

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Marija Karađole

MORFOLOŠKE OSOBITOSTI FEMINIZACIJE U RIBA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

ZAVOD ZA ANATOMIJU, HISTOLOGIJU I EMBRIOLOGIJU

PREDSTOJNIK: prof. dr. sc. Damir Mihelić

MENTORICA: prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli

ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:

1. prof. dr. sc. Zvonimir Kozarić

2. doc. dr. sc. Nino Maćešić

3. prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli

Zamjena: prof. dr. sc. Goran Bačić

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, prije svega dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Srebrenki Nejedli koja mi je omogućila svu potrebnu literaturu, pomogla svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada i što je imala strpljenja i vremena za sve moje upite.

Nadalje, izrazitu zahvalnost izrazila bih prof. dr. sc. Goranu Bačiću, izv. prof. dr. sc. Tugomiru Karadjoli te doc. dr. sc. Ninu Maćešiću koji su mi tijekom studiranja pružili veliku količinu potrebnih znanja i vještina.

Također, zahvalila bih se Josipi Burić koja je tijekom cijelog mog života bila tu za mene i pružala mi nesebičnu potporu. Veliko hvala i dr. vet. med. Ani Jeličić bez koje moje studiranje ne bi bilo potpuno. Veliko hvala i svim ostalim prijateljima i prijateljicama na svim lijepo provedenim trenutcima tokom studiranja.

I na kraju, najveću zaslugu pripisujem roditeljima i sestri, koji su me uvijek podržavali i bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Onečišćenje vode endokrinim modulatorima.

(<http://2011.igem.org/Team:Caltech/Project>)

Slika 2. Makroskopski prikaz gonada riba.

<https://fishingcalendar.files.wordpress.com/2014/02/moidevelopment.png>

Slika 3. Mikroskopski prikaz nalaza testisa koji sadržava jednu oocitu (a), te nakupine oocita (b) kod malousnog pastrvskog grgeča (*Micropterus dolomieu*) (prilagođeno iz BLAZER i sur., 2007.).

Tablica 1. Istraživanja kod kojih je utvrđena pojavnost «interseksualnosti» kod različitih vrsta riba, prilagođeno iz VRECL i JENČIČ (2016.).

Tablica 2. Stupanj feminizacije prema broju oocita po histološkom rezu (VRECL i JENČIČ, 2016., modificirano po JOBLING i sur., 1998.).

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. SPOLNI SUSTAV RIBA	2
2.1.1. Jajnici riba.....	2
2.1.2. Oogeneza	2
2.1.3. Sjemenci riba.....	3
2.1.4. Spermatogeneza.....	3
2.1.5. Reproductivni ciklus riba.....	3
2.2. ENDOKRINI MODULATORI	4
2.2.1. Mehanizam djelovanja.....	5
2.2.2. Tributilkositar (TBT)	7
2.2.3. Ftalati i njihov utjecaj na zdravlje ljudi.....	8
2.3. POJAVA FEMINIZACIJE U RIBA.....	9
2.3.1. Metode određivanja feminizacije u riba.....	11
2.3.2. Histološka izrada preparata i mikroskopska pretraga testisa u riba.....	11
3. RASPRAVA.....	13
4. ZAKLJUČCI.....	16
5. LITERATURA.....	17
6. SAŽETAK.....	28
7. SUMMARY	29
8. ŽIVOTOPIS.....	30

1.UVOD

Brojna istraživanja diljem svijeta izvijestila su o raširenoj pojavi abnormalnog seksualnog razvoja slatkovodnih i morskih riba (GROSS-SOROKIN i sur., 2004.). Kod riba su utvrđene povišene koncentracije vitelogenina u krvnoj plazmi mužjaka, te nalaz oocita u testikularnom tkivu kao znak feminizacije reproduktivnog sustava (JOBBLING i sur., 1998.; VAN AERLE i sur., 2001.; KIRBY i sur., 2004.). Vitelogenin u riba je protein koji se sintetizira u jetri zrelih ženki, kao odgovor na endogenu stimulaciju estrogena. Putem krvi dopijeva u jajnike gdje se tijekom razvoja jajne stanice nakuplja u obliku žumanjčanih granula (KOZARIĆ, 2001.). Zbog izostanka estrogenizacije u riba nalaz vitelogenina nije fiziološki kod mužjaka i mlađi. Međutim, izloženost estrogenima može dovesti do produkcije vitelogenina i kod takvih životinja (PURDOM i sur., 1994.).

