

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Josip Barišić

**Varijacija masnokiselinskog sastava lipidnih  
frakcija i antioksidativni status europske plosnate  
kamenice (*Ostrea edulis* L.) tijekom godine**

Doktorski rad

Osijek, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Josip Barišić

**Varijacija masnokiselinskog sastava lipidnih  
frakcija i antioksidativni status europske plosnate  
kamenice (*Ostrea edulis* L.) tijekom godine**

Doktorski rad predložen je Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije u  
svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti  
na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom  
studiju Molekularne bioznanosti – modul biologija mora

Osijek, 2015.



Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za ihtiopatologiju – biološke materijale Zavoda za kemiju materijala na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu te na Zavodu kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Rozalindre Čož-Rakovac i prof. dr. sc. Ivančice Delaš, u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH: (098-1782739-2749) “Substancična, biokemijska i filogenetska raznolikost tkiva riba, rakova i školjkaša”, kojega je voditeljica dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** Biologija i Biotehnologija

### Varijacija masnokiselinskog sastava lipidnih frakcija i antioksidativni status europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* L. tijekom godine

Josip Barišić, dr. vet. med.

**Rad je izrađen u:** Laboratoriju za ihtiopatologiju - biološke materijale, Zavoda za kemiju materijala na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu i na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Mentori:** dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac  
prof. dr. sc. Ivančica Delaš

**Kratki sažetak doktorskog rada:** Na temelju saznanja o povezanosti varijacija masnokiselinskog sastava tkiva školjkaša i promjena čimbenika okoliša tijekom uzgoja, određen je biokemijski profil tkiva europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) s naglaskom na sastav masnih kiselina različitih lipidnih frakcija i antioksidativni status. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoje li promjene u sastavu masnih kiselina lipidnih frakcija tkiva kamenice, posebice n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina i/ili promjene oksidativnog statusa tijekom godine, te usporediti rezultate s promjenama okolišnih čimbenika u uzgajalištu na području Malostonskog zaljeva. Biokemijski sastav, masnokiselinski sastav ukupnih lipida i lipidnih frakcija: triacilglicerola, fosfolipida i slobodnih masnih kiselina, te aktivnost antioksidativnih enzima i koncentracije produkata lipidne peroksidacije analizirani su u tkivu kamenica tijekom godišnjeg ciklusa u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010. godine. Na promjene u masnokiselinskom sastavu lipida najveći utjecaj imale su promjene temperature mora, otopljenog kisika, pH mora te sadržaj organske i anorganske tvari u moru. Matematičkim modeliranjem uočena je značajna povezanost i predviđanje razine antioksidativnog statusa tkiva kamenica s promjenama okolišnih čimbenika. U radu se po prvi put opisuje utjecaj različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika okoliša na lipidni profil i oksidativni status europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) uzgajane u Malostonskom zaljevu, području najveće proizvodnje školjkaša u Hrvatskoj.

**Broj stranica:** 178

**Broj slika:** 75

**Broj tablica:** 41

**Broj literaturnih navoda:** 239

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** europska plosnata kamenica, lipidne frakcije, masne kiseline, antioksidativni sustav, godišnji ciklus, *Ostrea edulis* L.

**Datum obrane:** 12. svibnja 2015.

### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. **Prof. dr. sc. Branko Glamuzina**, redoviti profesor Sveučilišta u Dubrovniku-Odjela za akvakulturu, predsjednik;
2. **Dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac**, znanstvena savjetnica Insituta Ruđer Bošković, mentor 1 i član;
3. **Prof. dr. sc. Ivančica Delaš**, izvanredna profesorica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, mentor 2 i član;
4. **Dr. sc. Tomislav Šmuc**, znanstveni savjetnik Insituta Ruđer Bošković, član;
5. **Prof. dr. sc. Vera Cesar**, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
6. **Dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović**, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, zamjena;

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik

PhD Thesis

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

**Scientific Area:** Interdisciplinary Field of Science (Natural sciences and Biotechnical sciences)

**Scientific Fields:** Biology and Biotechnology

**Variation of fatty acid composition of lipid fractions and antioxidant status of the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) during annual cycle**

Josip Barišić, D.V.M.

**Thesis performed at:** Laboratory for ichthyopathology-biological materials, Department of Chemistry Materials, Ruđer Bošković Institute, Zagreb and Department of Medical Chemistry and Biochemistry, School of Medicine, University of Zagreb

**Supervisors:** Rozelindra Čož-Rakovac, Ph. D., Scientific Advisor;  
Ivančica Delaš, Ph. D., Associate Professor

**Short abstract:** Based on the knowledge about the correlation in changes of fatty acids profile in the oysters tissue due to annual changes during the breeding season, biochemical profile of the of European flat oysters (*Ostrea edulis* L.) tissue, with the emphasis on fatty acid composition of different lipid fractions and antioxidative status, were determined. The aim of this study was to investigate whether there are annual changes in the fatty acid composition of oysters tissue, especially n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and/or changes in oxidative status, and to compare the results with changes of environmental factors on a farm in the area of Mali Ston Bay. Biochemical composition, fatty acid composition of total lipids and lipid fractions: triglycerides, phospholipids and free fatty acids were analyzed during the annual cycle in the period from April 2009 to March 2010. Changes in lipid and fatty acid content appear due to differences in seawater temperature, dissolved oxygen, pH and content of organic and inorganic substances in the seawater. Mathematical modeling reveals a significant predictive link between the level of tissue antioxidant status of cultivated oysters and changes of environmental factors.

This paper describes for the first time the influence of different abiotic and biotic environmental factors on the lipid profile and oxidative status of the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) grown in Mali Ston bay, the largest area of shellfish production in Croatia.

**Number of pages:** 178

**Number of figures:** 75

**Number of tables:** 41

**Number of references:** 239

**Original in:** Croatian

**Key words:** European flat oyster, lipid fractions, fatty acids, antioxidative system, year round, *Ostrea edulis* L.

**Date of the thesis defense:** 12. May 2015.

## **Reviewers:**

1. **Branko Glamuzina, Ph. D.**, Full Professor, University of Dubrovnik-Department for Aquaculture, president;
2. **Rozelindra Čož-Rakovac, Ph. D.**, supervisor 1 and member;
3. **Ivančica Delaš, Ph. D.**, Associate Professor, School of Medicine, University of Zagreb, supervisor 2 and member;
4. **Tomislav Šmuc, Ph. D.**, Institute, member;
5. **Vera Cesar, Ph. D.**, Full Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member;
6. **Ivančica Strunjak-Perović, Ph. D.**, substitute;

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## Zahvala

Želim izraziti najveću zahvalnost voditeljici dr. sc. Rozelindri Čož-Rakovac na predloženoj temi, konstruktivnim savjetima i živopisnim diskusijama tijekom izrade disertacije.

Najtoplije se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivančici Delaš na savjetima oko izvedbe eksperimentalnog rada, tumačenju rezultata te podršci i razumijevanju pri izradi ove disertacije.

Za prikupljanje uzoraka i podataka s uzgajališta kamenica zahvaljujem se dr. sc. Ani Gavrilović, dr. sc. Jurici Jug Dujaković, Marini Brailo, dipl. ing. i Antoniu Radetiću, mag. ing. maricult.

Srdačno se zahvaljujem članovima Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a naročito Goranu Kapustiću, te svima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Iznimno sam zahvalan svim članovima mog Laboratorija za ihtopatologiju - biološke materijale Instituta "Ruđer Bošković" na nesebičnom prijenosu znanja, stručnim savjetima, uputama te strpljivosti.

Zahvaljujem dr.sc. Blanki Beer Ljubić, dr.sc. Branki Mihaljević, Ivani Tartaro, dipl. ing. kem. i dr. sc. Ana-Mariji Domijan, što su mi svojom ekspertizom pomogle u provođenju analiza oksidativnog stresa.

Zahvaljujem članovima povjerenstva za ocjenu i obranu ovog doktorskog rada prof. dr. sc. Veri Cesar, prof. dr. sc. Branku Glamuzini i dr. sc. Tomislavu Šmucu na čitanju rada i konstruktivnim savjetima.

Veliko hvala mr. sc. Alanu Ramiću, mag. pharm., na bezuvjetnoj pomoći i podršci tijekom prijave teme i pisanja doktorata.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima za strpljenje, poticaje i odricanja tijekom školovanja.

Hvala

Josip



## KRATICE

AA	C 20:4n-6	arahidonska kiselina
ANOVA		jednosmjerna analiza varijance
C 16:1 n-7/9		heksadekanoična kiselina
C 18:1 n-9 <i>cis</i> -9		oktadekanoična kiselina
C 20:1 n-9		gondoična kiselina
CAT		katalaza
DHA	C 22:6n-3	dokozaheksaenska kiselina
DO		otopljeni kisik
EPA	C 20:5n-3	eikozapentaenska kiselina
ETA	C 20:4n-3	Eikozatetraenoična acid
FA		masne kiseline
FAME		metilni ester masnih kiselina
FFA		slobodne masne kiseline
GC		plinska kromatografija
GPx		glutation-peroksidaza
GR		glutation-reduktaza
GSH		reducirani glutacion
GSSG		oksidirani glutacion
GST		glutation S-transferaza
H <sub>2</sub> O		voda
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		vodikov peroksid
KW		Kruskal-Wallis test
LA	C 18:2n-6	linolna kiselina
LNA	C 18:3n-3	α-linolenska kiselina
LP		lipidni peroksidi
LPO		lipidna peroksidacija
MDA		malondialdehid
MUFA		jednostruko nezasićene masne kiseline
n-3/6/9		omega 3/6/9
NADP <sup>+</sup>		nikotinamid adenin
NADPH		nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirani)
NH <sub>3</sub> <sup>-</sup>		amonijak
NMID		nemetilen prekinute dienoična (masna kiselina)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		nitriti
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		nitriti
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>		superoksid anion radikal
OH <sup>•</sup>		hidroksi radikal
PCA		analiza glavnih komponenata
PIM		ukupna anaorganska tvar
PL		fosfolipidi
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		fosfati
POM		ukupna organska tvar
PUFA		višestruko nezasićene masne kiseline
ROS		reaktivne kisikove vrste
S		salinitet
SD		standardna devijacija
SFA		zasićene masne kiseline
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		sulfati
SOD		superoksid dismutaza
T		temperatura
TAG		triacilgiceroli
TBARS		tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance
TPM		ukupna partikularna tvar
UI		indeks nezasićenosti
UL		ukupni lipidi

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Svrha i cilj istraživanja</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3. Biološke i ekološke značajke europske plosnate kamenice (<i>Ostrea edulis</i> L.)</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4. Uzgoj kamenica u Malostonskom zaljevu</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5. Značajke istraživanog područja</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6. Biokemijski sastav mesa školjkaša</b> .....	<b>12</b>
<b>1.7. Lipidni sastav mesa školjkaša</b> .....	<b>13</b>
<b>1.8. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor u školjkaša</b> .....	<b>18</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Postavljanje pokusnog uzgajališta</b> .....	<b>21</b>
2.1.1. Određivanje osnovnih hidrografskih parametara .....	22
2.1.2. Određivanje koncentracije ukupne partikularne tvari .....	22
2.1.2.1. Određivanje koncentracije organske i anorganske partikularne tvari .....	22
2.1.3. Određivanje hranjivih soli .....	23
<b>2.2. Uzorkovanje kamenica</b> .....	<b>24</b>
2.2.1. Određivanje indeksa kondicije i biokemijskog sastava europske plosnate kamenice .....	24
2.2.1.1. Određivanje masenog udjela lipida.....	25
2.2.1.2. Određivanje masenog udjela proteina.....	25
2.2.1.3. Određivanje masenog udjela glikogena .....	25
2.2.2. Razdvajanje lipidnih frakcija .....	26
2.2.3. Tankoslojna kromatografija.....	27
2.2.4. Priprema metilnih estera masnih kiselina.....	28
2.2.5. Plinska kromatografija.....	28
<b>2.3. Određivanje oksidativnog oštećenja</b> .....	<b>30</b>
2.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) .....	30
2.3.2. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR) .....	30
2.3.3. Određivanje lipidnih peroksida (LP).....	31
2.3.4. Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA).....	31
<b>2.4. Statistička obrada podataka</b> .....	<b>32</b>
<b>2.5. Matematičko modeliranje</b> .....	<b>32</b>
<b>3. REZULTATI</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Osnovni hidrografski parametri</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2. Indeks kondicije i biokemijski sastav tkiva kamenica</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3. Sastav masnih kiselina lipidnih frakcija kamenica</b> .....	<b>45</b>
3.3.1. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida .....	45
3.3.2. Sastav masnih kiselina frakcije triacilglicerola.....	55

3.3.3. Sastav masnih kiselina frakcije fosfolipida .....	63
3.3.4. Sastav slobodnih masnih kiselina.....	70
<b>3.4. Antioksidativni status kamenica .....</b>	<b>76</b>
<b>3.5. Faktorska struktura obilježja sezone .....</b>	<b>80</b>
3.5.1. PCA analiza biokemijskog sastava tkiva kamenica.....	81
3.5.2. PCA analiza masnokiselinskog sastava ukupnih lipida tkiva kamenica .....	84
3.5.3. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije triacilglicerola tkiva kamenica.....	88
3.5.4. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije fosfolipida tkiva kamenica.....	92
3.5.5. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije slobodnih masnih kiselina tkiva kamenica..	96
<b>3.6. PCA analiza (anti) oksidativnog statusa tkiva kamenica .....</b>	<b>101</b>
<b>3.7. Obilježja čimbenika okoliša prema godišnjim dobima .....</b>	<b>104</b>
<b>3.8. Promjene biokemijskog sastava, masnokiselinskog sastava lipida i lipidnih frakcija i antioksidativnog statusa kamenica prema godišnjim dobima .....</b>	<b>106</b>
3.8.1. Promjene biokemijskog sastava kamenica prema godišnjim dobima .....	106
3.8.2. Promjene masnokiselinskog sastava ukupnih lipida kamenica prema godišnjim dobima ..	111
3.8.3. Promjene masnokiselinskog sastava triacilglicerola u tkivu kamenica prema godišnjim dobima .....	116
3.8.4. Promjene masnokiselinskog sastava lipidne frakcije fosfolipida kamenica prema godišnjim dobima .....	119
3.8.5. Promjene masnokiselinskog sastava lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina kamenica prema godišnjim dobima .....	121
<b>3.9. Promjene (anti) oksidativnog statusa kamenica prema godišnjim dobima.....</b>	<b>123</b>
<b>3.10. Matematičko modeliranje.....</b>	<b>124</b>
3.10.1. Predviđanje relativnog masenog udjela n-3 PUFA tijekom godine.....	126
3.10.2. Predviđanje omjera n-3/n-6 PUFA tijekom godine.....	128
3.10.3. Predviđanje omjera AA/DHA tijekom godine.....	130
3.10.4. Predviđanje omjera AA/EPA tijekom godine.....	132
3.10.5. Predviđanje koncentracije lipidnih peroksida (LP) tijekom godine.....	134
3.10.6. Predviđanje koncentracije malondialdehida (MDA) tijekom godine.....	136
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>138</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>151</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>154</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>171</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>173</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>175</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Svrha i cilj istraživanja

Morski organizmi iz razreda *Bivalvia* imaju veliku važnost u akvakulturi zbog svog biokemijskog sastava i prehrambene vrijednosti (Linehan i sur., 1999). Europska plosnata kamenica (*Ostrea edulis* L.) jedna je od najvažnijih vrsta školjkaša uzgajanih u Europi (González-Araya i sur., 2012). Uzgoj školjkaša u Jadranskom moru ima višestoljetnu tradiciju, a Malostonski zaljev jedno je od rijetkih područja, ne samo u Jadranu nego i šire, gdje se zbog posebno povoljnih ekoloških i produkcijskih uvjeta odvija prirodan i nesmetan životni ciklus niza vrsta školjkaša (Basioli, 1981).

Dosadašnja istraživanja lipida morskih organizama pokazuju da masnokiselinski sastav ovisi o mnogim biološkom i okolišnim čimbenicima, poput vrste hrane i temperature mora (Linehan i sur., 1999). Iako je masnokiselinski sastav kamenica određivan u mnogim morima, za područje Jadranskog mora nema dostupnih podataka, osim ukupnih lipida probavne žlijezde i mišića zatvarača (Ezgeta-Balić i sur., 2013). U ovom istraživanju ukupni lipidi dodatno su razdvajani na pojedine frakcije, te je u njima određivan masnokiselinski sastav kako bi se što preciznije odredio fiziološki status u uzgojnoj sredini. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o antioksidativnom statusu tkiva kamenica na ovom prostoru. Stoga je cilj ovog istraživanja bio po prvi puta odrediti i usporediti sastav masnih kiselina ukupnih lipida i lipidnih frakcija: triacilglicerola, fosfolipida i slobodnih masnih kiselina u tkivu kamenica iz Malostonskog zaljeva u odnosu na godišnje promjene okolišnih čimbenika kao što su temperatura mora, salinitet, otopljeni kisik, pH mora, prisutnost hranjivih tvari (organska i anorganska partikularna tvar), te otopljene hranjive soli (nitrati, nitriti, fosfati i sulfati) i koncentracija amonijaka. Dodatno su određeni i omjeri pojedinih masnih kiselina kao važan čimbenik koji doprinosi kvaliteti uzgajanih kamenica i omogućava bolje razumijevanje metaboličkih puteva sinteze masnih kiselina, a varijabilnost ovih omjera uvjetovana je promjenama u okolišu. Zadatak je bio, pored navedenog, po prvi put odrediti i aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-reduktaze (GR), te koncentraciju lipidnih peroksida (LP) i malondialdehida (MDA) u tkivu kamenica, koji pružaju uvid u stupanj oksidativnog stresa kroz uzgojnu sezonu.

Kroz hipotezu je testirano jesu li promjene udjela pojedinih višestruko nezasićenih masnih kiselina (*Polyunsaturated fatty acids, PUFA*), aktivnost antioksidativnih enzima i biokemijski sastav tkiva kamenica povezani s različitim godišnjim dobima. Pratili smo u kojoj mjeri abiotički i biotički čimbenici u uzgoju utječu na promjene u lipidnom i biokemijskom sastavu, te na razinu oksidativnog stresa kamenica uzgajanih u Malostonskom zaljevu. Dobiveni rezultati uspoređeni su s relevantnom znanstvenom literaturom.

Istraživanje je provedeno kroz terenski rad (postavljenje pokusa i mjesečna uzorkovanja) i tri faze laboratorijskih analiza, te kroz obradu podataka. U prvoj fazi laboratorijskih analiza određen je biokemijski sastav tkiva kamenice koji uključuje analizu ukupnih lipida, proteina i glikogena. U drugu fazu uključena je analiza masnokiselinskog sastava ukupnih lipida, te pojedinih frakcija lipida (triacilglicerola, fosfolipida i slobodnih masnih kiselina), a u trećoj fazi procijenjen je antioksidativni status tkiva kamenica (mjerenje aktivnosti enzima SOD i GR, te koncentracije lipidnih peroksida i malondialdehida). Prilikom obrade podataka korišteni su precizni statistički alati za utvrđivanje međusobne ovisnosti istraživanih varijabli, te matematičko modeliranje za predviđanje varijacija masnokiselinskog sastava i stupnja oksidacijskog stresa

kroz godišnji ciklus.

U prirodnim uvjetima, rast i kondicija kamenica, odraz su međusobne interakcije svih navedenih okolišnih čimbenika, a najniže vrijednosti kod zdravih kamenica utvrđene su tijekom razdoblja neposredno nakon mrijesta. Prethodne studije na vrsti kraljevske školjke (*Pecten maximus* L.) u Španjolskoj pokazale su da se promjene odvijaju na ukupnim lipidima, uglavnom triacilglicerolima, a manje na fosfolipidima (Pazos i sur., 1997a). U literaturi najčešće spominjani čimbenici okoliša koji se odnose na nekontaminirana područja jesu: dostupnost hrane, temperatura, salinitet i zasićenost kisikom (Ruiz i sur., 1992; Jasprica i sur., 1997a; Haure i sur., 1998; Sarà i sur., 2008). S obzirom da se spomenute varijable razlikuju na različitim geografskim područjima, Ruiz i sur. (1992.) navode da je za svako uzgojno područje potrebno utvrditi vrijeme mrijesta i promjene biokemijskog sastava u ovisnosti o čimbenicima okoliša. Uz navedeno, lipidni status je ujedno i pokazatelj tržišne kvalitete kamenica, te nam njegova vrijednost može ukazati na iskoristivost određenog područja za uzgoj kamenica (Gavrilović i sur., 2011). Hrana iz mora, uključujući i školjkaše, glavni je izvor n-3 PUFA kiselina za ljudsku prehranu. Za ove masne kiseline već je dokazano da imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje i smanjenje rizika od povišenog krvnog tlaka i triglicerola u krvi, te mnogih drugih bolesti (Delaš, 2011). Podaci dobiveni u ovom istraživanju pružiti će korisne informacije za akvakulturnu industriju kamenica kao i za prehrambene navike potrošača. Uzgoj kamenica predstavlja važnu granu u marikulturi, a ovakva istraživanja pomažu u popularizaciji akvakulturnog uzgoja i poticaj su uzgoju školjkaša u Hrvatskoj. Za očekivati je da će rezultati ove disertacije doprinijeti boljem razumijevanju utjecaja okolišnih čimbenika na biokemijski sastav i sastav masnih kiselina lipidnih frakcija, te dati uvid u antioksidativni status kamenica kroz godišnji uzgojni ciklus, što je prvi korak u utvrđivanju povezanosti vanjskih utjecaja na kvalitetu mesa i zdravlje kamenica. Rezultati ovog istraživanja također prikazuju varijabilnost antioksidativnog statusa tijekom godine na referentnom mjestu bez zagađenja, hranjivu vrijednost školjkaša, razdoblje najpogodnije za njihovu konzumaciju, te pridonose kontroliranoj proizvodnji i optimiziranju uzgoja ove vrste u budućnosti.

Ovim radom su po prvi puta korištene metode matematičkog modeliranja kako bi se dobili modeli koji najbolje opisuju predviđanja fluktuacije udjela masnih kiselina i antioksidativnog statusa tkiva kamenica u ovisnosti o fizikalno-kemijskim parametrima mora (temperatura, salinitet, zasićenje kisikom i koncentracija hranjivih soli i tvari) kroz razdoblje od godinu dana. Ovi modeli mogu se primijeniti i na druge vrste školjkaša, za promicanje kvalitete hrane iz mora, poboljšanje uvjeta uzgoja i proizvodnje, kao i optimiziranje uvjeta u kontroliranim pokusima.

## 1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja

Lipidi školjkaša predmet su brojnih istraživanja zbog visokog sadržaja n-3 i n-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), za koje je dokazana pozitivna uloga u prevenciji određenih bolesti kod ljudi (Delaš, 2011).

Zbog relativno duge uzgojne sezone, sastav masnih kiselina tkiva kamenica predstavlja integrirani rezultat interakcija endogenih i egzogenih promjena, te služi kao biomarker kvalitete (Navarro i sur., 2000; Egtesadi-Araghi i Bastami, 2011). Istraživanja su pokazala kako promjene fiziološkog stanja tijekom uzgoja školjkaša mogu rezultirati promjenom sastava PUFA u sastavu ukupnih lipida. Ove promjene opisane su kod nekoliko vrsta morskih mekušaca, a općenito se odnose na ciklus rasta i sazrijevanja gonada (Navarez i sur., 2009., Sajjadi i sur., 2009a). Godišnje varijacije u masnokiselinskom sastavu ovise o temperaturi mora, dostupnosti hrane i drugim vanjskim čimbenicima (Freits i sur., 2009; Hannachi i sur., 2011). Najčešće analizirani profil masnih kiselina jest sastav ukupnih lipida i triacilglicerola (TAG) s obzirom da čine depo masti čiji je masnokiselinski sastav podložniji promjenama (Zlatanov, 2008). U novije vrijeme pokazala se potreba za detaljnijim istraživanjima masnokiselinskog sastava fosfolipida (PL) iz staničnih membrana te slobodnih masnih kiselina u svrhu što boljeg i preciznijeg određivanja fiziološkog statusa školjkaša (Pernet i sur., 2006).

Posljednjih nekoliko godina korišteni su različiti biokemijski i fiziološki odgovori školjkaša uzrokovani promjenama okolišnih čimbenika kako bi se procijenio zdravstveni status organizama (Egtesadi-Araghi i Bastami, 2011.). Kako je temperatura ključna odrednica u bio-geografskoj distribuciji morskih organizama, tako se ovisno o temperaturi okoliša mijenja brzina kemijskih i enzimskih reakcija te fluidnost membrana (Abad i sur., 1995). Temperatura mora izravno utječe na vrijeme i intenzitet razmnožavanja, aktivnost filtriranja i brzinu rasta školjkaša (Glamuzina i Dulčić, 2009). Pad temperature obično smanjuje propusnost membrane, što može dovesti do membranske disfunkcije. Školjkaši imaju sposobnost prilagodbe promjenama temperature tako što mijenjaju sastav membranskih lipida na način da ugrađuju više nezasićenih masnih kiselina u membrane te održavaju funkcionalnost membrana putem promjena u PL, odnosno sastavu masnih kiselina i sadržaju kolesterola (Hazel, 1995). Salinitet mora i količina otopljenog kisika također utječu na fiziologiju i rast školjkaša školjkaša, a samim time i na masnokiselinski sastav (Dridi i sur., 2007). Značajnu ulogu u modeliranju sastava masnih kiselina ima i količina otopljenih soli u moru (nitrati, nitriti, sulfati, fosfati) jer djeluju kao regulatori rasta fitoplanktona (Strunjak-Perović, 2010). Promjene molarnih omjera otopljenih hranjivih soli utječu na rast i razvoj pojedinih vrsta fitoplanktona. Prekomjerni porast koncentracije otopljenih hranjivih soli može dovesti i do promjena u stupnju zasićenosti mora kisikom te do porasta abudancije i biomase fitoplanktona pa tako i do cvata toksičnih vrsta fitoplanktona. S druge strane, njihova smanjena koncentracija dovodi do smanjene abudancije fitoplanktona, što se također može negativno odraziti na kakvoću i mrijest školjkaša. Povećana koncentracija amonijaka označava lošu kvalitetu uzgojne sredine i može toksično djelovati na kamenice (Gavrilović, 2011).

Unatoč navedenim podacima, sezonalitet i učinak okolišnih čimbenika na promjene u sastavu masnih kiselina školjkaša u Jadranskom moru nije dovoljno proučavan. Prethodne studije i analize mesa kamenice bile su usredotočene uglavnom na kondicijski indeks i osnovne biokemijske parametre (Gavrilović i sur., 2010).

Mnoge studije o antioksidativnoj aktivnosti enzima organizama koji žive u vodi, osobito školjkaša, osmišljene su kako bi pružile podatke za komparativne studije, odnosno kako bi se ispitali učinci okolišnih čimbenika,

npr. dostupnost hrane, sezonske varijacije i utjecaj zagađivala (Viarengo i sur., 1991). Navedeni čimbenici okoliša mogu djelovati stresno i poticati stvaranje reaktivnih spojeva kisika (*reactive oxygen species*, ROS) (Sheehan i Power, 1999). Kao temperaturno ovisni organizmi, školjkaši se sustavno prilagođavaju fluktuacijama u okolišu, prilagodbom metaboličkih procesa, a posljedično tome i oscilacijama u razini reaktivnih kisikovih spojeva (Sheehan i Power, 1999). Stoga se razina slobodnih radikala, stupanj oksidativnog oštećenja i antioksidativni status izravno povezuju s temperaturom okoliša i razinom metaboličkih aktivnosti (Borković i sur., 2005). Studije o biljezima oksidativnog stresa vezanim za sezonalne promjene u poikilotermnih organizama dokazale su snažnu povezanost s metaboličkim statusom (Pereira i sur., 2013), što znači da je u trenutku usporenog metabolizma niža i antioksidacijska obrana.

Istraživanja biokemijskog sastava, lipidnog statusa i antioksidativnog stanja omogućuju pronalaženje veza između utjecaja abiotičkih i biotičkih čimbenika okoliša na stanične reakcije (Niyogi i sur., 2001).

Europska plosnata kamenica najcjenjenija je vrsta kamenica na tržištu, no njena je populacija tijekom druge polovine prošlog stoljeća u većini europskih zemalja desetkovana pojavom teških parazitarnih bolesti bonamioze i martelioze (da Silva i sur., 2005). Malostonski zaljev je jedno od rijetkih područja koje je pošteđeno ovih gubitaka i u kojem je samonikla kamenica opstala, te je još uvijek jedina nazočna vrsta kamenica (Carić i sur., 2000a; Peharda, 2003). Budući da se ovo područje svrstava u najvišu zonu produktivnosti u Jadranskom moru, ova vrsta se ovdje uspješno uzgaja te se ulažu znatni naponi za povećanje njezine proizvodnje i unapređenje tehnologije uzgoja (Glamuzina, 2009). Osnovna obilježja kvalitete konzumne kamenice, pored zdravstvene ispravnosti koja se podrazumijeva, predstavljaju kvaliteta i sastav mesa. Kvaliteta mesa varira tijekom godine i u prvom redu ovisi o sezoni mriještenja, promjeni čimbenika okoline, te o eventualnoj pojavi bolesti. U optimalnim uvjetima sredine, zdrava kamenica je najkvalitetnija u stadiju gonadnog mirovanja, odnosno u hladnijem razdoblju godine (Gavrilović i Petrinc, 2003). S obzirom da kamenicu kao takvu treba očuvati i zaštitom na tržištu osigurati njezino diferenciranje od drugih sličnih proizvoda, nužno je načiniti njezinu specifikaciju. Za izradu specifikacije potrebno je primijeniti sve dostupne analitičke metode kako bi se svojstva ovog vrijednog proizvoda marikulture što detaljnije opisala (Jug-Dujaković, 2008). Zbog preplavljenosti tržišta uvezenim plodovima mora „nepoznatog porijekla“, i sve zahtjevnijeg i izbirljivijeg potrošača, potrebno je europskoj plosnatoj kamenici uzgajanoj u Malostonskom zaljevu dodati i ova obilježja, odnosno odrediti njezin masnokiselinski profil. Budući da do sada nije detaljno provedena analiza lipidnog profila malostonskih kamenica, cilj istraživanja je odrediti njezin masnokiselinski sastav, utvrditi specifičnost proizvoda obzirom na kvalitetu mesa i uzgojne sredine te na taj način upotpuniti specifikaciju (Glamuzina i sur., 2009). Ovakve analize predstavljaju mogućnost za do  
nom proizvodu.

Istraživanja u Malostonskom zaljevu tijekom proteklih godina uglavnom su se bavila uzgojnim i prirodnim populacijama školjkaša s ciljem boljeg poznavanja biologije i ekologije vrsta te unaprjeđenja uzgojnih tehnologija kako bi se optimizirala proizvodnja (Gavrilović i Petrinc, 2003). Unatoč brojnim istraživanjima posvećenim biologiji i ekologiji vrste *Ostrea edulis* L. u Malostonskom zaljevu (Gavrilović, 2011), informacije o biokemijskom sastavu i sastavu masnih kiselina vrlo su oskudne. Prilog poznavanju hranidbenih navika četiri vrste školjkaša kroz lipidni i izotopni status dala je Ezgeta-Balić i sur., 2012. i 2014. Utjecaj dubine na rast i preživljavanje kamenice istraživali su Zrnčić i sur. (2007). Gavrilović i sur. (2007) te Kljaković-Gašpić i sur. (2007) istraživali su koncentracije teških metala u tkivu kamenice i dagnje. Čimbenike koji ograničavaju produkciju fitoplanktona i zooplanktona u malostonskom zaljevu istraživali su Čalić i sur. (2013). Prirast kamenica na različitim dubinama i uvalama u Malostonskom zaljevu istraživao je Radetić (2010), za

razdoblje od deset mjeseci na različitim dubinama. Rezultati istraživanja ukazuju da je najbolji mjesečni prirast tijekom navedenog razdoblja bio na 4 metra dubine. Prethodna istraživanja kemijskog sastava mesa kamenice iz Malostonskog zaljeva obavljena su kroz jednogodišnje razdoblje (Carić i sur., 2000b). Analizirana je količina vode u mesu, te anorganski (suha tvar) i organski sastav (protein, ugljikohidrati i glikogen). Prema rezultatima ovog istraživanja utvrđene su promjene mjerenih vrijednosti te je zaključeno kako se kemijski sastav tkiva kamenice mijenja ovisno o sezoni. Naime, količine glikogena i proteina se izmjenjuju prije, za vrijeme i poslije mrijesta. Nakon mrijesta količina glikogena i lipida opada, a količina proteina raste. Gavrilović i sur. (2008) proučavali su utjecaj indeksa kondicije kamenice i stupnja infestacije ljuštore polihetom *Polydora* spp. na kvalitetu mesa kamenice i utvrdili su da prema indeksu mesa kamenice najvećim dijelom godine spadaju u vrhunsku kategoriju, te da je utjecaj polihete na kvalitetu ljuštore minimalan.

### 1.3. Biološke i ekološke značajke europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.)

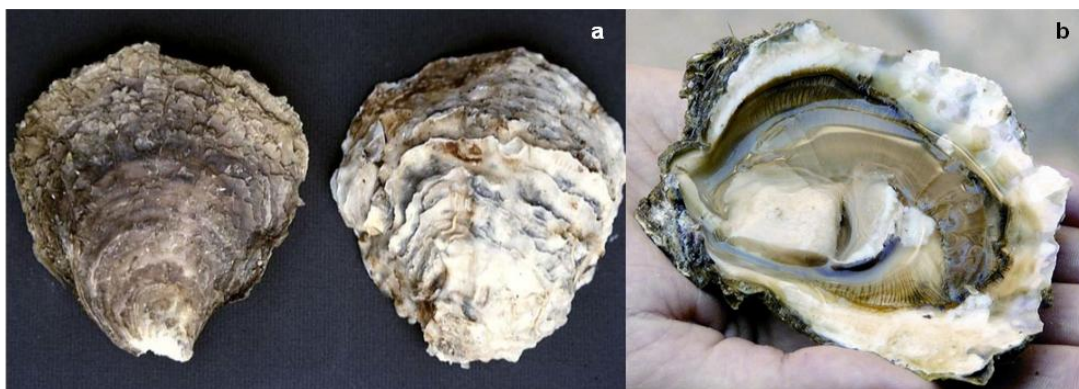
Suvremena podjela jestivih kamenica je na rodove: *Ostrea*, *Crassostrea*, *Saccostrea* (Australija) i *Tiostrea* (Čile). Osnovna razlika između rodova *Ostrea* i *Crassostrea* je u tome što kamenice iz roda *Ostrea* imaju okruglije i plosnatije ljuštore nego što su kod roda *Crassostrea* (Turgeon i sur., 1998) (Tablica 1.1).

**Tablica 1.1** Taksonomski položaj europske plosnate kamenice

Skupina	Naziv	Autor
Koljeno	Mollusca	-
Razred	Bivalvia	Linnaeus, 1758.
Podrazred	Pteriomorphia	Beurlen, 1944.
Red	Ostreoida	Ferussac, 1822.
Natporodica	Ostreoidea	Rafinesque, 1815.
Porodica	Ostreidae	Rafinesque, 1815.
Rod	<i>Ostrea</i>	Linnaeus, 1758.
Vrsta	<i>Ostrea edulis</i>	Linnaeus, 1758.

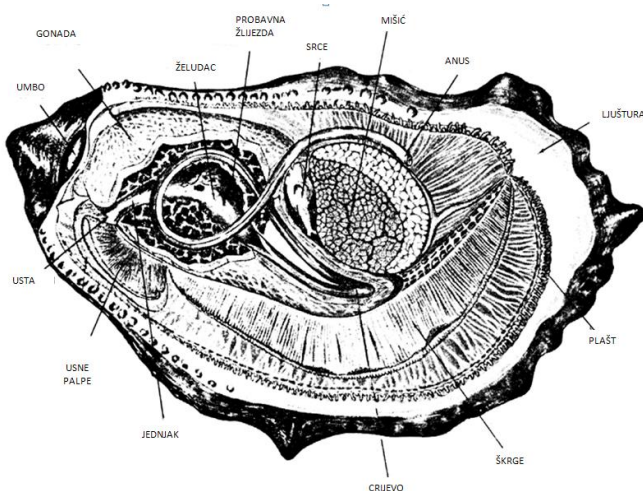
Prosječna veličina odraslih jedinki je od 6 do 9 cm. Na kamenici razlikujemo pliću, donju (lijevu) i dublju, gornju (desnu) ljušturu. Boja kamenice je sivokamenasta sa sivomaslinastim primjesama. Ljuštore su nepravilna, ovalnog do jajastog oblika, nepravilnih rubova, čvrste građe, katkada lomljive i nesimetrične (Slika 1.1 a). Unutrašnjost ljuštura je biserno-bijele ili plavkasto-sive boje. Ispod ljuštore školjke nalazi se plašt koji je mekane do čvrste konzistencije i obavija cijelo tijelo (FAO, 2004-2015) (Slika. 1.1 b).





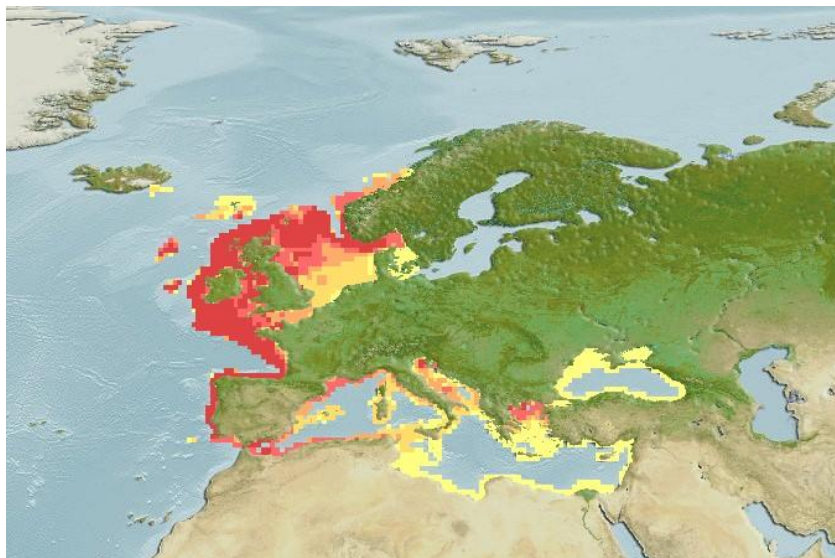
**Slika 1.1** Europska plosnata kamenica, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758

a) ljuštore b) meko tkivo (www.fao.org)



**Slika 1.2** Morfolologija mekog tkiva kamenica (Radetić, 2010)

Meko tkivo *O. edulis* shematski je prikazano na Slici 1.2. Usta se nalaze u blizini umbra i okružena su usnim palpama, a škrge se prostiru duž donjeg dijela tijela. Kamenice karakterizira središnji aduktorni mišić koji omogućuje zatvaranje i otvaranje ljuštore. Visceralna masa smještena je iznad škrge, između aduktora i zgloba, a čine je želudac s probavnom žlijezdom, crijeva, srce, bubrezi i gonade. Spolne žlijezde su povećane kada su u zreom stadiju razvoja. Boja gonada ovisi o stupnju gametogeneze i može biti tamnosmeđa ili zelena neposredno nakon mrijesta, odnosno krem-bijela u razdoblju nakupljanja energetskih rezervi za gametogenezu i tijekom gametogeneze (Laing i sur., 2006).



**Slika 1.3** Geografska rasprostranjenost europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* L. ([www.sealifebase.org](http://www.sealifebase.org))

Geografska rasprostranjenost prirodnih populacija ove vrste je od fjordova Norveške do Maroka (duž sjeveroistočne obale Atlanskog oceana) te u Sredozemnom moru, pa sve do crnomorskih obala. (Vercaemer sur., 2006) (Slika 1.3). Na istočnoj obali Jadrana kamenicu nalazimo u svim područjima koja su pod utjecajem slatke vode. Obitava na dubinama od 0,5 m do 50 m (Peharda i sur., 2010). Prema Ransonu (1951), rasprostranjenost europske kamenice određena je salinitetom i temperaturom mora, koji su ujedno limitirajući čimbenici njezina opstanka u periodu embrionalnih i ličinačkih stadija.

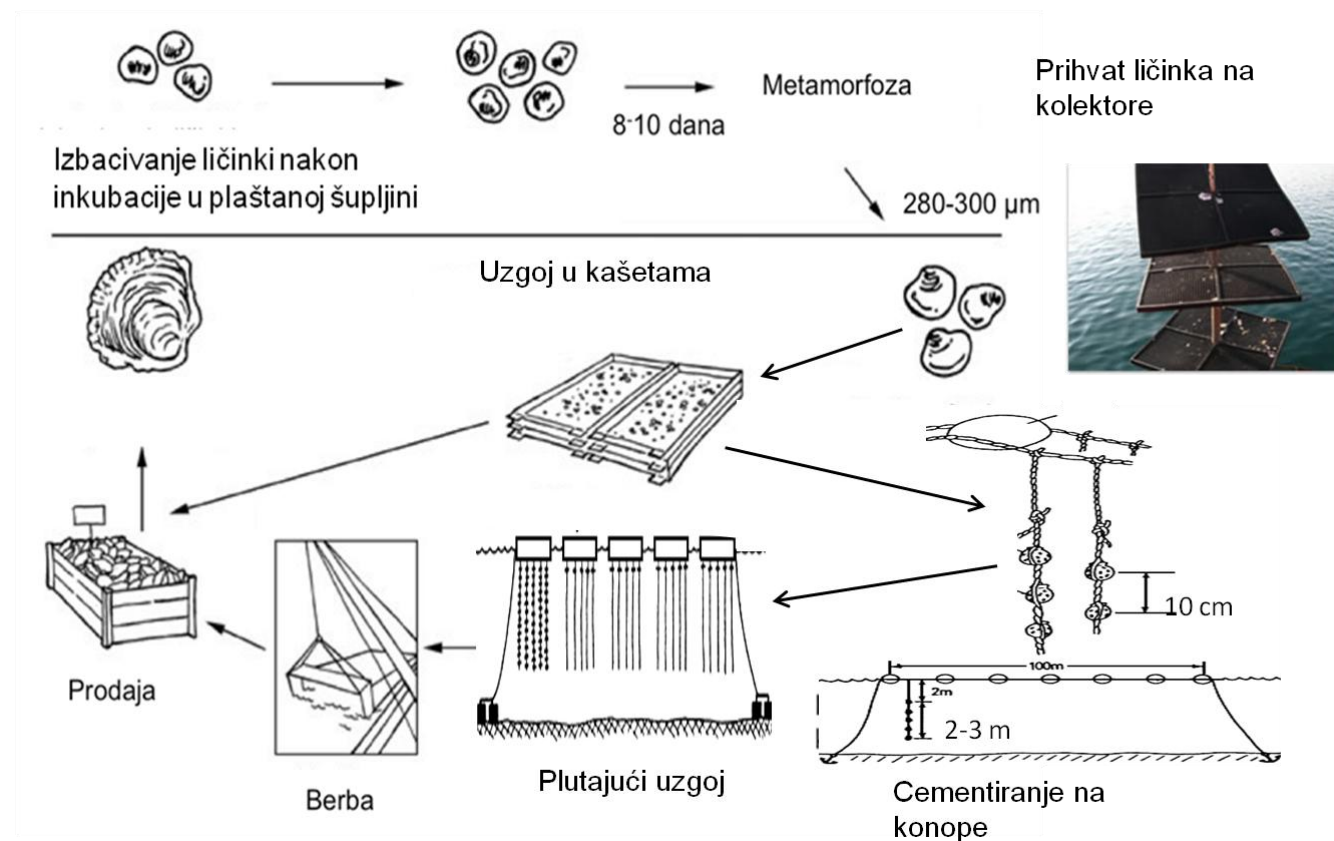
Europska plosnata kamenica je protoginički hermafrodit. Tijekom jednog reproduktivnog ciklusa spol mijenja dva puta. U prvoj fazi spolne zrelosti funkcionira kao mužjak, nakon toga slijedi inverzija spola, pa se pojavljuje razvojna faza ženke, te ponovna inverzija u mužjaka ali bez mogućnosti samooplodnje (Laing i sur., 2006; Lapègue i sur., 2007). Razvijanje muških i ženskih spolnih stanica teče kontinuirano tijekom godine, a izbacivanje spolnih produkata obavlja se sezonski pod utjecajem abiotičkih čimbenika iz okoliša (Gouletquer, 2004). Razdoblje razmnožavanja kod kamenice je karakteristično za proljeće i počinje sazrijevanjem spolnih stanica, jaja i spermija, a završava njihovim izbacivanjem u okoliš (Glamuzina, 2009). Za kamenice je karakteristično da se spermiji izbacuju iz plaštane šupljine u okoliš i bivaju morskim strujama doneseni do druge kamenice koja ima spolno zrele jajne stanice i tako se vrši oplodnja (da Silva i sur., 2005). U ovisnosti od ekoloških uvjeta i kondicije jedinke, postoje velike mogućnosti za višekratni mrijest, iako je to najčešće jednom u godini. Po iskustvu školjkara u Malostonskom zaljevu nekad su bila uočljiva dva maksimuma mrijesta, proljetni i jesenji. Danas je situacija nešto drugačija, prisutan je dugotrajni spolni ciklus koji počinje od samog proljeća te se produljuje i na topliji dio godine i nadovezuje na jesenski, s većim ili manjim oscilacijama (Marčelja, 2009).

## 1.4. Uzgoj kamenica u Malostonskom zaljevu

Uzgoj školjkaša u Malostonskom zaljevu ima višestoljetnu tradiciju, a prva uzgajana vrsta bila je upravo europska kamenica. Najraniji zapis o skupljanju kamenica s prirodnih rastilišta i uzgoja u Malostonskom zaljevu potječe još iz 1573. godine (Tomšić i Lovrić, 2004). Prvi podaci vezani za industrijsku proizvodnju

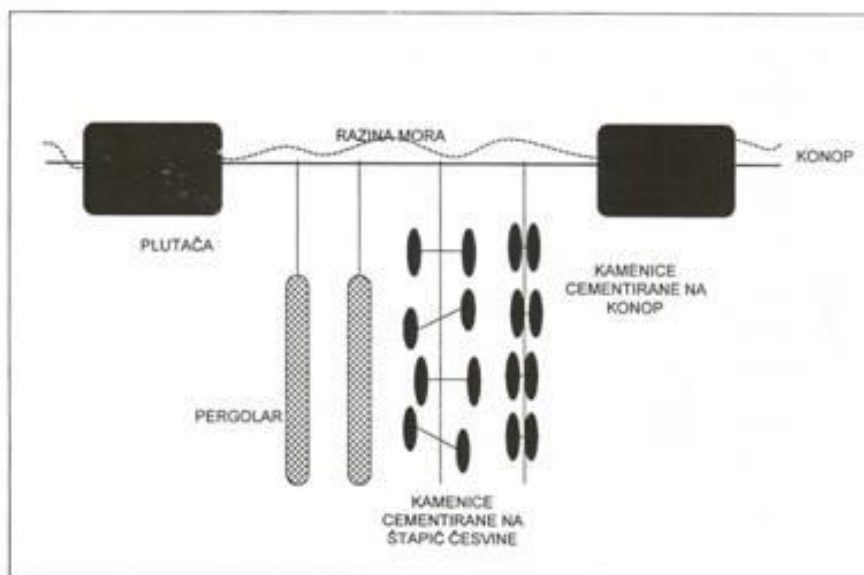
kamenica na ovom području datiraju iz 1911., kada je na Bistrini bilo uzgojeno 10 tona, a u uvali Bjejevica 6,8 tona kamenica. Godine 1990. u Hrvatskoj je proizvedeno 130 tona kamenica, a od toga je oko 60% proizvedeno u Malostonskom zaljevu (Benović, 1997). Prema službenim podacima Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva i Hrvatske obrtničke komore, 2011. i 2012. godine proizvodnja kamenica u Hrvatskoj je porasla s 55 na 155 tona godišnje.

Tehnologija uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu dijeli se u tri razdoblja: prihvat ličinka na kolektore i daljnji uzgoj na kolektorima; nakon čega slijedi skidanje mlađi i njezino cementiranje na uzgojne konope, te nakon toga izlov i prerada za tržište (Slika 1.4).



**Slika 1.4** Faze uzgoja kamenica (www.fao.org)

Kada mlađ dostigne veličinu od 4 do 5 cm skida se s kolektora i cementira na konope te uzgaja do konzumne veličine. Kamenice se cementiraju po dvije nasuprot u razmaku 10ak cm, a zatim se konopac veže na mjesto gdje će kamenice rasti do tržišne veličine. Umjesto cementiranja, kamenice se također mogu posložiti i u metalne kaveze. Ovaj tradicionalan način uzgoja primjenom plutajućih parkova, uz male izmjene, primjenjuje se kod nas od 1970ih godina (Slika 1.5). Uzgoj kamenica traje najviše tri godine, a za dostizanje komercijalne veličine kamenice od 90 mm duljine i mase od 65-80 g/kom, u Malostonskom zaljevu potrebne su dvije godine (Gavrilović i Petrinec, 2003).



**Slika 1.5** Uzgojni plutajući park za kamenice ([www.opcina-starigrad.hr](http://www.opcina-starigrad.hr))

U posljednje vrijeme prirodna nalazišta kamenice *Ostrea edulis* L. u većini europskih zemalja nisu toliko obilna da bi se iskorištavala za izlov u većoj mjeri. Hrvatska ima izuzetno povoljne uvjete za njezin uzgoj, što nije slučaj s drugim zemljama u kojima je zbog prelova ili bolesti trend uzgoja ove vrste silazan (Slika 1.6). Posljednjih četrdeset godina proizvodnja kamenica u svijetu bilježi drastičan pad zbog utjecaja parazitskih epizotija (*Bonamia ostreae* i *Marteilia refringens*). Posljedično tome svjetska marikultura usredotočila se na uzgoj Portugalske kamenice (*Crassostrea angulata*) i Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793). Francuska proizvodnja kamenica bilježi konstantan pad od 1960ih, ali i dalje proizvodi 1 500 tona godišnje. Prema podacima iz 2004. godine, glavninu svjetske proizvodnje kamenica imaju Španjolska (51 %) i Francuska (30 %). Irska i Hrvatska su druge dvije zemlje s proizvodnjom većom od 200 tona. Ukupna proizvodnja Europske plosnate kamenice čini manje od 0,11 % od ukupne svjetske proizvodnje kamenica, a glavninu (96,2 %) čini uzgoj Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas*) (Lapègue i sur., 2007). Pacifičku kamenicu, koja je znatno otpornija, a meso joj je slabije kvalitete, u Hrvatskoj nalazimo uz istarsku obalu - Limski kanal (Hrs-Brenko, 1982).



**Slika 1.6** Glavni uzgajivači *Ostrea edulis* L. u svijetu ([www.fao.org](http://www.fao.org))

Glavnina proizvodnje europske plosnate kamenice u Republici Hrvatskoj od davnina se odvija u Malostonskom zaljevu (Peharda i sur., 2003). Uzme li se u obzir činjenica da je *Ostrea edulis* vrlo cijenjena delikatesa, očuvanje i unapređenje njezina uzgoja na Jadranskoj obali, a osobito u Malostonskom zaljevu gdje je jedina nazočna vrsta kamenice, od izuzetnog je gospodarskoga značenja (Marčelja i sur., 2004). Jedan od integralnih planova razvoja školjkarstva Republike Hrvatske iz 2009. godine bio je povećati proizvodnju kamenica u Malostonskom zaljevu sa 100 tona na više od 3 000 tona godišnje (Glamuzina, 2009), međutim on do sada nije ostvaren. Razlozi zbog kojih predviđena proizvodnja nije ostvarena leže u neuređenim i neusklađenim prostornim planovima, neorganiziranosti uzgajivača, nepostojanju jakih udruga uzgajivača i dobrog marketinga, zastarjelim tehnologijama uzgoja, donedavnim barijerama prilikom izvoza na tržište Europske Unije, te porastu ponude proizvoda marikulture iz konkurentskih zemalja, a s biološke strane najveći problem je nepostojanje sigurne opskrbe s mlađi školjkaša (Glamuzina i sur., 2009). Krajem 2013. godine Republici Hrvatskoj su ukinute zabrane izvoza živih školjkaša u zemlje Europske Unije pa se na taj način povećalo tržište na koje se školjkaši mogu plasirati, što dodatno naglašava potrebu povećanja trenutne proizvodnje i kvalitete kamenica. Prema Nacionalnom strateškom planu razvoja akvakulture za razdoblje 2014. – 2020. godine, cilj je povećati proizvodnju kamenica sa 150 t na 1000 t godišnje. Ono je moguće ostvariti putem povećanja uzgoja na poznatim područjima, te popularizacijom kamenica kao funkcionalne hrane. Kako bi se optimizirala proizvodnja i izbjegle negativne posljedice koje marikultura može imati na okoliš, potrebno je dobro poznavati hidrografske značajke uzgojnih područja, te biologiju i ekologiju uzgajanih vrsta. Planirano povećanje proizvodnje europske plosnate kamenice sa stotinjak tona na tisuću tona na ovom prostoru iziskuje i iscrpnije poznavanje reagiranja ove vrste na različite čimbenike iz okoliša. Te su spoznaje vrlo važne za buduće precizno planiranje kapaciteta uzgoja i očekivane gospodarske dobiti. Poznavanje masnokiselinskog sastava i antioksidativnog statusa školjkaša kao i interakcije koje se očituju kroz prilagodbu na uvjete okoliša, važni su aspekti koje treba detaljno istražiti kako bi se što bolje razumjelo funkcioniranje fiziologije i kvalitete uzgajanih kamenica, te podržala proizvodnja sigurne i kvalitetne namirnice. U Hrvatskoj uzgojena kamenica plasira se na lokalno i inozemno tržište. Cijene malostonskih kamenica ex-farma su trenutno oko 5 kuna/kom., a u restoranima 8 - 10 kuna/kom. Istovremeno su cijene u restoranima u Zagrebu 10 - 14 kn, a na crnogorskoj obali čak do 30 kn (Glamuzina i sur., 2009). Stoga je razumljivo zašto danas ovaj resurs zauzima gospodarsku nišu, s obzirom na to je kamenica vrlo cijenjena delikatesa i kako luksuzni plodovi mora privlače i određenu tipologiju kupaca. Kamenice se kao uvriježeni kulinarski specijalitet poslužuju za predjelo, najčešće u svježem stanju, iako postoje i drugi načini njihovog pripremanja, a jestivim se smatra cijeli mesnati dio kamenice (Slika 1.7) (Hasanspahić, 2011).



Slika 1.7 Kamenica iz Malostonskog zaljeva (www.adris.hr)

## 1.5. Značajke istraživanog područja

Malostonski zaljev nalazi se na završetku Neretvanskog kanala. Akvatorij je omeđen kopnom sa sjeverne strane i poluotokom Pelješcem s južne strane. Izgrađen je od vodopropusnog vapnenca i sadrži mnogobrojne izvore slatke vode (vrulje). Vode podzemnih izvora bitno utječu na ekološke prilike u zaljevu i to naročito na temperaturu i slanost (Carić i sur., 1992). Zbog izrazitog utjecaja slatkih voda, zabilježene su dosta visoke vrijednosti koncentracije hranjivih soli, što uzrokuje visoku fitoplanktonsku i zooplanktonsku produkciju (Benović, 2008). Kao prirodno eutrofizirani ekosustav s visokom koncentracijom hranjivih soli, izvrsno je stanište za uzgoj kamenica i ostalih filtratornih organizama. Ovaj fenomen pruža veliku raznolikost u prirodnoj hrani za školjkaše, što pak može rezultirati u različitom sastavu masnih kiselina (Benović, 2008). Akvatorij se može podijeliti u tri dijela: Neretvanski kanal, Malo more i Malostonski zaljev u užem smislu – njegov unutrašnji dio. Vanjski dio zaljeva povremeno je pod jačim, a njegov unutrašnji dio pod slabijim utjecajem slatke vode iz rijeke Neretve. Jači utjecaj Neretve očituje se za vrijeme njezina visokog vodostaja i za jačeg vjetra iz zapadnog kvadranta. Zimi kad je more homogeno pojavljuje se estuarijski tip dok je ljeti zbog znatno manjeg utjecaja izvora slatke vode podjednaka vjerojatnost pojave ulaznog i cirkulacije izlaznog strujanja (Šimunović, 2004). Slatke vode koje pritječu u Malostonski zaljev izravno djeluju na slanost, termiku i količinu hranjivih tvari. Visoka koncentracija hranjivih soli u Malostonskom zaljevu uzrokuje visoku produkciju i raznolikost fotosintetičkih jednostaničnih algi (fitoplanktona), karakterističnih za obalno more (Carić i sur., 1992). Intenzivni razvoj fitoplanktona odvija se u proljeće, a njegove guste populacije mogu se zabilježiti sve do mjeseca kolovoza (Jasprica i Carić, 1997). Prirodne karakteristike Malostonskog zaljeva, područja zaštićenog od udaranja mora, s umjerenim temperaturama, zaslađenijim morem i dotokom hranjivih tvari s okolnih pošumljenih brda za obilnih kiša, uz dotok vode iz podvodnih vrulja omogućavaju obilan razvoj planktona. Visoka planktonska produkcija na cijelom području zaljeva omogućuje obilnu prehranu brojnih organizama – filtratora. Tako uz kamenice (*Ostrea edulis* L.) i dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) koje se uzgajaju, tamo žive i drugi školjkaši s većom ili manjom gustoćom populacija, kao što su prstac (*Litophaga litophaga* L.), kunjka (*Arca noae* L.), prnjavica (*Venus verucosa* L.), runjava dagnja (*Modiolus barbatus* L.), kopito (*Spondylus gaedoropus* L.), periska (*Pinna nobilis* L.) i jakobova kapica (*Pecten jacobaeus* L.) (Basioli, 1981).

Malostonski zaljev je jedno od najvažnijih turističkih i gospodarskih obalnih područja u istočnom dijelu Jadranskog mora i primjer je relativno čistog i referentnog mjesta (Gavrilović i sur., 2007; Kljaković-Gašpić, 2007; Benović, 2008). Navedeno područje je odlukom Dubrovačko-neretvanske županije 2002. godine zaštićeno i proglašeno posebnim morskim rezervatom.

Istraživanja osnovnih hidrografskih parametara: temperature, saliniteta, otopljenog kisika, prozirnosti i morskih struja pokazala su da je Malostonski zaljev izuzetno složeno područje, s velikim vremenskim i prostornim oscilacijama navedenih parametara (Balenović, 1981). Na osnovi mjerenja primarne proizvodnje, gustoće i biomase partikularne tvari, Malostonski zaljev se karakterizira kao područje relativno visoke proizvodnje planktona. Prosječna dnevna proizvodnja od 40,5 mg C/m<sup>3</sup> u sloju 0 – 10 m predstavlja za oko sedam puta veću vrijednost od prosječne vrijednosti za otvorene vode srednjeg Jadrana u istom periodu (Marasović i Pucher-Petković, 1981). Uz navedeno, u zaljevu su utvrđene znatne sezonske razlike u količini i kvalitativnom sastavu mikro/nano fitoplanktona i mikrozooplanktona, kao i u količini klorofila *a* (Jasprica i Carić, 1997; Jasprica i sur., 1997; Čalić i sur., 2013). Iako se ranije mislilo da se kamenice isključivo hrane fitoplanktonom, istraživanja provedena posljednjih dvadesetak godina pokazala su da hranu ovih organizama pored fitoplanktona čine i drugi planktonski organizmi (bakterije, nelorikatni cilijati i metazoe). Stoga je određivanje koncentracije organske partikularne tvari (POM) vjerodostojniji pokazatelj dostupnosti hrane od koncentracije klorofila *a*. Međutim, sama koncentracija POM još uvijek nije dovoljna da bismo donijeli zaključak o količini filtrirane i asimilirane hrane. Naime, brojni su pokusi pokazali da na filtraciju utječe i omjer između organske i anorganske komponente. Omjer anorganske partikularne tvari (PIM) i POM veći od 3,5 je kritičan jer se POM ne može resorbirati kada je PIM veći od 80 % ukupne partikularne tvari (TPM) (Vahl, 1980). Iz navedenih je razloga potrebno poznavati raspon vrijednosti sve tri komponente partikularne tvari (Gavrilović, 2011).

## 1.6. Biokemijski sastav mesa školjkaša

Biokemijski sastav mesa školjkaša nije stalan, nego koleba ovisno o vrsti, hidrografskim prilikama i uvjetima prehrane u sredini u kojoj žive, vremenu sazrijevanja spolnih organa, sezoni mriještenja, starosti i veličini, te zdravstvenom stanju samih jedinka (Ojea i sur. 2004). Najzastupljenije makromolekule unutar suhe tvari (lipidi, glikogen i proteini) imaju važnu ulogu biokemijskih rezervi školjkaša u tijeku procesa stvaranja gameta i nestašice hrane (Carić i sur., 2000b). Tijekom godišnjeg reproduktivnog ciklusa, hranjive se tvari pohranjuju kada ih ima u izobilju, a aktivnost gonada je minimalna (Bayne, 1976; Dridi i sur., 2007). Akumulacija i mobilizacija biokemijskih rezervi prema stadiju reproduktivnog ciklusa opisana je za više vrsta morskih školjkaša i uzrokuje promjene u njihovoj hranjivoj vrijednosti i organoleptičkim svojstvima (Okumus i Stirling, 1998; Berthelin i sur., 2000). Najveći porast mase kamenice nastupa tijekom proljeća kada dolazi do naglog porasta temperature mora i koncentracije klorofila *a* (Cano i sur., 1997). Proljetni porast temperature mora i količine fitoplanktona dovodi također i do porasta organskog sadržaja i razvoja reproduktivnog tkiva kod ovog školjkaša (Beninger i Lucas, 1984; Ren i sur., 2003; Pogoda i sur., 2013). Gametogeneza je energetski zahtjevan proces, a stalna opskrba hranjivim tvarima potrebna je za biosintezu reproduktivnog materijala, pa početkom razdoblja mriještenja naglo pada masa tkiva i indeks kondicije (Ojea i sur., 2004). Važnost pojedinih makromolekula i njihov energijski doprinos ovisi o vrsti školjkaša (Albentosa i sur., 2007). Glikogen, kao glavni sastojak ugljikohidrata, osnovna je energetska zaliha kod školjkaša za odvijanje gametogeneze u

uvjetima niskih temperatura, nedostatka hrane i kisika, pa se može smatrati bioindikatorom stanja količine hrane u okolišu (Galap i sur., 1997; Marin i sur., 2003; Dridi i sur., 2007). Matias i sur. (2013) su za vrstu *Ruditapes decussatus* L. zapazili kako su vrijednosti koncentracija lipida i proteina obrnutno proporcionalne. Gabbott (1975) je prvi zaključio da razvoj gonada školjkaša može uključiti pretvorbu glikogena u lipide. Najveće koncentracije glikogena uočene su tijekom faze počinaka ili početka gametogeneze, a koncentracije lipida u to vrijeme bile su najmanje. Najmanje koncentracije glikogena nađene su u stadiju zrelosti gonada, neposredno prije mriještenja, kada su koncentracije lipida bile najveće (De Zwaan i Zandee, 1972; Løfstedt, 2010). Sezonske promjene u suhoj masi velikim su dijelom odraz stadija reproduktivnog ciklusa, a najviše se odnose na sadržaj proteina i glikogena (Navarro i sur., 1989). Proteini su makromolekule najzastupljenije u tkivima i mogu biti alternativni izvor energije u nekim vrstama školjkaša tijekom gametogeneze (Beninger i Lucas, 1984; Galap i sur., 1997). Regulacija sinteze proteina predstavlja značajan adaptivni odgovor na stanični stres (Navarez i sur., 2009). Biokemijski sastav školjkaša također se koristio kao biljeg u istraživanju kojem je cilj bilo procijeniti utjecaj okolišnog zagađenja (Salman i Nasar, 2013). Poznavanje biokemijskog sastava može pridonijeti ne samo boljem razumijevanju rasta, uzgoja i uspjeha u reprodukciji, nego i djelotvornijoj karakterizaciji zdravstvenog stanja i kvalitete kamenica (Anibal i sur., 2011).

## 1.7. Lipidni sastav mesa školjkaša

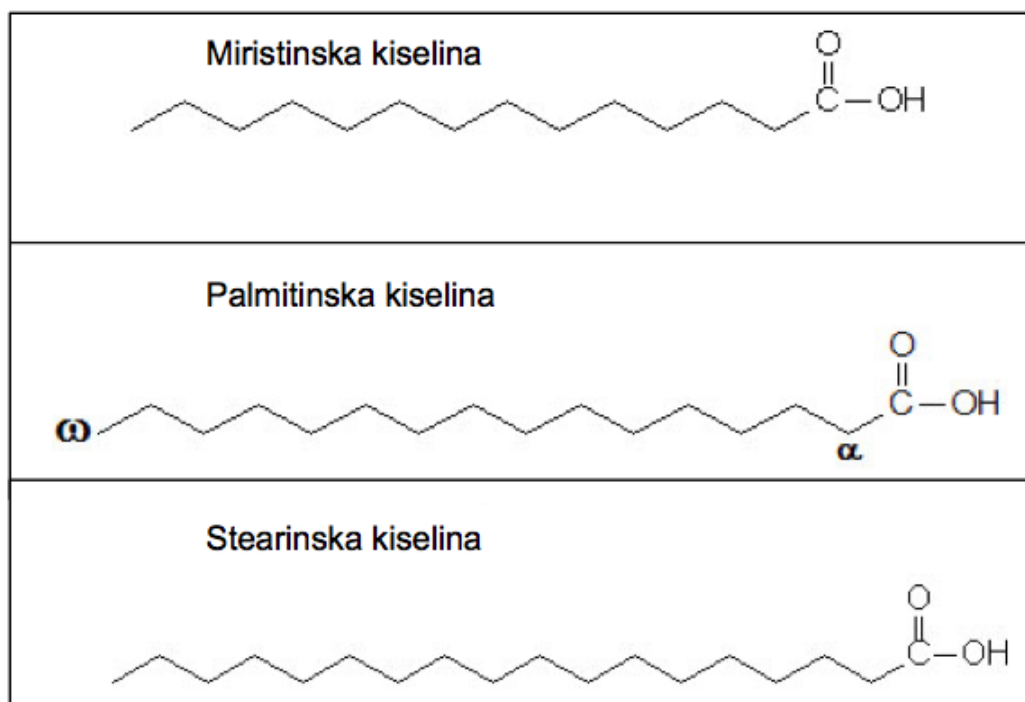
Lipidi su važne energetske rezerve organizama koji žive u vodi (Arts i sur, 2009). Predstavljaju glavni izvor metaboličke energije, važan su materijal za izgradnju staničnih membrana, sudjeluju u mnogim biokemijskim procesima, fiziologiji i reproduktivnom ciklusu školjkaša, te reflektiraju specifične biotičke i abiotičke promjene okoliša u kojem se organizmi nalaze (Pázos i sur., 1997; Arts i sur., 2001; Vance i Vance, 2002). Različite funkcije lipida rezultiraju i različitim definicijama istih, iako se znanstvenici koji istražuju lipide oslanjaju na definiciju koju je dao Christie (2003). Ova najšire prihvaćena definicija ih definira kao spojeve topljive u organskim otapalima kao što su kloroform, benzen, eter i alkohol. Preciznija definicija temelji se na njihovoj kemijskoj strukturi, koja dijeli lipide na polarne (glicerolipidi i sfingolipidi), nepolarne (triacilgliceroli) i slobodne masne kiseline (Sahena i sur., 2009). Za potrebe ovog rada korištena je upravo ova znanstvena terminologija na temelju njihove kemijske strukture.

Masne kiseline čine strukturne dijelove različitih vrsta lipida. Djeluju kao prekursori bioaktivnih molekula, imaju strukturne i funkcionalne uloge u organizmu, te utječu na procese kao što su reprodukcija, osmoregulacija i odgovor na stres (Topić-Popović i sur., 2011). Uobičajene masne kiseline životinjskog ili biljnog podrijetla obično imaju ravne lance s različitim brojem atoma ugljika, s metilnom skupinom (-CH<sub>3</sub>) na jednom kraju, i kiselinskom tj. karboksilnom (-COOH) skupinom na drugom kraju. Masne kiseline građene su od lanaca s 12 do 24 atoma ugljika koji sadrže 0 do 6 dvostrukih veza (pretežno u *cis* konfiguraciji). Najčešće dolaze u sastavu glicero- i sfingolipida, dok su neesterificirane masne kiseline, poznate kao slobodne masne kiseline (*free fatty acids*, FFA), prisutne u vrlo malom udjelu u organizmima. Masne kiseline s jednom dvostrukom vezom označavamo kao jednostruko nezasićene masne kiseline (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) (Slika 1.8), s dvije ili više dvostrukih veza su višestruko nezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (Slika 1.9), a masne kiseline bez dvostrukih veza nazivamo zasićene masne kiseline (*saturated fatty acids*, SFA) (Slika 1.10).

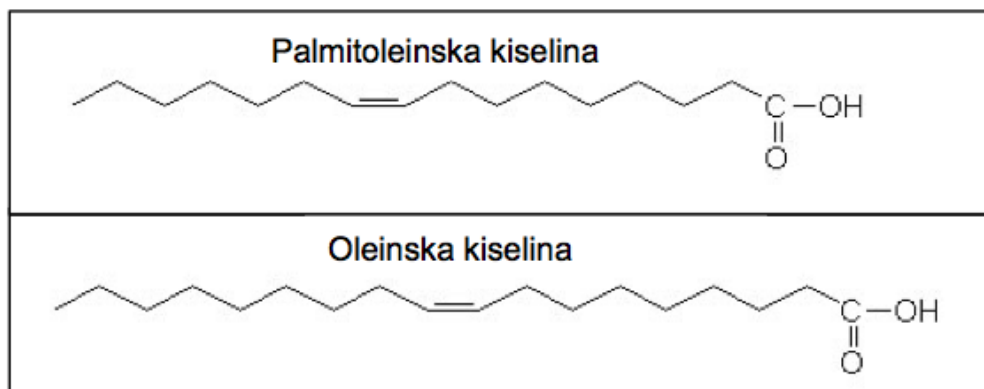


Najzastupljenije zasićene masne kiseline u životinjskim i biljnim tkivima su one s ravnim lancem s 14, 16 i 18 atoma ugljika: miristinska kiselina (MA, 14:0), palmitinska kiselina (PA, 16:0) i stearinska kiselina (SA, 18:0) (Slika 1.8).

