

# Endokrini poremećaji organizama u uzgoju

---

**Krajina-Roso, Celestin**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Dubrovnik / Sveučilište u Dubrovniku**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:155:193491>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2020-11-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Dubrovnik](#)



SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU  
ODJEL ZA AKVAKULTURU  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ AKVAKULTURA

Celestin Krajina-Roso

## **Endokrini poremećaji organizama u uzgoju**

ZAVRŠNI RAD

Mentor:

doc. dr. sc. Tatjana Dobroslavić

Dubrovnik, 2020.

Ovaj završni rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Tatjane Dobrosravić, u sklopu preddiplomskog studija Akvakultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

**SADRŽAJ**

1. UVOD.....	2
1.1. Mehanizam djelovanja endokrinih disruptora.....	3
2. ENDOKRINI SUSTAV.....	4
2.1. Endokrine žlijezde i tkiva.....	4
2.1.1. Hipofiza.....	4
2.1.2. Štitnjača .....	6
2.1.3. Ultimobranhijalna žlijezda.....	6
2.1.4. Interrenalne i kromafine stanice.....	6
2.1.5. Epifiza.....	7
2.1.6. Gušterača.....	7
2.1.7. Stanijusova tjelešca.....	7
2.1.8. Riblje crijevo.....	8
2.1.9. Urofiza.....	8
3. ENDOKRINE OSI .....	9
3.1. Hipotalamus – hipofiza - gonade os.....	9
3.2. Hipotalamus - hipofiza - tireoidna os.....	10
3.3. Hipotalamus - hipofiza - interrenalna os.....	12
4. POREMEĆAJI ENDOKRINOG SUSTAVA BESKRALJEŠNJAKA.....	14
4.1. Rotiferi.....	14
4.2. Mekušci.....	15
4.3. Rakovi.....	17
4.3.1. Razmnožavanje.....	17
4.3.2. Presvlačenje.....	19
5. POREMEĆAJI ENDOKRINOG SUSTAVA RIBA.....	20
5.1. Reproductivni sustav.....	20
5.1.1. Reproductivni sustav mužjaka.....	20
5.1.2. Reproductivni sustav ženki.....	22
5.2. Štitnjača i intrerrenalne i kromafine stanice.....	26
5.2.1. Štitnjača.....	27
5.2.2. Interrenalne i kromafine stanice.....	29
5.3. Imunološki sustav.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA.....	35

## 1. UVOD

Provedena istraživanja dokazala su da onečišćivači okoliša mogu uzrokovati poremećaje endokrinog sustava ljudi i životinja. Pojam „*endocrine disruption*“ uveden je na prvoj World Wildlife Federation Winspread konferenciji 1991. godine, koja je održana zbog brojnih izvješća o štetnim utjecajima raznih kemikalija, (pesticidi, industrijske kemikalije i lijekovi) na određene hormonski regulirane funkcije kod raznih skupina kralješnjaka i ljudi (Zou, 2010). Ove tvari se nazivaju endokrini disruptori i definirani su kao kemikalije egzogenog porijekla koje uzrokuju poremećaje kod zdravih organizama ili njihovog potomstva, dovodeći do promjena koje direktno utječu na funkciju endokrinog sustava ili funkcije endokrinih žlijezda, njihovih hormona i receptora (Carr i O'Harris, 2006). Glavna osnova u definiciji jest da zagađivač utječe na specifičnu komponentu endokrinog sustava u koncentracijama koje ne utječu na funkcioniranje ne-endokrinog tkiva u životinji (Hester i Harrison, 1999).

Endokrini disruptori (EDC) različite su kemijske tvari: pesticidi, sintetički hormoni, biljne tvari, kemikalije korištene pri proizvodnji i obradi plastike i otpad iz različitih grana industrije kao npr. perklorati (Carr i O'Harris, 2006). Tijekom zadnjih godina značajno se povećao broj potvrđenih i mogućih tvari koje uzrokuju poremećaje endokrinog sustava uključujući i industrijske prerađevine kao što su 4-nonilfenol, bisfenol-A, ftalat ester plastifikator, ali i klasična zagađivala poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, poliklorirani bifenila, dioksina, nekih pesticida i nekoliko elemenata u tragovima (Pait i sur., 2002).

Štetnost određenog EDC na jedinku ili cijelu populaciju ovisi o više čimbenika kao što su: koncentracija i duljina izlaganja, vrsta i životni stadij ali i o okolišnim čimbenicima: godišnjem dobu, temperaturi, salinitetu te prisutnosti ostalih tvari i zagađivala (Evans i sur., 2014).

Pri određivanju štetnosti određenog EDC u akvatičnom okolišu ribe se često koriste kao modelni organizmi. Neke od prednosti ovog pristupa su: sličnost endokrinog sustava riba s endokrinim sustavom viših kralješnjaka, laboratorijski i in vivo dokazana osjetljivost na EDC, lakoća obavljanja eksperimenata i rukovanja s ribom i zbog toga što populacije riba iz prirode, prikupljenih na različitim lokacijama, pokazuju simptome za koje se smatra da se mogu povezati s izlaganjem EDC (Pait i sur., 2002).

Iako su prvenstveno istraživane samo reproduktivne funkcije, pokazalo se da mnoge tvari ometaju funkcije i ostalih žlijezda, kao što su štitnjača i nadbubrežna žlijezda, što između ostalog ometa normalan rast, razvoj i odgovor na stres. Osim odgovora na stres i neometanog

rasta i razvoja organizma, funkcije ovih žlijezda bitne su i za uspješno razmnožavanje tako da njihove disfunkcije neposredno utječu i na spolni sustav (Carr i O'Norris, 2006).

### 1.1. Mehanizam djelovanja endokrinih disruptora

Smatra se da endokrini disruptori djeluju:

- 1) oponašanjem djelovanja hormona u organizmu, kao što su estrogeni i androgeni
- 2) antagoniziranjem utjecaja hormona u organizmu
- 3) mijenjanjem obrazaca sinteze i metabolizma hormona
- 4) modificiranjem razina hormonskih receptora.

Najčešće, endokrini disruptori djeluju kao estrogen i vežu se na njegove receptore (Evans i sur., 2014). Kemikalije mogu imati različiti afinitet vezivanja na receptor estrogena, a intenzitet djelovanja ne mora nužno odgovarati afinitetu. Neke se slabije vežu za receptor, ali svejedno potiču odgovor, dok druge imaju visok afinitet, a induciraju slab odgovor ili služe samo kao blokada vezanja endogenog estrogena (Hester i Harrison, 1999). *In vivo* istraživanjima otkriveni su mnogi mehanizme koje bi mogli biti uključeni u ometanje endokrinog sustava aktivacijom receptora što dovodi do genomske nestabilnosti i promjenama u regulaciji hormona mehanizmom povratne sprege. EDC koji oponašaju svojstva hormona mogu se vezati na ligande što dovodi do konformacijskih promjena i razlika u funkcionalnim i regulatornim aktivnostima ekspresije gena. Određene vrste modificiraju transkripcijske signale tako što inhibiraju ili sintetiziraju nove proteine, oponašaju urođene steroidne hormone i uzrokuju negenomski podražaj vezanjem na receptore plazma membrane i tako zajedničkim djelovanjem sa signalnom molekulom dovode do promjena u staničnoj mobilnosti, procesima signalizacije i brze sinteze hormona (Akefe i sur., 2017). S ubrajanjem receptora za ostale hormone, pojam endokrini disruptori obuhvaća kemikalije koje mogu stupiti u interakciju s bilo kojim hormonskim receptorom, najčešće androgenima, hormonima štitnjače i receptorom za progesteron (Hester i Harrison, 1999).

## 2. ENDOKRINI SUSTAV

Endokrini sustav je regulacijski sustav u tijelu koji djeluje putem hormona, kemijskih glasnika koji upravljaju svakim aspektom u životu kralješnjaka, počevši još od razdoblja ranog embrionalnog razvoja i diferencijacije tkiva do kasnijeg života i razmnožavanja. Hormoni su odgovorni za održavanje homeostaze - stabilnog ekvilibrija fizioloških procesa neovisno o okolišnim procesima (Carr i O'Norris, 2006).

Središnje komponente endokrinog sustava su hipotalamus i hipofiza, koji potaknuti živčanim signalima iz mozga sintetiziraju određene hormone aktivne u ostalim žlijezdama, poput gonada, štitnjače ili nadbubrežne žlijezde (interrenalnih i kromafinih stanica) (Hester i Harrison, 1999).

Hipotalamus, koji se nalazi u ventralnom dijelu diencefalona, bitna je dodirna točka između živčanog i endokrinog sustava (Borella i sur., 2020). Odgovoran je za regulaciju endokrinog sustava, ali i za sintezu određenih hormona koji djeluju stimulatивно ili inhibitivno na anteriorni dio hipofize, tj. na lučenje hormona iz tog dijela. Endokrinim funkcijama hipotalamusa upravljaju viši kortikalni centri u mozgu, ali i utjecaj mehanizma povratne sprege s nekoliko razina endokrinog sustava (Kumar i sur., 2018).

Jedan od glavnih hormona koje hipotalamus sintetizira i otpušta je gonadotropin - oslobađajući hormon (GnRH), koji potiče otpuštanje folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) iz gonadotropnih stanica u hipofizi. Kod životinja se mogu pronaći sveukupno 23 varijante ovog hormona, od čega su tri tipa prisutna kod kralješnjaka: GnRH-I odgovoran za regulaciju hipotalamus-hipofizna-gonade osi i otpuštanje gonadotropina, GnRH-II za kojeg se smatra da djeluje kao neuromodulator i GnRH-III koji se može pronaći samo kod nekih vrsta riba. GnRH-I je jedina varijanta ovog hormona za koju je dokazano da se može vezati na hipofizne receptore i stimulirati lučenje hipofiznih hormona FSH i LH (Petrač, 2015). Lučenje GnRH je pod utjecajem nekoliko okolišnih čimbenika poput: fotoperioda, temperature, količine padalina, feromona i dostupnosti hrane (Borella i sur., 2020).

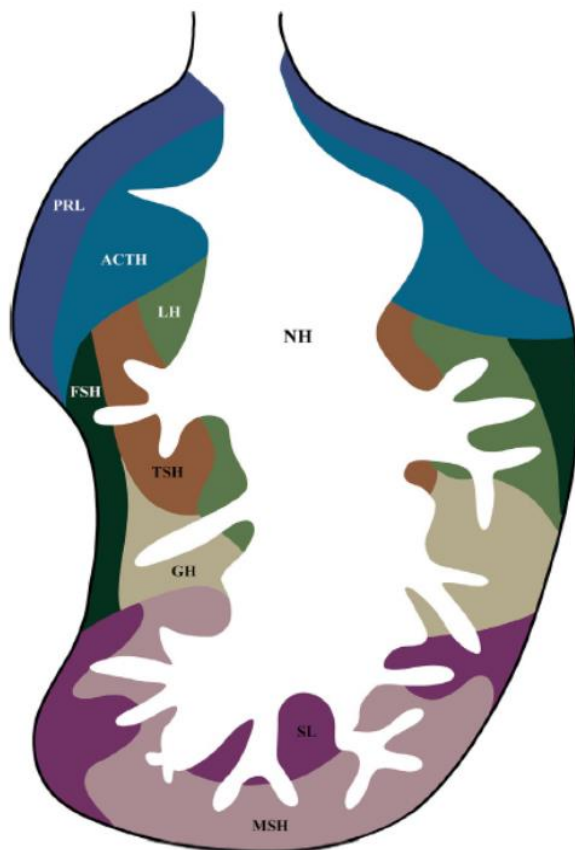
### 2.1. Endokrine žlijezde i tkiva

#### 2.1.1. Hipofiza

Hipofiza je mala endokrina žlijezda koja se nalazi pri bazi diencefalona, pričvršćena s tankom drškom. Ventralni dio hipofize se nalazi u udubini klinaste kosti koja se naziva tursko

sedlo, „*sela turcica*“. Sastoji se od dva dijela: adenohipofize, u kojoj se nalaze stanice odgovorne za sintezu različitih hormona, i neurohipofize, koja se sastoji većinom od živčanih vlakana bez mijelina. Ova vlakna, koja polaze od neurosekretornih neurona u mozgu (hipotalamusu), prenose tvari koje mogu djelovati stimulirajuće ili inhibirajuće na sekreciju hormona iz adenohipofize, kao npr. ranije spomenuti GnRH (Borella i sur., 2020).

