

Utjecaj endokrinih disruptora na reproduktivna svojstva mekušaca u moru

Gračanin, Lorena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:374049>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lorena Gračanin

**Utjecaj endokrinih disruptora na
reproduktivna svojstva mekušaca u moru**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lorena Gračanin

**Impact of endocrine disruptors on
reproduction of sea molluscs**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Znanosti o okolišu na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Romane Gračan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Utjecaj endokrinih disruptora na reproduktivna svojstva mekušaca u moru

Lorena Gračanin

Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mnoge vrste koje pripadaju koljenu mekušaca imaju veliku komercijalnu i ekološku važnost. Poseban naglasak stavlja se na skupine, ponajviše školjkaše i puževe, koji služe kao bioindikator u okolišnim studijama, uglavnom vezanim uz čistoću voda. Neke komponente donesene u okoliš mogu znatno utjecati na njihovo razmnožavanje i razvoj. Te komponente nazvane su EDC (*Endocrine disrupting compounds*) ili ED (*endocrine disruptors*), a ovisno o proučavanoj vrsti, njihov utjecaj je različit. Možemo ih podijeliti u tri skupine. Androgene, kseno-estrogene i antiandrogene. Najbolje istražena pojava kod mekušaca je imposeks fenomen koji je uočen prvenstveno kod prosobranhijalnih puževa, a primarni uzročnik je tributil-kositar (TBT) koji je možda najbitniji primjer endokrinog disruptora (ED) u moru unesen od strane čovjeka. Još je niz pojava uzrokovanih ED-a, no nisu tako detaljno proučene.

Ključne riječi: imposeks, tributilkositar, TBT, hormoni
(18 stranica, 8 slika, 0 tablica, 13 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Impact of endocrine disruptors on reproduction of sea molluscs

Lorena Gračanin

Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Croatia

Many species which belong to phylum *Mollusca* have great commercial and ecological importance. Special emphasis is on the species, specifically bivalves and gastropods, which are used as bioindicators in environmental studies, mainly about water quality. There are a lot of anthropogenic components in environment which affect animal endocrine system, including their reproduction. They are called EDCs (Endocrine disrupting compounds) or EDs (endocrine disruptors) and they have different impact on investigated species. We can divide ED in three categories: xeno-estrogens, androgens and antiandrogens. The most known phenomenon in molluscs, specifically prosobranchial snails, is imposex, which is direct consequence of trybutyl-tin (TBT), an organogenic compound introduced in the environment by human. There are more deformations caused by EDs, but they have to be researched more thoroughly yet.

Keywords: TBT, tybutil-tin, imposex, hormones, xeno-estrogens, antiandrogens
(18 pages, 8 figures, 0 tables, 13 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Brojnost i sistematika skupine mekušci.....	2
1.2. Endokrini sustav mekušaca.....	2
1.3. Uloga endokrinog sustava u razmnožavanju.....	3
1.4. Spolni sustav mekušaca.....	3
2. Pojave u organizmu uzrokovane utjecajem endokrinih disruptora	5
2.1. Pojava imposeksa uzrokovana androgenim supstancama.....	5
2.2. Pojava interseksa uzrokovana androgenim supstancama.....	7
2.3. Deformacije pri nastanku i razvoju jaja i embrija uzrokovane kseno-estrogenima.....	8
2.4. Utjecaj antiandrogenih endokrinih disruptora.....	9
2.5. Druge pojave	11
3. Mehanizmi kojima dolazi do endokrine disrupcije	13
3.1. Utjecaj TBT-a na pojavu imposeksa.....	13
4. Zaključak.....	15
5. Literatura	16
6. Životopis	18

1. Uvod

Poznato je da se razvitkom civilizacije i tehnologije postupno povećavala i količina antropogenih supstanci unesenih u okoliš. Nezanemarivi broj njih znatno utječe na živi i neživi svijet i u vodama i na kopnu, te se iz tog razloga razvojem znanosti pokušava i povećati količina znanja o tome, te sama svijest među ljudima. Endokrini disruptori (ED) pripadaju skupini spojeva unesenih u okoliš. Oni su prirodne ili kemijski-sintetizirane kemikalije koje utječu na djelovanje hormona u tijelu organizma, odnosno na endokrini sustav, što ima utjecaj na mnogobrojne bolesti (National Institute of Environmental Health Sciences 2023). Dugi se niz godina naglasak stavlja na istraživanja posvećenim isključivo kralježnjacima, te je relativno nedavno povećana svijest o važnosti utjecaja endokrinih disruptora na organizme iz skupine beskralježnjaka. U te zanemarene skupine uključujemo i vrste iz koljena mekušaca, koji danas broje oko 70 000 opisanih vrsta, te su kao takvi bitan dio ekosustava na Zemlji (Habdića i sur. 2021). Također, vrste iz skupine mekušaca, primarno puževi i školjkaši, već se niz godina koriste kao indikatori kvalitete okoliša, pri čemu se zna da su prvenstveno pokazatelji vode loše kvalitete. Niz je razloga zašto oni predstavljaju jedan od idealnih skupina za takvu ulogu. Glavna je to što zbog njihove ograničene mobilnosti, razina kontaminacije organizma vremenski odgovara bioraspodjelivosti onečišćivala, odnosno koncentracija zagađivača u odraslom sesilnom organizmu, savršeno će prikazivati stanje u njegovom staništu. Iznimke su, naravno, pelagičke vrste koje se ne mogu koristiti u tu svrhu. Također, mekušci, kao druga najveća skupina beskralježnjaka, rasprostranjeni su u svim ekosustavima po cijelom svijetu, što uključuje veliki broj kozmopolitskih vrsta. Time je omogućeno kontinuirano praćenje stanja na geografski različitim područjima. Određene ključne vrste nužno je pratiti jer će negativni utjecaj na njih posljedično imati negativan utjecaj na cijeli ekosustav. Osim terenskog aktivnog i pasivnog praćenja vrsta, zbog jednostavnog uzgoja, koriste se i kao pokusne životinje u laboratorijima za ekotoksikološka istraživanja. Veliki broj vrsta živi dugo, stoga se utjecaj onečišćivača može pratiti kroz duži period. Osim njihove ekologije, idealnim indikatorima čini ih i sama struktura organizma. Naime, ustanovljeno je da je utjecaj onečišćivala na organizam mekušaca, puno intenzivniji, nego kod ostalih organizama, te se stoga koriste kao takozvani uranjeni upozoravajući sustav. Već će veoma niske koncentracije kemikalija u okolišu imati negativne posljedice na njihov organizam, u odnosu na ostale sistematske skupine. Velika osjetljivost mekušaca prezentirana je i činjenicom da se velika većina vrsta nalazi na crvenim listama ugroženih životinja. S obzirom da

je histološka i morfološka struktura tkiva detaljno proučena, kao i ekologija vrsta, utjecaj onečišćivala može se pratiti na svim razinama, od molekularnih do populacijskih (Oehlmann i Schulte-Oehlmann 2003). U ovom preglednom radu, pokušat će se dati uvid u nove smjerove istraživanja i dosadašnja znanja o utjecaju onečišćivala na endokrini sustav ove važne skupine organizama.