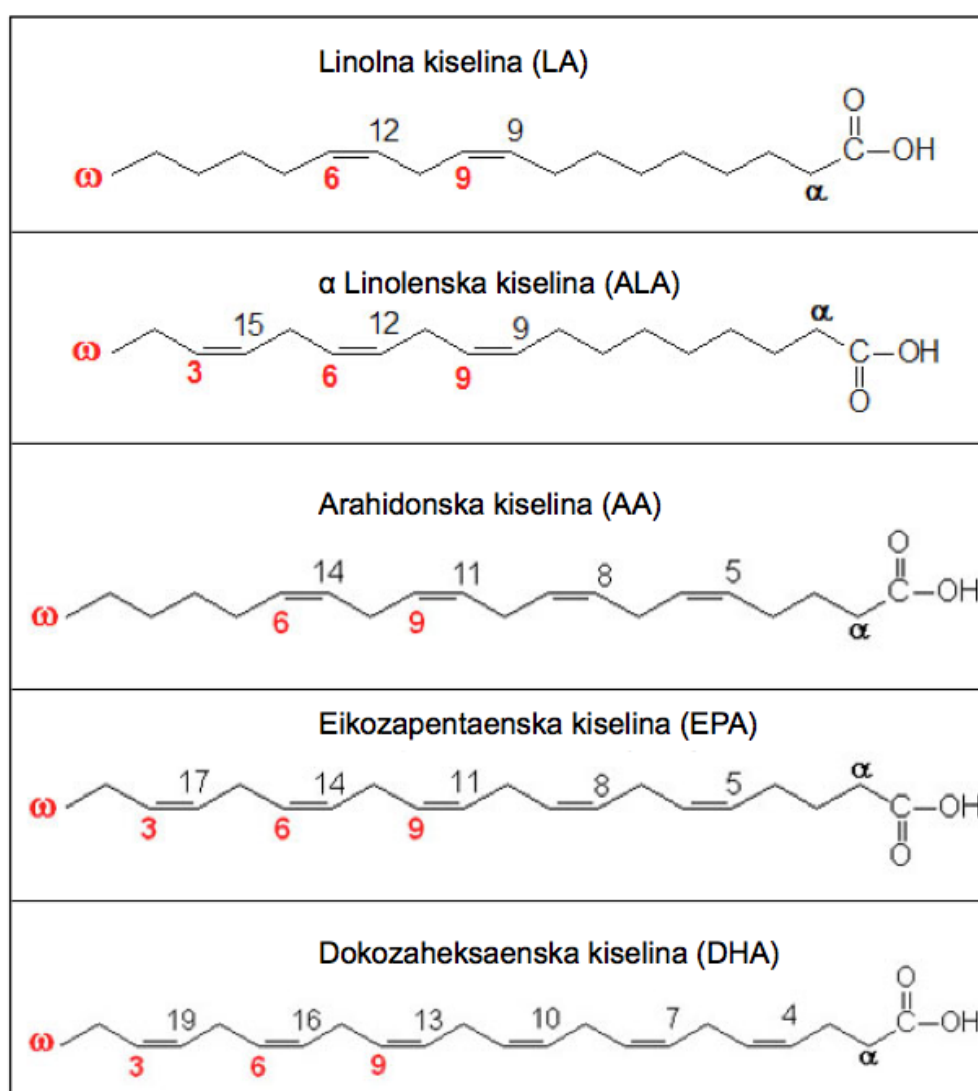
Najučestalije jednostruko nezasićene masne kiselina u tkivu su palmitoleinska kiselina (PO, 16:1n-9) i oleinska kiselina (OA, 18:1n-9) (Slika 1.9). Dvije glavne skupine višestruko nezasićenih masnih kiselina dijele se u dvije skupine, n-3 i n-6 PUFA, ovisno o položaju prve dvostruke veze računajući od kraja lanca odnosno metilne skupine (označenom kao n ili  $\omega$ ) prema karbonilnoj skupini. Dvostruke veze razdvojene su jednom metilenskom jedinicom. Budući da niti životinje niti ljudi ne mogu sintetizirati dvostruke veze na položaju 6 ili manjem, omega-3 (n-3) i omega-6 (n-6) PUFA moraju se unijeti hranom. Izvor n-3 PUFA su morski organizmi i neke biljke, dok su izvor n-6 PUFA uglavnom biljna ulja. Esencijalne masne kiseline (*essential fatty acids*, EFA) su linolna kiselina (LA, 18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, C18:3n-3). Arahidonska kiselina (AA, C20:4n-6) može se sintetizirati iz LA djelovanjem enzima (elongaze i desaturaze), dok ALA služi kao prekursor u sintezi eikozapentaenske (EPA, C20:5n-3) i dokozaheksaenske kiseline (DHA, C22:6n-3). S obzirom da je učinkovitost mehanizama produljenja i desaturacije relativno mala, AA, EPA i DHA mogu biti označene kao uvjetno esencijalne masne kiseline (Vance i Vance, 2002; Von Elert, 2002; Monroig i sur., 2013) (Slika 1.10).



**Slika 1.8** Zasićene masne kiseline (www.eufic.org)



**Slika 1.9** Jednostruko nezasićene masne kiseline (www.eufic.org)

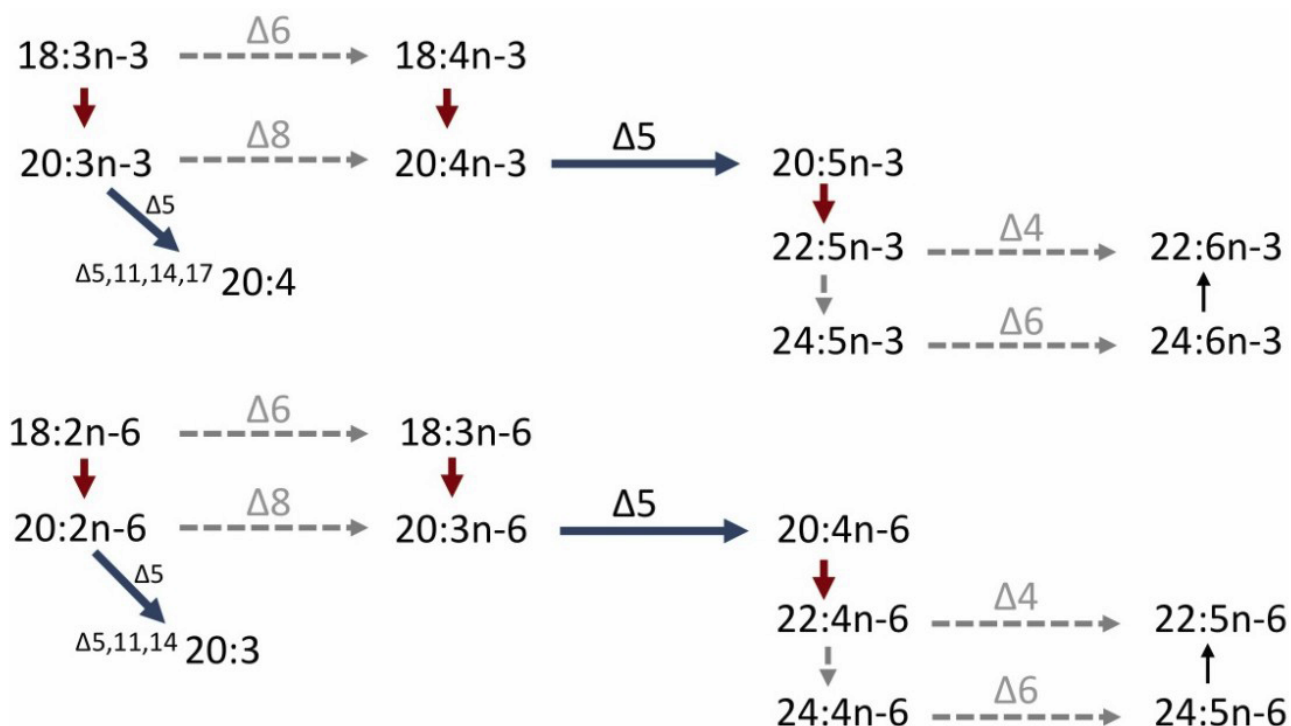


**Slika 1.10** Višestruko nezasićene masne kiseline (www.eufic.org)

Unatoč brojnim mogućim kombinacijama koje se odnose na stupanj nezasićenosti, položaj dvostruke veze i duljinu ugljikovog lanca, u prirodi masne kiseline najčešće sadrže jednu metilensku grupu između dvostrukih veza. Takve masne kiseline nazivaju se metilen-prekinute dienske kiseline (*methylene interrupted dienoic*,

MID). Nedavno su u morskim ekosustavima otkrivene i ne-metilen prekinute dienske masne kiseline (*non methylene interrupted dienoic*, NMID) koje ne sadrže metilenske skupine između dvostrukih veza unutar molekule masne kiseline (Zhukova, 1991).

Mekušci su nedvojbeno skupina morskih beskralješnjaka u kojoj je biosinteza PUFA najopsežnije istražena, dijelom i zbog komercijalnog interesa i nutritivne vrijednosti mekušaca kao izvora "omega-3" masnih kiselina za ljude (Joseph, 1982). Školjkaši imaju mogućnost biosinteze PUFA (Waldock i Holland, 1984), a postoje moguće razlike među vrstama ovisno o svojstvima enzima (desaturaza i elongaza) koji sudjeluju u ovim metaboličkim reakcijama. Mehanizme produljenja masnih kiselina od LA do AA i od LNA do EPA i DHA u školjkaša prvi je opisao Holman (1981). Biokemijske studije sugeriraju da mekušci posjeduju elongaze koje su uključene u biosintetičke puteve PUFA, uključujući NMID masne kiseline produljenjem lanca C18:3n-3 i C18:2n-6 do C20:3n-3 odnosno C20:2n-6. Slično putu opisanom za ribe, enzimi s  $\Delta^6$  ili  $\Delta^8$  desaturacijskom aktivnosti potrebni su za sintezu C20:4n-3 i 20:3n-6 iz prekursora C18 prekursora ALA i LA. Nakon *de novo* biosinteze C16:0 i C18:0 slijedi desaturacija djelovanjem  $\Delta^9$  desaturaze u C16:1n-7 ( $\Delta^9$  16:1) i C18:1n-9 ( $\Delta^9$  18:1). Naknadno produljenje do C18:1n-7 ( $\Delta^{11}$  18:1) i C20:1n-9 ( $\Delta^{11}$  C20:1), i daljnja  $\Delta^5$ -desaturacija rezultiraju formiranjem  $\Delta^{5,11}$  C18:2 i  $\Delta^{5,11}$  C20:2. Novo produljenje lanca rezultira sintezom  $\Delta^{7,13}$  C20:2 i  $\Delta^{7,13}$  C22:2 masnim kiselinama (Monroig i sur., 2013). Podaci dostupni u literaturi pružaju dokaze da beskralješnjaci posjeduju gene koji kodiraju enzime desaturaze i elongaze i imaju uloge u endogenoj proizvodnji PUFA. Osim toga, čini se da neki školjkaši imaju izrazitu n-3 (odnosno  $\Delta^{15}$ ) desaturaznu aktivnost enzima koji katalizira interkonverziju n-6 u n-3 nezasićene masne kiseline (Schauer i Simpson, 1985; Ito i Simpson, 1996) (Slika 1.11).



Slika 1.11 Metabolički putevi n-3 i n-6 nezasićenih masnih kiselina (Monroig i sur., 2013)

Triacilgliceroli (*triacylglycerols*, TAG) predstavljaju najčešći oblik lipida za pohranu i čine većinski udio lipida organizama koji žive u vodenoj sredini (Arts i sur., 2009). Sastoje se od tri molekule masnih kiselina esterski vezanih na okosnicu glicerola. Životinje mobiliziraju pohranjene TAG ukoliko energetske zahtjevi nisu ispunjeni kroz prehranu, ili obrnuto, deponiraju TAG kada dijetetski unos energije prelazi metaboličke zahtjeve. Prema tome, masnokiselinski sastav TAG u glavnoj lipidnoj rezervi direktno je pod utjecajem hranidbe i relativno je dinamičan. Uskladišteni lipidi u tkivima mogu se hidrolizirati do slobodnih masnih kiselina različitim enzimima (npr. lipoprotein lipaze, hormonski osjetljive lipaze, fosfolipaze A), prije nego što se metaboliziraju na različite načine, uključujući oksidaciju, desaturaciju, produljenje i re-esterifikaciju.

Fosfolipidi (*phospholipids*, PL) su strukturne komponente svih staničnih membrana. Građeni su od dvije masne kiseline esterificirane na molekulu glicerola. Zbog specijaliziranih funkcija ovih lipida u sastavu membrane, organizmi nastoje očuvati masnokiselinski sastav, pa je ova lipidna klasa relativno otporna na promjene u prehrani i stoga nije od značaja kao pokazatelj prehrane.

Slobodne ili ne-esterificirane masne kiseline (*free fatty acids*, FFA) su također prisutne u tkivu morskih beskralježnjaka iako njima ne obiluju. Kod životinja, prehrambeni lipidi hidroliziraju se do slobodnih masnih kiselina prije nego što se apsorbiraju i koriste za sintezu endogenih lipida. FFA se transportiraju u plazmi vezane kao kompleks za albumine do organa u kojima se difuzijom ili aktivnim prijenosom preko staničnih membrana koriste u unutarstaničnim procesima.

Tkiva školjkaša izgrađena su različitim lipidnim strukturama; najobilnije su one koje sadrže masne kiseline kao dio svoje molekularne strukture. Da bi se smanjila složenost ukupnih lipida ili ako se treba analizirati samo određeni dio lipida (npr. lipidne frakcije), uzorak se podvrgava različitim preparativnim tehnikama (razdvajanju i pročišćavanju) prije dobivanja metilnih estera masnih kiselina (*fatty acid methyl esters*, FAME) i analize na plinskom kromatografu (Tanaka et al., 2007). Masne kiseline potrebno je u kiselom ili alkalnom mediju osloboditi iz kompleksa u koje su vezane i trans-esterifikacijom prevesti u lako hlapljive derivate poput metilnih estera masnih kiselina (FAME) (Christie, 1989, 2003) za analizu na plinskom kromatografu.

U praksi, masne kiseline su se pokazale kao trofični biljezi prehrane kamenica (Ezgeta-Balić i sur., 2012), te indeksiraju zdravlje i prehrambeno stanje školjkaša (Liu i sur., 2008). Nedavno je dokazano da je praćenjem sastava masnih kiselina moguće predvidjeti dugoročne promjene u strukturi pelagičnih ekosustava mora (Martino i Maria, 2004) i povezati ih izravno sa zdravstveno/prehrambenim stanjem školjkaša u uzgoju (Løfstedt, 2010). Relativni odnosi i sastav masnih kiselina kod morskih organizama karakteristični su za svaku pojedinu vrstu i ovisni su o čimbenicima okoline (Bergé i Barnathan, 2005). Poznato je da je sezonalitet sadržaja lipida i sastava masnih kiselina kod odraslih školjkaša usko povezan s reproduktivnim ciklusom, klimatskim promjenama, te dostupnosti i sastavu prirodne hrane (Caers i sur., 2000; Freitas i sur., 2002). Masne kiseline su među najvažnijim biomolekulama koje se prenose kroz hranidbene lance od biljaka do životinja, uključujući i hranidbene lance u moru. S obzirom na činjenicu da životinje ne mogu promijeniti položaj dvostruke veze u alifatskom lancu najbliže terminalnoj metilnoj skupini (manjoj od n-9), kao i da ne mogu *de novo* sintetizirati određene masne kiseline, moguće je pratiti određene masne kiseline u hranidbenoj mreži, otkrivajući odnose predatora i plijena (Prato i sur., 2010). Poznato je da je sastav velike većine životinjskih lipida ovisan izravno iz njihovoj prehrani, a samo ograničen dio se *de novo* sintetizira. To čini određene lipide (lipidne klase) korisnim biljekom u morskim ekosustavima. Međutim, kako količina lipida koju školjkaši koriste kao zalihu energije ovisi o sezoni, lipidi mogu biti posebno pogodan medij za proučavanje dinamike okoliša i odnosa primarnih proizvođača kroz hranidbene lance (Freitas i sur., 2002).

Dinamika metabolizma lipida kamenica u Malostonskom zaljevu trebala bi pratiti dinamiku promjena u sezoni, a promjene udjela masnih kiselina u mesu od interesa su kako kvalitativno tako i kvantitativno.

## 1.8. Oksidativni stres i antioksidativni odgovor u školjkaša

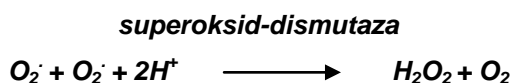
Sezonski okolišni čimbenici, poput promjene temperature mora, pH i količine otopljenog kisika, mogu utjecati na metaboličke aktivnosti beskralješnjaka i indukciju oksidacijskog stresa, te za posljedicu imati povećanje proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (*reactive oxygen species*, ROS) (Sheehan i Power, 1999). Kada koncentracija ROS-a prelazi antioksidativni kapacitet u stanicama, oni mogu postati štetni i uzrokovati ozbiljna oštećenja svih biomolekula u stanici (DNA, proteini, lipidi, ugljikohidrati) kao i smrt stanica (Devasagayam i sur., 2003; de Almeida i sur., 2007; Bocchetti i sur., 2008; Banni i sur., 2008; Wang i sur., 2008). Ksenobiotici i okolišno zagađenje također mogu izazvati neravnotežu između proizvodnje ROS i njihovog uklanjanja, a kao posljedica javlja se oksidativni stres (Pawar i sur., 2013). Mjere razine oksidativnog stresa korisne su kao osjetljiv pokazatelj ranog otkrivanja antropogenih učinaka u vodenom staništu (Regoli i sur., 2011). Školjkaši su korisni organizmi za procjenu kemijskog zagađenja u vodenom okolišu, budući da su sedentarni filtratorni organizmi i imaju široku geografsku zastupljenost. Da bismo razumjeli zdravlje morskih organizama, u posljednjih nekoliko godina koriste se biljezi za procjenu molekularnih, biokemijskih i staničnih odgovora školjkaša nastalih pod utjecajem okoliša (Di Giulio i sur., 1989). Najčešće se kao indikator fiziološkog stanja i rasta kamenica koriste biokemijske analize antioksidativnog statusa (Lanning i sur. 2006; Gavrilović i sur., 2008; Hamdani i Soltani-Mazouni, 2011). Na biokemijskoj razini, promjene u lipidima mogu prikazati fiziološki status školjkaša i stresore koji izazivaju oksidativni stres u organizmu (Sifi i sur., 2013). Višestruko nezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) su gusto raspoređene u lipidima staničnih membrana kojima daju svojstvo fluidnosti, a upravo su njihove dvostruke veze meta lipidne peroksidacije. Kada je prekinuta kovalentna veza, a nespareni elektron ostaje vezan s atomom kisika, dušika ili nekom skupinom, formira se slobodni radikal i potiče lipidnu peroksidaciju (Pawar i sur., 2013). Novonastala molekula je konjugirani dien koji reagira s kisikom i formira peroksidni radikal koji uzima elektron od druge lipidne molekule u procesu širenja učinaka slobodnih radikala (Kelly i sur., 1998). Protuoksidacijske tvari učinkovito doniraju elektrone slobodnim radikalima te prekidaju oksidacijsku lančanu reakciju (Lucu, 2012). Lipidna peroksidacija jedan je od najvažnijih fenomena staničnih ozljeda uzrokovanih slobodnim radikalima, a kako bi organizam to spriječio razvijen je antioksidativni obrambeni sustav koji štiti funkcionalnost i strukturu stanica od mogućih oštećenja (Štefan i sur., 2007; Bebiano i sur., 2005). Prekomjerna produkcija ROS u odgovoru na okolišne stresore može dovesti do povećane lipidne peroksidacije u membrani stanica, te posljedično do oštećenja membrane stanica i proizvodnje lipidnih peroksida koji se pojavljuju kao najraniji produkti oksidativnih oštećenja. Dolazi i do stvaranja drugih nusproizvoda kao što je malondialdehid koji nastaje kao završni produkt lipidne peroksidacije (Viarengo i sur., 1991; Domijan i sur., 2015). Lipidni peroksidi i MDA nastali nakon razgradnje PUFA koriste se kao biomarkeri lipidne peroksidacije kako bi se procijenile štetne posljedice uzrokovane stresom (Monserat i sur., 2003; Štefan i sur., 2008).

U prirodnom okruženju sezonski je ciklus određen fiziološkim značajkama beskralješnjaka kao što su rast, reprodukcija i imunitet (Ruiz i sur., 1992; Pázos i sur., 1997b). Promjene ekoloških čimbenika tijekom sezone mogu snažno utjecati na metaboličke aktivnosti (Abad i sur., 1995; Ren i sur., 2003). Rezultati nekih studija

unutar sezone pokazuju da su razine lipidnih peroksida (LP) i MDA veće zimi, bez obzira na mjesto uzorkovanja. Zimi visoka koncentracija otopljenog kisika povećava stvaranje ROS-a i generiranje stresa te smanjuje stanični antioksidativni kapacitet za neutralizaciju slobodnih radikala (Abele i Puntarolo, 2004). Studije o povezanosti biomarkera oksidativnog stresa i sezonskih promjena u poikilotermnih organizama otkrivaju povezanost s metaboličkim procesima, pa je tako zaključeno da usporeni metabolizam prati manji oksidacijski stress (Banni i sur., 2008; Bocchetti i sur., 2008). Pretpostavlja se da povećana razina potrošnje kisika, koja je uzrokovana povećanim energetske potrebama vezanim za okolišni stres, može uzrokovati generiranje ROS i time inducirati štetne procese u stanicama (Lesser i Kruse, 2004, Lannig i sur., 2006). Almeida i sur. (2005) su zaključili da periodično otvaranje i zatvaranje školjke izložene zraku može dovesti do proizvodnje ROS-a i uzrokovati oksidativne ozljede.

Obrambeni sustav koji teži inhibiciji reaktivnih kisikovih spojeva i sprječava oksidativno oštećenje staničnih dijelova uključuje enzimsku i ne-enzimsku antioksidativnu obranu (Cossu i sur., 1997; Federal i sur., 2008). Vidal-Liñán i sur. (2010) bili su prvi koji su izvještavali o sezonskim promjenama aktivnosti antioksidativnih enzima u azijskom slatkovodnom školjkašu (*Corbicula fluminea* Müller, 1774), a zaključili su da je aktivnost mjenjenih enzima bila niža u hladnijim nego u toplijim mjesecima. Glavni enzimi s antioksidativnim djelovanjem za neutralizaciju ROS-a kod aerobnih organizama su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). Aktivnost ovih enzima često se koristi u biološkom praćenju kao biljeg oksidativnog stresa kod različitih vrsta organizama koji žive u vodi, poput rakova (Tu i sur., 2012), puževa (Winston i Di Giulio, 1991), školjkaša (Vidal-Liñán i sur., 2010; Borković-Mitić i sur., 2011), morskih krastavaca (Wang i sur., 2008) i riba (Federal i sur., 2008; Regoli i sur., 2011; Maltar-Strmečki i sur., 2013).

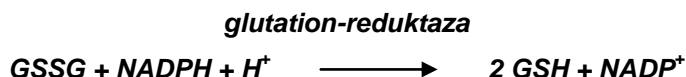
Superoksid-dismutaza, enzim s kofaktorom Cu/Zn, važan je čimbenik u protuoksidacijskim sustavima zaštite od ROS-a. SOD katalizira pretvorbu dva superoksida u manje toksične spojeve (vodikov peroksid i kisik). U biljkama i životinjama SOD katalizira dismutaciju dva superoksid-iona u manje toksične spojeve (vodikov peroksid i kisik), nakon čega katalaze razgrađuju vodikov peroksid na vodu i kisik (Lin i sur., 2001).



Glutation-peroksidaze pripadaju grupi enzima u čijoj strukturi se nalazi selen. Ovi enzimi, kao i katalaze, razgrađuju vodikov peroksid. Glutation-peroksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksida pomoću glutationa (GSH) u vodu, pri čemu se sulfhidrilna skupina GSH oksidira i on prelazi u dimerni oblik GS-SG (oksidirani glutation-disulfid).



Oksidirani oblik GSSG regenerira se u reducirani u redoks-ciklusu koji uključuje glutathion-reduktazu i redoks-sustav NADP<sup>+</sup>/NADPH.



Glutathion-reduktaza (GR) nalazi se u visokim koncentracijama u stanicama probavne žlijezde školjkaša, koja sudjeluje u pretvorbi i izlučivanju toksičnih tvari i ima važnu ulogu u zaštiti tih stanica od slobodnih radikala i oksidativnog oštećenja. Stanična "smrt" (apoptoza) nastaje nakon ekstremnog osiromašenja ili potrošnje glutathiona (Cossu i sur., 1997).

Zbog poremećaja dinamičke ravnoteže nastalog pod utjecajem stresa, organizmi su osjetljiviji na daljnje promjene u ekosustavu. Pritom biokemijsko-fiziološke promjene u organizmu nastale kao odgovor na stres mogu biti akutne ili kronične (Lam i Gray, 2003; De Luca-Abbott i sur., 2005; Dunphy i sur., 2006; Hamdani i Soltani-Mazouni 2011). Aktivnost antioksidativnih enzima međusobno je ovisna o varijacijama unutar bioloških ciklusa, fizikalno-kemijskih promjena u okolišu i utjecaju antropogenih zagađivala (Banni i sur., 2008). Zbog toga je procjena i tumačenje sezonskih varijacija biomarkera oksidativnog stresa od velike važnosti za buduće ekotoksikološke studije (Sheehan i Power, 1999). Mehanizmi godišnjih varijacija u antioksidativnoj obrani primijećeni su u tkivima mnogih vrsta školjkaša, kao što su dagnja (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) (Borković i sur., 2005; Bocchetti i sur., 2008), kunjka (*Modiolus modiolus* L.) (Lesser i Kruse, 2004), plava dagnja (*Mytilus edulis* L.) (Manduzio i sur., 2005), te u probavnoj žlijezdi smeđe dagnje (*Perna perna* L.) (Filho i sur., 2001).

Povećanje svijesti o školjkašima kao osjetljivim bioindikatorima onečišćenja okoliša i potreba za procjenom godišnjih varijacija biomarkera kao odgovora na oksidacijski stres temelj su ovog istraživanja. Cilj ovog istraživanja je procijeniti utjecaj sezone (oscilacije u temperaturi, salinitetu, otopljenom kisiku i koncentraciji hranjivih tvari) na oksidacijske reakcije tkiva uzgojne populacije europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) iz nezagađenog referentnog mjesta u Jadranskom moru.

Pretpostavka je da će školjke iz Malostonskog zaljeva imati nižu aktivnost antioksidativnih enzima ljeti, zbog nižih koncentracija kisika u moru, u usporedbi sa zimskim razdobljem kada je razina kisika veća, ali i zbog utjecaja visoke temperature na enzimsku i ukupnu metaboličku aktivnost (Viarengo i sur., 1991; Sheehan i Power, 1999; Filho i sur., 2001; Nahrgang i sur., 2013). Prethodne studije pokazale su da beskralježnjaci koji se prilagođavaju okruženju s visokom razinom otopljenog kisika (npr. polarna staništa) često imaju visoku aktivnost antioksidansa kako bi se zaštitili od slobodnih radikala (Camus i sur., 2005). S druge strane, pronađen je vrlo nizak antioksidativni status kod mekušaca izloženih izrazito anaerobnim uvjetima (Viarengo i sur., 1991).

Utjecaj varijabli okoliša na oksidativni odgovor, ukoliko se ne mjeri, može dovesti do pogrešaka u interpretaciji rezultata biomarkera prilikom monitoringa morskih organizama kroz dulji period. Iz tog razloga rezultati ovog istraživanja mogu biti vrijedan pokazatelj oscilacija u antioksidativnom statusu i fiziološkom stanju uzgajane kamenice tijekom godine. Pored toga, dobiveni rezultati mogu biti temelj budućih studija značajnih za zaštitu biološke raznolikosti Jadranskog mora.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Postavljanje pokusnog uzgajališta

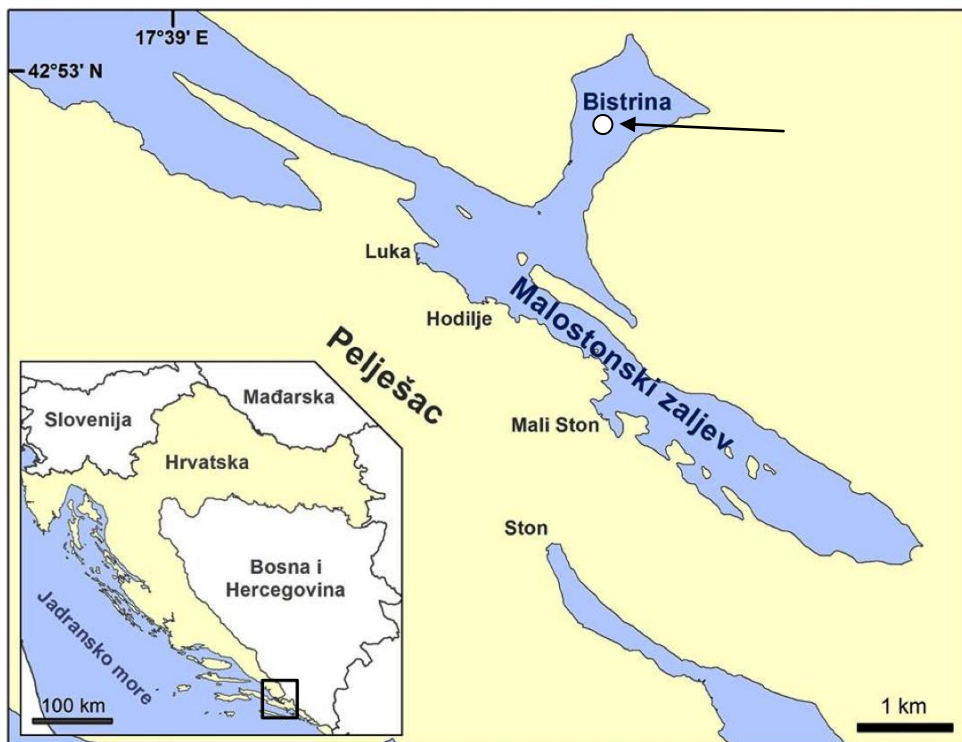
Početkom 2009. godine postavljen je pokusni uzgojni park s europskim plosnatim kamenicama (*Ostrea edulis* L.) u uvali Bistrina u Malostonskom zaljevu (Slika 2.1). Nakon razdoblja prilagodbe od 2 mjeseca, obavljena je prva selekcija kamenica koje su početkom travnja 2009. godine postavljene na novi uzgojni park. Odabrano je 500 jedinka koje su prema tradicionalnoj uzgojnoj tehnologiji cementirane na pergolare. Cijeli pokus trajao je 12 mjeseci. Godišnja doba su uključila slijedeće mjesece:

PROLJEĆE (ožujak, travanj i svibanj)

LJETO (lipanj, srpanj, kolovoz)

JESEN (rujan, listopad, studeni)

ZIMA (prosinac, siječanj, veljača).



Slika 2.1 Područje istraživanja



### 2.1.1. Određivanje osnovnih hidrografskih parametara

Uzorci morske vode uzimani su na istraživanoj postaji jednom mjesečno Niskinovim crpcem volumena 5 L, s dubine od 1 do 4 metra s obzirom da se u tom sloju nalaze užad s cementiranim kamenicama. Nakon izvlačenja uzoraka vode mjerena je temperatura, količina otopljenog kisika, pH i salinitet u zahvaćenom volumenu morske vode uz pomoć WTW- Multi 350i sonde (Slika 2.2).

### 2.1.2. Određivanje koncentracije ukupne partikularne tvari

Pri obradi uzoraka za određivanje partikularne tvari koriste se prethodno izvagani i označeni stakleni membranski filtri (Whatman GF/C) u triplikatu. Neposredno po povratku s terena, volumen od 1 L morske vode filtrira se pomoću vakuum pumpe pod niskim tlakom, a filteri se potom pohrane na -20°C do daljnje laboratorijske obrade. Za određivanje ukupne partikularne tvari filteri se suše do konstantne mase na 100 °C u razdoblju od 24 sata. Nakon toga slijedi vaganje filtera na analitičkoj vagi.

Ukupna partikularna tvar (TPM) računa se po formuli:

$$TPM = \text{masa suhog filtera} - \text{masa čistog suhog filtera}.$$

#### 2.1.2.1. Određivanje koncentracije organske i anorganske partikularne tvari

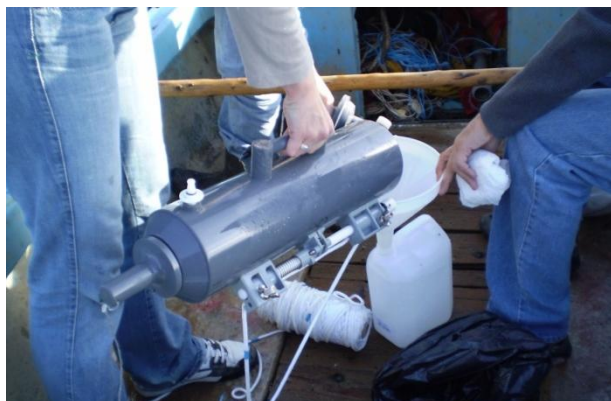
Za određivanje koncentracije organske partikularne tvari (POM) i anorganske partikularne tvari (PIM) koriste se prethodno pripremljeni i osušeni filtrir papiri s talogom filtriranog uzorka mora, žare se 5 sati na 450 °C, te se nakon toga važu.

Anorganska partikularna tvar računa se po formuli:

$$PIM = \text{masa žarenog filtera} - \text{masa čistog žarenog filtera}$$

Organska partikularna tvar računa se po formuli:

$$POM = TPM - PIM$$



Slika 2.2 Uzorkovanje mora Niskinovim crpcem

### 2.1.3. Određivanje hranjivih soli

Uzorci mora za kemijske analize pohranjeni su po završetku svakog uzorkovanja na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do laboratorijskih mjerenja spektrofotometrijskim metodama. Količine nitrita, nitrata, fosfata, sulfata i amonijaka u moru određivane su kolorimetrijskim metodama uz pomoć spektrofotometra Hanna Instruments 83200. Kemijski parametri mora određivani su sljedećim metodama (Koroleff, 1983):

- Nitriti - adaptiranom kadmij-redukcijskom metodom; Nitratni ioni u uzorku vode reagiraju s 2,6-dimetil-fenolom u prisustvu smjese anorganskih kiselina i stvaraju obojeni kompleks. Intenzitet boje mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 324\text{ nm}$ , a koncentracija se izračunava pomoću kalibracijskog pravca.
- Nitriti – adaptiranom EPA (Environmental Protection Agency) diazotizacijskom metodom; Nitritni ioni reagiraju u kiselom mediju sa sulfanilnom kiselinom stvarajući sol, koja zatim u reakciji s naftil-aminom formira kompleks ružičaste boje. Apsorbancija boje u uzorku mjeri se pri  $\lambda = 530\text{ nm}$  i uspoređuje s apsorbancijom standarda poznate koncentracije.
- Fosfati – prilagodbom standardne metode redukcije amonijevim fosfomolibdatom; Određivanje koncentracije anorganskih fosfata temelji se na reakciji fosfatnog iona s amonijevim molibdatom u kiselom mediju, pri čemu nastaje spoj kompleksne strukture - amonijev fosfomolibdat. Apsorbancija reduciranog molibdenovog plavila mjeri se na  $\lambda = 660\text{ nm}$ .
- Sulfati – turbidimetrijskom metodom ISO: 3025; Postupak ispitivanja sulfata obavlja se turbidimetrijskim mjerenjem koje se temelji na taloženju barijevog sulfata u koloidnom obliku. Apsorbancija se mjeri pomoću spektrofotometra na  $\lambda = 420\text{ nm}$ , a koncentracija sulfatnih iona određuje se usporedbom sa standardnom krivuljom.
- Amonijak – adaptiranom Nesslerovom metodom; Amonijevi ioni u uzorku reagiraju s Nesslerovim reagensom i daju žuto-crvenu boju te se spektrofotometrijski određuju na  $\lambda = 425\text{ nm}$ .

## 2.2. Uzorkovanje kamenica

Uzorkovanje kamenica (n = 30) provedeno je mjesečno tijekom godine dana (Slika 2.3 a). Nakon transporta u laboratorij, kamenice su izmjerene, te pažljivo otvarane (Slika 2.3 b). Nakon sušenja na staničevini izmjerena je masa svježega tkiva, te su uzorci pohranjeni u hladnu komoru na -80 C°.



Slika 2.3 Uzorkovanje kamenica a) na terenu b) u laboratoriju

### 2.2.1. Određivanje indeksa kondicije i biokemijskog sastava europske plosnate kamenice

Meso i ljuštire nakon odvajanja su osušeni u sušioniku na temperature od 105 °C tijekom 24 sata. Indeks kondicije (IK) računao se po Mann-u (1978) prema formuli:

$$IK = \text{masa suhog mesa} / \text{masa suhe ljuštire} \times 1000$$

Uzorci za biokemijske analize pripremljeni su tako da se cijelo tkivo školjkaša homogenizira pomoću Ultra-Turax homogenizatora u izotoničnoj otopini NaCl u omjeru 1:5 uz hlađenje tubice u serijama od 5 x 20 s, odnosno do potpunog usitnjenja tkiva.

### 2.2.1.1. Određivanje masenog udjela lipida

Ukupni lipidi su iz uzoraka izdvojeni metodom ekstrakcije organskim otapalima (*solvent extraction*) po Folchu (1957). Ova metoda primjenjuje smjesu kloroforma i metanola ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ ) u omjeru 1:2. Uzorak homogenata volumena 2 mL stavi se u Falcon epruvete, doda se smjesa otapala i miješa na automatskoj tresilici 30 min. Zatim slijedi centrifugiranje 5 min na 1000 g pri sobnoj temperaturi. Odvaja se donja organska faza Pasteurovom pipetom. Postupak se ponavlja s čistim kloroformom zbog postizanja maksimalnog iskorištenja ekstrakcije. Dobiveni ekstrakti sjedine se u staklenu epruvetu sa čepom te se doda bezvodni natrijev-sulfat i ostavlja na 4 °C preko noći kako bi se iz uzorka odstranio višak vode. U međuvremenu se pripremaju i važu epruvete za uparavanje. U njih se profiltrira organska faza te se upari do suhog u vakuum uparivaču (UNICRYO MC2L-80°C i UNIVAPO 100H, UniEquip Martinsried, Njemačka). Ponovnim vaganjem epruvete gravimetrijski se određuje masa ukupnih lipida u uzorku koja se izražava po gramu vlažnog tkiva kamenice. Ekstrahirani lipidi koriste se za daljnje određivanje sastava masnih kiselina i lipidnih peroksida.

### 2.2.1.2. Određivanje masenog udjela proteina

Udio proteina u tkivu određuje se metodom po Lowry-u (1951). Homogenat školjkaša centrifugira se (Biofuge Fresco, Heraus instruments) na 13 000 g tijekom 5 minuta. U staklene epruvete odvoji se 0,1 mL supernatanta i razrijedi 10 puta s  $\text{dH}_2\text{O}$ . Razrijeđenom uzorku koji sadrži 5 do 50  $\mu\text{g}$  proteina dodaje se 2 mL Lowry reagensa (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (50 mL); 2 %  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  (0,5 mL); 1 %  $\text{CuSO}_4$  (0,5 mL); 1M NaOH) te 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa (Kemika, Zagreb, Hrvatska) razrijeđenog s destiliranom vodom u omjeru 1:3. Apsorbancija otopine mjeri se nakon inkubacije od 60 min pri  $\lambda = 740$  nm. Koncentracija proteina izražava se u miligramima proteina po gramu vlažnog tkiva (mg proteina/g tkiva). Kao standard koristi se albumin goveđeg seruma (Sigma Aldrich, Njemačka).

### 2.2.1.3. Određivanje masenog udjela glikogena

Glikogen je određen primjenom anthrone reagensa metodom po De Zwaan i Zandee (1972) uz modifikacije. 1 mL homogenata razgrađuje se dodatkom 3 mL 30 % KOH u kipućoj vodenoj kupelji kroz 20 minuta. Sadržaj se ohladi u ledenoj kupelji i dodaje se 4 mL 95% etanola, temeljito pomiješa i oprezno dovede do vrenja u kupelji vruće vode. Ova smjesa se ohladi i centrifugira 15 minuta na 1000 g. Supernatant se dekantira i obrnuto okrenute epruvete suše se na filtrir-papiru nekoliko minuta. Talog se otopi u 1 mL destilirane vode, pretaloži s 2 mL 95 % etanola, centrifugira i suši. Talog se otopi u 5 mL destilirane vode i doda se 10 mL 0,2 % anthrone reagensa u sulfatnoj kiselini u ledeno hladnim uvjetima. Glikogen se hidrolizira u razrijeđenim kiselinama na jednostavne šećere čiju količinu je jednostavno izmjeriti kolorimetrijski na  $\lambda = 680\text{nm}$ . Količina glikogena u tkivima izražava se

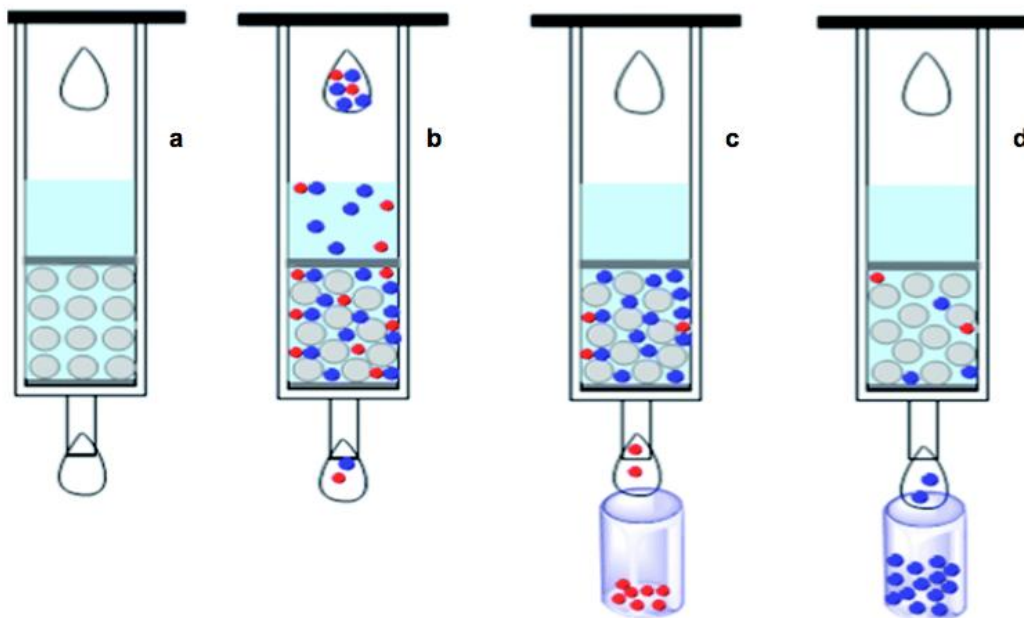
kao mg glikogena na gram svježeg tkiva. Kalibracijski pravac priprema se pomoću standardne otopine glukoze.

## 2.2.2. Razdvajanje lipidnih frakcija

Ekstrakt ukupnih lipida razdvojen je na frakcije triacilglicerola, fosfolipida i masnih kiselina metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (*Solid Phase Extraction - SPE*), koristeći amino-propil kolone volumena 2,8 mL, koje sadrže 500 mg silicija modificiranog aminopropil grupama, uz primjenu vacuum-razdjelnika Phenomenex, SAD (Kaluzny i sur., 1985).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) je ekstrakcijska metoda kod koje se odvajanje analita od matrice uzorka temelji na selektivnom vezanju analita na sorbens, nakon čega slijedi desorpcija ispiranjem odgovarajućim otapalom.

Kolone su kondicionirane propuštanjem 3 mL kloroforma i 3 mL metanola (Slika 2.4 a). Uzorak ukupnih lipida otopljen je u 200  $\mu$ L kloroforma od čega je na kolonu je naneseo 150  $\mu$ L uzorka (Slika 2.4 b), dok se ostatak ukupnih lipida koristio kao zasebna frakcija. Frakcija triacilglicerola (nepolarnih lipida) iz uzorka ispirana je mješavinom kloroform/izopropanol = 2:1 (vv) u volumenu od 2 x 2 mL (Slika 2.4 c). Frakcija fosfolipida (polarnih lipida) ispirana je metanolom u volumenu od 10 x 2 mL (Slika 2.4 d). Slobodne masne kiseline eluirane su smjesom 2 % mravlje kiseline u eteru u volumenu od 2 x 3 mL. Dobivene frakcije uparene su do suha i korištene za analizu masnih kiselina .

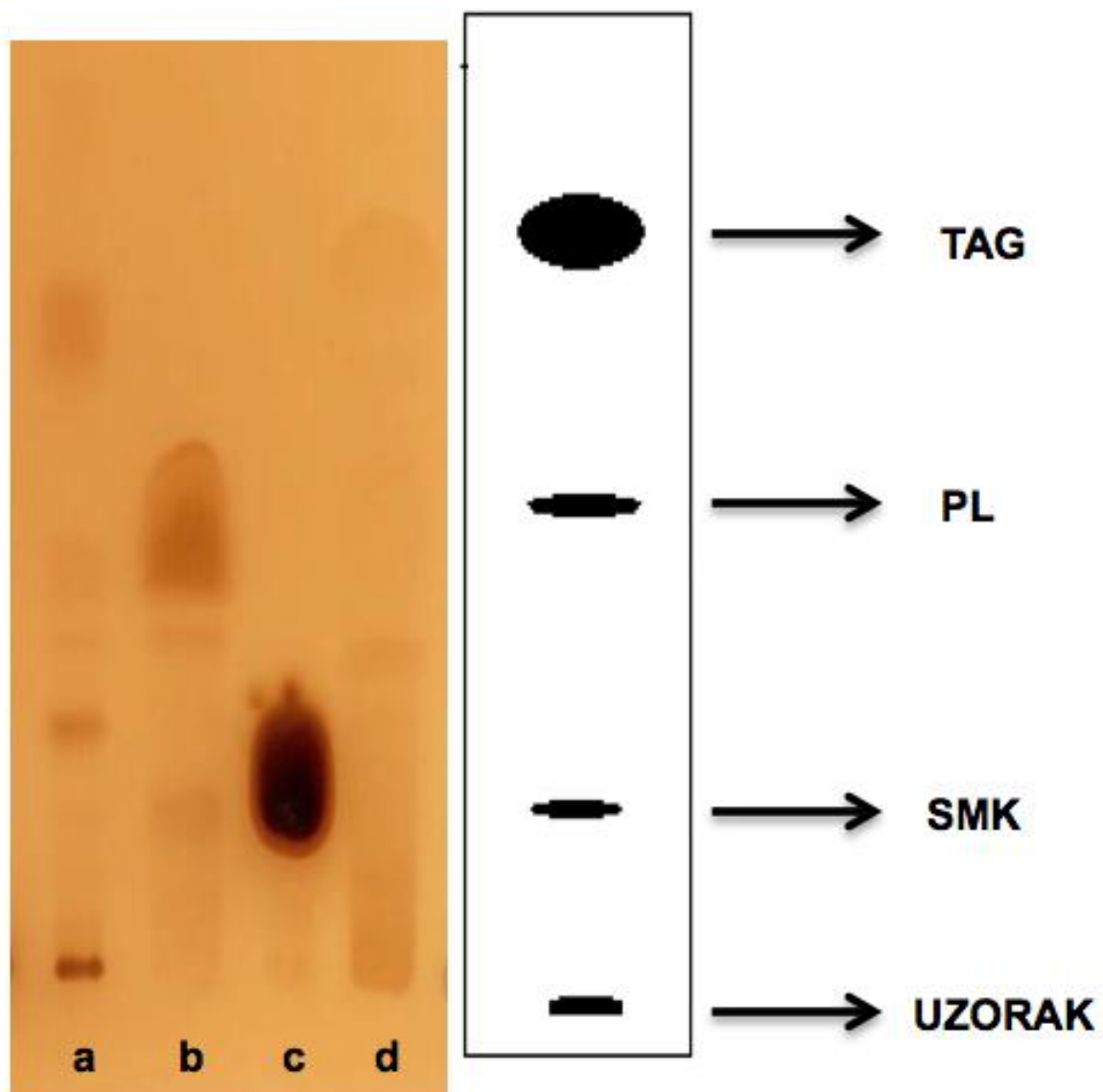


**Slika 2.4** Shema razdvajanja lipidnih frakcija prema stupnju polarosti ([www.pubs.rsc.org](http://www.pubs.rsc.org))

### 2.2.3. Tankoslojna kromatografija

S ciljem provjere učinkovitosti razdvajanja lipidnih frakcija korištena je uzlazna tankoslojna kromatografija na pločama silikagela prema metodi Mangold (1969), uz modifikacije prema Ramić i sur. (2006).

Za tankoslojnu kromatografiju korištene su staklene ploče veličine 10 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany), (Slika 2.5) impregnirane tankim slojem silikagela (0,25 mm). Kao razvijajući koristi se smjesa petroleter:dietileter:octena kiselina u omjeru 80:20:1 (v:v:v). Za identifikaciju izoliranih ukupnih lipida (a) i lipidnih frakcija: triacilglicerola (d), fosfolipida (b) i slobodnih masnih kiselina (c) korištene su standardne otopine fosfolipida (PL), triacilglicerola (TAG) i slobodnih masnih kiseline (SMK). Vizualizacija je izvršena u kupelji sa zasićenim parama joda (Slika 2.5 a, b, c i d).



Slika 2.5 Tankoslojna kromatografija

### 2.2.4. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Prevođenje masnih kiselina u metilne estere provedeno je prema metodi Morrison i Smith (1964). Kao interni standard uzorcima se dodaje nonadekanska kiselina C 19:0 (Sigma Aldrich, Njemačka). U staklene epruvete s uparenom lipidnom frakcijom dodano je 1 mL 1 M metanolne NaOH te su stavljane u termostat na 70 °C kroz 30 min. Zatim se uzorak hladi i doda se 2 mL 12 % BF<sub>3</sub> u metanolu. Epruvete se ponovno čvrsto zatvore, dobro protresu te vrata u termostat na još 10 minuta. Nakon ponovnog hlađenja u uzorak se dodaje 2 mL heksana i 1 mL 20 % NH<sub>4</sub>Cl. Uzorak se centrifugira 15 minuta na 3000 g pri 4 °C. Pažljivo se odvoji gornja organska faza, dodaje se natrijev sulfat bezvodni kako bi se odstranio višak vode, te ostavi uzorak na 4 °C preko noći. Nakon filtriranja uzorci se upare do suhog. Epruvete se propušu čistim dušikom iz boce, zatvore i čuvaju na -20 °C do analize na plinskom kromatografu.

### 2.2.5. Plinska kromatografija

Upareni ekstrakti metilnih estera masnih kiselina (*fatty acid methyl esters*, FAME) otapani su u otopini kloroforma, te su injektirani u plinski kromatograf SRI 8610C (Slika 2.6), (SRI Instruments Chromatography Systems, Torrance, CA, USA). Za kromatografiju je korištena DB-WAX kolona, duljine 60 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm te debljine aktivnog sloja 0,25 μm, proizvođača Agilent J&W, SAD.



Slika 2.6 Plinski kromatograf, model SRI 8610C

Temperaturni uvjeti bili su slijedeći: temperatura injektora 260 °C, temperatura detektora (FID) 260 °C, početna temperatura kolone 150 °C, 3 min, zagrijavanje 8°C/min do 220 °C, 32 min na 220 °C. Kao plin nosač korišten je vodik uz protok 20 mL/sec, u "split modu" omjera 1:100. Ukupno trajanje programa iznosilo je 45 min.

Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je na temelju vremena retencije usporedbom s poznatim standardima (PUFA 1 F.A.M.E. mix, C 18-C 20, PUFA 2 Marine Source, Supelco 37 Component F.A.M.E. mix, Supelco, SAD).

Sadržaj masnih kiselina izražen je kao relativni maseni udio (%). Masne kiseline su grupirane i prikazane u skladu sa svojim stupnjem zasićenosti SFA, MUFA, PUFA, n-3, n-6, ako nije drugačije navedeno. Kvantitativno određivanje pojedinih masnih kiselina provedeno je usporedbom površine vrška internog standarda (C 19:0) dodanog tijekom metilacije masnih kiselina s površinom vrška pojedine masne kiseline. Obrada kromatograma provedena je računalnim programom Peak Simple 3D 2000 za Windows. Aterogeni indeks (AI), trombogeni indeks (TI), omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (U/S), te indeks nezasićenja (UI) n-3 i n-6 reda izračunati su prema formulama prikazanim na slici 2.7 (Slika 2.7 a, b, c, d i e).

$$a) \quad AI = \frac{(4 \times C 14:0) + C 16:0}{\Sigma MUFA + \Sigma PUFA (n-6) + \Sigma PUFA (n-3)}$$

$$b) \quad TI = \frac{C 14:0 + C 16:0 + C 18:0}{0,5 (\Sigma MUFA) + 0,5 (\Sigma PUFA (n-6)) + 3 (\Sigma PUFA (n-3)) + \left(\frac{n-3}{n-6}\right)}$$

$$c) \quad U/S = \frac{\Sigma MUFA + \Sigma PUFA}{\Sigma SFA}$$

$$d) \quad UI (n - 3) = \frac{\Sigma (n-3 \text{ PUFA}) \times \Sigma (\text{dvostrukih veza } n-3 \text{ PUFA})}{100}$$

$$e) \quad UI (n - 6) = \frac{\Sigma (n-6 \text{ PUFA}) \times \Sigma (\text{dvostrukih veza } n-6 \text{ PUFA})}{100}$$

**Slika 2.7** Formule korištene za izračunavanje indeksa masnih kiselina



## **2.3. Određivanje oksidativnog oštećenja**

Nakon uzorkovanja, školjkašima je izvađeno tkivo, višekratno isprano u fiziološkoj otopini, osušeno na staničevini i izvagano. Tkivo je zatim homogenizirano korištenjem 0,14 M otopine KCl u omjeru 1:10 pomoću Ultra-Turax homogenizatora (5 x 20 s) uz stalno hlađenje u vodi s ledom. Homogenati su zatim centrifugirani na 12 000 g 10 minuta pri 4 °C u Eppendorf centrifugi Hettich EBA 12 R. Nakon centrifugiranja, supernatanti tkiva su čuvani na -80 °C do analize. U tako dobivenom supernatantu homogenata tkiva kamenica opseg oksidativnih oštećenja procijenjen je na nekoliko načina, putem određivanja aktivnosti antioksidacijskih enzima i koncentracije lipidnih peroksida i malondialdehida.

### **2.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)**

Katalitička koncentracija enzima superoksid-dismutaze (SOD, E. C. 1.15.1.1.) određena je u supernatantu homogenata tkiva inhibicijom redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin-oksidaza prema modificiranoj metodi McCord i Fridovich (1969). U staklenu kivetu s 2,9 mL otopine A (1,5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9,86 mL 1 mM NaOH i tome je dodano 12,96 mg 0,05 mM citokroma c otopljenog u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera pH = 7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA) doda se 50 µL uzorka i reakcija se započne dodatkom 50 µL otopine B (1500 µL otopine svježe pripremljene ksantin-oksidaze u 50 mM fosfatnom puferu pH = 7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U/mL). Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Jedinica SOD-a (U) definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma c u usporedbi s baždarnim pravcem s poznatim koncentracijama SOD. Aktivnosti SOD izražena je kao U/mg proteina. Svaki uzorak izmjeran je u triplicatu.

### **2.3.2. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)**

Aktivnost enzima glutation-reduktaza (GR, E. C. 1.6.4.2) određena je prema protokolu za komercijalni set (Randox, Irska). Glutation-reduktaza katalizira konverziju oksidiranog glutationa u reducirani glutation upotrebljavajući NADPH kao supstrat. Količina NADPH koja se koristi u reakciji izravna je mjera aktivnosti enzima. Reakcijska smjesa (pH 7,5) sadržavala je 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM EDTA, 2 mM NADPH i 2 mM GSSG. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 500 µL 2 mM otopine GSSG, 400 µL 100 mM kalijevog fosfatnog pufera (pH 7.5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA te 50 µL ekstrakta proteina i 50 µL 2 mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je 2-3 minute pri valnoj duljini od  $\lambda = 340$  nm svakih 15 sekundi. Za svaku seriju mjerenja napravljena je i negativna kontrola s destiliranom vodom umjesto oksidiranog glutationa. Kao pozitivna kontrola korištena je glutation-reduktaza ekstrahirana iz kvasca, koja je također sastavni dio korištenog analitičkog seta za GR. Aktivnost GR izražena je enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu

enzima koji katalizira redukciju 1  $\mu\text{mol}$  supstrata po minuti, a normirana je na koncentraciju proteina u uzorku.

Aktivnosti SOD i GR određivane su reagensima tvrtke Randox (Dublin, Irska) na biokemijskom analizatoru SABA 18 (AMS, Rim, Italija).

### 2.3.3. Određivanje lipidnih peroksida (LP)

Za mjerenje oštećenja na razini lipida korištena je metoda sa željezo-reagensom (Mihaljević i sur., 1996). Suhi ostatak nakon ekstrakcije lipida razrijedi se diklormetanom ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) tako da svaki uzorak sadrži približno 2 mg/mL lipida. U odmjernim tikvicama od 5 mL deaerira se smjesa otapala ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 2:1$ , v:v) kojoj se potom doda alikvot ekstrahiranih hidroperoksida te 0,4 mL Fe-reagens (deaerirana otopina  $0,0045 \text{ mol dm}^{-3} \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  u  $0,04 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$  i 3% KSCN u MeOH pomiješane su u omjeru 1:1). Crveno obojene mjerne otopine snimljene su na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 500 \text{ nm}$ , u kivetu od 1 cm na sobnoj temperaturi. Uzorci su snimani 30–40 minuta nakon vremena postizanja kvantitativnosti reakcije Fe-reagens i ispitivanih otopina hidroperoksida. Ova se metoda temelji na mjerenju količine peroksida nastalih prilikom oksidacije lipida. Koncentracija hidroperoksida izračuna su iz vrijednosti apsorbancije mjernih otopina umanjenih za vrijednost slijepe probe i vrijednosti molarnog ekstinkcijskog koeficijenta feritocijanatnog kompleksa ( $\epsilon = 58440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.3.4. Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA)

Stupanj peroksidacije lipida određen je prema metodi Okhawa i sur. (1979). Koncentracija produkata lipidne peroksidacije određena je kao količina tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS) (Heath i Packer, 1968.) uz određene modifikacije.

U 0,5 mL supernatanta dodaje se 1,0 mL 20%-tne trikloroctene kiseline (TCA) (Kemika, Hrvatska) kako bi se istaložili proteini. Nakon centrifugiranja na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pri 6000 g tijekom 5 minuta, na 0,5 mL bistrog supernatanta dodaje se 1,0 mL 0,5% tiobarbiturne kiseline (TBA) (Sigma Aldrich, Njemačka). promiješa i smjesa se zagrijava 30 minuta u vodenoj kupelji na  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon ponovnog centrifugiranja pri 1000 g 10 minuta, apsorbancija se očitava pri  $\lambda = 535 \text{ nm}$  i  $\lambda = 600 \text{ nm}$  na spektrofotometru Genesys (10 S, USA) prema slijepoj probi, koristeći integriranu programsku podršku. Ovaj spektrofotometar je korišten u svim kasnije opisanim analizama antioksidativne aktivnosti. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) izračunata je prema molarnom ekstinkcijskom koeficijentu  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i izražena kao nM g<sup>-1</sup> mokre mase (w/w). Baždarni dijagram pripremljen je iz različitih razrijeđenja matičnog standarda 1,1,3,3-tetrametoksiopropana (TMP) (Sigma Aldrich, Njemačka).

## 2.4. Statistička obrada podataka

Razina statističke značajnosti određena je na  $p < 0,05$ , te su u svim slučajevima upotrebljavani dvokračni (engl. *two-tail*) testovi statističke značajnosti. Normalnost raspodjela provjeravana je Shapiro-Wilk testom, a kao mjere centralne tendencije i raspršenja prikazani su medijan i interkvartilni raspon. Statistička značajnost razlike u srednjim vrijednostima pojedinih parametara kroz 12 mjeseci analizirana je Kruskal – Wallis testom. Povezanost pojedinih parametara s obilježjima sezone analizirana je Pearsonovim koeficijentom korelacije, a predviđanja vrijednosti na temelju obilježja sezone obavljena su putem multiple linearne regresije. Sve statističke obrade obavljene u paketu SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Stupičasti grafikoni sažeto prikazuju raspodjelu vrijednosti na svakoj razini. Krajevi linija prikazuju 25 % (donji kvartil - Q1) i 75 % (gornji kvartil - Q3) vrijednosti, a sredina čini interkvartilni raspon. Visina stupića prikazuje medijan mjerenih vrijednosti.

U idućem koraku napravljena je multipla regresijska analiza za varijable koje su se pokazale statistički značajno povezane s obilježjima sezone i statistički značajno različite s obzirom na mjesec (statistička značajnost u oba slučaja). U analizi su u obzir uzete 4 komponente, budući da su pojedina obilježja sezone međusobno u visokim korelacijama.

Kod višestrukih usporedbi koristi se Bonferroni korekcija koja podešava razinu statističke značajnosti jedne analize kako bi razina statističke značajnosti cijelog seta usporedbi iznosila  $p < 0,005$ . Razina vjerojatnosti da ćemo dobiti lažno pozitivan rezultat postavljena je na  $p = 0,05$  kod jedne usporedbe, no kad se rade primjerice tri usporedbe, ako je razina značajnosti za svaku  $p = 0,05$ , tada će za ukupnu analizu (sve 3 usporedbe) vjerojatnost pogreške biti  $0,05 \cdot 3$ , odnosno 15 %. Bonferronijeva korekcija postavlja ukupnu razinu značajnosti (za sve analize) na 0,05.

## 2.5. Matematičko modeliranje

Pored klasičnih statističkih metoda obrade podataka, u ovom radu korištene su i metode matematičkog modeliranja i predikcije sastava masnih kiselina ukupnih lipida korištenjem računalnog programa R (verzija i386 3.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

Analiza podataka provedena je metodom višestruke linearne regresije. Modeliranje je provedeno zasebno za svaku zavisnu varijablu (ZV). Za dobivanje boljeg uvida u oblik distribucija koriste se *box – dijagrami* i *histogrami*. U slučaju odstupanja od pretpostavki regresije ili postojanja većih *outliera* (netipičnih vrijednosti), provodi se Box – Coxova metoda za procjenu najbolje transformacije nad ZV u smislu regresijskog modela. Osim toga, kako bi bolje procijenili oblik i formu modela, korišten je regresijski model u kojem je neovisna kategorička varijabla mjesec, s 12 kategorija koje su uključene u model kroz 11 pokazatelja (dummy) varijable (Zar, 2010). Ovaj model je ekvivalent ANOVA analizi. Kriteriji koji su korišteni za procjenu prilagodbe pojedinog modela su: prilagođeni koeficijent determinacije (*adjusted coefficient of determination*,  $R_a^2$ ), Akaike informacijski kriterij (*Akaike*

*information criteria*, AIC) i predikcijska suma kvadrata reziduala (*predicted residual sum of squares*, PRESS).

*t*-testom se testira jeli, s obzirom na druge nezavisne varijable u modelu, dobiveni koeficijent značajno različit od 0, a F testom se testira jeli model značajan u cijelosti (*goodness-of-fit*). Za usporedbu s dobivenim modelom naveden je i  $R^2$  modela s mjesecima kao kategorijskom nezavisnom varijablom (ANOVA model) te vrijednost F–testa za prilagodbu modela (*lack-of-fit*).

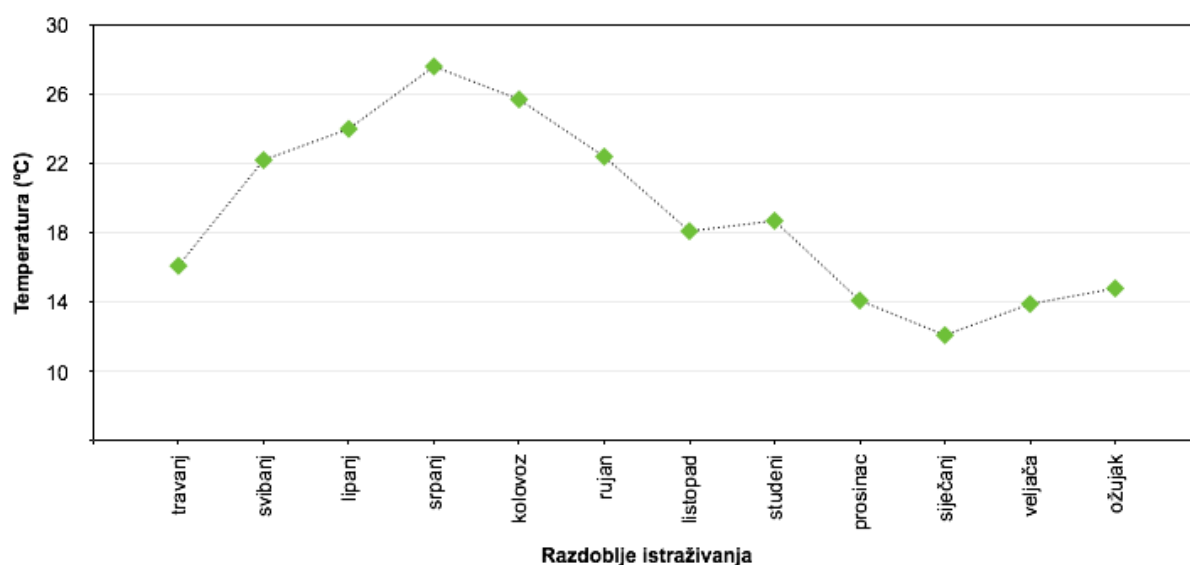
Pomoću *Shapiro – Wilkovog* testa, testira se odstupaju li reziduali značajno od normalne razdiobe, a *Breusch – Paganov* test testira postoji li značajna heterogenost varijance. Eventualno postojanje multikolinearnosti provjerava se VIF (*variance inflation factor*) statistikom. Uz ove osnovne dijagnostike, provjerava se i postojanje utjecajnih slučajeva.

Ovim pristupom dobivaju se modeli koji, može se reći koriste podatke i na učinkovitiji način od standardnih statističkih metoda. Pristup modeliranju podataka preko strojnog učenja omogućava, u nekim slučajevima istovremeno korištenje podataka sa prediktivnog aspekta, ali i modele podataka koji omogućavaju jednostavniju interpretaciju sa stanovišta varijabli od interesa za istraživani fenomen.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Osnovni hidrografski parametri

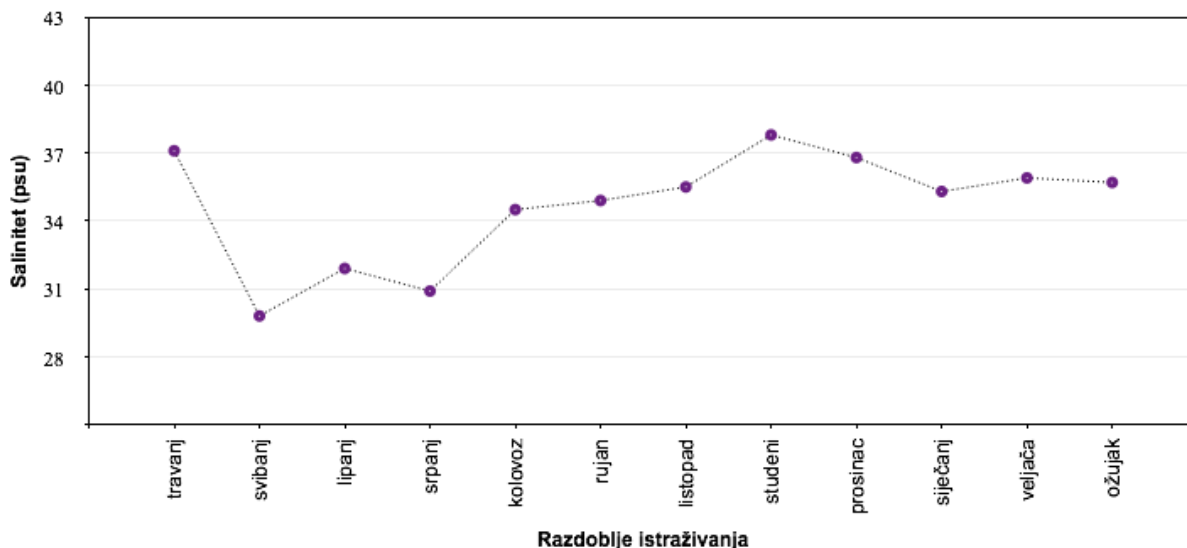
Temperatura (*temperature*, T) morske vode mijenja se sezonski, raste tijekom proljeća i ljeta te dostiže maksimalne vrijednosti u srpnju i kolovozu, a tijekom zimskih mjeseci ima najniže vrijednosti. Najveća srednja mjesečna temperatura mora (27,6 °C) utvrđena je u srpnju, a najniža (12,1 °C) u siječnju. (Slika 3.1).



**Slika 3.1** Vrijednosti temperature mora na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

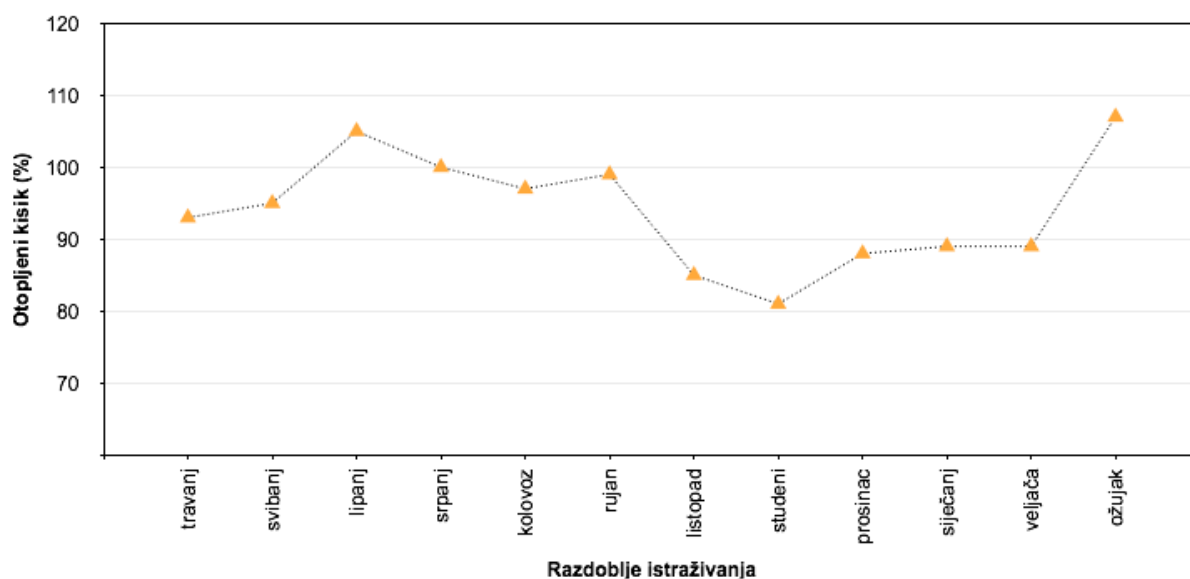
Na mjestu pokusnog parka utvrđena je pozitivna korelacija temperature mora s koncentracijom otopljenog kisika (*dissolved oxygen*, DO), te negativna korelacija temperature mora s koncentracijom nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) i salinitetom (*salinity*, S) kroz godinu (Tablica 3.1).

U usporedbi s temperaturom mora, srednje mjesečne vrijednosti saliniteta izrazitije su varirale tijekom godine (Slika 3.2). Najveći salinitet zabilježen je u studenom (37,8 psu). Na mjestu pokusnog parka utvrđene su negativne korelacije saliniteta s koncentracijom otopljenog kisika i temperaturom mora, a visoka pozitivna korelacija utvrđena je između saliniteta i koncentracije partikularne i anorganske tvari. (Tablica 3.1).



**Slika 3.2** Vrijednosti saliniteta mora na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

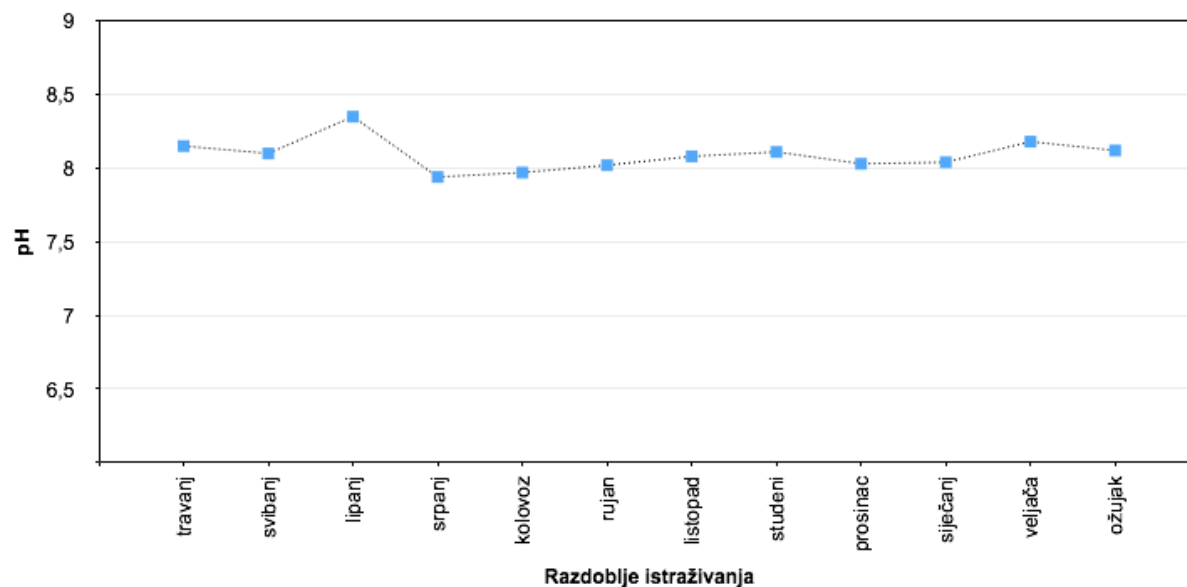
Vrijednosti zasićenja mora kisikom uglavnom su veće od 80 % na istraživanoj postaji što pokazuje dobru prozračnost. Srednja mjesečna zasićenost mora kisikom bila je najveća u ožujku (106 %), a najmanja u studenom (81 %) (Slika 3.3).