Adenohipofiza kod koštunjača se može podijeliti na dva dijela: *pars distalis* i *pars intermedia*. *Pars distalis* se dalje dijeli na dva poddijela: *rostral pars distalis* i *proximal pars distalis*. Ovakva podjela se zasniva na rasporedu, tj. prisutnosti, određenih sekretornih stanica u pojedinom dijelu. *Rostral pars distalis* koštunjača sadrži stanice odgovorne za lučenje hormona prolaktina i adrenokortikotropnog hormona, ali kod nekih vrsta se mogu naći i stanice za otpuštanje tireotropina. *Proximal pars distalis* je odgovoran za otpuštanje hormona rasta, gonadotropnih hormona i najčešće (kod većine vrsta) tireotropina. U dijelu *pars intermedia* se nalaze stanice koje luče melanotropin i somatolaktin, hormon prisutan samo kod riba. Distribucija sekretornih stanica po regijama adenohipofize je stalna (Slika 1), tj. specifične stanice se nalaze uvijek u istim regijama, ali zabilježene su i manje varijacije kod nekih vrsta, povezane s napredovanjem reproduktivnog ciklusa (Borella i sur., 2020).





Slika 1. Prikaz građe hipofize koštunjača s rasporedom stanica odgovornih za otpuštanje određenih hormona. PRL - prolaktin; ACTH - adrenokortikotropni hormon; GH – hormon rasta; TSH - tireotropin; FSH – folikostimulirajući hormon; LH – luteinizirajući hormon; SL - somatolaktin; MSH - melanotropni hormon; NH – živčana vlakna neurohipofize (Izvor: Borella i sur., 2020)

Neurohipofiza nastaje kao izbočina dna diencefalona (infundibulum) koji raste prema dolje poput drške povezane s mozgom. Sastoji od nemijeliziranih živčanih vlakana iz neurosekretornih neurona u mozgu, naročito onih u hipotalamusu. Obuhvaća proksimalni dio drška hipofize i živčana vlakna koja čine *pars nervosa*, rasprostranjena kroz adenohipofizu. Posebno intezivno se granaju u *pars intermedia* (Borella i sur., 2020).

### 2.1.2. Štitnjača

Tkivo štitnjače se kod većine vrsta koštunjača može pronaći raspršeno u basibranhijalnom predjelu. Organizirano je, kao i kod ostalih kralješnjaka, u obliku folikula koji se sastoje od jednog sloja epitelnih stanica i okružuju ekstracelularni lumen pun proteinskog koloida. Hormoni štitnjače su odgovorni za regulaciju rasta, razvoj u ranoj dobi, metamorfozu i za neke od aspekata razmnožavanja (Brown i sur., 2004).

### 2.1.3. Ultimobranhijalna žlijezda

Ultimobranhijalna žlijezda je endokrini organ koji luči hormon kalcitonin, bitan za mineralizaciju kostiju i homeostazu kalcija, pa stoga svi čeljustousti kralješnjaci imaju ultimobranhijalnu žlijezdu ili stanice porijeklom iz ove žlijezde. Kod većine koštunjača se nalazi kao neparni organ neposredno iza srca, ali kod nekih, kao npr. lososa, *Salmo salar*, se javlja bilateralno (Shinohara i Sasayama, 1998).

### 2.1.4. Interrenalne i kromafine stanice

Istraživanjima je ustanovljeno da koštunjače nemaju definiranu nadbubrežnu žlijezdu. Umjesto kompaktnog organa, funkcije nadbubrežne žlijezde obavljaju specijalizirane stanice u bubregu koje se nazivaju interrenalne stanice. Sintetiziraju adrenokortikalne hormone koji djeluju prilikom odgovora na stres, a smatraju se za funkcionalni ekvivalent nadbubrežne žlijezde sisavaca. Glavni od ovih hormona je kortizol, čije se povišene razine mogu primjetiti kod većine koštunjača tijekom i nakon stresnih situacija, poput kontakta s predatorom, izlaganja zraku, ili izolaciji (Gorelick i Habenicht, 2020).

Osim kortizola, za uspješnu prilagodbu na akutni stres su potrebni i katekolamini, adrenalin i noradrenalin, koji se otpuštaju iz kromafinih stanica. Porast razine ovih hormona u krvotoku izaziva niz kompenzacijskih procesa s ciljem ublažavanja utjecaja stresa na fiziološke funkcije. Neki od utjecaja povišenih katekolamina su: poboljšana izmjena i transport kisika zbog utjecaja na kardiovaskularne i dišne funkcije i funkcije crvenih krvnih zrnaca i slezene. Kod koštunjača, većina kromafinih stanica se nalazi unutar stijenki posteriorne kardinalne vene, ali su također prisutne i u tkivu prednjeg bubrega (Perry i sur., 2003).

#### 2.1.5. Epifiza

Epifiza je endokrina žlijezda koja se može naći u mozgu većine kralješnjaka. Sintetizira melatonin, hormon male molekularne težine koji sinkronizira dnevni biološki ritam, kao što je npr. ciklus spavanja i buđenja (Gorelick i Habenicht 2020). Istraživanjima je potvrđena uloga ove žlijezde u smoltifikaciji, razmnožavanju i prilagodbi na promjene duljine dana i noći (Esteban i sur., 2006).

#### 2.1.6. Gušterača

Gušterača se kod koštunjača, kao i kod sisavaca, sastoji od egzokrinog i endokrinog dijela. Endokrini dio je organiziran u obliku Langerhansovih otočića, jednog glavnog i nekoliko manjih, nepravilno oblikovanih, čiji broj varira o vrsti. Langerhansovi otočići sadrže  $\alpha$ -stanice koje proizvode glukagon,  $\beta$ -stanice koje sintetiziraju inzulin i  $\delta$ -stanice odgovorne za otpuštanje somatostatina. Kod odraslih jedinki, u gušterači se još mogu naći i  $\gamma$ -stanice, koje luče pankreasne polipeptide. Inzulin i glukagon reguliraju količinu glukoze u krvi tako što upravljaju s dva nasuprotna dijela metabolizma glukoze, glikogeneom odnosno glikogenolizom, a somatostatin inhibira njihovo otpuštanje iz  $\alpha$ , odnosno  $\beta$ -stanica. Osim toga, inzulin sudjeluje u metabolizmu mnogih drugih biomolekula koje skladište energiju, što također utječe na, tj. spušta, razinu glukoze u krvi (Gorelick i Habenicht, 2020, Kumar i sur., 2018).

#### 2.1.7. Stanijusova tjelešca

Stanijusova tjelešca su jedinstvena za koštunjače i nisu zabilježena kod viših kralješnjaka. Nalaze se u potpunosti ili djelomično ugrađena u bubreg, a broj im varira ovisno o vrsti. Odgovorna su za lučenje hipokalcina, homodimerskog glikoproteinskog hormona, koji upravlja ravnotežom između kalcija i fosfata putem škrge, crijeva i bubrega. Djelovanjem

ovog hormona može se smanjiti stopa absorpcije kalcija iz okolne vode kroz škrge ili crijevo (Karkit i sur., 2019).

#### 2.1.8. Riblje crijevo

Jedno od najvećih endokrinih tkiva kod je riblje crijevo. Endokrine stanice ribljeg crijeva otpuštaju peptidne hormone gastrin i kolekistokin, koji potiču otpuštanje želučane kiseline i enzima gušterače (Evans i sur., 2014).

#### 2.1.9. Urofiza

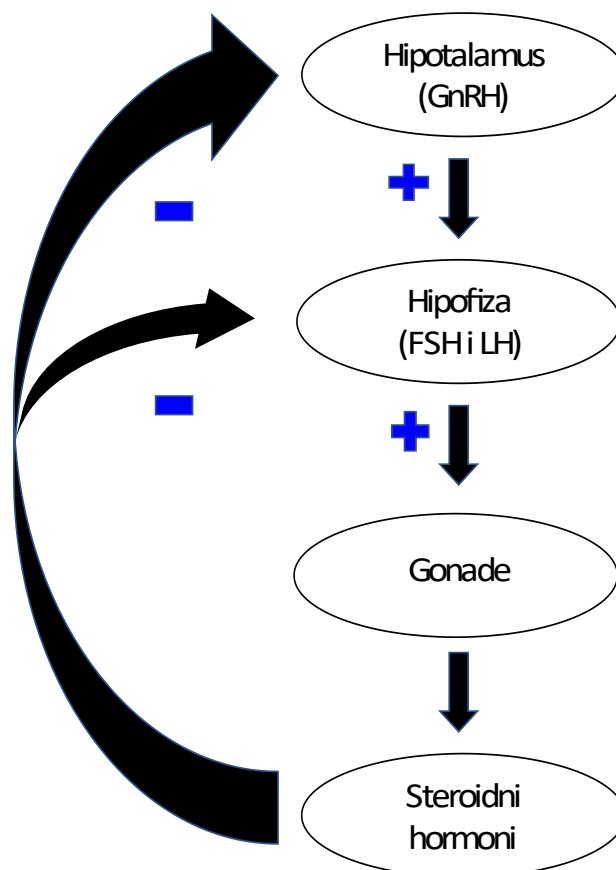
Urofiza izlučuje urotenzine za koje se smatra da, između ostalog, sudjeluju u regulaciji krvnog tlaka i osmoregulacije, ali opseg njihovog djelovanja i dalje nije u potpunosti istražen (Evans i sur., 2014).

### 3. ENDOKRINE OSI

Endokrinim sustavom upravljaju središnje osi koje se sastoje od tri komponente: moždane komponente - hipotalamusa, anteriornog dijela hipofize i jedne od endokrinih žlijezda kao npr. štitnjače ili spolnih žlijezda. Svaka os je regulirana mehanizmom povratne sprege (Kumar i sur., 2018)

#### 3.1. Hipotalamus – hipofiza – gonade os

Hipotalamus, posteriorni dio hipofize i gonade (testisi ili jajnici) čine hipotalamus – hipofiza - gonade os, koja upravlja reproduktivnim funkcijama (Kumar i sur., 2018). Glavni regulator ove osi, GnRH, se otpušta u hipotalamusu (Slika 2). Djeluje vezanjem za membranske receptore adenohipofize, što potiče lučenje gonadotropnih hormona, folikostimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona (Corradi i sur., 2016).



Slika 2. Građa i regulacija hipotalamus – hipofiza - gonade osi. GnRH - gonadotropin - oslobađajući hormon, FSH – folikulostimulirajući hormon, LH – luteinizirajući hormon (Izvor: Kumar i sur., 2018)

Gonadotropini su glavni regulativni hormoni reproduktivnih funkcija. To su glikoproteinski hormoni čije se molekule sastoji od dvije podjedinice, a i b. Podjedinica a je iste građe kod gonadotropina i tireotropina, a podjedinica b je varijabilna ovisno o hormonu. (Borella i sur., 2020).

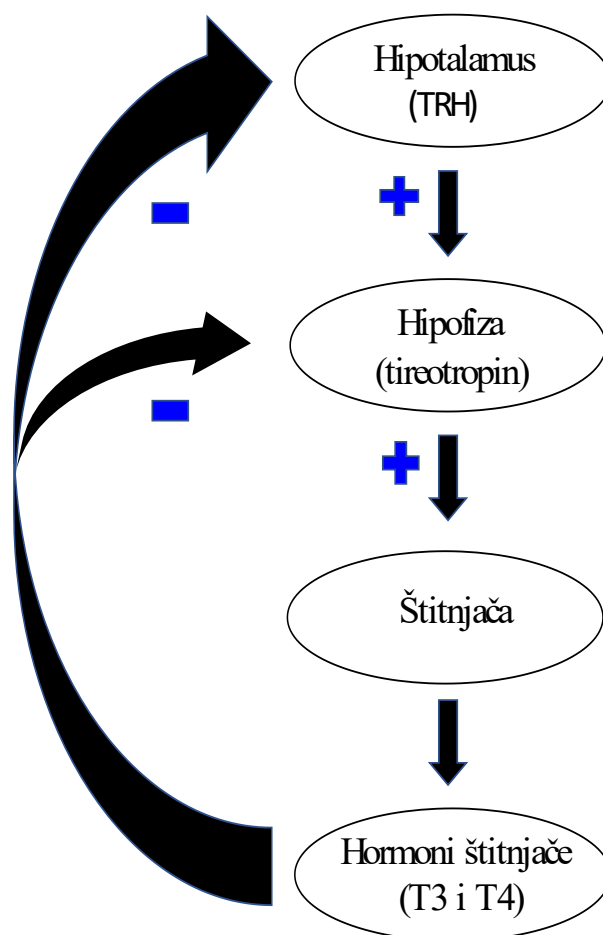
Kod ženki, FSH je aktivan tijekom rasta oocita i sinteze i inkorporacije vitelogenina, a LH izaziva lučenje steroidnog hormona indukcije završnog sazrijevanja gameta, koji potiče odvijanje (daljnjih faza) mejoze. Kod mužjaka, FSH, uz pomoć androgena 11-ketotestosterona, potiče dijeljenje spermatogonija tijekom ranijih stadija spermatogeneze, a LH povećava stope sinteze steroidnog hormona indukcije završnog sazrijevanja gameta, koji regulira kasnije stadije spermatogeneze i odgovoran je za aktivaciju spermatozoida (Borella i sur., 2020).