Onečišćene vode glavni su izvor tvari koje u riba dovode do estrogenizacije mužjaka. Glavni zagađivači su uglavnom teški metali, endokrini modulatori i zagađivači organskog podrijetla (TYLER i ROUTLEDGE, 1998.; KWON i sur., 2006.; JU i sur., 2009.; LEE i sur., 2009.).

Studije iz država članica Europske unije i Sjedinjenih Američkih Država jasno su identificirale prirodne steroide (estron i 17β -estradiol) i sintetički (17α -etinilestradiol) steroid kao glavne aktivne tvari prisutne u otpadnim vodama kućanstva (GROSS-SOROKIN i sur., 2004.).

U brojnim zemljama u svrhu praćenja promjena provodi se biomonitoring, pri čemu se najčešće izrađuju histološki preparati gonada, te se u testisima utvrđuje broj oocita. Stoga je cilj ovog rada kroz primjere iz dosadašnjih istraživanja ukazati na potrebu da se i u Republici Hrvatskoj započne s provođenjem biomonitoringa na određenim vrstama riba.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Spolni sustav riba

Spolni sustav riba vrlo je raznolik pri čemu su razvijeni različiti reprodukcijски mehanizmi. Kod većine riba spolovi su odvojeni i oplodnja je vanjska (oviparne ribe), no kod nekih riba oplodnja je unutrašnja pa takve ribe ležu žive mlade (viviparne ribe). Kod nekih riba uočena je pojavnost dvospolnosti (*Sparidae*, *Serranidae*).

Reproduktivni sustav riba čine gonade i odvodni sustav. Gonade su parni organi koje nalazimo u tjelesnoj šupljini na duplikaturi peritoneuma koji kod ženki nazivamo mezoovarij, te kod mužjaka mezoorhij. U početku se sastoje od zametnih stanica, diferencijacijom kojih kasnije nastaju oogonije u jajnicima, odnosno spermatogonije u testisima (KOZARIĆ, 2001.).

2.1.1. Jajnici riba

Jajnici riba parni su organi smješteni uz bubreg. Kod hrskavičnjača oni su smješteni ispred bubrega, u kečige se jajnici nalaze u ravnini bubrega, dok se kod koštunjača nalaze duž cijelog bubrega. Ovarijalna šupljina nastavlja se na jajovode, a oni se sa svake strane otvaraju samostalno ili zajedno u kloaku ili anus. Takav tip jajnika nazivamo cistični. Kod nekih vrsta riba kao što su salmonidi jajnici se otvaraju u trbušnu šupljinu. Takav tip jajnika nazivamo policistični. Najjednostavniju građu jajnika ima jegulja u koje se jajnik sastoji od jednostavnog nabora koji visi u tjelesnoj šupljini, te otpušta zrele jajne stanice koje preko genitalnog otvora izlaze van. Takav tip jajnika nazivamo gimnoovarij (KOZARIĆ, 2001.).

2.1.2. Oogeneza

Oogeneza započinje proliferacijom oogonija u naborima jajnika, nakon čijeg dijeljenja nastaju primarne oocite. U jezgrama oocita dešava se niz promjena koje završavaju nastankom zametnog mjehurića. Oocita se vremenom povećava, te u njenoj citoplazmi dolazi do nakupljanja žumanjka ili vitelusa. Osnovni sastojak žumanjka je protein vitelogenin, a osim njega nalazimo i uljne kapljice. Završetkom vitelogeneze zametni mjehurić se iz središnjeg dijela pomiče k periferiji čime nastupa prva mejotička dioba. Slijedi ju druga mejotička dioba koja se prekida u metafazi nakon čega nastupa ovulacija (KOZARIĆ, 2001.).