**Slika 3.3** Vrijednosti koncentracije otopljenog kisika u moru na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

Tijekom razdoblja istraživanja izmjerene su niže vrijednosti koncentracije otopljenog kisika u periodu od listopada do veljače. Utvrđene su negativne korelacije vrijednosti otopljenog kisika u moru sa salinitetom, koncentracijom partikularne i anorganske tvari i koncentracijom nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ), a visoka pozitivna korelacija utvrđena je između vrijednosti zasićenja mora kisikom i temperature mora. (Tablica 3.1).

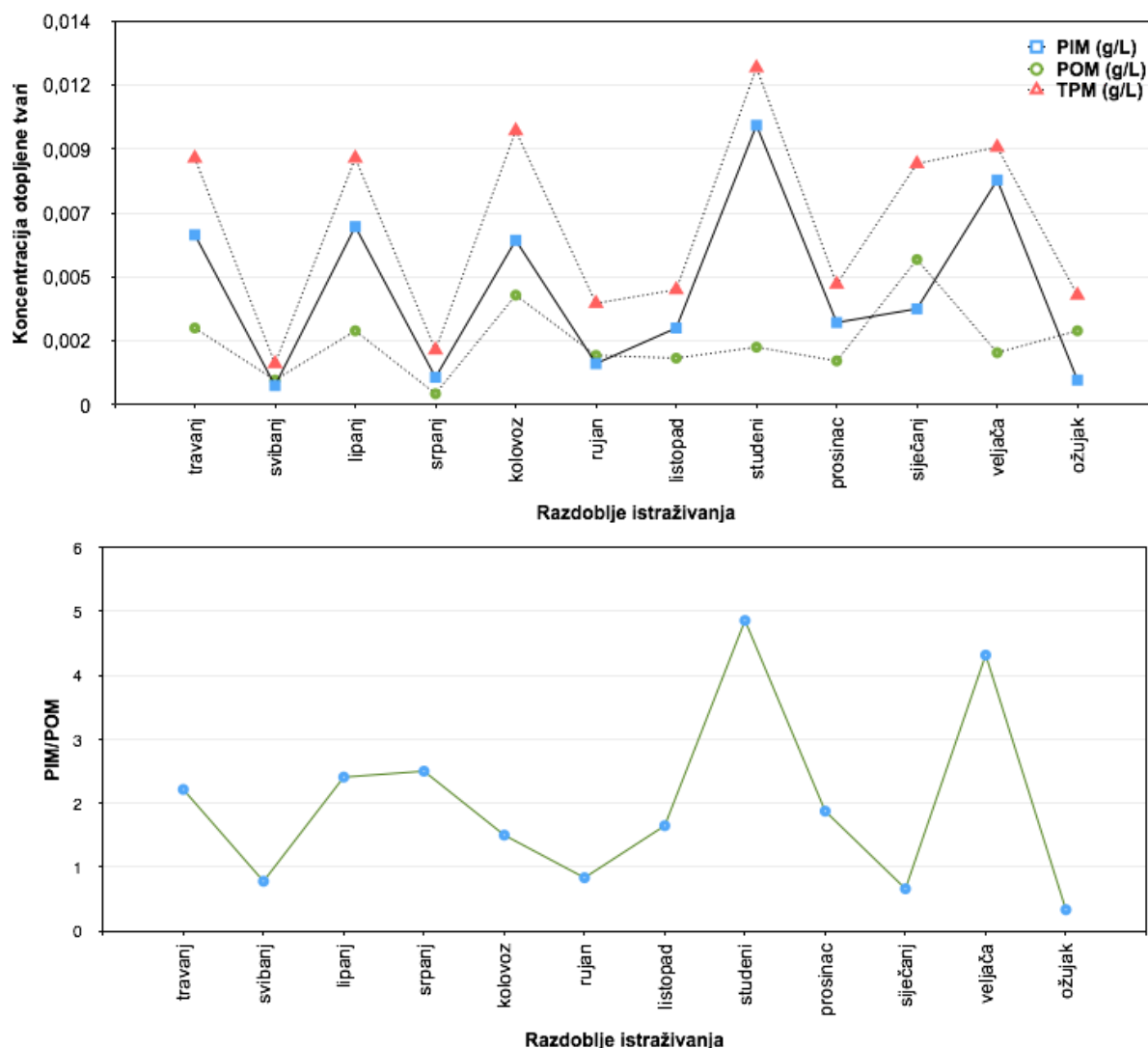
Srednje mjesečne vrijednosti stupnja kiselosti (*potential Hydrogen*, pH) na istraživanoj postaji su pokazivale manje oscilacije tijekom cijele godine, pri čemu je najveća vrijednost zabilježena u lipnju (8,35), a najmanja u srpnju (7,94) što čini i jedinu veću godišnju oscilaciju (Slika 3.4). Iz Tablice 3.1 je vidljiva najveća pozitivna korelacija između pH mora i koncentracije fosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) u moru.



**Slika 3.4** Vrijednosti pH mora na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

Rezultati srednjih mjesečnih koncentracija svih komponenti partikularne tvari tijekom godine pokazuju izrazitije vremenske varijacije (Slika 3.5a). Tijekom razdoblja istraživanja najveće srednje mjesečne koncentracije ukupne partikularne tvari (*total particular matter*, TPM) izmjerene su u studenom (0,0123 g/L), organske partikularne tvari (*particular organic matter*, POM) u siječnju (0,0053 g/L), a anorganske partikularne tvari (*particular inorganic matter*, PIM) u studenom (0,0102 g/L). Najniže srednje mjesečne koncentracije TPM i PIM bile su u svibnju (0,0015 g/L, 0,0007 g/L), a POM u srpnju (0,004 g/L). Utvrđene su negativne korelacije vrijednosti TPM i PIM sa stupnjem zasićenosti mora kisikom, dok je vrijednost POM negativno korelirala s temperaturom mora. Visoka pozitivna korelacija utvrđena je između vrijednosti TPM i PIM s vrijednostima saliniteta, nitrata i fosfata. Osim sa salinitetom, nitratima i fosfatima, vrijednosti POM u pozitivnoj su korelaciji i s koncentracijom amonijaka u moru (Tablica 3.1).

Omjer između PIM i POM u studenom i veljači imao je vrijednosti iznad 2,5. (Slika 3.5b).

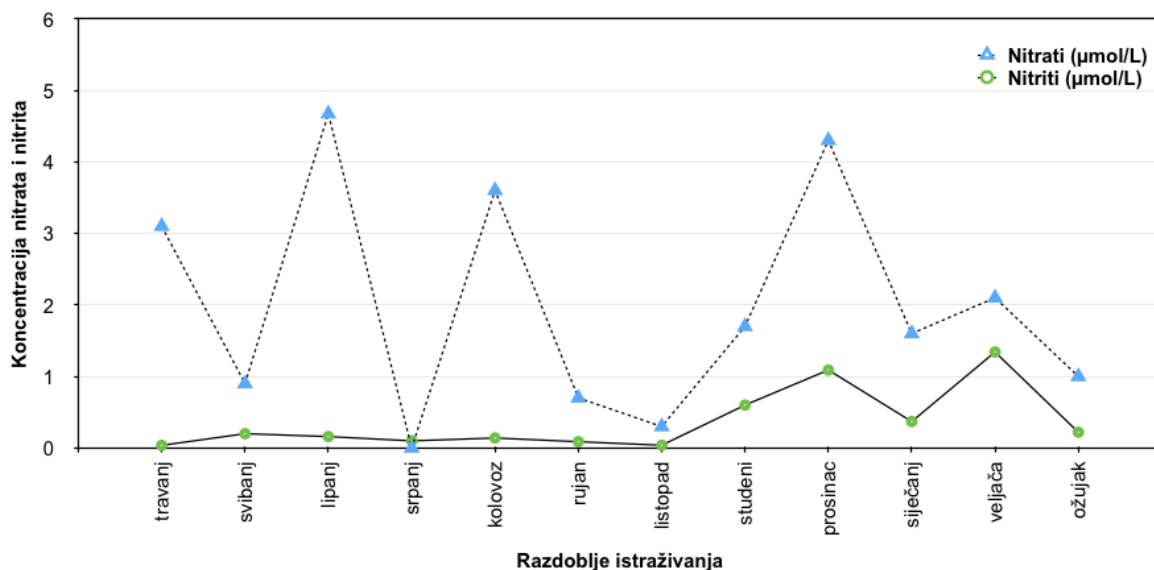


**Slika 3.5** Vrijednosti koncentracije partikularne tvari u moru na ispitivanoj postaji i omjer anorganske i organske partikularne tvari, u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

Koncentracija nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) u moru na ispitivanoj postaji značajno je varirala od 0,005 do 4,67  $\mu\text{mol/L}$ , (Slika 3.6). Najveća koncentracija nitrata zabilježena je u lipnju, dok je najniža koncentracija nitrata zabilježena u srpnju. Na mjestu pokusnog parka utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije nitrata sa salinitetom mora i koncentracijom fosfata u moru, a značajna negativna korelacija nije uočena (Tablica 3.1).

Varijacije koncentracije nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) u moru tijekom godine na istraživanoj postaji bile su manje u usporedbi s koncentracijom nitrata (Slika 3.6). Tijekom zime, koncentracije nitrita su bile povišene (0,37-1,34  $\mu\text{mol/L}$ ). U toplijem dijelu godine od ožujka do listopada koncentracija nitrita kretala se u rasponu od 0,0039 do 0,22  $\mu\text{mol/L}$ . Utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije nitrita sa salinitetom mora i koncentracijom PIM, a negativna korelacija uočena je između koncentracije nitrita i temperature mora, te sa stupnjem zasićenosti mora kisikom (Tablica 3.1).

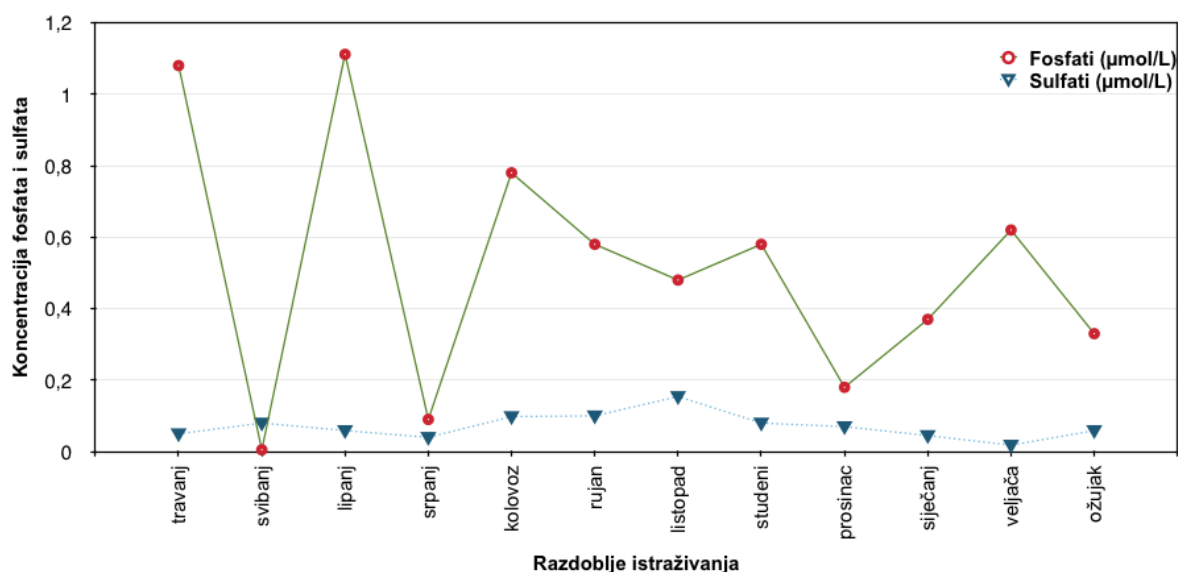




**Slika 3.6** Vrijednosti koncentracije nitrata i nitrita u moru na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010. godine.

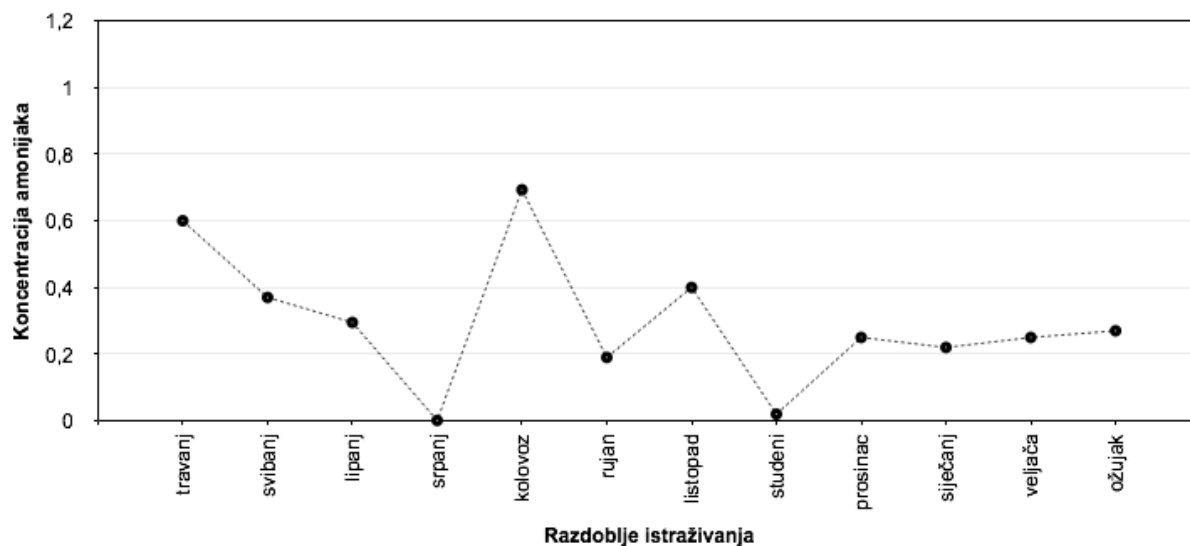
Koncentracije fosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) bile su u rasponu 0,051 – 1,11  $\mu\text{mol/L}$  (Slika 4.7). Najveća koncentracija fosfata zabilježena je u travnju i lipnju, a najmanja u svibnju i srpnju. Utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije fosfata s koncentracijom POM, PIM, nitrata, te pH mora, a značajnija negativna korelacija nije uočena (Tablica 3.1).

Koncentracije sulfata ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) bile su u rasponu 0,01 – 0,1541  $\mu\text{mol/L}$  (Slika 3.7). Najveća koncentracija sulfata u moru zabilježena je u listopadu, a najmanja u veljači. Utvrđena je slaba pozitivna korelacija koncentracije sulfata s koncentracijom amonijaka i temperaturom mora, dok je najveća negativna korelacija utvrđena s koncentracijom nitrita (Tablica 3.1).



**Slika 3.7** Vrijednosti koncentracije fosfata i sulfata u moru na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

Koncentracije amonijaka ( $\text{NH}_3^-$ ) u moru izmjerene su u rasponu od 0,0011 do 0,69  $\mu\text{mol/L}$  (Slika 3.8). Najmanje koncentracije amonijaka zabilježene su u srpnju i studenom, a najveće u kolovozu. Utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije amonijaka s koncentracijom POM, nitrata, te sulfata u moru, a negativna korelacija uočena je s koncentracijom nitrita u moru (Tablica 3.1).



**Slika 3.8** Vrijednosti koncentracije amonijaka u moru na ispitivanoj postaji u razdoblju od travnja 2009. do ožujka 2010.

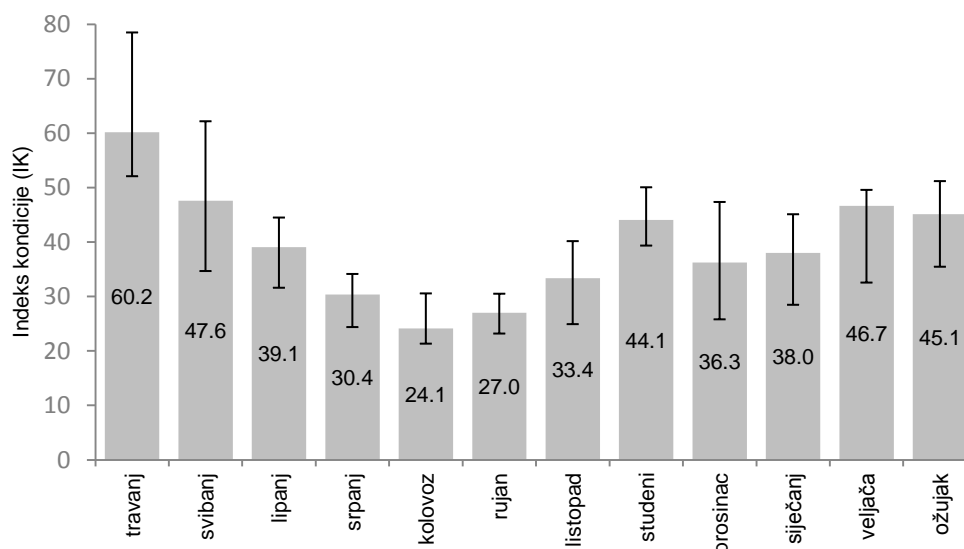
Tablica 3.1 Korelacije nezavisnih i zavisnih varijabli obilježja sezone

	T (°C)	DO (%)	pH	S (psu)	TPM (g/L)	PIM (g/L)	POM (g/L)	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )
T (°C)	1,00	0,43	-0,18	-0,68	-0,22	-0,14	-0,36	-0,08	-0,54	0,04	0,25	0,03
DO (%)	0,43	1,00	0,18	-0,53	-0,37	-0,47	-0,02	0,04	-0,48	0,10	-0,19	0,13
pH	-0,18	0,18	1,00	0,00	0,35	0,43	0,06	0,43	0,11	0,59	-0,22	0,07
S (psu)	-0,68	-0,53	0,00	1,00	0,55	0,50	0,36	0,22	0,40	0,32	0,04	0,07
TPM (g/L)	-0,22	-0,37	0,35	0,55	1,00	0,93	0,60	0,51	0,25	0,71	-0,17	0,18
PIM (g/L)	-0,14	-0,47	0,43	0,50	0,93	1,00	0,27	0,48	0,39	0,66	-0,17	0,07
POM (g/L)	-0,36	-0,02	0,06	0,36	0,60	0,27	1,00	0,34	-0,10	0,42	-0,07	0,39
Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,08	0,04	0,43	0,22	0,51	0,48	0,34	1,00	0,27	0,58	-0,14	0,43
Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,54	-0,48	0,11	0,40	0,25	0,39	-0,10	0,27	1,00	-0,17	-0,42	-0,28
Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,04	0,10	0,59	0,32	0,71	0,66	0,42	0,58	-0,17	1,00	-0,02	0,47
Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,25	-0,19	-0,22	0,04	-0,17	-0,17	-0,07	-0,14	-0,42	-0,02	1,00	0,28
Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,03	0,13	0,07	0,07	0,18	0,07	0,39	0,43	-0,28	0,47	0,28	1,00

KRATICE: T = temperature mora; DO = otopljeni kisik; S = salinitet; TPM = ukupna partikularna tvar; PIM = anorganska partikularna tvar; POM = organska partikularna tvar

### 3.2. Indeks kondicije i biokemijski sastav tkiva kamenica

Indeks kondicije kamenica kretao se tijekom godine od minimalnih 24,1 (21,3–30,5) u kolovozu, do maksimalnih vrijednosti indeksa kondicije zabilježenih u travnju 60,2 (52,1–78,5). Indeks kondicije pokazuje tendenciju smanjenja od travnja i dostiže minimum u kolovozu i rujnu, nakon čega slijedi postupno povećanje tijekom jeseni i zime kada je indeks kondicije prilično ujednačen (Slika 3.9).



**Slika 3.9** Indeksa kondicije kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Rezultati udjela biokemijskih parametara (lipidi, glikogen i proteini) tkiva kamenica izraženi su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ), i prikazani u Tablici 3.2.

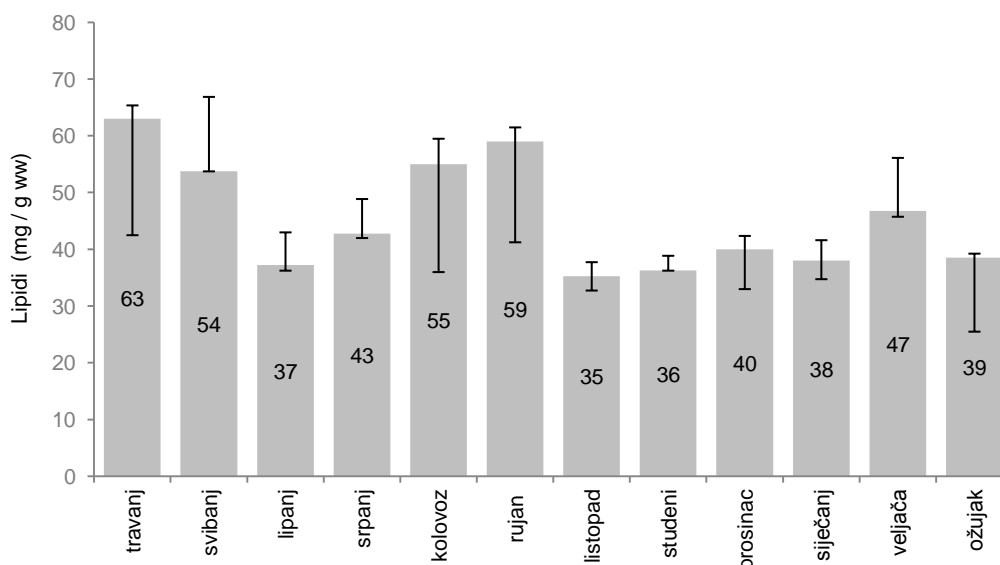
Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesec u godini ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.2 Biokemijski sastav europske plosnate kamenice tijekom godine

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studenj	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
Lipidi (mg/g ww)	63,00 (52,75-65,38)	53,75 (53,75-66,88)	37,25 (36,75-43,00)	42,75 (42,38-48,88)	55,00 (45,50-59,50)	59,00 (50,13-61,50)	35,25 (34,00-37,75)	36,25 (36,25-38,88)	40,00 (36,50-42,38)	38,00 (36,38-41,63)	46,75 (46,25-56,13)	38,50 (32,00-39,25)	0,043
Proteini (mg/g ww)	133,39 (122,16-135,52)	190,70 (174,85-196,14)	115,96 (104,09-117,40)	144,72 (141,37-147,86)	194,43 (180,40-196,00)	62,59 (58,67-67,44)	103,84 (100,08-112,47)	109,71 (109,52-112,06)	96,20 (91,95-100,58)	64,91 (62,87-68,66)	34,84 (31,72-59,32)	83,58 (77,63-86,35)	0,001
Glikogen (mg/g ww)	15,74 (12,47-17,51)	26,75 (23,44-28,54)	10,11 (9,68-17,87)	30,78 (23,27-33,02)	25,16 (23,16-27,92)	4,60 (3,97-5,41)	16,95 (15,78-19,94)	19,23 (17,12-21,00)	21,02 (20,35-22,75)	40,05 (39,46-42,44)	26,05 (24,08-28,81)	26,59 (25,62-28,51)	0,008

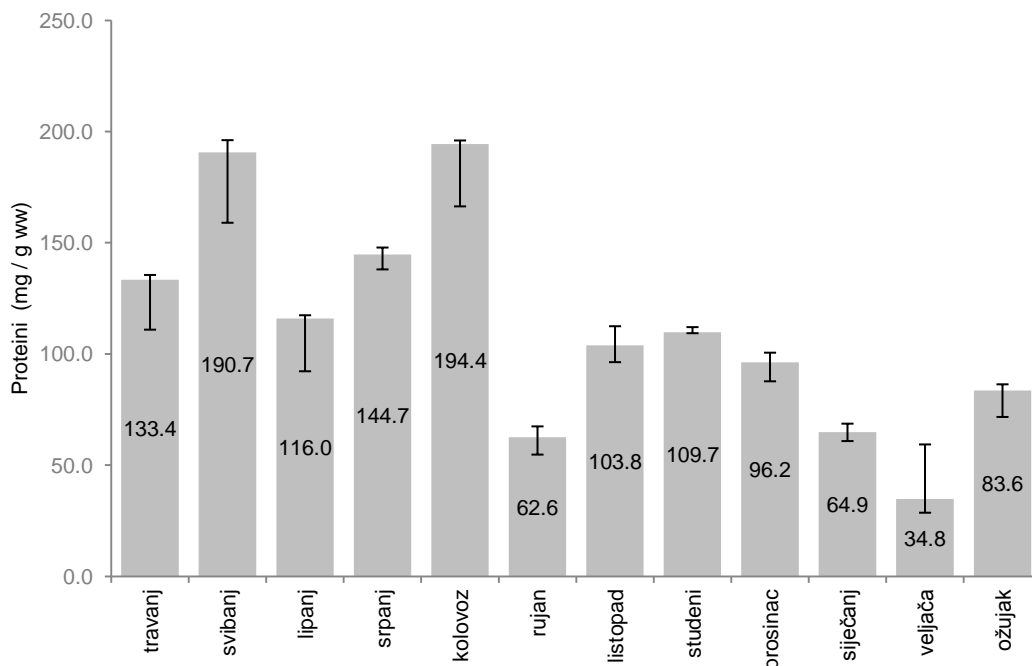
KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Udio lipida u tkivu kamenica tijekom godine kretao se od minimalnih 35,25 (34,0 – 37,75) mg/g vlažnog tkiva (*wet weight*, ww) u listopadu, do maksimalnih vrijednosti zabilježenih u travnju 63,0 (52,75 – 65,38) mg/g ww. Udio lipida raste tijekom proljeća i dostiže maksimum u travnju i svibnju, nakon čega slijedi ljetni pad u lipnju i srpnju, a tijekom jeseni i zime udjeli lipida prilično su ujednačeni (Slika 3.10). Kruskal–Wallis (KW) testom utvrđena je statistički značajna različitost vrijednosti udjela lipida u vlažnom tkivu kamenica ( $p = 0,043$ ) tijekom godine (Tablica 3.2).



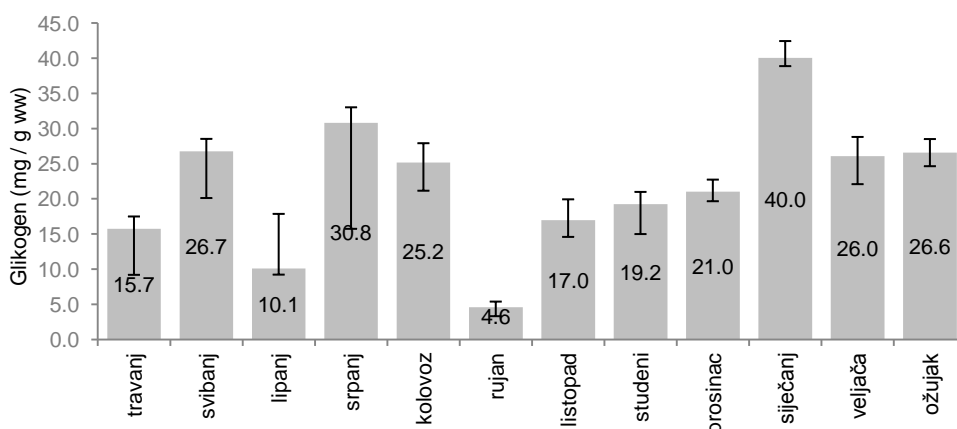
**Slika 3.10** Udio lipida u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Udio sadržaja proteina u tkivu europske plosnate kamenice tijekom godine kretao se od minimalnih 34,84 (31,72 – 59,32) mg/g ww u veljači do maksimalnih vrijednosti zabilježenih su u svibnju 190,7 (174,85 – 196,14) i kolovozu 194,43 (180,40 – 196,0) mg/g ww. Primijećen je porast sadržaja proteina od ožujka do svibnja, te od lipnja do kolovoza, nakon čega slijedi smanjenje u rujnu i ujednačene minimalne vrijednosti u hladnijem dijelu godine (Slika 3.11). KW testom utvrđena je statistički značajna razlika ( $p = 0,001$ ) udjela proteina u vlažnom tkivu kamenica prema mjesecima u godini (Tablica 3.2).



**Slika 3.11** Udio proteina u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Sadržaj glikogena u tkivu europske plosnate kamenice tijekom godine varirao je od minimalnog udjela od 40,6 (3,97 – 5,41) mg/g ww u rujnu, do maksimalnog udjela u siječnju 40,05 (39,46 – 42,44) mg/g ww. Najveće vrijednosti udjela glikogena bile su u zimskom periodu, u proljeće i jesen vrijednosti su nešto niže, dok se u jesenskom periodu dostiže minimalna vrijednost, (Slika 3.12). KW testom utvrđena je statistički značajna razlika ( $p = 0,008$ ) između udjela glikogena u vlažnom tkivu kamenica prema mjesecima u godini (Tablica 3.2).



**Slika 3.12** Udio glikogena u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

### 3.3. Sastav masnih kiselina lipidnih frakcija kamenica

#### 3.3.1. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida

Rezultati analize masnokiselinskog sastava ukupnih lipida, sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi izraženi su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha), i prikazani u Tablicama 3.3 i 3.4. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesec u godini ( $p < 0,05$ ).

Sastav masnih kiselina ukupnih lipida tkiva europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) prikazan je u Tablici 3.3.



Tablica 3.3 Relativni maseni udio (%) pojedinih masnih kiselina u ukupnim lipidima

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 14:0	2,77 (1,02-3,57)	3,91 (2,7-4,49)	4,64 (4,18-5,73)	3,78 (1,92-4,13)	4,26 (3,05-4,47)	3,41 (1,62-3,87)	4,57 (3,72-4,57)	3,73 (2,44-4,62)	3,32 (2,26-4,19)	3,14 (2,52-3,76)	2,78 (1,35-8,55)	3,49 (2,34-5,35)	0,318
C 14:1	0,36 (0,16-0,57)	0,29 (0,19-0,37)	0,41 (0,33-0,53)	0,32 (0,16-0,45)	0,35 (0,25-0,39)	0,26 (0,08-0,27)	0,35 (0,27-0,35)	0,29 (0,24-0,47)	0,31 (0,19-0,79)	0,23 (0,18-0,28)	0,19 (0,07-0,56)	0,28 (0,20-3,79)	0,581
C 15:0	0 (0-0,30)	0,01 (0-0,08)	0,24 (0,14-0,36)	0,01 (0-0,05)	0,04 (0,01-0,16)	0,04 (0,01-0,39)	0,06 (0,06-0,06)	0,14 (0,03-0,41)	0,16 (0,04-0,26)	0,09 (0,03-0,23)	0,06 (0,02-0,22)	0,39 (0,08-0,72)	0,201
C 15:1	0,76 (0,32-1,12)	0,75 (0,55-0,84)	1,04 (0,99-1,24)	0,86 (0,42-1,03)	0,82 (0,53-1,19)	0,22 (0,11-0,55)	1,16 (1,18-1,18)	1,03 (0,64-1,23)	0,82 (0,49-0,96)	1,03 (0,71-1,14)	0,71 (0,35-1,42)	0,88 (0,81-0,96)	0,302
C 16:0	15,42 (6,39-16,92)	14,3 (9,72-15,98)	18,6 (15,67-21,68)	16,95 (7,96-17,71)	13,82 (8,90-19,03)	15,46 (10,37-16,49)	19,16 (18,20-19,38)	20,06 (12,41-20,85)	15,69 (9,31-18,88)	17,25 (11,76-18,92)	11,3 (5,91-19,31)	16,63 (11,07-17,74)	0,433
C 16:1n-9	2,74 (1,61-3,84)	2,45 (1,91-3,27)	2,77 (2,63-4,4)	2,38 (1,15-2,62)	2,68 (1,58-3,16)	2,73 (2,86-2,86)	2,38 (2,34-2,52)	2,19 (1,45-2,58)	2,41 (1,66-3,97)	2,13 (1,48-2,58)	2,93 (1,42-9,24)	1,32 (0,99-2,22)	0,513
C 16:1n-7	0,38 (0,09-0,68)	0,35 (0,25-0,44)	0,57 (0,46-0,77)	0,49 (0,23-0,58)	0,54 (0,27-0,67)	0,42 (0,28-0,43)	0,65 (0,66-0,66)	0,51 (0,28-0,64)	0,5 (0,26-0,84)	0,47 (0,32-0,54)	0,49 (0,23-0,57)	0,49 (0,41-0,73)	0,335
C 17:0	0,77 (0,25-1,18)	0,54 (0,35-0,67)	0,85 (0,53-1,22)	0,45 (0,21-0,50)	0,6 (0,33-0,74)	0,63 (0,39-0,71)	0,97 (0,66-0,99)	0,85 (0,53-1,10)	1,12 (0,38-1,29)	0,61 (0,43-0,76)	0,46 (0,27-1,13)	1,33 (0,9-2,91)	0,198
C 17:1n-7	0,99 (0,45-1,16)	1,14 (0,82-1,38)	1,52 (0,98-1,67)	1,45 (0,64-1,5)	1,53 (0,91-2,06)	1,36 (0,86-1,43)	1,9 (1,74-1,92)	1,85 (1,15-2)	1,26 (0,66-1,57)	1,54 (1,02-1,78)	0,9 (0,41-1,43)	1,22 (1,13-1,57)	0,133
C 16:4n-3	4,69 (3,46-7,03)	4,26 (0,12-8,56)	5,74 (3,98-7,63)	7,88 (2,45-9,16)	8,68 (3,31-10,32)	3,34 (2,96-4,94)	11,67 (9,4-11,68)	7,39 (4,02-8,52)	4,71 (3,10-7,03)	5,6 (4,26-7,34)	2,29 (0,77-6,24)	8,5 (6,71-11,2)	0,203
C 18:0	4,11 (1,96-5,18)	4,43 (3,43-5,52)	6,2 (4,32-6,39)	5,94 (2,37-7,49)	6,05 (3,05-7,92)	4,72 (3,15-4,90)	7,13 (6,28-7,21)	7,08 (4,27-7,87)	4,85 (2,75-8,88)	5,48 (3,49-6,82)	2,55 (1,32-6,24)	6,49 (5,35-8,24)	0,383
C 18:1cn-9	4,52 (3,25-4,80)	3,08 (1,67-3,44)	3,06 (2,53-3,58)	3,32 (1,34-3,46)	4,18 (2,25-4,99)	3,07 (2,14-3,61)	3,31 (3,28-3,6)	4,02 (2,31-4,19)	2,44 (1,39-3,51)	3,08 (2,22-3,72)	2,85 (1,62-3,03)	2,03 (1,41-3,11)	0,222
C 18:1tn-7	1,76 (1,26-2,46)	1,9 (1,34-2,56)	2,34 (1,61-2,95)	2,32 (0,93-2,50)	2,79 (1,31-3,13)	1,71 (1,31-1,95)	2,7 (2,45-2,73)	1,95 (1,17-2,02)	1,33 (0,86-2,17)	1,47(1,06-2)	1,43(0,79-1,71)	1,28(0,92-1,68)	0,181
C 18:2cn-6	1,6 (0,62-2,20)	1,51 (0,34-2,21)	1,58 (1,22-1,79)	1,85 (0,93-1,98)	2,5 (1,43-2,75)	1,93 (1,45-2,27)	1,63 (1,61-1,74)	1,99 (2,34-2,34)	1,32 (0,91-1,99)	1,64(1,29-1,97)	1,09(0,42-1,85)	1,38(0,96-1,65)	0,658
C 18:2tn-6	0,1 (0-1,43)	0,16 (0,03-1,25)	0,15 (0,03-0,39)	0,1 (0,02-0,17)	0,18 (0,12-0,37)	0,14 (0,09-0,15)	0,18 (0,18-0,21)	0,16 (0,04-0,17)	0,49 (0,13-0,77)	0,09 (0,02-0,12)	0,09 (0,01-1,03)	0,8 (0,71-2,78)	0,164
C 18:3n-3	2,85 (1,62-3,43)	1,34 (0,77-1,8)	1,11 (1,01-1,41)	1,04 (0,62-1,23)	1,46 (0,8-1,7)	1,28 (1,45-1,44)	1,69 (1,67-1,92)	1,91 (1,08-2,53)	1,65 (0,72-2,23)	2,05 (2,12-2,43)	2,19 (1,42-2,8)	1,34 (0,78-1,83)	0,109
C 18:4n-3	3,88 (2,13-5,03)	1,41 (1-2,73)	1,17 (1,01-1,86)	1,15 (0,7-1,52)	1,23 (0,65-1,75)	1,85 (1,45-1,91)	1,4 (1,39-1,68)	1,99 (1,35-2,7)	2,24 (1,12-3,17)	2,49 (2,12-3,05)	3,21 (1,64-4,92)	1,28 (0,69-2,18)	0,043
C 20:0	0,23 (0,04-0,31)	0,14 (0,03-0,22)	0,27 (0,19-0,31)	0,28 (0,09-0,33)	0,33 (0,1-0,4)	0,11 (0,07-0,12)	0,47 (0,34-0,50)	0,33 (0,06-0,46)	0,13 (0,02-0,24)	0,26 (0,05-0,33)	0,11 (0-0,22)	0,43 (0,26-0,49)	0,152
C 18:5n-3	0,1 (0,02-0,16)	0,13 (0,08-0,14)	0,27 (0,16-0,40)	0,13 (0,11-0,44)	0,19 (0,13-0,22)	0,17 (0,15-0,18)	0,15 (0,15-0,15)	0,37 (0,20-0,50)	0,08 (0,01-0,26)	0,18 (0,13-0,3)	0,08 (0-0,31)	0,32 (0,19-0,72)	0,067
C 20:1n-9	0,85 (0,7-3,14)	1,02 (0,51-1,28)	1,78 (0,56-1,92)	2,3 (2-2,78)	2,25 (1,5-2,67)	2,52 (1,78-2,66)	2,21 (2,01-2,22)	1,72 (1,18-2,09)	0,91 (0,67-1,36)	1,04 (0,63-1,44)	0,53 (0,44-1,41)	2 (1,45-2,69)	0,019
C 20:1n-7	0,71 (0,15-0,95)	0,61 (0,5-1,32)	0,93 (0,77-1,29)	0,79 (0,19-0,87)	0,92 (0,77-1,69)	0 (0-0,26)	1,01 (0,99-1,04)	1,18 (0,99-1,45)	0,69 (0,6-1,44)	0,74 (0,49-0,79)	0,82 (0,13-1,38)	0,83 (0,2-1,33)	0,130

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 20:2n-6	2,85 (2,36-5,28)	3,59 (2,58-5,85)	4,47 (2,15-5,31)	4,17 (3,67-4,98)	4,58 (3,10-8,59)	2,69 (2,51-3,12)	5,08 (4,7-5,14)	4,53 (3,48-5,5)	3,53 (3,04-4,84)	3,18 (2,68-3,89)	2,98 (1,52-4,46)	4,06 (3,08-4,31)	0,413
C 20:3n-6	0,33 (0,15-0,38)	0,27 (0,24-0,3)	0,34 (0,28-0,38)	0,51 (0,29-0,63)	0,32 (0,15-0,48)	0,33 (0,27-0,35)	0,37 (0,34-0,38)	0,6 (0,45-0,72)	0,3 (0,05-1,19)	0,39 (0,33-0,48)	0,42 (0,1-0,47)	0,45 (0,09-0,54)	0,213
C 20:3n-3	0,13 (0,03-0,15)	0,16 (0,12-0,21)	0,18 (0,15-0,45)	0,22 (0,15-0,32)	0,28 (0,26-0,34)	0,28 (0,25-0,43)	0,16 (0,16-0,16)	0,16 (0,11-0,6)	0,13 (0,03-0,2)	0,19 (0,13-0,21)	0,22 (0,16-0,26)	0,16 (0,04-0,2)	0,068
C 20:4n-6	1,1 (0,93-1,44)	1,25 (0,76-1,66)	0,91 (0,68-0,99)	1,43 (0,65-1,68)	1,81 (1,56-2,09)	2,72 (2,35-2,95)	1,54 (1,52-1,84)	1,31 (1,17-1,68)	1,1 (0,59-1,57)	1,09 (0,81-1,47)	0,89 (0,58-1,58)	1,56 (0,92-2,24)	0,040
C 20:4n-3	0,55 (0,42-0,72)	0,38 (0,2-0,52)	0,29 (0,2-0,44)	0,26 (0,21-0,3)	0,26 (0,06-0,34)	0,39 (0,35-0,4)	0,34 (0,34-0,44)	0,25 (0-0,73)	0,35 (0,05-2,58)	0,44 (0,24-0,58)	0,64 (0,15-1,31)	0,25 (0-0,68)	0,582
C 20:5n-3	11,41 (8,44-13,87)	7,76 (6,86-12,73)	5,22 (3,12-7,54)	6,12 (4,39-7,61)	7,91 (6,69-9,79)	8,81 (7,31-8,86)	5,46 (5,33-7,35)	5,6 (4,81-7,73)	8,47 (6,51-11,06)	9,29 (5,44-12,14)	8,33 (7,33-16,28)	6,9 (3,97-8,87)	0,146
C 22:0	0,13 (0,02-0,24)	0,27 (0,07-0,82)	0,21 (0,19-0,38)	0,36 (0,27-0,45)	0,19 (0,03-0,27)	0,09 (0,07-0,11)	0,14 (0,12-0,18)	0 (0-0,12)	0,22 (0,02-0,35)	0,16 (0,04-0,18)	0,08 (0-0,17)	0,06 (0-0,24)	0,081
C 22:1n-9/n-7	0,7 (0,6-1,23)	0,83 (0,6-1,38)	0,49 (0,12-1,17)	1,20 (0,86-2,28)	0,85 (0,49-1,06)	1,03 (0,65-1,45)	1,11 (0,98-1,24)	1,27 (0,31-2,22)	0,82 (0,18-2,22)	0,81 (0,5-2,2)	0,39 (0,27-0,79)	0,87 (0,18-1,43)	0,673
C 22:2n-6	3,96 (2,87-5,18)	6,27 (3,41-13,45)	5,68 (3,97-12,02)	7,41 (3,92-15,95)	4,61 (3,29-3,64)	4,29 (3,97-7,45)	4,71 (4,14-4,91)	5,63 (2,53-11,56)	4,88 (3,37-10,68)	3,29 (2,53-12,56)	3,03 (1,87-8,48)	3,84 (3,27-4,61)	0,759
C 22:3n-3	0,17 (0,04-0,19)	0,21 (0,13-0,27)	1,15 (0,26-2,38)	0,18 (0,14-0,26)	0,13 (0,02-0,36)	0,14 (0,11-0,16)	0,26 (0,26-0,47)	0,43 (0,05-0,83)	0,23 (0,02-0,67)	0,23 (0,14-0,32)	0,16 (0,04-0,43)	0,08 (0-0,26)	0,407
NMID 1	0,49 (0,28-0,74)	0,58 (0,25-1,48)	0,38 (0,19-1,65)	0,55 (0,52-1,91)	0,48 (0,42-0,69)	0,35 (0,26-0,84)	0,53 (0,49-0,53)	0,65 (0,12-1,14)	0,56 (0,42-1,39)	0,42 (0,24-1,71)	0,83 (0,49-1,79)	0,61 (0,11-1,17)	0,961
NMID 2	0,21 (0,04-0,31)	0,17 (0,15-0,25)	0,08 (0-0,24)	0,2 (0,04-0,33)	0,39 (0,22-0,57)	0,15 (0,15-0,74)	0,15 (0,14-0,33)	0,06 (0-0,16)	0,07 (0-0,17)	0,29 (0,14-0,49)	0 (0-0,39)	0,15 (0-0,34)	0,296
C 22:4n-6	0,2 (0,14-0,25)	0,4 (0,16-0,59)	0,26 (0,2-1,25)	0,35 (0,29-0,7)	0,36 (0,21-0,47)	0,46 (0,32-0,97)	0,38 (0,36-0,39)	0,34 (0,08-1)	0,25 (0,19-0,36)	0,37 (0,26-0,93)	0,31 (0,06-0,82)	0,14 (0-0,45)	0,703
C 22:5n-6	0,45 (0,36-0,52)	0,77 (0,35-1,28)	0,58 (0,28-1,09)	1,28 (0,68-1,98)	1,1 (0,78-1,49)	1,5 (1,41-2,39)	0,65 (0,64-0,8)	1,42 (0,48-8,95)	1,22 (0,80-2,49)	1,12 (0,75-1,66)	0,97 (0,76-1,75)	0,6 (0,13-0,77)	0,037
C 22:5n-3	0,74 (0,46-0,85)	0,64 (0,48-1,68)	1,04 (0,47-1,35)	0,79 (0,6-1,64)	0,82 (0,71-0,85)	0,95 (0,83-1,73)	0,72 (0,69-0,75)	0,64 (0,14-0,97)	1,03 (0,66-1,34)	1,04 (0,72-1,82)	1 (0,29-2,23)	1,48 (0,97-2,67)	0,436
C 24:0	0,19 (0-0,49)	0,16 (0,12-0,51)	0,07 (0-0,54)	0,2 (0,18-0,23)	0,15 (0,03-0,3)	0,32 (0,25-0,66)	0,11 (0,1-0,11)	0,07 (0-0,58)	0,04 (0-0,22)	0,17 (0,02-0,4)	0,43 (0,14-0,61)	0 (0-0,16)	0,431
C 22:6n-3	21,9 (18,58-29,67)	26,68 (20,32-31,66)	17,33 (8,53-22,77)	18,38 (16,92-37,71)	16,32 (13,68-33,51)	32,28 (25,21-37,08)	11,08 (10,96-14,67)	13,61 (12,19-22,04)	22,74 (13,67-36,71)	23,28 (16,21-30,05)	27,11 (18,96-41,32)	18,26 (9,42-21,32)	0,212

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Najveći relativni maseni udio (%) zasićenih masnih kiselina (*saturated fatty acids*, SFA) ukupnih lipida čini palmitinska kiselina (*palmitic acid*, C 16:0). Medijan i interkvartilni raspon (IQR) udjela C 16:0 tijekom godine kretao se od minimalnih 11,3 (5,9 – 19,3) % u veljači do maksimalnih 20,1 (12,4 – 20,9) % u studenom. Najveći relativni maseni udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) ukupnih lipida čini oleinska kiselina (*oleic fatty acid*, C 18:1n-9) čiji udio se tijekom godine kretao od minimalnih 2,0 (1,4 – 3,1) % u ožujku, do 4,5 (3,3 – 4,8) % u travnju.

Najveći maseni udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) ukupnih lipida čine eikozapentaenska kiselina (*eicosapentaenoic acid*, EPA, C 20:5n-3) s rasponom od 5,22 (3,1 – 7,5) % u lipnju do 11,4 (8,4 – 13,9) % u travnju, i dokozaheksaenska kiselina (*docosahexaenoic acid*, DHA, C 22:6n-3) s rasponom od 11,08 (10,96 – 14,67) % u listopadu do 32,3 (25,2 – 37,1) % u rujnu. DHA je dominirala u odnosu na EPA tijekom cijele godine.

Stearidonska kiselina (*stearidonic acid*, 18:4n-3) bilježi najveće udjele u hladnijim mjesecima, od prosinca do travnja, osim u ožujku kada je udio iznosio 1,3 (0,7–2,2), dok je u ostatku godine njen udio dosta manji, te je od svibnja do studenog medijan udjela manji od 2,0. KW testom je utvrđeno da promjena udjela stearidonske kiseline u tkivu kamenica tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,043$ . Eikozenska kiselina (*eicosenic fatty acid*, 20:1n-9) najveći udio ima u srpnju, kolovožu, rujnu i listopadu (2,2 – 2,5) %, dok su niže vrijednosti utvrđene u prosincu, siječnju, veljači i ožujku (0,5 – 2,0) %. KW testom je utvrđeno da promjena udjela eikozenske masne kiseline u tkivu kamenica tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,019$ .

Osim navedenih, unutargodišnje varijacije na statističkoj razini značajnosti  $p < 0,05$  uočene su kod arahidonske masne kiseline (AA) 20:4n-6 (0,040) i 22:5n-6 (0,037) (Tablica 3.3).

Suma pojedinih skupina masnih kiselina, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti, i masnokiselinski indeksi prikazani su u Tablici 3.4.

Tablica 3.4 Suma pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi u ukupnim lipidima

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
Σ n-3	46,40 (39,35-56,99)	43,08 (40,57-49,70)	34,11 (24,86-39,26)	38,95 (34,37-49,17)	38,04 (35,41-49,33)	48,37 (43,72-52,39)	32,65 (32,65-36,82)	35,76 (31,52-36,18)	43,20 (35,85-53,70)	42,69 (40,23-50,91)	51,35 (38,36-62,02)	40,42 (26,58-44,27)	0,080
Σ n-6	10,86 (9,44-14,41)	14,99 (10,11-23,58)	14,55 (12,17-19,28)	17,04 (12,94-25,63)	15,36 (12,95-18,99)	15,20 (13,84-18,74)	14,68 (14,21-18,74)	15,21 (12,55-29,70)	13,63 (12,27-20,16)	11,47 (10,73-20,71)	10,29 (7,29-17,96)	13,62 (11,36-14,38)	0,614
Σ n-9	8,12 (5,79-11,65)	6,93 (4,22-7,60)	8,08 (5,81-9,33)	8,05 (5,02-8,29)	9,40 (5,53-10,56)	7,10 (5,96-8,25)	7,92 (7,88-8,15)	8,19 (5,07-8,64)	6,43 (4,22-7,93)	6,25 (4,45-7,69)	6,92 (3,79-12,77)	5,85 (6,39)	0,466
Σ MUFA	14,19 (12,20-16,03)	12,81 (10,25-14,10)	15,67 (12,06-17,69)	15,72 (9,89-15,82)	17,34 (11,02-19,65)	11,80 (10,11-13,67)	16,90 (16,38-16,94)	16,17 (11,87-16,76)	13,38 (8,85-15,30)	12,48 (10,24-14,96)	13,56 (7,97-16,96)	12,73 (11,72-13,97)	0,288
Σ PUFA	56,00 (50,52-70,93)	58,74 (55,69-67,61)	50,69 (38,21-55,34)	53,26 (51,65-73,19)	52,29 (49,48-68,31)	60,86 (57,56-69,78)	47,51 (47,42-51,12)	48,83 (46,74-65,34)	55,89 (49,71-73,20)	58,13 (51,39-67,22)	62,93 (46,92-77,41)	52,52 (39,49-58,62)	0,443
Σ SFA	27,04 (10,81-33,77)	24,85 (17,82-28,60)	31,92 (29,83-42,85)	29,23 (13,55-30,95)	27,50 (17,55-31,57)	26,15 (18,10-27,31)	33,78 (30,64-33,93)	33,52 (20,44-34,89)	28,66 (15,94-33,92)	27,82 (19,58-31,68)	20,17 (9,83-35,84)	33,02 (27,51-46,36)	0,448
Σ NMID	0,65 (0,57-0,85)	0,75 (0,48-1,64)	0,59 (0,25-1,69)	0,84 (0,72-2,00)	0,82 (0,69-1,25)	0,50 (0,41-1,58)	0,68 (0,68-0,83)	0,70 (0,15-1,27)	0,63 (0,59-1,39)	0,82 (0,55-1,93)	1,08 (1,79)	0,94 (1,25)	0,946
n-3/n-6	4,38 (3,37-4,83)	2,75 (1,90-5,25)	1,87 (1,82-2,95)	2,44 (1,67-2,99)	2,51 (2,36-2,97)	2,57 (2,55-3,22)	2,22 (2,21-2,60)	2,19 (1,26-2,86)	2,52 (2,45-3,27)	3,53 (2,26-4,64)	4,25 (3,12-7,37)	3,08 (1,99-3,55)	0,076
EPA/DHA	0,48 (0,44-0,53)	0,37 (0,25-0,44)	0,39 (0,17-0,69)	0,35 (0,15-0,42)	0,46 (0,31-0,53)	0,27 (0,21-0,38)	0,50 (0,49-0,50)	0,41 (0,25-0,62)	0,42 (0,27-0,50)	0,48 (0,22-0,58)	0,40 (0,23-0,52)	0,39 (0,32-0,55)	0,644
AA/EPA	0,09 (0,07-0,18)	0,16 (0,07-0,22)	0,17 (0,13-0,24)	0,22 (0,2-0,24)	0,25 (0,16-0,29)	0,34 (0,33-0,35)	0,28 (0,25-0,29)	0,23 (0,22-0,24)	0,14 (0,07-0,20)	0,15 (0,09-0,18)	0,12 (0,05-0,19)	0,23 (0,19-0,31)	0,005
AA/DHA	0,05 (0,04-0,08)	0,05 (0,02-0,08)	0,06 (0,03-0,11)	0,08 (0,03-0,09)	0,12 (0,06-0,13)	0,08 (0,07-0,13)	0,14 (0,13-0,14)	0,10 (0,06-0,13)	0,05 (0,02-0,10)	0,05 (0,03-0,09)	0,03 (0,02-0,08)	0,11 (0,07-0,12)	0,088
AI	0,58 (0,53-0,72)	0,61 (0,58-0,70)	0,53 (0,41-0,58)	0,55 (0,54-0,75)	0,54 (0,51-0,70)	0,63 (0,60-0,72)	0,50 (0,50-0,53)	0,51 (0,49-0,67)	0,58 (0,52-0,75)	0,61 (0,54-0,69)	0,64 (0,51-0,79)	0,55 (0,42-0,60)	0,438
TI	0,19 (0,08-0,20)	0,18 (0,12-0,20)	0,23 (0,21-0,27)	0,21 (0,10-0,22)	0,18 (0,12-0,23)	0,19 (0,13-0,20)	0,24 (0,22-0,24)	0,24 (0,15-0,26)	0,19 (0,12-0,23)	0,20 (0,14-0,23)	0,14 (0,07-0,28)	0,21 (0,13-0,23)	0,374
16:1n-7/16:0	0,20 (0,04-0,29)	0,15 (0,09-0,18)	0,17 (0,13-0,29)	0,19 (0,18-0,25)	0,20 (0,15-0,22)	0,16 (0,15-0,17)	0,27 (0,26-0,28)	0,24 (0,17-0,26)	0,18 (0,13-0,30)	0,22 (0,20-0,23)	0,14 (0,07-0,20)	0,36 (0,22-0,69)	0,084
18:1n-9/18:0	1,10 (0,66-3,15)	0,58 (0,40-0,90)	0,55 (0,48-0,62)	0,56 (0,44-0,60)	0,69 (0,58-0,82)	0,77 (0,71-0,79)	0,45 (0,45-0,59)	0,52 (0,51-0,60)	0,51 (0,36-0,57)	0,59 (0,52-0,64)	0,76 (2,51)	0,34 (0,20-0,50)	0,059
20:1/18:1n-9	0,23 (0,16-0,68)	0,34 (0,27-0,41)	0,53 (0,18-0,62)	0,74 (2,89)	0,61 (0,58-0,74)	0,61 (1,46)	0,67 (0,68)	0,50 (0,58)	0,38 (0,37-0,51)	0,38 (0,39)	0,30 (0,25-0,53)	1,11 (1,84)	0,027
16:0/14:0	5,19 (4,35-7,18)	3,58 (3,33-3,95)	3,82 (3,22-4,65)	4,25 (3,71-4,71)	3,93 (2,33-4,42)	4,05 (3,65-4,29)	4,29 (4,24-4,46)	4,87 (4,46-5,60)	4,19 (4,02-5,20)	4,99 (4,54-5,65)	4,14 (4,39)	4,29 (3,32-5,38)	0,049
18:0/16:0	0,29 (0,26-0,35)	0,34 (0,28-0,40)	0,30 (0,26-0,35)	0,34 (0,27-0,44)	0,32 (0,25-0,81)	0,30 (0,30)	0,37 (0,34-0,37)	0,35 (0,34-0,39)	0,32 (0,27-0,49)	0,33 (0,28-0,37)	0,26 (0,15-0,43)	0,38 (0,32-0,79)	0,654
20:3/18:3n-3	0,05 (0,01-0,11)	0,12 (0,08-0,28)	0,16 (0,12-0,82)	0,22 (0,13-0,71)	0,19 (0,16-0,47)	0,18 (0,18)	0,09 (0,08-0,09)	0,11 (0,07-0,24)	0,06 (0,01-0,30)	0,08 (0,07-0,14)	0,11 (0,09-0,16)	0,09 (0,02-0,16)	0,029
20:2/18:2n-6	1,90 (1,13-10,93)	4,18 (1,28-22,19)	2,60 (1,61-3,36)	2,26 (1,86-6,73)	1,80 (1,80)	1,21 (1,12-2,43)	3,19 (2,76-3,19)	2,39 (1,51-4,30)	2,87 (1,61-5,34)	2,00 (1,77-2,26)	3,98 (1,23-6,48)	2,98 (2,06-4,17)	0,962
20:4/18:2n-6	0,91 (0,45-2,16)	0,84 (0,45-9,96)	0,56 (0,54-0,59)	0,78 (0,69-0,85)	0,80 (0,69-1,18)	1,41 (1,31-1,73)	0,94 (0,94-1,05)	0,72 (0,62-0,99)	0,66 (0,51-1,30)	0,65 (0,58-0,82)	1,35 (0,57-1,57)	0,97 (0,89-1,69)	0,176

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
20:4/18:3n-3	9,45 (6,70-12,83)	18,52 (13,42-41,35)	12,54 (8,12-37,21)	16,84 (14,92-102,21)	10,12 (9,54-48,36)	25,14 (18,27-47,29)	6,55 (6,55-7,52)	7,20 (5,11-22,13)	16,33 (6,32-57,50)	11,51 (6,91-21,83)	12,08 (8,15-41,36)	12,93 (9,01-16,42)	0,226
UI n-3	19,49 (16,53-23,94)	18,09 (17,04-20,87)	14,32 (10,44-16,49)	16,36 (14,43-20,65)	15,97 (14,87-20,72)	20,31 (18,36-22,00)	13,72 (13,71-15,46)	15,02 (13,24-15,20)	18,14 (15,06-22,55)	17,93 (16,90-21,38)	21,57 (16,11-26,05)	16,98 (11,16-18,59)	0,080
UI n-6	2,61 (2,27-3,46)	3,60 (2,43-5,66)	3,49 (2,92-4,63)	4,09 (3,11-6,15)	3,69 (3,11-4,56)	3,65 (3,32-4,50)	3,52 (3,41-3,54)	3,65 (3,01-7,13)	3,27 (2,95-4,84)	2,75 (2,57-4,97)	2,47 (1,75-4,31)	3,27 (2,73-3,45)	0,614
U/S	16,27 (13,73-26,22)	15,22 (13,95-16,22)	17,26 (13,92-18,63)	17,42 (17,28-17,65)	18,93 (14,99-21,73)	16,25 (15,19-16,85)	18,29 (18,07-18,34)	17,61 (15,48-18,12)	15,42 (13,83-16,78)	15,25 (13,13-16,58)	15,11 (13,36-23,19)	14,36 (13,57-15,11)	0,148

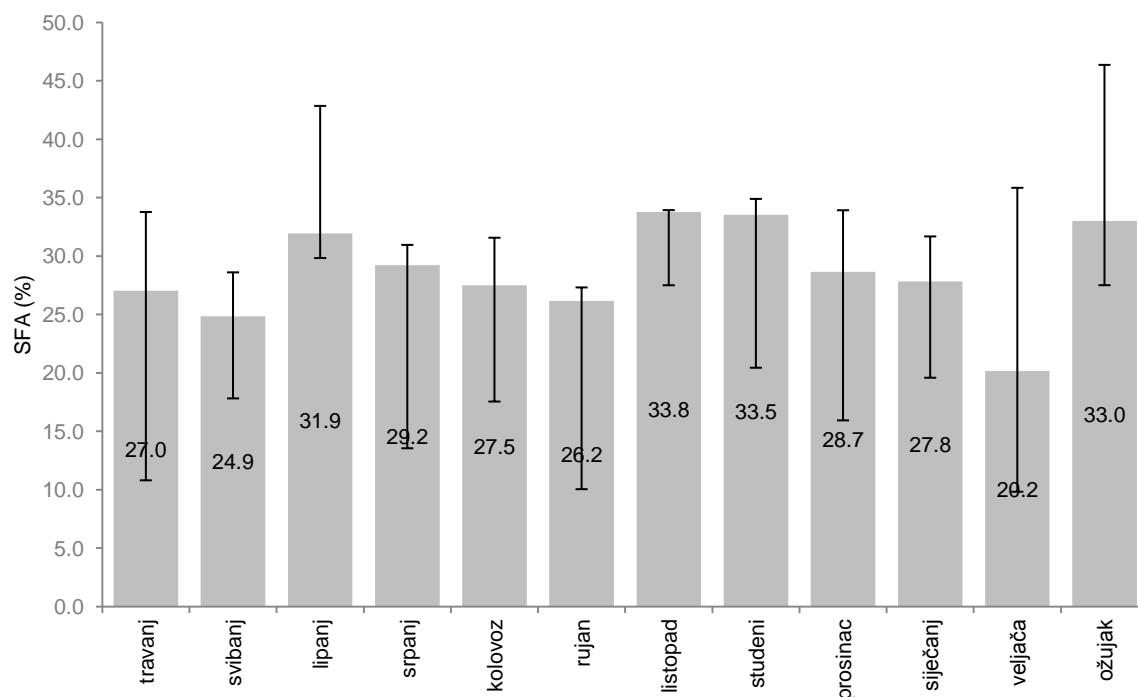
KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Ukupni lipidi sastoje se od SFA, s medijanom i interkvartilnim rasponom (*interquartile rate*, IQR) najmanjeg relativnog masenog udjela od 20,17 (9,83 – 35,84) u veljači do najvećeg udjela od 33,78 (30,64–33,93) % u listopadu (Slika 3.13). MUFA imaju najmanje udjele 11,80 (10,11–13,67) % u rujnu do najvećih udjela 17,34 (11,02–19,65) % u kolovozu (Slika 3.14). PUFA imaju najmanji udio od 47,51 (47,42–51,12) % u listopadu do najvećeg udjela od 62,93 (46,92–77,41) % u veljači (Slika 3.15).

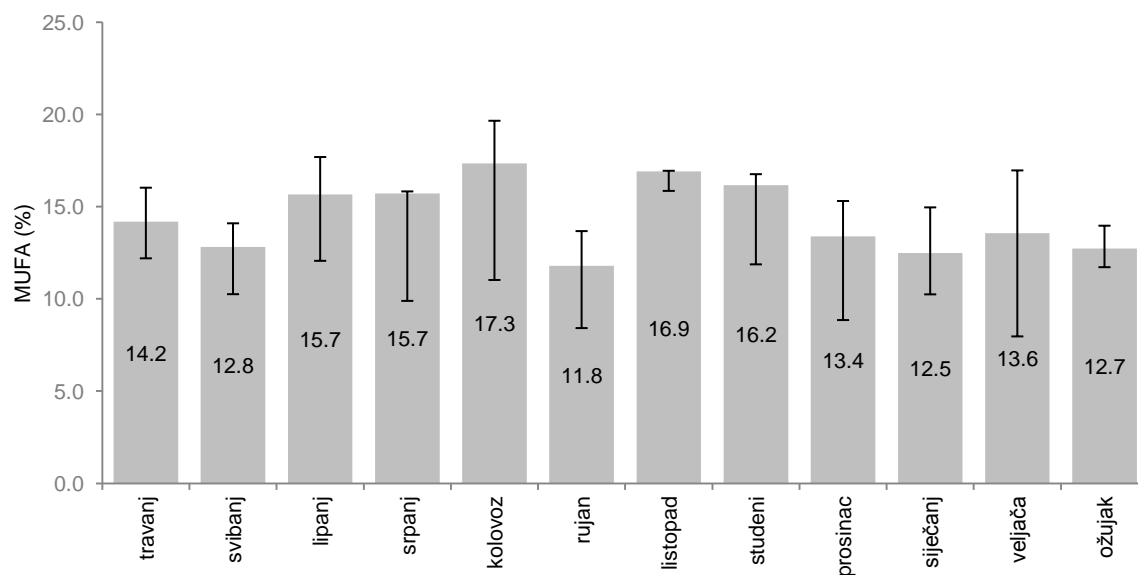
Budući da PUFA i MUFA čine glavninu masnih kiselina, u Tablici 3.4. usporedno je prikazan i njihov sastav s obzirom na pripadnost n-3, n-6 i n-9 redu. Nazastupljenije su n-3 PUFA (16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) s najmanjim udjelom od 32,6 (32,6 – 36,8) % u listopadu do najvećeg udjela 51,3 (38,4 – 60,0) % u veljači (Slika 3.16). Slijede n-6 PUFA (18:2cn-6, 18:2tn-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:4n-6 i 22:5n-6) sa minimalnim udjelom 10,3 (7,29 – 17,96) % u veljači do maksimalnog udjela od 17,0 (12,9 – 25,6) % u srpnju (Slika 3.17). Najmanje zastupljene u sastavu masnih kiselina su n-9 MUFA (16:1n-9, 18:1cn-9 i 20:1n-9) s najmanjim udjelom od 5,8 i IQR 5,0–6,4 % u ožujku do najvećih vrijednosti relativnog masenog udjela u kolovozu 9,4 (5,5–10,6) %. Udjeli n-3 PUFA veći su od udjela n-6 PUFA i njihovi omjer (n-3/n-6) varira od 1,9 do 4,4. Maksimalna vrijednost zabilježena je u travnju, a minimalna u lipnju, dok su tijekom ostalih mjeseci vrijednosti n-3/n-6 omjera iznad 2,0.

Omjer AA/EPA u tkivu europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) povećava su od travnja (0,12) do rujna (0,34) te se smanjuje prema veljači (0,09). KW testom je utvrđeno da promjene AA/EPA omjera u tkivu kamenica tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,005$ . Omjer 16:0/14:0, odnosno palmitinske i miristinske kiseline (*myristic fatty acid*, C 14:0) najmanje vrijednosti ima u srpnju i kolovozu, a KW testom utvrđena je statistički značajna povezanost ( $p = 0,049$ ) s godišnjim ciklusom (Tablica 3.4). Omjeri 20:1n-9/18:1n-9 i 20:3n-3/18:3n-3 masnih kiselina, odnosno indeksi elongacije, generalno su bili manji u hladnijem dijelu godine, a veći u toplijem dijelu godine. Značajna povezanost između vrijednosti ovih omjera i godišnjeg ciklusa utvrđena je KW testom.

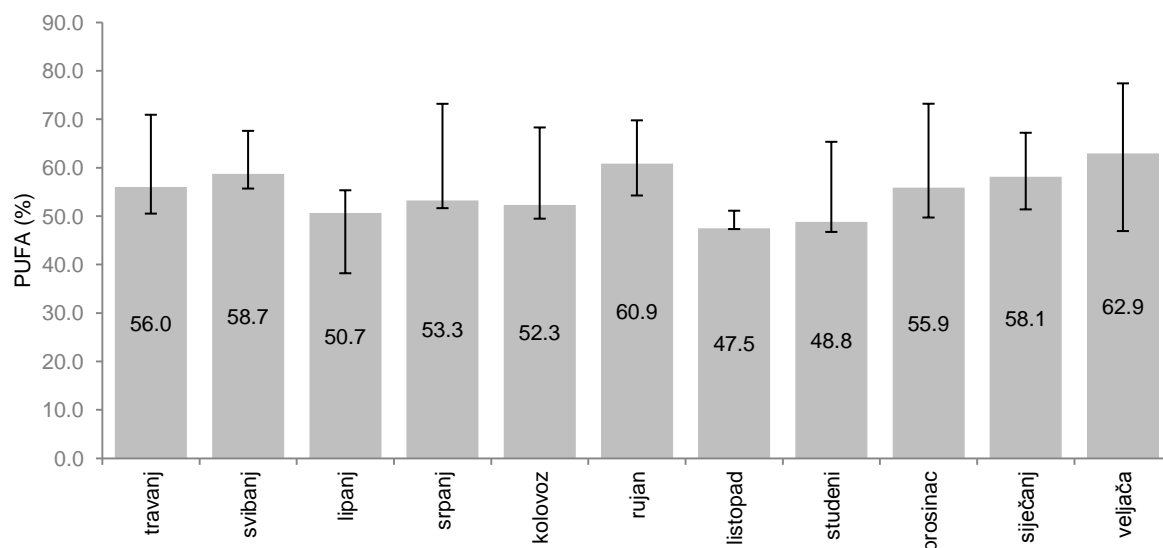
Aterogeni indeks (*atherogenic index*, AI) kretao se između 0,50 i 0,61, a trombogeni indeks (*thrombogenic index*, TI) između 0,14 i 0,24 tijekom godine. Indeks nezasićenosti (*unsaturation index*, UI) n-3 masnih kiselina kretao se od 13,72 u listopadu do 21,57 u veljači, dok se isti indeks n-6 masnih kiselina kretao od 2,47 u veljači do 3,65 u studenom. Omjer ukupnih nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (*unsaturated/saturated*, U/S) bio je od 14,36 u ožujku do 18,93 u kolovozu (Tablica 3.4).