Dodatna funkcija gonadotropina je stimuliranje lučenja steroidnih hormona u gonadama. Kod riba, glavni estrogen je  $17\beta$ -estradiol, koji se većim dijelom otpušta u folikularnim stanicama u jajnicima, iako može nastati i u perifernim tkivima aromatazom testosterona putem enzima aromataze. Od androgena, glavni hormoni su testosteron i 11-ketotestosteron (11-KT) ali se smatra da je 11-KT biološki aktivniji. Iako se androgeni uobičajeno povezuju s mužjacima, a estrogeni s ženkama, nedavna istraživanja pokazuju da se i jedan i drugi hormon mogu pronaći kod oba spola (Evans i sur., 2014).

### 3.2. Hipotalamus – hipofiza – tireoidna os

Hipotalamus – hipofiza - tireoidna os je središnji regulacijski mehanizam staničnog metabolizma proteina i ugljikohidrata, kao i katabolizma lipida. Osim toga, sudjeluje u procesima diferencijacije i dijeljenja stanica i morfogeneze (Zmijewski i sur., 2012).

Regulacija ove osi također polazi od hipotalamusa, koji otpušta tireotropin - oslobađajući hormon (Slika 3). Ovaj hormon djeluje na hipofizu i stimulira otpuštanje tireotropina iz adenohipofize. Tireotropin je glavni regulator razvoja i funkcija štitnjače i potiče lučenje hormona štitnjače, tiroksina i trijodtironina, bitnih za pravilan rast i razvoj većine organizama (Ortiga i sur., 2016). Osim hormonske regulacije, na razine hormona štitnjače mogu utjecati i hranidbeni čimbenici, poput dostupnosti joda, ali i utjecaji iz okoliša poput radijacije, izlaganja kemikalijama, lijekovima i temperaturi (Kumar i sur., 2018).



Slika 3. Regulacija hipotalamus – hipofiza - tireodne osi. TRH - tireotropin - oslobađajući hormon, T3 - trijodtironin, T4 - tiroksin (Izvor: Kumar i sur., 2018)

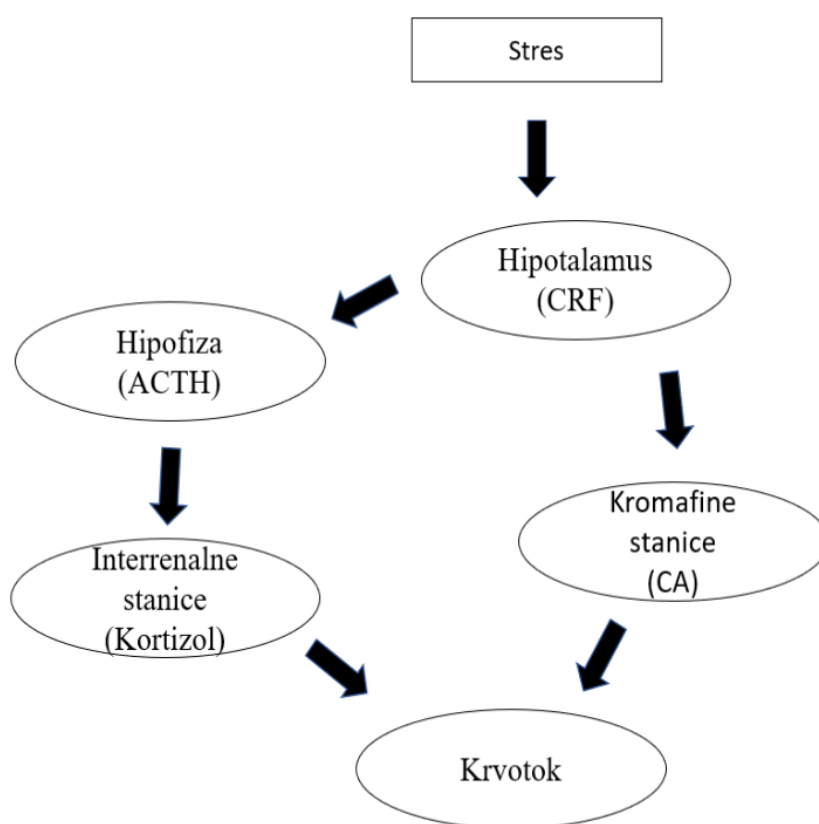
Hormone štitnjače, kao i steroidne hormone, obično krvotokom prenose transportni proteini, a manje od 1% sveukupne količine se mogu naći u slobodnom obliku. Od ova dva hormona, tiroksin se može naći u puno većim koncentracijama u krvotoku, ali se za trijodtironin smatra da je aktivni oblik (Evans i sur., 2014).

Ksenobiotici kao, npr. diklor-difenil-trikloroetan, utječu na štitnjaču tako što ometaju sintezu ili lučenje hormona na jednom od nekoliko koraka:

1. inhibicija mehanizama za hvatanje joda (iodine trapping)(tijocijanat ili perklorat)
2. blokada vezivanja joda i spajanja jodotironina koji čini tiroksin ili trijodtironin (sulfonske kiseline, tiourea, tiamazol (metimazole), aminotiazol)
3. inhibicija lučenja jednog od hormona pokretanjem proteolize aktivnih hormona u koloidnim disperznim sustavima (Carr i O'Harris, 2006).

### 3.3. Hipotalamus - hipofiza – interrenalna os

Odgovor na stres kod riba, ali i kod ostalih kralješnjaka, regulira hipotalamus – hipofiza - interrenalna os (Slika 4). Hipotalamus, potaknut različitim stresorima, otpušta kortikotropin - oslobađajući hormon, koji djeluje na hipofizu i stimulira lučenje adrenokortikotropnog hormona. Ovaj hormon dalje djeluje na prednji bubreg i potiče otpuštanje kortizola. Kortizol, u kombinaciji s katekolaminima, omogućava prilagodbu na stres tako što izaziva nekoliko fizioloških promjena, poput ubrzanja rada srca, metabolizma masti i mobilizacije glukoze i promjena u osmoregulaciji (Srivastava i Reddy, 2020).



Slika 4. Djelovanje hipotalamus – hipofiza - interrenalne osi uslijed stresora. CRF - kortikotropin - oslobađajući hormon, ACTH - adrenokortikotropni hormon, CA - katekolamini (Izvor: Kime, 1998)

Odgovor na stres kod riba može se podijeliti u tri faze: primarna, sekundarna i tercijarna. Primarna faza podrazumijeva neuroendokrini odgovor, tj. otpuštanje katekolamina (epinefrina i norepinefrina) iz kromafinih i kortizola iz interrenalnih stanica. Porast razine ovih hormona potiče sekundarni, fiziološki i metabolički, odgovor tijekom kojeg dolazi do promjena poput hiperglikemije, vazodilatacije stijenki arterija, povećanja otkucaja srca i smanjene imunološke

funkcije. Za prve dvije faze se smatra da omogućuju ribi uspješnu prilagodbu na stresore i održavanje homeostaze. Ukoliko se organizam ne uspije uspješno prilagoditi na stres, dolazi do treće faze, tijekom koje se javljaju promjene funkcioniranja metabolizma nepovoljne po zdravlje jedinke (Srivastava i Reddy, 2020).



#### 4. POREMEĆAJI ENDOKRINOG SUSTAVA BESKRALJEŠNJAKA

Beskralješnjaci čine veliku većinu svih poznatih životinjskih vrsta. Već nekoliko godina su tema sve većeg broja istraživanja i većina dokaza upućuje na to da okolišne kemikalije mogu utjecati na signalne procese slične endokrinima kod ove skupine organizama. Znanje o endokrinologiji beskralješnjaka je najčešće nepotpuno ili čak u nekim slučajevima skoro nepostojeće, što otežava definiranje štetnih utjecaja kemikalija iz okoliša na hormonsku regulaciju rasta, razvoja, metamorfoze i razmnožavanja (Zou, 2010).

Hormonska regulacija kod ove skupine se prvenstveno odvija putem neuropeptida, sintetiziranih u specijaliziranim neurosekretornim stanicama, kao npr. račji hiperglikemijski hormon, koji sintetizira i izlučuje X-organ u očnoj stapci. Steroidni hormoni su također opisani u tkivu mnogih vrsta, ali njihova uloga i dalje nije u potpunosti jasna. U slučaju bodljikaša, mekušaca i rakova, zabilježena je i in situ sinteza testosterona i nekoliko steroidnih hormona, a smatra se da sudjeluju u procesima razmnožavanja i rasta (Hester i Harrison, 1999).

Od ostalih hormona, kukci, rakovi, plošnjaci, nematodi i aneleidi koriste „*homosesquiterpenoid epoxides*“ („*juvenile hormon*“) i ekdisteroide (ekdison, 20 - hidroksiekdison) za regulaciju reproduktivnih procesa, presvlačenja, hranjenja i ponašanja. Rakovi još koriste i metil farnezoat, neoksidirani prekursor „*juvenile hormona*“, koji kontrolira ekdisis. Nijedan od ovih specijaliziranih steroidnih hormona ne postoji kod kralješnjaka (Hester i Harrison, 1999).

##### 4.1. Rotiferi

Tijekom životnog ciklusa rotifera dolazi do izmjene između spolnog i partenogenetskog načina razmnožavanja. Neoplođena jaja spolne generacije daju mužjake, a oplođena ženke. Na početku dijela godine u kojem se odvija rast diploidne ženke se izlegnu iz jaja prijašnje generacije (Zou, 2010).

Istraživanjima su proučavani utjecaji okolišnih kemikalija na funkcije razmnožavanja kod rotatorija, *Brachionus plicatilis*. Rezultati su pokazali da izlaganje jedinki ove vrste različitim hormonima i neurotransmiterima izaziva promjene u razmnožavanju. Može doći do usporavanja ili ubrzavanja rasta brojnosti populacije, ovisno o tome djeluje li određena tvar inhibitivno (hormon rasta, ljudski korionski gonadotropin, 5 – hidroksitriptamin) ili stimulirajuće (17 $\beta$ -estradiol) na partenogenetsko razmnožavanje. U slučaju spolnog

razmnožavanja, uočeno je stimulativno djelovanje pesticida diazinon, fenitrotiona i S - metoprena na stvaranje trajnih jaja, ali i niže stope izvaljivanja iz ovih jaja. Dodatnim istraživanjem s vrstom *Brachnionus calyciflorus*, također o utjecaju pesticida, zabilježeni su negativni utjecaji pentaklorofenola i klorpirosa na efikasnost spolnog razmnožavanja. Iako su točni mehanizmi ometanja kemijske signalizacije i dalje nejasni, iz dobivenih rezultata se može pretpostaviti da se radi o ometanju regulacije funkcija razmnožavanja ksenobioticima (Zou, 2010).

#### 4.2. Mekušci

Endokrini mehanizmi različitih skupina mekušaca su jako različiti, zbog toga što postoje velike morfološke i evolucijske razlike unutar ovog koljena. Kod puževa i školjkaša se neurosekretorna središta nalaze u središnjem živčanom sustavu, koji je organiziran u četiri ganglija: cerebralni, pleuralni, pedalni i abdominalni. Neuropeptidi koje luče bitni su za regulaciju rasta i razmnožavanja (Zou, 2010).

Jedan od najčešće opisanih primjera utjecaja endokrinih disruptora kod ove skupine je pojava imposexa ili intersexa kod (morskih) puževa nakon izlaganja protu-obraštajnim bojama koje sadržavaju tributilkositar. Pojam imposex, prvi put je upotrijebljen tijekom ranih 1980-tih, opisuje nametanje muških spolnih karakteristika ženka. Izložene ženke razvijaju strukturu sličnu penisu, vas deferens i zamršeni gonodukt (Hester i Harrison, 1999). Ova anomalija spolnog sustava zabilježena je kod više od 140 vrsta iz reda Neogastropoda diljem svijeta (Zou, 2010).