1.1. Brojnost i sistematika skupine mekušci

Koljeno *Mollusca* ili mekušci, drugo je najraznolikije koljeno unutar beskralježnjaka koje broji oko 100 000 vrsta. Prema današnjoj sistematici, podijeljeni su u sedam skupina: *Aplacophora* (bezljušturaši), *Polyplacophora* (mnogoljušturaši), *Monoplacophora* (jednoljušturaši), *Gastropoda* (puževi), *Bivalvia* (školjkaši), *Cephalopoda* (glavonošci) i *Scaphopoda* (koponošci) (Habdija i sur., 2021). Najbrojnija skupina su puževi (*Gastropoda*). Iako su primarno živjeli u morskom okolišu, danas su prilagođeni na sve vrste staništa, i vodene i kopnene. Dijelimo ih u 4 skupine ovisno o stupnju torzije tijela. To su *Zygoneuria* (prednjoškržnjak - *Diotocardia*), *Streptoneuria* (prednjoškržnjak – *Monotocardia*), *Euthyneuria* (stražnjoškržnjak) i *Orthoneria* (plućnjak) (Habdija i sur. 2021). Upravo zbog tako velike raznolikosti, bitno je naglasiti da i razlike u funkcionalnim i anatomskim obilježjima također nisu zanemarive. Vrsta iz skupina *Bivalvia*, tj. školjkaša, brojimo oko 25 000, pri čemu one žive isključivo u vodenim staništima, bilo morskim ili slatkovodnim. Sjedilački su ili polusjedilački organizmi (Habdija i sur. 2021). Zbog prirode rada, u daljnjem tekstu biti će opisana obilježja endokrinog, živčanog i spolnog sustava puževa i školjkaša

1.2. Endokrini sustav mekušaca

Centralnu ulogu endokrinog sustava kod mekušaca imaju neurosekretorne stanice i gangliji koji reguliraju i proizvode produkte koje nazivamo neurohormonima. Oni su kemijski glasnici koji upravljaju mnogim mehanizmima i procesima unutar organizma. Živčani sustav razlikujemo ovisno o stupnju razvoja pojedinih skupina unutar koljena mekušaca, stoga najrazvijeniji sustav nailazimo kod skupine glavonožaca. No, općenito gledano, svi pripadnici ove skupine imaju

tetraneuralni živčani sustav koji se sastoji od 5 parova ganglija koji su međusobno povezani konektivama i komisurama (Habdija i sur. 2021). Kod proučavanja endokrinog sustava, naglasak se stavlja na par cerebralnih ganglija i ventralnu živčanu vrpcu. Što se tiče neurosekretornih stanica, one se nalaze unutar neurohemalnih organa, posebnih mjesta gdje se izlučuju neurohormoni. Kod naprednijih skupina, dolazi do razvoja prvih žlijezda u svijetu beskralježnjaka. Kod njih razlikujemo cerebralne, pleuralne, pedalne i abdominalne endokrine žlijezde, te se u tom slučaju neurosekretorne stanice nalaze unutar samih žlijezda. Razlikujemo dva tipa hormona. To su peptidi koji djeluju na membranske receptore i pokreću reakcijsku kaskadu koja naposljetku dovodi do transkripcije gena. Primjeri su *APGWamid*, *CDCH*, *DBH*, *ELH*, *MIPs* od kojih će kasnije neki biti spomenuti. Drugi tip su neuropeptidi i aminergički neurosekreti kao što su dopamin, noradrenalin i serotonin, a izlučeni su od strane cerebralnih, visceralnih i pedalnih ganglija. Imaju ulogu pokretanja udvostručavanja gameta, vitelogeneze, te kontroliranja mehanizama mriješćenja i čuvanja energije (Ketata i sur. 2008).

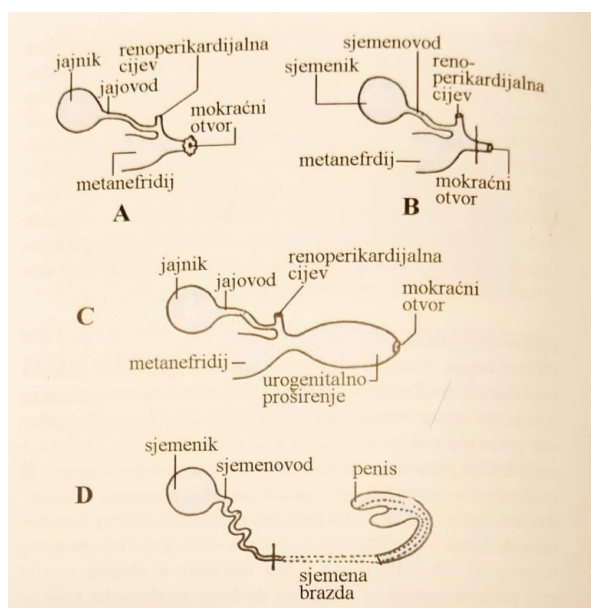
1.3. Uloga endokrinog sustava u razmnožavanju

Endokrini sustav, odnosno izlučeni hormoni, imaju veliku važnost u regulaciji i provođenju procesa reprodukcije u organizama. Unutar skupine postoji velika raznolikost među organizmima, pa tako i vezano za njihov način razmnožavanja. Posljedično, mnoge su razlike pronađene i u sastavu hormona i građi neurosekretornih organa. Vrste iz skupine glavnožaca i školjkaša primarno su gonohoristi, odnosno razlikujemo dva odvojena spola, dok kod skupine puževa prevladava hermafroditizam, bilo da je riječ o simultanom ili sekvencijalnom tipu (Ketata i sur. 2008).