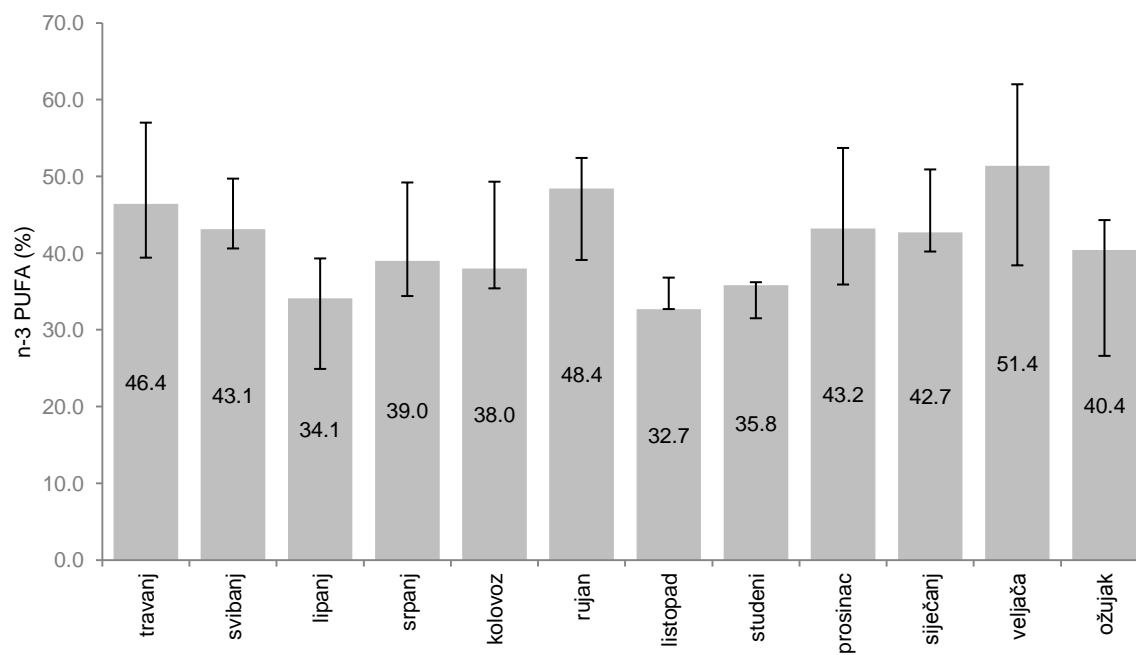
**Slika 3.13** Udio zasićenih masnih kiselina (SFA) ukupnih lipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.14** Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) ukupnih lipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

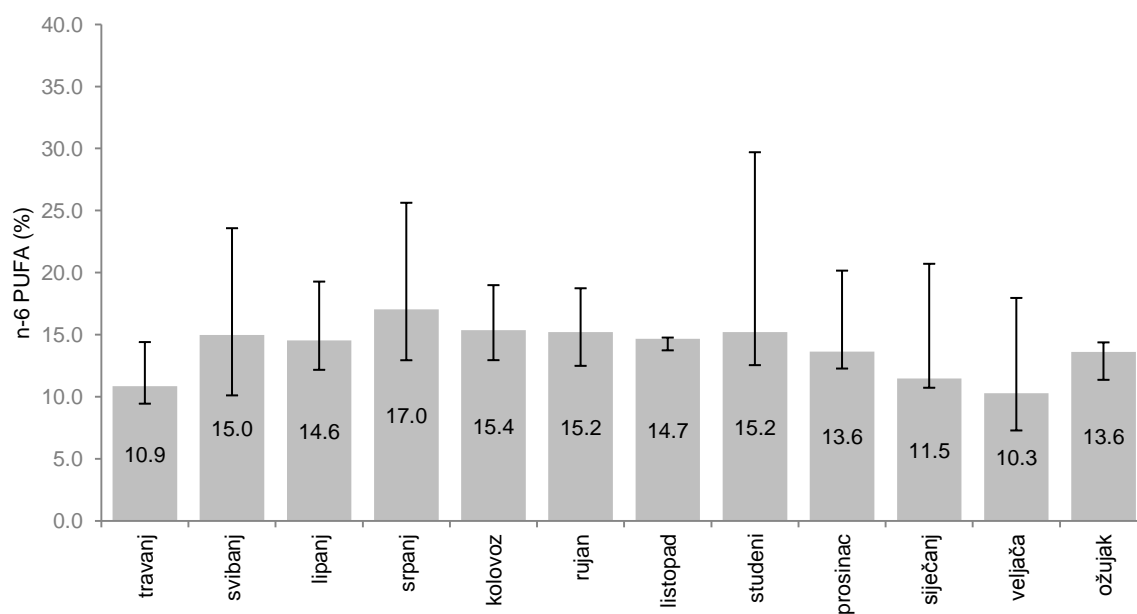


**Slika 3.15** Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) ukupnih lipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.16** Udio n-3 PUFA ukupnih lipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon





**Slika 3.17** Udio n-6 PUFA ukupnih lipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

### 3.3.2. Sastav masnih kiselina frakcije triacilglicerola

Rezultati analize masnokiselinskog sastava, sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi lipidne frakcije triacilglicerola izraženi su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha), i prikazani u Tablicama 3.5 i 3.6. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesec u godini ( $p < 0,05$ ).

Sastav masnih kiselina frakcije triacilglicerola europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) prikazan je u Tablici 3.5

Tablica 3.5 Relativni maseni udjeli masnih kiselina u lipidnoj frakciji triacilglicerola

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 14:0	2,29 (1,93-2,65)	3,57 (1,58-6,42)	2,92 (2,39-2,94)	3,89 (1,81-5,18)	4,03 (2,58-5,31)	4,79 (4,73-6,90)	2,69 (2,33-3,80)	3,56 (2,80-5,72)	3,52 (2,19-5,81)	3,27 (2,39-3,86)	3,17 (1,85-3,35)	2,73 (2,30-3,20)	0,228
C 14:1	0,32 (0,19-0,45)	0,21 (0,10-0,41)	0,27 (0,21-0,30)	0,29 (0,13-0,37)	0,38 (0,24-0,45)	0,31 (0,27-0,32)	0,28 (0,20-0,39)	0,30 (0,26-0,71)	0,43 (0,27-0,70)	0,26 (0,23-0,60)	0,22 (0,11-0,36)	0,31 (0,27-0,47)	0,744
C 15:0	0,08 (0,00-0,15)	0,03 (0,00-0,08)	0,29 (0,07-0,33)	0,01 (0,00-0,03)	0,02 (0,00-0,13)	0,00 (0,00-0,03)	0,00 (0,00-0,01)	0,12 (0,09-0,95)	0,00 (0,00-0,53)	0,05 (0,01-0,08)	0,06 (0,00-0,12)	0,28 (0,13-0,40)	0,068
C 15:1	0,38 (0,35-0,40)	0,59 (0,21-1,30)	0,43 (0,39-0,57)	0,76 (0,35-0,95)	0,81 (0,49-0,82)	0,94 (0,75-0,97)	0,73 (0,51-0,83)	0,76 (0,68-1,10)	0,66 (0,41-0,96)	0,84 (0,82-1,01)	0,65 (0,44-0,89)	0,52 (0,47-0,57)	0,095
C 16:0	7,73 (6,89-8,93)	10,26 (3,81-19,07)	7,83 (11,51)	15,25 (6,61-17,64)	16,21 (11,34-19,64)	19,50 (18,05-20,80)	14,34 (10,18-17,08)	15,36 (13,30-22,04)	11,78 (9,22-24,32)	15,73 (12,08-18,52)	12,43 (6,70-16,43)	14,55 (12,65-17,63)	0,080
C 16:1n-9	1,76 (1,61-2,22)	2,54 (1,02-3,50)	1,98 (1,24-3,36)	3,19 (1,33-4,06)	3,25 (2,10-3,53)	3,85 (3,67-6,13)	2,27 (1,47-2,80)	2,34 (1,72-2,96)	2,43 (1,17-4,37)	1,99 (1,49-3,09)	1,69 (1,04-1,82)	1,62 (1,18-2,12)	0,204
C 16:1n-7	0,35 (0,21-0,46)	0,31 (0,11-0,48)	0,26 (0,20-0,32)	0,40 (0,18-0,53)	0,46 (0,31-0,53)	0,53 (0,49-0,56)	0,39 (0,30-0,47)	0,44 (0,36-0,46)	0,40 (0,37-0,61)	0,49 (0,40-0,59)	0,41 (0,31-0,48)	0,32 (0,24-0,42)	0,304
C 17:0	0,74 (0,44-0,90)	0,62 (0,21-1,63)	1,60 (0,78-2,16)	0,51 (0,32-1,43)	0,94 (0,46-1,26)	1,03 (0,99-1,32)	0,80 (0,41-4,54)	1,33 (0,80-5,16)	2,04 (0,84-4,48)	0,84 (0,64-0,85)	0,59 (0,35-0,68)	2,90 (1,04-3,97)	0,152
C 17:1n-7	0,70 (0,50-0,81)	0,83 (0,26-1,57)	0,61 (0,51-0,89)	1,27 (0,56-1,52)	1,41 (1,02-1,71)	1,77 (1,11-1,86)	1,42 (0,94-1,49)	1,38 (1,20-1,89)	0,99 (0,50-1,18)	1,31 (1,08-1,59)	1,01 (0,58-1,53)	1,04 (1,02-1,10)	0,119
C 16:4n-3	0,59 (0,47-0,72)	1,29 (0,32-2,30)	1,72 (0,89-2,74)	0,86 (0,46-2,44)	1,52 (0,45-3,53)	2,29 (1,28-3,05)	1,92 (0,35-11,03)	0,76 (0,33-2,95)	1,21 (0,57-1,50)	1,95 (0,61-2,46)	1,63 (0,83-2,70)	1,88 (1,51-3,36)	0,776
C 18:0	1,38 (1,11-1,70)	3,34 (0,80-5,87)	1,89 (1,58-3,17)	4,76 (2,11-6,48)	4,85 (3,03-6,03)	6,33 (4,58-6,34)	5,50 (3,05-10,03)	4,57 (3,51-10,92)	2,88 (1,48-3,64)	4,77 (3,20-5,34)	3,18 (1,54-5,31)	5,94 (3,72-7,45)	0,058
C 18:1cn-9	2,12 (1,91-2,42)	1,94 (0,73-3,58)	1,19 (1,07-2,45)	3,17 (1,39-3,88)	4,04 (2,95-4,83)	4,30 (4,24-6,51)	2,44 (2,05-2,93)	2,73 (2,39-3,32)	1,83 (0,98-2,99)	3,15 (2,14-4,13)	2,08 (1,09-3,11)	2,78 (2,50-3,96)	0,026
C 18:1tn-7	0,80 (0,56-1,06)	1,47 (0,71-2,23)	0,86 (0,61-1,52)	1,96 (0,88-2,88)	2,15 (1,48-2,58)	2,41 (2,20-2,80)	1,26 (1,04-1,59)	1,14 (1,05-1,54)	1,08 (0,52-1,38)	1,39 (0,91-1,82)	0,83 (0,73-1,16)	1,13 (0,84-1,43)	0,040
C 18:2cn-6	1,39 (1,26-1,50)	1,08 (0,53-1,69)	0,72 (0,62-1,37)	1,89 (0,91-2,35)	2,54 (1,94-3,36)	2,19 (1,70-2,44)	1,19 (1,07-1,64)	1,55 (1,30-1,91)	1,07 (0,55-1,32)	1,68 (1,17-2,09)	1,47 (0,74-1,74)	1,82 (1,42-2,05)	0,037
C 18:2 tn-6	0,14 (0,00-0,39)	0,34 (0,18-0,40)	0,49 (0,39-0,70)	0,26 (0,23-0,41)	0,25 (0,12-0,32)	0,25 (0,12-0,31)	0,20 (0,17-0,87)	0,32 (0,21-1,19)	0,33 (0,08-1,28)	0,09 (0,00-0,22)	0,14 (0,12-0,35)	2,49 (1,37-7,73)	0,027
C 18:3n-3	2,19 (2,09-2,23)	1,25 (0,90-1,55)	0,54 (0,47-1,20)	1,09 (0,55-1,67)	1,51 (1,35-2,27)	1,67 (1,17-1,68)	0,93 (0,83-1,46)	1,82 (0,93-2,03)	1,11 (1,36)	2,24 (1,53-2,90)	2,17 (1,18-2,38)	1,94 (1,35-2,32)	0,021
C 18:4n-3	3,67 (3,39-3,76)	2,34 (1,30-2,41)	0,98 (0,81-1,92)	1,87 (1,09-2,63)	2,08 (1,43-2,99)	1,97 (1,91-2,17)	1,29 (0,71-1,91)	2,57 (1,50-2,92)	1,86 (1,04-2,13)	3,52 (2,27-4,61)	3,53 (1,93-4,49)	2,24 (1,57-3,03)	0,011
C 18:5n-3	0,06 (0,00-0,15)	0,10 (0,02-0,14)	0,15 (0,02-0,24)	0,15 (0,11-0,36)	0,22 (0,14-0,28)	0,23 (0,21-0,24)	0,61 (0,16-1,17)	0,31 (0,21-1,17)	0,00 (0,00-0,08)	0,22 (0,11-0,41)	0,19 (0,04-0,24)	0,60 (0,33-0,35)	0,008
C 20:1n-9	0,00 (0,00-0,05)	0,43 (0,06-0,77)	0,42 (0,05-0,88)	0,26 (0,00-0,93)	0,97 (0,65-1,13)	1,29 (0,72-1,45)	0,90 (0,58-2,12)	0,56 (0,12-1,07)	0,60 (0,41-0,99)	0,64 (0,44-0,97)	0,77 (0,36-1,38)	0,97 (0,67-1,93)	0,097
C 20:1n-7	0,36 (0,04-0,78)	0,45 (0,11-0,55)	0,33 (0,05-0,97)	0,60 (0,41-1,37)	0,49 (0,39-0,75)	0,55 (0,54-0,94)	0,81 (0,64-1,25)	0,79 (0,57-1,02)	0,10 (0,00-0,24)	0,48 (0,44-0,57)	0,52 (0,40-0,73)	0,59 (0,53-0,78)	0,056
C 20:2n-6	2,17 (1,51-5,25)	3,46 (2,29-6,03)	1,81 (1,50-2,90)	2,90 (2,69-4,22)	2,28 (1,86-4,29)	2,41 (1,30-2,67)	3,69 (1,71-6,02)	2,39 (1,39-2,65)	2,21 (1,36-2,78)	2,37 (2,07-2,69)	2,34 (1,50-5,86)	2,40 (2,23-2,43)	0,877

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 20:3n-6	0,41 (0,18-0,58)	0,21 (0,07-0,29)	0,02 (0,00-0,25)	0,28 (0,22-1,27)	0,29 (0,22-0,36)	0,28 (0,20-0,30)	0,22 (0,04-0,32)	0,41 (0,33-0,79)	0,16 (0,03-0,69)	0,39 (0,06-0,58)	0,38 (0,30-0,46)	0,36 (0,32-0,40)	0,167
C 20:3n-3	0,17 (0,13-0,17)	0,18 (0,07-0,28)	0,06 (0,00-0,22)	0,18 (0,04-0,22)	0,29 (0,23-0,36)	0,28 (0,24-0,31)	0,17 (0,04-0,50)	0,24 (0,05-0,39)	0,21 (0,04-0,29)	0,25 (0,15-0,31)	0,15 (0,09-0,32)	0,43 (0,27-0,66)	0,117
C 20:4n-6	0,85 (0,56-1,16)	0,88 (0,64-1,73)	0,46 (0,41-0,64)	1,37 (1,11-1,54)	1,73 (1,34-2,09)	2,49 (1,77-2,77)	2,07 (1,43-3,89)	1,12 (0,26-1,69)	0,59 (0,46-0,96)	1,30 (1,09-1,75)	1,09 (1,60-1,60)	1,13 (0,99-1,78)	0,020
C 20:4n-3	0,96 (0,74-1,23)	0,60 (0,41-0,64)	0,11 (0,00-0,32)	0,47 (0,37-0,56)	0,54 (0,45-0,70)	0,65 (0,58-0,71)	0,13 (0,00-0,28)	0,54 (0,13-0,71)	0,39 (0,19-0,77)	0,59 (0,24-0,74)	0,86 (0,72-0,91)	0,88 (0,64-1,27)	0,002
C 20:5n-3	20,51 (17,20-25,24)	12,71 (8,42-21,18)	9,19 (2,33-14,96)	9,96 (9,03-10,67)	9,45 (8,04-13,36)	10,89 (9,93-14,05)	8,78 (3,32-16,83)	8,77 (1,84-12,94)	10,68 (5,94-15,41)	11,80 (11,60-12,37)	12,67 (11,72-17,03)	7,77 (6,32-9,84)	0,120
C 22:0	0,00 (0,00-0,01)	0,07 (0,00-0,31)	0,43 (0,25-0,80)	0,55 (0,31-0,81)	0,18 (0,08-0,51)	0,03 (0,01-0,10)	0,03 (0,00-0,18)	0,05 (0,00-0,11)	0,14 (0,00-0,28)	0,09 (0,02-0,23)	0,08 (0,00-0,16)	0,00 (0,00-0,12)	0,020
C 22:1n-9/n-7	0,15 (0,07-0,41)	0,15 (0,01-0,31)	0,00 (0,00-0,24)	0,49 (0,45-0,78)	0,41 (0,27-0,53)	1,47 (0,94-3,11)	0,54 (0,29-1,06)	0,62 (0,24-1,44)	0,00 (0,00-1,22)	0,42 (0,08-1,23)	0,27 (0,15-0,53)	0,54 (0,36-0,88)	0,044
C 22:2n-6	0,81 (0,61-1,26)	3,09 (1,61-5,37)	8,79 (4,26-15,70)	4,11 (2,84-8,18)	2,98 (1,87-4,08)	1,28 (0,86-2,06)	3,72 (2,25-8,39)	2,64 (1,70-4,00)	2,88 (1,89-5,67)	1,92 (1,48-5,80)	1,99 (1,46-4,33)	3,11 (2,39-3,93)	0,032
C 22:3n-3	0,09 (0,02-0,10)	0,06 (0,00-0,15)	0,09 (0,00-0,70)	0,12 (0,03-0,38)	0,12 (0,03-0,26)	0,19 (0,12-0,26)	0,40 (0,02-2,53)	0,14 (0,03-1,81)	0,28 (0,00-0,57)	0,24 (0,20-0,62)	0,13 (0,03-0,45)	0,42 (0,21-0,59)	0,550
NMID 1	0,03 (0,01-0,07)	0,06 (0,00-0,15)	0,00 (0,00-0,31)	0,23 (0,06-0,35)	0,17 (0,04-0,25)	0,17 (0,08-0,20)	0,08 (0,00-0,18)	0,06 (0,00-0,27)	0,00 (0,00-0,18)	0,40 (0,05-0,59)	0,17 (0,04-0,35)	0,36 (0,31-0,41)	0,196
NMID 2	0,88 (0,70-0,96)	0,48 (0,21-0,84)	0,97 (0,63-1,01)	0,56 (0,49-1,31)	0,37 (0,19-1,12)	0,46 (0,34-0,62)	0,42 (0,04-1,38)	0,61 (0,24-2,19)	0,27 (0,00-0,67)	0,67 (0,33-1,64)	0,63 (0,40-0,75)	0,22 (0,16-0,77)	0,482
C 22:4n-6	0,04 (0,04-0,07)	0,16 (0,04-0,25)	0,47 (0,10-0,60)	0,19 (0,04-0,32)	0,20 (0,11-0,48)	0,19 (0,17-0,25)	0,20 (0,05-0,69)	0,38 (0,08-0,53)	0,08 (0,00-0,29)	0,21 (0,19-0,28)	0,15 (0,08-0,23)	0,22 (0,16-0,32)	0,538
C: 22:5n-6	0,43 (0,33-0,52)	0,47 (0,43-0,88)	0,65 (0,36-0,89)	0,82 (0,77-1,02)	1,27 (0,50-1,70)	0,39 (0,30-0,95)	0,73 (0,58-12,67)	1,68 (1,24-3,87)	0,82 (0,28-1,00)	1,10 (0,76-1,64)	0,63 (0,41-0,93)	0,41 (0,31-1,09)	0,090
C 22:5n-3	0,48 (0,35-0,69)	0,65 (0,46-0,74)	1,16 (0,76-1,35)	1,06 (0,50-1,62)	0,75 (0,72-0,81)	1,03 (0,87-1,56)	0,68 (0,16-1,35)	0,93 (0,86-0,97)	0,71 (0,24-1,59)	0,76 (0,74-3,29)	1,05 (0,61-1,40)	1,04 (0,55-1,55)	0,313
C 22:6n-3	41,02 (38,26-43,18)	40,54 (24,18-52,30)	39,86 (36,17-50,76)	28,96 (19,95-49,58)	21,58 (20,09-40,68)	14,06 (13,40-14,91)	22,78 (9,28-36,53)	28,27 (10,10-38,53)	31,86 (20,31-49,96)	31,04 (20,18-38,90)	38,46 (28,61-46,20)	25,45 (12,40-36,25)	0,155

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal – Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Najveći relativni maseni udio (%) SFA triacilglicerolne frakcije (*triacylglycerol*, TGA) čini C 16:0. Medijan i IQR udjela stearinske kiseline tijekom godine kretao se od minimalnih 7,37 (6,89–8,93) % u travnju do maksimalnih 19,50 (18,05–20,80) % u rujnu. Najveći relativni maseni udio MUFA frakcije triacilglicerola čini C 18:1n-9 s minimalnim udjelom od 1,2 (1,1 – 2,4) % u lipnju, do 4,3 (4,2 – 6,5) % u rujnu.

Najveći maseni udio PUFA triacilglicerolne frakcije čine C 20:5n-3 s rasponom od 7,8 (6,3 – 9,8) % u ožujku do 20,5 (17,2 – 25,2) % u travnju, i C 22:6n-3 s rasponom od 14,1 (13,4 – 14,9) % u rujnu do 41,02 (38,3 – 43,2) % u travnju. DHA je dominirala u odnosu na EPA tijekom cijele godine.

Eikozatetraenska kiselina (*eicosatetraenoic fatty acid*, ETA, C 20:4n-3) bilježi najveće udjele u proljetnim mjesecima, od veljače do travnja, a najmanji udjeli zabilježeni su u lipnju i listopadu. KW testom je utvrđeno da promjena udjela eikozatetraenske kiseline u tkivu kamenica tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,002$  (Tablica 3.5).

Osim navedenih, unutargodišnje varijacije na statističkoj razini značajnosti  $p < 0,05$  uočene su kod masnih kiselina 18:1cn-9, 18:1tn-7, 18:2cn-6, 18:2tn-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 18:5n-3, 20:4n-6, 22:0, 22:1n-9/n-7 i 22:2n-6 (Tablica 3.5).

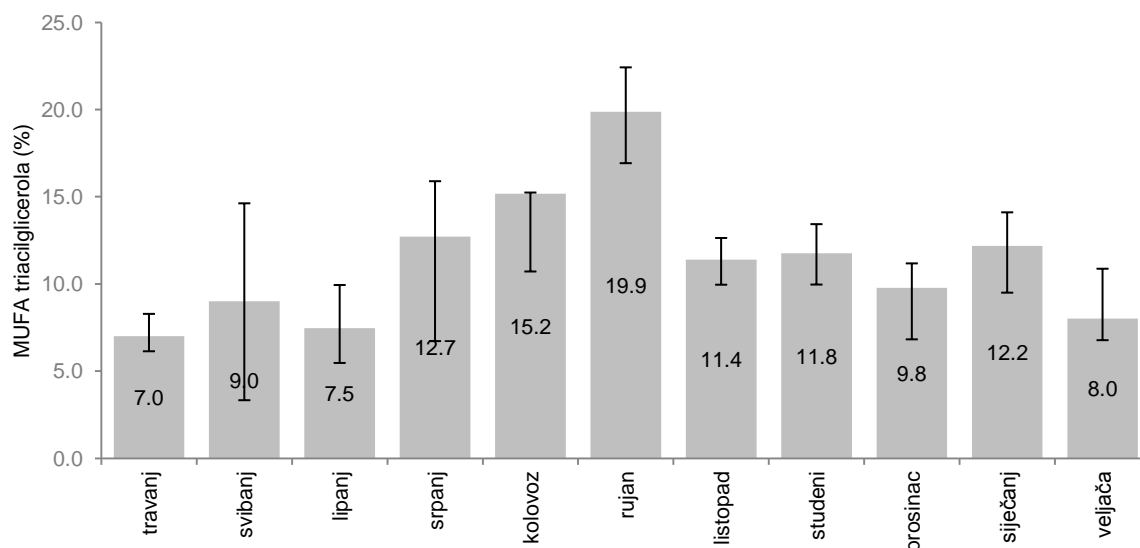
Suma pojedinih skupina masnih kiselina triacilglicerolne frakcije lipida, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti, te masnokiselinski indeksi prikazani su u Tablici 3.6.



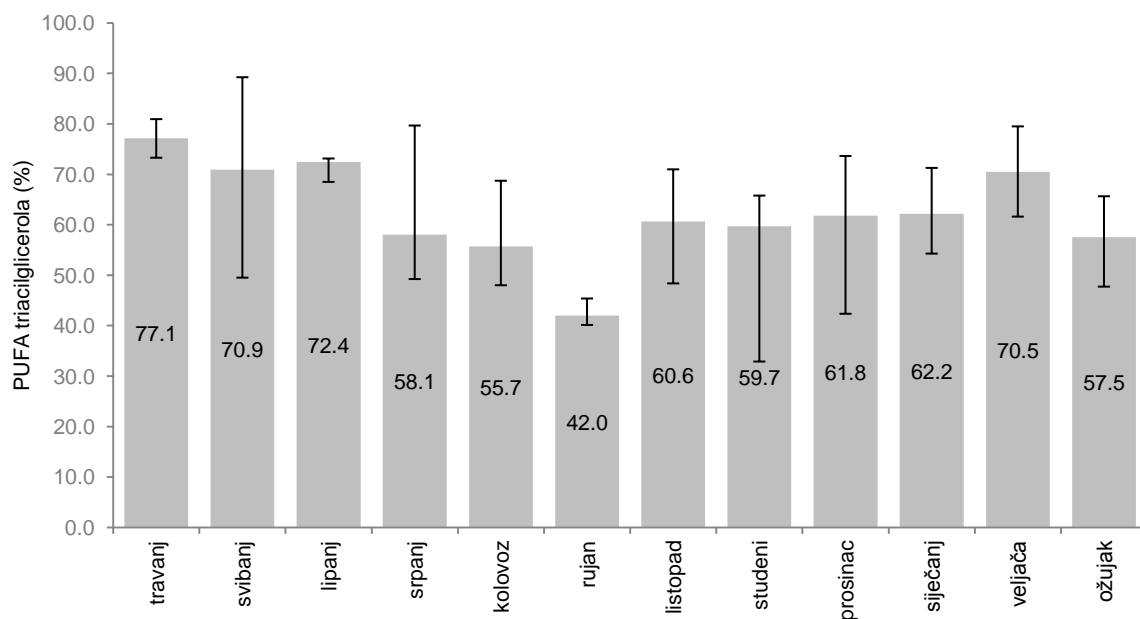
Triacilgliceroli se sastoje od SFA s medijanom i IQR najmanjeg relativnog masenog udjela od 14,13 (11,62 – 16,27) % u travnju do najvećeg udjela od 32,97 (31,66 – 34,53) % u rujnu, MUFA s najmanjim udjelom od 7,0 (6,14 – 8,28) % u travnju do najvećeg udjela 19,88 (18,40 – 22,42) % u rujnu (Slika 3.18) i PUFA s najmanjim udjelom od 41,98 (41,05 – 45,37) % u rujnu do najvećeg udjela od 77,14 (73,27 – 80,93) % u travnju (Slika 3.19). KW testom je utvrđeno da promjene udjela MUFA u triacilglicerolnoj frakciji lipida tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,016$  (Tablica 3.6).

Budući da PUFA i MUFA čine glavninu triacilglicerolne frakcije, u Tablici 3.6 usporedno je prikazan i njihov sastav s obzirom na pripadnost n-3, n-6 i n-9 redu. Najzastupljenije su n-3 PUFA (16:4 n-3, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 20:5 n-3, 22:5 n-3, 22:6 n-3) s najmanjim udjelom od 36,41 (32,71 – 37,50) u rujnu do najvećeg udjela 69,45 (66,62 – 73,81) % u travnju (Slika 3.20). KW testom je utvrđeno da promjene sume n-3 PUFA triacilglicerolne frakcije lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,049$ . Zatim po zastupljenosti slijede n-6 PUFA (18:2c n-6, 18:2t n-6, 20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6, 22:2 n-6, 22:4 n-6 i 22:5 n-6) s minimalnim udjelom 6,79 (5,14 – 9,52) % u travnju do maksimalnog udjela od 17,16 (10,92 – 25,72) % u listopadu. Najmanje zastupljene u sastavu nezasićenih masnih kiselina su n-9 MUFA (16:1 n-9, 18:1c n-9 i 20:1 n-9) s najmanjim udjelom od 3,97 i IQR 3,62 – 4,50 % u travnju do najvećih vrijednosti relativnog masenog udjela u rujnu 9,76 (9,36–13,52) %. KW testom je utvrđeno da promjena udjela n-9 MUFA triacilglicerolne frakcije lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,042$ . Udjeli n-3 PUFA veći su od udjela n-6 PUFA i njihovi omjeri (n-3/n-6) tijekom godine variraju od 2,9 do 10,3. Maksimalna vrijednost zabilježena je u travnju, a minimalna u rujnu. Vrijednosti n-3/n-6 omjera triacilglicerolne frakcije tijekom cijele godine su iznad 2,0.

Omjer AA/EPA u tkivu europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) najveće vrijednosti ima u kolovozu, rujnu i listopadu (0,20 – 0,29). KW testom je utvrđeno da promjene AA/EPA omjera triacilglicerolne frakcije lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,022$ . Omjer AA/DHA masnih kiselina pokazuje najveće vrijednosti u rujnu i listopadu dok je u ostatku godine relativno nizak KW testom je utvrđeno da promjene AA/DHA omjera triacilglicerolne frakcije lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,010$ . Omjer 16:0/14:0 ima najmanje vrijednosti u svibnju i lipnju, a KW testom utvrđena je statistički značajna povezanost ( $p = 0,005$ ) s godišnjim ciklusom. Indeks 18:0/16:0 imao je najmanje vrijednosti u travnju (0,18) i prosincu (0,19), dok je u ostatku godine omjer varirao 0,26 – 0,40, a KW testom utvrđena je značajna povezanost između vrijednosti navedenog indeksa i godišnjeg ciklusa. Omjer ukupnih nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (U/S) triacilglicerolne frakcije lipida bio je od 11,53 u lipnju do 20,99 u rujnu, te je utvrđena značajna povezanost vrijednosti omjera U/S i godišnjeg ciklusa na razini  $p = 0,004$  (Tablica 3.6).

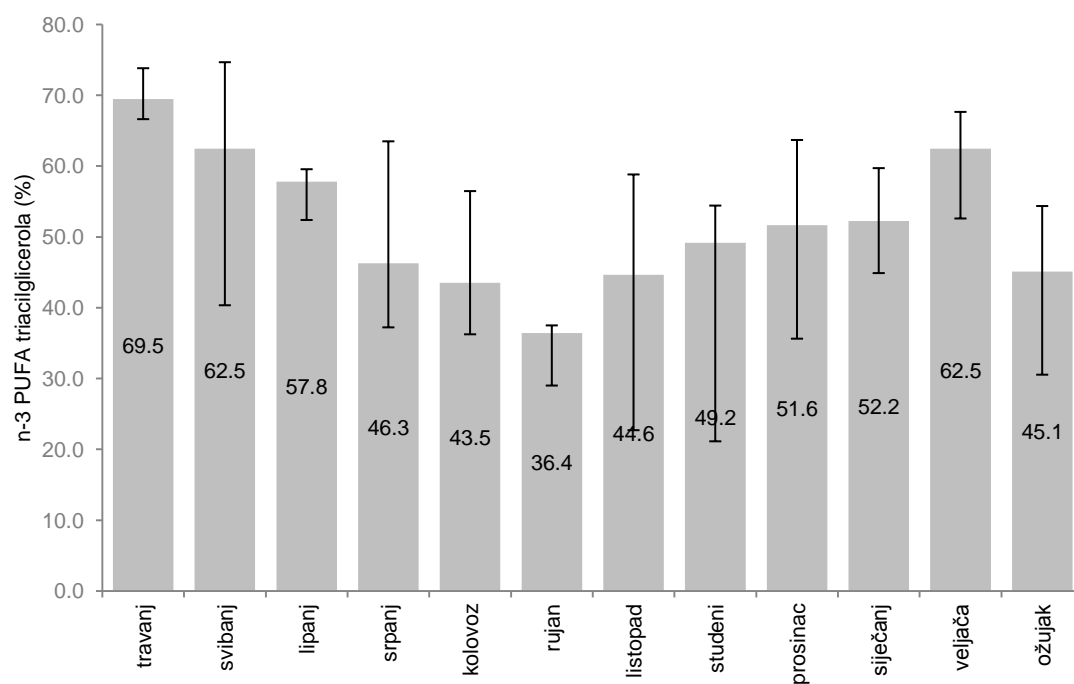


**Slika 3.18** Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) frakcije triacilglicerola tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.19** Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) frakcije triacilglicerola tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon





**Slika 3.20** Udio n-3 PUFA triacilglicerola tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

### 3.3.3. Sastav masnih kiselina frakcije fosfolipida

Rezultati analize masnokiselinskog sastava, sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi lipidne frakcije fosfolipida izraženi su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha), i prikazani u Tablicama 3.7 i 3.8. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesec u godini ( $p < 0,05$ ).

Sastav masnih kiselina frakcije fosfolipida europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) prikazan je u Tablici 3.7.

Tablica 3.7 Relativni maseni udjeli (%) masnih kiselina u lipidnoj frakciji fosfolipida

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 14:0	2,63 (1,79-4,56)	3,92 (0,94-4,73)	9,01 (7,15-9,33)	9,42 (6,31-9,81)	2,91 (2,46-3,53)	4,07 (3,79-4,50)	2,82 (1,81-5,22)	5,12 (4,64-6,57)	4,99 (3,71-5,21)	3,38 (2,42-10,30)	2,44 (2,17-3,61)	6,95 (4,75-9,19)	0,031
C 15:1	1,23 (0,81-1,67)	0,67 (0,16-0,70)	2,83 (2,31-3,23)	1,60 (1,20-1,71)	0,86 (0,53-1,62)	0,81 (0,41-1,34)	0,97 (0,72-1,61)	1,78 (1,62-2,05)	1,10 (1,06-1,55)	0,98 (0,17-1,69)	0,93 (0,59-1,32)	2,51 (1,72-3,72)	0,024
C 16:0	16,14 (13,97-27,07)	13,76 (4,83-15,90)	25,04 (21,73-25,63)	21,35 (17,68-27,16)	17,95 (12,36-19,17)	13,91 (13,29-14,16)	11,96 (7,40-16,11)	20,57 (20,10-23,33)	17,65 (12,97-25,56)	18,03 (10,72-28,23)	13,04 (11,20-18,74)	25,33 (23,30-34,20)	0,058
C 17:0	0,70 (0,37-0,95)	0,52 (0,05-0,89)	1,33 (1,22-2,35)	3,06 (2,01-5,50)	0,72 (0,27-5,86)	0,34 (0,17-0,53)	1,60 (4,78)	4,16 (9,01)	0,99 (0,31-2,14)	3,76 (7,54)	0,38 (0,08-0,69)	2,87 (1,98-5,13)	0,005
C 17:1n-7	2,89 (1,89-3,59)	1,12 (0,83-1,14)	1,72 (1,41-1,82)	1,11 (1,02-1,45)	1,36 (0,82-1,60)	0,84 (0,42-1,16)	0,92 (1,20)	1,91 (1,64-2,91)	0,97 (0,19-1,80)	1,74 (1,20-2,42)	0,74 (0,16-1,06)	1,80 (1,43-2,49)	0,014
C 16:4n-3	5,44 (3,76-9,23)	1,31 (0,00-3,58)	35,52 (28,07-37,43)	26,10 (22,61-26,81)	25,41 (5,34-45,35)	11,88 (11,65-14,30)	29,03 (9,33-37,64)	1,13 (1,10-1,18)	14,90 (5,33-27,26)	11,19 (2,80-33,66)	13,42 (5,15-18,98)	14,42 (4,77-27,50)	0,029
C 18:0	6,83 (4,13-7,50)	7,20 (3,11-14,86)	5,77 (5,48-6,44)	8,38 (6,73-9,50)	6,34 (3,68-9,13)	5,08 (4,33-5,66)	5,07 (2,27-6,03)	12,14 (10,96-12,75)	5,92 (4,29-27,07)	10,55 (3,55-15,05)	6,84 (3,38-10,38)	13,26 (12,57-15,40)	0,167
C 18:1cn-9	3,71 (2,46-6,27)	3,08 (1,98-13,27)	1,75 (0,87-1,85)	1,84 (0,92-2,51)	2,27 (1,20-2,80)	1,83 (1,71-4,14)	1,11 (0,66-1,45)	0,44 (0,22-0,72)	1,50 (1,23-1,63)	0,00 (0,00-1,05)	1,92 (1,66-2,88)	0,00 (0,00-1,24)	0,003
C 18:1tn-7	1,34 (0,87-2,83)	1,72 (1,23-5,41)	2,02 (1,01-2,23)	1,61 (0,81-1,69)	1,69 (1,18-1,92)	0,93 (0,47-1,05)	1,30 (0,95-2,04)	0,88 (0,44-0,91)	1,27 (0,51-1,55)	0,00 (0,00-0,00)	1,52 (0,81-1,94)	0,00 (0,00-0,94)	0,049
C 18:2cn-6	1,85 (1,17-3,06)	0,00 (0,00-1,27)	0,00 (0,00-0,19)	0,00 (0,00-0,57)	1,50 (0,74-2,52)	0,00 (0,00-0,76)	0,00 (0,00-0,78)	0,00 (0,00-0,00)	0,70 (0,29-1,16)	0,00 (0,00-0,00)	1,21 (1,15-1,54)	0,00 (0,00-4,41)	0,012
C 20:4n-6	1,62 (1,03-2,55)	0,68 (0,06-2,23)	0,00 (0,00-0,52)	0,00 (0,00-0,58)	1,17 (0,17-2,61)	5,39 (4,27-8,20)	2,14 (1,04-3,69)	0,00 (0,00-0,25)	0,79 (0,12-1,26)	0,00 (0,00-1,34)	1,75 (0,95-2,84)	0,00 (0,00-0,50)	0,008
C 20:5n-3	20,11 (13,99-26,70)	16,10 (2,84-33,35)	0,00 (0,00-2,56)	0,00 (0,00-4,96)	8,24 (2,46-12,15)	13,12 (13,09-25,65)	9,18 (3,86-14,05)	0,00 (0,00-0,96)	7,09 (1,32-12,61)	0,00 (0,00-16,28)	18,72 (12,52-19,88)	0,00 (0,00-2,58)	0,006
C 22:6n-3	33,38 (7,78-36,02)	27,74 (11,42-28,77)	14,70 (14,04-19,20)	15,84 (8,89-23,59)	31,53 (13,02-39,76)	36,72 (20,44-39,09)	29,08 (14,90-37,14)	0,00 (0,00-2,73)	22,37 (6,30-28,97)	0,00 (0,00-27,74)	33,15 (27,02-47,16)	5,34 (0,00-14,32)	0,089

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Najveći relativni maseni udio (%) SFA fosfolipidne frakcije (*phospholipid*, PL) čini C 16:0. Medijan i IQR udjela palmitinske kiseline tijekom godine kretao se od minimalnih 12,0 (7,4 – 16,1) % u listopadu do maksimalnih 25,3 (23,3 – 34,2) % u ožujku. Najveći relativni maseni udio MUFA fosfolipidne frakcije čini C 18:1n-9 s minimalnim udjelom od 0,00 (0,00 – 1,0) % u siječnju, do 3,08 (1,98 – 13,27) % u svibnju. Najveći maseni udio PUFA fosfolipidne frakcije čine C 20:5n-3 s rasponom od 0,0 (0,0 – 1,0) % u studenom do 20,1 (14,0 – 26,7) % u travnju, i C 22:6n-3 s rasponom od 0,0 (0,0 – 2,7) % u studenom do 36,7 (20,4 – 39,1) % u rujnu. U frakciji fosfolipida DHA je dominirala u odnosu na EPA tijekom cijele godine (Tablica 3.7).

Unutargodišnje varijacije masnokiselinskog sastava fosfolipidne frakcije na statističkoj razini značajnosti  $p < 0,05$  utvrđene su KW testom kod masnih kiselina 14:0, 15:1, 17:0, 17:1n-7, 16:4n-3, 18:1cn-9, 18:1m-7, 18:2cn-6, 20:4n-6 i 20:5n3 (Tablica 3.7).

Suma pojedinih skupina masnih kiselina fosfolipidne frakcije lipida, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti, i masnokiselinski indeksi prikazani su u Tablici 3.8.

Tablica 3.8 Suma pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi u lipidnoj frakciji fosfolipida

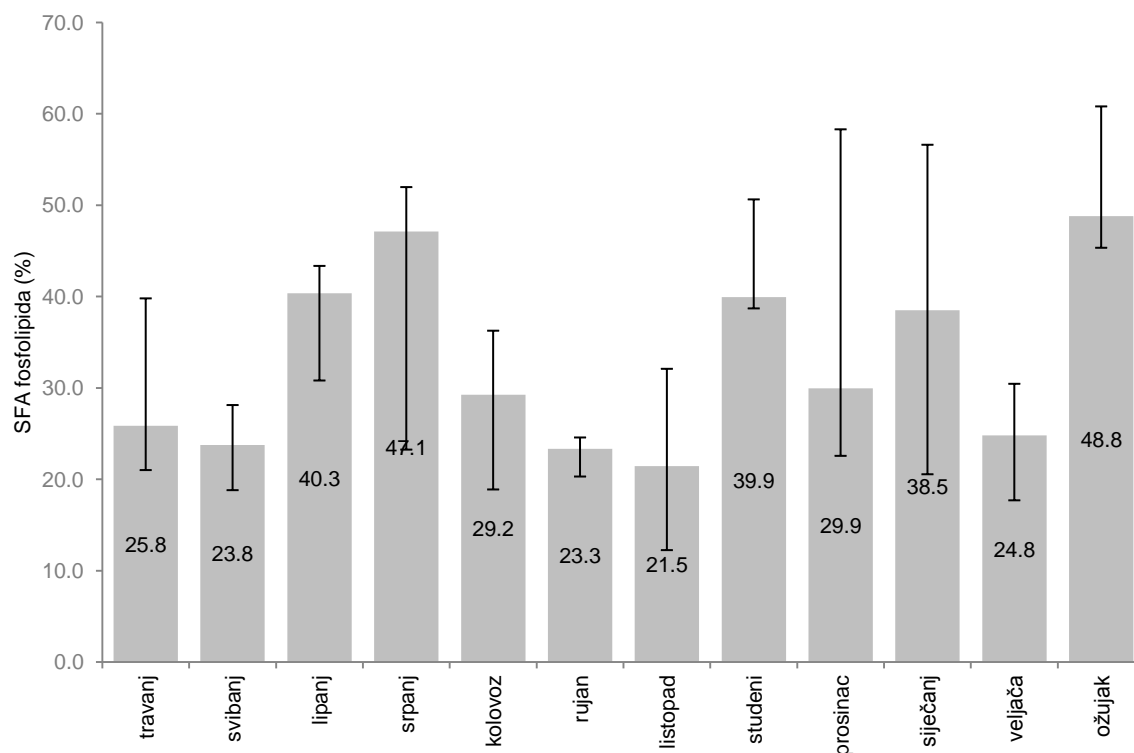
Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
Σ n-3	55,84 (35,84-64,74)	47,10 (15,24-62,78)	48,90 (46,60-54,03)	43,35 (32,21-55,36)	61,88 (51,84-69,54)	61,26 (60,17-63,84)	59,90 (46,09-78,21)	1,23 (1,18-4,84)	40,82 (21,25-64,09)	27,48 (4,76-59,44)	65,08 (59,45-71,47)	27,53 (11,24-30,17)	0,022
Σ n-6	5,13 (3,06-5,45)	2,01 (1,12-9,95)	1,38 (0,69-2,40)	3,47 (3,31-4,58)	4,39 (2,78-4,98)	1,92 (1,88-2,78)	4,59 (3,64-6,38)	4,76 (3,10-5,22)	2,53 (1,47-8,31)	6,19 (1,74-11,96)	4,03 (2,24-6,44)	0,66 (0,00-4,57)	0,541
Σ n-9	3,71 (2,46-6,27)	3,08 (1,98-13,27)	1,75 (0,87-1,85)	1,84 (0,92-2,51)	2,27 (1,20-2,80)	1,83 (1,71-4,14)	1,11 (0,66-1,45)	0,44 (0,22-0,72)	1,50 (1,23-1,63)	0,00 (0,00-1,05)	1,92 (1,66-2,88)	0,00 (0,00-1,24)	0,003
Σ MUFA	8,51 (6,91-14,14)	9,11 (5,14-17,06)	7,08 (5,91-8,20)	5,17 (4,39-6,41)	5,90 (4,71-7,25)	6,13 (5,27-6,29)	4,89 (2,94-5,55)	5,01 (4,88-5,62)	4,73 (4,58-5,05)	2,96 (2,14-4,16)	5,01 (3,96-6,57)	4,16 (3,46-8,22)	0,033
Σ PUFA	59,44 (40,61-67,64)	48,40 (16,70-64,26)	48,90 (46,60-54,74)	43,35 (32,21-56,51)	63,39 (54,35-74,21)	70,08 (68,01-70,94)	62,57 (47,63-81,66)	1,23 (1,18-5,09)	42,49 (22,08-65,92)	27,48 (4,76-60,78)	68,01 (63,80-73,62)	27,53 (11,74-34,58)	0,013
Σ SFA	25,84 (21,01-39,80)	23,77 (18,81-28,12)	40,35 (35,58-43,35)	47,10 (35,17-51,98)	29,24 (18,89-36,26)	23,35 (21,83-24,58)	21,45 (12,25-32,09)	39,93 (39,32-50,63)	29,95 (22,56-58,30)	38,49 (20,55-56,61)	24,82 (17,70-30,45)	48,78 (45,33-60,81)	0,061
n-3/n-6	10,83 (6,62-23,54)	28,56 (3,96-57,09)	12,92 (6,46-27,92)	7,61 (6,84-14,47)	15,44 (12,28-20,42)	32,28 (24,56-33,43)	13,43 (8,18-19,15)	0,78 (0,50-1,28)	16,31 (4,67-49,26)	2,37 (0,73-39,18)	16,40 (9,67-35,19)	2,58 (0,00-8,63)	0,063
16:0/14:0	5,80 (6,14-8,24)	3,00 (3,26-3,66)	2,72 (2,78-3,13)	2,27 (3,23-3,80)	4,54 (5,51-6,70)	2,82 (3,11-3,61)	3,17 (4,00-4,34)	3,26 (3,83-4,39)	3,37 (3,54-5,06)	2,73 (4,26-6,11)	3,58 (5,51-7,57)	3,52 (3,74-5,19)	0,038
18:0/16:0	0,24 (0,33-0,44)	0,22 (0,46-5,56)	0,21 (0,27-0,29)	0,32 (0,36-0,38)	0,30 (0,35-0,48)	0,28 (0,35-0,40)	0,29 (0,36-0,45)	0,50 (0,51-0,55)	0,31 (0,36-1,00)	0,30 (0,53-0,61)	0,28 (0,39-0,78)	0,45 (0,51-0,56)	0,231
UI n-3	5,38 (8,38-9,71)	2,29 (7,07-9,42)	6,65 (7,33-8,10)	3,16 (6,50-8,30)	7,78 (9,28-10,43)	8,86 (9,19-9,58)	6,91 (8,99-11,73)	0,17 (0,18-0,73)	3,19 (6,12-9,61)	0,71 (4,12-8,92)	8,92 (9,76-10,72)	1,69 (4,13-4,53)	0,022
UI n-6	0,18 (0,31-0,33)	0,07 (0,12-0,60)	0,00 (0,08-0,14)	0,19 (0,21-0,28)	0,17 (0,26-0,30)	0,11 (0,12-0,17)	0,22 (0,28-0,38)	0,09 (0,29-0,31)	0,09 (0,15-0,50)	0,10 (0,37-0,72)	0,13 (0,24-0,39)	0,55 (5,88-9,59)	0,541
U/S	10,14 (10,85-15,24)	7,38 (11,59-17,95)	5,80 (9,05-9,73)	3,98 (8,17-8,37)	7,05 (9,09-9,54)	7,41 (8,68-9,33)	6,77 (7,93-10,75)	4,98 (5,04-5,64)	5,12 (6,30-7,96)	2,53 (3,70-6,45)	7,37 (8,18-9,13)	4,17 (4,74-8,45)	0,012

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

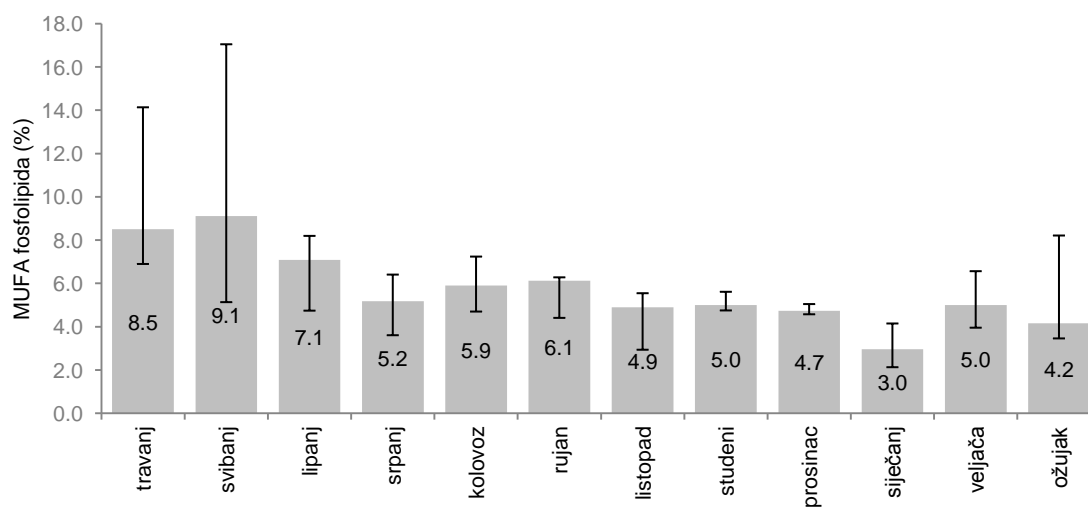
Fosfolipidi sadrže SFA s medijanom i IQR najmanjeg relativnog masenog udjela od 21,45 (12,25 – 32,09) % u listopadu do najvećeg udjela od 48,8 (45,3 – 60,8) % u ožujku (Slika 3.21), MUFA s najmanjim udjelom od 2,96 (2,14 – 4,16) % u siječnju do najvećeg udjela 9,11 (5,14 – 17,06) % u svibnju (Slika 3.22) i PUFA s najmanjim udjelom od 1,23 (1,18 – 5,09) % u studenom do najvećeg udjela od 70,08 (68,01 – 70,94) % u rujnu (Slika 3.23). KW testom je utvrđeno da promjene udjela MUFA i PUFA u fosfolipidnoj frakciji lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,033$  odnosno  $p = 0,013$  (Tablica 3.8).

Budući da PUFA i MUFA čine glavninu fosfolipidne frakcije, u Tablici 3.8 usporedno je prikazan njihov sastav s obzirom na pripadnost n-3, n-6 i n-9 redu. Najzastupljenije su n-3 PUFA (16:4n-3, 20:5n-3 i 22:6n-3) s najmanjim udjelom od 1,23 (1,18 – 4,84) % u studenom do najvećeg udjela 65,08 (59,45 – 71,47) % u veljači. KW testom je utvrđeno da promjene sume n-3 PUFA fosfolipidne frakcije lipida tijekom godine imaju razinu statističke značajnosti  $p = 0,022$ . Zatim slijede n-6 PUFA (18:2cn-6 i 20:4n-6) s minimalnim udjelom 0,66 (0,00 – 4,57) % u ožujku do maksimalnog udjela od 6,19 (1,74 – 11,96) % u siječnju (Slika 3.24). Najmanje zastupljene u sastavu masnih kiselina su n-9 MUFA (18:1cn-9) s najmanjim udjelom od 0,00 i IQR 0,00 – 1,05 % u siječnju do najvećih vrijednosti relativnog masenog udjela u travnju 3,71 (2,46 – 6,27) %. KW testom je utvrđeno da zbroj n-9 MUFA fosfolipidne frakcije lipida tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,003$ .

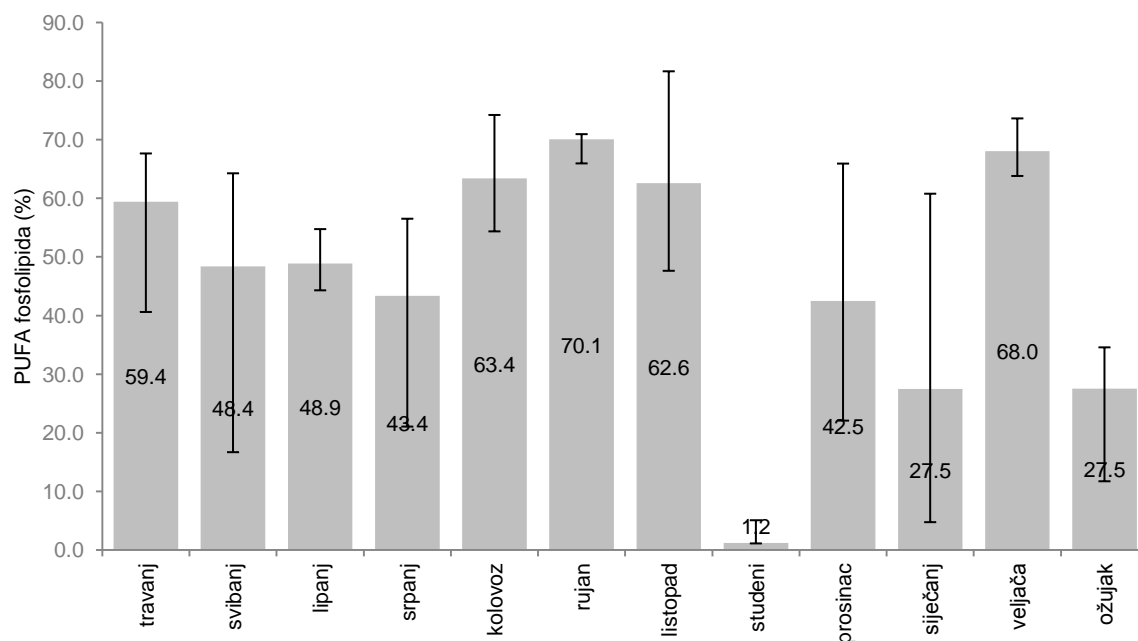
Udjeli n-3 PUFA veći su od udjela n-6 PUFA i njihovi omjeri (n-3/n-6) tijekom godine variraju u rasponu od 0,78 do 32,28. Maksimalna vrijednost zabilježena je u rujnu, a minimalna u studenom. Vrijednosti n-3/n-6 omjera fosfolipidne frakcije jedino su u studenom manje od 2,0. Za promjene u omjeru 16:0/14:0 KW testom utvrđena je statistički značajna povezanost ( $p = 0,038$ ) s godišnjim ciklusom. Indeks nezasićenosti (UI) n-3 masnih kiselina kretao se od 0,17 u studenom do 8,92 u veljači, te je KW testom utvrđena značajna povezanost vrijednosti UI n-3 masnih kiselina fosfolipidne frakcije lipida i godišnjeg ciklusa na razini  $p = 0,022$  (Tablica 3.8).



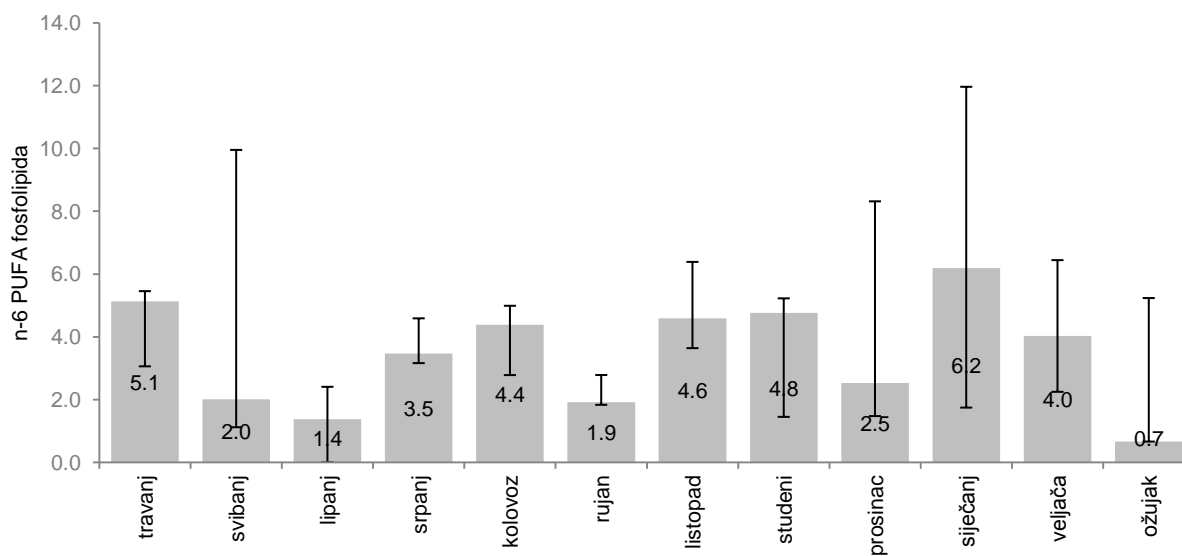
**Slika 3.21** Udio zasićenih masnih kiselina (SFA) fosfolipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.22** Udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) fosfolipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.23** Udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) fosfolipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



**Slika 3.24** Udio n-6 PUFA fosfolipida tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon



### 3.3.4. Sastav slobodnih masnih kiselina

Rezultati analize masnokiselinskog sastava, sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina izraženi su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha), i prikazani u Tablicama 3.9 i 3.10. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesece u godini ( $p < 0,05$ ).

Sastav masnih kiselina frakcije slobodnih masnih kiselina europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) prikazan je u Tablici 3.9.

Tablica 3.9 Relativni maseni udjeli masnih kiselina u frakciji slobodnih masnih kiselina

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 14:0	5,77 (5,87-6,78)	4,56 (6,16-7,73)	5,49 (8,66-11,67)	4,18 (7,28-9,66)	4,22 (5,93-6,31)	7,03 (7,90-10,54)	6,95 (7,76-8,73)	6,29 (6,57-7,33)	4,10 (5,20-8,79)	3,37 (4,54-8,10)	2,76 (5,33-9,74)	2,03 (10,75-23,10)	0,584
C 14:1	0,45 (0,52-0,61)	0,39 (0,47-0,85)	0,45 (0,69-0,96)	0,40 (0,60-0,90)	0,32 (0,46-0,55)	0,42 (0,55-0,73)	0,59 (0,62-0,75)	0,46 (0,49-0,56)	0,32 (0,35-0,58)	0,23 (0,33-0,66)	0,22 (0,37-0,46)	0,18 (0,84-1,75)	0,331
C 15:1	1,57 (1,95-2,64)	1,08 (1,33-1,57)	1,48 (2,07-2,86)	1,21 (1,74-2,21)	1,12 (1,27-1,42)	1,48 (1,94-2,17)	1,95 (2,37-2,92)	1,56 (1,74-1,96)	1,08 (1,35-1,92)	0,20 (1,38-2,35)	0,18 (1,15-1,90)	0,18 (0,74-5,14)	0,130
C 16:0	26,61 (31,15-34,13)	20,23 (21,89-25,25)	27,23 (35,32-58,32)	23,50 (27,23-32,91)	20,99 (27,47-29,39)	26,36 (28,95-33,17)	29,49 (30,77-32,12)	26,27 (29,92-33,82)	20,06 (24,02-29,62)	15,66 (30,49-34,01)	11,92 (19,41-31,01)	13,48 (71,06-128,66)	0,362
C 16:1n-9	1,36 (4,02-4,65)	3,29 (4,42-5,44)	4,80 (6,22-8,01)	2,96 (4,59-8,81)	4,05 (5,20-8,81)	4,52 (5,07-5,79)	3,25 (4,12-5,07)	3,47 (4,11-5,07)	3,23 (3,56-7,86)	1,70 (2,79-4,39)	1,32 (2,40-2,93)	1,62 (6,40-15,49)	0,078
C 16:1n-7	0,85 (0,59-0,98)	0,63 (0,48-0,75)	0,91 (0,78-1,70)	0,85 (0,83-0,95)	0,90 (0,67-0,92)	0,78 (0,70-0,87)	1,20 (1,05-1,55)	0,74 (0,66-1,05)	0,80 (0,57-1,64)	0,84 (0,44-1,05)	0,57 (0,36-0,77)	2,88 (0,41-5,82)	0,181
C 17:0	1,48 (1,30-3,13)	0,77 (0,55-0,88)	0,63 (0,44-0,96)	1,16 (0,56-2,85)	0,46 (0,34-0,62)	1,69 (1,11-2,47)	1,01 (0,84-1,18)	0,84 (0,79-0,99)	0,81 (0,69-1,00)	1,21 (0,65-1,51)	1,09 (0,48-2,14)	2,06 (0,31-5,15)	0,074
C 17:1n-7	2,16 (1,61-2,45)	1,60 (1,39-2,01)	2,28 (1,88-4,08)	1,97 (1,90-2,05)	1,82 (1,45-2,13)	2,05 (1,93-2,34)	2,42 (2,12-2,55)	2,02 (1,77-2,45)	1,63 (1,41-1,92)	2,31 (1,22-2,76)	1,53 (0,92-2,02)	5,90 (1,16-11,17)	0,244
C 16:4n-3	0,37 (0,31-0,47)	0,34 (0,31-0,46)	0,63 (0,41-0,91)	0,43 (0,10-0,54)	0,33 (0,29-0,35)	0,33 (0,08-0,37)	0,40 (0,30-0,45)	0,45 (0,40-0,52)	0,33 (0,26-0,39)	0,53 (0,25-0,64)	0,44 (0,28-0,61)	1,59 (0,30-4,61)	0,383
C 18:0	12,90 (9,85-15,28)	9,48 (6,50-9,78)	10,47 (8,65-19,20)	9,14 (8,54-10,88)	8,75 (5,55-9,35)	9,95 (8,85-12,37)	8,12 (7,04-10,78)	8,74 (8,09-11,38)	7,92 (5,73-9,06)	12,69 (5,90-16,51)	7,72 (5,60-10,87)	38,99 (6,35-75,11)	0,440
C 18:1cn-9	4,95 (4,46-6,21)	4,22 (3,67-4,65)	5,36 (3,54-9,44)	4,66 (4,33-7,13)	4,99 (2,85-6,27)	5,45 (5,14-6,50)	3,70 (3,43-4,17)	4,79 (4,53-5,32)	3,40 (2,47-5,49)	4,95 (2,46-5,81)	2,98 (2,06-3,71)	11,45 (2,44-21,78)	0,186
C 18:1n-7	2,81 (1,82-2,87)	2,95 (2,01-3,93)	3,88 (3,00-5,56)	2,65 (2,30-4,67)	2,39 (0,97-3,42)	2,30 (2,06-2,84)	1,91 (1,57-2,26)	2,14 (1,97-2,37)	2,05 (1,20-2,91)	1,81 (1,00-2,04)	1,19 (0,29-1,61)	5,48 (1,00-10,84)	0,065
C 18:2cn-6	2,07 (1,64-2,30)	2,49 (2,22-3,02)	2,41 (1,72-4,35)	2,51 (2,26-2,69)	2,98 (1,77-3,78)	2,57 (2,33-3,41)	1,81 (1,71-2,04)	2,26 (2,18-2,35)	1,88 (1,42-2,52)	2,01 (1,05-2,24)	2,05 (1,65-8,37)	4,29 (1,04-10,16)	0,255
C 18:2n-6	0,62 (0,52-0,95)	0,18 (0,14-0,29)	0,07 (0,01-0,21)	0,21 (0,05-0,33)	0,15 (0,03-0,28)	0,38 (0,08-0,60)	0,25 (0,05-0,34)	0,17 (0,03-0,22)	0,21 (0,05-0,66)	0,51 (0,09-0,65)	0,40 (0,21-0,67)	0,71 (0,11-1,51)	0,184
C 18:3n-3	1,36 (0,74-1,69)	1,53 (1,06-1,67)	1,37 (0,94-2,65)	1,11 (0,71-1,14)	1,42 (0,97-1,95)	1,17 (1,14-1,61)	1,30 (0,81-1,61)	1,83 (1,15-1,83)	1,32 (1,04-2,25)	1,50 (0,77-1,66)	1,67 (0,86-1,86)	2,05 (0,68-7,14)	0,772
C 18:4n-3	0,66 (0,32-0,88)	0,61 (0,48-0,80)	0,84 (0,71-1,67)	0,74 (0,55-0,90)	0,75 (0,49-0,91)	0,43 (0,00-0,88)	0,56 (0,35-1,05)	1,29 (1,05-1,42)	1,02 (0,92-1,49)	0,47 (0,26-0,71)	1,15 (0,57-8,71)	0,57 (0,28-4,38)	0,151
C 18:5n-3	0,25 (0,22-0,62)	0,16 (0,13-0,28)	0,27 (0,15-0,37)	0,31 (0,19-0,41)	0,16 (0,07-0,22)	0,15 (0,00-0,36)	0,07 (0,00-0,41)	0,14 (0,14-0,16)	0,12 (0,02-0,17)	0,18 (0,15-0,39)	0,33 (0,15-0,45)	0,57 (0,11-2,22)	0,246
C 20:1n-9	0,42 (0,32-0,47)	0,54 (0,35-0,83)	0,92 (0,59-1,66)	0,83 (0,67-1,09)	0,69 (0,26-1,07)	0,79 (0,75-1,08)	0,40 (0,34-0,67)	0,63 (0,62-0,72)	0,31 (0,20-0,65)	0,41 (0,27-0,58)	0,34 (0,21-0,73)	1,76 (0,28-6,87)	0,096
C 20:1n-7	1,01 (0,59-1,43)	0,78 (0,44-1,02)	0,85 (0,46-1,72)	0,84 (0,48-0,93)	0,72 (0,46-0,91)	0,85 (0,69-0,90)	0,55 (0,53-0,58)	1,02 (1,01-1,07)	0,52 (0,30-0,89)	0,82 (0,38-1,29)	0,64 (0,56-1,25)	4,98 (0,62-9,58)	0,341
C 20:2n-6	5,01 (3,90-6,14)	8,65 (5,06-8,78)	8,95 (5,85-13,34)	5,12 (4,40-6,90)	5,47 (3,85-8,46)	4,26 (3,16-5,27)	4,19 (3,39-5,04)	6,28 (5,78-6,64)	7,17 (4,26-11,50)	5,58 (2,47-8,31)	3,94 (2,60-5,52)	19,64 (4,41-45,84)	0,101

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
C 20:3n-6	0,61 (0,49-0,97)	0,39 (0,29-0,51)	0,44 (0,23-0,86)	0,57 (0,11-0,69)	0,45 (0,27-1,71)	0,55 (0,12-0,68)	0,38 (0,31-0,70)	0,61 (0,54-0,63)	0,41 (0,24-0,68)	0,75 (0,51-0,88)	0,79 (0,44-8,19)	3,46 (0,46-7,44)	0,557
C 20:3n-3	0,18 (0,00-0,63)	0,16 (0,03-0,28)	0,25 (0,13-0,45)	0,23 (0,17-0,35)	0,20 (0,04-0,32)	0,43 (0,10-0,52)	0,00 (0,00-0,57)	0,16 (0,10-0,17)	0,10 (0,02-0,20)	0,05 (0,00-0,11)	0,43 (0,03-0,84)	0,41 (0,05-1,10)	0,622
C 20:4n-6	0,32 (0,07-0,43)	0,71 (0,38-1,31)	0,63 (0,56-1,68)	0,83 (0,66-1,23)	1,69 (0,91-2,09)	0,97 (0,55-1,40)	0,79 (1,04-1,04)	0,83 (0,68-0,93)	1,27 (0,73-1,45)	0,39 (0,19-0,90)	0,69 (0,43-1,01)	1,12 (0,35-5,70)	0,096
C 20:4n-3	0,00 (0,00-0,30)	0,18 (0,17-0,30)	0,34 (0,17-0,57)	0,21 (0,20-0,61)	0,26 (0,06-0,49)	0,73 (0,38-0,83)	0,38 (0,08-0,48)	0,19 (0,05-0,36)	0,18 (0,03-0,33)	0,16 (0,02-0,30)	0,57 (0,20-0,66)	0,73 (0,18-3,64)	0,202
C 20:5n-3	0,76 (0,47-0,91)	1,01 (0,77-1,51)	3,36 (2,29-6,23)	2,25 (1,34-3,57)	3,23 (2,77-10,58)	1,69 (1,12-3,80)	1,84 (1,12-7,05)	2,81 (1,74-3,32)	6,55 (2,25-9,77)	0,79 (0,34-1,74)	2,54 (1,01-9,02)	2,76 (2,10-24,71)	0,008
C 22:0	0,11 (0,00-0,36)	0,31 (0,12-0,47)	0,38 (0,09-0,48)	0,19 (0,04-0,20)	0,16 (0,12-0,22)	0,06 (0,00-0,79)	0,00 (0,00-0,08)	0,13 (0,12-0,14)	0,06 (0,00-0,61)	0,07 (0,00-0,16)	0,06 (0,00-0,65)	0,55 (0,11-1,26)	0,426
C 22:1n-9/n-7	0,72 (0,57-0,85)	0,88 (0,64-1,11)	0,51 (0,26-1,63)	0,47 (0,38-0,70)	0,54 (0,39-0,65)	0,22 (0,00-0,74)	0,31 (0,27-0,36)	0,86 (0,50-1,19)	0,56 (0,28-1,29)	0,38 (0,18-0,52)	0,41 (0,27-0,63)	1,90 (0,26-7,15)	0,198
C 22:2n-6	2,75 (2,40-3,85)	5,74 (5,41-14,51)	3,73 (2,97-7,86)	2,72 (2,08-4,46)	2,73 (2,21-3,34)	2,22 (1,79-2,54)	1,54 (1,24-2,80)	3,74 (1,96-5,35)	3,65 (1,88-5,74)	1,67 (0,46-2,67)	2,07 (1,64-7,49)	7,67 (0,50-21,11)	0,106
C 22:3n-3	1,25 (0,98-1,82)	0,47 (0,15-1,25)	1,13 (0,47-1,67)	0,56 (0,47-2,03)	0,21 (0,18-0,46)	1,48 (0,66-2,45)	2,80 (1,55-5,41)	0,99 (0,61-1,37)	0,52 (0,36-2,02)	0,63 (0,53-2,32)	1,08 (0,53-2,35)	2,40 (0,78-4,70)	0,064
NMID 1	0,79 (0,53-1,13)	0,84 (0,49-1,05)	0,59 (0,41-0,96)	0,42 (0,25-0,45)	0,51 (0,23-0,60)	0,24 (0,00-0,57)	0,52 (0,32-0,77)	0,20 (0,12-0,41)	0,71 (0,41-1,16)	0,47 (0,24-0,55)	0,55 (0,47-1,15)	2,91 (0,40-6,14)	0,066
NMID 2	0,13 (0,00-0,38)	0 (0-0)	0,29 (0,19-0,47)	0,13 (0,00-1,09)	0,11 (0,02-1,02)	0,26 (0,00-1,02)	0,96 (0,45-2,22)	0,02 (0,01-0,09)	0,40 (0,07-0,65)	0 (0-0)	0,16 (0,00-0,47)	0,08 (0,02-2,00)	0,052
C 22:4n-6	0,28 (0,06-0,41)	0,39 (0,07-0,59)	0,37 (0,05-0,58)	0,20 (0,03-0,36)	0,25 (0,08-0,45)	0,19 (0,00-0,42)	0,32 (0,06-0,55)	0,28 (0,18-0,35)	0,28 (0,23-0,57)	0,18 (0,03-0,26)	0,76 (0,32-0,80)	0,15 (0,03-2,46)	0,723
C 22:5n-6	0,33 (0,06-0,45)	0,94 (0,47-1,13)	0,40 (0,23-0,73)	0,61 (0,35-0,73)	0,79 (0,30-0,94)	0,62 (0,11-0,90)	0,66 (0,50-1,42)	0,39 (0,25-0,53)	0,47 (0,09-0,67)	0,37 (0,06-1,86)	0,60 (0,43-5,38)	0,59 (0,26-2,49)	0,520
C 22:5n-3	0,55 (0,09-1,06)	1,08 (0,63-1,60)	0,98 (0,65-1,54)	0,41 (0,35-0,62)	0,61 (0,37-0,89)	1,08 (0,80-1,17)	0,60 (0,41-0,78)	0,58 (0,43-0,67)	0,56 (0,48-0,87)	0,50 (0,27-0,64)	0,86 (0,43-1,09)	1,48 (0,56-9,62)	0,088
C 24:0	0,72 (0,11-2,22)	0,13 (0,02-0,57)	0,23 (0,03-0,44)	0,31 (0,12-0,54)	0,10 (0,00-0,52)	0,22 (0,00-0,99)	0,29 (0,04-0,54)	0,29 (0,17-0,33)	0,21 (0,18-1,26)	0,32 (0,20-0,43)	0,35 (0,04-0,57)	1,31 (0,25-13,42)	0,849
C 22:6n-3	6,70 (0,85-14,38)	12,15 (9,89-20,44)	12,32 (6,54-16,14)	8,88 (7,38-15,45)	10,73 (8,67-24,11)	7,97 (2,69-11,55)	6,38 (5,26-11,56)	8,57 (5,88-10,13)	10,60 (7,04-21,96)	4,06 (3,08-9,53)	10,64 (4,56-35,38)	10,17 (75,20)	0,524

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Najveći relativni maseni udio (%) SFA slobodnih masnih kiselina (*free fatty acids*, FFA) čini C 16:0. Medijan i IQR udjela palmitinske kiseline tijekom godine kretao se od minimalnih 11,92 (19,41 – 31,01) % u veljači do maksimalnih 29,5 (30,8 – 32,1) % u listopadu. Najveći relativni maseni udio MUFA čini C 18:1n-9 s minimalnim udjelom od 3,4 (2,5 – 5,5) % u prosincu, do 11,4 (2,4 – 21,8) % u svibnju. Najveći maseni udio PUFA u sastavu slobodnih masnih kiselina čine C 20:5n-3 s rasponom od 0,8 (0,3 – 1,7) % u siječnju do 6,5 (2,2 – 9,8) % u prosincu, i C 22:6n-3 s rasponom od 4,1 (3,1 – 9,5) % u siječnju do 12,3 (6,5 – 16,1) % u lipnju (Tablica 3.9).