Kod nekih vrsta, poput *Tritia obsoleta* i *Nassarius reticulatus*, razvoj muških spolnih organa ne uzrokuje reproduktivne smetnje kod ženki, dok kod drugih vrsti kao npr. *Nucella lapillus* i *Ocenebra erinaceus* izaziva sterilnost, koja nastupa kao posljedica blokiranja genitalne pore zaplitanjem vas deferensa. Nestajanje puževa u područjima intenzivnog pomorskog prometa se povezuje s pojavom imposexa (Zou, 2010).

Postoje tri teorije koje objašnjavaju okolišnu etiologiju ove abnormalnosti, svaka sa svojim eksperimentalnim dokazima.

- Prva teorija, još poznata kao *testosteron teorija*, povezuje maskulinizaciju ženskih puževa nakon izlaganja organokositru s povećanjem razina testosterona u organizmu (Zou, 2010). Dokazano je da izlaganje ženki mekušaca tributilkositru izaziva porast razine testosterona u hemolimfi. Većina dobivenih dokaza upućuje na kompetitivnu

inhibiciju citokrom P450 aromataze, koja je odgovorna za pretvorbu testosterona u  $17\beta$ -estradiol, što vodi do povećanja razine testosterona (Hester i Harrison, 1999).

- Druga teorija, *neuropeptid teorija*, se temelji na zapažanjima dobivenim nakon injektiranja neuropeptida APGWamida ženjkama, kod kojih zatim dolazi do pojave imposexa. Prema ovoj teoriji, organokositar izaziva otpuštanje neuobičajeno velikih količina APGWamida iz neurosekretornih stanica, što potiče razvoj muških spolnih organa, koji zatim sintetiziraju androgene potrebne za daljnji razvoj i pokretanje spermatogeneze (Zou, 2010).
- Treća teorija o porijeklu imposexa je *RXR teorija*. Prema ovoj teoriji, nuklearni retinoid - X receptor (RXR) posreduje u signalizaciji koja vodi do razvoja muških spolnih organa. Jedan od novijih dokaza za ovu teoriju je istraživanje s vrstom *Thais clavigera*, u kojemu je kod jedinki izloženih 9 - cis retinoičnoj kiselini, prirodnom ligandu RXR-a, došlo do indukcije imposexa (Zou, 2010).

Dodatnim istraživanjima na puževima ustanovljeno je da, osim poremećaja u endokrinom signalizaciji, tvari na bazi organokositra uzrokuju i poremećaje u komunikaciji feromonima. Koristeći jedinke prikupljene s mjesta zagađenog organokositrom, a ujedno i sa visokom učestalosti pojave imposexa, Straw i Rittschhof (2004.) su ustanovili da zahvaćene, ali i nezahvaćene ženke slabije razlikuju muške od ženskih feromona u vodi, iz čega autori zaključuju da izlaganje organokositru može ugroziti i komunikaciju putem feromona. Osim poremećaja u komunikaciji, zabilježili su izostanak reproduktivnih aktivnosti i polaganja jaja kod morfološki normalnih puževa.

Zabilježeni su i utjecaji endokrinih disruptora na školjkaše. U jednom istraživanju, jedinke plave dagnje, *Mytilus edulis*, izložene su povišenim razinama  $17\beta$ -estradiola tijekom perioda odvijanja ranijih stadija gametogeneze. Rezultati su pokazali da izlaganje količinama većim od 50ng/l izaziva povećanje količine sintetiziranog vitelogenina, a najveći porast zabilježen je kod mužjaka. Međutim, izlaganje jedinki količinama 200ng/l ili većim nije rezultiralo povećanjem količine ovog proteina. (Ciocan i sur., 2010).

U dodatnom istraživanju s vrstom *Ruditapes philippinarum* dobiveni su slični rezultati. Kod jedinki izloženih nonilfenolu, razine proteina sličnih vitelogeninu su također bile povišene. Količine proteina u hemolimfi su bile oko 1,5 puta, a u probavnoj žlijezdi 4 puta veće nego kod mužjaka iz kontrolne skupine. Za vrstu *Elliptio complanata* je također zabilježen porast razina vitelogenina, ali u ovom slučaju došlo je i do promjene udjela spolova, tj. povećanja

broja ženki u populacijama u blizini mjesta ispuštanja komunalnih voda (Matozzo i Marin, 2005).

### 4.3. Rakovi

#### 4.3.1. Razmnožavanje

Rakovi se razmnožavaju na dva načina. Primitivni rakovi, kao oni iz skupina Cladocera, Artemiina, Notostraca i većina iz razreda Ostracoda, se razmnožavaju partegonetenski i spolno, a većina vrsta iz skupine Copepoda i svi pripadnici podrazreda Cirripedia i razreda Malacostraca samo spolno (Zou i sur., 2010).

Dodson i Hanazoato (1995.) su nakon primijećenog pada broja mužjaka proveli istraživanja o utjecajima estrogenih kemikalija na diferencijaciju muškog reproduktivnog sustava i omjerima spolova u populacijama vrsta iz roda *Daphnia*. Rezultati su pokazali da mnogi endokrini disruptori, poput endosulfana, prirodnog estrogena, tributilkositra, diklor-difenil-trikloroetana ili metoksiklora, nemaju učinka na mužjake, a nonilfenol ima čak i stimulirajući efekt na spolnu diferencijaciju. S obzirom na ove rezultate autori su iznjeli zaključak da se pad broja mužjaka može pripisati ometanju signalizacije hormona metil farnezoata od strane još neodređene tvari, a ne estrogenih kemikalija.

Oetken i sur. (2004) su istraživali koje utjecaje na veliku vodenbuhu, *Daphnia magna*, ima izlaganje antiandrogena ciproteron acetatu. Rezultati su pokazali da izložene jedinice imaju niži fekunditet i smanjene stope rasta. Zbog toga, autori zaključuju da tvari koje se vežu za androgene receptore kralješnjaka mogu biti toksične i za rakove.

Dodatno istraživanje se bavilo utjecajem endokrinih disruptora kod dekapodnih rakova iz podreda Brachyura, vrste *Uca pugilator*. Morfološki normalne jedinice ove vrste imaju izražen spolni dimorfizam. Karakteristike tipične za mužjake su asimetrična kliješta i uzak abdomen, a za ženke mala kliješta i širok abdomen. Zabilježena su četira različita oblika devijacije od ovog obrasca. U jednom od oblika, jedinice imaju širok abdomen, pleopode ženskog tipa i asimetrična kliješta, u drugom simetrična i povećana kliješta, a abdomen i pleopode karakteristične za ženke. U trećem slučaju, radi se o jedinkama blago asimetričnih kliješta, s prijelaznim izgledom abdomena, pleopodijima kod mužjaka i gonoporama (gonopores) kao kod ženki. U zadnjem, tj. četvrtom, slučaju opisane jedinice imaju nepravilna i blago asimetrična kliješta, s prijelaznim oblikom abdomena i pleopode muškog i ženskog tipa. Točni uzroci nastanka ove pojave su i dalje nepoznati (Zou, 2010).

Poremećaji spolne diferencijacije su opisani i kod gonohorističkih vrsta iz roda *Harpacticoida*. Jedinke s obilježjima oba spola, tj interseksualne, su zabilježene u blizini mjesta ulijevanja komunalnih voda. Trenutno nema dokaza koji upućuju na to da su ove promjene rezultat djelovanja estrogenih tvari (Zou, 2010).

Dodatni primjer nepravilne spolne diferencijacije zabilježen je kod vrste *Geothelphusa dehaani*. Zahvaćene jedinke iskazuju morfološke značajke mužjaka, ali s spolnim otvorima ženki. Učestalost pojavljivanja ove nepravilnosti je bila između 8 i 32%, a za uzrok se smatra dugoročna izloženost zasad neodređenoj okolišnoj kemikaliji. Pretpostavlja se da do razvoja abnormalnih spolnih značajki ne dolazi tijekom ranijih razvojnih stadija nego tek nakon nastupanja spolne zrelosti (Zou, 2010).

Dodatno istraživanje se bavilo negativnim promjenama kod vrste *Carcinus maenas*. Jedinke s nekoliko promatranih lokacija iskazuju morfometrijske abnormalnosti kao što su promjena duljine pleopoda ili proširenje abdomena. Zabilježene su i fiziološke promjene poput prisutnosti proteina sličnih vitelogeninu u hepatopankreasu mužjaka ili povećanja razina ekdisteroida. Točni uzroci ovih morfometrijskih i fizioloških promjena su nepoznati, ali pretpostavlja se da nisu povezane s prisutnošću estrogenih tvari u okolnoj vodi jer ranije provedena istraživanja upućuju na to da hormoni kralješnjaka ne utječu na reproduktivne funkcije rakova. Do feminizacije mužjaka najvjerojatnije dolazi zbog indirektnih utjecaja trenutno nepoznatih tvari na signalizaciju hormona metil farnezoata i hormona androgene žlijezde (androgen gland hormone). U sklopu istog istraživanja promatrani su još i učinci na signalizaciju putem feromona, za koje se smatra da posreduju pri privlačenju mužjaka i ženki. Mužjaci s određenim stupnjem morfološke i/ili fiziološke feminizacije su iskazivali slabiji odgovor na podražaj spolnim feromonima nego oni s kontrolne lokacije (Zou, 2010).

Provedeno je i istraživanje o utjecajima endokrinih disruptora na omjer mužjaka i ženki kod običnog rakušca, *Gammarus pulex*. Populacije koje obitavaju u blizini mjesta otpuštanja komunalnih voda iskazuju promijenjen omjer mužjaka/ženki, s puno većim udjelom mužjaka. Kod ženki s ove lokacije je uočen nepravilan razvoj oocita i nepravilna distribucija žumanjka, a kod mužjaka su zabilježene alometrijske promjene odnosa duljine tijela i gnatopoda i/ili duljine tijela i genitalne papile. Smatra se da je uzrok promjena u morfologiji mužjaka ometanje signalizacije androgenim hormonima, a narušavanje tijeka oogeneze kod ženki vjerojatno nastupa uslijed djelovanja tvari koje oponašaju steroidne hormone i mogu stupiti u interakciju s signalizacijom ekdisteroidima (Zou, 2010).

#### 4.3.2. Presvlačenje

Da bi ostvarili normalan rast, rakovi moraju periodično presvlačiti svoj egzoskelet. Proces presvlačenja reguliran je multihormonalnim sustavom. Kod vrsta iz razreda Malacostraca, ekdisteroidni hormoni sintetizirani iz Y-žlijezde, djeluju stimulirajuće, a hormon inhibicije presvlačenja, peptid porijeklom iz X-organa, inhibirajuće. S obzirom na važnost presvlačenja za normalan razvoj rakova, sve više istraživanja se bavi mogućnosti utjecaja endokrinih disruptora na ovaj proces. Većina dosada promatranih tvari djeluje inhibirajuće, a samo nekoliko stimulirajuće (Zou, 2020).

Jedan od mehanizama pomoću kojih ksenobiotici mogu ometi proces presvlačenja je promjena razina ekdisteroida. Laboratorijskim istraživanjima s kineskim rakom, *Eriocheir sinensis*, utvrđeno je da izlaganje bakru pri okolišno značajnim koncentracijama rezultira sniženim koncentracijama 20-hidroksiekdisona. U drugom istraživanju, zabilježena je značajna odgoda presvlačenja kod jedinki vrste *Americamysis bahia* uzrokovana sniženim razinama 20-hidroksiekdisona. Slični rezultati su dobiveni i uslijed djelovanja kepona, organokloriranog insekticida, kod *Macrobrachium rosenbergii*. Jedinke izložene ovoj tvari su također iskazivale smanjene razine 20-hidroksiekdisona i aktivnosti hitinolitičkog enzima N-acetilglukozamina (Zou, 2020).

Zabilježeni su i suprotni rezultati, tj. povećanje razina ekdisteroida uslijed djelovanja endokrinih disruptora. Izlaganje vinklozolinu ili bisfenolu-A rezultira povećanim razinama 20-hidroksiekdisona kod podrumske babure, *Porcellio scaber*, ali samo u slučaju bisfenola-A je došlo i do i stimulativnog djelovanja na sam proces presvlačenja, dok vinklozolin djeluje inhibirajuće (Zou, 2020).

Osim promjene razina ekdisteroida, negativni utjecaji endokrinih disruptora mogu biti i rezultat ometanja signalizacije ekdisteroidima u epidermisu. Kod jedinki vrste *Uca pugilator* uočena je slabija signalizacija ovim hormonima nakon izlaganja endosulfanu i polikloriranim bifenilima. U dodatnom istraživanju o utjecaju pesticida, ispitivani su utjecaji tebufenozida i fenoksikarba na američkog hlapa, *Homarus americanus*. Rezultati su pokazali da se obe promatrane tvari mogu vezati za ekdisteroidni receptor ove vrste, tebufenozid s višim, a fenoksikarb s nižim afinitetom, što autori ujedno i smatraju uzrokom, ili jednim od uzroka, odgode presvlačenja (Zou, 2020).