2.1.3. Sjemenici riba

Sjemenici (testisi) kod riba parni su organi. S obzirom na dužinu sjemenih kanala i njihov odnos prema sjemenovodu uglavnom dolaze dva tipa testisa. Prvi tip je režnjevite građe s kratkim sjemenovodom. Za vrijeme spermatogeneze dolazi do pucanja vezivnotkivnih pregrada među režnjicima i njihovog spajanja što rezultira otvaranjem sjemenovoda. Kod drugog tipa testisa iz sjemenih kanalića izlaze odvodni kanalići koji se spajaju u mrežastu strukturu iz koje izlazi sjemenovod (KOZARIĆ,2001.).

2.1.4. Spermatogeneza

Primarne spermatocite nastaju dijeljenjem spermatogonija, a nakon prve mejotičke diobe iz njih se razvijaju sekundarne spermatocite. Iz njih se pak razvijaju spermatide, nakon kojih nastaju spermiji. Spermiji riba sastoje se od glave, vrata i repa. Sam proces spermatogeneze odvija se uz Sertolijeve stanice čija je uloga nutritivna i potporna. Osim njih u testisima pronalazimo i Leydigove intersticijske stanice koje imaju endokrinu funkciju, te luče steroidne hormone (KOZARIĆ, 2001.).

2.1.5. Reproductivni ciklus riba

Ribe svoju spolnu zrelost dosežu u različito vrijeme. Reproductivni ciklus u riba sezonska je pojava i započinje nekoliko mjeseci prije mriješćenja. Ženke spolnu zrelost obično dosežu kasnije od mužjaka, te su veličinom tijela veće (KOZARIĆ, 2001.). Kao i kod svih kralježnjaka, reprodukcija u riba koštunjača odvija se pod mehanizmom hipotalamus-hipofiza-gonade. Vanjski čimbenici, kao što su svjetlo i/ili temperatura vode, utječu na sezonu mriješta. Ovisno o dobivenom podražaju hipotalamus izlučuje gonadotropin otpuštajući hormon koji potiče lučenje gonadotropina (luteinizirajućeg hormona [LH] i folikulo-stimulirajućeg hormona [FSH]) iz hipofize. Gonadotropini kontroliraju produkciju i sekreciju steroidnih hormona u gonadama. Upravo ovi hormoni (17-β estradiol i testosteron kod ženki, te testosteron i dominantni 11-ketotestosteron kod mužjaka) čine razliku među spolovima (SCHULZ i GOOS 1999.).

2.2. ENDOKRINI MODULATORI

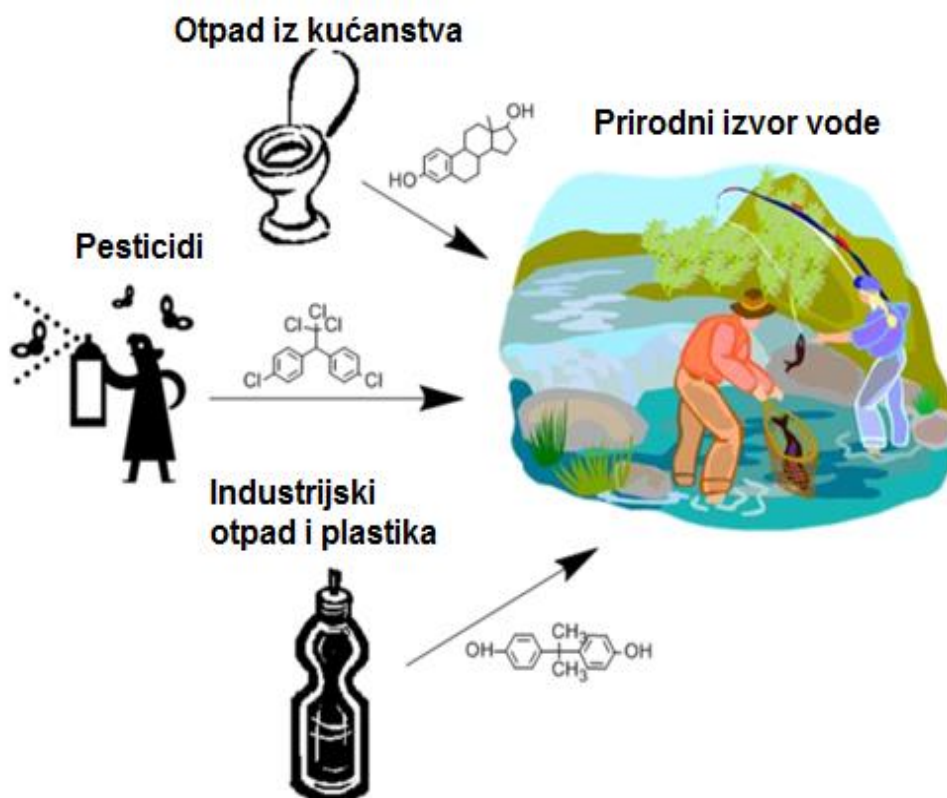
Znanstvenici iz područja ekologije, epidemiologije, toksikologije i endokrinologije nedavno su započeli pridavati pažnju estrogenu sličnim tvarima, te antiandrogenim kemikalijama (CRISP i sur., 1998.). Te tvari su prirodni i sintetički spojevi koji utječu antagonistički ili agonistički na endokrini sustav organizma i nazivaju se endokrini modulatori (eng. endocrine-disrupting chemicals [EDC]) (KERKEZ, 2016.). Spojevi koji posjeduju takva svojstva mogu se pronaći u brojnim proizvodima kao što su plastika (bifenol A [BPA]), lijekovi, protupožarna sredstva, pesticidi, fungicidi i kozmetika (ftalati).