Unutargodišnje varijacije masnokiselinskog sastava slobodnih masnih kiselina na statističkoj razini značajnosti  $p < 0,05$  utvrđene su KW testom kod masne kiseline C 20:5n-3,  $p = 0,008$  (Tablica 3.9).

Suma pojedinih skupina slobodnih masnih kiselina, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti, i masnokiselinski indeksi prikazani su u Tablici 3.10.

**Tablica 3.10** Suma pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinski indeksi frakcije slobodnih masnih kiselina

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
Σ n-3	11,55 (6,52-20,75)	18,57 (15,02-26,29)	20,67 (14,97-30,51)	15,10 (13,85-23,45)	18,06 (15,80-38,23)	18,99 (14,87-22,86)	15,79 (13,63-24,78)	17,08 (12,25-19,49)	22,40 (15,71-35,06)	10,16 (6,08-16,36)	26,41 (16,39-46,52)	14,44 (6,97-25,67)	0,351
Σ n-6	12,35 (11,28-13,00)	20,12 (15,58-27,99)	16,40 (12,83-29,00)	12,53 (10,82-16,75)	14,76 (12,98-17,24)	12,87 (9,43-31,95)	10,36 (9,15-12,15)	14,70 (12,06-16,40)	15,92 (13,98-18,14)	11,29 (6,76-16,03)	12,09 (9,69-34,67)	12,77 (7,76-17,48)	0,202
Σ n-9	10,14 (8,42-10,50)	9,36 (7,66-10,58)	12,13 (10,10-19,28)	10,15 (9,26-12,05)	11,72 (9,55-13,53)	12,93 (12,12-27,13)	9,89 (8,68-11,10)	11,46 (10,38-12,30)	9,59 (7,59-11,39)	9,02 (4,78-10,33)	6,66 (3,89-8,38)	6,43 (4,57-7,79)	0,046
Σ MUFA	19,46 (18,84-19,84)	17,74 (15,40-20,77)	23,27 (18,50-37,75)	19,44 (18,18-22,87)	20,67 (15,65-21,98)	21,76 (20,56-50,88)	19,85 (17,20-21,08)	20,80 (20,01-20,93)	18,35 (14,47-19,31)	17,59 (9,21-19,52)	12,36 (7,13-16,75)	12,40 (9,37-17,81)	0,069
Σ PUFA	24,41 (18,06-32,99)	41,80 (35,09-46,68)	35,53 (29,90-58,96)	29,30 (25,18-38,02)	34,68 (30,64-51,75)	32,50 (24,96-53,52)	27,10 (24,73-34,04)	31,15 (24,94-35,90)	39,81 (29,71-51,69)	21,45 (13,63-31,60)	48,97 (28,15-68,65)	25,22 (21,67-38,20)	0,156
Σ SFA	54,37 (46,07-61,05)	39,12 (36,30-43,36)	55,61 (43,97-92,57)	46,87 (41,18-54,18)	43,72 (31,65-46,34)	50,80 (44,94-149,23)	49,93 (46,26-52,84)	47,62 (42,52-53,96)	39,51 (32,10-50,22)	52,73 (27,53-58,27)	36,30 (22,86-54,92)	33,03 (22,91-51,32)	0,276
Σ NMID	1,00 (0,53-1,43)	0,84 (0,49-1,05)	1,01 (0,69-1,22)	0,55 (0,25-1,54)	0,62 (0,37-0,66)	0,50 (0,00-4,36)	1,65 (0,78-2,81)	0,22 (0,13-0,50)	1,16 (0,92-1,33)	0,47 (0,24-0,55)	0,89 (0,65-1,25)	2,95 (0,48-8,11)	0,073
n-3/n-6	0,91 (0,56-1,70)	0,83 (0,62-1,72)	1,06 (0,92-1,63)	1,34 (0,92-1,77)	1,15 (1,00-2,97)	1,40 (0,72-1,92)	1,52 (1,15-2,73)	1,19 (0,96-1,23)	1,19 (1,10-1,83)	0,99 (0,69-1,24)	1,54 (0,82-4,77)	1,40 (0,47-2,65)	0,873
EPA/DHA	0,07 (0,06-0,09)	0,10 (0,05-0,12)	0,36 (0,25-0,45)	0,25 (0,14-0,31)	0,33 (0,29-0,42)	0,30 (0,18-0,86)	0,33 (0,19-0,61)	0,33 (0,29-0,33)	0,40 (0,29-0,75)	0,14 (0,10-0,24)	0,12 (0,09-0,24)	0,32 (0,26-0,36)	0,010
AA/EPA	0,54 (0,10-0,69)	0,71 (0,46-0,87)	0,26 (0,17-0,29)	0,32 (0,29-0,77)	0,39 (0,18-0,56)	0,50 (0,36-0,60)	0,42 (0,19-0,49)	0,30 (0,28-0,40)	0,24 (0,13-0,36)	0,52 (0,47-0,63)	0,43 (0,10-0,61)	0,23 (0,15-0,51)	0,114
AA/DHA	0,05 (0,03-0,06)	0,07 (0,03-0,10)	0,09 (0,05-0,12)	0,09 (0,08-0,10)	0,13 (0,07-0,18)	0,13 (0,10-0,38)	0,09 (0,08-0,18)	0,10 (0,09-0,12)	0,11 (0,06-0,14)	0,08 (0,06-0,11)	0,07 (0,03-0,10)	0,07 (0,05-0,16)	0,314
20:1/18:1n-9	0,08 (0,07-0,09)	0,13 (0,09-0,18)	0,17 (0,14-0,21)	0,16 (0,12-0,23)	0,13 (0,09-0,17)	0,15 (0,13-0,17)	0,10 (0,09-0,19)	0,14 (0,12-0,15)	0,10 (0,07-0,12)	0,11 (0,07-0,13)	0,11 (0,10-0,20)	0,16 (0,10-0,32)	0,043
16:0/14:0	4,88 (4,40-5,75)	3,93 (2,95-4,58)	4,81 (3,99-5,33)	4,03 (3,26-5,77)	4,69 (4,59-5,02)	3,65 (2,86-4,22)	3,82 (3,62-4,51)	4,33 (4,18-4,84)	4,63 (3,44-5,01)	5,17 (3,71-6,82)	3,68 (3,22-4,41)	6,04 (5,01-7,47)	0,047
18:0/16:0	0,41 (0,37-0,45)	0,40 (0,29-0,47)	0,32 (0,26-0,37)	0,33 (0,27-0,46)	0,30 (0,26-0,34)	0,36 (0,31-0,39)	0,26 (0,24-0,34)	0,31 (0,29-0,34)	0,30 (0,26-0,37)	0,44 (0,32-0,53)	0,44 (0,31-0,49)	0,57 (0,45-0,60)	0,020
20:3/18:3n-3	0,12 (0,00-0,94)	0,11 (0,02-0,28)	0,14 (0,10-0,32)	0,20 (0,15-0,40)	0,14 (0,03-0,17)	0,33 (0,08-0,59)	0,00 (0,00-0,41)	0,09 (0,06-0,09)	0,06 (0,01-0,19)	0,04 (0,00-0,14)	0,23 (0,02-1,11)	0,10 (0,07-0,33)	0,611
20:2/18:2n-6	2,66 (1,92-3,06)	3,15 (1,83-3,94)	2,79 (2,58-5,74)	2,08 (1,88-2,60)	1,87 (1,45-3,44)	1,34 (1,25-2,08)	2,32 (1,68-2,96)	2,78 (2,46-3,04)	3,25 (1,96-8,56)	2,77 (2,33-3,70)	1,80 (0,62-2,77)	4,93 (2,72-7,33)	0,071
20:4/18:2n-6	0,15 (0,03-0,21)	0,31 (0,16-0,43)	0,34 (0,24-0,40)	0,33 (0,27-0,50)	0,46 (0,33-1,16)	0,30 (0,23-0,54)	0,40 (0,29-0,58)	0,36 (0,31-0,41)	0,57 (0,35-1,04)	0,26 (0,14-0,40)	0,37 (0,08-0,58)	0,39 (0,22-0,61)	0,187
20:6/18:3n-3*	4,40 (0,75-8,97)	9,79 (7,21-12,97)	7,11 (4,09-13,48)	8,67 (7,57-13,70)	8,04 (4,63-25,01)	5,53 (2,42-9,75)	5,18 (4,18-6,42)	4,56 (3,57-5,54)	6,29 (4,33-21,70)	4,06 (2,56-6,28)	7,28 (4,61-18,89)	10,15 (4,23-11,95)	0,231
UI n-3	8,37 (3,06-9,72)	7,80 (6,31-10,40)	8,68 (6,29-12,81)	6,34 (5,82-9,85)	7,24 (6,46-15,05)	6,99 (4,51-8,41)	5,58 (4,84-9,45)	7,17 (5,14-8,19)	9,41 (5,38-14,72)	3,71 (2,50-6,12)	11,09 (6,57-19,54)	6,06 (2,93-10,78)	0,393
UI n-6	2,96 (1,64-3,12)	4,83 (3,74-5,81)	3,43 (3,00-6,78)	3,01 (2,03-3,75)	3,54 (2,93-4,14)	3,09 (1,35-7,67)	2,33 (2,05-2,73)	3,53 (2,72-3,94)	3,82 (2,65-4,35)	2,27 (1,32-3,85)	2,90 (2,33-8,32)	9,44 (1,76-20,22)	0,313
U/S	19,82 (19,50-20,28)	18,81 (16,69-21,60)	23,86 (19,32-38,35)	19,92 (19,02-23,57)	21,46 (17,40-22,64)	22,29 (21,25-51,29)	20,39 (17,91-21,57)	21,44 (20,50-21,77)	19,14 (15,97-20,28)	18,12 (9,80-19,91)	13,68 (10,19-17,47)	13,40 (10,36-18,40)	0,081

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Slobodne masne kiseline sastoje se od SFA s medijanom i IQR najmanjeg relativnog masenog udjela od 33,03 (22,91 – 51,32) % u ožujku do najvećeg udjela od 55,61 (43,97 – 92,57) % u lipnju, MUFA s najmanjim udjelom od 12,36 (7,13 – 16,75) % u veljači do najvećeg udjela 23,27 (18,50 – 37,75) % u lipnju i PUFA s najmanjim udjelom od 21,45 (13,63 – 31,60) % u siječnju do najvećeg udjela od 48,97 (28,15 – 68,65) % u veljači (Tablica 3.10).

Budući da PUFA i MUFA čine glavninu slobodnih masnih kiselina, u Tablici 3.10 usporedno je prikazan i njihov sastav ovisno o pripadnosti n-3, n-6 i n-9 redu. Najbrojnije su n-3 PUFA (16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 18:5n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:3n-3, 22:5n-3 i 22:6n-3) s najmanjim udjelom od 10,16 (6,08 – 16,36) u siječnju do najvećeg udjela 26,41 (16,39 – 46,52) % u veljači. Zatim slijede n-6 PUFA (18:2cn-6, 18:2tn-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:4n-6 i 22:5n-6) s minimalnim udjelom 10,36 (9,15 – 12,15) % u listopadu i maksimalnog udjela od 20,12 (15,58 – 27,99) % u svibnju. Najmanje zastupljene u sastavu masnih kiselina su n-9 MUFA (16:1n-9, 18:1cn-9 i 20:1n-9) s najmanjim udjelom od 6,43 i IQR 4,57 – 7,79 % u ožujku do najvećih vrijednosti relativnog masenog udjela u rujnu 12,93 (12,12 – 27,13) %. KW testom je utvrđeno da zbroj n-9 MUFA frakcije slobodnih masnih kiselina tijekom godine ima razinu statističke značajnosti  $p = 0,046$ . Udio n-3 PUFA u slobodnim masnim kiselinama nije puno veći od udjela n-6 PUFA, pa je omjer (n-3/n-6) tijekom godine manji od 2, bez većih oscilacija. DHA je dominirala u odnosu na EPA tijekom cijele godine.

Omjer EPA/DHA u tkivu europske plosnate kamenice pokazuju minimalne vrijednosti od siječnja do svibnja (0,07 – 0,32), dok je od lipnja do prosinca višestruko veći (0,25 – 0,40). KW testom utvrđena je statistički značajna promjena između omjera EPA/DHA i godišnjeg ciklusa na razini  $p = 0,010$ . Indeks 16:0/14:0 i 18:0/16:0 slobodnih masnih kiselina, odnosno indeks elongacije, generalno se povećavaju prema ljetnom razdoblju, a smanjuju prema zimskom razdoblju. Indeks 20:1/18:1 n-9 masnih kiselina, odnosno indeks desaturacije, također pokazuje trend rasta i najveće vrijednosti u ljetnim mjesecima te smanjenje prema hladnijim mjesecima.

KW testom utvrđena je statistička značajnost promjena tijekom godine za indekse 16:0/14:0 na razini  $p = 0,047$ , 18:0/16:0 na razini  $p = 0,020$  i 20:1/18:1 n-9 na razini  $p = 0,043$  (Tablica 3.10).

### 3.4. Antioksidativni status kamenica

Katalitička koncentracija antioksidativnih enzima i koncentracija produkata lipidne peroksidacije izražene su u obliku medijana i interkvartilnog raspona uz razinu statističke značajnosti ( $p$ ) ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha), i prikazani su u Tablici 3.11.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne promjene s obzirom na mjesece u godini ( $p < 0,05$ ).

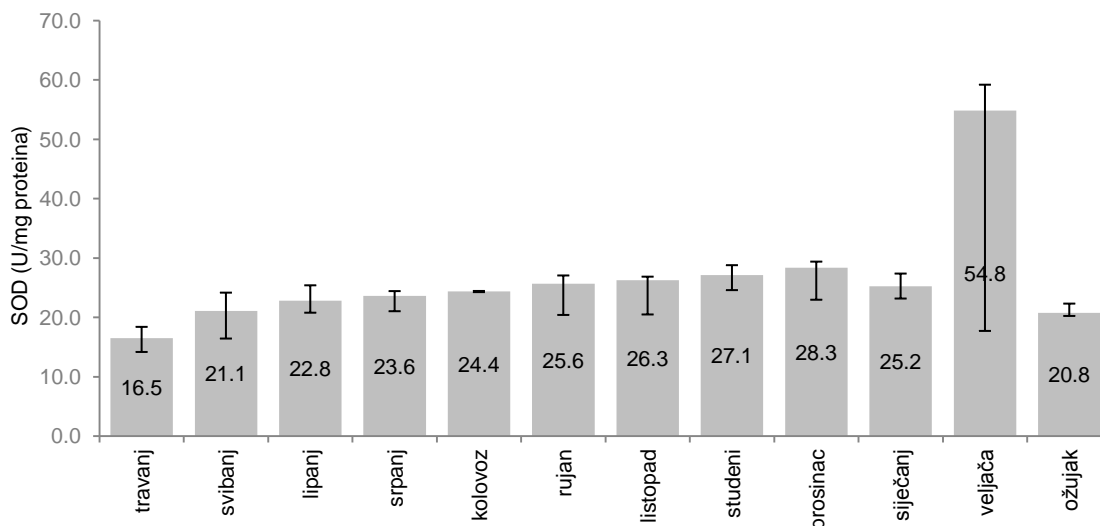
Tablica 3.11 Oksidativni status europske plosnate kamenice po mjesecima

Medijan (IQR)	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan	Listopad	Studeni	Prosinac	Siječanj	Veljača	Ožujak	p
SOD (U/mg proteina)	16,53 (15,34-18,39)	21,11 (18,77-24,15)	22,83 (21,80-25,39)	23,60 (22,31-24,41)	24,39 (24,32-24,43)	25,65 (23,02-27,04)	26,28 (23,38-26,84)	27,14 (25,86-28,78)	28,34 (25,65-29,38)	25,22 (24,19-27,36)	54,84 (36,27-59,17)	20,76 (20,49-22,30)	0,231
GR (U/mg proteina)	0,12 (0,10-0,14)	0,31 (0,30-0,33)	0,29 (0,27-0,30)	0,16 (0,15-0,21)	0,31 (0,26-0,31)	0,26 (0,25-0,29)	0,23 (0,23-0,26)	0,23 (0,23-0,25)	0,34 (0,25-0,35)	0,23 (0,22-0,29)	0,58 (0,40-0,67)	0,25 (0,22-0,26)	0,135
LP (nmolLOOH/mg lipida)	0,41 (0,40-0,44)	15,80 (14,60-16,40)	1,78 (1,65-1,93)	4,01 (3,65-4,37)	4,23 (3,18-4,26)	7,77 (7,56-8,57)	2,44 (2,02-4,01)	1,71 (1,62-1,96)	3,92 (3,89-5,10)	5,75 (5,54-6,71)	6,99 (6,33-7,21)	1,80 (1,73-1,81)	0,001
MDA (mmol/mg proteina)	0,11 (0,11-0,12)	0,12 (0,11-0,12)	0,19 (0,14-0,25)	0,10 (0,09-0,13)	0,10 (0,08-0,10)	0,12 (0,09-0,15)	0,12 (0,09-0,15)	0,15 (0,13-0,17)	0,22 (0,19-0,22)	0,17 (0,17-0,21)	0,33 (0,27-0,54)	0,14 (0,13-0,15)	0,046

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; p = Kruskal - Wallis test, razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

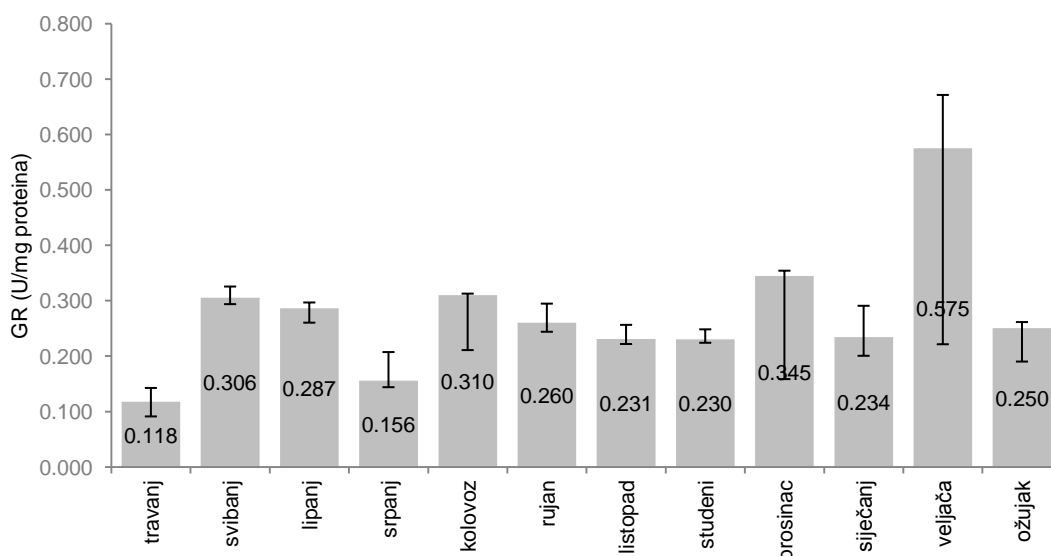


Aktivnost superoksid-dismutaze (*superoxide dismutase*, SOD) u tkivu europske plosnate kamenice tijekom godine kretala se od minimalnih 16,53 (15,34 – 18,39) U/mg proteina u travnju do 54,8 (36,27 – 59,17) U/mg proteina u veljači (Slika 3.25). Vrijednosti katalitičke koncentracije SOD gotovo su podjednake tijekom godine, osim u veljači, i ne pokazuju statistički značajnu varijaciju izračunatu KW testom ( $p = 0,231$ ) (Tablica 3.11).



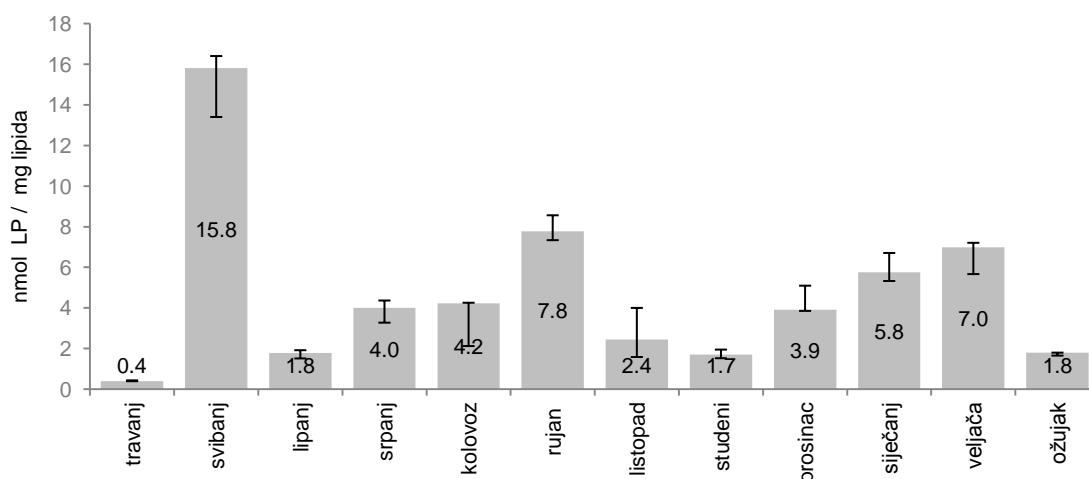
**Slika 3.25** Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Aktivnost glutation-reduktaze (*glutathione reductase*, GR) u tkivu europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) tijekom godine kretala se od minimalnih 0,11 (0,11 – 0,12) U/mg proteina u travnju do 0,58 (0,40 – 0,67) U/mg proteina u veljači (Slika 3.26). Porast aktivnosti GR zabilježen je od toplijeg prema hladnijem dijelu godine. Iako su vrijednosti GR varirale, aktivnost GR ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $p = 0,135$ ) tijekom godine (Tablica 3.11).



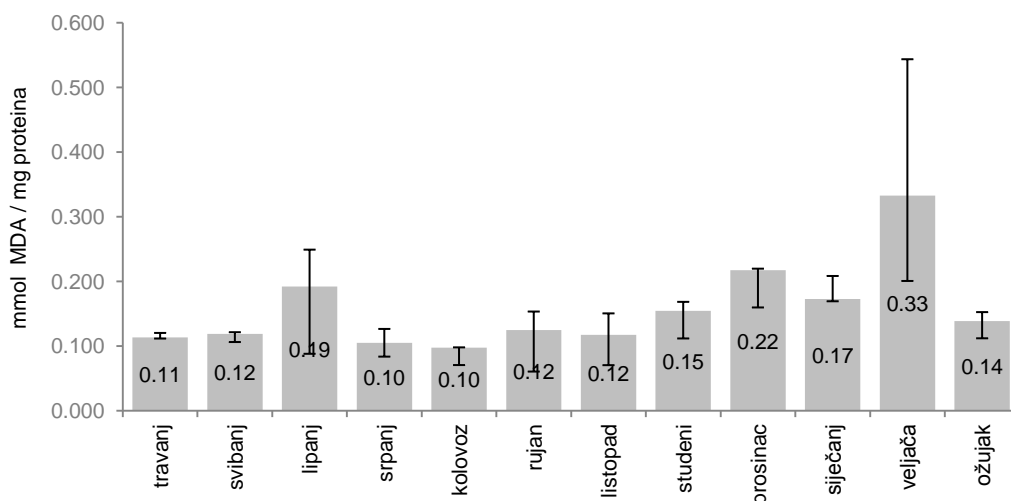
**Slika 3.26** Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Koncentracija lipidnih peroksida (*lipid peroxides*, LP) u tkivu kamenica kroz godinu kretala se od minimalnih 0,41 (0,40 – 0,44) mmol LOOH/mg lipida u travnju, dok je maksimalni sadržaj LP po miligramu ukupnih lipida kamenica iznosio 15,80 (14,60 – 16,40) u svibnju (Slika 3.27). Tijekom godine vidljiva su dva razdoblja rasta koncentracije LP, i to od lipnja do rujna, te od studenog do veljače. Za koncentraciju LP u tkivu kamenica KW testom utvrđena je statistički značajna razlika na razini  $p = 0,001$  tijekom godine (Tablica 3.11).



**Slika 3.27** Koncentracija lipidnih peroksida (LP) u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

Koncentracija malondialdehida (*malondialdehyde*, MDA) u tkivu kamenica kroz godinu bila je od 0,10 (0,08 – 0,10) mmol/mg proteina u kolovozu, do najvećih koncentracija u veljači 0,33 (0,27 – 0,54) mmol/mg proteina (Slika 3.28). KW testom utvrđena je statistički značajna povezanost ( $p = 0,046$ ) između mjeseci u godini i koncentracije MDA u tkivu kamenica (Tablica 3.11).



**Slika 3.28** Koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivu kamenica tijekom godine; rezultat je prikazan kao medijan, crta pogreške prikazuje interkvartilni raspon

### 3.5. Faktorska struktura obilježja sezone

Analizom glavnih komponenti (*principal component analysis*, PCA) s kriterijem ekstrakcije glavnih komponenata: *eigen* vrijednosti ( $\lambda$ ) veće od 1, izolirane su četiri glavne komponente koje sadrže 12 manifestnih varijabli obilježja okolišnih čimbenika. Četiri komponente ukupno objašnjavaju 79,1 % varijance zavisnih varijabli (Tablica 3.12). Prvu komponentu čine koncentracija fosfata, anorganska partikularna tvar (PIM), ukupna partikularna tvar (TPM), pH i koncentracija nitrata. Drugu komponentu čine otopljeni kisik (DO), salinitet (S) i temperatura mora (T). Treću komponentu čine organska partikularna tvar (POM) i koncentracija amonijaka, te četvrtu komponentu čine koncentracije sulfata i nitrita (Tablica 3.13).

**Tablica 3.12** Udjeli objašnjenja varijance u četiri izolirane glavne komponente obilježja sezone

Komponenta	% varijance	Kumulativni %
I	26,7	26,7
II	22,7	49,4
III	15,0	64,4
IV	14,7	79,1

**Tablica 3.13** Varimax rotirana matrica strukture obilježja sezone

	Komponenta			
	I	II	III	IV
Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,852	-0,040	0,355	0,181
PIM (g/L)	0,845	0,485	-0,070	-0,035
TPM (g/L)	0,785	0,452	0,240	-0,047
pH	0,698	-0,182	-0,006	-0,277
Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,679	-0,014	0,339	-0,207
DO (%)	-0,015	-0,901	0,188	-0,149
S (psu)	0,172	0,809	0,321	-0,063
T ( $^{\circ}\text{C}$ )	0,122	-0,636	-0,379	0,533
POM (g/L)	0,231	0,182	0,817	-0,086
Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,223	-0,120	0,695	0,364
Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	-0,202	0,144	0,052	0,862
Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,131	0,553	-0,246	-0,642

KRATICE: PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar); DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

### 3.5.1. PCA analiza biokemijskog sastava tkiva kamenica

U Tablici 3.14 prikazana je povezanost biokemijskog sastava tkiva europske plosnate kamenice i obilježja sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one varijable koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesec.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.14 Povezanost obilježja biokemijskog sastava s obilježjima sezone

$r$ $p$	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	PIM (g/L)	TPM (g/L)	pH	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
Lipidi (mg/g ww)	<b>0,057</b>	<b>-0,044</b>	<b>-0,103</b>	<b>-0,063</b>	<b>-0,020</b>	<b>0,089</b>	<b>-0,270</b>	<b>0,239</b>	<b>-0,165</b>	<b>0,284</b>	<b>-0,119</b>	<b>-0,080</b>	<b>0,038</b>	<b>-0,224</b>	<b>-0,036</b>	<b>0,076</b>
Proteini (mg/g ww)**	0,742	0,801	0,551	0,715	0,908	0,606	0,111	0,161	0,336	0,093	0,491	0,641	0,828	0,189	0,834	0,658
Glikogen (mg/g ww)**	<b>-0,089</b>	<b>-0,103</b>	<b>-0,138</b>	<b>-0,234</b>	<b>0,078</b>	<b>0,123</b>	<b>-0,494</b>	<b>0,628</b>	<b>-0,173</b>	<b>0,415</b>	<b>0,247</b>	<b>-0,437</b>	<b>0,019</b>	<b>-0,366</b>	<b>-0,052</b>	<b>0,492</b>
	0,605	0,550	0,422	0,170	0,653	0,477	0,002	<0,001	0,314	0,012	0,147	0,008	0,913	0,028	0,761	0,002
	<b>-0,402</b>	<b>-0,091</b>	<b>0,049</b>	<b>-0,219</b>	<b>-0,106</b>	<b>-0,097</b>	<b>-0,110</b>	<b>-0,286</b>	<b>0,367</b>	<b>-0,069</b>	<b>-0,366</b>	<b>0,207</b>	<b>-0,285</b>	<b>0,102</b>	<b>0,205</b>	<b>-0,401</b>
	0,015	0,597	0,776	0,199	0,537	0,575	0,522	0,091	0,028	0,689	0,028	0,226	0,092	0,554	0,231	0,015

KRATICE:  $r$  = Pearsonov koeficijent korelacije;  $p$  = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

Za varijablu udjela ukupnih lipida prema istraživanim obilježjima sezone nije utvrđena statistička značajnost. Za varijablu udjela ukupnih proteina utvrđena je pozitivna korelacija s temperaturom mora ( $r = 0,628$ ;  $P < 0,001$ ), koncentracijom amonijaka ( $r = 0,415$ ;  $P = 0,01$ ) i komponentom 4 ( $r = 0,492$ ;  $p = 0,002$ ), a negativna povezanost sa salinitetom mora ( $r = -0,494$ ;  $p = 0,002$ ), koncentracijom nitrita ( $r = -0,437$ ;  $p = 0,008$ ) i komponentom 2 ( $r = -0,366$ ;  $p = 0,028$ ).

Za varijablu udjela glikogena u tkivu kamenica utvrđena je pozitivna korelacija s koncentracijom POM ( $r = 0,367$ ;  $p = 0,0028$ ) te negativna korelacija s koncentracijama fosfata ( $r = -0,402$ ;  $p = 0,0028$ ) i sulfata ( $r = -0,366$ ;  $p = 0,0015$ ) te komponentom 4 ( $r = -0,401$ ;  $p = 0,0015$ ) (Tablica 3.14).

### 3.5.2. PCA analiza masnokiselinskog sastava ukupnih lipida tkiva kamenica

U Tablici 3.15 prikazana je povezanost relativnog masenog udjela pojedinih masnih kiselina ukupnih lipida kamenica s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one masne kiseline koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.15 Povezanost relativnog masenog udjela (%) pojedinih masnih kiselina ukupnih lipida s komponentama okolišnih čimbenika

r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	pH	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
C 18:1cn-9	<b>0,346</b> 0,018	<b>0,301</b> 0,042	<b>0,269</b> 0,071	<b>0,007</b> 0,963	<b>0,135</b> 0,369	<b>-0,166</b> 0,271	<b>0,141</b> 0,351	<b>0,106</b> 0,485	<b>0,185</b> 0,218	<b>0,301</b> 0,042	<b>0,180</b> 0,232	<b>-0,234</b> 0,118	<b>0,262</b> 0,079	<b>0,102</b> 0,500	<b>0,164</b> 0,277	<b>0,358</b> 0,015
C 18:1tn-7	<b>0,187</b> 0,214	<b>0,027</b> 0,856	<b>0,036</b> 0,815	<b>0,025</b> 0,870	<b>0,081</b> 0,592	<b>0,045</b> 0,767	<b>-0,222</b> 0,138	<b>0,379</b> 0,009	<b>-0,004</b> 0,978	<b>0,249</b> 0,095	<b>0,346</b> 0,018	<b>-0,335</b> 0,023	<b>0,167</b> 0,266	<b>-0,185</b> 0,218	<b>0,003</b> 0,984	<b>0,453</b> 0,002
C 18:2cn-6	<b>0,110</b> 0,465	<b>0,152</b> 0,314	<b>0,088</b> 0,560	<b>-0,198</b> 0,186	<b>0,030</b> 0,844	<b>-0,047</b> 0,757	<b>0,043</b> 0,778	<b>0,225</b> 0,132	<b>0,161</b> 0,284	<b>0,103</b> 0,496	<b>0,260</b> 0,081	<b>-0,206</b> 0,170	<b>0,064</b> 0,673	<b>0,044</b> 0,773	<b>0,083</b> 0,582	<b>0,346</b> 0,019
C 18:3n-3	<b>0,232</b> 0,121	<b>0,330</b> 0,025	<b>0,314</b> 0,034	<b>0,105</b> 0,489	<b>0,079</b> 0,600	<b>-0,401</b> 0,006	<b>0,446</b> 0,002	<b>-0,449</b> 0,002	<b>0,222</b> 0,138	<b>0,201</b> 0,181	<b>-0,095</b> 0,529	<b>0,161</b> 0,286	<b>0,142</b> 0,347	<b>0,427</b> 0,003	<b>0,230</b> 0,125	<b>-0,064</b> 0,674
C 18:4n-3**	<b>0,217</b> 0,148	<b>0,288</b> 0,052	<b>0,305</b> 0,039	<b>0,172</b> 0,253	<b>0,141</b> 0,349	<b>-0,340</b> 0,021	<b>0,380</b> 0,009	<b>-0,480</b> 0,001	<b>0,145</b> 0,335	<b>0,132</b> 0,380	<b>-0,319</b> 0,031	<b>0,312</b> 0,035	<b>0,169</b> 0,262	<b>0,358</b> 0,014	<b>0,158</b> 0,293	<b>-0,280</b> 0,060
C 20:1n-9**	<b>0,052</b> 0,731	<b>-0,115</b> 0,448	<b>-0,152</b> 0,314	<b>-0,260</b> 0,081	<b>-0,234</b> 0,118	<b>0,249</b> 0,095	<b>-0,042</b> 0,779	<b>0,373</b> 0,011	<b>-0,071</b> 0,640	<b>0,003</b> 0,985	<b>0,273</b> 0,067	<b>-0,430</b> 0,003	<b>-0,097</b> 0,523	<b>-0,186</b> 0,215	<b>-0,008</b> 0,958	<b>0,396</b> 0,006
C 20:2n-6	<b>0,002</b> 0,987	<b>0,044</b> 0,774	<b>0,047</b> 0,756	<b>-0,131</b> 0,386	<b>0,037</b> 0,809	<b>-0,023</b> 0,881	<b>-0,070</b> 0,646	<b>0,259</b> 0,082	<b>-0,008</b> 0,956	<b>0,142</b> 0,347	<b>0,277</b> 0,063	<b>-0,169</b> 0,260	<b>0,044</b> 0,770	<b>-0,024</b> 0,873	<b>-0,017</b> 0,911	<b>0,332</b> 0,024
C 20:4n-6**	<b>-0,031</b> 0,838	<b>-0,158</b> 0,294	<b>-0,212</b> 0,157	<b>-0,354</b> 0,016	<b>-0,295</b> 0,046	<b>0,090</b> 0,554	<b>0,089</b> 0,555	<b>0,200</b> 0,183	<b>-0,008</b> 0,955	<b>0,080</b> 0,598	<b>0,458</b> 0,001	<b>-0,289</b> 0,052	<b>-0,241</b> 0,106	<b>0,010</b> 0,949	<b>0,088</b> 0,563	<b>0,437</b> 0,002
C 22:0	<b>-0,252</b> 0,092	<b>-0,376</b> 0,010	<b>-0,321</b> 0,030	<b>-0,065</b> 0,669	<b>-0,053</b> 0,725	<b>0,217</b> 0,148	<b>-0,537</b> <0,001	<b>0,352</b> 0,016	<b>-0,283</b> 0,056	<b>-0,017</b> 0,911	<b>-0,021</b> 0,887	<b>-0,180</b> 0,231	<b>-0,155</b> 0,305	<b>-0,409</b> 0,005	<b>-0,202</b> 0,179	<b>0,038</b> 0,804
C 22:3n-3	<b>0,313</b> 0,034	<b>0,190</b> 0,205	<b>0,227</b> 0,129	<b>0,485</b> 0,001	<b>0,339</b> 0,021	<b>0,121</b> 0,425	<b>-0,156</b> 0,300	<b>0,164</b> 0,276	<b>0,022</b> 0,886	<b>-0,078</b> 0,606	<b>0,024</b> 0,875	<b>-0,039</b> 0,795	<b>0,440</b> 0,002	<b>-0,195</b> 0,193	<b>-0,124</b> 0,411	<b>0,006</b> 0,969
C 22:5n-6**	<b>-0,060</b> 0,694	<b>0,184</b> 0,222	<b>0,231</b> 0,122	<b>-0,120</b> 0,429	<b>-0,064</b> 0,672	<b>-0,288</b> 0,053	<b>0,186</b> 0,217	<b>0,022</b> 0,883	<b>-0,064</b> 0,671	<b>-0,295</b> 0,047	<b>0,062</b> 0,684	<b>0,154</b> 0,308	<b>0,060</b> 0,693	<b>0,298</b> 0,044	<b>-0,260</b> 0,081	<b>0,074</b> 0,624

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar); DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)  
 Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )  
 Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )  
 Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )  
 Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )



U Tablici 3.16 prikazana je povezanost suma pojedinih skupina masnih kiselina u ukupnim lipidima kamenica i masnokiselinskih indeksa s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one skupine masnih kiselina i omjeri koji su se pokazali statistički značajno različiti s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.16 Povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinskih indeksa u ukupnim lipidima s komponentama okolišnih čimbenika

r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	pH	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
$\Sigma$ MUFA	<b>0,233</b>	<b>0,195</b>	<b>0,203</b>	<b>0,056</b>	<b>0,100</b>	<b>-0,055</b>	<b>0,032</b>	<b>0,184</b>	<b>0,061</b>	<b>0,162</b>	<b>0,228</b>	<b>-0,162</b>	<b>0,229</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,314</b>
	0,118	0,194	0,176	0,712	0,508	0,717	0,835	0,220	0,687	0,281	0,127	0,283	0,126	0,912	0,912	0,034
n-3/n-6	<b>0,066</b>	<b>0,072</b>	<b>0,084</b>	<b>0,091</b>	<b>0,026</b>	<b>-0,116</b>	<b>0,153</b>	<b>-0,364</b>	<b>0,075</b>	<b>0,174</b>	<b>-0,331</b>	<b>0,300</b>	<b>0,008</b>	<b>0,146</b>	<b>0,157</b>	<b>-0,324</b>
	0,668	0,639	0,584	0,551	0,866	0,447	0,317	0,014	0,625	0,252	0,026	0,045	0,959	0,337	0,303	0,030
ARA/EPA**	<b>-0,018</b>	<b>-0,143</b>	<b>-0,172</b>	<b>-0,209</b>	<b>-0,309</b>	<b>0,174</b>	<b>0,001</b>	<b>0,321</b>	<b>-0,076</b>	<b>-0,109</b>	<b>0,514</b>	<b>-0,356</b>	<b>-0,146</b>	<b>-0,080</b>	<b>-0,074</b>	<b>0,469</b>
	0,906	0,344	0,253	0,164	0,037	0,246	0,993	0,030	0,614	0,473	<0,001	0,015	0,333	0,595	0,626	0,001
ARA/DHA	<b>0,052</b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,044</b>	<b>-0,150</b>	<b>-0,168</b>	<b>0,021</b>	<b>0,123</b>	<b>0,165</b>	<b>0,042</b>	<b>0,058</b>	<b>0,503</b>	<b>-0,282</b>	<b>-0,066</b>	<b>0,057</b>	<b>0,060</b>	<b>0,452</b>
	0,732	0,976	0,770	0,319	0,265	0,890	0,415	0,274	0,779	0,701	<0,001	0,057	0,661	0,705	0,694	0,002
20:1/18:1n-9**	<b>-0,191</b>	<b>-0,309</b>	<b>-0,316</b>	<b>-0,263</b>	<b>-0,323</b>	<b>0,322</b>	<b>-0,147</b>	<b>0,261</b>	<b>-0,207</b>	<b>-0,229</b>	<b>0,023</b>	<b>-0,232</b>	<b>-0,270</b>	<b>-0,244</b>	<b>-0,140</b>	<b>0,067</b>
	0,204	0,037	0,032	0,078	0,029	0,029	0,330	0,080	0,167	0,126	0,880	0,121	0,070	0,102	0,354	0,658
16:0/14:0**	<b>0,116</b>	<b>0,191</b>	<b>0,126</b>	<b>-0,006</b>	<b>0,005</b>	<b>-0,246</b>	<b>,370</b>	<b>-0,317</b>	<b>0,187</b>	<b>-0,057</b>	<b>-0,083</b>	<b>-0,066</b>	<b>0,011</b>	<b>0,285</b>	<b>0,167</b>	<b>-0,043</b>
	0,441	0,205	0,405	0,970	0,976	0,099	0,011	0,032	0,214	0,707	0,583	0,663	0,943	0,055	0,268	0,776
20:3/18:3n-3**	<b>0,060</b>	<b>-0,096</b>	<b>-0,082</b>	<b>-0,043</b>	<b>0,010</b>	<b>0,275</b>	<b>-0,290</b>	<b>0,430</b>	<b>-0,122</b>	<b>-0,113</b>	<b>0,043</b>	<b>-0,174</b>	<b>0,079</b>	<b>-0,316</b>	<b>-0,177</b>	<b>0,138</b>
	0,692	0,524	0,589	0,778	0,948	0,064	0,051	0,003	0,421	0,455	0,774	0,247	0,604	0,032	0,239	0,360

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

### 3.5.3. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije triacilglicerola tkiva kamenica

U Tablici 3.17 prikazana je povezanost relativnog masenog udjela pojedinih masnih kiselina triacilglicerolne frakcije lipida s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one masne kiseline koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).



U Tablici 3.18 prikazana je povezanost suma pojedinih skupina masnih kiselina triaciglicerolne frakcije lipida i masnokiselinskih indeksa s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one skupine masnih kiselina i omjeri koji su se pokazali statistički značajno različiti s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.18** Povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinskih indeksa lipidne frakcije triacilglicerola s komponentama okolišnih čimbenika

r p	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	pH	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
$\Sigma$ n-9**	<b>-0,074</b> 0,622	<b>-0,130</b> 0,383	<b>-0,224</b> 0,130	<b>-0,220</b> 0,137	<b>-0,369</b> <b>0,011</b>	<b>0,135</b> 0,365	<b>0,023</b> 0,876	<b>0,194</b> 0,190	<b>0,085</b> 0,569	<b>-0,056</b> 0,709	<b>0,267</b> 0,070	<b>-0,207</b> 0,163	<b>-0,239</b> 0,106	<b>-0,034</b> 0,823	<b>0,084</b> 0,575	<b>0,252</b> 0,087
$\Sigma$ MUFA**	<b>-0,126</b> 0,399	<b>-0,120</b> 0,422	<b>-0,204</b> 0,168	<b>-0,315</b> <b>0,031</b>	<b>-0,441</b> <b>0,002</b>	<b>0,051</b> 0,732	<b>0,038</b> 0,801	<b>0,214</b> 0,148	<b>0,060</b> 0,687	<b>-0,135</b> 0,366	<b>0,304</b> <b>0,038</b>	<b>-0,204</b> 0,168	<b>-0,276</b> 0,060	<b>0,038</b> 0,799	<b>0,009</b> 0,951	<b>0,302</b> <b>0,039</b>
ARA/EPA	<b>-0,058</b> 0,701	<b>-0,160</b> 0,282	<b>-0,156</b> 0,294	<b>-0,279</b> 0,058	<b>-0,124</b> 0,408	<b>-0,115</b> 0,440	<b>0,040</b> 0,791	<b>0,035</b> 0,814	<b>-0,055</b> 0,714	<b>0,075</b> 0,617	<b>0,477</b> <b>0,001</b>	<b>-0,204</b> 0,168	<b>-0,195</b> 0,189	<b>0,101</b> 0,499	<b>0,015</b> 0,921	<b>0,385</b> <b>0,007</b>
ARA/DHA**	<b>-0,060</b> 0,688	<b>-0,196</b> 0,188	<b>-0,208</b> 0,161	<b>-0,320</b> <b>0,028</b>	<b>-0,181</b> 0,225	<b>-0,085</b> 0,570	<b>0,064</b> 0,668	<b>0,034</b> 0,821	<b>-0,048</b> 0,748	<b>0,053</b> 0,723	<b>0,478</b> <b>0,001</b>	<b>-0,224</b> 0,129	<b>-0,245</b> 0,097	<b>0,096</b> 0,521	<b>0,037</b> 0,805	<b>0,386</b> <b>0,007</b>
20:1/18:1n-9	<b>-0,056</b> 0,709	<b>-0,023</b> 0,878	<b>0,027</b> 0,856	<b>0,039</b> 0,793	<b>0,111</b> 0,458	<b>-0,082</b> 0,584	<b>0,137</b> 0,357	<b>-0,220</b> 0,137	<b>-0,048</b> 0,751	<b>-0,039</b> 0,795	<b>0,061</b> 0,682	<b>0,317</b> <b>0,030</b>	<b>-0,022</b> 0,882	<b>0,163</b> 0,275	<b>-0,032</b> 0,831	<b>-0,137</b> 0,360
16:0/14:0**	<b>-0,088</b> 0,556	<b>0,119</b> 0,424	<b>-0,004</b> 0,978	<b>-0,198</b> 0,183	<b>-0,137</b> 0,357	<b>-0,115</b> 0,443	<b>0,425</b> <b>0,003</b>	<b>-0,411</b> <b>0,004</b>	<b>0,320</b> <b>0,028</b>	<b>-0,082</b> 0,585	<b>0,085</b> 0,568	<b>0,093</b> 0,533	<b>-0,215</b> 0,148	<b>0,348</b> <b>0,017</b>	<b>0,273</b> 0,064	<b>-0,082</b> 0,584
18:0/16:0**	<b>-0,202</b> 0,174	<b>-0,114</b> 0,446	<b>-0,114</b> 0,446	<b>-0,463</b> <b>0,001</b>	<b>-0,132</b> 0,376	<b>-0,035</b> 0,815	<b>-0,045</b> 0,764	<b>0,100</b> 0,505	<b>-0,073</b> 0,625	<b>-0,181</b> 0,222	<b>0,323</b> <b>0,027</b>	<b>-0,196</b> 0,187	<b>-0,218</b> 0,141	<b>0,060</b> 0,689	<b>-0,149</b> 0,319	<b>0,270</b> 0,066
20:6/18:3n-3	<b>0,006</b> 0,968	<b>-0,143</b> 0,338	<b>-0,057</b> 0,705	<b>0,232</b> 0,116	<b>0,229</b> 0,122	<b>0,211</b> 0,154	<b>-0,380</b> <b>0,008</b>	<b>0,270</b> 0,066	<b>-0,237</b> 0,109	<b>-0,123</b> 0,411	<b>-0,130</b> 0,385	<b>0,012</b> 0,938	<b>0,164</b> 0,271	<b>-0,347</b> <b>0,017</b>	<b>-0,253</b> 0,087	<b>-0,114</b> 0,444
UI n-3	<b>0,145</b> 0,330	<b>0,114</b> 0,446	<b>0,117</b> 0,435	<b>0,143</b> 0,338	<b>0,202</b> 0,173	<b>0,034</b> 0,818	<b>-0,086</b> 0,567	<b>-0,122</b> 0,416	<b>0,078</b> 0,603	<b>0,181</b> 0,224	<b>-0,393</b> <b>0,006</b>	<b>0,070</b> 0,639	<b>0,166</b> 0,266	<b>-0,104</b> 0,487	<b>0,111</b> 0,458	<b>-0,263</b> 0,075
UI n-6	<b>-0,052</b> 0,731	<b>-0,143</b> 0,342	<b>-0,134</b> 0,373	<b>-0,216</b> 0,149	<b>0,051</b> 0,739	<b>0,171</b> 0,256	<b>-0,221</b> 0,139	<b>0,245</b> 0,101	<b>-0,087</b> 0,565	<b>-0,035</b> 0,819	<b>0,297</b> <b>0,045</b>	<b>-0,261</b> 0,080	<b>-0,054</b> 0,720	<b>-0,192</b> 0,201	<b>-0,100</b> 0,509	<b>0,259</b> 0,082
U/S**	<b>-0,217</b> 0,144	<b>-0,289</b> <b>0,048</b>	<b>-0,329</b> <b>0,024</b>	<b>-0,423</b> <b>0,003</b>	<b>-0,451</b> <b>0,001</b>	<b>0,097</b> 0,517	<b>-0,236</b> 0,110	<b>0,354</b> <b>0,015</b>	<b>-0,101</b> 0,498	<b>-0,039</b> 0,795	<b>0,257</b> 0,081	<b>-0,314</b> <b>0,032</b>	<b>-0,343</b> <b>0,018</b>	<b>-0,142</b> 0,341	<b>-0,077</b> 0,605	<b>0,343</b> <b>0,018</b>

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

### 3.5.4. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije fosfolipida tkiva kamenica

U Tablici 3.19 prikazana je povezanost relativnog masenog udjela pojedinih masnih kiselina fosfolipidne frakcije lipida s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one masne kiseline koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.19 Povezanost relativnog masenog udjela (%) pojedinih masnih kiselina lipidne frakcije fosfolipida s komponentama okolišnih čimbenika

r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	pH	DO %	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
C 14:0**	<b>-0,075</b>	<b>-0,073</b>	<b>-0,122</b>	<b>-0,022</b>	<b>0,113</b>	<b>0,329</b>	<b>-0,146</b>	<b>0,108</b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,409</b>	<b>-0,181</b>	<b>-0,113</b>	<b>-0,007</b>	<b>-0,265</b>	<b>-0,124</b>	<b>-0,203</b>
	0,628	0,640	0,431	0,887	0,464	0,029	0,345	0,487	0,973	0,006	0,239	0,464	0,962	0,082	0,422	0,187
C 15:1**	<b>0,224</b>	<b>0,118</b>	<b>0,088</b>	<b>0,165</b>	<b>0,389</b>	<b>0,391</b>	<b>0,092</b>	<b>-0,004</b>	<b>0,055</b>	<b>-0,177</b>	<b>-0,121</b>	<b>-0,094</b>	<b>0,249</b>	<b>-0,219</b>	<b>0,031</b>	<b>-0,167</b>
	0,144	0,444	0,572	0,284	0,009	0,009	0,552	0,981	0,723	0,250	0,436	0,544	0,103	0,154	0,844	0,278
C 16:0	<b>0,076</b>	<b>0,117</b>	<b>0,034</b>	<b>0,123</b>	<b>0,114</b>	<b>0,318</b>	<b>0,114</b>	<b>-0,056</b>	<b>0,140</b>	<b>-0,211</b>	<b>-0,295</b>	<b>-0,046</b>	<b>0,093</b>	<b>-0,145</b>	<b>0,094</b>	<b>-0,275</b>
	0,626	0,451	0,829	0,427	0,461	0,036	0,459	0,717	0,365	0,170	0,052	0,769	0,548	0,348	0,543	0,071
C 17:0**	<b>-0,085</b>	<b>0,216</b>	<b>0,136</b>	<b>-0,155</b>	<b>-0,127</b>	<b>-0,133</b>	<b>0,127</b>	<b>-0,011</b>	<b>0,193</b>	<b>-0,316</b>	<b>0,009</b>	<b>-0,082</b>	<b>-0,019</b>	<b>0,189</b>	<b>-0,057</b>	<b>0,038</b>
	0,581	0,159	0,377	0,314	0,413	0,388	0,411	0,943	0,209	0,037	0,952	0,597	0,903	0,218	0,713	0,807
C 17:1n-7**	<b>0,319</b>	<b>0,342</b>	<b>0,237</b>	<b>0,134</b>	<b>0,166</b>	<b>0,036</b>	<b>0,264</b>	<b>-0,142</b>	<b>0,292</b>	<b>0,087</b>	<b>-0,194</b>	<b>-0,248</b>	<b>0,242</b>	<b>0,033</b>	<b>0,274</b>	<b>-0,034</b>
	0,035	0,023	0,122	0,384	0,281	0,819	0,083	0,359	0,054	0,572	0,208	0,105	0,113	0,833	0,072	0,829
C 18:0	<b>-0,259</b>	<b>-0,040</b>	<b>-0,074</b>	<b>0,030</b>	<b>-0,056</b>	<b>0,024</b>	<b>0,125</b>	<b>-0,228</b>	<b>0,031</b>	<b>-0,219</b>	<b>-0,178</b>	<b>0,189</b>	<b>-0,165</b>	<b>0,095</b>	<b>0,013</b>	<b>-0,298</b>
	0,090	0,798	0,632	0,849	0,720	0,878	0,418	0,136	0,844	0,153	0,248	0,219	0,284	0,539	0,932	0,049
C 18:1n-7**	<b>0,012</b>	<b>-0,149</b>	<b>-0,011</b>	<b>0,082</b>	<b>0,110</b>	<b>0,000</b>	<b>-0,332</b>	<b>0,276</b>	<b>-0,307</b>	<b>0,303</b>	<b>0,111</b>	<b>-0,063</b>	<b>0,11</b>	<b>-0,214</b>	<b>-0,167</b>	<b>0,196</b>
	0,939	0,333	0,944	0,599	0,477	0,998	0,028	0,070	0,043	0,046	0,473	0,685	0,477	0,163	0,279	0,202
C 18:2cn-6**	<b>0,229</b>	<b>0,103</b>	<b>0,088</b>	<b>0,172</b>	<b>0,009</b>	<b>0,166</b>	<b>0,186</b>	<b>-0,070</b>	<b>0,073</b>	<b>0,377</b>	<b>-0,143</b>	<b>0,018</b>	<b>0,118</b>	<b>-0,048</b>	<b>0,276</b>	<b>-0,054</b>
	0,135	0,505	0,571	0,263	0,954	0,282	0,226	0,650	0,640	0,012	0,356	0,907	0,445	0,759	0,070	0,726
C 22:6n-3	<b>0,167</b>	<b>-0,033</b>	<b>0,063</b>	<b>0,077</b>	<b>0,009</b>	<b>-0,058</b>	<b>-0,059</b>	<b>0,105</b>	<b>-0,145</b>	<b>0,329</b>	<b>0,081</b>	<b>0,097</b>	<b>0,112</b>	<b>-0,020</b>	<b>-0,014</b>	<b>0,138</b>
	0,278	0,832	0,686	0,618	0,955	0,707	0,702	0,498	0,347	0,029	0,599	0,533	0,47	0,897	0,926	0,371

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )



U Tablici 3.20 prikazana je povezanost suma pojedinih skupina masnih kiselina u fosfolipidnoj frakciji lipida i masnokiselinskih indeksa s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one skupine masnih kiselina i omjeri koji su se pokazali statistički značajno različiti s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).

Tablica 3.20 Povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinskih indeksa lipidne frakcije fosfolipida s komponentama okolišnih čimbenika

r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	pH	DO %	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
$\Sigma$ n-3**	<b>0,245</b> 0,109	<b>-0,074</b> 0,633	<b>-0,012</b> 0,936	<b>0,103</b> 0,504	<b>0,004</b> 0,980	<b>0,056</b> 0,718	<b>-0,123</b> 0,428	<b>0,192</b> 0,212	<b>-0,093</b> 0,550	<b>0,382</b> <b>0,010</b>	<b>0,145</b> 0,349	<b>-0,014</b> 0,926	<b>0,117</b> 0,448	<b>-0,136</b> 0,378	<b>0,061</b> 0,695	<b>0,207</b> 0,179
$\Sigma$ n-6	<b>-0,139</b> 0,368	<b>-0,174</b> 0,259	<b>-0,266</b> 0,081	<b>-0,173</b> 0,261	<b>0,060</b> 0,701	<b>0,401</b> <b>0,007</b>	<b>0,103</b> 0,507	<b>-0,211</b> 0,170	<b>0,073</b> 0,636	<b>-0,049</b> 0,750	<b>-0,085</b> 0,581	<b>-0,085</b> 0,584	<b>-0,239</b> 0,118	<b>-0,158</b> 0,305	<b>0,224</b> 0,143	<b>-0,223</b> 0,146
$\Sigma$ MUFA**	<b>0,122</b> 0,430	<b>-0,106</b> 0,492	<b>-0,024</b> 0,879	<b>0,083</b> 0,592	<b>0,204</b> 0,184	<b>0,165</b> 0,285	<b>-0,269</b> 0,078	<b>0,221</b> 0,150	<b>-0,225</b> 0,141	<b>0,289</b> 0,057	<b>-0,042</b> 0,788	<b>-0,217</b> 0,158	<b>0,152</b> 0,324	<b>-0,321</b> <b>0,034</b>	<b>-0,046</b> 0,765	<b>0,106</b> 0,492
$\Sigma$ PUFA**	<b>0,256</b> 0,093	<b>-0,078</b> 0,616	<b>-0,017</b> 0,912	<b>0,091</b> 0,556	<b>-0,007</b> 0,966	<b>0,061</b> 0,693	<b>-0,102</b> 0,511	<b>0,189</b> 0,219	<b>-0,096</b> 0,537	<b>0,390</b> <b>0,009</b>	<b>0,155</b> 0,316	<b>-0,023</b> 0,883	<b>0,111</b> 0,472	<b>-0,130</b> 0,398	<b>0,070</b> 0,653	<b>0,218</b> 0,155
$\Sigma$ SFA	<b>-0,094</b> 0,545	<b>0,072</b> 0,643	<b>-0,008</b> 0,959	<b>0,038</b> 0,805	<b>0,032</b> 0,838	<b>0,204</b> 0,185	<b>0,104</b> 0,502	<b>-0,099</b> 0,522	<b>0,119</b> 0,441	<b>-0,329</b> <b>0,029</b>	<b>-0,249</b> 0,103	<b>0,013</b> 0,931	<b>-0,023</b> 0,884	<b>-0,048</b> 0,758	<b>0,018</b> 0,908	<b>-0,284</b> 0,062
16:0/14:0**	<b>0,372</b> <b>0,014</b>	<b>0,399</b> <b>0,008</b>	<b>0,355</b> <b>0,019</b>	<b>0,234</b> 0,130	<b>0,012</b> 0,941	<b>-0,146</b> 0,352	<b>0,378</b> <b>0,013</b>	<b>-0,232</b> 0,134	<b>0,280</b> 0,069	<b>0,466</b> <b>0,002</b>	<b>-0,201</b> 0,195	<b>0,106</b> 0,498	<b>0,257</b> 0,096	<b>0,226</b> 0,145	<b>0,371</b> <b>0,014</b>	<b>-0,042</b> 0,788
UI n-3**	<b>0,245</b> 0,109	<b>-0,074</b> 0,633	<b>-0,012</b> 0,936	<b>0,103</b> 0,504	<b>0,004</b> 0,980	<b>0,056</b> 0,718	<b>-0,123</b> 0,428	<b>0,192</b> 0,212	<b>-0,093</b> 0,550	<b>0,382</b> <b>0,010</b>	<b>0,145</b> 0,349	<b>-0,014</b> 0,926	<b>0,117</b> 0,448	<b>-0,136</b> 0,378	<b>0,061</b> 0,695	<b>0,207</b> 0,179
UI n-6	<b>-0,139</b> 0,368	<b>-0,174</b> 0,259	<b>-0,266</b> 0,081	<b>-0,173</b> 0,261	<b>0,060</b> 0,701	<b>0,401</b> <b>0,007</b>	<b>0,103</b> 0,507	<b>-0,211</b> 0,170	<b>0,073</b> 0,636	<b>-0,049</b> 0,750	<b>-0,085</b> 0,581	<b>-0,085</b> 0,584	<b>-0,239</b> 0,118	<b>-0,158</b> 0,305	<b>0,224</b> 0,143	<b>-0,223</b> 0,146
U/S**	<b>0,182</b> 0,238	<b>-0,149</b> 0,334	<b>-0,034</b> 0,828	<b>0,046</b> 0,769	<b>0,166</b> 0,281	<b>0,083</b> 0,592	<b>-0,262</b> 0,086	<b>0,251</b> 0,100	<b>-0,276</b> 0,069	<b>0,430</b> <b>0,004</b>	<b>0,114</b> 0,461	<b>-0,223</b> 0,146	<b>0,143</b> 0,354	<b>-0,274</b> 0,071	<b>-0,038</b> 0,805	<b>0,257</b> 0,092

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

### 3.5.5. PCA analiza masnokiselinskog sastava frakcije slobodnih masnih kiselina tkiva kamenica

U Tablici 3.21 prikazana je povezanost relativnog masenog udjela pojedinih ne-esterificiranih masnih kiselina u tkivu kamenica s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one masne kiseline koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesece.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ )



r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	TPM (g/L)	PIM (g/L)	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	pH	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
C 22:0	<b>-0,041</b> 0,781	<b>-0,142</b> 0,336	<b>-0,157</b> 0,288	<b>0,017</b> 0,908	<b>0,154</b> 0,295	<b>0,363</b> <b>0,011</b>	<b>-0,066</b> 0,655	<b>-0,032</b> 0,828	<b>-0,048</b> 0,748	<b>-0,021</b> 0,886	<b>-0,129</b> 0,384	<b>0,001</b> 0,993	<b>-0,043</b> 0,773	<b>-0,241</b> 0,099	<b>0,062</b> 0,677	<b>-0,214</b> 0,143
C 22:1n-9/n-7	<b>-0,084</b> 0,572	<b>-0,101</b> 0,495	<b>-0,142</b> 0,335	<b>-0,044</b> 0,768	<b>0,114</b> 0,441	<b>0,295</b> <b>0,042</b>	<b>0,046</b> 0,758	<b>-0,128</b> 0,387	<b>0,013</b> 0,928	<b>-0,022</b> 0,881	<b>-0,093</b> 0,530	<b>-0,049</b> 0,742	<b>-0,097</b> 0,511	<b>-0,141</b> 0,338	<b>0,125</b> 0,399	<b>-0,187</b> 0,203
NMID 1	<b>-0,094</b> 0,523	<b>-0,168</b> 0,254	<b>-0,222</b> 0,130	<b>-0,053</b> 0,721	<b>0,134</b> 0,365	<b>0,344</b> <b>0,017</b>	<b>0,065</b> 0,661	<b>-0,229</b> 0,118	<b>0,034</b> 0,816	<b>0,057</b> 0,699	<b>-0,115</b> 0,437	<b>-0,023</b> 0,879	<b>-0,162</b> 0,271	<b>-0,161</b> 0,276	<b>0,223</b> 0,127	<b>-0,254</b> 0,081
NMID 2	<b>-0,048</b> 0,746	<b>-0,253</b> 0,082	<b>-0,220</b> 0,132	<b>-0,197</b> 0,180	<b>-0,011</b> 0,943	<b>0,049</b> 0,739	<b>0,058</b> 0,695	<b>-0,022</b> 0,880	<b>-0,170</b> 0,248	<b>-0,004</b> 0,978	<b>0,324</b> <b>0,025</b>	<b>-0,135</b> 0,359	<b>-0,184</b> 0,211	<b>-0,005</b> 0,972	<b>-0,016</b> 0,914	<b>0,192</b> 0,190
C 22:5n-3	<b>-0,073</b> 0,620	<b>-0,148</b> 0,314	<b>-0,192</b> 0,190	<b>-0,089</b> 0,549	<b>0,109</b> 0,461	<b>0,322</b> <b>0,026</b>	<b>0,006</b> 0,967	<b>-0,104</b> 0,480	<b>0,011</b> 0,942	<b>-0,012</b> 0,937	<b>-0,045</b> 0,762	<b>-0,063</b> 0,671	<b>-0,125</b> 0,397	<b>-0,172</b> 0,242	<b>0,129</b> 0,382	<b>-0,156</b> 0,288

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

U Tablici 3.22 prikazana je povezanost suma pojedinih skupina masnih kiselina i masnokiselinskih indeksa lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one skupine masnih kiselina i omjeri koji su se pokazali statistički značajno različiti s obzirom na mjesec.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).



### 3.6. PCA analiza (anti) oksidativnog statusa tkiva kamenica

U Tablici 3.23 prikazana je povezanost (anti) oksidativnog statusa europske plosnate kamenice s obilježjima sezone. Obilježja sezone grupirana su prema PCA analizi u 4 glavne komponente. U tablici su uz svaku varijablu navedeni i Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) i razina statističke značajnosti ( $p$ ), odnosno vjerojatnost pogreške tipa I ( $\alpha$ ).

Oznakom \*\* označene su one varijable koje su se pokazale statistički značajno različite s obzirom na mjesec.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na komponente okolišnih čimbenika ( $p < 0,05$ ).



Tablica 3.23 Povezanost obilježja antioksidativnog sastava s obilježjima sezone

r	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	PIM (g/L)	TPM (g/L)	pH	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	DO (%)	S (psu)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Komponenta I	Komponenta II	Komponenta III	Komponenta IV
SOD (U/mg proteina)*	<b>-0,024</b> 0,888	<b>0,310</b> 0,066	<b>0,212</b> 0,214	<b>0,099</b> 0,564	<b>0,027</b> 0,875	<b>-0,257</b> 0,131	<b>0,156</b> 0,363	<b>-0,227</b> 0,183	<b>-0,044</b> 0,800	<b>-0,195</b> 0,254	<b>-0,239</b> 0,161	<b>0,594</b> <0,001	<b>0,138</b> 0,423	<b>0,310</b> 0,065	<b>-0,227</b> 0,184	<b>-0,317</b> 0,060
GR (U/mg proteina)*	<b>-0,064</b> 0,709	<b>0,186</b> 0,277	<b>0,096</b> 0,579	<b>0,183</b> 0,284	<b>0,074</b> 0,670	<b>-0,112</b> 0,517	<b>-0,029</b> 0,869	<b>-0,163</b> 0,342	<b>-0,051</b> 0,767	<b>-0,067</b> 0,699	<b>-0,180</b> 0,294	<b>0,543</b> 0,001	<b>0,112</b> 0,517	<b>0,133</b> 0,438	<b>-0,168</b> 0,328	<b>-0,309</b> 0,066
LP (nmol LOOH/mg lipida)**	<b>-0,556</b> <0,001	<b>-0,419</b> 0,011	<b>-0,479</b> 0,003	<b>-0,189</b> 0,270	<b>-0,323</b> 0,055	<b>-0,034</b> 0,846	<b>-0,527</b> 0,001	<b>0,101</b> 0,558	<b>-0,272</b> 0,108	<b>-0,066</b> 0,701	<b>0,031</b> 0,858	<b>0,096</b> 0,576	<b>-0,432</b> 0,009	<b>-0,165</b> 0,336	<b>-0,232</b> 0,173	<b>-0,065</b> 0,705
MDA (mmol/mg proteina)**	<b>0,069</b> 0,691	<b>0,317</b> 0,060	<b>0,234</b> 0,169	<b>0,304</b> 0,071	<b>0,150</b> 0,383	<b>-0,175</b> 0,306	<b>0,163</b> 0,344	<b>-0,371</b> 0,026	<b>0,015</b> 0,930	<b>-0,161</b> 0,349	<b>-0,411</b> 0,013	<b>0,620</b> <0,001	<b>0,217</b> 0,203	<b>0,236</b> 0,166	<b>-0,128</b> 0,457	<b>-0,507</b> 0,002

KRATICE: r = Pearsonov koeficijent korelacije; p = razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar);

DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Komponenta I = fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), PIM (g/L), TPM (g/L), pH, nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta II = DO (%), S (psu), T ( $^{\circ}\text{C}$ )

Komponenta III = POM (g/L), amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )

Komponenta IV = sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ ), nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )

Za varijablu aktivnosti SOD u tkivu kamenica utvrđena je pozitivna korelacija s koncentracijom nitrita u moru ( $r = 0,594$ ;  $p < 0,001$ ). Za varijablu aktivnosti GR utvrđena je izražena pozitivna korelacija s koncentracijom nitrata u moru ( $r = 0,543$ ;  $p = 0,001$ ). Za varijablu koncentracije lipidnih peroksida u tkivu kamenica utvrđena je negativna korelacija sa salinitetom mora ( $r = -0,527$ ;  $p = 0,001$ ) i koncentracijom fosfata ( $r = -0,556$ ;  $p < 0,001$ ) (Tablica 3.23). Također je statistički značajna razlika na razini  $p = 0,003$ ;  $0,011$  i  $0,009$ , te negativna korelacija utvrđena između količine lipidnih peroksida i koncentracije TPM ( $r = -0,479$ ), PIM ( $r = -0,419$ ) u moru i komponente 1 ( $r = -0,432$ ). Za varijablu koncentracije MDA utvrđena je i negativna korelacija i statistički značajna povezanost s obilježjima sezone i to: temperaturom mora ( $r = -0,371$ ;  $p = 0,026$ ), koncentracijom sulfata ( $r = -0,411$ ;  $p = 0,013$ ) i komponentom 4 ( $r = -0,507$ ;  $p = 0,002$ ), dok je s koncentracijom nitrita utvrđena pozitivna korelacija ( $r = 0,620$ ), a statistička značajnost je bila  $p < 0,001$  (Tablica 3.23).

### 3.7. Obilježja čimbenika okoliša prema godišnjim dobima

U Tablici 3.24 prikazana je povezanost mjerenih čimbenika okoliša u ovisnosti o godišnjim dobima. Korelacijska matrica daje uvid u snagu univarijatne i multivarijatne međusobne povezanosti. U tablici su uz svaku varijablu navedeni: aritmetička sredina (M), standardna devijacija (SD), MANOVA; razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) ( $p$ ), univarijatna (uv) i multivarijatna (mv) analiza, a učinak je prikazan kao standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ) za modele ANOVA. Crvenom bojom naznačene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 3.24** Razlika u obilježjima godišnjeg ciklusa prema godišnjim dobima

	Proljeće		Ljeto		Jesen		Zima		$p_{uv}; \eta^2$	$p_{mv}; \eta^2$
	M	(SD)	M	(SD)	M	(SD)	M	(SD)		
T (°C)	17,7	(3,37)	25,8	(1,54)	19,7	(1,99)	13,4	(0,94)	<0,001; 0,824	<0,001; 0,918
DO (%)	98,3	(6,46)	100,7	(3,45)	88,3	(8,06)	88,7	(0,49)	<0,001; 0,532	
pH	8,1	(0,02)	8,1	(0,19)	8,1	(0,04)	8,1	(0,07)	0,648	
S (psu)	34,2	(3,30)	32,4	(1,58)	36,1	(1,31)	36,0	(0,64)	<0,001; 0,386	
TPM (g/L)	0,005	(0,003)	0,007	(0,004)	0,007	(0,004)	0,008	(0,002)	0,250	
PIM (g/L)	0,003	(0,003)	0,005	(0,003)	0,005	(0,004)	0,005	(0,002)	0,207	
POM (g/L)	0,002	(0,001)	0,002	(0,002)	0,002	(0,000)	0,003	(0,002)	0,213	
Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,41	(0,144)	0,33	(0,296)	0,20	(0,162)	0,24	(0,015)	0,034; 0,177	
Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,67	(1,059)	2,76	(2,087)	0,90	(0,615)	2,67	(1,225)	0,004; 0,258	
Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,15	(0,085)	0,13	(0,026)	0,24	(0,265)	0,93	(0,430)	<0,001; 0,645	
Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,47	(0,470)	0,66	(0,444)	0,55	(0,049)	0,39	(0,188)	0,258	
Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,06	(0,013)	0,07	(0,025)	0,11	(0,033)	0,04	(0,022)	<0,001; 0,528	

KRATICE: M = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija;  $p$  = MANOVA; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); uv = univarijatna analiza; mv = multivarijatna analiza;  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ANOVA testa; PIM (partikularna anorganska tvar); TPM (ukupna partikularna tvar); DO (otopljeni kisik); S (salinitet); T (temperatura); POM (partikularna organska tvar)

Utvrđena je statistički značajna razlika u obilježjima sezone između četiri godišnja doba (MANOVA;  $F(24, 108) = 54,911$ ;  $p < 0,001$ ; Wilk  $\lambda = 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,918$ ).