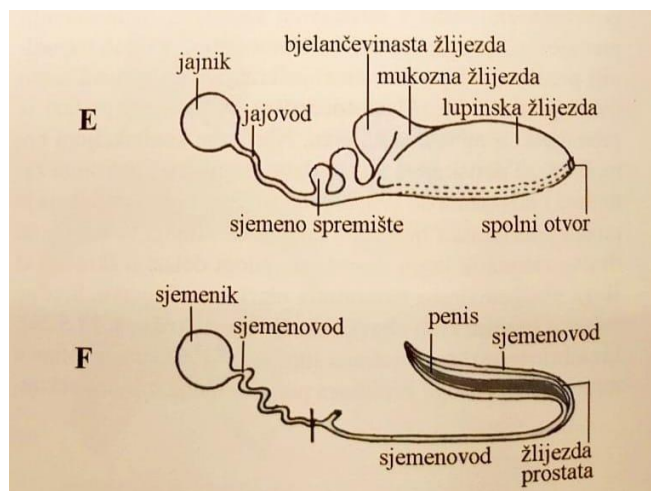
1.4. Spolni sustav mekušaca

Proučavajući spolni sustav vrsta iz skupine puževa, kao i kod svih ostalih organskih sustava, vidljiva je velika raznolikost. Prednjoškržnjaci su uglavnom razdvojena spola. Ovisno o vrsti, postoje tri razine usloženosti spolne organizacije. Kao što je prikazano na slici 1. i 2., kod najjednostavnijih organizama, gonade su povezane s metanefridijima pri čemu se spolni produkti ulijevaju u renoperikardijalnu cijev i urogenitalnom cijevi izlaze kroz nefridopor. Nešto složeniji sustav uključuje proširenje urogenitalne cijevi kod ženki, te razvoj penisa kod mužjaka, odnosno

kopulatornog organa. Kod najrazvijenijeg tipa, ženke posjeduju *receptaculum seminis* (sjemeno spremište) i bjelančevinastu i mukoznu žlijezdu, dok se kod mužjaka još formira sjemenovod i žlijezda prostata. Također je prisutan zaseban spolni otvor. Kod druge važne skupine mekušaca, *Bivalvia*, jedinke su također uglavnom razdvojena spola. Gonade su vrlo velike, s mnogo režnjeva, te se nalaze u gonocelu u utrobnoj vreći, te ponekad zahvaćaju djelomično i prostor pukotina stopala. Sami gonodukti otvaraju se u suprabranhijalni prostor u čijoj blizini je nefridiopor ili se spajaju s metanefridijskom cijevi (Habdija i sur. 2021).



Slika 1. Tri razine usloženosti spolnog sustava kod prednjoškrnjak. A i B *Monodonta* kao primjer prve razine, C i D *Calliostoma* kao primjer druge razine (Preuzeto od Habdija i sur. 2021).



Slika 2. Treća razina usloženosti spolnog sustava kod beskralježnjaka. E *Potamopyrgus* kao primjer ženskog spolnog sustava i F *Potamopyrgus* kao primjer muškog spolnog sustava (Preuzeto od Habdija i sur. 2021).

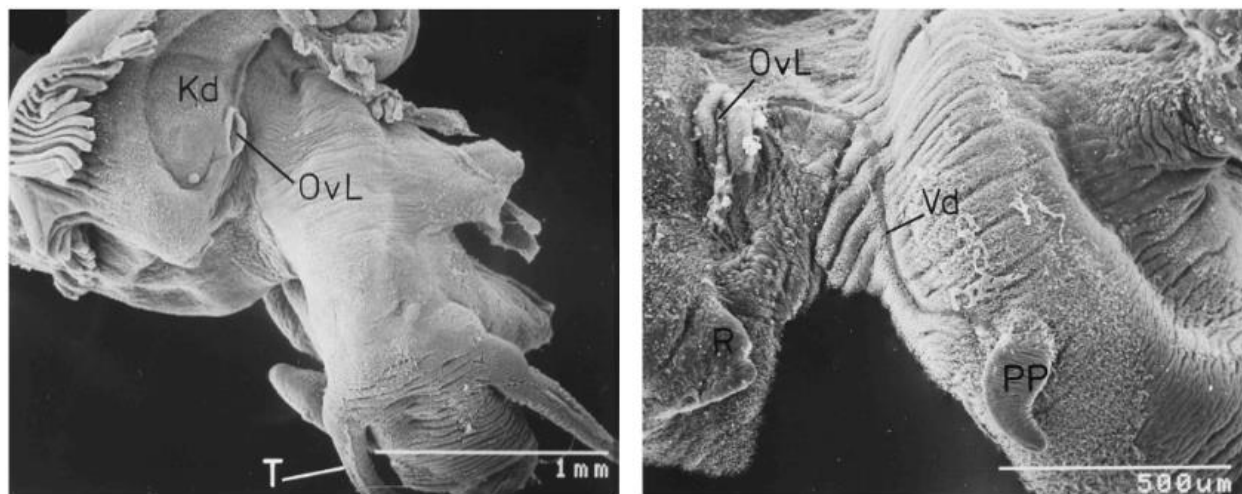
2. Pojave u organizmu uzrokovane utjecajem endokrinih disruptora

Endokrine disruptore (ED) možemo podijeliti u tri skupine prema njihovom utjecaju na organizam. To su kseno-estrogeni, androgeni i antiandrogeni. Svaki od njih inducira karakteristične pojave kod organizama. Kseno-estrogeni primarno uzrokuju pojavu takozvanih super ženki, odnosno povećava se produkcija jaja koja rezultira povećanim mortalitetom ženki. Androgeni, među kojima su najpoznatiji organogeni kositreni spojevi, specifično tributil-kositar, dovode do pojave imposeksa fenomena. Te naposljetku, antiandrogeni, koji u usporedbi s ostale dvije skupine imaju najmanju štetu za populaciju, uzrokuju redukciju muških spolnih organa i spermatogenezu kod muških jedinki. Najveći je naglasak na spomenute pojave, no endokrini disruptori dovode do niza deformacija u organizmu koji još nisu detaljnije istraženi (Tillmann i sur. 2001).