Prirodne kemikalije prisutne u ljudskoj i životinjskoj hrani (npr. fitoestrogeni) također mogu djelovati kao endokrini modulatori (KERKEZ, 2016.; DIAMANTI-KANDARAKIS i sur., 2009.).

Endokrini modulatori uključuju prirodne estrogene, 17β -estradiol (E2) i estron, te sintetički 17α etinilestradiol (EE2), koji se ispuštaju u otpadne vode iz kanalizacije (HARRIES i sur., 1999.). Vjeruje se da i ostale kemikalije koje nisu endokrini modulatori mogu djelovati štetno na biološki sustav (GERALD, 2009.).

2.2.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja endokrinih modulatora zasniva se na oponašanju hormona, te izmjeni normalne funkcije imunskog, živčanog i endokrinog sustava. U prvom redu pokazalo se da oni utječu na normalnu funkciju hormonalnog sustava na nekoliko različitih razina uključujući oponašanje hormona vezivanjem na njihove receptore, blokirajući vezanje na receptore kao i poremećaj sinteze metabolizma i aktivnosti hormona (GOLDEN i sur. 1998.). U organizam riba endokrini modulatori ulaze preko onečišćenih voda (Slika 1.).



Slika 1. Onečišćenje vode endokrinim modulatorima

Ciljno tkivo pri ekspoziciji polikloriranim bifenilima (PCB) kod većine kralježaka i koštunjača je štitna žlijezda. U brancina koji su bili eksponirani organskim polutantima uočene su promijenjene koncentracije tireoidnih hormona u cirkulaciji te morfološke promjene u samoj štitnoj žlijezdi (SCHNITZLER i sur. 2008.). Kod pastrva koje su bile izložene vodama kontaminiranim 3', 4, 4', 5 – pentaklorobifenilom opaženo je smanjenje koncentracija plazme 17 β -estradiola (E2) i tireoidnih hormona usporedno s kontrolnom grupom (BROWN i sur. 2004.). U običnog tuljana nađenog u vodama zagađenim endokrinim modulatorima nađene su histološke lezije u štitnoj žlijezdi (SYLVAIN i sur. 1995.). KEYMER i sur. (1988.) utvrdili su da je hiperplazija nadbubrežne žlijezde vidre u Baltičkom moru povezana sa visokim koncentracijama organoklorinskih zagađivača.

Pretpostavlja se da je razaranje imunskog sustava akvatičnih organizama drugi mehanizam kojim endokrini modulatori ispoljavaju svoj toksični učinak. Postoje brojni dokazi koji ukazuju da halogeni spojevi imaju štetne učinke na imunski sustav riba i/ili školjki. Ovi spojevi mijenjaju funkciju i staničnog i humoralnog dijela imunskog sustava (ZHOU i sur. 2009.). Nije iznenađujuća činjenica da endokrini modulatori induciraju imunosupresiju na pokusnim životinjama, što u konačnici rezultira njihovom povećanom osjetljivošću na razne mikroorganizme kao što su bakterije, protozoe i virusi. Nedavno su brojna istraživanja potvrdila povezanost humoralne i stanične imunosupresije sa ksenobioticima kao i smanjenje otpornosti na bakterijske i virusne infekcije (JORN i sur. 2007.).