Univarijatnim analizama utvrđene su statistički značajne razlike u temperaturi mora ( $F(3, 44) = 68,762$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,824$ ), količini otopljenog kisika ( $F(3, 44) = 16,672$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,532$ ), Su ( $F(3, 44) = 9,204$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,386$ ), koncentraciji amonijaka ( $F(3, 44) = 3,153$ ;  $p = 0,034$ ;  $\eta^2 = 0,177$ ), nitrata ( $F(3, 44) = 5,088$ ;  $p = 0,004$ ;  $\eta^2 = 0,258$ ), nitrita ( $F(3, 44) = 26,604$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,645$ ) i sulfata ( $F(3, 44) = 16,434$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,528$ ) (Tablica 3.24).

Nakon Bonferronijeve korekcije razine statističke značajnosti, koja je u ovom slučaju postavljena na  $p = 0,004$ , statistički značajne razlike ostaju u svim parametrima osim u koncentraciji amonijaka i koncentraciji nitrata.

Bonferronijevim *post hoc* testom utvrđena je statistički značajna razlika u temperaturi mora između svih godišnjih doba osim između proljeća i jeseni ( $p < 0,001$ ). Razlika u koncentraciji otopljenog kisika bila je statistički značajna između proljeća i jeseni, proljeća i zime, između ljeta i jeseni te između ljeta i zime ( $p < 0,001$ ), pri čemu je koncentracija kisika bila najveća u ljeto i proljeće, a najmanja u jesen i zimu. Količina otopljenog kisika u moru nije se statistički značajno razlikovala između proljeća i ljeta te između jeseni i zime. Statistički značajna razlika u salinitetu mora utvrđena je između ljeta i jeseni te ljeta i zime ( $p < 0,001$ ), pri čemu je salinitet bio manji ljeti nego u jesen i zimu. Koncentracija nitrita statistički se značajno razlikovala zimi u odnosu na sva ostala godišnja doba ( $p < 0,001$ ), pri čemu je koncentracija zimi bila veća. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji nitrita između drugih godišnjih doba. Koncentracija sulfata u jesen statistički je značajno bila veća od svih drugih godišnjih doba ( $p < 0,001$ ), dok se koncentracija sulfata u proljeće, ljeto i zimu nije statistički značajno razlikovala (Tablica 3.24).

### 3.8. Promjene biokemijskog sastava, masnokiselinskog sastava lipida i lipidnih frakcija i antioksidativnog statusa kamenica prema godišnjim dobima

U ovom djelu obrade u obzir su uzete samo varijable koje su se pokazale statistički značajno povezane s obilježjima sezone, te različite po mjesecima.

Grafikonima su prikazane varijable koje su se pokazale statistički značajno povezane s parametrima sezone, različite po mjesecima, i različite po godišnjim dobima. U svakom je grafikonu prikazana istraživana varijabla i onaj čimbenik okoliša s kojima se ta varijabla pokazala statistički značajno povezanom.

#### 3.8.1. Promjene biokemijskog sastava kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 3.25 prikazana je povezanost biokemijskog sastava tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ). Oznakom \* označeni su oni biokemijski parametri kod kojih je statistička značajnost ostala i nakon Bonferroni korekcije. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

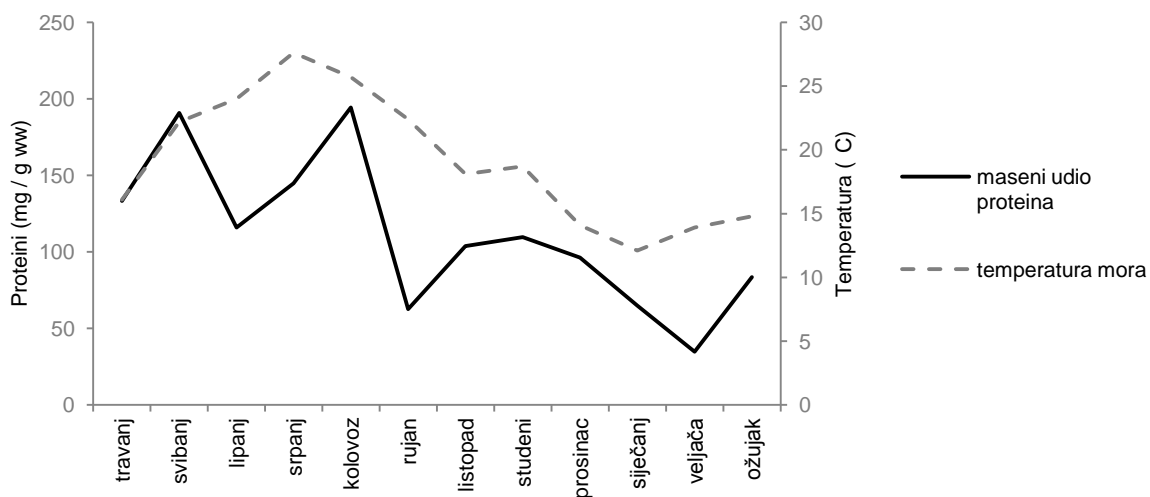
**Tablica 3.25** Razlike biokemijskog sastava europske plosnate kamenice u ovisnosti o godišnjim dobima

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p; \eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
Proteini (mg/g ww)	133,4 (86,3-174,9)	144,7 (117,4-180,4)	103,8 (67,4-112,1)	72,4 (47,8-92,0)	<0,001; -0,64*
Glikogen (mg/g ww)	24,7 (17,5-28,6)	25,2 (12,9-30,7)	15,0 (5,4-21,0)	26 (21,6-39,5)	0,005; -0,76*

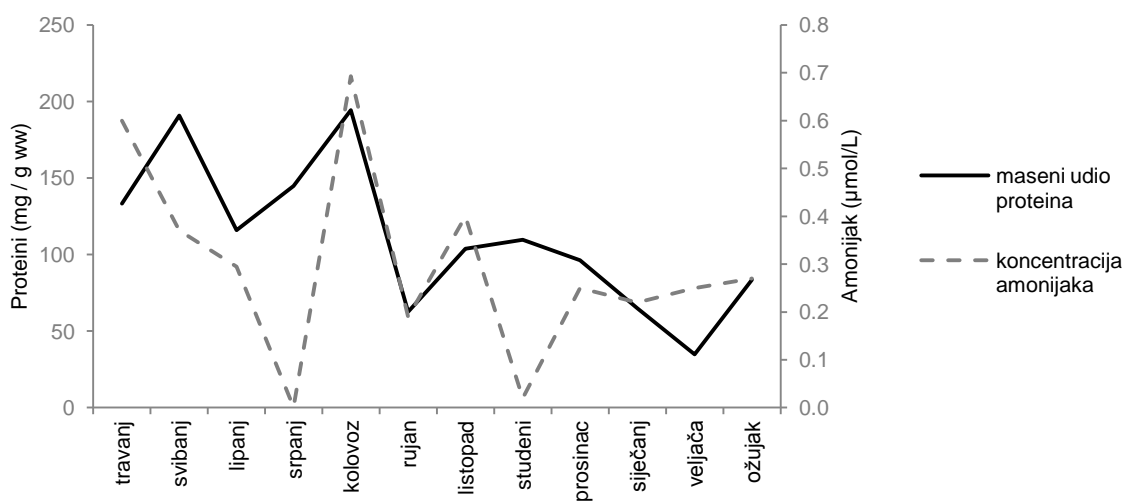
KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

Utvrđena je statistički značajna razlika u masi proteina po gramu školjke (Kruskal-Wallis t test;  $\chi^2 = 17,054$ ;  $ss = 3$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = -0,64$ ), te u masi glikogena (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 11,342$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,005$ ;  $\eta^2 = -0,76$ ). U razini proteina statistički značajna razlika je utvrđena između proljeća i zime (Mann-Whitney U = 11; Z = -2,605;  $p = 0,008$ ), ljeta i jeseni (Mann-Whitney U = 8; Z = -2,870;  $p = 0,003$ ), te između ljeta i zime (Mann-Whitney U = 2; Z = -4,400;  $p < 0,001$ ) (Tablica 3.25).

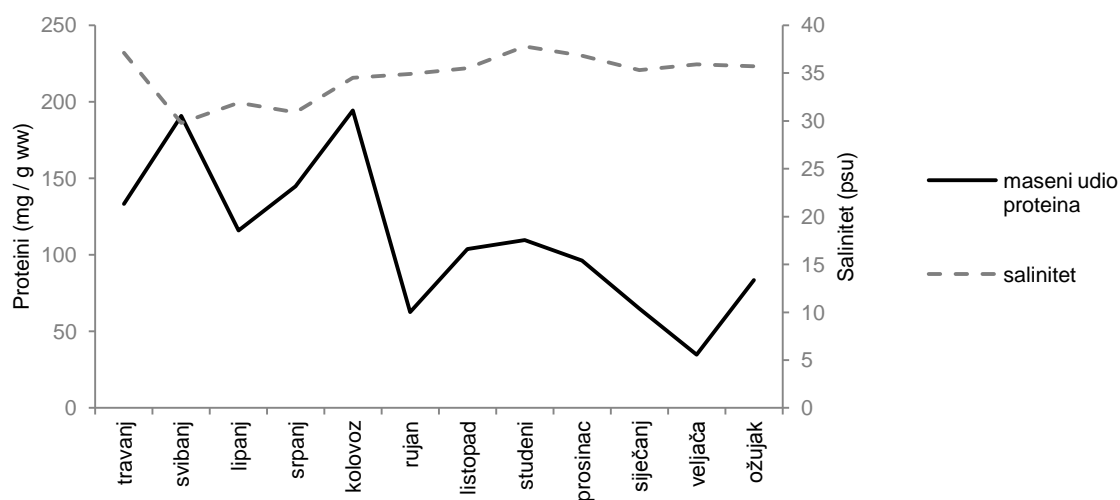
Za maseni udio proteina u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna pozitivna povezanost s temperaturom mora (Slika 3.29) i koncentracijom amonijaka (Slika 3.30), a negativna povezanost sa salinitetom (Slika 3.31) i koncentracijom nitrita u moru (Slika 3.32).



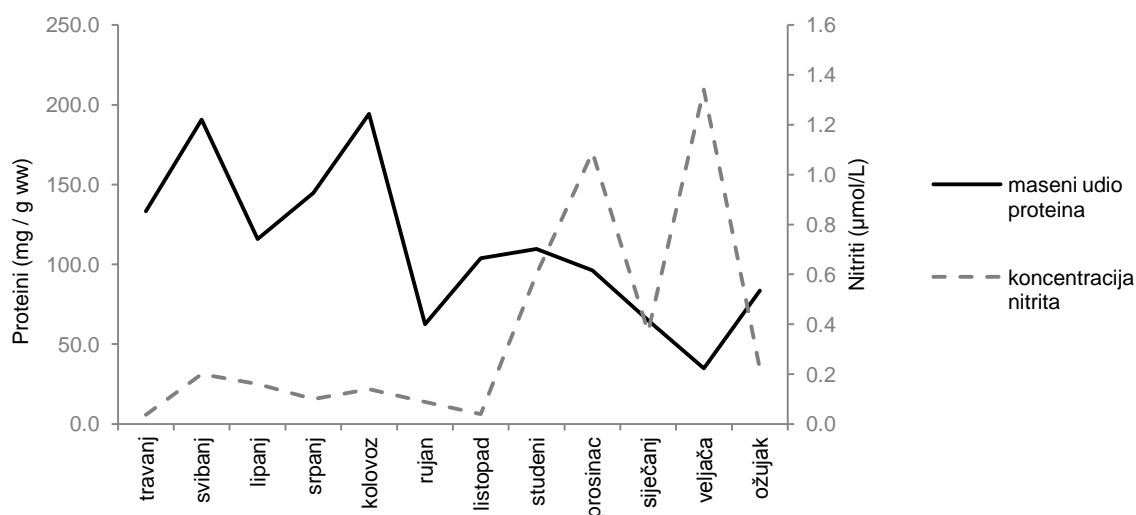
**Slika 3.29** Maseni udio proteina u tkivu kamenica u odnosu na temperaturu mora tijekom godine



**Slika 3.30** Maseni udio proteina u tkivu kamenica u odnosu na koncentraciju amonijaka u moru tijekom godine

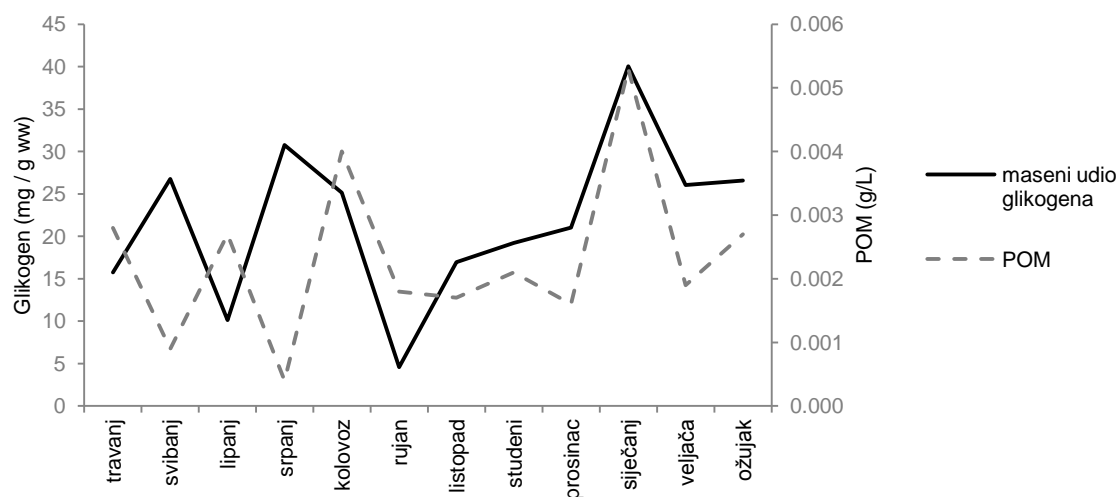


**Slika 3.31** Maseni udio proteina u tkivu kamenica u odnosu na salinitet mora tijekom godine

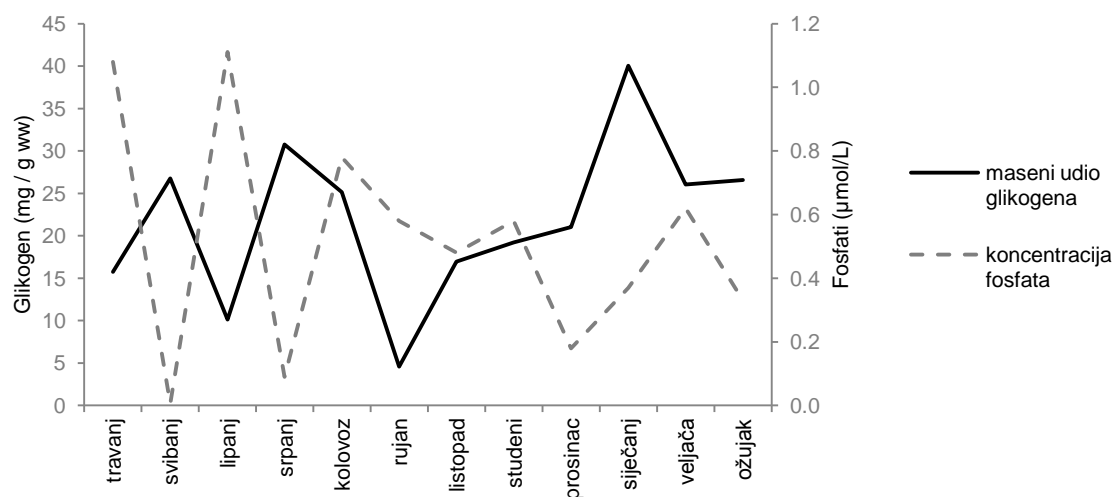


**Slika 3.32** Maseni udio proteina u tkivu kamenica u odnosu na koncentraciju nitrita u moru tijekom godine

Za maseni udio glikogena u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna pozitivna povezanost s koncentracijom organske tvari (POM) (Slika 3.33), i negativna povezanost s koncentracijom fosfata (Slika 3.34) i koncentracijom sulfata (Slika 3.35).

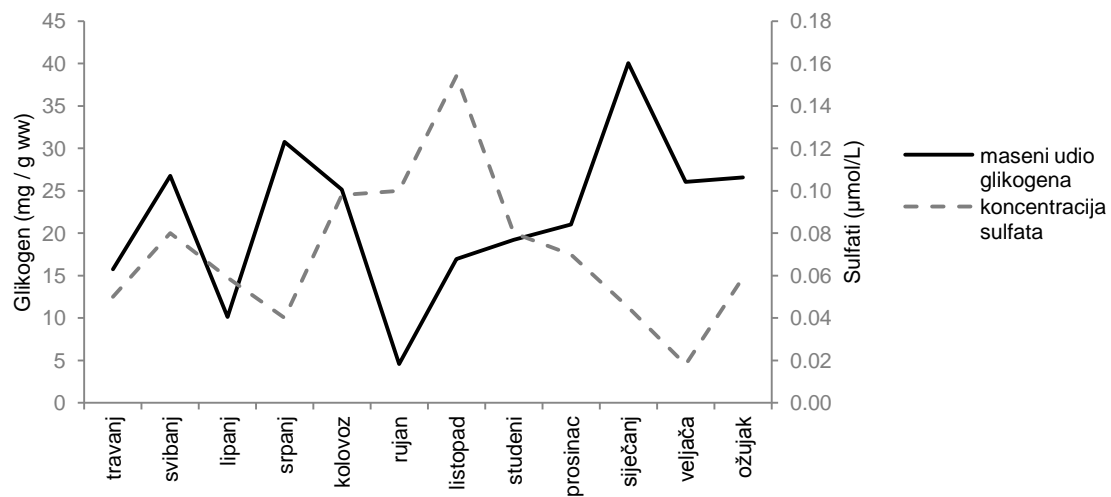


**Slika 3.33** Maseni udio glikogena u tkivu kamenica u odnosu na koncentraciju partikularne organske tvari (POM) u moru tijekom godine



**Slika 3.34** Maseni udio glikogena u tkivu kamenica u odnosu na koncentraciju fosfata u moru tijekom godine





**Slika 3.35** Maseni udio glikogena u tkivu kamenica u odnosu na koncentraciju sulfata u moru tijekom godine

### 3.8.2. Promjene masnokiselinskog sastava ukupnih lipida kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 3.26 prikazana je povezanost masnokiselinskog sastava ukupnih lipida tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ). Oznakom \* označene su one masne kiseline kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.26** Razlike u relativnim masenim udjelima (%) masnih kiselina ukupnih lipida prema godišnjim dobima

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p; \eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
C 18:4n-3	1,71 (1,00-3,39)	1,18 (1,00-1,54)	1,63 (1,36-2,12)	2,49 (1,82-3,26)	0,006; -0,75
C 20:1n-9	1,25 (0,81-2,26)	2,02 (1,76-2,48)	2,00 (1,48-2,30)	0,75 (0,58-1,39)	0,002; -0,70*
C 20:4n-6	1,27 (0,90-1,66)	1,40 (0,88-1,79)	1,65 (1,38-2,29)	0,96 (0,75-1,47)	0,037; -0,83
C 22:5n-6	0,53 (0,36-0,77)	0,89 (0,66-1,52)	1,14 (0,64-2,44)	0,98 (0,77-1,70)	0,007; -0,76

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

U Tablici 3.27 prikazana je povezanost masnokiselinskih indeksa ukupnih lipida tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ). Oznakom \* označene su one skupine masnih kiselina i masnokiselinski indeksi kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.27.** Razlike u lipidnih indeksa ukupnih lipida prema godišnjim dobima

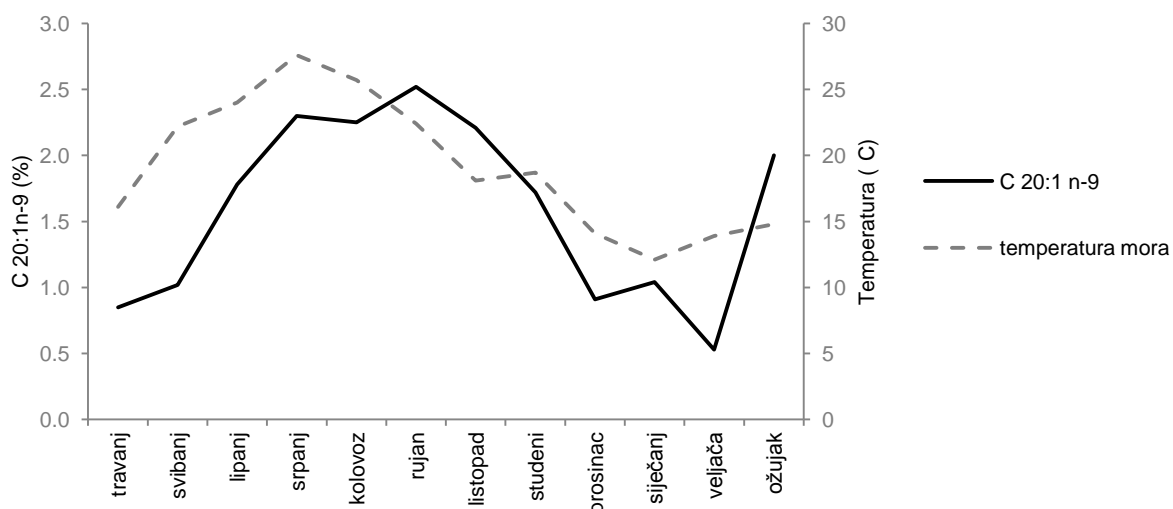
	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p; \eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
AA/EPA	0,19 (0,08-0,23)	0,22 (0,15-0,26)	0,26 (0,23-0,32)	0,14 (0,07-0,18)	<0,001; -0,61*
20:1/18:1n-9	0,40 (0,26-0,76)	0,59 (0,49-0,74)	0,57 (0,42-0,67)	0,37 (0,25-0,40)	0,009; -0,77
16:0/14:0	4,26 (3,53-5,45)	4,06 (3,51-4,42)	4,46 (4,16-4,79)	4,36 (4,02-5,07)	0,383
20:3/18:3n-3	0,09 (0,04-0,12)	0,18 (0,13-0,49)	0,11 (0,09-0,20)	0,09 (0,07-0,14)	0,002; -0,72*

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

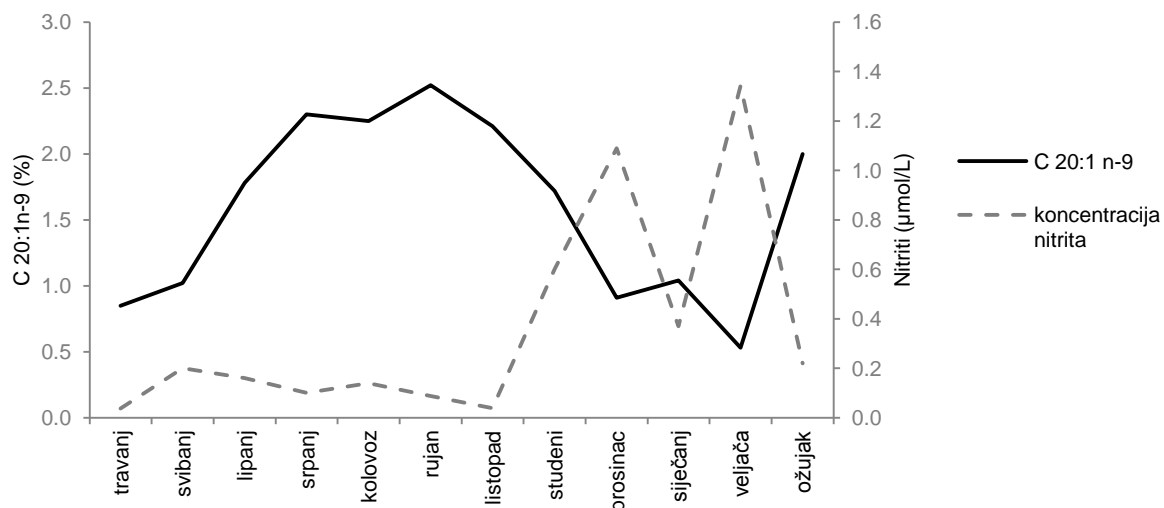
Utvrđene su statistički značajne razlike u udjelima svih analiziranih masnih kiselina osim omjera 16:0/14:0. Nakon Bonferronijeve korekcije razine statističke značajnosti korištene kod višestrukih usporedbi (pri čemu je korigirana razina statističke značajnosti postavljena na  $p = 0,008$ ), statistički

značajne razlike između godišnjih doba ostaju u udjelima masnih kiselina C 20:1 n-9 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 14,635$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,002$ ;  $\eta^2 = -0,70$ ), omjeru ARA/EPA (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 18,780$ ;  $ss = 3$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = -0,77$ ), te omjeru 20:3/18:3n-3 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 13,621$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,001$ ;  $\eta^2 = -0,72$ ) i u tablicama su označene oznakom \*. Udio C 20:1n-9 masne kiseline statistički se značajno razlikovao između ljeta i zime (Mann-Whitney U = 16, Z = -3,233;  $p = 0,001$ ) te između jeseni i zime (Mann-Whitney U = 11, Z = -3,231;  $p = 0,001$ ). Udio C 20:1n-9 bio je manji zimi u odnosu na ljeto i jesen. Omjer AA/EPA statistički se značajno razlikovao između proljeća i jeseni (Mann-Whitney U = 17, Z = -2,835;  $p = 0,003$ ) te između jeseni i zime (Mann-Whitney U = 1, Z = -3,890;  $p < 0,001$ ), pri čemu je omjer AA/EPA bio veći u jesen u odnosu na proljeće i zimu. Omjer 20:3/18:3n-3 statistički se značajno razlikovao između proljeća i ljeta (Mann-Whitney U = 17, Z = -3,176;  $p = 0,001$ ) te zime i ljeta (Mann-Whitney U = 20, Z = -3,002;  $p = 0,002$ ), pri čemu je omjer 20:3/18:3n-3 ljeti bio veći u odnosu na proljeće i zimu (Tablica 3.25 i 3.26).

Za relativni maseni udio eikozenske kiseline (C 20:1n-9) ukupnih lipida u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna pozitivna povezanost s temperaturom mora (Slika 4.36) i negativna povezanost s koncentracijom nitrita (Slika 4.37).

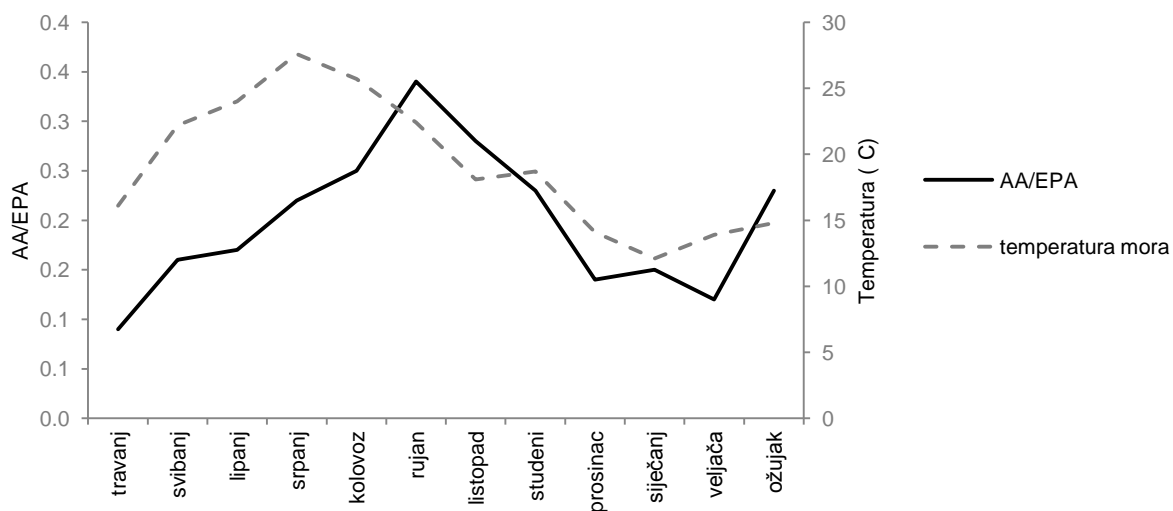


**Slika 3.36** Relativni maseni udio masne kiseline C 20:1n-9 u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na temperaturu mora tijekom godine

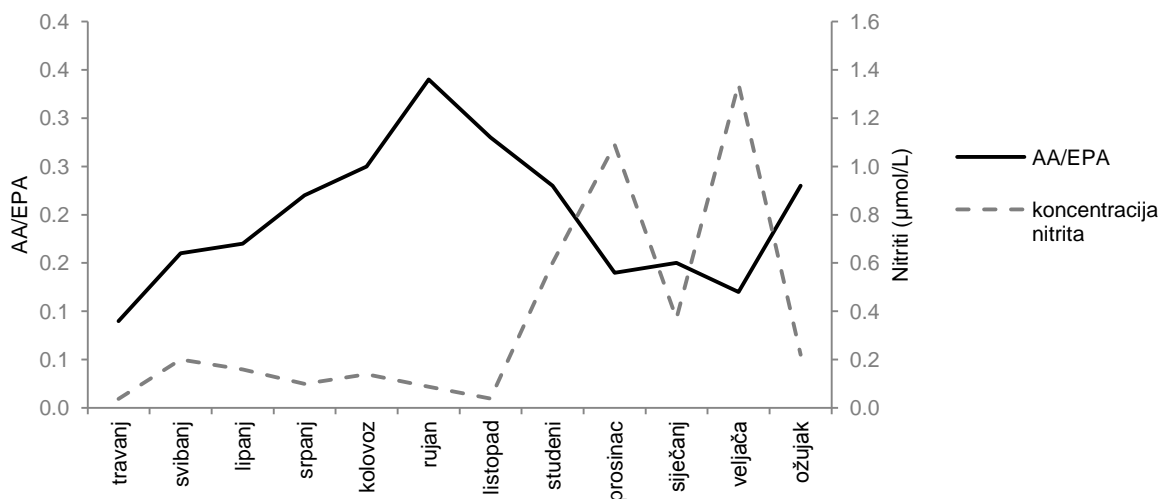


**Slika 3.37** Relativni maseni udio masne kiseline C 20:1n-9 u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na koncentraciju nitrita u moru tijekom godine

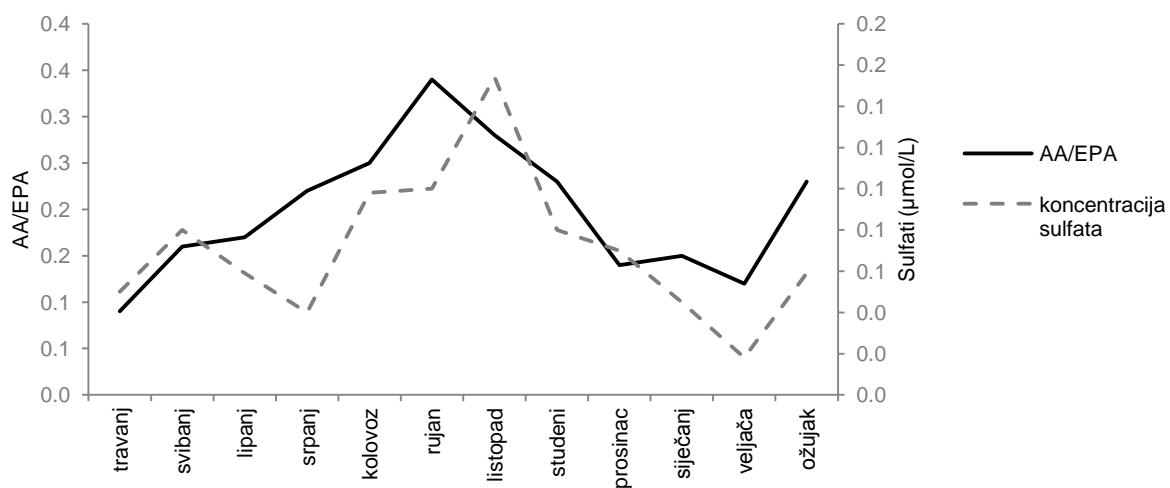
Za omjer masnih kiselina AA/EPA u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna pozitivna povezanost s temperaturom mora (Slika 3.38), koncentracijom nitrita (Slika 3.39) i koncentracijom sulfata (Slika 3.40).



**Slika 3.38** Omjer masnih kiselina AA/EPA u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na temperaturu mora tijekom godine

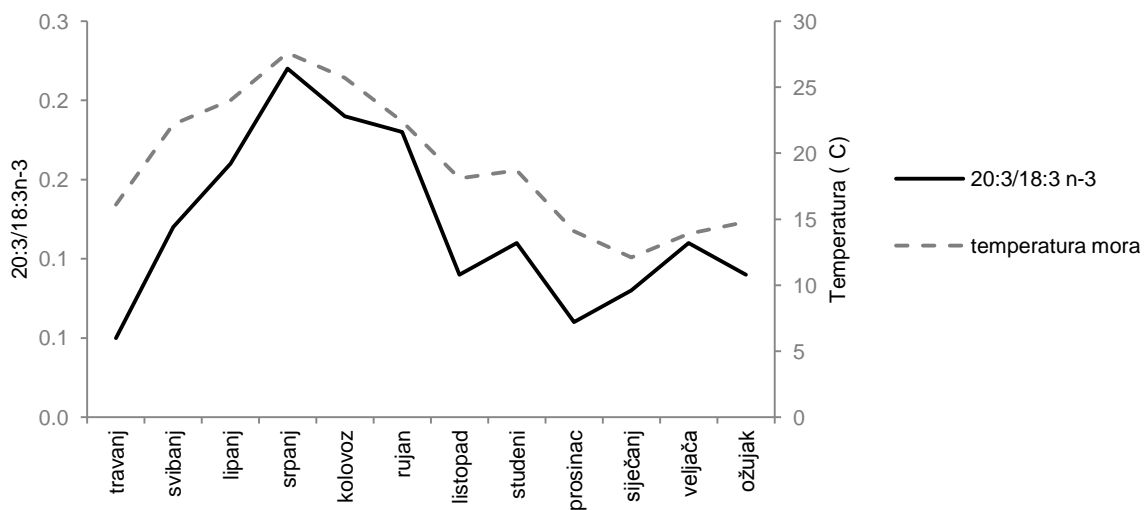


**Slika 3.39** Omjer masnih kiselina AA/EPA u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na koncentraciju nitrita u moru tijekom godine



**Slika 3.40** Omjer masnih kiselina AA/EPA u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na koncentraciju sulfata u moru tijekom godine

Za omjer masnih kiselina 20:3/18:3n-3 u sastavu ukupnih lipida u tkivu kamenica tijekom godine utvrđena je snažna pozitivna povezanost s temperaturom mora (Slika 3.41).



**Slika 3.41** Omjer masnih kiselina 20:3/18:3n-3 u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva kamenica u odnosu na temperaturu mora tijekom godine

### 3.8.3. Promjene masnokiselinskog sastava triacilglicerola u tkivu kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 3.28 prikazana je povezanost masnokiselinskog sastava triacilglicerola u tkivu europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ).

Oznakom \* označene su one masne kiseline kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.28** Razlike u relativnim masenim udjelima (%) masnih kiselina u sastavu triacilglicerola prema godišnjim dobima

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p; \eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
C 18:1cn-9	2,37 (1,91-2,92)	2,81 (1,14-3,91)	2,90 (2,33-4,19)	2,16 (1,68-3,35)	0,272
C 18:1tn-7	0,99 (0,70-1,43)	1,74 (0,79-2,34)	1,36 (1,10-1,99)	0,95 (0,82-1,38)	0,076
C 18:2cn-6	1,39 (1,17-1,83)	1,75 (0,70-2,44)	1,46 (1,20-2,00)	1,32 (0,97-1,74)	0,581
C 18:2tn-6	0,40 (0,18-1,79)	0,30 (0,25-0,47)	0,25 (0,18-0,37)	0,16 (0,03-0,34)	0,151
C 18:3n-3	1,85 (1,26-2,23)	1,21 (0,53-1,51)	1,63 (0,80-1,81)	1,56 (1,01-2,38)	0,124
C 18:4n-3	2,40 (2,23-3,58)	1,83 (0,93-2,26)	1,97 (1,24-2,45)	2,35 (1,74-4,28)	0,033; -0,82
C 20:4n-6	1,03 (0,66-1,23)	1,28 (0,75-1,60)	1,85 (1,05-2,49)	1,08 (0,58-1,46)	0,120
C 20:4n-3	0,77 (0,60-1,06)	0,42 (0,25-0,56)	0,50 (0,00-0,65)	0,66 (0,35-0,85)	0,001; -0,70*
C 22:2n-6	2,43 (1,02-3,65)	3,91 (2,73-8,95)	2,84 (1,60-4,25)	2,06 (1,73-4,73)	0,057

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

U Tablici 3.29 prikazana je povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti i masnokiselinski indeksi u lipidnoj frakciji triacilglicerola tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ).

Oznakom \* označene su one skupine masnih kiselina i masnokiselinski indeksi kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.29** Razlike u sumi skupina masnih kiselina i lipidni indeksi u lipidnoj frakciji triacilglicerola

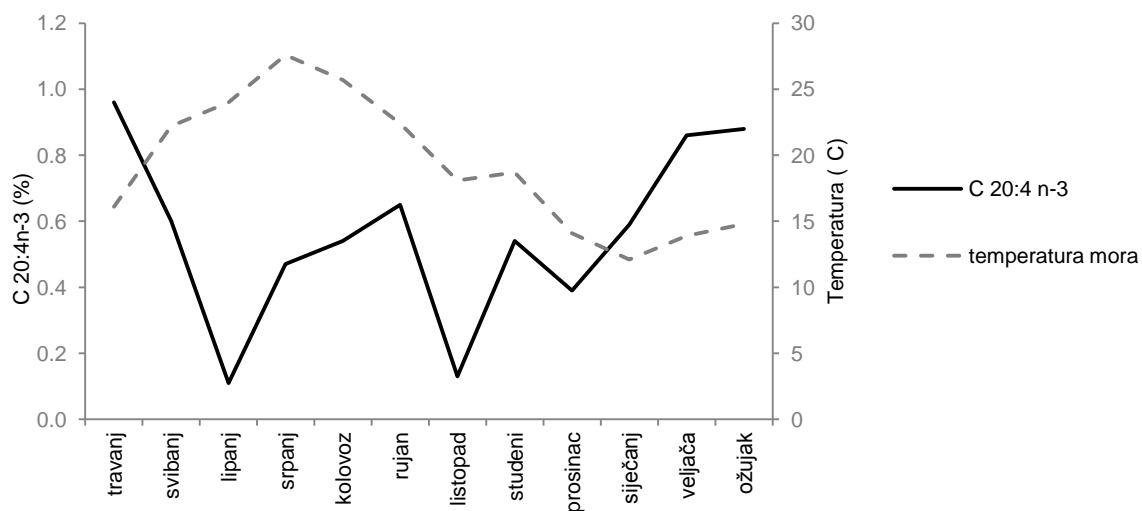
	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p$ ; $\eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
$\Sigma$ n-9	4,65 (3,85-6,52)	5,96 (4,38-8,72)	5,95 (5,22-8,97)	5,27 (4,01-7,12)	0,195
$\Sigma$ MUFA	8,72 (6,35-11,51)	10,68 (6,88-15,18)	12,99 (10,11-16,93)	9,92 (7,67-11,59)	0,058
ARA/EPA	0,09 (0,03-0,13)	0,13 (0,08-0,18)	0,14 (0,09-0,28)	0,09 (0,06-0,12)	0,122
16:0/14:0	3,51 (2,99-4,94)	3,50 (3,18-4,31)	4,30 (3,76-4,94)	4,49 (3,57-4,94)	0,147
18:0/16:0	0,25 (0,19-0,37)	0,29 (0,24-0,33)	0,31 (0,27-0,52)	0,26 (0,20-0,30)	0,224

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

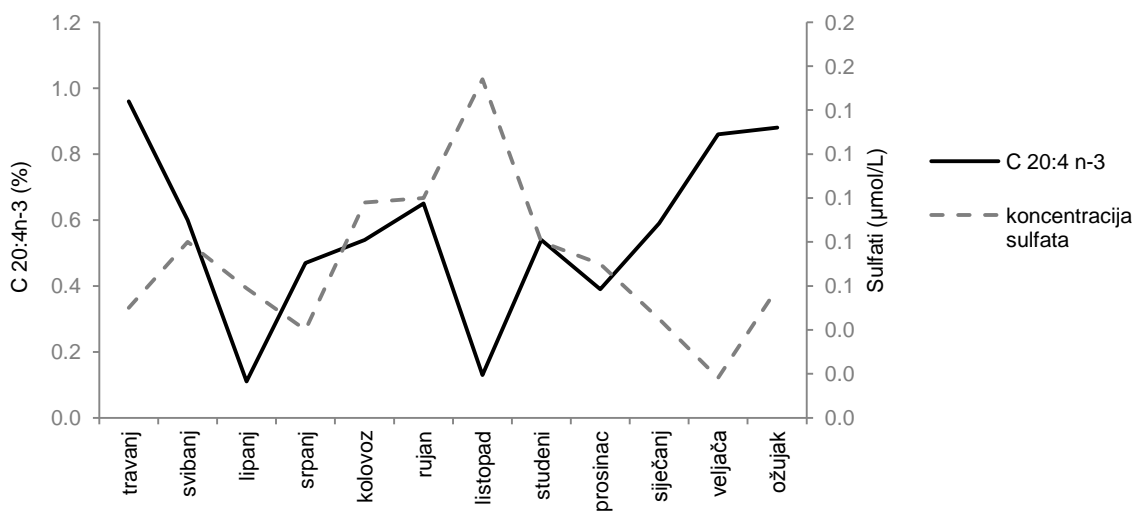
Statistički značajna razlika u udjelima masnih kiselina triacilglicerola u tkivu kamenica ovisno o godišnjem dobu utvrđena je za C 18:4n-3, C 20:4n-3 i C 22:0. Nakon Bonferronijeve korekcije razine statističke značajnosti (pri čemu korigirana razina statističke značajnosti iznosi  $p = 0,003$ ), statistički značajne razlike ostaju u masnim kiselinama C 20:4n-3 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 14,296$ ; ss = 3;  $p = 0,001$ ;  $\eta^2 = -0,70$ ) i C 22:0 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 19,471$ ; ss = 3;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = -0,75$ ) i u tablicama su označene sa \*. Udio C 20:4n-3 masne kiseline u sastavu triacilglicerola statistički se značajno razlikovao između ljeta i proljeća (Mann-Whitney U = 15; Z = -3,292;  $p < 0,001$ ) te između proljeća i jeseni (Mann-Whitney U = 19; Z = -2,896;  $p = 0,003$ ), pri čemu je udio bio veći u proljeće u odnosu na ljeto i jesen (Tablica 3.28).



Za relativni maseni udio eikozatetraenske kiseline (ETA, C 20:4n-3) u lipidnoj frakciji triacilglicerola tkiva kamenica tijekom godine pokazana je snažna negativna povezanost s temperaturom mora (Slika 3.42) i koncentracijom sulfata (Slika 3.43).



**Slika 3.42** Relativni maseni udio masne kiseline C 20:4n-3 lipidne frakcije triacilglicerola u odnosu na temperaturu mora tijekom godine



**Slika 3.43** Relativni maseni udio masne kiseline C 20:4n-3 lipidne frakcije triacilglicerola u odnosu na koncentraciju sulfata u moru tijekom godine

### 3.8.4. Promjene masnokiselinskog sastava lipidne frakcije fosfolipida kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 3.30 prikazana je povezanost masnokiselinskog sastava u lipidnoj frakciji fosfolipida tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ).

Oznakom \* označene su one masne kiseline kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.30** Razlike u relativnim masenim udjelima (%) masnih kiselina u lipidnoj frakciji fosfolipida prema godišnjim dobima

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p$ ; $\eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
C 14:0	4,16 (2,55-5,96)	4,44 (3,03-9,48)	4,11 (2,87-5,34)	3,51 (2,41-5,04)	0,656
C 17:0	0,87 (0,37-2,01)	1,22 (0,81-4,41)	1,60 (0,48-4,55)	1,15 (0,36-3,25)	0,722
C 17:1n-7	1,55 (1,13-2,65)	1,36 (1,06-1,74)	1,12 (0,71-1,58)	1,13 (0,68-1,86)	0,190
C 18:1n-7	1,19 (0,21-1,85)	1,69 (0,79-1,97)	0,94 (0,66-1,28)	0,94 (0,00-1,55)	0,323
C 18:2cn-6	0,49 (0,00-1,91)	0,50 (0,00-1,32)	0,00 (0,00-0,26)	0,70 (0,00-1,20)	0,234

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

U Tablici 3.31 prikazana je povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti i masnokiselinski indeksi u lipidnoj frakciji fosfolipida tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ).

Oznakom \* označene su one skupine masnih kiselina i masnokiselinski indeksi kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.31** Razlike u sumi skupina masnih kiselina i lipidni indeksi u lipidnoj frakciji fosfolipida

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	$p; \eta^2$
$\Sigma$ n-3	34,12 (26,45-57,21)	54,17 (44,07-64,82)	53,81 (6,64-67,62)	50,47 (21,25-68,04)	0,439
$\Sigma$ MUFA	7,11 (4,64-11,79)	6,01 (4,72-7,45)	5,20 (4,41-6,15)	4,60 (3,54-5,06)	<b>0,020; -0,80</b>
$\Sigma$ PUFA	37,06 (26,45-60,70)	56,39 (44,07-66,87)	59,08 (7,01-72,08)	53,95 (21,91-70,30)	0,572
16:0/14:0	4,06 (3,47-5,84)	3,90 (2,76-5,36)	3,89 (3,06-4,18)	4,26 (3,37-5,77)	0,486
UI n-3	5,12 (3,97-8,58)	8,13 (6,61-9,72)	8,07 (1,00-10,14)	7,57 (3,19-10,21)	0,493
U/S	9,83 (5,60-13,86)	8,68 (6,31-9,46)	7,16 (5,95-9,21)	6,77 (4,70-8,21)	0,091

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

Utvrđena je statistički značajna razlika u udjelu sume jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA) fosfolipidne frakcije lipida (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 9,495$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,020$ ;  $\eta^2 = -0,80$ ), no nakon Bonferronijeve korekcije razine statističke značajnosti (kojom je korigirana razina statističke značajnosti postavljena na  $p = 0,003$ ), niti jedna masna kiselina iz fosfolipidne frakcije više nije statistički značajna (Tablica 3.31).

### 3.8.5. Promjene masnokiselinskog sastava lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 3.32 prikazana je povezanost sume pojedinih skupina masnih kiselina, grupiranih ovisno o stupnju zasićenosti, i masnokiselinski indeksi u lipidnoj frakciji slobodnih masnih kiselina tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ). Oznakom \* označene su one skupine masnih kiselina i masnokiselinski indeksi kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije. Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

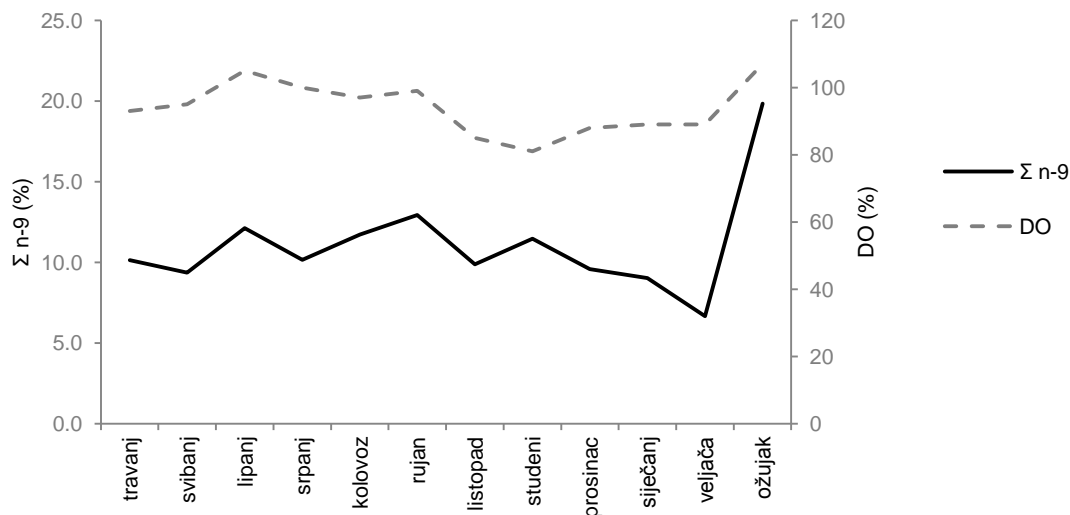
**Tablica 3.32** Razlike u sumi skupina masnih kiselina i lipidni indeksi u lipidnoj frakciji slobodnih masnih kiselina

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p$ ; $\eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
$\Sigma$ n-9	9,82 (7,35-10,82)	10,94 (9,95-13,30)	11,54 (10,38-12,73)	8,34 (5,76-9,96)	0,002; -0,71*
EPA/DHA	0,12 (0,07-0,31)	0,32 (0,24-0,38)	0,33 (0,21-0,43)	0,21 (0,12-0,40)	0,031; -0,82
18:1n-9/18:0	0,42 (0,30-0,48)	0,51 (0,43-0,63)	0,56 (0,40-0,58)	0,38 (0,34-0,46)	0,015; -0,79
20:1/18:1n-9	0,11 (0,08-0,17)	0,16 (0,12-0,18)	0,14 (0,11-0,16)	0,11 (0,09-0,13)	0,061
16:0/14:0	4,85 (4,08-5,78)	4,62 (3,99-5,22)	4,10 (3,62-4,44)	4,08 (3,59-5,01)	0,094
18:0/16:0	0,42 (0,38-0,53)	0,30 (0,27-0,37)	0,31 (0,28-0,36)	0,38 (0,29-0,49)	0,003; -0,73*

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

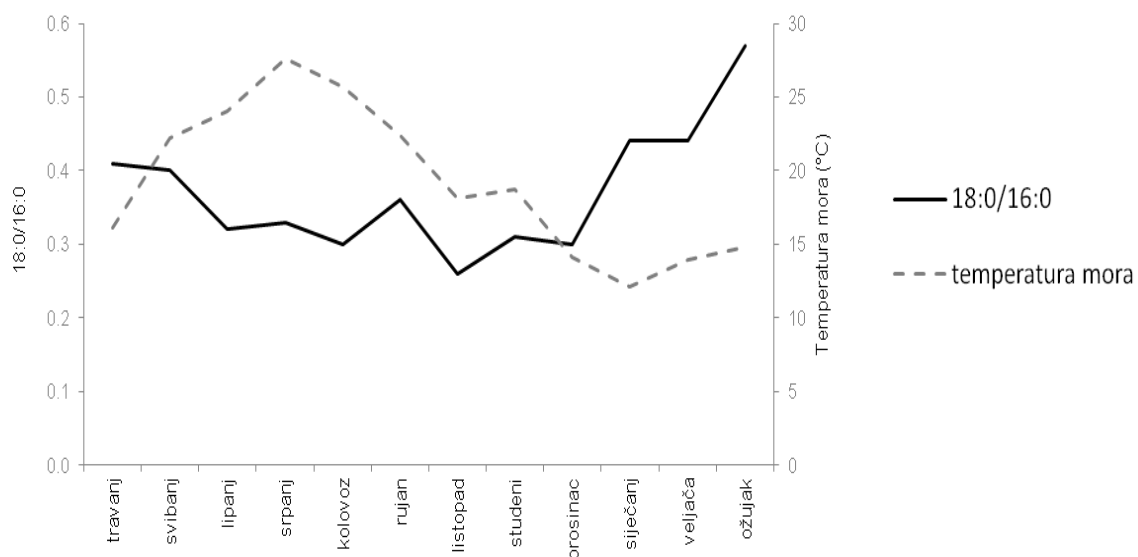
Utvrđena je statistički značajna razlika sume n-9 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 13,838$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,003$ ;  $\eta^2 = -0,71$ ), omjera EPA/DHA (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 8,630$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,031$ ;  $\eta^2 = -0,82$ ), omjera 18:1n-9/18:0 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 10,063$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,015$ ;  $\eta^2 = -0,79$ ) i omjera 18:0/16:0 (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2 = 13,110$ ;  $ss = 3$ ;  $p = 0,003$ ;  $\eta^2 = -0,73$ ) u frakciji slobodnih masnih kiselina. Nakon Bonferronijeve korekcije razine statističke značajnosti (pri čemu je korigirana razina postavljena na  $p = 0,006$ ), statistički značajne razlike ostaju u sumi n-9 masnih kiselina i omjeru 18:0/16:0 i u tablicama su označene sa \*. U sumi n-9 slobodnih masnih kiselina statistički značajna razlika utvrđena je između ljeta i zime (Mann-Whitney U = 19; Z = -3,060;  $p = 0,001$ ) te između jeseni i zime (Mann-Whitney U = 15; Z = -3,292;  $p < 0,001$ ), pri čemu je suma n-9 bila manja zimi u odnosu na ljeto i jesen. Omjer 18:0/16:0 bio je statistički značajno različit između proljeća i ljeta (Mann-Whitney U = 22; Z = -2,887;  $p = 0,003$ ) te proljeća i jeseni (Mann-Whitney U = 16; Z = -3,234;  $p = 0,001$ ), pri čemu je omjer bio veći u proljeće u odnosu na ljeto i jesen (Tablica 3.32).

Za sumu n-9 masnih kiselina lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna pozitivna povezanost s otopljenim kisikom (Slika 3.44).



**Slika 3.44** Relativni maseni udio  $\Sigma$  n-9 masnih kiselina frakcije slobodnih masnih kiselina u odnosu na otopljeni kisik (DO) u moru tijekom godine

Za omjer masnih kiselina 18:0/16:0 lipidne frakcije slobodnih masnih kiselina u tkivu kamenica tijekom godine otkrivena je snažna negativna povezanost s temperaturom mora (Slika 3.45).



**Slika 3.45** Omjer masnih kiselina 18:0/16:0 frakcije slobodnih masnih kiselina u odnosu na temperaturu mora tijekom godine

### 3.9. Promjene (anti) oksidativnog statusa kamenica prema godišnjim dobima

U Tablici 2.33 prikazana je povezanost (anti) oksidativnog sastava tkiva europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima. U tablici je uz svaku varijablu naveden medijan vrijednosti i interkvartilni raspon (IQR), razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha) prema rezultatima Kruskal-Wallis testa i standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate ( $\eta^2$ ).

Oznakom \* označeni su oni antioksidativni parametri kod kojih je statistička značajnost ostala nakon Bonferroni korekcije.

Crvenom bojom naglašene su statistički značajne korelacije s obzirom na godišnja doba ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 2.33** Razlike antioksidativnog statusa europske plosnate kamenice prema godišnjim dobima

	Proljeće	Ljeto	Jesen	Zima	$p$ ; $\eta^2$
	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	medijan (IQR)	
MDA (mmol/mg proteina)	15,1 (11,9-20,2)	16,2 (13,0-21,4)	12,2 (7,3-18,3)	15,8 (11,9-20,3)	0,339
LP (nmol LOOH/mg lipida)	1,8 (0,4-14,6)	3,3 (1,9-4,3)	2,4 (1,7-7,6)	5,8 (4,6-7,2)	0,164

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon;  $p$  = Kruskal-Wallis test; razina statističke značajnosti ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = eta koeficijent, standardizirana mjera veličine učinka uz statistički značajne rezultate Kruskal-Wallis testa

KW testom nisu utvrđene statistički značajne razlike koncentracije MDA i LP u tkivu kamenica prema godišnjim dobima (Tablica 2.33).

### 3.10. Matematičko modeliranje

U rezultatima matematičkog modeliranja za svaki je odabrani model prikazana tablica s regresijskim koeficijentima (B), njihovim standardnim devijacijama (SD), vrijednostima  $t$ -testova i odgovarajućim  $p$ -vrijednostima. Također su u tablici navedeni kvadrirani regresijski koeficijenti ( $R^2$ ), prilagođeni kvadrirani regresijski koeficijenti ( $R_a^2$ ), standardna devijacija reziduala ( $\sigma$ ) i vrijednost F – testa za procjenu prilagodbe modela s pripadajućom  $p$  – vrijednosti i stupnjevima slobode.

Uz svaki model prikazan je i dijagram raspršenja zavisnih varijabli (ZV) u odnosu na mjesece, te su na njemu plavom linijom povezane srednje vrijednosti po mjesecima, a crvenim trokutima predviđanja modela. Također, izrađeni su i dijagrami koji prikazuju oblik regresijske funkcije s obzirom na svaku od nezavisnih varijabli (NV) u modelu, tako da su vrijednosti drugih NV u modelu fiksirane na pripadne srednje vrijednosti. Ukoliko su u pojedinim modelima zavisne varijable transformirane logaritmom, učinci nezavisnih varijabli se ne izražavaju u apsolutnom iznosu povećanja/smanjenja, nego kao relativno postotno povećanje u originalnoj varijabli.

U tablici 3.34 je prikazani su neparametrijski Spearmanovi koeficijenti povezanosti između nezavisnih varijabli okolišnih čimbenika i zavisnih varijabli sastava tkiva kamenica. U tablici su uz svaku varijablu navedene mjerne jedinice, te Spearmanovi koeficijenti korelacije (r)

**Tablica 3.34** Neparametrijski Spearmanovi koeficijenti povezanosti između nezavisnih i zavisnih varijabli

r	T (°C)	DO (%)	pH	S (psu)	TPM (g/L)	PIM (g/L)	POM (g/L)	Amonijak ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitrati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Nitriti ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fosfati ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sulfati ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>n-3 PUFA (%)</b>	-0,20	-0,11	-0,16	0,07	-0,07	-0,07	-0,01	0,11	-0,04	0,22	-0,08	-0,24
<b>n-3/n-6 PUFA</b>	-0,36	-0,11	0,09	0,15	0,07	0,08	0,08	0,17	0,02	0,29	0,07	-0,33
<b>AA/EPA</b>	0,32	0,17	-0,21	0,00	-0,14	-0,17	-0,08	-0,11	-0,31	-0,36	-0,02	0,51
<b>AA/DHA</b>	0,16	0,02	-0,15	0,12	0,00	-0,04	0,04	0,06	-0,17	-0,28	0,05	0,50
<b>LP (nmol LOOH/mg lipida)</b>	0,10	-0,03	-0,19	-0,53	-0,48	-0,42	-0,27	-0,07	-0,32	0,10	-0,56	0,03
<b>MDA (mmol/mg proteina)</b>	-0,37	-0,18	0,30	0,16	0,23	0,32	0,02	-0,16	0,15	0,62	0,07	-0,41

KRATICE: r = Spearmanov koeficijent korelacije; T = temperatura mora; DO = otopljeni kisik; S = salinitet; TPM = ukupna partikularna tvar; PIM = anogrnska partikularna tvar; POM = organska partikularna tvar; PUFA = višestruko nezasićene masne kiseline; AA = arahidonska kiselina; EPA = eikozapentaenska kiselina; DHA = dokozaheksaenska kiselina; LP = lipidni peroksidi; MDA = malondialdehid

Jače korelacije među nezavisnim i zavisnim varijablama uočene su između AA/DHA omjera i koncentracije sulfata (0,50), između AA/EPA omjera i koncentracije sulfata (0,51), nitrita (-0,36) i temperature mora (0,32), te između n-3/n-6 PUFA i temperature mora (-0,36) i koncentracije sulfata (-0,33).



### 3.10.1. Predviđanje relativnog masenog udjela n-3 PUFA tijekom godine

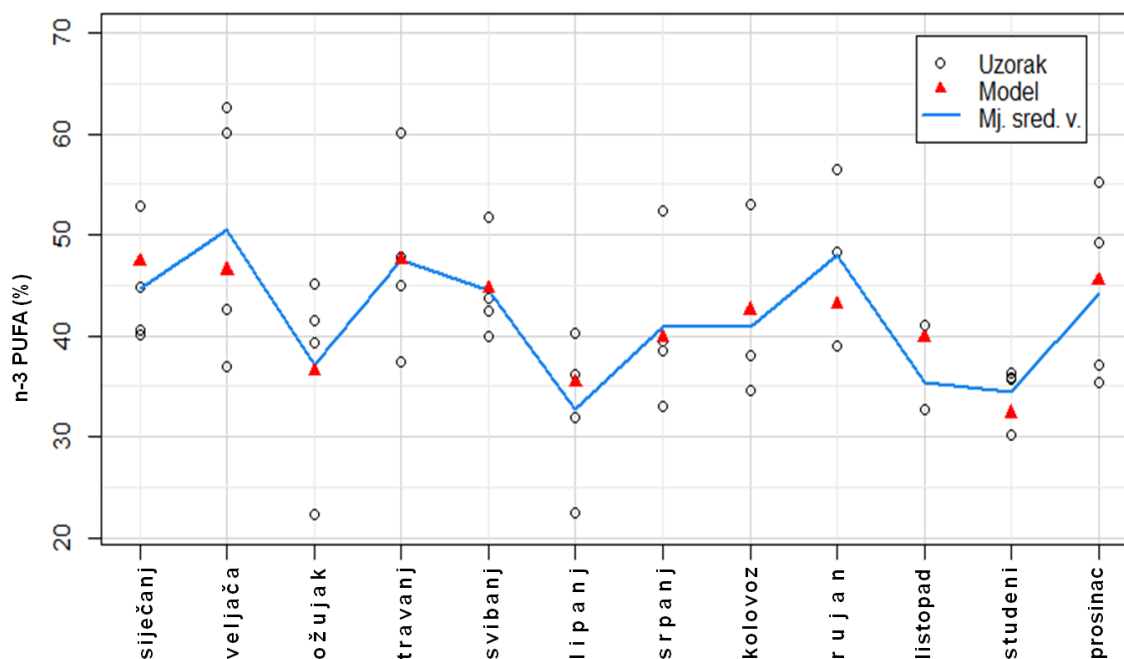
U tablici 3.34 prikazan je Spearmanov koeficijent korelacije varijable relativnog masenog udjela n-3 PUFA (%) sa svim nezavisnim varijablama. Najveće korelacije ( $r$ ) zabilježene su za temperaturu mora (-0,20), pH (-0,16), te koncentraciju nitrita (0,22) i sulfata (-0,24). Iako je otopljeni kisik (DO) slabo koreliran s n-3 PUFA, značajna se pokazuje veza s uključenim kvadratnim članom  $DO^2$ . Tablica 3.35 prikazuje rezultate za odabrani finalni model. Ukupan model je značajan ( $F(3,116) = 5,92$ ;  $p < 0,01$ ), kao i koeficijenti za linearni i kvadratni član kisika ( $p < 0,001$ ). Koeficijent za temperaturu mora nije statistički značajan uz razinu značajnosti od 0,05, no finalni model ima puno bolje kriterije za odabir modela u odnosu na model bez varijable temperatura mora (T) ( $R^2 = 0,24$ ;  $R_a^2 = 0,20$ ). *Lack-of-fit test* za usporedbu modela u Tablici 3.35 s ANOVA modelom po mjesecima ( $R^2 = 0,38$ ) nije značajan, uz  $p = 0,819$ .

**Tablica 3.35** Rezultati regresijske funkcije za varijablu n-3 PUFA

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	-632,97	174,922	-3,62	<0,001
DO (%)	14,57	3,725	3,91	<0,001
DO <sup>2</sup> (%)	-0,08	0,020	-3,92	<0,001
T (°C)	-0,50	0,261	-1,89	0,065
<b>R<sup>2</sup> = 0,30</b>	<b>R<sub>a</sub><sup>2</sup> = 0,25</b>	<b>σ = 7,89</b>	<b>F(3, 116) = 5,92</b> <b>(p &lt; 0,01)</b>	

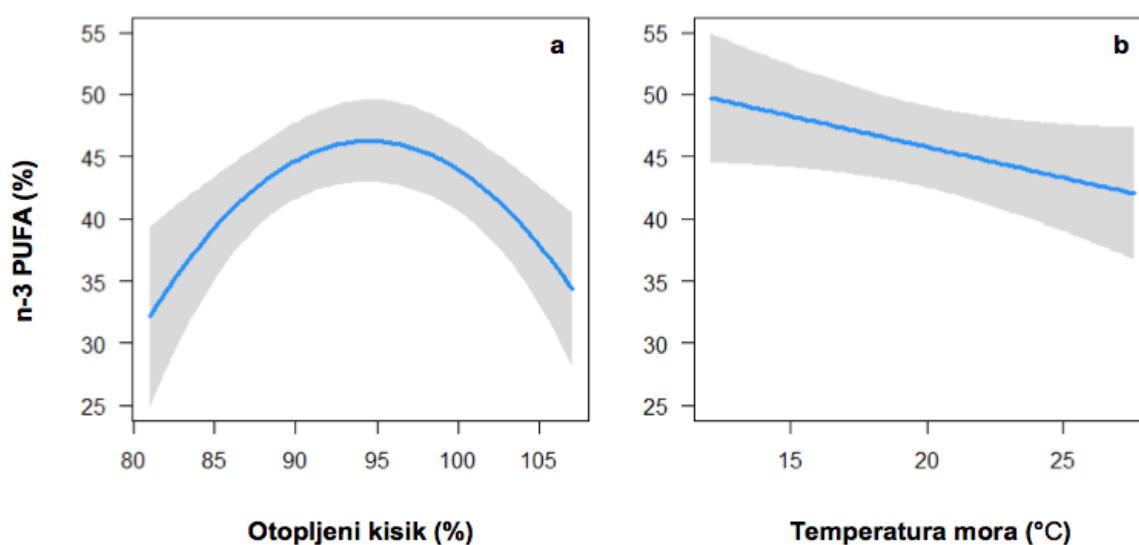
KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija; t = t test; p = razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta; R<sup>2</sup> = kvadrirani regresijski koeficijent; R<sub>a</sub><sup>2</sup> prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent; σ = standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

Na Slici 3.46 vidi se da je varijacija udjela n-3 PUFA u tkivu kamenica unutar svakog mjeseca razmjerno velika u odnosu na varijaciju među mjesecima. S obzirom na to, ne može se očekivati puno bolji model od već dobivenoga. Mjesečne srednje vrijednosti udjela n-3 PUFA kretale su se u rasponu od 32 % do 50 %, s najnižim vrijednostima u ožujku, lipnju, listopadu i studenom. Predviđanja modela dobro prate mjesečne srednje vrijednosti, a najveće odstupanje je u veljači, rujnu i listopadu.



**Slika 3.46** Raspršenje varijable masenog udjela n-3 PUFA u tkivu kamenica u odnosu na mjesec

Na Slici 3.47 prikazani su očekivani utjecaji otopljenog kisika i temperature mora na udio n-3 PUFA u tkivu kamenica. Promjena udjela PUFA u odnosu na zasićenost mora kisikom nije jednoznačna. Povećanje zasićenosti kisikom za 5 postotnih bodova, sa 85 % na 90 % rezultira povećanjem udjela n-3 PUFA za 5,4 postotna boda, povećanje sa 100 % na 105 % rezultira smanjenjem n-3 PUFA za 6,1 postotni bod, dok se maksimalna očekivana vrijednost masenog udjela n-3 PUFA postiže pri 94,5 % zasićenosti kisikom. Za svako povećanje temperature mora od 1 °C, očekivani udio n-3 PUFA smanjuje se za 0,5 postotnih bodova.



**Slika 3.47** Regresijska funkcija udjela n-3 PUFA s obzirom na a) otopljeni kisik i b) temperaturu mora

### 3.10.2. Predviđanje omjera n-3/n-6 PUFA tijekom godine

Najveće korelacije varijable omjer n-3/n-6 PUFA zabilježene su s temperaturom mora (-0,36), te koncentracijom nitrita (0,29) i sulfata (-0,33) (Tablica 3.34). Ponovno se kao značajna pokazala kvadratna veza s otopljenim kisikom. Zbog heterogenosti varijance i postojanja *outliera*, omjer n-3/n-6 PUFA je logaritamski transformiran, što je bilo dovoljno da se zadovolje pretpostavke modela, a također je rezultiralo povećanjem  $R^2$ . U Tablici 3.36 prikazani su rezultati za odabrani finalni model. Ukupan model je značajan kao i svi koeficijenti, uz razinu značajnosti 0,01.

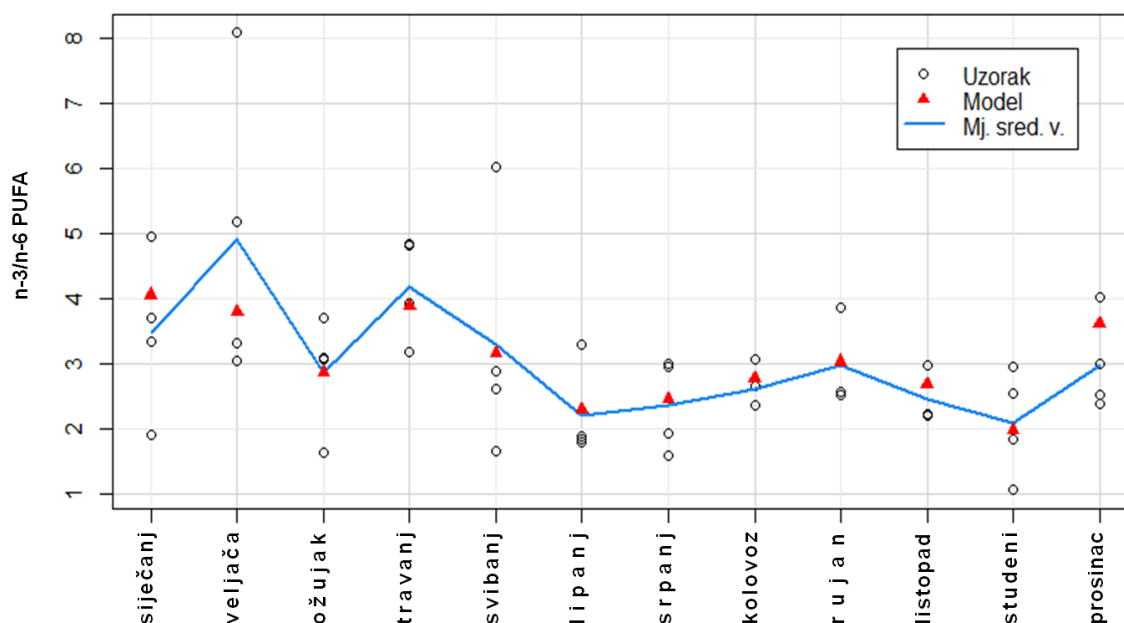
*Lack-of-fit test* nije značajan, uz  $p = 0,831$  pa zaključujemo da je dobiveni model dobro prilagođen podacima.  $R^2$  za ANOVA model po mjesecima iznosi 0,40 što nije puno više od modela ( $R^2 = 0,33$ ) u Tablici 3.36.