2.1. Pojava imposeksa uzrokovana androgenim supstancama

Najistraživaniji fenomen koji se pojavljuje kao posljedica utjecaja androgenih kemijskih supstanci u okolišu na organizme iz koljena puževa, je imposeks. To je pojava pri kojoj kod ženskih jedinki dolazi do razvoja nefunkcionalnih muških spolnih organa, odnosno penisa, *vas deferensa* i sjemenika. No, trenutno je pronađen isključivo kod prosobranhijalnih vrsta puževa, tj. kod prednoškržnjaka. Uočeno je da utječe na preko 160 poznatih vrsta, no ne na sve (Ketata i sur. 2008). Glavni uzročnik pojave imposeksa su organogeni kositreni spojevi, specifično tributil-kositar (TBT-Sn) kojeg pronalazimo u protuobraštajnim biocidnim bojama primarno za brodove (Furdek, 2015). Već izrazito niske koncentracije, od 1ng po litri, dovodi do morfoloških promjeni kod jedinki, a sam intenzitet deformacija i pojave sterilnosti ovisan je o koncentraciji. Zbog učinka onečišćivala, vidljive su direktne posljedice na populaciju vrsta. Posebno su ugrožene skupine općenito niskog fekunditeta i ograničene mobilnosti (Ketata i sur. 2008). Koliko će imposeks utjecati na mogućnost reprodukcije, može se kvantitativno izraziti pomoću sheme sekvence *vas deferens-a* (VDS). Veći broj određuje fazu s razvijenijim muškim spolnim organima koji kada dođu do posljednje faze fizički pritišću ženski spolni sustav i onemogućuju razvoj i lijeganje jaja (Quintela i sur. 2002). VDS indeks temelji se na 6 faza razvoja imposeksa, pri čemu su peta i šesta faza ekološki najbitnije s obzirom da uvjetuju sterilnost. U fazi pet dolazi do prerastanja muških spolnih organa oko vulve i genitalne papile, dok u šestoj fazi dolazi do začepljenja otvora ovidukta

zbog čega se kapsularni materijal akumulira (Spence i sur. 2023). Kod vrste iz skupine puževa, *Hydrobia ulvae*, napravljen je elektronski snimak izgleda unutrašnjosti plaštane šupljine ženke, prije i nakon razvitka posljednje, odnosno šeste, faze imposeksa što je prikazano na slici 1. Na njoj je vidljiv razvoj svih muških spolnih organa koji su u konačnici doveli do začepljenja otvora ovidukta i tako onemogućili daljnje razmnožavanje. Dva su poznata



Slika 3. Snimka jedinice ženke vrste *Hydrobia ulvae* s otvorenom plaštanom šupljinom, napravljena elektronskim mikroskopom. 1. slika je zdrava ženka bez pojave imposeksa; 2. slika je sterilna ženka u posljednjoj fazi pojave imposeksa. Kratice: Kd – lupinska žlijezda, OvL – otvor ovidukta, PP – penis, T – krak, Vd – vas deferens (preuzeto od Oehlmann i Schulte-Oehlmann 2003).

mehanizma kako imposeks dovodi do sterilnosti. Jedan je prethodno opisan, odnosno začepljenje otvora ovidukta koji se još naziva i tip 6a. Drugi način je takozvana 5c faza, kada dolazi do pucanja *burse copulatorix* i lupinske žlijezde zbog čega je onemogućena kopulacija i stvaranje kapsularnog materijala (Oehlmann i Schulte-Oehlmann 2003). Endokrini disruptori mogu utjecati na reprodukciju kroz različite metaboličke i kataboličke puteve u organizmu, odnosno: „ciljajući sintezu, sekreciju, transport, metabolizam, mehanizam djelovanja ili nastanka hormona u organizmu“ (Ketata i sur. 2008). Rezultatima koji su dobiveni u laboratoriju, ustanovljeno je da TBT može djelovati na više aspekata u organizmu, te su također dobivene različite varijacije ovisno na kojoj vrsti je provedeno istraživanje. Zašto postoje razlike između različitih skupina prednjoškržnjaka, ne zna se. Schulte-Oehlmann i sur. (2000) navode pojavu fenomena imposeksa i kod azijske vrste *Thais clavigera* uzrokovanu trifeniltinom (TPT-om), čime se upućuje da do navedene deformacije može doći i utjecajem drugih endokrinih disruptora. Trifeniltin je česti

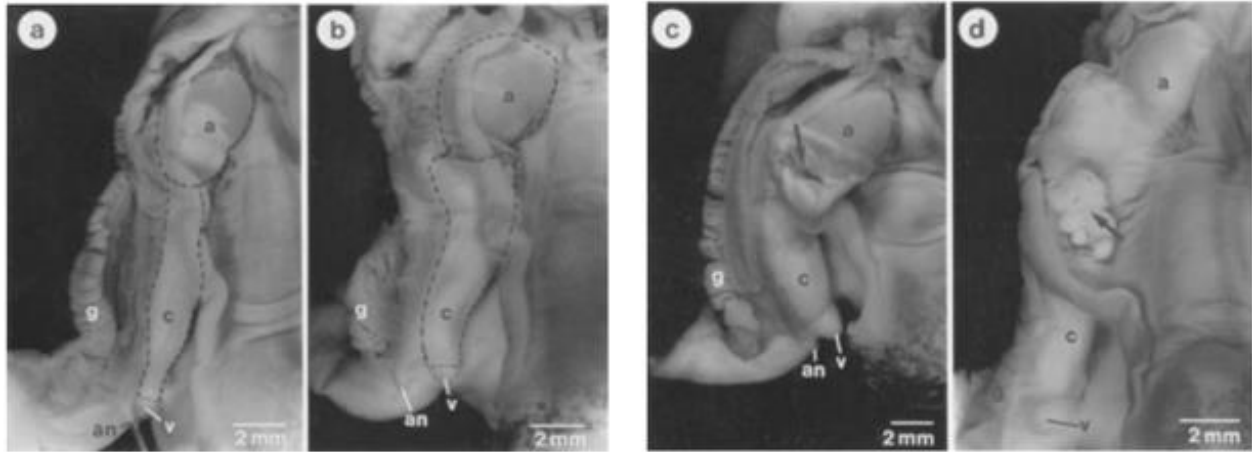
fungicid u poljoprivredi. Daljnjim eksperimentima, uočeno je da do pojave imposeksa dolazi ovisno o samoj vrsti. Primjerice, dok je kod slatkovodne vrste *Marisa cornuarietis* utjecaj TPT-a bio značajan i morfološki vidljiv kod morskih vrsta *Nucella lapillus* i *Hinia reticulata* nije došlo do sličnih deformacija. Slična istraživanja provedena su i na prostoru Jadranskog mora u Republici Hrvatskoj. Stagličić i sur. (2008) primjećuju pojavu imposeksa kod vrste *Hexaplex trunculus* na prostoru Kaštelanskog zaljeva. 20 – 90% jedinki prosječno, bilo je zahvaćeno najvećim stadijem imposeksa opisanim VDSI indeksom. Primarni uzrok je, i u ovom slučaju, zagađenje tributil-kositrom.