Izrazitu pozornost zaslužuje toksično djelovanje endokrinih modulatora na reproduktivni sustav. Najčešće zabilježeni učinak je poremećaj u metabolizmu androgenih steroida, što može dovesti do promjene spola ili «interseksualnosti» koja se javlja kao posljedica njihovog uplitanja u diferencijaciju spolova ili djelovanja na sekundarne spolne karakteristike (HILL i sur. 2003.).

2.2.2. Tributilkositar (TBT)

Poremećaj endokrinog sustava jedna je od najbitnijih promjena koja dovodi do fenomena «interseksualnosti». Brojnim istraživanjima uočena je prisutnost organokositarskih spojeva u brojnim morskih biljaka i životinja kao što su morske trave (*Zostera marina* i *Fucus vesiculosus*), plave dagnje (*Mytilus edulis*), ribe listovi (*Platichthys flesus*), bakalari (*Gadus morrhua*), haringe (*Clupea harengus*) i ribe od kamena (*Myoxocephalus scorpius*) (STRAND i sur., 2005.).

Tributilkositar se navodi kao jedan od najvažnijih predstavnika endokrinih modulatora (IGUCHI i sur. 2008.). To je organokositarski, toksičan kemijski spoj koji se upotrebljava u različitim svrhama u industriji. Vrlo često se primjenjuje kao sredstvo protiv obraštanja broskog dna kao i za dezinfekciju industrijskih voda. Kao takav vrlo često je prisutan kao onečišćivač morskih i slatkovodnih ekosustava (KRNIĆ, 2014.). Oslobođen iz premaza za zaštitu drva brzo se apsorbira u organske materijale i ugrađuje u tkiva zooplanktona, beskralježnjaka i riba, te kao najtoksičniji organokositarski spoj izaziva čitav niz bioloških promjena (BERGE i sur., 2004.; OHJI i sur., 2007.).

Republika Hrvatska jedna je od zemalja koja je zabranila primjenu organokositarskih spojeva koji imaju ulogu biocida, a od 1.siječnja 2008. godine sredstva protiv obraštanja broskog dna moraju biti uklonjena s brodova. Pošto su takvi spojevi još uvijek prisutni u sedimentu njihove se koncentracije moraju redovito pratiti (KRNIĆ, 2014.).

Na temelju spoznaja da je tributilkositar toksičan kemijski spoj provedena su brojna istraživanja o njegovu utjecaju. Znanstvenici su najčešće kao model koristili zebraste ribice koje su se pokazale pogodnima za istraživanja zbog vanjske oplodnje jajašaca, brzog razvoja, lako uočljivih razvojnih faza embrija kao i niske cijene uzgoja ribica. (STERNBERG i sur., 2012.; CIMA i BALLARIN, 2012.; CINAROGLU i sur., 2011.; MCGINNIS i sur., 2011.; CHEN i sur., 2012.). U tim istraživanjima kod ribica su uočeni endokrini poremećaji, smanjenje plodnosti i oštećenje sperme (MCALLISTER i sur., 2003.; SANTOS i sur., 2006.; THRESHER i sur., 2011.). No sam mehanizam djelovanja tributilkositra još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (PAGLIARANI i sur., 2012.; SNOEIJ i sur., 1987.).

2.2.3. Ftalati i njihov utjecaj na zdravlje ljudi

Ftalati su spojevi sintetičkog podrijetla koji se najčešće koriste kao dodatci različitim plastičnim masama kako bi se poboljšala njihova mehanička svojstva posebice mekoća, savitljivost i rastezljivost. Kao aditivi za plastificiranje prisutni su u raznim otapalima i insekticidima, tehnološkim procesima prehrambene industrije i sličnim industrijama te u brojnim proizvodima opće uporabe poput dječjih igračaka i kozmetike (ATDSR, 2001.; ATDSR 2002.; HEUDORF i sur., 2007.). Nisu vezani kemijskom vezom za plastični materijal pa se lako ispiru, brzo isparavaju u zrak i najčešće iz ambalažnog materijala lako migriraju u hranu, pića i vodu za piće (ANON, 2008.; ANON, 2001.; BALAFAS i sur., 1999.; JURICA, 2008.; CHOU i WRIGHT, 2006.).