## 5. POREMEĆAJI ENDOKRINOG SUSTAVA RIBA

Djelovanje endokrinih disruptora je najopsežnije opisano kod riba (Matthiessen, 2003). Najbolje su evidentirani negativni utjecaji na reproduktivne sustave poput pada broja gameta, razvoja hermafroditizma, pada/porasta gonadosomatskog indeksa, ometanja sinteze steroidnih hormona, feminizacije mužjaka i pada vijabilnosti gameta, tj. snižene pokretljivosti i fertilitnosti spermatozoida kod mužjaka i inhibicija razvoja i/ili sazrijevanja oocita i pojava apoptotskih ili autofagnih procesa kod ženki. Osim efekata na reproduktivni sustav, EDC mogu dovesti i do narušavanja funkcija štitnjače, imunološkog sustava ili djelovati na razini gena (Srivastava i Reddy, 2020).

### 5.1. Reproductivni sustav

Abnormalne funkcije reproduktivnog sustava riba mogu biti rezultat ometanja endokrinih funkcija hipotalamusa, hipofize i gonada ili promjena aktivnosti enzima odgovornih za deaktivaciju steroidnih hormona u jetri (Hester i Harrison, 1999).

U slučaju hipotalamusa i hipofize, dobivanje jasnih podataka otežava njihova mala veličina i nepristupačnost, ali iz provedenih podataka se može jasno zaključiti da neke tvari, poput teških metala, organokloriranih i karbamatnih pesticida, djeluju toksično na ova tkiva. Toksični učinci na hipotalamus izazivaju oštećenje neurona odgovornih za otpuštanje GnRH što rezultira reproduktivnim neuspjehom, tj. nepravilnim funkcioniranjem jajnika i testisa. Mnoge druge tvari, kao što su organoklorirani i organofosforni pesticidi, cijanid, policiklički aromatski ugljikovodici, poliklorirani bifenili, kadmij i živa, djeluju negativno na hipofizu i izazivaju propadanje sekretornih stanica i pad lučenja gonadotropnih hormona. Negativni utjecaji na hipofizu mogu još nastati i remećenjem mehanizma povratne sprege, koji regulira razinu steroidnih hormona u krvnoj plazmi (Hester i Harrison, 1999).

#### 5.1.1. Reproductivni sustav mužjaka

Jedan od najraširenijih utjecaja kemikalija iz okoliša na reproduktivni sustava mužjaka je indukcija vitelogenina. Ova pojava je odličan biomarker za otkrivanje izlaganja estrogenim kemikalijama koje djeluju na receptor za estrogen u jetri, a može izazvati i reproduktivne smetnje kod zahvaćenih mužjaka. Osim reproduktivnih poteškoća, može doći i do povećanja jetre i oštećenja bubrega, do kojih dolazi zbog sinteze odnosno sekrecije ovog proteina (Matthiessen, 2003).

Lye i sur. (1997) su proveli istraživanje o utjecaju estrogenih tvari na mužjake iverka, *Platichthys flesus*, u blizini mjesta ispuštanja otpadnih voda. Rezultati su pokazali prisutnost vitelogenina kod 20% proučavanih jedinki, s najnižim zabilježenim razinama kod jedinki ulovljenih najdalje od mjesta ispuštanja otpadnih voda. Daljnjim istraživanjima s istom vrstom utvrđena je prisutnost ovog proteina kod jedinki s 13 različitih lokacija (estuarija), a količine u krvi iznosile su do 20mg/ml plazme (Matthiessen, 2003).

U slučaju vrste *Pleuronectes vetulus*, sinteza vitelogenina je zabilježena kod više od 50% mužjaka s područja zagađenog organokloriranim spojevima. Slični rezultati su dobiveni i za cipola bataša, *Mugil cephalus* (Matthiessen, 2003).

Prema podacima za igluna, *Xiphias gladius*, jedinke iz okolice Sicilije imaju nekoliko puta više razine vitelogenina i zona radiata proteina nego one ulovljene u blizini Azorskih otoka. Istraživanje se temeljilo na manjem broju jedinki, ali autori zaključuju da se količine ovih proteina povećavaju s starošću životinje, do čega vjerojatno dolazi zbog bioakumulacijskih svojstava lipofilnih estrogenih tvari. Slično povećanje nije primjećeno kod ranije spomenutog *Platichthys flesus*, kod kojeg i mlađi primjerci imaju relativno visoke količine tvari u odnosu na starije (Matthiessen, 2003).

Pored indukcije vitelogenina, dodatni učinak endokrinih disruptora može biti i inhibicija/stimulacija otpuštanja steroidnih hormona. Do promjena u lučenju hormona dolazi ometanjem regulacije osi hipotalamus – hipofiza - gonade ili promjenama metabolizma i ekskrecije. Jedan od primjera pada razina testosterona opisan je kod jedinki vrste *Fundulus heteroclitus* izloženim otpadnim vodama tvornice celuloze. Pretpostavlja se da je uzrok sniženim razinama hormona jedan ili više međusobno neovisnih mehanizama poput ometanja otpuštanja gonadotropina, smanjene dostupnosti kolesterola i/ili inhibicija enzima uključenih u sintezu spolnih hormona. Pad količine androgena u krvnoj plazmi je zabilježen i kod grgeča, *Perca fluviatilis*, također u blizini tvornice celuloze. Kod ovih jedinki je primjećena i demaskulinizacija, koja se vjerojatno može pripisati nižoj razini testosterona (Matthiessen, 2003).

Prilikom istraživanja s pastrvskim grgečom, *Micropterus salmoides*, dobiveni su drugačiji rezultati. Nakon dvadesetdnevnog izlaganja atrazinu uočene su povišene razine steroidnih hormona, 11-ketotestosterona kod mužjaka i estrogena kod ženki. Međutim, ukoliko se uz atrazin doda još jedna kemikalija, poput klordana, dolazi do smanjenja stope sinteze testosterona (Carr i O'Harris, 2006).



Dodatna istraživanja su se bavila mogućnosti utjecaja ksenobiotika na razvoj gonada. U slučaju vrsti *Zoarces viviparus* i *Platichthys flesus*, zabilježena je prisutnost ovotestisa kod 15-20% mužjaka s nekoliko promatranih lokacija. U ovotestisima su se redovno mogle opaziti primarne, a ponekad i sekundarne oocite. Kod *Pomatoschistus minutus* s istih lokacija nije utvrđena prisutnost ovotestisa niti indukcija vitelogenina, ali kod velikog broja mužjaka, na nekim lokacijama čak i do 75%, dolazi do nepravilnog razvoja urogenitalne papile. In vitro eksperimentima s mlađi ove vrste dokazano je da izlaganje  $17\beta$ -estradiolu u trajanju od 32 tjedna, tj. do odrasle dobi, rezultira ovim poremećajem, iz čega se može pretpostaviti da je uzrok ove nepravilnosti djelovanje estrogenih kemikalija. S obzirom na dobivene rezultate, autori zaključuju da izostajanje indukcije vitelogenina i ovotestisa, uz istovremeni nepravilni razvoj urogenitalne papile znači različiti odgovor ove vrste na estrogene kemikalije. Dodatni primjeri blažeg oblika indukcije ovotestisa se mogu pronaći na više lokacija diljem svijeta, poput *Pseudopleuronectes yokohamae* u Japanu ili *Xiphias gladius* u Mediteranu. U ovim slučajevima, radi se o prisutnosti manjeg broja primarnih oocita u inače morfološki normalnom tkivu testisa (Matthiessen, 2003).

Indukcija ovotestisa je primjer djelomičnog iskazivanje ženskog fenotipa kod genetskih mužjaka, ali moguće je i da dođe do potpune promjene fenotipa, tj. pojave morfoloških ženki s genotipom mužjaka (Matthiessen, 2003). Jedan primjer ove pojave je opisan kod kraljevskog lososa, *Oncorhynchus tshawytscha*. Kod većeg broja fenotipskih ženki prikupljenih iz prirode (do 84%) se mogao primjetiti genetski marker za Y kromosom, koji nije bio prisutan kod jedinki iz uzgajališta. Autori zaključuju da su ženke s muških genotipom pretrpile promjenu spola, što bi moglo rezultirati stvaranjem abnormalnog YY genotipa. Ovaj genotip bi mogao imati isključivo muško potomstvo i potencijalno značajno promjeniti omjere spolova u populacijama (Nagler i sur., 2001).

### 5.1.2. Reproductivni sustav ženki

Ometanje reproduktivnog sustava ženki ksenobioticima nastupa na isti način kao i kod mužjaka. Negativne promjene mogu biti uzrokovane narušavanjem funkcija hipotalamusa ili hipofize, promjenama strukture jajnika ili inhibicijom/stimulacijom sinteze steroidnih hormona. Osim navedenih nepravilnosti, može doći i do pada sveukupne količine sintetiziranog vitelogenina i posljedično nedovoljne količine žumanjka za oocite (Kime, 1998).

Jedna od najčešćih promjena uzrokovana djelovanjem endokrinih disruptora je nepravilan razvoj jajnika, do kojeg dolazi nedostatnom stimulacijom gonadotropinima ili steroidnim hormonima ili direktnim citotoksičnim djelovanjem na oocite. U ovariju se obično može primjetiti pad broja jajnih stanica s žumanjkom uz istovremeni porast nezrelih oocita, iz čega se da naslutiti da je uzrok poremećaja povezan s ometanjem funkcija hipofize. Neke od tvari čije djelovanje izaziva ovu nepravilnost su: teški metali, organoklorirani, organofosforni i karbamatni pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici i poliklorirani bifenili (Hester i Harrison, 1999).

Provedeno je nekoliko istraživanja o utjecaju teških metala na oogenezu. Izlaganje vrste *Trichogaster fasciata* arsenu rezultira zastojem oogeneze u drugom stadiju, atrezijom i povećanom količinom unutar folikularnog prostora. Nije utvrđeno je li uzrok zastoja ometanje funkcija hipofize ili pad razina estrogena koji rezultira nižom stopom sinteze vitelogenina. Kod vrste *Monopterus albus*, kadmij također izaziva zastoj oogeneze. Osim zastoja oogeneze, opisana je još i nekroza i fibroza lamelarnih stijenki i propadanje strukture jajnika. Slični rezultati dobiveni su i prilikom eksperimenta s *Micropogonias undulatus* u kojemu je izlaganje olovu izazvalo slabiji razvoj jajnika. Dodatni primjer je istraživanje provedeno s vrstom *Channa punctata* u kojemu je kod jedinki izloženih živa (II)-kloridu došlo do oštećenja oocita u ranijim stadijima, a atreziju onih u stadiju vitelogeneze ili kasnijem. Za razliku od kadmija, živa (II) klorid ne utječe na proces inkorporacije vitelogenina u jajne stanice (Kime, 1998).

Dodatna skupina kemikalija s negativnim djelovanjem na proces oogeneze su organoklorirani pesticidi. Istraživanjem s mozambičkom tilapijom, *Oreochromis mossambicus*, dokazano je da diklor-difenil-trikloroetan može izazvati nepravilnosti tijekom oogeneze, sniženi gonadosomatski indeks, nepravilnu strukturu stijenke jajnika i raspadanje strukture jajnika. Kod oocita u ranijim stadijima razvoja mogla se primjetiti vakuolizacija i granularna struktura, a kod onih u kasnijim stadijima deformiranost i prisutnost vitelogenina granularne strukture. Sve nepravilnosti bi postupno počele nestajati nakon vraćanja ribe u nekontaminiranu vodu. U drugom istraživanju zabilježeno je da endosulfan uzrokuje smanjeni promjer i deformacije oocita, nekrozu i fibrozu vezivnog tkiva i proširenje krvnih žila kod *Rasbora daniconius* (Kime, 1998).

Ometanje oogeneze je zabilježeno i kod vrste *Parophrys vetulus*. Ovariji promatranih jedinki nisu mogli nastaviti proces oogeneze dalje od perinuklearnog ili ranog previtelogenog stadija. Osim inhibicije razvoja, uočene su upalne lezije i nakupine makrofaga u jajnicima jedinki s

kontaminiranih lokacija. Sva mjesta s kojih su jedinke prikupljene sadržavala su velike količine policikličkih aromatskih ugljikovodika i polikloriranih bifenila, ali vjerojatno i drugih zagađivala (Kime, 1998).