2.2. Pojava interseksa uzrokovana androgenim supstancama

Kod pojedinih vrsta uočeno je da povećana koncentracija androgenih onečišćivala ne dovodi do imposeksa, no dolazi do deformacija koje zajedničkom riječju nazivamo interseks. Prva vrsta na kojoj je to primijećeno je *Littorina littorea* kod koje je, pri izloženosti TBT-u, došlo do promjene morfologije palijalnih organa u strukture nalik muškim spolnim organima. Do potpunog razvitka penisa i *sjemenovoda* u ovom slučaju nije došlo (Ketata i sur. 2008). Pod pojmom interseks smatraju se ženke kojima je na palijalnim organima došlo do razvitka muških spolnih organa koji posljedično zatvaraju ženski spolni otvor, te ženke čiji su ženski spolni organi postupno zamijenjeni muškima. Sama pojava navedenih deformacija smanjuje reproduktivni uspjeh ženke, odnosno povećava njenu sterilnost ovisno o fazi razvoja koja se izražava putem indeksa interseksa (ISI). Raspon brojeva u samom indeksu kreće se od nula do četiri, pri čemu vrijednost odražava prosječno stanje u populaciji. Nula predstavlja odsustvo pojave interseksa, dok je četiri krajnja faza potpune sterilnosti. U fazi jedan i dva dolazi do smanjenog reproduktivnog uspjeha zbog gubljenja sjemene tekućine u fazi jedan prilikom kopulacije, odnosno izljevanja kapsularnog materijala u plaštanu šupljinu tijekom faze dva. U posljednje dvije faze, odnosno tri i četiri, žlijezde koje imaju ulogu tvorbe kapsule jajeta, više nisu prisutne u organizmu što dovodi do nemogućnosti stvaranja jaja (Oehlmann i Schulte-Oehlmann 2003).

2.3. Deformacije pri nastanku i razvoju jaja i embrija uzrokovane kseno-estrogenima

Osim pojave imposeksa kao najčešćeg fenomena, kod pojedinih vrsta uočene su i deformacije u procesima nastanka i razvoja jaja i embrija prilikom izloženosti kseno-estrogenima. Kod vrsta iz skupine prosobranhijalnih puževa, kao što je primjerice *Marisa cornuarietis*, izlaganje bisfenolu A (BPA) i oktilfenolu (OP) uzrokuje akumulaciju povećanog broja jajašaca unutar palijalnih organa koji uslijed toga bubre, te naposljetku pucaju što uzrokuje smrt ženki neovisno o koncentraciji kojoj su izložene. Slika 4 prikazuje faze puknuća tkiva i naposljetku izlaska akumulirane mase jaja kroz otvor. Navedene deformacije ukazuju na nastanak takozvanih „superženki“ (Ketata i sur. 2008). Unatoč tome što je eksperimentalni organizam slatkovodni, pretpostavka je da do istog događaja može doći i u morskom okolišu, no ovisno o vrsti s obzirom na njihovu veliku raznolikost. Oehlmann i sur. (2000) navodi da kod *N. lapillus* također dolazi do povećanja broja embrija, no posljedica nije ruptura ovidukta i povećana smrtnost već smanjena produkcija sjemene tekućine i redukcija veličine penisa i prostate. U slučaju vrste *M. cornuarietis* utjecaj endokrinih disruptora proporcionalan je s vremenom izloženosti onečišćivalu do određenog perioda kada više nema promjena pri čemu je važno naglasiti da je do stalne koncentracije pri kojoj je jasan odgovor došlo u manjem periodu pri izloženosti onečišćivala kroz sediment, u odnosu na izloženost kroz vodeni medij. U drugom slučaju, kod vrste *N. lapillus*, nema pojave stalne koncentracije kao kod prvog primjera niti u slučaju povećanja broja embrija, kao ni kod smanjenja muških spolnih organa. Eksperimenti su provedeni i za kseno-estrogene nonilfenol (NP) i etinilestradiol (EE2), no njihov utjecaj manje je jasan. Što se tiče samog mehanizma utjecaja navedenih kseno-estrogena na endokrini sustav, on još uvijek nije razjašnjen, no eksperimentima je jasno pokazano da utječe na njega. Kao biomarker predložena je indukcija sinteze vitelogenina (Vtg), proteina prekursora sinteze žumanjka jajeta, koji se u tu svrhu uspješno koristi kod vodenih vrsta kralježnjaka. S obzirom na velike razlike između organizama iz skupine kralježnjaka i beskralježnjaka, još uvijek nije eksperimentalno dokazano da se navedeni biomarker može koristiti u tu svrhu i kod ove skupine životinja (Porte i sur. 2006).