Najveće koncentracije ftalata nađene su u masnoj hrani kao što su mlijeko i mliječni proizvodi, riba i meso, radi izrazite lipofilnosti (DAVID i sur. 2003.). Osim učinka na ljudsko zdravlje izvješća su potvrdila da ftalati i ostali endokrini modulatori djeluju na mnoge vrste riba i divljih životinja kao npr. sisavce, ptice i gmazove (CRISP i sur. 1998.).

Sinteza vitelogenina i proteina zone radiate u riba primarno je pod kontrolom estrogena. Ona je u ženki stimulirana tijekom sezone mrijesta i pod normalnim okolnostima ne javlja se u značajnoj mjeri kod mužjaka. Znakovi ekspozicije ftalatima su povišena koncentracija vitelogenina i proteina zone radiate naročito u mužjaka (ARUKWE i sur. 1997.; SUMPTER i JOBLING, 1995.). Promjene često uočene u humanoj medicini kod žena su rak dojke i endometritis, a kod muškaraca rak testisa i prostate, abnormalni seksualni razvoj, smanjena plodnost, promjene u hipofizi i štitnjači kao i imunosna supresija te promjene u živčanom sustavu. Isto se može primijeniti i za ribe.

2.3. POJAVA FEMINIZACIJE U RIBA

«Interseksualnost» je istovremena prisutnost muških i ženskih gonada kod individua (TYLER i JOBLING, 2008.). Njena najčešće zabilježena pojava je ona kod odraslih mužjaka u čijem su testikularnom tkivu prisutne jedna ili više oocita. Također, često se mogu pronaći i spermatoocite unutar jajnika, kao i oocite unutar sjemenovoda (NOLAN i sur., 2001.), a ovisno o pojavi kod akvatičnih organizama razlikujemo proces feminizacije (Slika 2.) (NOLAN i sur., 2001.) i maskulinizacije (HINCK i sur., 2007.).



Slika 2. Makroskopski prikaz gonada riba

U Tablici 1. prikazan je popis vrsta riba i država u kojima su provedena istraživanja te utvrđena pojavnost «interseksualnosti».

Tablica 1. Istraživanja kod kojih je utvrđena pojavnost «interseksualnosti» kod različitih vrsta riba, prilagođeno iz VRECL i JENČIČ (2016.).