Najčešći uzroci inhibicije oogeneze je nemogućnost sinteze dovoljne količine ili inkorporacije vitelogenina. Do ovog poremećaja može doći uslijed disfunkcije jetre, ali vjerojatniji razlog je nedostatak  $17\beta$ -estradiola, koji je neophodan za uspješnu stimulaciju vitelogeneze. Smanjene razine ovog hormona mogu biti rezultat ometanja enzimatskih funkcija folikula ili slabijeg otpuštanja gonadotropina uslijed ometanja kompleksa hipotalamus-hipofiza (Kime, 1998).

Provedeno je istraživanje o utjecaju pesticida diklor-difenil-trikloroetana na mozambičku tilapiju. Rezultati su pokazali snižene razine androgena i estrogena kod jedinki izloženih količini od 0.001 mg/l. Slični rezultati su dobiveni i za bodljastog soma, *Heteropneustes fossilis*. Izlaganje jedinki ove vrste lindanu, još jednom od organokloriranih pesticida, pri količinama od 16mg/l također rezultira sniženim koncentracijama testosterona i  $17\beta$ -estradiola, ali i njihovog prekursora,  $17\alpha$ -hidroksiprogesterona. Ukoliko bi se zahvaćenim ribama ubrizgao gonadotropin - oslobađajući hormon sisavaca ili *Mystus* GtH razine steroidnih hormona bi porasle, iz čega se da zaključiti da se radi o inhibiciji na razini hipofize (Kime, 1998).

Slični rezultati su dobiveni i u slučaju industrijskih kemikalija, tj. polikloriranih bifenila. Koncentracije androgena, estrogena i kortikosteroida u krvnoj plazmi kod kalifornijske pastrve, *Oncorhynchus mykiss*, bile su snižene nakon izlaganja jednoj od ovih tvari. S obzirom da je aktivnost mikrosomalnih enzima u jetrenim stanicama bila povišena, a i obrnuto proporcionalna razinama steroidnih hormona u krvnoj plazmi, pretpostavlja se da je primjećeni pad količina rezultat ubrzane razgradnje hormona u jetri. Slični rezultati su dobiveni i za vrstu *Micropogonias undulatus*. Dodatnim in vivo istraživanjima je pronađena i inhibicija sinteze estrogena kod pacifičkog iverka, *Lepidopsetta bilineata*, i kod *Hippoglossoides elassodon*. Međutim, zabilježeni su i suprotni rezultati. Kod vrste *Parophrys vetulus*, jedinke prikupljene s lokacije također zagađene jednim od polikloriranih bifenila iskazivale su snižene količine  $17\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi. Količine ovog hormona su bile obrnuto proporcionalne s aktivnosti aril ugljikovodične hidroksilaze u jetri i razinama fluorescentnih aromatskih ugljikovodika, ali proporcionalne razinama polikloriranih bifenila. Autori zaključuju da je ovaj rezultat, suprotan od ranije opisivanih, rezultat interakcija ostalih zagađivala s ribom i polikloriranim bifenilima (Kime, 1998).

Dodatno istraživanje se bavilo utjecajem olova na razine steroidnih hormona *Micropogonias undulatus*. Rezultati su pokazali da ovaj element izaziva pad razina testosterona i 17 $\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi. Tijekom in vitro eksperimenta uočeno je da uslijed izlaganja tkiva jajnika olovu dolazi do porasta sinteze 17 $\beta$ -estradiola iz čega autori zaključuju da je uzrok pada razina steroidnih hormona ometanje funkcija hipotalamusa/hipofize (Kime, 1998).

Iako se može pronaći puno primjera o utjecajima ksenobiotika na oogenezu i razine steroidnih hormona, manji broj istraživanja se bavio mogućim promjenama tijekom završnih stadija oogeneze, ovulacije i mriješćenja. U slučaju mriješćenja, često može doći do vremenske odgode uslijed dugoročne izloženosti nekoj kemikaliji. Negativni utjecaji ove odgode mogu biti posebno izraženi ukoliko dođe do nepoklapanja perioda obilja hrane i početka aktivnog hranjenja, što rezultira slabijim preživljavanjem ličinki. Može doći i do pada kvalitete jajnih stanica ukoliko se predugo zadržavaju u tijelu ribe (Kime, 1998).

Provedenim istraživanjem o utjecajima cinka na mriješćenje zebrice, *Danio rerio*, ustanovljeno je da izlaganje ovom elementu uzrokuje odgodu mriješćenja. U slučaju bakra, izlaganje velikog bucnja, *Lepomis macrochirus*, izaziva potpunu obustavu razmnožavanja (Kime, 1998).

Dodatna istraživanja proučavala su utjecaj pesticida na stadij završnog sazrijevanja oocita. Kod vrste *Mystus vittatus* zabilježen je pad broja oocita s periferno lociranom jezgrom od 20 - 30% nakon izlaganja pesticidima malationu, tetraklorvinfosu, i klorfenvinfosu. U dodatnom istraživanju o utjecajima malationa i endosulfana dobiveni su slični rezultati. Broj oocita s periferno lociranom jezgrom je u ovom slučaju pao s 41% (kontrolna skupina) na 18% i 26% za malation, odnosno endosulfan (Kime, 1998).

Osim utjecaja endokrinih disruptora na razvoj gonada i mriješćenje, bitno je sagledati i potencijalne učinke na brojnost mlađi. Najbitniji čimbenici za održavanje velikog broja mlađi su ukupna količina jajnih stanica i količina vitelogenina po oociti, koja određuje veličinu i sposobnost preživljavanja svake ličinke. Putem vitelogenina se okolišne kemikalije mogu inkorporirati u embrij i sniziti stope izvaljivanja i preživljavanja do prvog hranjenja. Nakon prvog hranjenja ksenobiotici mogu dospjeti u ličinke i putem hrane, a moguć je i unos putem vode (Kime, 1998).

Monosson i sur. (1994) su proveli istraživanje o utjecajima polikloriranih bifenila na mriješćenje i ličinke vrste *Morone americana*. Rezultati su pokazali da injekcije „3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyla“ davane neposredno pred sezonu mriješćenja izazivaju pad stope

preživljavanja ličinki, nepravilnosti i zastoj oogeneze, inhibiciju razvoja jajnika i snižene količine steroidnih hormona i sveukupno sintetiziranog vitelogenina. Nisu zabilježeni negativni utjecaji na stope izvaljivanja, dužinu tijela pri izvaljivanju ili rast ličinki do petog dana nakon izvaljivanja, ali s porastom doze zabilježena je niža razina preživljavanja do otvaranja usta (sedmi dan). Kod ženki tretiranih sa 0,5 - 1 mg/kg stope preživljavanje su bile snižene, a kod onih tretiranih s 1 - 5 mg/kg iznosile su 0%.

Dodatna istraživanja su provedena o utjecaju pesticida. Izlaganje diklor-difenil-trikloroetanu izaziva visok mortalitet, nepravilnu gastrulaciju i česte deformacije kralješaka kod mlađi američkog iverka, *Pseudopleuronectes americanus*. Djelovanje iste tvari kod vrste *Genyonemus lineatus* rezultira sniženim fekunditetom i padom broja jedinki kod kojih dolazi do mriješta (Matthiessen, 2003). Izlaganje gupija, *Poecilia reticulata*, količinama temefosa od 0,5mg/kg rezultira padom sveukupnog broja jajnih stanica, dok fenitrotion u količinama od 1mg/l uzrokuje prestanak razvoja embrija (Kime, 1998).

U većini istraživanja o utjecaju pesticida koristi se dugoročno izlaganje konstantnoj količini neke tvari, što ne odgovara u potpunosti stvarnoj situaciji jer se većina pesticida otpušta periodično. Da bi se bolje razumjeli mehanizmi aktivni prilikom kratkog izlaganja visokim količinama, poput onog u prirodi, proveden je eksperiment s vrstom *Jordanella floridae* u kojemu su jedinke izlagane 1,8 mg/l metoksiklora u trajanju od 2 sata. Sveukupna količina jajnih stanica bila je 87% niža, a stopa izvaljivanja 33% niža nego kod jedinki iz kontrolne skupine, ali nije zabilježen veći broj nepravilno razvijene mlađi (Kime, 1998).

Zabilježena je i maskulinizacijom ženki uslijed djelovanja endokrinih disruptora. Razvoj sekundarnih spolnih obilježja i reproduktivnog ponašanja mužjaka je zabilježen kod ženki gambuzije, *Gambusia affinis*, s zagađene lokacije u blizini ispusta otpadnih voda pogona za preradu celuloze. Sekundarno spolno obilježje mužjaka ove vrste su izdužene šipčice podrepne peraje koje na jednom mjestu tvore i gonopodij. Ovaj organ se uobičajeno ne nalazi kod ženki, ali je prisutan kod onih izloženim sintetičkim androgenima i određenim tipovima otpadnih voda (Kime, 1998). Maskulinizacija ženki je zabilježena i kod koljuške, *Gasterosteus aculeatus*, ali u ovom slučaju radi se o samo nekoliko jedinki iz populacija koje obitavaju u blizini ispusta komunalnih voda (Matthiessen i Weltje, 2015).

## 5.2. Štitnjača i interrenalne i kromafine stanice

Funkcije još najmanje dvije endokrine žlijezde, štitnjače i interrenalnih i kromafinih stanica (ekvivalent nadbubrežne žlijezde sisavaca), mogu biti narušene djelovanjem kemikalija iz

okoliša. Interrenalne i kromafine stanice su odgovorne za uspješnu prilagodbu na stres, a hormoni štitnjače sudjeluju u nekoliko procesa poput razvoja neurološkog sustava, regulacije metabolizma, smoltifikacije i metamorfoze kod plosnatica. Narušavanje funkcija ovih žlijezda najčešće nastupa istovremeno, a razlog tome su njihove brojne međusobne interakcije (Matthiesen, 2003).

### 5.2.1. Štitnjača

Jedan od primjera narušavanja funkcija štitnjače ksenobioticima je zabilježen za *Fundulus heteroclitus* s lokacije zagađene teškim metalima, polikloriranim bifenilima i diklor-difenil-trikloroetanom. U odnosu na jedinke iz kontrolne skupine, ribe s promatrane lokacije su sporije, otežano love plijen i izbjegavaju predatore. Od fizioloških promjena zabilježeno je povećanje veličine folikula štitnjače i porast razine tiroksina. Autori smatraju da je narušavanje pravilnog funkcioniranja hormona štitnjače uzrok povećanju stanica, a porast razine tiroksina pripisuju ometanju funkcija kortizola, koji je odgovoran za proces pretvorbe ovog hormona u trijodtironin. Reproduktivne nepravilnosti nisu zabilježene, vjerojatno jer su gamete i embriji razvili neku vrstu otpornosti na zagađivala (Matthiesen, 2003). Slični rezultati su zabilježeni i kod vrsta *Cymatogaster aggregata* i *Leptocottus armatus*. Kod jedinki s lokacije zagađene polikloriranim bifenilima su zabilježene niže razine tiroksina i promjene odnosa trijodtironin:tiroksin (Matthiessen i sur., 2018).

Dodatno istraživanje se bavilo mogućnosti utjecaja pesticida na vrstu *Channa punctata*. Rezultati su pokazali da organofosforni pesticidi fenitrotion i karbofuran mogu izazvati smanjenje promjera folikula štitnjače i pad količine koloida, ali i povećanje debljine epitela štitnjače. Promjene strukture ove žlijezde nastajale su progresivno i mogle su se po prvi put primjetiti 30 dana od početka izlaganja. U slučaju organokloriranih pesticida, provedeno je istraživanje o utjecajima diklor-difenil-trikloroetana na vrstu *Oreochromis mossambicus*. Jedinke izložene ovoj tvari su razvile gušavost i hipertrofiju s velikim brojem neaktivnih stanica štitnjače. Nastale promjene bile su reverzibilne i nestale bi u potpunosti nakon 20 dana u nekontaminiranoj vodi (Kime, 1998).

Nakon što je primijećen veći broj jedinki s simptomima hiperplazije, hipertrofije i gušavosti štitnjače, provedeno je istraživanje na srebrnom lososu, *Oncorhynchus kisutch*. Prema izvještajima s promatranog područja, svaka riba uhvaćena od sredine 1970-tih godina pokazivala je ove simptome. Prvenstveno se smatralo da je uzrok ovom poremećaju nedostatak joda, ali autori su usporedili sastav ishrane s ishranom jedinki iste vrste iz mora i

zaključili da je sastav joda isti, tj. da nedostatak ovog elementa ne može biti uzrok poremećaju (Kime, 1998).