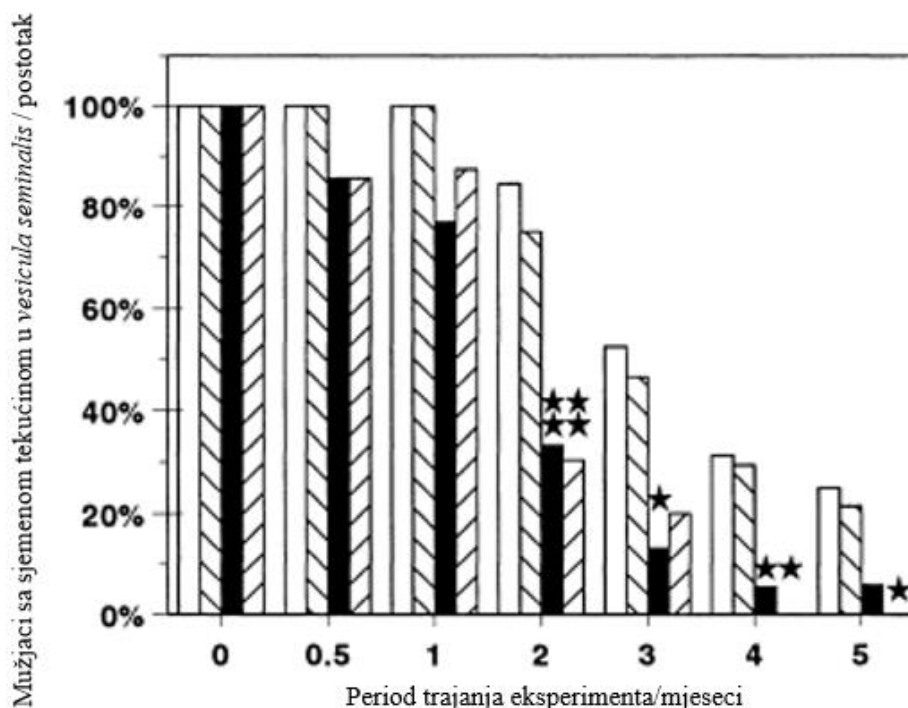


Slika 4. Usporedba fotografija otvorene plaštane šupljine ženke vrste *Marisa cornuarietis* pri čemu (a) slika predstavlja kontrolnu jedinku, (b),(c), (d) ženske jedinke izložene endokrinim disruptorima bisfenolu i oktilfenolu . (b) povećanje lupinske i bjelančevinaste žlijezde prikazano crtama u usporedbi s (a); (c) puknuće tkiva uz ovidukt prikazano strelicom; (d) strelica pokazuje na izlazak mase jajašaca kroz puknuće (preuzeto od Oehlmann i sur. 2000).

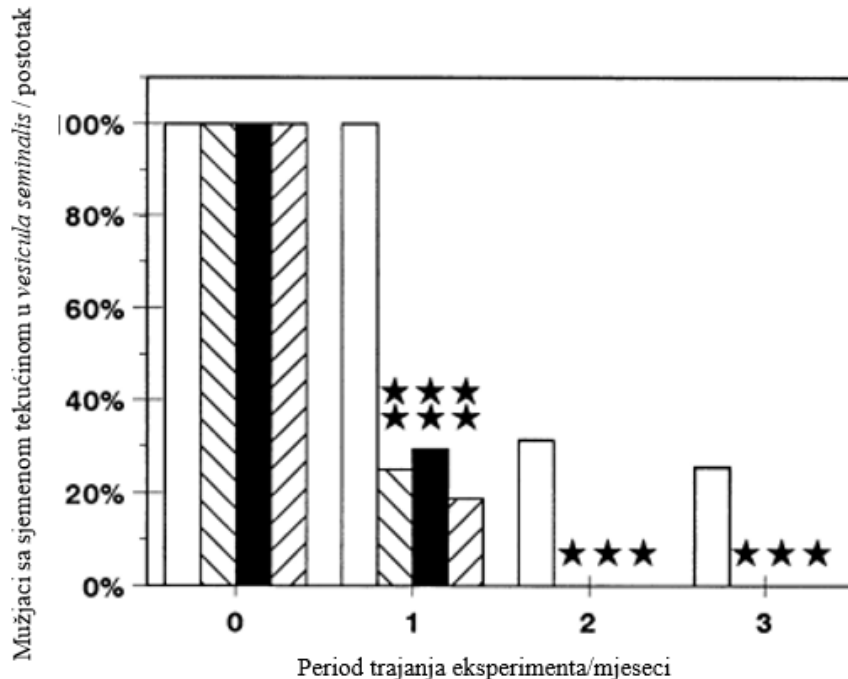
2.4. Utjecaj antiandrogenih endokrinih disruptora

Osim androgenih supstanci, kao što je TBT, pretpostavlja se da se u okolišu mogu naći i antiandrogeni disruptori koji imaju široku primjenu u industriji, a postoji mogućnost da imaju veliki utjecaj na živi svijet. Tillmann i sur. (2001) provode eksperimentalno istraživanje pri čemu su dvije vrste morskih prosobranhijalnih puževa, *Nucella lapillus* i *Nassarius reticulatus*, izložene dvjema različitim antiandrogenim supstancama. Za primjer uzima ciproteron acetat (CPA) koji ima veliku primjenu u farmaciji, te vinklozolin (VZ) koji se koristi u poljoprivredi kao fungicid. Već je pri niskim koncentracijama došlo do ispoljavanja karakteristika utjecanih CP-om. Naime, kod muških jedinki, dolazi do redukcije dužine penisa, koja je nakon 5 mjeseci, iznosila 18,6%. Jedinke su također izložene istovremenom utjecaju TBT-a kao androgena, te CPA kao antiandrogena. Došlo je do zanemarivog utjecaja TBT-a, odnosno kod tih jedinki dolazi do redukcije penisa za 17% u istom periodu. Osim na dužinu kopulatornog organa, uočen je i utjecaj na samu spermatogenezu. Na slici 5 može se jasno vidjeti kako količina sjemene tekućine u sjemenim mjehurićima opada pri dužoj izloženosti toksinima. Rezultati dobiveni kod primjene vinklozolina, usporedivi su s prvotnim eksperimentom, no bitno je naglasiti da je korištena koncentracija VZ-a znatno manja u usporedbi s koncentracijom CPA. Uz redukciju penisa i spermatogenezu, dolazi do redukcije žlijezde prostate, ali i do ranijeg prestanka reproduktivnih aktivnosti Na slici 6 grafički je prikazan

utjecaj VZ-a kroz vrijeme na spermatogenezu. Prema dobivenim podacima, pretpostavka je da navedene kemikalije mogu imati utjecaj na fekunditet puževa, pri čemu je naglasak na redukciju penisa. S obzirom da kopulatorni organ mora ući u *bursu copulatorix* ženke tijekom kopulacije, potrebna je minimalna dužina penisa kako bi to bilo moguće (Tillmann i sur. 2001).



Slika 5. Grafički prikaz broja mužjaka sa sjemenim mjehurićima (*vesicula seminalis*) ispunjenima sjemenom tekućinom izraženo u postotku, kroz period eksperimenta u trajanju od pet mjeseci, kod puževa vrste *Nucella lapillus* pri izloženosti antiandrogenom endokrinom disruptoru ciproteron acetatu (CPA), tributil-kositru (TBT-Sn) ili kombinaciji oba spoja. Stupci gledajući s lijeva na desno predstavljaju: kontrolnu skupinu, skupinu izloženu 0,05µg TBT-Sn/L, skupina izložena 1,25mg CPA/L, skupina izložena 0,05 µg TBT-Sn/L plus 1,25mg CPA/L. Zvezdice predstavljaju statistički značajnu razliku izračunatu Hi-kvadrat testom. Jedna zvezdica znači da je $p < 0,05$, dvije zvezdice znače da je $p < 0,01$ (Preuzeto i prilagođeno od Tillmann i sur. 2001).