**Tablica 3.36** Rezultati regresijske funkcije za varijablu  $\log(n-3/n-6 \text{ PUFA})$

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	-23,836	7,266	-3,28	<0,01
DO (%)	0,539	0,155	3,48	<0,01
DO <sup>2</sup> (%)	-0,003	0,001	-3,46	<0,01
T (°C)	-0,037	0,011	-3,38	<0,01
$R^2 = 0,33$	$R_a^2 = 0,28$	$\sigma = 0,328$	$F(3, 116) = 6,87$ ( $p < 0,001$ )	

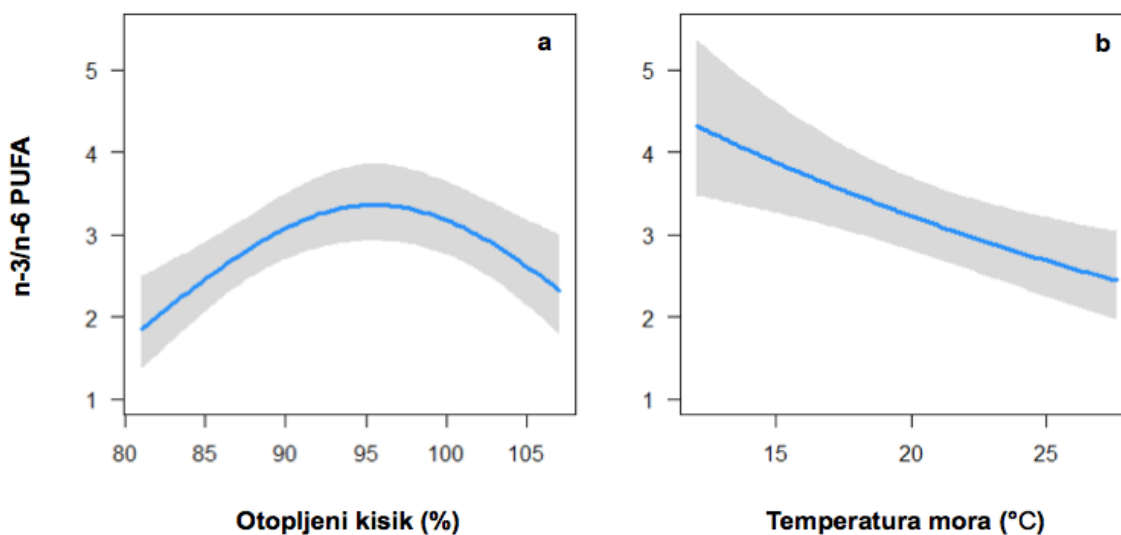
KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija; t = t test; p = razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta;  $R^2$  = kvadrirani regresijski koeficijent;  $R_a^2$  prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent;  $\sigma$  = standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

Na slici 3.48 prikazane su srednje vrijednosti omjera n-3/n-6 PUFA u tkivu kamenica. Najveća srednja vrijednost n-3/n-6 PUFA bila je u veljači (4,9) i travnju (4,2), dok se od lipnja do prosinca kreće između 2,2 i 3. Predviđanja modela dobro prate mjesečne srednje vrijednosti, a najveće odstupanje je u prosincu, siječnju i veljači. U veljači je jedan slučaj dosta veći od ostalih, te bi srednja vrijednost za veljaču bez tog slučaja bila puno bliža predviđanju modela.



**Slika 3.48** Raspršenje varijable omjera n-3/n-6 PUFA u tkivu kamenica u odnosu na mjesec

Na slici 3.49 prikazan je utjecaj otopljenog kisika i temperature mora na omjer n-3/n-6 PUFA u tkivu kamenica. Povećanje zasićenosti kisikom za 5 postotnih bodova, s 85 % na 90 % rezultira relativnim povećanjem omjera n-3/n-6 PUFA za 25,5 %, povećanje zasićenosti kisikom sa 100 % na 105 % rezultira smanjenjem omjera n-3/n-6 PUFA za 17,8 %, a maksimalna se očekivana vrijednost omjera n-3/n-6 PUFA postiže pri 95,6 % zasićenosti kisikom. Svako povećanje temperature mora za 1 °C rezultira smanjenjem očekivanog omjera n-3/n-6 PUFA za 3,6 %.



**Slika 3.49** Regresijska funkcija varijable omjer n-3/n-6 PUFA s obzirom na a) otopljeni kisik i b) temperaturu mora

### 3.10.3. Predviđanje omjera AA/DHA tijekom godine

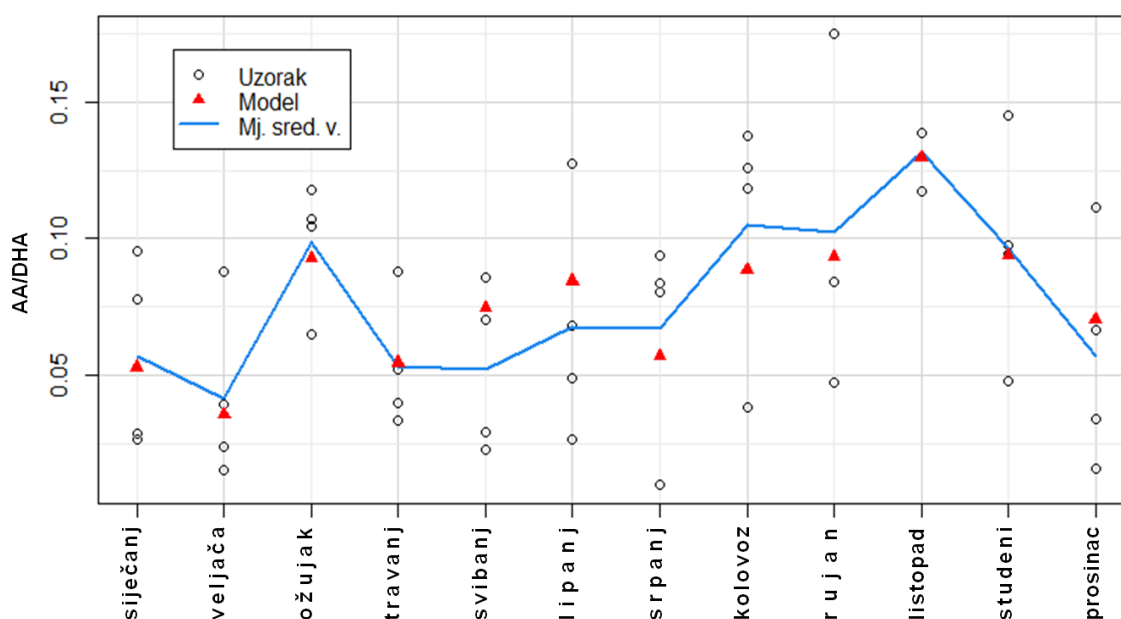
Najveće korelacije omjera AA/DHA zabilježene su za varijable koncentracija nitrita (-0,28) i sulfata (0,50) (Tablica 3.34). Najznačajnija se u odabiru varijabli pokazala koncentracija sulfata. Druge nezavisne varijable nisu se pokazale značajnima, te su najveći doprinos  $R_a^2$  opet imali DO i  $DO^2$ . U Tablici 3.37 prikazani su rezultati za odabrani finalni model. Ukupan model je značajan, kao i koeficijent uz sulfate. Koeficijenti uz linearni i kvadratni član nisu značajni uz razinu značajnosti od 0,05, no ipak su ostavljeni u modelu zbog doprinosa  $R_a^2$  (+0,03), a također i zato što se može očekivati da bi povećanjem veličine uzorka i ti članovi mogli biti značajni. U modelu bez DO i  $DO^2$  koeficijent za varijablu koncentracija sulfata, kao i pripadajuća standardna devijacija, gotovo su isti kao i u modelu u Tablici 3.37. *Lack-of-fit test* nije se pokazao značajnim ( $p = 0,827$ ) pa možemo reći da je dobiveni model dobro prilagođen podacima.  $R^2$  za ANOVA model po mjesecima iznosi 0,39.

**Tablica 3.37** Rezultati regresijske funkcije za varijablu omjer AA/DHA

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	1,328	0,796	1,67	0,103
DO (%)	-0,028	0,017	-1,67	0,101
DO <sup>2</sup> (%)	1,5x10 <sup>-4</sup>	8,8x10 <sup>-5</sup>	1,71	0,094
Sulfati (μmol/L)	0,643	0,170	3,79	<0,001
$R^2 = 0,31$	$R_a^2 = 0,27$	$\sigma = 0,036$	$F(3, 116) = 6,43$ ( $p < 0,01$ )	

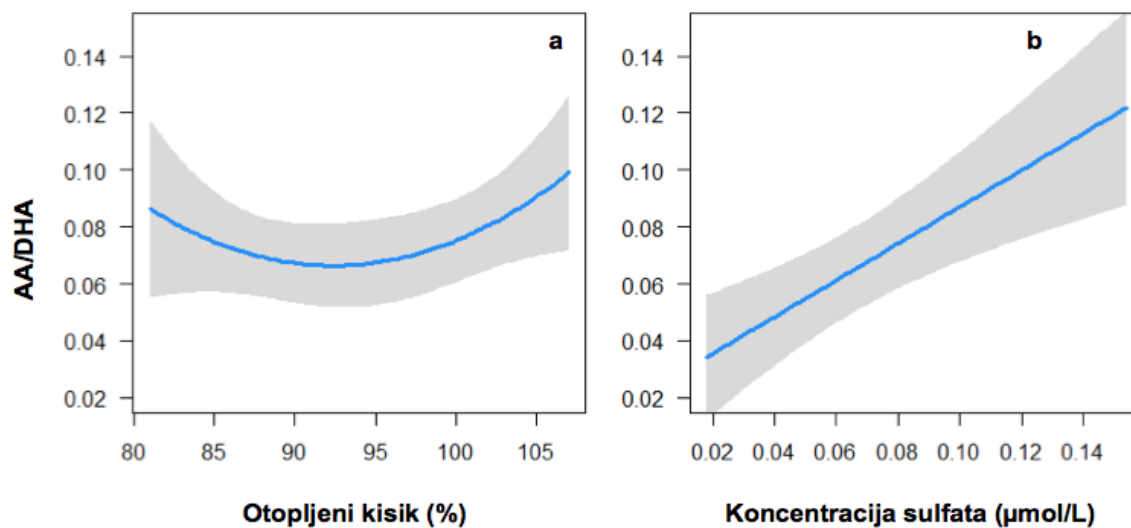
KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija; t = t test; p = razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta;  $R^2$  = kvadrirani regresijski koeficijent;  $R_a^2$  prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent;  $\sigma$  = standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

Od travnja do srpnja omjer AA/DHA u tkivu kamenica kretao se između 0,05 i 0,07, nakon čega se povećava preko 0,10 u ožujku, te postiže maksimum u listopadu (0,13). Zatim se omjer smanjuje i postiže minimum u veljači (0,04). Predviđanja solidno prate mjesečne srednje vrijednosti s umjerenim odstupanjem od svibnja do rujna (Slika 3.50).



**Slika 3.50** Raspršenje varijable omjer AA/DHA u tkivu kamenica u odnosu na mjesec

Na Slici 3.51 vidljiv je utjecaj otopljenog kisika i koncentracije sulfata na očekivani omjer AA/DHA. Povećanje otopljenog kisika s 85 % na 90 % rezultira smanjenjem od 0,008, povećanje otopljenog kisika sa 100 % na 105 % rezultira povećanjem AA/DHA za 0,015 dok se minimum postiže pri 92,4 % zasićenosti kisikom. Za svako povećanje koncentracija sulfata od 0,05  $\mu\text{mol/L}$  omjer AA/DHA se poveća za 0,032.



**Slika 3.51** Regresijska funkcija omjera AA/DHA s obzirom na a) otopljeni kisik i b) koncentraciju sulfata

### 3.10.4. Predviđanje omjera AA/EPA tijekom godine

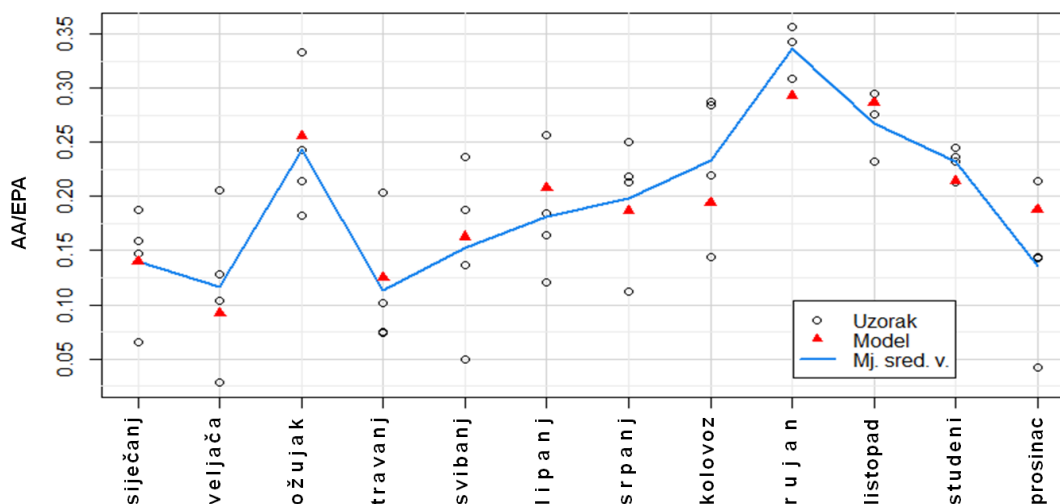
Omjer AA/EPA najveće korelacije ima s varijablama temperatura mora (0,32), koncentracija nitrata (-0,31), nitrita (-0,36) i sulfata (0,51) (Tablica 3.34). Sukladno korelacijama, koncentracija sulfata je najznačajnija nezavisna varijabla u finalnom modelu. Odabrani model još uključuje varijable otopljenog kisika i koncentracije amonijaka sa značajnim koeficijentima pri razini značajnosti 0,01 (Tablica 3.38). *Lack-of-fit test* nije značajan, uz  $p = 0,282$ , pa zaključujemo da je dobiveni model dovoljno dobro prilagođen podacima.  $R^2$  za ANOVA model po mjesecima iznosi 0,60, što nije puno više od modela u Tablici 3.38.

**Tablica 3.38** Rezultati regresijske funkcije za varijablu AA/EPA

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	-0,678	0,259	-2,61	0,012
Sulfati (μmol/L)	1,785	0,304	5,87	<0,001
DO (%)	0,005	0,001	3,58	<0,001
Amonijak (μmol/L)	-0,161	0,050	-3,24	<0,01
$R^2 = 0,49$	$R_a^2 = 0,44$	$\sigma = 0,061$	$F(4, 115) = 9,95$ ( $p < 0,001$ )	

KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija;  $t = t$  test;  $p =$  razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta;  $R^2 =$  kvadrirani regresijski koeficijent;  $R_a^2$  prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent;  $\sigma =$  standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

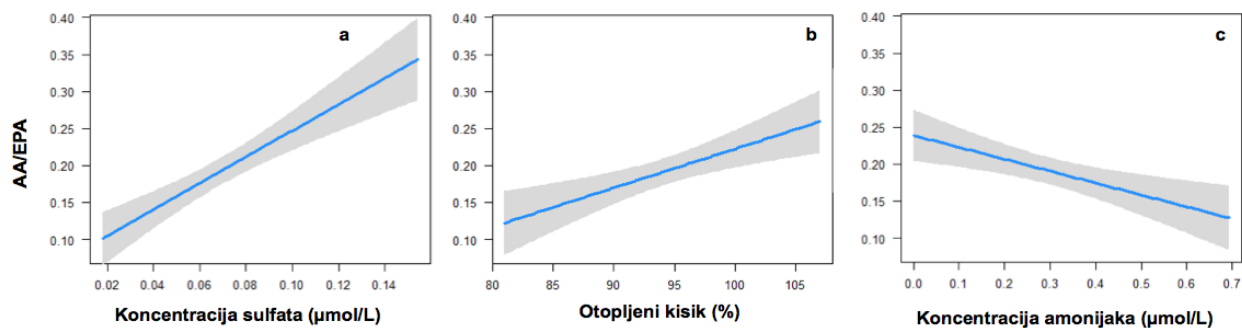
Na Slici 3.52 prikazano je kretanje omjera AA/EPA u tkivu kamenica kroz mjesece. Od travnja do kolovoza mjesečna srednja vrijednost raste gotovo linearno od 0,11 do 0,23, te se u rujnu povećava na maksimalni omjer od 0,34. Potom se omjer smanjuje sve do veljače (0,12), s povećanjem u ožujku (0,24). Predviđanja modela dobro prate mjesečne srednje vrijednosti, s najvećim odstupanjem u rujnu i prosincu.



**Slika 3.52** Raspršenje varijable omjer AA/EPA u tkivu kamenica u odnosu na mjesece

Slika 3.53 prikazuje učinke koncentracije sulfata, otopljenog kisika i koncentracije amonijaka na očekivani omjer AA/EPA u tkivu kamenica. Za svako povećanje koncentracije sulfata od 0,05 μmol/L,

očekivani omjer AA/EPA raste za 0,089. Za povećanje zasićenosti kisikom za 5 postotnih bodova, očekivani rast omjera AA/DHA iznosi 0,026. Povećanjem koncentracije amonijaka za 0,1  $\mu\text{mol/L}$  očekivana vrijednost omjera AA/DHA smanjuje se za 0,016.



**Slika 3.53** Regresijska funkcija varijable AA/EPA s obzirom na varijable a) koncentracija sulfata, b) otopljeni kisik i c) koncentracija amonijaka



### 3.10.5. Predviđanje koncentracije lipidnih peroksida (LP) tijekom godine

Koncentracija lipidnih peroksida ima najveće korelacije s varijablama: salinitet (-0,53), TPM (-0,48), PIM (-0,42), te koncentracijom nitrata (-0,32) i fosfata (-0,56) (Tablica 4.34). Zbog heterogenosti varijance reziduala i postojanja utjecajnih slučajeva, zavisna varijabla je logaritmirana, što je rezultiralo homogenom varijancom i poboljšanom normalnosti reziduala, kao i znatnim smanjenjem utjecaja tih slučajeva.

Značajnom se pokazala linearna veza sa salinitetom, dok je koncentracija nitrata transformirana kvadratnim korijenom zbog postizanja bolje linearnosti. Svi koeficijenti su značajni uz razinu značajnosti 0,001 (Tablica 3.39).

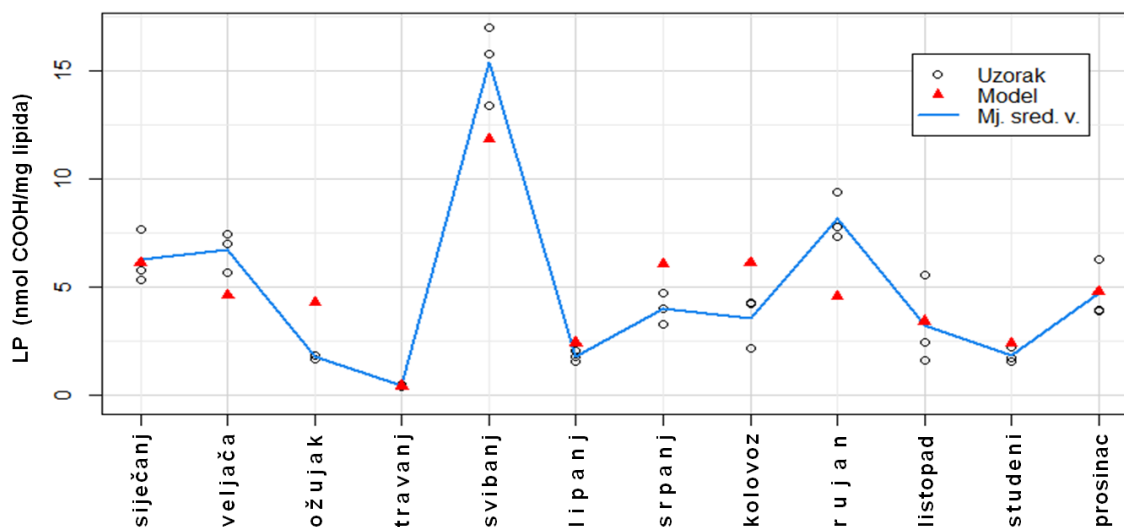
*Lack-of-fit test* je pokazao da postoji značajna razlika između modela u tablici 6 i ANOVA modela po mjesecima ( $p < 0,001$ ). To sugerira da model u Tablici 3.39 možda nije dovoljno kompleksan ili nema pravi oblik regresijske funkcije, no s povećanjem veličine uzorka veći model bi mogao rezultirati *overfittingom*.  $R^2$  za ANOVA model iznosi 0,94.

**Tablica 3.39** Rezultati regresijske funkcije za varijablu log(lipidni peroksidi)

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	11,74	1,582	7,42	<0,001
Nitrati <sup>1/2</sup> (μmol/L)	0,71	0,183	3,91	<0,001
S (psu)	-0,34	0,053	-6,42	<0,001
$R^2 = 0,76$	$R_a^2 = 0,72$	$\sigma = 0,49$	$F(4, 115) = 24,01$ ( $p < 0,001$ )	

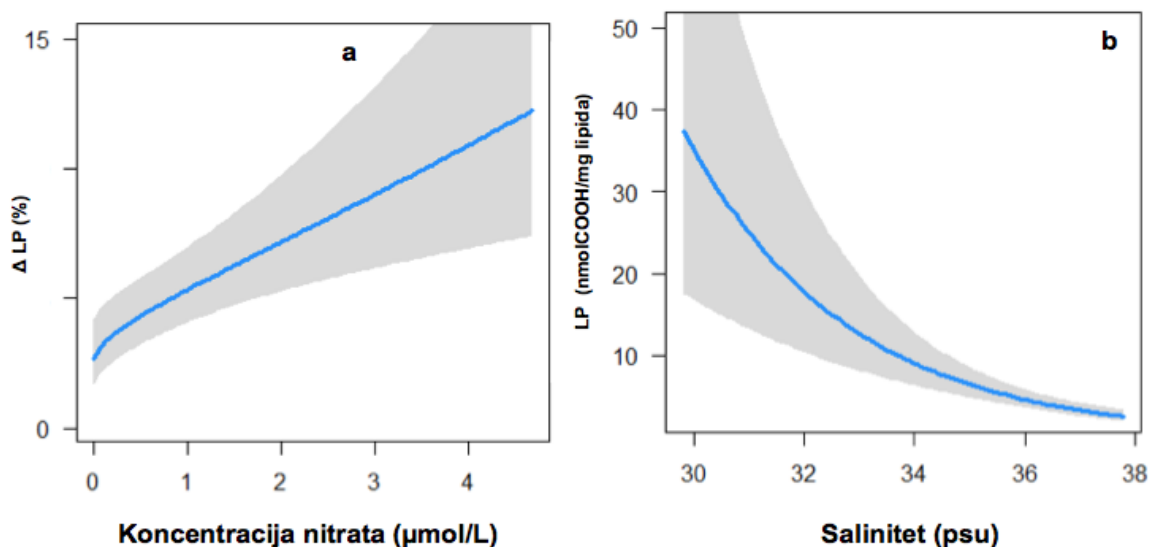
KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija; t = t test; p = razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta;  $R^2$  = kvadrirani regresijski koeficijent;  $R_a^2$  prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent;  $\sigma$  = standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

Na slici 3.54 vidi se kretanje varijable koncentracije lipidnih peroksida u tkivu kamenica po mjesecima. Nakon podjednakih srednjih vrijednosti u siječnju i veljači (cca. 6,5 nmol LOOH/mg lipida), u ožujku je nastupilo naglo smanjenje, te se u travnju postiže minimalna mjesečna srednja vrijednost (0,4 nmol LOOH/mg lipida). U svibnju se postiže maksimum (15,4 nmol LOOH/mg lipida) nakon čega je ponovno naglo smanjenje. Srednje vrijednosti u rujnu još jednom se povećavaju na 8,2 nmol LOOH/mg lipida. Predviđanja modela donekle prate kretanje srednjih vrijednosti, no ima i značajnih odstupanja, što potvrđuje zaključke *lack-of-fit testa*. Najveća odstupanja su u ožujku, svibnju, srpnju, kolovozu i rujnu.



**Slika 3.54** Raspršenje varijable koncentracija lipidnih peroksida u tkivu kamenica u odnosu na mjesece

Na slici 3.55 prikazani su učinci koncentracije nitrata i saliniteta na očekivanu vrijednost koncentracije lipidnih peroksida u tkivu kamenica. Veza koncentracije nitrata i lipidnih peroksida prema Slici 3.54 je gotovo linearna, s iznimkom najmanjih vrijednosti varijable nitrati gdje je regresijska funkcija zakrivljena. Povećanje koncentracije nitrata za 1  $\mu\text{mol/L}$ , s 0,5  $\mu\text{mol/L}$  na 1,5  $\mu\text{mol/L}$  rezultira apsolutnim povećanjem koncentracije lipidnih peroksida od 1,94, nmol LOOH/mg lipida, dok povećanje s 3  $\mu\text{mol/L}$  na 4  $\mu\text{mol/L}$  rezultira apsolutnim povećanjem varijable lipidnih peroksida za 1,90 nmol LOOH/mg lipida. Povećanjem saliniteta mora za 1 psu očekivana vrijednost koncentracije lipidnih peroksida pada za 28,7 %.



**Slika 3.55** Regresijska funkcija LP s obzirom na varijable a) koncentracija nitrata i b) salinitet.

### 3.10.6. Predviđanje koncentracije malondialdehida (MDA) tijekom godine

Za varijablu koncentracija malondialdehida (MDA) najveće korelacije zabilježene su s varijablama temperatura mora (-0,37), pH (0,30), PIM (0,32) te koncentracijom nitrita (0,62) i sulfata (-0,41) (Tablica 3.34). Zbog heterogenosti varijance i postojanja *outliera*, koncentracija MDA je transformirana logaritmom. Iako su pretpostavke modela zadovoljene, ostao je jedan ekstremni *outlier*, i to slučaj s najvećom vrijednošću u veljači (0,75). Taj slučaj je isključen iz daljnje analize.

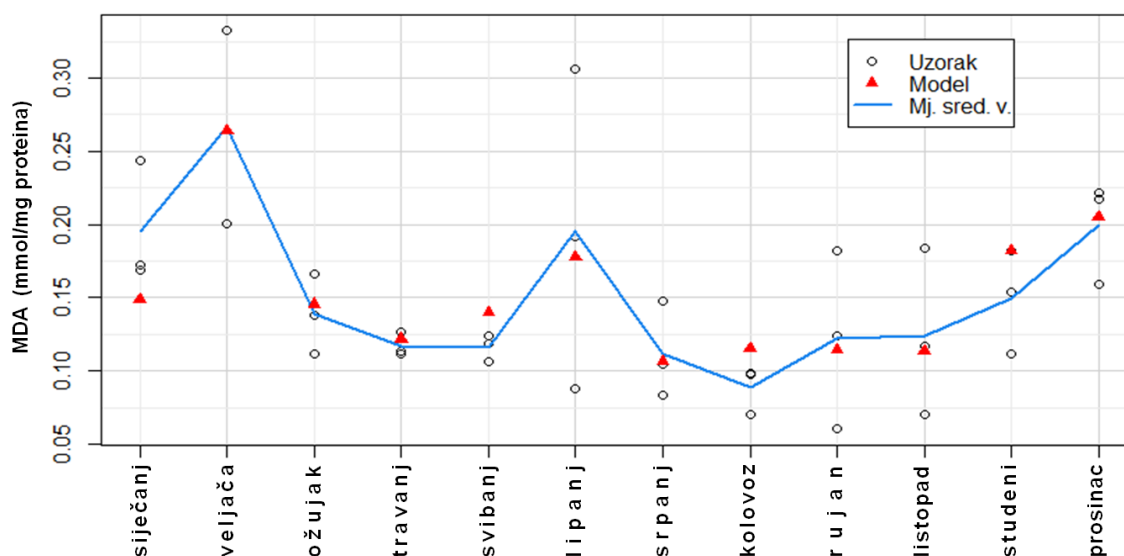
Koncentracija nitrita je u skladu s korelacijama najznačajniji parametar modela, a u model je ušla transformirana kvadratnim korijenom u svrhu postizanja bolje linearnosti. Također je u model ušla varijabla pH, koja je značajna uz razinu značajnosti 0,05. *Lack-of-fit* test nije pokazao značajnu razliku između modela u tablici 7 i ANOVA modela po mjesecima ( $p = 0,79$ ).  $R^2$  za ANOVA model po mjesecima iznosi 0,52 (Tablica 3.40).

**Tablica 3.40** Rezultati regresijske funkcije za varijablu log(MDA)

N = 120	B	SD	t	p
KONST.	-11,235	4,188	-2,68	0,011
Nitriti <sup>1/2</sup> ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,766	0,188	4,08	<0,001
pH	1,096	0,518	2,11	0,042
$R^2 = 0,41$	$R_a^2 = 0,37$	$\sigma = 0,318$	$F(2, 117) = 11,13$ ( $p < 0,001$ )	

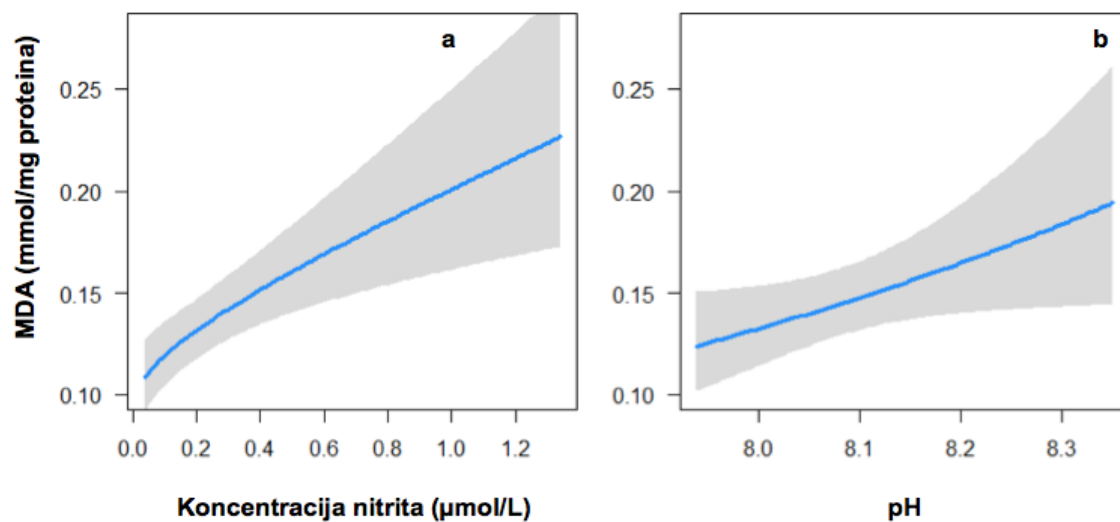
KRATICE: N = broj uzoraka; B = standardizirani koeficijenti modela regresije; SD = standardna devijacija; t = t test; p = razina statističke značajnosti; KONST. = konstanta;  $R^2$  = kvadrirani regresijski koeficijent;  $R_a^2$  prilagođeni (*adjusted*) kvadrirani regresijski koeficijent;  $\sigma$  = standardna devijacija reziduala; F = distribucija modela

Na Slici 3.56 vidljivo je kretanje vrijednosti koncentracije MDA u tkivu kamenica po mjesecima. Od srpnja do listopada srednje vrijednosti variraju između 0,09 i 0,12 mmol/mg proteina nakon čega se povećavaju do maksimalnih 0,27 mmol/mg proteina u veljači (0,43 mmol/mg proteina ako se uzme u obzir izbačeni slučaj). Potom se vrijednosti koncentracije MDA smanjuju, uz odstupanje u lipnju (0,20 mmol/mg proteina). Predviđanja modela dobro prate mjesečne srednje vrijednosti s najvećim odstupanjem u siječnju.



**Slika 4.56** Raspršenje varijable koncentracija MDA u tkivu kamenica u odnosu na mjesec

Na slici 3.57 prikazani su utjecaji koncentracije nitrita i pH na očekivanu koncentraciju MDA u tkivu kamenica. Povećanje koncentracije nitrita za 0,02  $\mu\text{mol/L}$ , s 0,01 na 0,03 rezultira relativnim povećanjem koncentracije MDA za 19,4 %, povećanje s 0,5 na 0,7 rezultira povećanjem od 10,4 %, dok povećanje s 1,0 na 1,2 rezultira povećanjem od 7,6 %. Svako povećanje pH mora od 0,1 rezultira relativnim povećanjem koncentracije MDA za 11,6 %.



Slika 3.57 Regresijska funkcija koncentracije MDA obzirom na koncentraciju nitrita i pH

## 4. RASPRAVA

Uzgoj europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) u Malostonskom zaljevu važan je zbog ekonomskog značenja i nutritivnih kvaliteta ovog školjkaša. Stoga je cilj Nacionalnog strateškog plana razvoja akvakulture za razdoblje od 2014. do 2020. godine povećati proizvodnju kamenica sa 150 t na 1000 t godišnje. Kako bi se uspješno povećala njihova proizvodnja, izuzetno je važno poznavati utjecaj okoliša na biokemijski sastav i zdravstveni status kamenica.

12 čimbenika okoliša grupirano je u četiri zbirne komponente. Principijelnom komponentnom analizom pratili smo ovisnost odabranih mjerenih parametara o četiri zbirne komponente koje opisuju čak 79,1 % varijance mjerenih parametara. Time smo utvrdili koji od zavisnih mjerenih parametara su statistički značajno ovisni o kojim čimbenicima okoliša, grupiranima u četiri zbirne komponente.

Proteini su najzastupljenija biokemijska komponenta u tkivu školjkaša i mogu služiti kao alternativni izvor energije tijekom gametogeneze (Beninger i Lucas, 1984), a u oocitama kamenica čine glavnu organsku tvar (Holland i Spencer, 1973). Proteini osiguravaju izvor energije i materijal za ugradnju prilikom gametogeneze, nakon što se istroše ugljikohidratne i lipidne rezerve (Yuan, i sur., 2009). Smanjenje udjela proteina nakon mrijesta (od rujna do ožujka) zabilježeno je kod mnogih vrsta školjkaša (Berthelin i sur., 2000). U našem istraživanju najmanji maseni udio proteina zabilježen je u lipnju i rujnu, te tako podržava hipotezu koju su predložili Berthelin i sur. (2000), a slične rezultate dobili su Linehan i sur. (1999) prilikom istraživanja sezonskih varijacija biokemijskog sastava u vrijeme mrijesta Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793). U našem istraživanju trend smanjenja masenog udjela proteina zabilježen u hladnijem dijelu godine, od listopada do ožujka. Maseni udio proteina u tkivu kamenica pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju s temperaturom mora i koncentracijom amonijaka, dok s koncentracijom nitrita i salinitetom mora pokazuje negativnu korelaciju. Prema rezultatima istraživanja Galap i sur. (1997) na vrsti školjkaša *Glycymeris glycymeris* da Costa, 1778, proteini su važan alternativni izvor energije za školjkaše u slučaju nestašice hrane, pa možemo pretpostaviti da tijekom uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu u hladnijem dijelu godine prevladava relativna nestašica hrane.

Glikogen predstavlja najvažniju sastavnicu ukupnih ugljikohidrata uz maseni udio od oko 50 % (Robert i sur., 1993), te se prema literaturi udio ugljikohidrata prikazuje kao maseni udio glikogena u tkivu (Park i sur., 2001). Kamenice počinju skladištiti glikogen neposredno nakon perioda mrijesta, kada su vrijednosti glikogena minimalne, a količina glikogena doseže maksimalne vrijednosti nekoliko mjeseci prije slijedećeg mrijesta, kada se glikogen koristi kao izvor energije prilikom proliferacije spolnih stanica (Linehan i sur., 1999; Carić i sur., 2000b). Glikogen uskladišten u proljeće, u vrijeme najveće koncentracije fitoplanktona u moru, koristi se za rast i akumulaciju lipida u oocite tijekom gametogeneze (Abad i sur., 1995). Poznata je činjenica da temperatura mora i povećanje fitoplanktonske mase imaju veliki utjecaj na gametogenezu (Sastry, 1968). Fitoplanktonski cvat u

Malostonskom zaljevu prisutan je u proljeće i jesen, a ponekad i ljeti (Čalić i sur., 2013). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na nakupljanje glikogena od listopada do maksimuma u siječnju, nakon čega slijedi blago smanjenje glikogenskih rezervi i minimalni udjeli u travnju, lipnju i rujnu. Slične rezultate dobili su Ruiz i sur. (1992) u istraživanju provedenom na tkivu Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) uzgajane u Španjolskoj. Sezonske varijacije u sadržaju glikogena visoko su povezane sa sastavom dostupne hrane (Patrick i sur., 2006). U ovom istraživanju udjeli glikogena u tkivu kamenica tijekom godine u pozitivnoj su korelaciji s koncentracijom POM u moru. Smanjenje udjela glikogena vrlo je vjerojatno uvjetovano smanjenjem koncentracije organske partikularne tvari u moru, odnosno zbog gladovanja. U ovom istraživanju koncentracije otopljenih fosfata i sulfata u moru imale su negativan utjecaj na maseni udio glikogena. Kod europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.) iz Malostonskog zaljeva, varijacije u udjelu lipida od travnja do rujna inverzno su povezane s količinom glikogena, što se može objasniti pretvaranjem glikogena u lipide koji se biosintetiziraju tijekom gametogeneze. Ovaj fenomen je već prije dokazan kod različitih vrsta školjkaša (Gabbott, 1975; Whyte i sur., 1990; Berthelin i sur., 2000).

Skladištenje i trošenje rezervi hranjivih tvari u tkivu školjkaša ponajviše ovise o stupnju razvoja gonada, utjecaju okoliša na metaboličke aktivnosti te o količini i sastavu dostupne hrane (Pazos i sur., 1997a). Proteini, ugljikohidrati i lipidi u tkivu morskih školjkaša prolaze kroz sezonske promjene koje su primarno ovisne o vrsti hrane i otopljenim hranjivim tvarima, temperaturi mora, salinitetu i reproduktivnom ciklusu (Gabbott, 1983; Beninger i Lucas, 1984). Općenito, energetske zalihe skladište se u obliku lipida, glikogena i proteina u periodu prije gametogeneze, kada hrane ima u izobilju, a troše se u periodu produkcije gameta kada su metaboličke potrebe povećane (Dridi i sur., 2007). Prema tome, rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu da sezonske varijacije u biokemijskom sastavu kamenica predstavljaju dobar pokazatelj njihovog fiziološkog i prehranbenog stanja tijekom uzgojnog ciklusa i ciklusa gametogeneze. Ovim radom smo potvrdili da su promjene biokemijskog sastava školjkaša povezane s njihovim reproduktivnom ciklusom, kao što je to zaključio i Martinez (1991). Kao dodatna potvrda rezultatima ove studije navodi se i istraživanje biokemijskog sastava pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) kod kojih je stres uslijed gladovanja u kontroliranim uvjetima rezultirao ne samo smanjenjem udjela ugljikohidrata nego i smanjenjem udjela lipida i proteina (Whyte i sur., 1990).

Bojne studije o sezonskim promjenama masnokiselinskog sastava školjkaša (Ruiz i sur., 1992; Robert i sur., 1993; Linehan i sur., 1999; Li i sur., 2000; Costil i sur., 2005; Soletchnik i sur. 2006; Dridi i sur., 2007; Sajjadi i sur., 2009b) prikazuju da akumulacija i trošenje lipidnih rezervi ovisi većinom o utjecaju okolišnih čimbenika na metaboličke aktivnosti.

Analizirani masnokiselinski profil ukupnih lipida kamenica iz Malostonskog zaljeva vrlo je sličan masnokiselinskom sastavu drugih morskih organizama s dominacijom palmitinske kiseline (C 16:0) te visokim udjelima eikozapentaenske kiseline (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) kako je opisano u literaturi (Gruger i sur., 1964; Voogt, 1972; Hayashi i Yamada, 1973; Besnard i sur., 1989; Ahn, i sur., 2000).

Školjkaši dobivaju masne kiseline iz hrane i koriste ih kao izvor energije, odnosno skladište u triacilgicerole ili modificiraju u fosfolipide (Ackman, 1973). Lipidi u tkivu školjkaša, uključujući i kamenice, nisu razvijeni u obliku adipoznog masnog tkiva kao kod viših organizama, već se radi o intracelularnim kapljicama lipida u specijaliziranim stanicama (Vasallo, 1973; Abad i sur., 1995; Pázos i sur., 2003).

Već je od prije poznato kako je udio PUFA kod različitih vrsta riba, rakova i školjkaša u negativnoj korelaciji s temperaturom mora (Piretti i sur., 1988; Chu i sur., 1991), dok se sadržaj SFA mijenja u pozitivnoj korelaciji s temperaturom mora (Pázos i sur., 2003). Veći udio PUFA u tkivu školjkaša je prilagodba na relativno niske temperature morskog okoliša i doprinosi održavanju fluidnosti stanične membrane (Holland, 1973). Na taj način im je omogućeno da ostanu fiziološki aktivne tijekom duljeg razdoblja pri niskim temperaturama mora (Pruitt, 1990). Temperatura mora u ovoj studiji varirala je od 12,1 °C u siječnju do 27,6 °C u srpnju. Maksimalni udio PUFA u tkivu kamenica u Malostonskom zaljevu pronađen je tijekom zimskog dijela godine, nakon povećanja koncentracije ukupne partikularne tvari (TPM) u siječnju i veljači. Povećanje količine PUFA i smanjenje količine SFA u trenutku kada je temperatura mora bila niža može doprinjeti boljem funkcioniranju stanične membrane s obzirom da PUFA imaju niži stupanj tališta od SFA. Fitoplankton iz mora vrlo je bogat višestruko nezasićenim masnim kiselinama EPA i DHA, a ujedno je i glavni izvor za C 18:1n-7, C 18:1n-9 te C 18:2n-6 (LA) i C 18:3n-3 (LNA) (Freites i sur., 2002; Ojea i sur., 2004) što potvrđuje visoki udio PUFA (posebno n-3) u jestivim dijelovima kamenica iz Malostonskog zaljeva. Povećanje udjela PUFA u hladnijem dijelu godine događa se zbog povećanog akumuliranja n-3 PUFA iz hrane, dok je koncentracija SFA bila najveća u toplijem dijelu godine zbog prilagodbe membrana na povišenu temperaturu mora. Primjenom matematičkog modeliranja uspjeli smo predvidjeti povećanje udjela n-3 PUFA i n-3/n-6 omjera u membranama stanica sa smanjenjem temperature mora kao posljedicu povećanja citoplazme i fluidnosti membrana. Prema predloženom modelu, udio n-3 PUFA uzgajane europske plosnate kamenice doseže maksimum kada je temperatura mora između 10 i 18 °C, a postupno se smanjuje tijekom toplijeg dijela godine kada započinje sezona mriješta, što dokazuje ulogu n-3 PUFA kao štitnika membrana i strukturnih elemenata oocita (Ruiz et al., 1992). Slična situacija se događa s modelima koji prate n-3/n-6 PUFA omjer. Za visoki omjer n-3/n-6 PUFA kod morskih riba je utvrđeno da je važan za rast i opstanak, dok niski omjer nije imao utjecaj na funkcioniranje membrane (Brett i Müller-Navarra, 1997). Omjeri n-3/n-6 masnih kiselina tijekom cijele godine istraživanja ukazuju na odličnu fiziološku kondiciju kamenica uzgajanih u Malostonskom zaljevu, kao što predlaže Soudant i sur. (1999).

U ovom istraživanju među masnim kiselinama ukupnih lipida utvrđena je statistički značajna povezanost udjela eikozenske kiseline (C 20:1n-9) s temperaturom mora i koncentracijom nitrita tijekom godine. Kod različitih vrsta školjkaša utvrđeno je da prehrana zooplanktonom doprinosi povećanju eikozenske kiseline (Watanabe i Takeuchi, 1989), što je u ovom istraživanju potvrđeno u periodu od ljeta do jeseni. Iako sastav masnih kiselina školjkaša uglavnom reflektira sastav masnih kiselina njihove hrane (Albentosa i sur., 1996), školjkaši su imaju sposobnost produljenja nekih masnih kiselina (npr. C 16:1n-7 u C 18:1n-7; C 18:1n-9 (olienska kiselina) u eikozensku; EPA u C

22:5n-3; AA u C 22:4n-6 (Albentosa i sur., 1996; Delaporte i sur., 2005) kao i njihovu desaturaciju (npr. 20:3n-6 u AA; ETA u EPA) (Albentosa i sur., 1996). Direktna desaturacija zasićenih masnih kiselina dovodi do konverzije C 16:0 u C 16:1n-9 (palmitoleinska kiselina) i C 18:0 do C 18:1n-9, no ukoliko se produlji lanac od C 16:0 do C 18:0, tada vrijedi C 16:1n-7 + 2C i nastaje C 18:1n-7 i dokaz je procesa produljenja sa zadržavanjem strukture (Monroig i sur., 2013). Metabolizam lipida kod školjkaša nešto je fleksibilniji od toplokrvnih životinja i puno ekonomičniji po pitanju utroška energije, te tako školjkaši produljuju lance 16:1n-7 do 18:1n-7 prije nego li sintetiziraju C 18:1n-9 *de novo* (Monroig i sur., 2013). U ovom istraživanju udio C 18:1n-9 u fosfolipidnoj frakciji bio je jednak kao i kod frakcije triacilglicerola, što znači da se sinteza ove masne kiseline odvija preko zajedničkog izvora (Monroig i sur., 2013).

Kamenice mobiliziraju velike količine masnih kiselina prilikom sazrijevanja spolnih stanica, te imaju sposobnost desaturacije i elongacije masnih kiselina s 18 C atoma za sintezu AA, EPA i DHA (Watanabe i Ackman, 1974). Povećanje udjela DHA i smanjene udjela EPA ukazuju na moguću adaptaciju na biljnu ishranu kao što su mikroalge ili povećanu metaboličku aktivnost elongacije EPA do C 22:5n-3 i desaturacije do DHA (Dunstan i sur., 1996).

U ovom istraživanju omjer AA/EPA statistički je značajno povezan s godišnjim ciklusom, odnosno oscilacijama u temperaturi mora i koncentraciji nitrita i sulfata u moru tijekom godine. U prilog tome ide i potvrda statističke analize matematičkim modeliranjem koje otkriva varijablu koncentracije otopljenih sulfata u moru i otopljenog kisika kao glavne pozitivne prediktore u predviđanju ovog omjera. Matematičkim modeliranjem mogli smo predvidjeti kretanje ove varijable tijekom godine, čime smo potvrdili standardne statističke alate. Za omjer AA/EPA se pretpostavlja da je važan pokazatelj kvalitete mrijesta i ikre kod morske ribe (Furuita sur., 2003; Mazorra i sur., 2003). Utvrđene veće vrijednosti omjera AA/EPA u korelaciji su sa jesenskim periodom mrijesta europske plosnate kamenice uzgajane u Malostonskom zaljevu. Hipoteza koju predlažu Hulbert i Else (1999) o membranama stanica kao metaboličkim „pacemakerima“ može biti primjenjiva i na kamenice, s obzirom da smo uspjeli dokazati specifičnosti bazalnog metabolizma i omjer ugradnje PUFA u stanične membrane tijekom godine. Matematičkim modeliranjem bilo je moguće predvidjeti utjecaj čimbenika okoliša na masnokiselinski sastav ukupnih lipida tkiva kamenica, njihov metabolizam i promjene u fluidnosti membrana. Sezonske varijacije udjela PUFA čini se imaju poveznicu s prehranom kao i s reprodukcijom. Gardner i Riley (1981) objašnjavaju kako se PUFA selektivno koriste kao rezerva energije u periodu nestašice hrane, što može objasniti manji udio EPA i DHA u ukupnim lipidima u srpnju u ovom istraživanju.

Omjer masnih kiselina C 20:3n-6/18:3n-6 također je statistički značajno povezan s temperaturom mora. Ovaj omjer ukazuje na povećanu aktivnost elongaza i produljenje lanaca masnih kiselina u srpnju i kolovozu. Sezonalnost ovog metaboličkog puta biosinteze arahidonske kiseline moguće je objasniti ubrzanjem metabolizma s povećanjem temperature mora što potvrđuju i najviši udjeli AA u srpnju, kolovozu i rujnu koje smo dokazali ovim istraživanjem. Telahigue i sur. (2013) su iz pokusa gladovanja glatke jakovljeve kapice (*Flexopecten glaber* L.) uočili značajno održavanje udjela AA u tkivu, što ukazuje na povećanje ove metaboličke aktivnosti prilikom pripreme za mrijest.



Kako bi školjkaši iskoristili dostupne hranjive tvari filtriranjem mora, a s obzirom na sjedilački način života, moraju prilagoditi stanične funkcije i metabolizam takvom načinu života. Kod školjkaša, kao i kod viših organizama, lipidi služe kao funkcionalne komponente u strukturi stanica u membranama, dok se pohrana lipida i korištenje energije iz lipidnih rezervi bitno razlikuju (Allen, 1976). Da bi bolje razumjeli sudbinu hranom unesenih masnih kiselina nije dovoljno samo analizirati ukupne lipide, već je najvažnije objasniti metode obnavljanja lipidnih frakcija i vrstu obnovljene lipidne frakcije. Gardner i Riley (1972) među prvima su objasnili ulogu dvaju lipidnih razreda među lipidima školjkaša i naglasili važnost u varijacijama masnokiselinskog sastava triacilglicerola i fosfolipida, s obzirom na to da analiza samo ukupnih lipida ne daje potpunu sliku metabolizma školjkaša. Zbog nedostatka informacija o masnokiselinskom sastavu lipidnih frakcija ekonomski uzgajanih vrsta školjkaša, sveobuhvatna analiza provedena u ovome radu, omogućava detaljniji uvid u metabolizam lipida školjkaša.

Masne kiseline u lipidnoj frakciji triacilglicerola skladište se kao izvor energije, a mogu služiti i kao privremeni rezervoar PUFA koje se onda mogu transferirati u strukturalne lipide ili usmjeriti u specifične metaboličke puteve (Ackman, 1983; Napolitano i sur., 1988). Promjene u sastavu masnih kiselina usko su povezane s količinom dostupne hrane, a veći udjeli PUFA ukazuju na dobru prehrambenu kondiciju (Dridi, 2007). Waldock i Nascimento (1979) dokazali su da su udjeli LN, LIN, AA, EPA i DHA u tkivu larvi pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) identični sastavu masnih kiselina algi kojima su se hranile. Vrlo je vjerojatno da su udjeli PUFA masnih kiselina u triacilglicerolima kamenica iz Malostonskog zaljeva integrirani uslijed resorpcije masnih kiselina iz hrane. U ovom istraživanju SFA u frakciji triacilglicerola su varirale od 14,13 % u travnju do 32,97 % u rujnu, a PUFA od 41 % u rujnu do 77,14 % u travnju. Za sezonalne promjene masnokiselinskog sastava triacilglicerola u tkivu kamenica dokazano je da su dobar indikator sazrijevanja spolnih stanica. Najveće varijacije utvrđene su u periodu neposredno prije mrijesta, budući da kamenice pohranjuju triacilgicerole u oocite kako bi osigurale energetske rezerve ličinkama za razvoj (Pernet i sur., 2007). Visoke razine n-3 PUFA i ukupnih PUFA frakcije triacilglicerola zabilježene u proljeće i jesen u odnosu na ljeto upućuju na to da se ova lipidna frakcija troši tijekom sezone mrijesta kao izvor energije te za sintezu vitelogenina (Gallagher and Mann, 1986). U ovoj frakciji DHA pokazuje maksimum od travnja do lipnja što je u korelaciji s koncentracijama hranjivih soli u moru. Smanjenje razine EPA od lipnja do kolovoza može biti objašnjeno sintezom prostaglandina kojima je EPA prekursor ili konverzijom EPA u DHA zbog povećanja aktivnosti  $\Delta^4$  desaturaze (Monroig i sur., 2013). S druge strane Watanabe i Ackman (1974) opisuju omjer ovih dviju masnih kiselina kao 1:2 u korist EPA. Za pojavu povećanog relativnog masenog udjela PUFA (naročito EPA i DHA) u istom periodu spominje se moguća prolagodba školjkaša na niže temperature mora (Holland, 1978). Watanabe i Ackman (1974) istražili su uzroke iskorištavanja masne kiseline C 18:4n-3 iz algi i skladištenja u triacilglicerolima školjkaša i otkrili da se C 18:4n-3 elongira do EPA. U frakciji triacilglicerola udio n-3 masnih kiselina povećavao se od jeseni do proljeća, u ožujku je primjećeno djelomično smanjenje i naglo povećanje u travnju, koje je pratilo ponovno smanjenje u svibnju i lipnju, dok je u ljetnom periodu udio n-3 bio stabilan. Smanjenje udjela n-3 PUFA triacilgicerolne frakcije u periodu između

listopada i studenog vjerojatno je uzrokovano transportom masnih kiselina u gonade ili prehranom sa smanjenim udjelom tih masnih kiselina. Prilagodba američke kamenice (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) na hladno more kroz dulji period uzrokovala je povećanu ugradnju LN i LNA masnih kiselina u triacilglicerolnoj frakciji (Chu i Greaves, 1991). S obzirom na sve navedeno možemo pretpostaviti da se triacilgliceroli zajedno s glikogenom akumuliraju tijekom perioda visoke dostupnosti hrane i iskorištavaju u periodima nedostatka hrane, pa je prema količini i sastavu triacilglicerola moguće utvrditi hranidbenu kondiciju životinja (Fraser i sur., 1985).

U ovom istraživanju u odnosu na ostale lipidne frakcije, udio n-6 masnih kiselina bio je mnogo veći u frakciji triacilglicerola, naročito LA i AA. Relativni maseni udio n-6 PUFA u ljeto i jesen bio je nešto veći nego u proljeće i zimu, sličan rezultat pronašli su Taylor i Savage (2006) u istraživanju godišnjih razlika u udjelima masnih kiselina novozelandske zelenousne dagnje (*Perna canaliculus* Gmelin, 1791).

U frakciji triacilglicerola eikozatetraenoična kiselina (C 20:4n-3, ETA) pokazuje izrazitu negativnu statističku povezanost s temperaturom mora i koncentracijom otopljenih sulfata. S obzirom na povećane udjele u zimskim i proljetnim mjesecima u odnosu na ljeto i jesen možemo pretpostaviti kako je udio ove masne kiseline pokazatelj pojačne aktivnosti elongacije stearidonske kiseline (C 18:4n-3, SDA) u metaboličkom putu sinteze EPA i DHA tijekom zime i proljeća (Monroig i sur., 2013).

Fosfolipidi rijetko imaju značajne udjele SFA osim palmitinske (C 16:0), margarinske (C 17:0) i stearinske (C 18:0), uglavnom zbog nepromjenjivog fosfolipidnog dvosloja staničnih membrane kojeg čine PUFA (Sergent i sur., 2002). Fakras (1979) napominje kako je masnokiselinski sastav fosfolipidne frakcije lipida jedan od glavnih faktora koji kontroliraju fluidnost membrane i stalno se prilagođava temperaturi okoliša. U ovom istraživanju frakcija fosfolipida u tkivu kamenica sadržavala je više PUFA nego SFA, a od PUFA prevladavale su C 16:4n-3, LA, AA, EPA i DHA što ide u prilog identifikaciji sastava staničnih membrana kamenica. U frakciji fosfolipida udio DHA dominirao je tijekom cijele godine, osim u svibnju, što su prikazali Caers i sur. (2000). Glavna uloga DHA je u održavanju strukture i funkcije staničnih membrana. U frakciji fosfolipida udio SFA varirao je od 21,45 % u listopadu do 48,78 % u ožujku, a PUFA od 1,23 % u studenom do 70,08 % u rujnu. Iako se smatra da triacilgliceroli imaju veći udio PUFA nego fosfolipidi, u ovom istraživanju je utvrđeno da je trećina svih masnih kiselina fosfolipida upravo PUFA i to ponajviše EPA i DHA. Pázos i sur. (1997a) objavili su da je udio PUFA kod *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793, naročito fosfolipidne frakcije, negativno povezan s temperaturom mora. Ovaj fenomen se inače objašnjava promjenom fluidnosti sastava masnih kiselina u membranama stanica, s obzirom na veći stupanj tališta PUFA u odnosu na SFA. Istovremeno Besnard i sur. (1989) spominju da je ugradnja PUFA u fosfolipide specifična tijekom proljeća i na početku ljeta. U tom slučaju najveće razine PUFA su u korelaciji s visokom razinom fitoplanktona u moru i reproduktivnim ciklusom, pa je teško usuglasiti ove dvije hipoteze (Furuita et al., 2003; Mazorra et al., 2003). Povećanje nezasićenosti kod membranskih lipida uzrokuje bolju fleksibilnost pri niskim temperaturama (Chu i Greaves 1991; Hazel 1995). U ovom radu utvrđeno je da kamenice podjednako nakupljaju EPA i DHA u fosfolipidnoj frakciji što im omogućuje bolje funkcioniranje u okruženju u kojem žive (Joseph, 1982). U ovom istraživanju fosfolipidna frakcija tkiva

kamenica pokazala je manje oscilacije u masnokiselinskom sastavu tijekom godine. PUFA frakcije fosfolipida imale su manji udio u periodu nakon mrijesta (svibanj, lipanj, srpanj i studeni, prosinac i siječanj), odnosno prilikom oporavljanja gonada. Povećanje vrijednosti n-3 PUFA tijekom sazrijevanja gonada i nagli pad vrijednosti neposredno nakon mrijesta slaže se s istraživanjima na spolnim žlijezdama ženki Jakobove kapice (*Pecten maximus* L.) Besnard i sur. (1989). Kod nekih vrsta školjkaša najveći udio PUFA u fosfolipidnoj frakciji zabilježen je tijekom ljeta (Ackman, 1983). U ovom istraživanju omjer n-3/n-6 PUFA u frakciji fosfolipida bio je veći u usporedbi s ostalim frakcijama iz razloga jer fosfolipidi posjeduju veće udjele n-3 PUFA, a manje n-6 PUFA. Fosfolipidna frakcija, u usporedbi s triacilglicerolima, pokazuje manje varijacije tijekom godine, s obzirom da su fosfolipidi građevni materijal staničnih membrana (Trider i Castell, 1980). Iako su n-3 i n-6 masne keline esencijalne za rast i razvoj školjkaša, veća potreba dokazana je za n-3 masnim kiselinama koje se koncentriraju u tkivu, dok se prisutne i lako dostupne n-6 masne kiseline ne koncentriraju u toj mjeri (Ackman, 1983). Promjena udjela n-6 PUFA fosfolipidne frakcije direktno ukazuje na trošenje strukturnih lipida, što je naročito vidljivo kroz povećanje i smanjenje udjela AA (Child i Lai

koji utječu na reproduktivne procese u mekušaca (Soudant i sur., 1999). U ovom radu, fosfolipidi su sadržavali veći udio AA nego frakcija triacilglicerola u većem dijelu godine. S obzirom da AA ima ulogu prekursora prostaglandina, moguće je stoga da promjene sastava masnih kiselina unutar fosfolipida imaju utjecaja na sintezu prostaglandina (Soudant i sur., 1999). Po potrebi AA se može biosintetizirati iz triacilglicerolne LN (Monroig i sur., 2013).

Masna kiselina C 16:4n-3 bila je prisutna u većem postotku u fosfolipidnoj frakciji nego u triacilglicerolnoj tijekom godine, s maksimalnim vrijednostima u lipnju (35,52 %) nakon perioda mrijesta, dok je smanjenje udjela zabilježeno u svibnju i studenom. Udio C 16:4n-3 masne kiseline u fosfolipidima povećava se s porastom temperature mora, što je vjerojatno posljedica veće prisutnosti partikularne organske tvari (POM) u okolišu (Sargent i sur., 1985; Napolitano i sur., 1997; Pond i sur., 1998)

U ovom istraživanju sastav masnih kiselina fosfolipidne frakcije nije pokazao statistički značajna odstupanja tijekom godine, što su to također dokazali Pázos i sur. (1996) kod pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793). To se može tumačiti ulogom fosfolipida kao strukturnih lipida u biološkim membranama pa su manje podložni utjecajima čimbenika iz okoliša (Tocher i Sargent, 1984).

Slobodne masne kiseline su neesterificirane masne kiseline i ne cirkuliraju slobodno već su obično vezane na neki protein (Napolitano i sur., 1988). Neesterificirane masne kiseline čine manji udio u tkivu beskralježnjaka te mogu biti apsorbirane i akumulirane u organizmu različitim metaboličkim putevima (Takahashi i Yamada, 1973). Tijekom nepravilnog skladištenja školjkaša, masne kiseline se oslobađaju zbog djelovanja fosfolipaza, te se prisutstvo slobodnih masnih kiselina iznad 15% ukupnih lipida smatra lipidnom degradacijom zbog neadekvatnog skladištenja uzoraka (Nachman, 1985). Udio slobodnih masnih kiselina u ovom istraživanju iznosi oko 8,0 % i u skladu je s prijašnjim istraživanjima na beskralježnjacima: 11,8 % (Moreno i sur., 1980) odnosno 4-14 % (Takahashi i Yamada, 1973). U

ovom istraživanju vodilo se računa o pravilnom skladištenju uzoraka kako bi se spriječila razgradnja lipida.

Slobodne masne kiseline karakterizira relativno visok stupanj zasićenosti, pri čemu su C 16:0 i C 18:0 bile najzastupljenije. Svi analizirani uzorci u frakciji slobodnih masnih kiselina imaju manji udio PUFA, posebice n-3, u odnosu na masnokiselinski sastav frakcija triacilglicerola i fosfolipida. Udio n-9 slobodnih masnih kiselina činile su uglavnom MUFA (C 18:1n-9 i C 20:1n-9). Ovim radom utvrđeno je da relativni maseni udio n-9 FA, koje potječu uglavnom iz prehrane mikro algama, ima pozitivnu povezanost s otopljenim kisikom. Zasićenost mora kisikom je važan čimbenik koji ukazuje na produktivnost mora od strane fitoplanktona. Jednostruko nezasićene n-9 masne kiseline su prekursori za *de novo* sintezu NMID masnih kiselina (Zhukova, 1991). Ovaj rezultat podržava teoriju metaboličkog puta biosinteze NMID1 (22:2  $\Delta^{7,13}$ ) (Monroig i sur., 2013), s obzirom da desaturacijom C 18:0 nastaje C 18:1n-9, a njenom elongacijom nastaje C 20:1n-9. Kao konačni produkt ove biosinteze nastaje NMID1, čiji udio u frakciji slobodnih masnih kiselina bilježi porast tijekom proljetnog razdoblja. U ovom istraživanju utvrđen je veliki utjecaj koncentracije otopljenog kisika u moru na moguću aktivaciju metaboličkog puta sinteze NMID1 u slobodnim masnim kiselinama. Moguće je da u nedostatku n-3 i n-6 masnih kiselina putem prehrane, kamenice sintetiziraju NMID masne kiseline kako bi osigurale normalno funkcioniranje stanica. Negativnu korelaciju između razine n-3 PUFA i razine NMID opisao je Klingensmith (1982). Povećanje NMID2 povezano je s manjim vrijednostima EPA kod vrste *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793 (Whyte, 1988). U ovom istraživanju udio EPA bio je najmanji u proljeće, čime možemo potvrditi ove tvrdnje.

Omjer 18:0/16:0 masnih kiselina karakteriziran je kao indeks elongacije masnih kiselina (Monroig i sur., 2013) i u negativnoj je korelaciji s temperaturom mora. U proljetnom razdoblju, pri nižoj temperaturi mora, ovaj indeks potvrđuje pretpostavku o pojačanoj biosintezi NMID1 masne kiseline. Uz povišenje temperature mora u ljetnom i jesenskom razdoblju omjer 18:0/16:0 je smanjen, što ukazuje na smanjenje metaboličke aktivnosti i podržava teoriju o sintezi PUFA koja se odvija pri nižim temperaturama mora s obzirom na stabilnost PUFA i nižu točku tališta (Monroig i sur., 2013).

Uvidom u antioksidativni status školjkaša dobavaju se informacije o sposobnostima za obranu od oksidacijskih oštećenja. U dostupnoj literaturi nisu nađeni podaci o antioksidativnom statusu europske plosnate kamenice u Jadranskom moru. Treća faza istraživanja osmišljena je kako bi se utvrdile sezonske promjene markera oksidativnog stresa u uzgojnoj populaciji kamenica (*Ostrea edulis* L.) iz nezagađenog referentnog mjesta u Jadranskom moru. U tu svrhu korišteno je tkivo cijele kamenice kako bi se utvrdila razina antioksidativne obrane (Livingstone, 1993). Izmjereni su indikatori posredovanog oksidativnog oštećenja staničnih membrane: malondialdehid (MDA) i lipidni peroksidi (LP) te aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-reduktaze (GR) kao antioksidativnih enzima u biotransformaciji slobodnih radikala.

Mjere razine oksidativnog stresa korištene su kao osjetljiv pokazatelj ranog otkrivanja štetnih učinaka u vodenom staništu (Verlecar i sur., 2007). Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti koliko godišnje

oscilacije u moru, vezane za temperaturu, otopljeni kisik i hranjive soli, utječu na oksidacijske reakcije tkiva europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* L.).

Morski školjkaši često se koriste kao biondikatori stanja morskog okoliša i u praćenju razine zagađenja ekosustava, a analiza antioksidativnog statusa koristi se kao specifični biljeg promjena u okolišu (Cajaraville i sur., 2000). Školjkaši su kontinuirano izloženi različitim tipovima okolišnog stresa s obzirom na sjedilački način života i način hranjenja (Goldberg, 1975). Mnoge studije usmjerene prema istraživanju utjecaja okolišnih stresora na školjkaše usredotočene su na pitanje - koji od uvjeta iz okoline potencijalno dovode do stanja oksidativnog stresa - s obzirom da je utvrđena povezanost između okolišnih stresora i stope nakupljanja staničnih reaktivnih kisikovih vrsta (*reactive oxygen species*, ROS) u organizmu (Storey, 1996). Većina školjkaša pokazuje sezonske varijacije metaboličke i enzimatske aktivnosti koje su obje povezane s fizikalnim promjenama u okolišu kao što su: promjena temperature, dostupnost hrane, količina otopljenog kisika i reproduktivni status (Almeida i sur., 2007.) Povišena temperatura mora i visoki udio hrane mogu povećati potrošnju kisika i generiranje staničnog oksidativnog stresa, čiji učinak se kompenzira povećanjem antioksidativne obrane (Livingstone, 1993). Povećanu koncentraciju produkata lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidativnih enzima tijekom zime i proljeća moguće je direktno povezati s povećanom osjetljivošću školjkaša na bolesti tijekom tog perioda (Filho i sur., 2001).

Stanične membrane bogate PUFA su potencijalna meta napada za ROS. Djelovanje ovih reaktivnih vrsta na membranske lipide uzrokuje autokatalitične oksidacijske procese poznate i kao lipidna peroksidacija. Tijekom ovog procesa lipidi se oksidiraju i stvaraju lipidne hidroperoksidi (LOOH<sup>•</sup>) kao primarne produkte. Formiranje LOOH<sup>•</sup> u membranama ometa normalni stanični metabolizam, aktivira adaptivne procese i/ili uzrokuje smrt stanica (Girotti, 1998). Tkiva školjkaša posjeduju veće udjele PUFA pa su stoga školjkaši podložniji lipidnoj peroksidaciji (Pampanin i sur., 2005). Indikatori lipidne peroksidacije stoga se koriste kao biljezi oštećenja stanične membrane slobodnim radikalima. Povećane koncentracije biljega lipidne peroksidacije ukazuju na okolišni stres (Sheehan i Power, 1999). Sezonalnost razine lipidne peroksidacije također se može mijenjati uslijed promjena u reproduktivnom ciklusu i fizikalno-kemijskih parametara mora (Cancio i sur., 1999).

Vrhunac razdoblja mrijesta kod vrste smeđe dagnje (*Perna perna* L.) događa se u kasnu jesen što se podudara s visokom razinom lipidnih peroksida u tkivu tijekom tog razdoblja (Filho i sur., 2001). Kako je već ranije spomenuto, u vrijeme mrijesta povećani su udjeli lipida i ugljikohidrata u tkivima školjkaša, pa su podložniji lipidnoj peroksidaciji te im je potreban dulji period oporavka (Filho i sur., 2001).

U ovom istraživanju koncentracije lipidnih peroksida u tkivu kamenica, koji nastaju kao prvi produkti lipidne peroksidacije, korištene su za otkrivanje ranog oksidativnog stresa (Almeida i sur., 2007). Koncentracija LP u tkivu kamenica u negativnoj je korelaciji s obilježjima sezone Komponenta 1 (TPM, PIM i fosfati) te salinitetom mora, no nije utvrđena statistička značajnost.

Matematičkim modeliranjem za varijablu koncentracija lipidnih peroksida u tkivu kamenica, dizajnirani matematički model predviđa vezu s koncentracijom nitrata, koja je u modelu gotovo linearna, s iznimkom najmanjih vrijednosti. Istovremeno model prikazuje izrazito visoke koncentracije lipidnih peroksida pri nižem salinitetu mora. Iz navedenog možemo pretpostaviti kako veliki priljev slatke vode, bilo iz rijeke Nereve, slivnim ili oborinskim vodama sa sobom nosi i veće koncentracije otopljenih soli (nitrati) te posljedično smanjuje salinitet mora što zajedno doprinosi većoj osjetljivosti školjkaša i lipidnoj peroksidaciji masnih kiselina u membranama stanica. Kamenice obično žive u bočatoj vodi, gdje se mogu pojaviti široke varijacije saliniteta i temperature mora. Kamenice su dobro prilagođene niskom salinitetu <23 psu, iako je predloženo da im bolje odgovaraju uvjeti povišenog saliniteta (> 30 psu) (Laing i sur., 2006), a mogu tolerirati promjene saliniteta u rasponu 15-35 psu bez učinka na ponašanje i hranjenje (Chanley, 1958). Ipak, Korringa (1976) prikazuje da dugotrajne niske razine saliniteta inhibiraju aktivnost hranjenja. Kombinacija niske slanosti i veće temperature mogu izazvati značajanu smrtnost kod kamenica, pa je tako niža dnevna stopa smrtnosti *O. edulis* L. pri niskom salinitetu uočena u kombinaciji s temperaturom mora od 5 °C u usporedbi sa jednakim salinitetom pri temperaturi mora od 10 °C, kada je smrtnost bila veća (Rödström i Jonsson, 2000).

U ovom istraživanju koncentracija malondialdehida u tkivu kamenica, koji nastaje kao završni produkt lipidne peroksidacije, korištena je za otkrivanje kroničnog oksidativnog stresa (Almeida i sur., 2007). Razina MDA u tkivu kamenica povećava se u odnosu na povišenje temperature mora i koncentracije nitrata u moru, no nije utvrđena statistička značajnost. Slične rezultate opisuju Filho i sur. (2001) u probavnoj žlijezdi smeđe dagnje (*Perna perna* L.) tijekom svibnja i studenog kao posljedicu pojačanog metabolizma tijekom sezone mrijesta.

Matematičkim modeliranjem za varijablu koncentracija MDA u tkivu kamenica dizajnirani matematički model predviđa linearnu vezu s koncentracijom nitrata, što podržava već navedeni stresni učinak prevelike koncentracije hranjivih soli u zaljevu na primjeru veće koncentracije lipidnih peroksida. Utjecaj pH mora na očekivanu koncentraciju MDA u tkivu kamenica moguće je objasniti većom osjetljivošću kamenica pri pH mora većem od 8,0, te zaključujemo kako su vrlo male promjene u pH imale učinka na peroksidaciju lipida i stvaranje malondialdehida.

Membranske masne kiseline s dvostrukim vezama podložne su peroksidaciji u prisutnosti slobodnih radikala. Superoksid-dismutaza (SOD) pretvara  $O_2^{\cdot -}$  radikale, nastale prilikom aerobne respiracije i prilikom različitih metaboličkih aktivnosti, do  $H_2O_2$ . U ovom istraživanju izmjerena aktivnost SOD bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom nitrata i salinitetom mora. Promjene u aktivnosti SOD zbog povišene koncentracije otopljenog kisika u moru ne mogu se objasniti povećanom produkcijom slobodnih radikala s obzirom da se topivost kisika u moru smanjuje kako se temperatura mora povećava. Povećanje temperature mora može dovesti do povećane filtracije i hranidbe te posljedično tome do povećane razine metabolizma. Povišena temperatura mora uzrokovala je povećanje aktivnosti SOD i smanjenje koncentracije MDA u tkivu kod *Lobiger serradifalci Calcara*, 1840 i *Oxynoe olivacea* Rafinesque, 1814 (Opisthobranchia, Mollusca) (Cavasa i sur., 2005).