Nakon ishrane, kao uzrok su predlagani ksenobiotici, koji se mogu naći u tkivu riba s te lokacije, ili zagađenje. Međutim, izlaganje potpuno zdravih *Oncorhynchus kisutch* i *Salvelinus namaycush* mješavini kemikalija sličnoj onoj pronađenoj u tkivu riba nije izazvalo povećanja štitnjače. U dodatnom istraživanju, koje ide u prilog teoriji o ksenobioticima, kod štakora hranjenih mesom riba s ovog područja se također javila gušavost. Od ostalih faktora, autori su pronašli korelaciju između stupnja eutrofikacije i povećanja štitnjače. Iako točan uzrok ove pojave nije određen, iz dobivenih rezultata se vidi da zagađenje doprinosi narušavanju funkcija štitnjače (Kime, 1998).

Promatrani su i potencijalni utjecaji ksenobiotika na proces smoltifikacije i prilagodbe na morsku vodu kod mlađi atlantskog lososa, *Salmo salar*. Rezultati su pokazali da neke kemikalije, poput polikloriranih bifenila i nafte, mogu omesti uobičajene obrasce lučenja hormona štitnjače u premigratornom razdoblju i smanjiti stope preživljavanja mlađi po dolasku u morsku vodu, a druge kemikalije, poput teških metala, ometaju proces smoltifikacije odgodom porasta razina tiroksina potrebnog za uspješno odvijanje ovog procesa (Kime, 1998)

Dodatna istraživanja su provedena o utjecajima kemikalija iz okoliša na razine/otpuštanje hormona štitnjače. U slučaju teških metala, za vrstu *Oreochromis mossambicus* utvrđeno je da izlaganje kadmiju rezultira povišenim razinama tiroksina i trijodtironina. Kod vrste *Oncorhynchus mykiss* dobiveni su drukčiji rezultati s istim elementom. Nakon kratkog izlaganja (2-4 sata) zabilježen je porast tiroksina, ali ne trijodtironina, a ukoliko bi jedinke provele tjedan dana u kontaminiranoj vodi došlo bi do pada tiroksina, dok bi razine trijodtironina ostale iste. Autori zaključuju da učinci ovog metala ovise o dozi i vremenu izlaganja (Kime, 1998).

Dokazano je i da mnogi pesticidi, poput malationa, endosulfana i lindana, također mogu djelovati na koncentracije hormona štitnjače u krvnoj plazmi, ali učinci variraju značajno ovisno o vrsti i promatranoj tvari. Pretpostavlja se da negativni učinci ovih tvari nastaju uslijed djelovanja na tiroidnu peroksidazu, enzim odgovoran za enzimatsku vezanje joda za tiroksin (Kime, 1998).

Osim povišenih koncentracija pesticida, vodene površine u okolici područja s razvijenom poljoprivrednom mogu imati i povećan udio amonijaka ili tvari na bazi amonijaka.

Istraživanjem s vrstom *Channa punctata* utvrđeno je da izlaganje amonijevom nitratu pri količinama unutar zakonski dozvoljenih granica (na promatranom području) rezultira hipertrofijom stanica štitnjače. Osim utjecaja na štitnjaču, zabilježeno je i oštećenje jetre i hipertrofija interrenalnih stanica (Kime, 1998).

### 5.2.2. Interrenalne i kromafine stanice

Ksenobiotici mogu negativno djelovati na hipotalamus – hipofiza - interrenalnu os izazivanjem stresnog odgovora ili direktnim narušavanjem funkcija osi. Ukoliko se radi o indukciji stresnog odgovora, dolazi do porasta razina kortizola i adrenalina, ali i metaboličkih i fizioloških promjena. U slučaju ometanja funkcioniranja ove osi, dolazi do slabijeg odgovora na različite stresore iz okoliša (Kime, 1998).

Provedeno istraživanje se bavilo mogućnosti uzrokovanja stresnog odgovora od strane okolišnih kemikalija kod američke jegulje, *Anguilla rostrata*. Rezultati su pokazali da jedinke izložene količinama kadmija sličnim onima kao i u prirodi (na lokaciji gdje su prikupljene) iskazuju povišene razine kortizola do 8 tjedana nakon prestanka izlaganja. Primjećeni porast razina kortizola bi mogao negativno utjecati na metabolizam, imunološki sustav, sazrijevanje gonada i migraciju do mjesta razmnožavanja. S obzirom na dugi životni vijek jegulja i sposobnost bioakumulacije mnogih ksenobiotika, moguće je da se ovi negativni učinci u prirodi jave i pri nižim koncentracijama teških metala u vodi (Kime, 1998).

Slični rezultati su dobiveni i za vrstu *Gasterosteus aculeatus*. Kod jedinki s lokacija zagađenih raznim tvarima pronađene su povišene količine kortizola u krvi, a koncentracije neposredno nakon stresnog odgovora su bile tri puta veće (Srivastava i Reddy, 2020). Izlaganje živinom (II) kloridu također rezultira povišenim razinama kortizola kod mlađi *Oncorhynchus mykiss*, ali tjedan dana nakon prestanka izlaganja koncentracije ovog hormona bile su ponovo unutar uobičajenih vrijednosti (Kime, 1998)

Osim direktnih toksičnih utjecaja, neke tvari mogu uzrokovati i poteškoće u disanju, što također rezultira stresnim odgovorom. Izlaganje vrste *Pleuronectes flesus* topivom dijelu sirove nafte uzrokuje drastičan pad razina kisika u krvi i posljedično stresni odgovor, tj. povećanje kortizola i noradrenalina. Slični rezultati su uočeni i kod jedinki vrste *Mugil cephalus* izloženih sirovoj nafti koja je uzrokovala iritaciju olfaktornog i škržnog epitela (Kime, 1998).



Za razliku od ranije spomenutog sekundarnog djelovanja ksenobiotika putem izazivanja stresnog odgovora, zabilježeno je i direktno ometanje funkcija hipotalamus – hipofiza - interrenalne osi ili narušavanje metabolizma kortizola u jetri. U ovom slučaju, dolazi do potiskivanja aktivnosti interrenalnih stanica i slabijeg odgovora na stres izazvan vanjskim utjecajima poput predatora ili promjena u okolišu. Jedan od primjera za ovaj tip djelovanja je istraživanje provedeno s vrstom *Oreochromis mossambicus* o utjecaju pesticida diklor-difenil-dikloroetana. Jedinke kojima je ova tvar injektirana iskazivale su povišene razine kortizola u plazmi, ali nije bilo daljnjeg povećanja nakon utjecaja stresora, poput hvatanja mrežom. Izostajanje stresnog odgovora se moglo primjetiti do 120 dana nakon injektiranja (Kime, 1998).

Slični rezultati su zabilježeni i uslijed djelovanja teških metala. Kod vrste *Clarias batrachus*, jedinke izložene živinom (II) kloridu iskazivale su snižene razine kortizola u krvi, citološke promjene stanica hipofize odgovornih za lučenje adenokortikotropnog hormona i hipertrofiju interrenalnih stanica. S obzirom na dobivene rezultate, autori zaključuju da je uzrok nižim razinama kortizola ometanje enzima aktivnih u biosintezi ovog hormona (Kime, 1998).

Dodatna istraživanja bavila su se utjecajima industrijskih kemikalija, poput polikloriranih bifenila i policikličkih aromatskih ugljikovodika, na stres induciran hvatanjem. Kod štuke, *Exos lucius*, i *Perca fluviatilis* prikupljenih s nekoliko lokacija zagađenih različitim kemikalijama primjećen je slabiji odgovor na stres, s najslabijim odgovorom zabilježenim kod jedinki s najzagađenije lokacije. S obzirom na stupanj atrofiranosti kortikotropnih stanica hipofize, autori zaključuju da su ribe zbog produljenog izlaganja ksenobioticima u trećoj fazi stresnog odgovora i ne mogu više odgovarati na dodatne stresore. Slični rezultati su dobiveni i kod jedinki istih vrsta izloženih otpadnim vodama tvornice sulfatne celuloze koje osim industrijskih kemikalija, sadrže još i teške metale (Kime, 1998).

Prilikom istraživanja s vrstom *Pseudopleuronectes yokohamae*, uočen je slabiji odgovor na stres i niže razine kortizola kod jedinki s lokacije zagađene različitim kemikalijama. Laboratorijskim eksperimentima je utvrđeno da je uzrok padu razina ovog hormona ometanje funkcija hipofize, tj. nedovoljna stimulacija prednjeg dijela bubrega adrenokortikotropnim hormonom (Matthiesen, 2003).

Osim utjecaja na hipofizu i interrenalne stanice, smatra se da može doći i do ometanja biosinteze kortizola, tijekom koje dolazi do enzimatskih reakcija sličnih onima kao i prilikom sinteze spolnih hormona. U istraživanju s vrstom *Oncorhynchus kisutch* zabilježene su niže

razine 11-ketotestosterona i kortizola u krvnoj plazmi kod životinja s zagađene lokacije. Iako točan uzrok nije određen, autori pretpostavljaju da su otpadne vode tvornice sulfatne celuloze, za koje je dokazano negativno djelovanje na reproduktivne funkcije, razlog primijećenog pada razina kortizola. Inhibitivno djelovanje ovih voda na otpuštanje kortizola je ranije već dokazano s vrstom *Catostomus commersonii*, iz čega se da zaključiti da bi i mnoge druge tvari koje ometaju biosintezu spolnih hormona mogle imati slično djelovanje na lučenje kortizola, tj. odgovor na stres (Kime, 1998).

Zabilježeni su i negativni učinci na otpuštanje katekolamina. U istraživanju s *Anguilla rostrata* uočene su snižene razine dopamina, adrenalina i noradrenalina u krvnoj plazmi nakon izlaganja kadmiju (Kime, 1998).

### 5.3. Imunološki sustav

Laboratorijska istraživanja su se bavila mogućnosti djelovanja endokrinih disruptora na imunološki sustav riba. Rezultati su pokazali da mnoge tvari, poput teških metala, tributilkositra, polikloriranih bifenila, policikličkih aromatskih ugljikovodika ili pesticida, djeluju inhibirajuće (Kime, 1998).

U jednom od provedenih istraživanja ispitivani su utjecaji estrogenih tvari na imunološki odgovor zlatne ribice, *Carassius auratus*. Rezultati su pokazali da izlaganje forbolnom esteru „*phorbol myristate acetate*“ i kalcijev ionofor A23187 rezultira slabijim dijeljenjem leukocita. Dodatnim istraživanjem je utvrđen slabiji odgovor ove vrste na infekciju bičašem *Trypanosoma danilewski*. Slični rezultati su dobiveni i prilikom istraživanja s komarčom, *Sparus aurata*, ali zabilježeni su još i negativni učinci na aktivnost komplemenata, peroksidaze u serumu i imunoglobulina - M (Iwanowicz i Blazer, 2009).

Dodatna istraživanja su se bavila utjecajima 4-nonilfenola i bisfenola-A na imunološki sustav i funkcioniranje fagocita u anterionom dijelu bubrega kod vrste *Cyprinus carpio*. Uočeno je da izlaganje ovim tvarima rezultira porastom broja superoksidnih aniona i slabijom aktivnosti fagocitnih stanica u anterionom dijelu bubrega. Slični rezultati su dobiveni i za ftalate prilikom dodatnih istraživanja s istom vrstom (Iwanowicz i Blazer, 2009).

Osim direktnog djelovanja, ksenobiotici mogu narušiti funkcioniranje imunološkog sustava i podizanjem razina kortizola. Jedan od primjera je istraživanje provedeno s vrstom *Poecilia reticulata*. Kod jedinke izloženih tributilkositar oksidu uočena je atrofija timusa, a nakon 30 dana kod većine riba je ovaj organ skoro u potpunosti nestao. Autori zaključuju da kortizol

djeluju mjenjanjem broja i snižavanjem afiniteta određenih receptora na leukocitima, ali točni mehanizmi djelovanja nisu određeni (Kime, 1998).

## 6. ZAKLJUČAK

Endokrini sustav je regulacijski sustav u tijelu koji upravlja mnogim procesima u životu kralješnjaka putem hormona, kemijskih glasnika odgovornih za signalizaciju između različitih žlijezda i tkiva. Središnji organi ovog sustava su hipotalamus i hipofiza, koji upravljaju aktivnostima svih ostalih žlijezda, poput štitnjače, epifize, urofize, ili gonada, i zajedno s njima tvore endokrine osi, odgovorne za upravljanje određenim životnim procesima. Od ovih osi, tri se izdvajaju po važnosti, hipotalamus – hipofiza - gonade os, koja regulira razmnožavanje, hipotalamus – hipofiza - tireoidna os, odgovorna za regulaciju rasta i metabolizma i hipotalamus – hipofiza - adrenalna os, ključna za uspješnu adaptaciju na stres.

Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća postalo je očito da određene tvari iz okoliša mogu stupiti u interakciju i narušiti normalno funkcioniranje endokrinog sustava, tj. endokrinih osi. Ove tvari se kolektivno nazivaju endokrini disruptori i mogu biti različitog kemijskog sastava: pesticidi, sintetički hormoni, biljne tvari, kemikalije korištene pri proizvodnji i obradi plastike i otpad iz različitih grana industrije kao npr. perklorati. Prvenstveno se smatralo da su samo reproduktivne funkcije kralješnjaka izložene negativnim utjecajima ksenobiotika, ali dodatnim istraživanjima su potvrđeni negativni učinci na druge žlijezde, poput štitnjače ili nadbubrežne (interrenalne i kromafine stanice) žlijezde i na endokrine sustave beskralješnjaka.

Razlog relativno kasnom shvaćanju učinaka endokrinih disruptora na beskralješnjake je djelomično nepoznavanje endokrinologije ove skupine, što otežava definiranje negativnih utjecaja. Međutim, iz provedenih istraživanja da se jasno zaključiti da kod većeg broja skupina, poput rotifera, mekušaca ili rakova, dolazi do određenih hormonalnih poremećaja. Najčešće se javljaju reproduktivni poremećaji, poput veoma dobro opisanog pojavljivanja imposexa kod nekih vrsti iz razreda Gastropoda, ali zabilježeni su i učinci na presvlačenje rakova, koje je također veoma bitno u životu ovih životinja.

Iako se u zadnje vrijeme broj provedenih istraživanja o učincima ksenobiotika kod beskralješnjaka povećava, većina radova se i dalje bavi ribama, kod kojih su ujedno dosada i najbolje opisani i istraženi hormonski poremećaji. Jedan od razloga za ovu fokusiranost na ribe je i sličnost njihovog endokrinog sustava s onim viših kralješnjaka, tj. ljudi, s kojim dijeli istu osnovu i zbog toga ribe čini odličnim biomarkerima. Osim toga, ribe su često i najizloženije utjecajima raznih tvari, koje na razne načine dospijevaju u more ili kopnene vode.

Najčešće opisivani utjecaji kod ove skupine organizama su oni na razmnožavanje. Pokazalo se da mnoge tvari mogu negativno utjecati na spolne sustave oba spola inhibicijom razvoja

gonada, gametogeneze ili steroidogeneze, djelomičnom feminizacijom/maskulinizacijom ili inhibicijom mriješćenja, ali zabilježeni su i negativni utjecaji na embrije, do kojih najčešće dolazi prijenosom ksenobiotika putem vitelogenina. Kod embrija, tj. ličinke, na ovaj način izloženim različitim kemikalijama se često mogu uočiti snižene stope preživljavanjem i/ili izvaljivanja, ali u nekim slučajevima dolazi i do pojave određenih poremećaja u kasnijem životu.

Osim reproduktivnih funkcija, proučavani su i potencijalni utjecaji na, između ostalih, funkcije štitnjače, interrenalnih i kromafinih stanica (ekvivalenta adrenalne žlijezde sisavaca) i imunološkog sustava. U slučaju štitnjače, pokazalo se da mnoge tvari mogu negativno utjecati na regulaciju hipotalamus – hipofiza - tireodine osi pomoću nekoliko mehanizama što rezultira poremećajima poput gušavosti, hiperplazije, lezija štitnjače, oštećenja stanice ove žlijezde i remećenja smoltifikacije. Zabilježene su i promjene u ponašanju, tj. usporenost i otežano izbjegavanje predatora, koje su također uzrokovane ometanjem funkcija ove žlijezde, ali i istovremenim narušavanjem funkcija interrenalnih stanica.

Interrenalne stanice, zajedno s kromafinima, reguliraju odgovor na stres kod riba i sa hipotalamusom i hipofizom čine hipotalamus – hipofiza - interrenalnu os. Za mnoge endokrine disruptore je dokazano da mogu ometi normalno funkcioniranje ove osi, što uobičajeno izaziva pad razina kortizola i slabiju reakciju na dodatne stresore, poput predatora ili promjena abiotičkih faktora. Međutim, negativni učinci mogu nastati i induciranjem stresnog odgovora, što dovodi od porasta razina kortizola u krvi kroz produljeni period i može negativno utjecati na metabolizam, razvoj gonada i imunološki sustav.

Inhibicija imunološkog sustava kortizolom se može očitovati atrofijom timusa ili slabijim imunološkim odgovorom, što ribu čini podložnijom na infekcije. Osim kortizola, ometanje pravilnog funkcioniranja imunološkog sustava mogu uzrokovati mnoge druge tvari, koje često utječu na aktivnosti fagocita, enzima i komplemenata.

Očito je da razne kemikalije mogu uzrokovati cijeli niz endokrinih poremećaja kod kralješnjaka i beskralješnjaka. Intezitet odgovora često varira ovisno o vrsti, ali jako je malo slučajeva u kojima egzogene kemikalije djeluju stimulirajuće na neku funkciju. Ukoliko se dosadašnji trend ispuštanja raznih kemikalija u vodena tijela ne promijeni, vrlo je vjerojatno da će se razni poremećaji moći primijetiti kod sve većeg broja vrsti i jedinki, što bi osim na pojedinačne organizme, moglo djelovati negativno i na cjelokupne populacije, tj. brojnost nekih vrsta.

## 7. LITERATURA

- Akefe, I., Adamu, A., Yusuf, I., Anaso, E., Umar, M., Abraham, S. 2017. Pathophysiological Mechanisms of Endocrine Disrupting Chemicals. *Biomedicine and Nursing*. 3(4): 1-12
- Borella, M., Chehade, C., Costa, F., Jesus, L., Cassel, M., Batlouni, S. 2019. The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis. *U: Baldisserotto, B., Urbinati, E.C. Cyrino, J.E.P. (ur.) Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, Academic Press. 1st vol. 315-341
- Brown, S., Adams, B., Cyr, D., Eales, J. 2004. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(7): 1680–1701
- Carr. J.A., Norris, D.O. 2006. ENDOCRINE DISRUPTION Biological Basis for Health Effects in Wildlife and Humans. Oxford University Press, Inc. Str. 477
- Ciocan, C., Puinean, A., Cubero-Leon, E., Hill, E., Minier, C., Osada, M., Itoh, N., Rotchell, J. 2010. Endocrine Disruption, Reproductive Cycle and Pollutants in Blue Mussel (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758). *U: Hamamura, N., Suzuki S., Mendo, S., Barroso, C. M., Iwata. H., Tanabe S. (ur.). Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Biological Responses to Contaminants. Terrapub. 3rd vol. 121-126*
- Corradi, P., Corradi, R., Greene, L. 2016. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urologic Clinics of North America*. 43(2): 151-162
- Dodson, S., Hanazato, T. 1995. Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of *Daphnia*, a Key Member of Aquatic Ecosystems. *Environmental health perspectives*. 103(4): 7-11
- Esteban, M., Cuesta, A., Rodríguez, A., Meseguer, J. 2006. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: A link between fish pineal gland and the immune system. *Journal of pineal research*. 41: 261-266
- Evans, D. H., Claiborne, J. B., Currie, S., 2014. *The physiology of fishes*. CRC Press New York, Str. 453
- Gorelick, D., Habenicht, L. 2020. Endocrine Systems. *U: Cartner, S., Eisen J., Farmer, S., Guillemin, K., Kent, M., Sanders G. (ur.) The Zebrafish in Biomedical Research*, Academic Press. 165-179

- Hester, E. R., Harrison, R. M. 1999. Endocrine disrupting chemicals. The Royal Society of Chemistry. Str. 151
- Iwanowicz, L., Blazer, V., 2009. An Overview Of Estrogen-Associated Endocrine Disruption In Fishes: Evidence Of Effects On Reproductive And Immune Physiology. *U: Cipriano R.C., Bruckner, A.W., Shchelkunov, I.S. (ur.) Bridging America and Russia with shared perspectives on aquatic animal health: Proceedings of the Third Bilateral Conference Between the United States and Russia, Aquatic Animal Health 2009.* Khaled bin Sultan Living Oceans Foundation. 266-275
- Karkit, M., Elewa, Y., Salem, H., Bareedy, M. 2019. Stannius Corpuscles in African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822): Histological and Ultrastructure Studies. *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 7(2): 6-11
- Kime, D. 1998. Endocrine Disruption in Fish. Springer US. Str. 411
- Kumar, A., Kulandhasamy, M., Kumari, C., Sharma, V., Sesham, K., Mochan, S. 2018. Endocrine System. *U: Vonk, J., Shackelford, T.K. (ur.) Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior.* Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. 1-26
- Luchini, L., Wicki, G., Romano, L. 2015. The Ultrastructure of Secretory Cells of the Islets of Langerhans in South American Catfish (*Rhamdia quelen* Quoy i Gaimard, 1824). *Journal of Histology.* 2015: 1-6
- Lye, C., Frid, C., Gill, M.E., McCormick, D. 1997. Abnormalities in the Reproductive Health of Flounder (*Platichthys flesus* Linnaeus, 1758) Exposed to Effluent from a Sewage Treatment Works. *Marine Pollution Bulletin.* 34(1): 34-41
- Matozzo, V., Marin, M. 2005. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*?. *Environmental research.* 97: 43-49
- Matthiessen, P. 2003. Endocrine disruption in fish. *Pure and Applied Chemistry.* 75(11-12): 2249-2261
- Matthiessen, P., Weltje, L. 2015. A review of the effects of azole compounds in fish and their possible involvement in masculinization of wild fish populations. *Critical Reviews in Toxicology.* 45(5): 453-467

- Matthiessen, P., Wheeler, J.R., Lennart, W. 2018. A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Critical Reviews in Toxicology*. 48(3): 195-216
- Monosson, E., Fleming, W., Sullivan, C. 1994. Effects of the planar PCB 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovarian development, plasma levels of sex steroid hormones and vitellogenin, and progeny survival in the white perch (*Morone Americana* Gmelin, 1789). *Aquatic Toxicology* 29(1-2): 1-19
- Nagler, J., Bouma, G., Thorgaard, G., Dauble, D. 2001. High Incidence of a Male-Specific Genetic Marker in Phenotypic Female Chinook Salmon from the Columbia River. *Environmental Health Perspectives* 109(1): 67-9
- Pait, A.S., Nelson, J. O. 2002. Endocrine Disruption in Fish: An Assessment of Recent Research and Results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Str. 55
- Petrač L. 2015. Analizi gonadotropin oslobađajućeg hormona u humanoј reprodukciji. Diplomski rad. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. str. 43
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2004. Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. U: Jeon K. (ur.) *International Review of Cell and Molecular Biology* (volume 236). Academic Press; 1 edition. 1-44
- Ortiga-Carvalho, T., Chiamolera, M., Pazos-Moura, C., Wondisford, F. 2016. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Comprehensive Physiology*. 6(3): 1387-1428
- Perry, S.F., Fritsche, R., Thomas, S., 1993. Storage and release of catecholamines from the chromaffin tissue of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *Journal of Experimental Biology*. 183(1): 165-184
- Shinohara, Y., Sasayama, Y. 1998. Unpaired Ultimobranchial Glands of the African Lungfish (*Protopterus dolloi* Boulenger, 1900). *Zoological science* 15(4): 581-588
- Srivastava, B., Reddy, P., 2020. An overview of the effects of endocrine disrupters (Edcs) in fish. *Life sciences international research journal*. 6(1): 5-13
- Straw, J., Rittschof, D., 2004. Responses of mud snails from low and high imposex sites to sex pheromones. *Marine Pollution Bulletin* 48: 1048–1054



- Zmijewski, M., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R., Stekete, J. 2012. Equivalent of Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis. *U: Sensing the Environment: Regulation of Local and Global Homeostasis by the Skin's Neuroendocrine System*, Springer; 2012 edition. 55-64
- Zou, E. 2010. Aquatic Invertebrate Endocrine Disruption. *U: Breed, D. M., Moore J. (ur.) Encyclopedia of Animal Behavior*, Elsevier science & technology. 112-123
- Zou, E. 2020. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: A current review. *General and Comparative Endocrinology*. 293: 113470