Slika 6. Grafički prikaz broja mužjaka sa sjemenim mjehurićima (*vesicula seminalis*) ispunjenima sjemenom tekućinom izraženo u postotku, kroz period eksperimenta u trajanju od tri mjeseca, kod vrste *Nucella lapillus* pri izloženosti VZ-u. Stupci gledajući s lijeva na desno predstavljaju: kontrolnu skupinu, skupinu izloženu 0,03 µg VZ/L, skupinu izloženu 0,3µg VZ/L, skupinu izloženu 1,0µg VZ/L. Zvezdice predstavljaju statistički značajnu razliku izračunatu Hi-kvadrat testom. Jedna zvezdica znači da je $p < 0,05$, dvije zvezdice znače da je $p < 0,01$ (Preuzeto i prilagođeno od Tillmann i sur. 2001)

2.5. Druge pojave

Uočeni su još mnogobrojni efekti kod organizama, uzrokovani utjecajem ED-a, no daljnja detaljnija istraživanja nisu provedena. Među njima, ističu se histološke promjene kao što su odgođena oogeneza ili spermatogeneza, nekroza tubula, upalne reakcije kao što su infiltracija fagocitnih hematocita i proliferacija vezivnog tkiva., te je Kod pojedinih vrsta puževa i školjkaša primjećena je i pojava ovotestisa (Ketata i sur. 2008). Ovotestis (OT) definiran je prisutnošću i testikularnog i ovarijskog tkiva, odnosno naziva se i hemafroditskom gonadom (Nordenström 2020). Također, primijećena je i alternacija ili indukcija vitelogeneze, što bi možda mogao biti dobar indikator utjecaja ED-a na endokrini sustav. Kod školjkaša *Mya arenaria* izloženih otpadnim vodama, dokazana je povećana fosforilacija proteina, a kod puža *Nucella lapillus* dokazana je indukcija ekspresije estradiolnog receptora (Ketata i sur. 2008). Sami mehanizmi djelovanja i

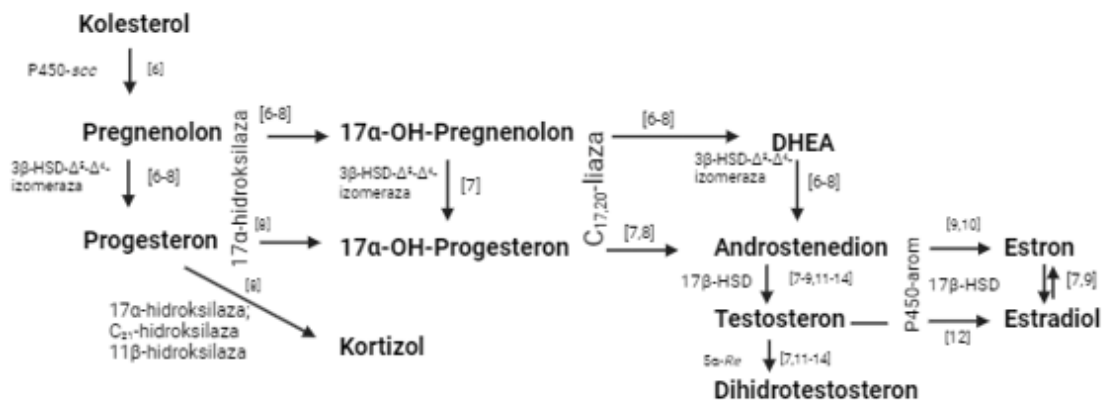
detaljniji podatci nisu dostupni, te su, kao što je spomenuto, potrebna daljnja istraživanja. Oehlmann i sur. (2000) također navode dodatne pojave uzrokovane trifeniltinom (TPT-om), kao primjerom kseno-androgena. Kod vrste *Hinia reticulata*, iako ne dolazi do nikakvih promjena tipičnih za utjecaj androgena, kao što je pojava imposeksa, primjećene su deformacije kod razvojnih procesa i procesa diferencijacije gonada kod oba spola. Što je koncentracija TPT-a kojom su bile izložene veća, to je stupanj razvoja gonada bio niži. Navedena deformacija, popraćena je i pojavom atrezije, odnosno pojave neprohodnosti cjevastih organa zbog sraslosti stijenki ili pritiska okoline (Leksikografski zavod Miroslav Krleža 2021).