U organizmu podvrgnutom stresu povećava se produkcija ROS, raste koncentracija vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i slobodnih radikala uključujući hidroksi radikal ( $OH^\cdot$ ) i superoksid anion ( $O_2^-$ ). Glutation-reduktaza (GR) je regenerirana od oksidiranog glutationa (GSSG) koji je skupljač slobodnih radikala i supstrat za druge enzime. GR je enzim koji reducira glutation disulfid (GSSG) u sulfhidrilni oblik (GSH) koji je važan stanični antioksidans (Meister, 1988). Za 1 mol GSSG potreban je 1 mol NADPH za redukcijsku reakciju, stoga stanice koje su izložene oksidativnom stresu trebaju velike količine glukoze za proizvodnju NADPH. U ovom istraživanju, od svih ispitivanih antioksidativnih enzima GR ima najveću osjetljivost prema okolišnoj dinamici te varira tijekom godine s maksimalnim vrijednostima u ljeto i zimu, a najveću statističku povezanost ima s koncentracijom nitrita u moru. Sezonske promjene okolišnih čimbenika moduliraju indukciju antioksidativnih enzima kao zaštitnu mjeru protiv stresa koja povećava proizvodnju ROS (Santovito i sur., 2005). Povećana metabolička aktivnost tijekom sezone mrijesta može biti razlog povećanom stvaranju slobodnih radikala koji rezultiraju oksidativnim stresom (Filho i sur., 2001). Ovi autori također potvrđuju kako se  $O_2^-$  radikali stvaraju prilikom povećanih metaboličkih aktivnosti. Sezonske promjene aktivnosti GR uočene su i kod dagnje (*Mytilus edulis* L.) (Manduzio i sur., 2004). Ovi enzimi štite stanice od slobodnih radikala i konjugiraju ih do glutationa, neutralizirajući mjesta vezivanja elektrona i stvaraju produkte topive u vodi. Temperaturni stres aktivira povećanje razine glutationa kao kompenzatorni mehanizam, kako bi omogućio kamenicama da zadrže GSH/GSSG omjer bez obzira na oksidativni stres (Zhang i sur., 2003; Lushchak i sur., 2011). Povećane vrijednosti različitih antioksidansa mogu biti uzrokovane privremenim uzrocima te imati direktnu poveznicu s okolišnim parametrima kao i reproduktivnim ciklusom (Verlecar i sur., 2007).

Ova studija naglašava enzimatske antioksidanse kod kamenica i procjenjuje interakciju okolišnih abiotičkih učinaka. Od mjerenih čimbenika najveći utjecaj imali su temperatura mora, koncentracija otopljenih soli i partikularne tvari u moru, koji utječu na metabolizam rezultirajući akumulacijom ROS (Rajagopal i sur., 2005).

U ovom istraživanju niti jedan od mjerenih parametara oksidativnog stresa nije imao značajnu statističku povezanost s čimbenicima okoliša što možemo pripisati relativno čistom i nezagađenom moru. Aktivnost enzima kao i koncentracije produkata lipidne peroksidacije nisu bile konstantne tijekom godine što se mora uzeti u obzir tijekom budućih istraživanja utjecaja zagađivala na ovu vrstu školjkaša.

Ovim istraživanjem utvrđeno je da godišnje razlike u biokemijskom sastavu, masnokiselinskom sastavu lipida i lipidnih frakcija te antioksidativnom statusu tkiva kamenica mogu nastati zbog složene interakcije između egzogenih abiotičkih i biotičkih čimbenika kao što su temperatura mora, salinitet (Prevodnik i sur., 2007), pH (Lima i sur., 2007) i dostupnosti hrane (Khessiba i sur., 1992), te endogenih čimbenika kao što su reproduktivni ciklus (Filho i sur., 2001).

U istraživanjima iz područja znanosti o okolišu i biotehnologije statistička obrada podataka koristi se isključivo radi dokazivanja uzročno-posljedičnih veza i objašnjenje povezanosti istraživanih varijabli. U ovom istraživanju, pored standardnih statističkih testova, koristili smo tehnike matematičkog

modeliranja u svrhu pronalaženja matematičkih modela koji imaju najbolju točnost predviđanja događaja na osnovi izmjerenih čimbenika okoliša i biokemijskih parametara tkiva kamenica (Shmueli, 2010). Pokušali smo opisivanjem i pronalaženjem matematičkih metoda predvidjeti vrijednosti udjela sume pojedinih skupina masnih kiselina ovisno o njihovom stupnju nezasićenosti, masnokiselinske omjere ukupih lipida, razinu produkata lipidne peroksidacije i njihovu međusobnu ovisnost, te ovisnost o okolišnim čimbenicima tijekom godine, kao što predlažu Čož-Rakovac i sur. (2008) na primjeru biokemijskih parametara krvi riba. U našoj studiji kod *Ostrea edulis* L. prikazali smo vremensku varijabilnost pojedinih abiotskih i biotskih čimbenika okoliša što je rezultiralo značajnom dinamikom masnokiselinskog sastava i anoksiativnog statusa, koji su se mogli predvidjeti matematičkim modelima.

Zasićenje mora kisikom bio je kritičan parametar okoliša koji je imao značajan utjecaj na udio PUFA, osobito n-3 i omjer n-3/n-6 kao i AA/EPA i AA/DHA omjer u tkivu kamenica (**Barišić i sur., 2015**). Ovakvi rezultati također su zabilježeni kod mnogih vrsta algi, kod kojih je povećanje otopljenog kisika u moru uzrokovalo povećanje oksidacije lipida (Juneja i sur., 2013). Također je predloženo da veća topljivost kisika u hladnoj vodi nego u citosolu može stvoriti unutarstanično okruženje s povišenom razinom kisika te potencirati stvaranje ROS (Abele i Puntarulo, 2004.). Povišene razine kisika u okolišu potiču proizvodnju ROS, prilikom čega visoki udio PUFA sugerira visoku osjetljivost na oksidaciju (Crockett, 2008) što čini kamenice osjetljivijima na bolesti. Smanjenje udjela PUFA može ukazivati na oksidativno oštećenje u tkivima kamenicama (Pernet i sur., 2010). Druga mogućnost utjecaja otopljenog kisika može se objasniti varijacijama PUFA izravno kroz predviđanje koncentracije planktona. Visoka zasićenost mora kisikom označava obilje mikrofitoplanktona poput dijatomeja i dinoflagelata. Zooplankton i fitoplankton potrebni su kamenicama za optimalan rast i razvoj, a koncentracija planktona ovisi o stupnju zasićenosti kisikom, a time su indikator visoke proizvodnje u moru. U Malostonskom zaljevu koncentracija dijatomeja dominirala je tijekom jeseni i zime, a dinoflagelata tijekom proljeća i ljeta (Čalić i sur., 2013). Veći udio EPA u tkivu služi kao marker prehrane s dijatomejama, dok je veći udio DHA obično marker za dinoflagelate u prehrani (Ezgeta-Balić i sur., 2012). Zasićenost morske vode kisikom predstavlja važan čimbenik za opstanak i rast kamenice, a niže vrijednosti mogu negativno utjecati na sastav membrana. Precizniji eksperimentalni dokaz kao prilog ovim mogućim mehanizmima i dalje nedostaje, a buduća istraživanja trebala bi usredotočiti se na tu hipotezu. Pomoću matematičkih modela bilo je moguće predvidjeti utjecaj zasićenosti mora kisikom na udio PUFA u tkivu kamenica, što znači da je za maksimalan udio PUFA u tkivu najpogodnija razina otopljenog kisika u morskoj vodi oko 95%.

U slučaju AA/DHA omjera, ekstremne vrijednosti otopljenog kisika od idealne mogu predvidjeti varijacije metabolizma i stupanj staničnog oštećenja. Pretpostavlja se da veći udio AA u tkivima ima ulogu u imunološkom odgovoru školjkaša (Pernet i sur., 2007). DHA ima važnu ulogu na strukturnim i funkcionalnim razinama stanične membrane i sudjeluje u oogenezi i embriogenezi (Hulbert i sur., 1999). Pomoću našeg matematičkog modela može se predvidjeti pojavljivanje mriješta s obzirom da je zabilježena niža razina AA/DHA pri zasićenju mora kisikom od 80-90 %. U isto vrijeme AA/EPA



omjer u korelaciji s otopljenim kisikom može služiti kao prediktor veće koncentracije kisika, što također može biti razlog za izazivanje oksidativnog stresa i izrazite imunološke reakcije u tkivu kamenica.

Otopljene hranjive soli (koncentracija sulfata) mogle su predvidjeti veći omjer AA/DHA i AA/EPA. Sve zajedno, to bi moglo značiti da se većim unosom hrane izgrađuju stanične membrane i lipidi tkiva, ali i da prevelika količina hrane može izazvati stresne uvjete i veći doprinos AA kao dio imunološkog odgovora na ove uvjete (Pernet i sur., 2007). To bi moglo objasniti specifičnu ulogu EPA, koja se odnosi uglavnom na energetske funkcije i korištenje tijekom embriogeneze (Soudant i sur., 1999). «Usko grlo» na predviđenim grafovima pokazuje akumulacije prije razvoja gonada s visokim obiljem hrane i manje udjele EPA u tkivima tijekom mrijesta. Za AA/EPA omjer pretpostavlja se da je važan pokazatelj kvalitete mrijesta i ikre morske ribe (Furuita i sur., 2003), te ličinki i jaja školjkaša. Visoki omjer AA/EPA smatra se mogućim dokazom hranjenja kamenica ličinkama školjkaša (Ezgeta-Balić i sur., 2012).

AA/EPA omjer također je bilo moguće predvidjeti matematičkim modelom u odnosu na razinu amonijaka u morskoj vodi, što znači da visoka razina amonijaka u moru predstavlja neodgovarajuće uvjete za zdravlje i fiziološko stanje kamenica, kao što je to prikazano u drugim morskih beskralješnjacima (Verghese i sur., 2007). Povećanje AA tijekom proljetno-ljetnog razdoblja može uzrokovati istovremeno smanjenje udjela EPA (Pernet i sur., 2007) što upućuje da smanjenje AA/EPA omjera pri većim koncentracijama amonijaka u morskoj vodi može odražavati pojačani imunološki odgovor tkiva kamenica (Pernet i sur., 2010).

## 5. ZAKLJUČCI

- I. Malostonski zaljev ima uobičajene sezonske oscilacije abiotičkih i biotičkih čimbenika okoliša. Tijekom istraživanog razdoblja nisu utvrđene ekstremno visoke niti ekstremno niske vrijednosti čimbenika okoliša (temperatura mora, salinitet, otopljeni kisik i pH mora), koncentracije hranjivih tvari (organska i anorganska partikularna tvar), otopljenih hranjivih soli (nitrati, nitriti, fosfati i sulfati) i koncentracije amonijaka, koje bi imale neočekivani učinak na kvalitetu uzgojne sredine.
- II. Oscilacije čimbenika okoliša tijekom godine pokazuju značajan utjecaj na promjene kvalitativnog i kvantitativnog biokemijskog sastava tkiva kamenica.
- III. Izmjereni smanjeni udio proteina u tkivu kamenica tijekom hladnijeg dijela godine potvrdio je da su proteini važan alternativni izvor energije u slučaju nestašice hrane. Možemo zaključiti da tijekom uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu prevladava relativna nestašica hranjivih tvari u hladnijem dijelu godine.
- IV. Na udio glikogena u tkivu kamenica pozitivno utječu količine raspoložive organske partikularne tvari (POM), a najveće vrijednosti glikogena ustanovljene su u zimskom razdoblju, neposredno prije mrijesta. Varijacije u udjelu lipida od travnja do rujna inverzno su povezane s količinom glikogena, što se može objasniti pretvaranjem glikogena u lipide koji se biosintetiziraju tijekom gametogeneze.
- V. Dinamiku promjena okolišnih čimbenika u Malostonskom zaljevu moguće je koristiti za praćenje varijacija masnokiselinskog sastava lipida. Informacije dobivene ovim istraživanjem ukazuju na godišnje promjene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida i različitih lipidnih frakcija europske plosnate kamenice.
- VI. Sastav masnih kiselina ukupnih lipida ukazuje na vrhunsku kvalitetu kamenica koje su odličan izvor n-3 i n-6 masnih kiselina s obzirom da se udio n-3 i n-6 PUFA u mesu kamenica kreće od 50 mg/100 g tkiva na više. Omjeri n-3/n-6 masnih kiselina bili su značajno viši u zimu i jesen. Povećani omjeri n-3/n-6 masnih kiselina dodatno imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Podaci iz ovog istraživanja upućuju na to da je kamenica nutritivno optimalna za konzumaciju u zimu i proljeće. Promjena udjela eikozenske kiseline (C 20:1n-9) u ukupnim lipidima i promjena omjera masnih kiselina 20:3n-3/18:3n-3 ukazuju na aktivnost metaboličkih puteva produljenja i desaturacije masnih kiselina. U radu smo dokazali izmjenu ugradnje PUFA i SFA u stanične membrane tijekom godine. Dinamika omjera masnih kiselina AA/EPA tijekom godine ukazuje na dobru prilagodbu kamenica i reorganizaciju strukture membrana u ovisnosti o temperaturi mora.

- VII. U radu je dokazana najveća promjenjivost udjela masnih kiselina lipidne frakcije triacilglicerola (TAG) čime je potvrđena uloga triacilglicerola kao energetske rezerve kamenica. Oscilacije udjela eikozatetraenoične kiseline (C 20:4n-3, ETA) triacilglicerolne frakcije ukazuju na pojačanu aktivnost elongacije stearidonske kiseline (C 18:4n-3, SDA) u metaboličkom putu sinteze EPA i DHA tijekom zimskog i proljetnog razdoblja. Visoka temperatura i koncentracija sulfata negativno su utjecali na aktivnost ovog metaboličkog puta.
- VIII. U ovom radu dokazali smo da masne kiseline lipidne frakcije fosfolipida (PL) nisu imale značajnije oscilacije tijekom godine što je u skladu s njihovom strukturalnom funkcijom u staničnim membrana kamenica.
- IX. Izmjerene promjene sastava masnih kiselina u frakciji slobodnih masnih kiselina (SMK) otkrivaju povećanu aktivnost metaboličkog puta sinteze NMID masnih kiselina preko n-9 preteća u periodu nestašice EPA. Istovremeno, promjenjiv omjer masnih kiselina 18:0/16:0 ukazuje na pojačanu aktivnost elongacije masnih kiselina pri niskoj temperaturi mora. Ova studija je po prvi put pokazala postojanje, porijeklo i korištenje NMID masnih kiselina u interpretaciji metaboličkih puteva masnih kiselina europske plosnate kamenice.
- X. Masnokiselinski sastav tkiva kamenica uzgajanih u Malostonskom zaljevu rezultat je utjecaja koncentracije hranjivih tvari, fizikalno-kemijskih parametara mora, oksidativnog stresa, kinetike desaturacije i elongacije masnih kiselina te brojnih još uvijek nerazjašnjenih uzroka.
- XI. Podaci dobiveni ovim istraživanjem prikazuju godišnje promjene u antioksidativnom statusu te predstavljaju vrijedan pokazatelj oscilacija fiziološkog stanja kamenica uzgajanih u čistom okruženju. Ovi se rezultati trebaju uzeti u obzir prilikom monitoringa zagađenosti okoliša, ekotoksikoloških studija na kamenicama, te prilikom unaprijeđenja tehnoloških procesa uzgoja kamenica.
- XII. Opisivanjem i pronalaženjem međuovisnosti matematičkim metodama bilo je moguće predvidjeti sastav masnih kiselina ovisno o njihovom stupnju nezasićenosti, masnokiselinske omjere, razinu produkata lipidne peroksidacije kao i njihovu međusobnu ovisnost, te ovisnost o okolišnim čimbenicima tijekom godine.
- XIII. Primjenom matematičkog modeliranja tj. dizajniranjem modela koji predviđaju reakcije kamenica na okolišne čimbenike otkriveno je da su udjeli n-3 masnih kiselina i omjer n-3/n-6 PUFA ovisni o temperaturi mora i zasićenosti mora kisikom. Ovi modeli mogli bi se primijeniti i na druge vrste školjkaša, za promicanje kvalitete hrane iz mora, poboljšanje uvjeta uzgoja i proizvodnje, kao i optimiziranje uvjeta u kontroliranim pokusima.

- XIV. Analognom primjenom matematičkog modeliranja otkriveno je da su omjeri masnih kiselina AA/EPA i AA/DHA ovisni o količini otopljenog kisika, koncentraciji sulfata i salinitetu mora.
- XV. Primjenom matematičkog modeliranja predviđeno je da su za oksidativni stres kod kamenica odgovorni povećanje koncentracije nitrata i nitrita u moru, povećanje pH te smanjenje saliniteta mora.

## 6. LITERATURA

1. Abad, M., Ruiz, C., Martínez, D., Mosquera, G., Sánchez, J.L., 1995. Seasonal variation of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrao (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C, 2, 109-118.
2. Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 138A, 405-415.
3. Ackman, R.G., 1974. Marine lipids and fatty acids in human nutrition, in *Fishery Products* (ed. R. Kreuzer), Fishing News Books, West Byfleet, UK, pp. 112–31.
4. Ackman, R.G., 1983. Fatty acid metabolism of bivalves. In: Pruder, G.O., Langdon, C., Conklin, D. (Eds.), *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Proceedings of the 2nd Conference on Aquaculture Nutrition*. Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA, pp. 358-376.
5. Ackman, R.G., Hooper, S.N., 1973. Non-methylene interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: A comparison of two mollusks (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with the sand shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 46:153-165.
6. Ahn, I.Y., Cho K.W., Choi K.S., Seo Y., Shin J., 2000. Lipid content and composition of the Antarctic lamellibranch, *Laternula elliptica* (King & Broderip) (Anomalodesmata: *Laternulidae*), in King George Island during an austral summer. *Polar. Biol.* 23, 24-33.
7. Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A., 2007. Response of two species of clams *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol.* 146B, 241-249.
8. Albentosa, M., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., 1996. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 113A, 113-119.
9. Allen, W.V., 1976. Biochemical aspects of lipid storage and utilization in animals. *Amer. Zool.* 16, 631-647.
10. Almeida, A.E., Bainy, A.C.D., Loureiro, A. P. M., Martínez, G. R., Miyamoto, S., Onuki, J., et al. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol.* 146, 588–600.
11. Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 1, 21–30.
12. Aníbal, J., Esteves E., Rocha C., 2011. Seasonal Variations in Gross Biochemical Composition, Percent Edibility, and Condition Index of the Clam *Ruditapes decussatus* Cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *J. Shellfish Res.* 30, 1, 17-23.

13. Arts, M.T., Ackman, R.G., Holub, B.J., 2001. Essential fatty acids in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 122-137.
14. Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), 2009. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer. New York. 377 pgs.
15. Balenović, R., 1981. Hidrografske prilike u Malostonskom zaljevu i Malom moru. U: Roglić, J., Meštrov, M. (ur.), *Zbornik radova savjetovanja Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje*. JAZU. Znanstveni savjet za zaštitu prirode. Dubrovnik, 66-76.
16. Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clearandeu, C., Jebali, J., Boussetta, H., 2008. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in clams *Ruditapes decussates* sampled from Tunisian coastal areas. *Environ. Monit. Assess.* 155, 1-4, 119-128.
17. **Barišić, J.**, Čož Rakovac, R., Delaš, I., Topić Popović, N., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Brailo, M., Sauerborn Klobučar R., Strunjak-Perović, I. (2015): Integral predictive modeling of European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) fatty acid composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. (prihvaćen za objavljivanje).
18. Basioli, J., 1981. Uzgoj školjaka na istočnoj obali Jadranskog mora s posebnim osvrtom na Malostonski zaljev, u: *Zbornik sa savjetovanja Malostonski zaljev. Prirodna podloga i društveno valoriziranje*, JAZU, 268-281.
19. Bayne, B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. In: Viley ML (ed) *Estuarine processes*. Academic press, New York, 432-448.
20. Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Médoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75, 354-373.
21. Beninger G.P., Lucas A., 1984. Seasonal variation in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 19-37.
22. Benović, A., 1997. The History, Present condition, and Future of the Molluscan Fisheries of Croatia, NOAA Tech. Rep. NMFS, 129, 217-226.
23. Benović, A., 2008. Malostonski zaljev - osnovne biološke i ekološke značajke. U: Pavić, A. (ed.) *Oživljavanje i razvitak ruralnog prostora općine Dubrovačko primorje*. SLAP-Udruga za očuvanje hrvatskih voda i mora, Zagreb. 44-50.
24. Bergé, J.P., Barnathan, G., 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96, 49-125.
25. Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* 125B, 359-369.
26. Besnard J.Y., Lubet P., Nouvelot A., 1989. Seasonal variations in the fatty acids content of the neutral lipids and phospholipids in the female gonade of *Pecten maximus* L. *Comp. Biochem. Phys.* 93B, 21-26.

27. Bocchetti, R., Lamberti, C.V., Pisanelli, B., Razzetti, E.M., Maggi, C., Catalano, B., Regoli, F., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environ. Res.* 66, 1, 24–26.
28. Borkovic-Mitic, S., Kovacevic, T., Perendija, B., Despotovic, S., Gavric, J., Pavlovic, S.Z., Saicic, Z., 2011. Superoxide dismutase and catalase activities in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio pictorum* from the Sava river. *Arch. Biol. Sci.* 63, 1, 185–192.
29. Borković, S.S., Saponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milosević, S.M., Kovačević, T.B., Saičić, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Phys.* 141C, 4, 366–74.
30. Brett, M., Müller-Navarra, D., 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biol.* 38, 3, 483–499.
31. Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum*. *Aquaculture.* 170, 307–322.
32. Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 2000. Impact of starvation and of feeding algal and artificial diets on the lipid content and composition of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) and clams (*Tapes philippinarum*). *Mar. Biol.* 136, 891-899.
33. Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
34. Čalić, M., Carić, M., Kršinić, F., Jasprica, N., Pećarević, M., 2013. Controlling factors of phytoplankton seasonal succession in oligotrophic Mali Ston Bay (south-eastern Adriatic). *Environ. Monit. Assess.* 185, 9, 7543-63.
35. Camus, L., Gulliksen, B., Depledge, M.H., Jones, M.B., 2005. Polar bivalves are characterized by high antioxidant defences. *Polar Res.* 24, 1-2, 111–118.
36. Cancio, I., Ibabe, A., Cajaraville, M.P., 1999. Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Phys.* 123C, 2, 135–44.
37. Cano, J., Rosique, J.M., Rocamora, J., 1997. Influence of environmental parameters on reproduction of the european flat oyster (*Ostrea edulis* L.) in a coastal lagoon (Mar Menor, Southeastern Spain). *J. Mollus. Stud.* 63, 2, 187-196.
38. Carić, M., Jasprica N., Viličić. D., 1992. Nutrient and chlorophyll a concentrations in Gruž and Mali Ston Bays (Southern Adriatic). *Rapp. Comm. Int. Mer. Médit.* 33, 367.
39. Carić, M., Jasprica, N., Čalić, M., Batistić, M., 2011. Phytoplankton response to high salinity and nutrient limitation in the eastern Adriatic marine lakes. *Sci. Mar.* 75, 3, 493-505.
40. Carić, M., Jasprica, N., Kršinić, F., 2000a. Kamenica u Malostonskom zaljevu. *Dubrovnik, Matica hrvatska.* 11, 1-2, 217-226.

41. Carić, M., Onofri, V., Kršinić F., 2000b. Biokemijski sastav kamenice u Malostonskom zaljevu. Zbornik sažetaka priopćenja sedmog hrvatskog biološkog kongresa. Nikola Ljubešić (ur.). Zagreb, Hrvatsko biološko društvo. 254-255.
42. Cavasa, L., Yurdakoca, K., Yokesb, B., 2005. Antioxidant status of *Lobiger serradifalci* and *Oxynoe olivacea* (Opisthobranchia, Mollusca). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 314, 2, 227–235.
43. Chanley, P., 1958. Survival of some juvenile bivalves in water of low salinity. Proc. Natl. Shellfish Assoc., 48, 52-65.
44. Child, A. R., Laing, I., 1998. Comparative low temperature tolerance of small juvenile European, *Ostrea edulis* L., and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. Aquacult. Res. 29, 2, 103–113.
45. Christie, W.W., 1989. Gas chromatography and lipids. The Oily Press. Dundee Scotland.
46. Christie, W.W., 2003. Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Third Edition. The Oily Press. Dundee Scotland.
47. Chu, F.L.E., Greaves, J., 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters. *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 110, 229-236.
48. Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 122-131.
49. Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). Helgoland Mar. Res. 59, 286–300.
50. Čož-Rakovac, R., Šmuc, T., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Hacmanjek, M., Jadan, M., 2008. Novel methods for assessing fish blood biochemical data. J. Appl. Ichthyol. 24, 77-80.
51. Crockett, E.L., 2008. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. J. Comp. Physiol. 178B, 795-809.
52. da Silva, P.M., Fuentes, J., Villalba, A. 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ria de Arousa (Galicia, NWSpain). Mar. Biol. 147, 965-977.
53. De Luca-Abbott, S., Richardson, B., McClellan, K., Zheng, G., Martin, M., & Lam, P., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 51, 694-707.
54. De Zwaan, A., Zandee, D. I., 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. 43A, 1, 53-58.
55. Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty Y., Samain., J.F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Comp. Biochem. Phys. 140A, 460-470.
56. Delaš, I., 2011. Benefits and hazards of fat-free diets. Trends Food. Sci. Tech. 22, 10, 576-582.



57. Devasagayam, T.P.A., Boloor, K. K., Ramasarma, T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J. Biochem. Bio.* 40, 5, 300–8.
58. Di Giulio, R., Washburn, P., Wenning, R., Winston, G., & Jewell, C., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Envir. Toxicol. Chem.* 8, 1103-23.
59. Domijan, A.M., Ralić, J., Radić Brkanac, S., Rumora, L., Žanić-Grubišić, T., 2015. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL – application to various biological samples. *Biomed. Chromatogr.* 29, 1, 41-46.
60. Dridi, S., Romdhane, M.S., Elcafsi, M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture.* 263, 238-248.
61. Dunphy, B.J., Wells, R.M.G., Jeffs, A.G., 2006. Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and intertidal Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Responses to temperature and starvation, *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 40, 1, 149-158.
62. Dunstan, G.A., Baillie, H.A., Barrett S.M., Volkman J.K., 1996. Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture.* 140, 115–127.
63. Eghtesadi-Araghi, P., Bastami, K.D., 2011. An integrated approach on interconnected effects between selected environmental parameters and fatty acid composition in mollusks. *Res. J. Environ. Sci.* 5, 4, 310-315.
64. Ezgeta-Balić, D., Lojen, S., Dolenc, T., Žvab Rožič, P., Dolenc, M., Najdek, M., Peharda, M., 2014. Seasonal differences of stable isotope composition and lipid content in four bivalve species from the Adriatic Sea. *Mar. Biol. Res.* 10, 6, 625-634.
65. Ezgeta-Balić, D., Najdek, M., Peharda, M., Blažina, M., 2012. Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. *Aquaculture.* 334, 89-100.
66. FAO, 2004-2015. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Ostrea edulis*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Goulletquer, P. U: FAO Fisheries and Aquaculture Department Rome.
67. Farkas T., 1979. Adaptation of fatty acid compositions to temperature - study on planktonic crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B, 1, 71-76.
68. Federal, U., Catarina, D.S., Maria, D.S., Maria, S., 2008. Scientific note lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Ciênc. Anim. Bras.* 9, 3, 811-814.
69. Filho, D.W., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhaes, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture.* 203, 149–158.
70. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 1, 497-509.
71. Fraser, A. J., Tocher, D.R., Sargent J.R., 1985. Thin-layer chromatography - flame ionization detection and the quantification of marine neutral lipids and phospholipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 88, 91-59.

72. Freitas, L., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta. U., 2002. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B, 453-461.
73. Freitas, L., Mendoza, J., Guevara, M., 2009. Influence of spat origin and environmental parameters on biochemical composition and biometry of the brown mussel *Perna perna* (Linné , 1758), under culture conditions, *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 44, 2, 343–355.
74. Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture.* 220, 725–735.
75. Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: an hypothesis concerning the relation between glycogen and gametogenesis. In: Barnes, H. (Ed.), *Proceedings of the Ninth Eur. Mar. Biol. Symp.* Aberdeen Univ. Press, Aberdeen, Scotland, 191-211.
76. Galap, C., Leboulenger, F., Grillot, J.P., 1997. Seasonal variations in biochemical constituents during the reproductive cycle of female dog cockle *Glycymeris glycymeris*. *Mar. Biol.* 129, 625-634.
77. Gallager. S.M., Mann. R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56, 105-12f.
78. Gardner, D., Riley, J.P., 1972. The components fatty acids of the lipids of some species of marine and freshwater molluscs. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 52, 827-838.
79. Gavrilović, A., 2011. Utjecaj planktona na morfohistokemijske i biokemijske osobine probavnog sustava kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) Malostonskog zaljeva. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 163 pp.
80. Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Bonacic, A.M., Bonacic, K., Ljubicic, A., Van Gorder, S., 2011. The influence of environmental parameters on the growth and meat quality of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) *Aquacult. Aquarium Conserv. Legis.* 4, 5, 573-583.
81. Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Gjurčević, E., Ljubičić. A., 2008. Utjecaj indeksa kondicije i stupnja infestacije ljušture polihetom *Polydora spp.* na kvalitetu europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758) iz Malostonskog zaljeva. 2 Zbornik radova, 43 Hrvatski i 3 Međunarodni simpozij agronoma, Opatija, Hrvatska. Pospišil, M. (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska. 742-746.
82. Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubičić, A., Conides, A., Strunjak-Perović, I., Topić Popović, N., Jadan, M., Čož-Rakovac, R., Van Gorder, S., 2010. Meat quality of European flat oyster *Ostrea edulis* in relation with variations of different environmental parametars in the bay of Mali ston. *Proceedings of the European Aquaculture Society Conference.* Porto, Portugal.
83. Gavrilović, A., Petrincec, Z., 2003. Proizvodnja i tehnologija uzgoja kamenica *O. edulis* u Malostonskom zaljevu – perspektive razvoja. *Veterinarska stanica.* 34, 1, 5-11.

84. Gavrilović, A., Srebočan, E., Pompe-Gotal, J., Petrinc, Z., Prevendar Crnić, A., Matašin, Ž., 2007. Spatiotemporal variation of some metal concentrations in oysters from the Mali Ston Bay, south-eastern Adriatic, Croatia - potential safety hazard aspect. *Vet. Med.* 52, 457-463.
85. Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542.
86. Glamuzina, B., 2009. Završno izvješće VIP projekta: Proizvodnja mlađi malostonske kamenice, Voditelj: prof.dr.sc. Branko Glamuzina, Sveučilište u Dubrovniku.
87. Glamuzina, B., Bavčević, L., Marguš, D., 2009. Integralni planovi razvoja školjkarstva. UNDP. Hrvatska, 178 pp.
88. Glamuzina, B., Dulčić, J., 2009. The Fishing and Mariculture Industries (Croatia) A Climate for Change: Climate change and its impacts on society and economy in Croatia. Human Development Report, Croatia 2008. Landau, Seth; Legro, Susan; Vlašić, Sandra (ed.). Zagreb: UNDP in Croatia, 150-164.
89. Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch - a first step in global marine monitoring *J. Mar. Pollut. Bull.* 6, 111.
90. González-Araya, R., Lebruna, L., Quéréc, C., Roberta, R., 2012. The selection of an ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B). *Aquaculture.* 362–363, 55–66.
91. Goulletquer, P., 2004. Cultured Aquatic Species Information Programme – *Ostrea edulis*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). FAO, Rome.
92. Gruger, E.H., Nelson, R.W., Stansby, M.E., 1964. Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater fish and shellfish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41, 662–667.
93. Hamdani, A., Soltani-Mazouni, N., 2011. Changes in Biochemical Composition of the Gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria) in relation to reproductive events and pollution. *Jordan J. Biol. Sci.* 4, 3, 149–156.
94. Hannachi, O., Bouakka, M., Melhaoui, M., Hakkou, A., 2011. Seasonal evolution of the biochemical composition of the Moroccan Mediterranean cost anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Adv. Environ. Biol.* 5, 7, 1787-1793.
95. Hasanspahić, H., 2011. The effects of refrigeration on sensory characteristics of oysters (*Ostrea edulis*) *Meso.* 13, 5.
96. Haure, J., Penisson, C., Bougrier, S., Baud, J.P., 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture.* 169, 211-224.
97. Hayashi, K. Yamada, M., 1973. Studies on the lipids of shell-fish. II. On the lipid composition of Japanese prickly scallop. *Bull. Fao. Fish. Hokkaido Univ.* 39, S09-S17.
98. Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
99. Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 1, 189–198.

100. Holland, D. L., Spencer, B. E., 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early growth. J. Mar. Bio. Assoc. 53, 287-298.
101. Hrs-Brenko, M., 1982: *Ostrea edulis* Linnaeus and *Crassostrea gigas* Thunberg larvae in the plankton of Limski Kanal in the northern Adriatic Sea. Acta Adriat. 231-2, 399-407.
102. Hulbert, A.J., Else, P.L., 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. J. Theor. Biol. 199, 257-274.
103. Ito, M.K., Simpson, K.L., 1996. The biosynthesis of omega 3 fatty acids from 18:2 omega 6 in *Artemia* spp. Comp. Biochem. Physiol. 115B, 69–76.
104. Jasprica, N., Carić, M., Bolotin, J., Rudenjak-Lukenda, M., 1997. The Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) growth rate response to phytoplankton and microzooplankton population densities in the Mali Ston Bay (southern Adriatic). Period. Biol. 99, 255-264.
105. Jasprica, N., Carić, M., 1997. A comparison of phytoplankton biomass estimators and their environmental correlates in the Mali Ston Bay (Southern Adriatic). Mar. Ecol. 18, 35-50.
106. Joseph, J.D., 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Prog. Lipid Res. 21, 109-153.
107. Jug-Dujaković, M., 2008. Mogući oblici zaštite i identifikacije malostonske kamenice na tržištu. Naše More. 55, 5-6, 262-268.
108. Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production. Energies. 6, 4607-4638.
109. Kaluzny, M.A., Duncan, L.A., Merritt, M.V., Epps D.E., 1985 Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. J. Lipid. Res. 26, 1, 135-140.
110. Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, A.H., Levi, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. Environ. Health Perspect. 106, 375-384.
111. Khessiba, A., Romeo M., P. Aissa, P., 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. Environ. Pollut. 133, 275-81.
112. Klingensmith, J.S., 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). Lipids. 17, 976-981.
113. Kljaković-Gašpić, Z., Ujević, I., Zvonarić, T., Barić, A., 2007. Biomonitoring of trace metals (Cu, Cd, Cr, Hg, Pb, Zn) in Mali Ston Bay (eastern Adriatic) using the Mediterranean blue mussel (1998-2005). Acta Adriat. 48, 73-88.
114. Koroleff, F., 1983. Methods of seawater analysis. Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (Eds). Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
115. Korringa, P., 1976. Farming the Flat Oysters of the Genus *Ostrea*. Developments in aquaculture And Fisheries Science, Vol. 3. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.

116. Laing, I., Walker, P., Areal, F., 2006. Return of the native - is European oyster (*Ostrea edulis*) stock restoration in the UK feasible? *Aquat. Living Resour.* 19, 283-287.
117. Lam, P., Gray, J., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 182-186.
118. Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 3, 278–87.
119. Lapègue, S., Beaumont, A., Boudry P., Gouletquer, P., 2007. European flat oyster – *Ostrea edulis*. U: T. Svåsand, D. Crosetti, E. García-Vázquez & E. Verspoor (Edt). Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report (EU contract n. RICACT-2005-022802), 70-75.
120. Lesser, M.P., Kruse, V.A., 2004. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 137A, 3, 495–504.
121. Li, Q., Osada, M., Mori, K., 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66, 502-508.
122. Lima, I., Moreira, S.M., Rendon-Von Osten, J., Soares, A., Guilhermino, L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere.* 66, 1230-1242.
123. Lin, C., Lee, T., Duan, K., Su, J., 2001. Purification and Characterization of Black Porgy Muscle Cu/Zn Superoxide Dismutase. *Zool. Stud.* 40, 2, 84–90.
124. Linehan, L.G., O`Connor, T.P., Burnell, G., 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chem.* 64, 211-214.
125. Liu, W.G., Li, Q., Yuan, Y.D., Zhang, S.H., 2008. Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the cockle *Fulvia mutica* (Reeve) from eastern coast of China. *J.Shellfish Res.* 27, 405-411.
126. Livingstone, D., 1993. Biotechnology and pollution monitoring. Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195-211.
127. Løfstedt, M.B., 2010. The effect of food quality on glycogen content, the fatty acid profile and winter mortality in cultivated oyster spat (*Ostrea edulis*). *Aquacult. Nutr.* 16, 6, 625–636.
128. Lowry, O.H, Rosbrough, N.J, Farr, A.L, Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265. 1951.
129. Lucu, Č., 2012. Fiziologija prilagodbe životinja u vodenom okolišu. Profil International, Zagreb. 244 str.
130. Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 1, 13–30.
131. Maltar-Strmečki, N., Ljubić-Beer, B., Laškaj, R., Aladrović, J., Džaja, P., 2013. Effect of the gamma radiation on histamine production, lipid peroxidation and antioxidant parameters during storage at two different temperatures in Sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Control.* 34, 1, 132-137.

132. Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ Invert. Surviv. J.* 2, 91–104.
133. Mangold, H.K., 1969. In *Thin Layer Chromatography* (E. Stahl Ed.), Springer, New York, 155 pp.
134. Mann, R., 1978. A comparison of morphometric, biochemical, and physiological index of condition in marine Bivalve Molluscs. In: *Energy and environmental stress in aquatic systems*, str. 484-497.
135. Marčelja, E., Bigunac, B., Glamuzina, B., 2004. Hrvatsko i europsko tržište kamenica. *Naše more*. 51, 1-2.
136. Marčelja, E., 2009. Reproductivni ciklus kamenica (*Ostrea edulis* L.) u Malostonskom zaljevu Zbornik sažetaka 10. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 14. - 20. rujna 2009. Besendorfer, Višnja; Kopjar, Nevenka; Vidaković-Cifrek, Željka; Tkalec, Mirta; Bauer Nataša; Lukša, Žaklin (ed). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885. 247-248.
137. Marin, M.G., Moschino, V., Deppieri, M., Lucchetta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice. *Aquaculture*. 219, 859-871.
138. Martinez, G., 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Veliger*. 34, 335-343.
139. Martino, R.C., Maria, G., 2004. Proximate composition and fatty acid content of the Mangrove Oyster *Crassostrea rhizophorae* along the year seasons. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 955–960.
140. Matias, D., Joaquim, S., Matias, A.M., Moura, P., Teixeira de Sousa, J., Sobral, P., Leitão A., 2013. The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*. 406–407, 52–61.
141. Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) *Aquaculture*. 227, 21–33.
142. McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (haemocytein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
143. Meister, A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205–17208.
144. Mihaljević, B., Katušin-Ražem, B., Ražem, D., 1996. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 1, 53-63.
145. Monroig, O., Tocher, D.R., Navarro, J.C., 2013. Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Invertebrates: Recent Advances in Molecular Mechanisms. *Mar. Drugs*. 11, 10, 3998–4018.
146. Monserrat, J. M., Geracitano, L. A., Pinho, G. L. L., Vinagre, T. M., Faleiros, M., Alciati, J. C., Bianchini, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 2, 177–183.

147. Moreno, J.E.A., Pollero, R.J., Moreno, V.J., Brenner, R.R., 1980. Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus Platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 48, 263-276.
148. Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid Res. 5, 600-608.
149. Nachman, R.J., 1985. Unusual predominance of evencarbonhydrocarbons in an Antarctic food chain. Lipids. 20, 629-633.
150. Nahrgang, J., Brooks, S., Evenset, J., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T.J., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*): implications for environmental monitoring in the Barents Sea. Aquat. Toxicol. 127, 21-35.
151. Napolitano, G.E., Pollero, R.J., Gayoso, A.M., MacDonald, B.A., Thompson, R.J., 1997. Fatty acids as trophic markers of phytoplankton blooms in the Bahía Blanca estuary (Buenos Aires, Argentina) and in Trinity Bay (Newfoundland, Canada). Biochem. Syst. Ecol. 25, 739-755.
152. Napolitano, G.E., Ratnayake, W.M., Ackman, R. G., 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. Comp. Biochem. Physiol. 90B, 4, 875-83.
153. Narváez, M., Freities, L., Mendoza, J., Guevara, M., 2009. Influence of spat origin and environmental parameters on biochemical composition and biometry of the brown mussel *Perna perna* (L., 1758), under culture conditions. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 44, 2, 343-355.
154. Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Larranaga, A., 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). Mar. Biol. 101, 503-511.
155. Navarro, J.M., Leiva, G.E., Martinez G., Aguilera, C., 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247, 67-83.
156. Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. Sci. Total Environ. 281, 237-246.
157. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 2, 351-358.
158. Ojea, J., Pazos, A.J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez J.L., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussates* in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture. 238, 1-4, 451-468.
159. Okumus, I., Stirling, H.P., 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. Aquaculture. 159, 249-261.
160. Pampanin, D.M., Maragon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C., 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environ. Pollut. 136, 103-107.

161. Park, M.S., Kang, C.K., Lee, P.L., 2001. Reproductive cycle and biochemical composition of the ark shell *Scapharca broughtonii* (Schrenck) in a Southern coastal bay of Korea. J. Shellfish Res. 20, 177-184.
162. Patrick, S., Faury, N., Gouletquer, P., 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oleron bay (France). Aquaculture. 252, 328-338.
163. Pawar, R.T., Nagvenkar, S.S., Jagtap, T.G., 2013. Protective role of edible clam *Paphia malabarica* (Chemnitz) against lipid peroxidation and free radicals. Turk. J. Biochem. 38, 2, 138–144.
164. Pázos, A.J., Román, G., Acosta, C.P., Abad, M., Sánchez, J.L., 1997b. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. J. Exp. Mar. Biol. 211, 169-193.
165. Pázos, A.J., Román, G., Acosta, C.P., Sánchez, J.L., Abad, M., 1997a. Lipid classes and fatty acid composition in the female gonad of *Pecten maximus* in relation to reproductive cycle and environmental variables. Comp. Biochem. Physiol. 117B, 3, 393-402.
166. Pazos, A.J., Ruíz, C., García-Martín, O., Abad, M., Sánchez, J.L., 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. Comp. Biochem. Physiol. 114B, 2, 171–179.
167. Pázos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Luz Pérez-Parallé, M., Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. Comp. Biochem. Physiol. 134B, 3, 367-380.
168. Peharda, M., 2003. Rasprostranjenost i sastav prirodnih populacija školjkaša (Mollusca, Bivalvia) u Malostonskom zaljevu. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 112 pp.
169. Peharda, M., Ezgeta-Balić, D., Vrgoč, N., Isajlović, I., Bogner, D., 2010. Description of bivalve community structure in the Croatian part of the Adriatic Sea - hydraulic dredge survey. Acta Adriat. 51, 2, 141-157.
170. Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Almeida, A.C., Araújo, O., Bebianno, M.J., Cravo, A., 2013. Interspecific variability of endocrine disruption and oxidative stress in two bivalve species from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal). Sci. Mar. 77, 1, 79-89.
171. Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., Boudry, P., 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. Mar. Ecol. Prog. Ser. 401, 129-146.
172. Pernet, F., Pelletier, C.J., Milley, J., 2006. Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. J Chromatogr. 1137 A, 127-137.
173. Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitat: energetic and remodeling of membrane lipids. J. Exp. Biol. 210, 2999-3014.



174. Piretti, M.V., Zuppa, F., Pagliuca, G., Taioli, F., 1988. Variations of fatty acid constituents in selected tissues of the bivalve mollusc *Scapharia inaequivalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89, 1, 183-187.
175. Pogoda, B., Buck, B.H., Saborowski, R., Hagen, W., 2013. Biochemical and elemental composition of the offshore-cultivated oysters *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 400-401, 53-60.
176. Pond, D.W., Bell, M.V., Harris, R.P. and Sargent, J.R., 1998. Microplanktonic polyunsaturated fatty acid markers: a mesocosm trial. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 46A, 61-67.
177. Prato, E., Danieli, A., Maffia, M., Biandolino, F., 2010. Lipid and fatty acid compositions of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Mar Grande of Taranto (Southern Italy): feeding strategies and trophic relationships. *Zool. Stud.* 49, 2, 211-219.
178. Prevodnik, A., Gardestrom, J., Lilja, K., Elfving, T., McDonagh, B., Petrovic, N., Tedengren, M., Sheehan, D., Bollner, T., 2007. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquat. Toxicol.* 82, 63-71.
179. Pruitt, N.L., 1990. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea – membrane structure and metabolism. *J. Thermal Biol.* 15, 1–8.
180. Radetić, A., 2010. Utjecaj nekih ekoloških čimbenika na sezonske promjene indeksa kondicije uzgojnih populacija europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad.
181. Rajagopal, S., Van der Gaag, M., Van der Velde, G., Jenner, H.A., 2005. Upper temperature tolerances of exotic brackish-water mussel, *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad): An experimental study. *Mar. Environ. Res.* 60, 512-530.
182. Ramić, A., Medić-Šarić, M., Turina, S., Jasprica, I., 2006. TLC Determination of Chemical Interactions of Vitamins A and D with Drugs. *JPC - J. Planar Chromat.* 19, 107, 27-31.
183. Ranson, G., 1951. *Les huîtres: Biologie - Culture.* (Lechevalier P. Ed.), Paris.
184. Regoli, F., Bocchetti, R., Filho, D.W., 2011. Spectrophotometric Assays of Antioxidants, in *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (eds D. Abele, J.P. Vázquez-Medina and T. Zenteno-Savín), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
185. Ren, S.J., Marsden, I.D., Ross, A.H., Schiel, D.R., 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 37, 171-182.
186. Robert, R., Trut, G., Laborde, J.L., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arachon, France. *Mar. Biol.* 116, 291-299.
187. Rödström, E.M., Jonsson, P., 2000. Survival and feeding activities of oyster spat (*Ostrea edulis* L.) as a function of temperature and salinity with implications for culture policies on the Swedish west coast. *J. Shellfish Res.* 19, 2, 799-8008.
188. Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sanchez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea*

- gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155, 249-262.
189. Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A., 2009. PUFAs in Fish: Extraction, Fractionation, Importance in Health. Compr. Rev. Food Sci. F. 8, 2, 59–74.
190. Sajjadi, N., Egtesadi-Araghi P., Jamili, S., Hashtrودي, M., Farzadniaand, S., Mashinchian, A., 2009a. Seasonal Variations of n-6: n-3 Ratios and Fatty Acid Compositions in Foot and Tissue of Chiton lamyi in a High Primary Productivity Area. Am. J. Environ. Sci. 5, 3, 278-284.
191. Sajjadi, N., Egtesadi-Araghi, P., Mashinchian, A., Jamili, S., Farzadnia, S., Hashtrودي, M. S., 2009b. Seasonal variations of fatty acid contents of *Saccostrea cucullata* at intertidal zone of Chabahar Bay. Res. J. Environ. Sci. 2, 3, 376-383.
192. Salman, J.M., Nasar, A.J., 2013. Total Lipids and Total Protein in two Mollusca Species as Environmental Biomarker of Pollution in Euphrates River, Iraq. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2, 10, 207–214.
193. Santivito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. Comp. Biochem. 140C, 321-329.
194. Sarà, G., Romano, C., Widdows J., Staff, F.J., 2008. Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis*-Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 363, 130-136.
195. Sargent, J.R., Eilertsen, H.C., Falk-Petersen, S. and Taasen, J.P., 1985. Carbon assimilation and lipid production in phytoplankton in northern Norwegian fjords. Mar. Biol. 85, 109-116.
196. Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, 3rd edition. Academic Press, San Diego, pp. 181–257.
197. Sastry, A.N., 1968. Relationship among food, temperature and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Physiol. Ecol. 41, 44-53.
198. Schauer, P.S., Simpson, K.L., 1985. Bioaccumulation and bioconversion of dietary labeled fatty acid in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42, 14.
199. Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 123C, 3, 193–9.
200. Shmueli, G., 2010. To Explain or to Predict? Stat. Sci. 25, 3, 289–310.
201. Sifi, K., Amira, A., Soltani, N., 2013. Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). Adv. Environ. Biol. 7, 4, 595-604.
202. Šimunović, A., 2004. Malostonski zaljev - biser Jadrana. Naše more (Dubrovnik). 51, 1-2, 12-16.
203. Soletchnik, P., Faury, N., Goulletquer, P., 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron Bay (France). Aquaculture. 252, 328–338.
204. Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature

- and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. 123B, 209-222.
205. Štefan, L., Tepšić, T., Zaviđić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R., 2007. Lipidna peroksidacija: uzroci i posljedice. Medicina, 43:84-93.
206. Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 1715–1733.
207. Strunjak-Perović, I., 2010. Završno izvješće VIP projekta: Zaštita proizvodnje malostonske kamenice dokazivanjem autohtonosti. Voditelj: dr.sc. Ivančica-Strunjak Perović. Institut Ruđer Bošković.
208. Takahashi, H., Yamada, M., 1976. Lipid composition of seven species of crustacean plankton. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42, 769-776.
209. Tanaka, T., Morishige, J., Iwawaki, D., Fukuhara, T., Hamamura, N., Hirano, K., Osumi, T., Satouchi, K., 2007. Metabolic pathway that produces essential fatty acids from polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids in animal cells. Eur. J. Biochem. 274, 2728-2737.
210. Taylor, A.G., Savage C., 2006. Fatty acid composition of New Zealand green-lipped mussels, *Perna canaliculus*: Implications for harvesting for n-3 extracts. Aquaculture. 261, 430–439.
211. Telahigue, K, Hajji, T., Rabeh, I., El Cafsi, M., 2013. The Effect of Starvation on the Biochemical Composition of the Digestive Gland, the Gonads and the Adductor Muscle of the Scallop *Flexopecten glaber*. Int. J. Food Sci. Nutr. 4, 405-413.
212. Telahigue, K., Chetoui, I., Rabeh, I., Romdhane, M. S., El Cafsi, M., 2010. Comparative fatty acid profiles in edible parts of wild scallops from the Tunisian coast. Food Chem. 122, 3, 744–746.
213. Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1984. Analyses of lipid and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. Lipids. 19, 492–499.
214. Tomšić, S., Lovrić J., 2004. Povijesni pregled uzgoja Kamenica u Malostonskom zaljevu, Naše more. 51,1-2, 17-23.
215. Topić Popović, N., Kozačinski, L., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., Jadan, M., Cvrtić-Fleck, Z., Barišić, J., 2012. Fatty acid and proximate composition of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) muscle with regard to plasma lipids. Aquacult Res. 43, 5, 722–729.
216. Trider, D.J., Castell, J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth tissue composition and metabolism of the oyster *Crassostrea virginica*. J. Nutr. 110, 1303–1309.
217. Tu, H. T., Silvestre, F., Meulder, B. De, Thome, J.P., Phuong, N. T., Kestemont, P., 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Chemosphere. 86, 1, 83–91.
218. Turgeon, D. D., Quinn, J. F., Bogan, A. E., Coan, E. V., Hochberg, F. G., Lyons, W. G., 1998. Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Mollusks, 2<sup>nd</sup> ed. American Fisheries Society Special Publication 26. 526.
219. Vahl, O., 1980. Seasonal variations in seston and the growth rate of the Iceland scallop, *Chlamys islandica* (Miller) from Balsfjord. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 48, 195-204.

220. Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), 2002. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. Elsevier. Netherlands.
221. Vassallo, M.T., 1973. Lipid storage and transfer in the scallop *Chlamys hericia* Gould. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A1, 169-1, 175.
222. Verghese, B., Radhakrishnan, E.V., Padhi, A., 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 928-936.
223. Verlecar, X., Jena, K., Chainy, G., 2007. Seasonal variation of oxidative biomarkers in the gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 76, 4, 745-752.
224. Viarengo A, Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 187-190.
225. Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, J. A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere.* 78, 3, 265–72.
226. Voogt, P.A., 1972. Lipid and sterol components and metabolism in Mollusca. In : *Chemical Zoology* (M. Florkin and B. R. Scheer, Eds.), Academic Press, New York. 7,245-300.
227. Voogt, P.A., 1975. Investigations on the capacity of synthesizing 3-a sterols in molluscs biosynthesis and composition of sterols in some bivalves *Anisomyaria* . *Comp. Biochem. Physiol.* 50B, 499–504
228. Waldock, M.J., Holland, D.L., 1984. Fatty acid metabolism in young oyster, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 19, 332–336.
229. Waldock, M.J., Nascimento, I. A., 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *N.E.R.C. U.M.I.B.* 1, 77-86.
230. Wang, F., Yang, H., Gao, F., Liu, G. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 4, 491–498.
231. Watanabe, T., Ackman, R.G., 1974. Lipids and fatty acids of the American (*Crassostrea virginica*) and European flat (*Ostrea edulis*) oysters from a common habitat and after one feeding with *Dicrateria inornata* and *Isochrysis galbana*. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 403–409.
232. Watanabe, T., Takeuchi, A., 1989. Implications of marine oils and lipids in aquaculture. In: *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*. Ed. by Ackman, R.G. CRC Press, Boca Raton. 457-479.
233. Whyte, J.N.C., 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids in tissue of cultured species. *Aquaculture*, 75, 193-203.
234. Whyte, J.N.C., Englar, J.R., Carswell, B.L., 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture.* 90, 157–172.
235. Winston, G., Di Giulio, R., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol.* 19, 137-161.

236. Zar, J. H., 2010. Biostatistical Analysis, fifth ed. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. 944 pp.
237. Zhang, Y., Meng, Q., Jiang, T., et al., 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 135B, 43–54.
238. Zhukova, N.V., 1991. The pathway of the biosynthesis of the nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 801– 804.
239. Zlatanov, S., 2008. Seasonal variation in the fatty acid composition of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in N. Greece. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 7, 6, 3015-3019.
240. Zrnčić, S., Oraić, D., Mihaljević Ž., Zanella, D., 2007. Impact of varying cultivation depths on growth rate and survival of the European flat oyster *Ostrea edulis*, L. *Aquac. Res.* 38, 1305-1310.

## 7. SAŽETAK

Morski organizmi iz razreda *Bivalvia* imaju veliku važnost u akvakulturi zbog svojeg biokemijskog sastava i prehrambene vrijednosti. Europska plosnata kamenica (*Ostrea edulis* L.) jedna je od najvažnijih vrsta školjkaša uzgajanih u Europi. Uzgoj u Jadranskom moru ima višestoljetnu tradiciju, a Malostonski zaljev jedno je od rijetkih područja, ne samo u Jadranu nego i šire, gdje se zbog posebno povoljnih ekoloških i produkcijskih uvjeta odvija veliki uzgoj ove vrste.

Poznavanje biokemijskog sastava, masnokiselinskog sastava i antioksidativnog statusa školjkaša kao i njihove interakcije koje se očituju kroz prilagodbu na uvjete okoliša, važni su aspekti koje treba detaljno istražiti kako bi se što bolje razumjela fiziologija i kvaliteta uzgajanih kamenica, te podržala proizvodnja sigurne i kvalitetne namirnice.

Ovo istraživanje je provedeno u razdoblju od travnja 2009. godine do ožujka 2010. godine na području uvale Bistrina u Malostonskom zaljevu. U ovom razdoblju detaljno su izmjerene i opisane interakcije i varijacije okolišnih čimbenika (temperatura mora, salinitet, pH, otopljeni kisik, koncentracije partikularne tvari, koncentracije otopljenih soli i amonijaka).

Biokemijski sastav kamenica analiziran je određivanjem masenog udjela lipida, proteina i glikogena u vlažnom tkivu kamenica. Analize masnokiselinskog sastava provedene su u ukupnim lipidima, a ukupni lipidi su dodatno razdvajani na pojedine lipidne frakcije: triacilgliceroli, fosfolipidi i slobodne masne kiseline. U lipidnim frakcijama je određivan masnokiselinski sastav kako bi se što preciznije odredio fiziološki status kamenica u uzgojnoj sredini. Dodatno su izmjereni i omjeri određenih masnih kiselina jer su oni važan čimbenik koji doprinosi kvaliteti uzgajanih kamenica i omogućavaju bolje razumijevanje metaboličkih puteva masnih kiselina. Varijabilnost ovih omjera uvjetovana je promjenama u okolišu što je istraživano u ovom radu. Pored navedenog, određivana je aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-reduktaze (GR) te koncentracija lipidnih peroksida (LP) i malondialdehida (MDA) u tkivu kamenica, koji pružaju uvid u stupanj oksidativnog stresa kroz uzgojnu sezonu.

Testirana je hipoteza da su promjene udjela pojedinih višestruko nezasićenih masnih kiselina (*Polyunsaturated fatty acids*, PUFA), aktivnost antioksidativnih enzima i biokemijski sastav tkiva kamenica povezani s različitim godišnjim dobima. Analizirano je u kojoj mjeri abiotički i biotički čimbenici utječu na promjene u lipidnom i biokemijskom sastavu te na razinu oksidativnog stresa kamenica uzgajanih u Malostonskom zaljevu. Dobiveni rezultati uspoređeni su s relevantnom znanstvenom literaturom.

Detaljnou statističkom obradom podataka utvrđena je izrazita značajnost između masenog udjela proteina u tkivu kamenica i temperature mora, saliniteta, koncentracije nitrita i amonijaka u moru. Istovremeno maseni udio glikogena imao je značajnu povezanost s koncentracijom organske tvari, fosfata i sulfata. Masnokiselinski sastav ukupnih lipida kamenica otkriva visoku hranjivu vrijednost kamenica. Među masnim kiselinama ukupnih lipida utvrđena je značajna ovisnost eikozenske kiseline o temperaturi mora i koncentraciji nitrita. Omjer AA/EPA pokazao je ovisnost o temperaturi mora i

koncentraciji nitrita i sulfata. Masne kiseline lipidne frakcije triacilglicerola pokazuju izrazita kolebanja tijekom godine. Jedino udio 20:4 n-3 pokazuje izrazitu statističku povezanost s temperaturom mora i koncentracijom sulfata. Masne kiseline lipidne frakcije fosfolipida nemaju statistički značajne varijacije tijekom godine. n-9 masne kiseline iz frakcije slobodnih masnih kiselina pokazuju ovisnost o otopljenom kisiku u moru, dok omjer 18:0/16:0 slobodnih masnih kiselina ima povezanost s temperaturom mora.

Ovim radom su prvi puta korištene metode matematičkog modeliranja kako bi se dobili prediktivni modeli koji najbolje opisuju predviđanja fluktuacije udjela masnih kiselina i antioksidativni status tkiva kamenica u ovisnosti o fizikalno-kemijskim parametrima mora kroz razdoblje od godinu dana.

Rezultati ovog istraživanja doprinose poznavanju fiziološkog odgovora kamenica na promjene okolišnih čimbenika. Osim toga, omogućavaju ne samo bolje razumijevanje uvjeta tijekom uzgoja i uspjeha u reprodukciji, nego i potpuniju karakterizaciju zdravstvenog stanja i kvalitete kamenica.

## 8. SUMMARY

Marine organisms from the class *Bivalvia* have a great importance in aquaculture because of their biochemical composition and nutritional value. European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) is one of the most important oyster species grown in Europe. Oyster farming in the Adriatic Sea has a centuries-old tradition, and Mali Ston Bay is one of the few areas, not only in the Adriatic, but also beyond, where due to the particularly favorable environmental conditions production of this species occurs.

Knowledge of the biochemical composition, fatty acid composition and antioxidant status of shellfish as well as their interaction manifested by its adaptation to environmental conditions, are important aspects that need to be thoroughly investigated in order to a better understanding of the physiology and quality of cultured oysters, and to support the production of quality sea food.

This survey was conducted from April 2009 to March 2010 in the Bistrina cove of Mali Ston Bay. In this period were measured in detail and describe the interaction and variation of environmental factors (water temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, concentration of particulate matter, concentration of dissolved salts and ammonia level).

The biochemical composition of oysters was analyzed by determining the amount of lipid, protein and glycogen in the oysters tissue wet weight. Fatty acid composition analysis was performed in total lipids and total lipids were further separated to individual lipid fractions: triacylglycerols, phospholipids and free fatty acids. Fatty acid composition was determined in each fraction in order to more precisely determine the physiological status of oysters in the farm conditions. In addition, ratios of specific fatty acids because were measured as they are an important factor that contributes to the quality of cultured oysters and a better understanding of the metabolic pathways of fatty acids. The variability of these ratios is conditioned by changes in the environment, which is investigated in this thesis. Activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR), and lipid peroxides (LP) and malondialdehyde (MDA) were measured in the oyster's tissue, which provide insight into the degree of oxidative stress through the growing season.

We tested the hypothesis whether the change in the share of certain polyunsaturated fatty acids (PUFA), antioxidant enzyme activities and biochemical composition in the oyster's tissue is associated with different seasons. We analyzed the extent to which abiotic and biotic factors influence change in lipid and biochemical composition and the level of oxidative stress in oysters grown in the Mali Ston Bay. The results were compared with the relevant scientific literature.

A detailed statistical analysis shows a distinct significance between the amount of proteins in the oysters tissue and sea temperature, salinity, and concentration of nitrite and ammonia in the seawater. At the same time the amount of glycogen in the tissues had a significant relationship with the concentration of particular organic matter, phosphate and sulfate. Fatty acid composition in total lipids oyster reveals a high nutritional value in farmed oysters. Among the fatty acids in total lipids eicosenoic fatty acid showed significant dependence on the water temperature and the concentration of nitrite. The ratio AA/EPA showed a dependence on the water temperature as well as the



concentration of nitrite and sulfate. Fatty acid lipid fraction of triacylglycerol showed extreme fluctuations during the year. Only the proportion of 20: 4n-3 showed a distinct statistical association with seawater temperature and concentration of sulphate. Fatty acid lipid fractions of phospholipids have no statistically significant variations during the year. n-9 fatty acid from the fraction of free fatty acids show the dependence with dissolved oxygen in the seawater, while the ratio of 18: 0/16: 0 fatty acids had a correlation with seawater temperature.

This study, for the first time, presents methods of mathematical modeling to obtain predictive models that best describe the fluctuation prediction of fatty acids and antioxidant status of oyster tissue depending on the physico-chemical parameters of seawater for a period of one year.

Results of this research contribute to the understanding of the physiological responses in oysters to change of the environmental factors. In addition, this will allow not only a better understanding of breeding and success in reproduction, but also will allow more effective characterization of health status and quality of farmed oysters.

## 9. ŽIVOTOPIS

Josip Barišić rođen je 06. kolovoza 1982. godine u Zagrebu gdje završava osnovnu i srednju školu. Akademске godine 2000./2001. upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem 2007. godine stječe titulu doktora veterinarske medicine. Interdisciplinarni poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti, smjer Biologija mora pri Sveučilištu u Osijeku upisuje u akademskoj godini 2010./2011., te pod vodstvom dr.sc. Rozalindre Čož-Rakovac i prof. dr. sc. Ivančice Delaš izrađuje ovu doktorsku disertaciju.

U razdoblju od travnja 2008. do lipnja 2009. radi u svojstvu stručnog suradnika za registraciju veterinarskih lijekova u tvrtki Veterna d.o.o. Od lipnja 2009. godine radi kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH "Substancična, biokemijska i filogenetska raznolikost tkiva riba, rakova i školjkaša" (098-1782739-2749) u Laboratoriju za Ihtiopatologiju – biološke materijale na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Pored navedenog projekta sudjelovao je na 2 VIP projekta Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja "Zaštita proizvodnje malostonske kamenice dokazivanjem autohtonosti" i "Unapređenje proizvodnje ribe primjenom probiotika u funkciji povećanja konkurentnosti" kao i drugim projektima koje provodi Laboratorij.

Tijekom poslijediplomskog studija boravio je na stručnom usavršavanju (Klinički bolnički centar Dubrava, Zavod za kliničku i eksperimentalnu patologiju, Zagreb, Hrvatska) te je sudjelovao na ljetnoj školi „**Aquaculture-production and management**” u organizaciji Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, Rehovot, Izrael, i Metodološkom tečaju u biologiji i medicini "**DNA i RNA**" u organizaciji Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Koautor je 11 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u *Current Content* bazi, te je sudjelovao na nekoliko domaćih i međunarodnih skupova s ukupno 16 radova.

### Popis znanstvenih radova objavljenih u CC časopisima:

1. **Barišić, J.**, Čož Rakovac, R., Delaš, I., Topić Popović, N., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Brailo, M., Sauerborn Klobučar R., Strunjak-Perović, I. (2015): Integral predictive modeling of European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) fatty acid composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. (prihvaćen za objavljivanje).
2. **Barišić, J.**, Dragun, Z., Ramani, S., Filipović Marijić, V., Krasnići, N., Kostov, V., Rebok, K., Jordanova, M. (2015): Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.027>
3. Babić S., Dragun Z., Sauerborn Klobučar R., Ivanković D., Bačić N., Fiket Ž., **Barišić J.**, Krasnići N., Strunjak-Perović I., Topić Popović, N., Čož-Rakovac R. (2015). Indication of metal homeostasis

disturbance in earthworm *Eisenia fetida* after exposure to semi-solid depot sludge. *Science of the total environment*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.056>

4. Topić Popović, N., Benussi Skukan, A., Džidara, P., Strunjak-Perović, I., Kepec, S., **Barišić, J.**, Čož-Rakovac, R. (2014) Prediction of *Listeria monocytogenes* growth as a function of environmental factors. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science* (prihvaćen za objavljivanje).

5. Topić Popović, N., Sauerborn Klobučar, R., Strunjak-Perović, I., Jadan, M., **Barišić, J.**, Čož-Rakovac, R. (2015) Piscine cytochromes P450 (CYP) and their response to antimicrobial drugs. *Aquaculture research*, **46**, 257-271.

6. Topić Popović, N., **Barišić, J.**, Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R. (2014) A tool for rapid identification of *Vibrio anguillarum*: Managing a field outbreak. *Fresenius environmental bulletin*, **23**, 1, 151-153.

7. Topić Popović, N., Sauerborn Klobučar, R., Maguire, I., Strunjak-Perović, I., Kazazić, S., **Barišić, J.**, Jadan, M., Klobučar, G. I. V., Čož-Rakovac, R. (2014) High-throughput discrimination of bacteria isolated from *Astacus astacus* and *A. leptodactylus*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **1**, 413.

8. Topić Popović N., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R., **Barišić J.**, Jadan M., Peršin Beraković A., Sauerborn Klobučar R. (2012): Tricaine methanesulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology*, **28**, 553-564.

9. Topić Popović N., Kozačinski L., Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R., Jadan M., Crvtila Fleck Ž., **Barišić J.** (2012) Fatty acid and proximate composition of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) muscle with regard to plasma lipids. *Aquaculture Research*, **43**, 722-729.

10. Ferri J., Topić Popović N., Čož-Rakovac R., Beer-Ljubić B., Strunjak-Perović I., Škeljo F., Jadan M., Petrić M., **Barišić J.**, Šimpraga M., Stanić R. (2011) The effect of artificial feed on blood biochemistry profile and liver histology of wild saddled bream, *Oblada melanura* (Sparidae). *Marine Environmental Research*, **71**, 3, 218-224.

11. Matanović K., Severin K., Martinković F., Šimpraga M., Janicki Z., **Barišić J.** (2008): Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **101**, 6, 1657-1661.

#### Radovi na znanstvenim skupovima objavljeni u zbornicima skupova:

1. **Barišić, J.**, Dragun, Z., Ramani, S., Rebok, K., Čož-Rakovac, R., Kostov, V., Jordanova, M. (2014) Spatial and seasonal variability of histopathological alterations on the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis*) from mining impacted rivers in the northeastern Macedonia. Book of abstracts: Influence

of active mines on freshwater ecosystems, Dragun, Zrinka (ur.). Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 27-28.

2. **Barišić, J.**, Dragun, Z., Ramani, S., Rebok, K., Čož-Rakovac, R., Kostov, V., Jordanova, M. (2013) Histopathological alterations on the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis*) from the mining impacted rivers in the northeastern Macedonia. Proceedings of the Days of Veterinary Medicine 2013, Mitrov, Dine; Pendovski, Lazo, Percinic, Florina P. (ur.). Skopje: Faculty of Veterinary Medicine, 85-86.

3. **Barišić, J.**, Jakšić, G., Rathman, M., Jendriš Škrljak, E., Mihaldinec, D., Čož-Rakovac, R. (2013) Modern technology in the service of aquaculture - preliminary magnetic resonance imaging of the live date mussel *Lithophaga lithophaga* (Linnaeus, 1758). Book of abstracts: Hrvatska akvakultura u Europskoj uniji - sadašnjost i budućnost, 18-18.

4. **Barišić J.**, Rathman M., Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Topić Popović N., Sauerborn-Klobučar R., Jendriš Škrljak E., Mihaldinec D. (2013) Magnetic Resonance Imaging - A New approach in investigations of endangered marine bivalves. VI International Conference "WATER & FISH". Poleksić, Vesna (ur.). Beograd: Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija, 393-394.

5. Sauerborn Klobučar, R., Malev, O., **Barišić, J.**, Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Margita, J., Čož-Rakovac, R. (2013) Važnost mehanizma multiksenobiotske otpornosti (MXR) u akvakulturi. Book of abstracts: Hrvatska akvakultura u Europskoj uniji - sadašnjost i budućnost.

6. Topić Popović, N., Sauerborn Klobučar, R., Maguire, I., Strunjak-Perović, I., Kazazić, S., **Barišić, J.**, Jadan, M., Klobučar, G., Čož-Rakovac, R. (2013) High-throughput discrimination of bacteria isolated from *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*. Book of abstracts: Regional European Crayfish Meeting – CrayCro.

7. Topić Popović, N., Sauerborn Klobučar, R., Maguire, I., Strunjak-Perović, I., Kazazić, S., **Barišić, J.**, Jadan, M., Klobučar, G. I. V., Čož-Rakovac, R. (2013) Comparison of a biochemical test system with mass spectrometry for identification of bacteria pertinent to a freshwater stream environment. Book of abstracts: First EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology: SAME13 EMBO (ur.). Stresa, Italija.

8. Topić Popović, N., Strunjak- Perović, I., Čož-Rakovac, R., Sauerborn Klobučar, R., Jadan, M., **Barišić, J.** (2013) Effects of antimicrobial drugs upon P450 enzymes in fish. Book of Abstracts, 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture, Marić, S; Lončarić, Z (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 230-231.

9. Čolak, S., Čož-Rakovac, R., Šmuc, T.; Lovrinov, M., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., **Barišić, J.**, Jadan, M., Beer Ljubić, B.; Šimpraga, M.; Aničić, I., Treer, Tomislav. (2012) Biokemijski profil hemolimfe triju vrsta dekapodnih rakova. Proceedings/Book of Abstracts. 47 Croatian and 7 International Symposium on Agriculture, Pospišil, Milan (ur.). Zagreb: Luna Grafika, 154-155.

11. Sauerborn Klobučar, R., Brozović, A., Štambuk, A., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Jadan, M., **Barišić, J.**, Čož-Rakovac, R. Ecotoxicological assessment of antibiotic nitrofurantoin. (2012) 11. Hrvatski Biološki Kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, Hrvatska.

12. Čolak, S., Čož-Rakovac, R., Šmuc, T., Lovrinov, Mario; Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Jadan, M., **Barišić, J.**, Beer Ljubić, B., Šimpraga, M., Aničić, I. (2011) Haemolymph biochemistry

profile of lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) after exposure to emersion. 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish: Abstract book/EAFP (ur.). Split : Dalmacijapapir publishing house, 281-281

13. Čož-Rakovac, R., Strunjak-Perović, I., Topić Popović, N., Šmuc, T., Jadan, M., Čolak, S., Lovrinov, M., Milina, A., **Barišić, J.** Discrimination between shade fish physiological profile based on blood biochemistry using statistical classification models. (2011) Book of Abstracts: 46th Croatian & 6th International Symposium on Agriculture, Milan Pospisil (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 173-176.

14. Topić Popović, N. Kozačinski, L. Strunjak-Perović, I. Čož-Rakovac, R., Jadan, M., Cvrtila Fleck, Ž., **Barišić, J.** Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) plasma lipids and muscle fatty acid composition. (2011) 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Split, September 12-16, 2011. Abstract book/EAFP (ur.). Split: Dalmacijapapir publishing house, 457-457.

15. Čolak, S., Lovrinov, M., Čož-Rakovac, R., Strunjak-Perović, I., Topić Popović, N., **Barišić, J.** Correlation between biometric measures of the host fish and the parasite *Ceratomyxa oestroides* (Risso, 1826). (2010) 11th biennial Mediterranean Symposium on "Animal farming and environmental interactions in Mediterranean regions" Rogošić J., Rosati A., Gabina D. (ur.). Zadar: University of Zadar, Department of Ecology and Agronomy, 67.

16. Gomerčić, T., **Barišić, J.**, Vuđan, M., Ćurković, S., Gužvica, G., Đuras Gomerčić, M., Pavlović, D., Frković, A., Huber, Đ. (2009) Određivanje dobi euroazijskih risova (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj prema slojevima zubnog cementa sjekutića. 8th Croatian Biological Congress with International Participation: Proceeding of abstracts Besendorfer, V., Kopjar, N. (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, 397-398.