3. Mehanizmi kojima dolazi do endokrine disrupcije

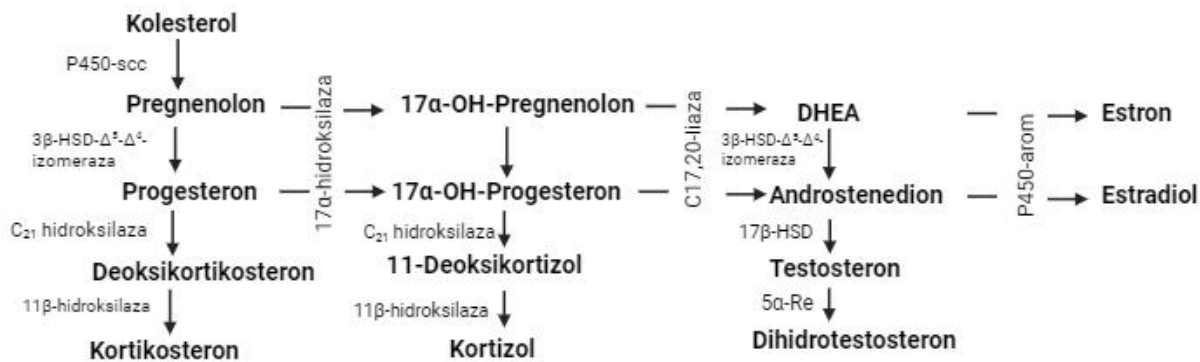
3.1. Utjecaj TBT-a na pojavu imposeksa

Kod ženskih jedinki koje počinju razvijati penis dolazi do sinteze neurohormona koji se prirodno sintetizira samo u pedalnom gangliju mužjaka. Povećana koncentracija TBT-a inducira sintezu velike količine tog hormona. Tributitl-kositar akumulira se u ganglijima i živcima, te se pretpostavlja da djeluje kao neurotoksin koji stimulira oslobađanje neurohormona PMF-a (*Penis Morphogenic Factor*) koji inducira razvitak muških sekundarnih spolnih značajki. Kao mogući PMF, predložen je peptidni hormon APGWamid. U vrste *Ilyanassa obsoleta* uočeno je da inducira imposeks već pri znatno niskim koncentracijama. APGWamid izrazito je konzerviran u svih vrsta mekušaca, te se pretpostavlja da ima bitnu ulogu u reprodukciji i razvoju. Također, nakon razvitka sekundarnih spolnih karakteristika, uočena je povećana koncentracija testosterona, zbog čega se otvara mogućnost da testosteron ima ulogu u održavanju imposeksa kod organizma. Zbog sposobnosti TBT-a da inhibira konverziju testosterona u inaktivan oblik, dolazi do smanjenja njegove eliminacije iz organizma. Osim testosterona, primjećene su i varijacije u razini estradiola, no promjene su različite ovisno o proučavanoj vrsti. Kod nekih jedinki nije došlo do značajnih promjena u koncentraciji, dok je kod nekih bitno smanjena razina estradiola zbog čega se mijenja omjer slobodnog testosterona i slobodnog estradiola u korist androgena. TBT može utjecati i na određene enzime koji sudjeluju u sintezi ili eliminaciji steroida, specifično, na CYP19 aromatazu, no to je također primjećeno samo kod pojedinačnih vrsta. Jedno od posljednjih istraživanja pokazalo je da se spomenuti toksin, sa velikim afinitetom za ligand, veže na retinoidni X receptor (RXR) za kojeg se zna da kod ljudi ima bitnu ulogu u biosintezi steroida, na način da modulira P450 aromatazu (Ketata i sur. 2008). Uspoređivanjem puta sinteze steroida kod kralježnjaka, primjerice sisavaca, prikazanog na slici 7., te istog tog puta kod mekušaca, prikazanog na slici 8., mogu se vidjeti određene sličnosti. Kao i kod sisavaca, i kod mekušaca kombinacija citokroma P450 i steroidnih dehidrogenaza ima glavnu ulogu pri konverziji kolesterola u spolne steroidne hormone. Iz tog razloga dolazi do pretpostavke da su mehanizmi utjecaja TBT-a na endokrini sustav kod mekušaca i kralježnjaka slični (Porte i sur. 2006). No s obzirom na nedostatak eksperimentalnih dokaza, te još uvijek izražene razlike između hormonalnog sustava ovih skupina

životinja, ne može se sa sigurnošću reći, ima li sposobnost TBT-a da se veže na X receptor, značajnu ulogu u organizmu mekušaca (Ketata i sur. 2008).



Slika 7. Biosintetski put steroida kod sisavaca (Preuzeto i prilagođeno od Porte i sur. 2006).



Slika 8. Biosintetski put steroida mekušaca (Preuzeto i prilagođeno od Porte i sur. 2006).

4. Zaključak

Zbog relativno nedavno otkrivene važnosti mekušaca u praćenju vodenih staništa, te njihove velike senzibilnosti na onečišivala u okolišu, povećao se broj istraživanja posvećenih njima. No unatoč tomu, broj eksperimentalnih podataka i količina znanja o toj temi još uvijek nije dovoljna u odnosu na obujam važnosti teme. Najveći naglasak kod istraživanja je utjecaj endokrinih disruptora na samu reprodukciju jer će ona uvjetovati opstanak populacija u okolišu. Najistraživanija pojava je fenomen imposeksa, čiji je glavni uzročnik tributilfenil-kositar (TBT) koji pripada u skupinu androgenih disruptora. Uz njih, postoje još kseno-estrogeni i antiandrogeni za koje je dokazano da također imaju učinak na endokrini i reproduktivni sustav mekušaca, no detaljnija istraživanja tek trebaju biti provedena. Sama skupina mekušaca veoma je raznolika, te je iz tog razloga veoma teško donijeti uniformni zaključak o utjecaju supstanci na njihov organizam. Učinak onečišćivala od vrste do vrste veoma se razlikuje, čak i unutar jedne skupine, primjerice puževa kao najraznolikije skupine unutar koljena. Potrebno je detaljno poznavanje endokrinog sustava svakih od skupina, ako ne i vrsta, kako bi se točno moglo znati kakav će utjecaj onečišćivala imati na organizam.

5. Literatura

- Furdek M. (2015): Raspodjela i ponašanje organokositrovih spojeva u priobalnom moru istočnoga dijela Jadrana. Doktorski rad, Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za anorgansku geokemiju okoliša, Zagreb
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A. i Sertić Perić, M. (2021): *Protista – Protozoa – Metazoa – Invertebrata: Strukture I funkcije*. Drugo izdanje. Alfa, Zagreb.
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021):<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=4511> (pristupljeno 13.9.2023.)
- Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., Minier, C. (2008): Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147: 261–270.
- National Institute of Environmental Health Sciences (2023):<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm> (pristupljeno 8.9.2023.)
- Nordenström, A. (2020): Puberty in individuals with a disorder of sex development. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 14: 42–51.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U. (2003): Molluscs as bioindicators. *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*: 577–635.

- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B. (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropods) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xenoandrogen. *Ecotoxicology* 9: 383–397.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B. (2000): Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails Mollusca: Gastropoda in the Laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylphenol as Xeno-Estrogens. *Ecotoxicology* 9: 383–397.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L., (2006): Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143: 303–315.
- Quintela, M., Barreiro, R., Ruiz, J.M. (2002): Dumpton Syndrome reduces the tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of the imposed *vas deferens*. *Marine Environmental Research* 54: 657–660.
- Spence, S.K., Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Masters, D., Morris, L., Hawkins, S.J. (2023): Effects of TBT Contamination on Nucella Populations. *Functional ecology, New Horizons on Ecotoxicology* 4: 425–432.
- Stagličić N., Prime M., Zoko M., Erak Ž., Blažević D., Madirazza K., Jelić K., Peharda M. (2008): Imposex incidence in *Hexaplex trunculus* from Kaštela Bay, Adriatic Sea. *Acta adriatica* 49 (2): 159- 164.
- Tillman M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J.R. (2001): Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part III: Cyproterone Acetate and Vinclozolin as Antiandrogens. *Ecotoxicology* 10: 373-388.

6. Životopis

Rođena 17. studenog 2001. godine u Karlovcu. Završila Osnovnu školu Dubovac 2016., te Gimnaziju Karlovac 2020. godine, također u Karlovcu. Iste godine upisuje smjer Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. 2022. godine odrađuje stručnu praksu u biološkoj udruzi Hyla, te demonstrature na kolegiju Zoologija na Biološkom odsjeku PMF-a. 2023. godine u sklopu Erasmus stručne prakse odlazi na dva mjeseca u Porto, Portugal na praksu u laboratoriju istraživačke grupe za biogeografiju i evoluciju u biološkom institutu CIBIO. Aktivan je član udruge studenata biologije BIUS.