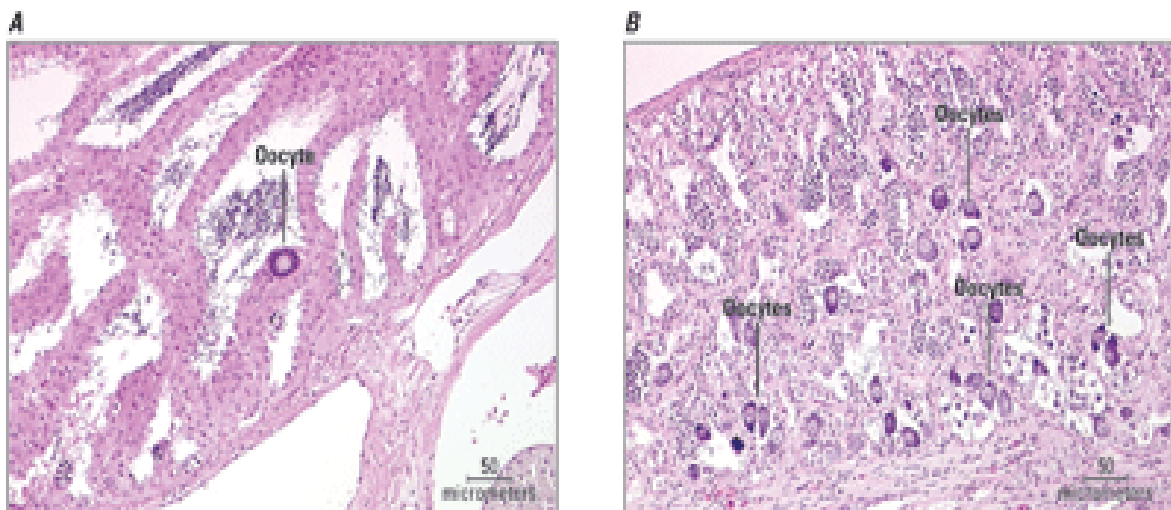
VRSTA	DRŽAVA	LITERATURA
Crvenooka, žutooka ili bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Jobling i sur., 1998.; Nolan i sur., 2001.; Gross-Sorkin i sur., 2006.; Beresford i sur., 2004.
Iverak (<i>Platichthys flesus</i>)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Allen i sur., 1999.
Krkuša (<i>Gobio gobio</i>)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Van Aarle i sur., 2001.
Iverak (<i>Platichthys flesus</i>), živorodac (<i>Zoarces viviparus</i>)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Stentiford i sur., 2003.
Limanda (<i>Limanda limanda</i>)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Stentiford i Feist, 2005.
Potočna pastrva (<i>Salmo trutta</i>)	Irska	Kelly i sur., 2010.
Crvenooka, žutooka ili bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)	Danska	Bjerregaard i sur., 2006b
Potočna pastrva (<i>Salmo trutta</i>)	Danska	Bjerregaard i sur., 2006a
Velika ozimica (<i>Coregonus lavaretus</i> spp.)	Švicarska	Bernet i sur., 2008.
Živorodac (<i>Zoarces viviparus</i>), koljuška (<i>Gasterosteus aculeatus</i>), grgeč (<i>Perca fluviatilis</i>)	Njemačka	Gercken i Sordyl, 2002.
Šaran (<i>Cyprinus carpio</i>)	Nizozemska	Gimeno i sur., 1996.
Šarani (<i>Cyprinidae</i>)	Italija	Vigano i sur., 2001.
Šaran (<i>Cyprinus carpio</i>)	Španjolska	Lavado i sur., 2004.
Trlja blatarica (<i>Mullus barbatus</i>)	Mediteran	Martin-Skilton i sur., 2006.
Sjevernoafrički som (<i>Clarias gariepinus</i>)	Južna Afrika	Barnhoorn i sur., 2004.
Monzambička tilapija (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Južna Afrika	Barnhoorn i sur., 2010.
Crni grgeč s uskim ustima (<i>Micropterus dolomieu</i>)	Sjedinjene Američke Države	Blazer i sur., 2007.
Sturgeon (<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>)	Sjedinjene Američke Države	Harshbarger i sur., 2000.
Šaran (<i>Cyprinus carpio</i>), zlatna ribica (<i>Carassius auratus</i>)	Kanada	Kavanagh i sur., 2004.

2.3.1. Metode određivanja feminizacije u riba

Jedna od metoda za određivanje feminizacije u riba je ELISA čiji su način provođenja detaljno opisali KATSIADAKI i sur.(2002., 2004.). PCR metodu opisali su GRIFFITHS i sur., (2000.). DENSLOW i sur. (1999.) mjerili su koncentracije vitelogenina u plazmi koristeći imunoenzimni test. Provedena su razna istraživanja u kojima su se mjerile koncentracije 17 β -estradiola i 11-ketotestosterona (HINCK i sur., 2008.) kao i mnoga toksikološka ispitivanja. Radi same jednostavnosti i jeftinog načina izvođenja najviše autora opisivalo je histološku metodu.

2.3.2. Histološka izrada preparata i mikroskopska pretraga testisa u riba

Uzorci testisa riba namijenjeni proučavanju mikroskopske građe fiksiraju se u 10% formalinu, poslije čega se materijal uklapa u parafinske blokove te se izreže uz pomoć mikrotoma na 5 μ m tanke rezove. Nakon deparafiniranja u ksilolu i padajućim koncentracijama etanola, rezovi se boje s hematoksilinom i eozinom (HE) (ROMEIS, 1968.). U histološkim preparatima testisa pretražuje se prisutnost oocita (Slika 3.) kako bi se odredila učestalost pojave te stupanj «interseksualnosti» (Tablica 2.).



Slika 3. Mikroskopski prikaz nalaza testisa koji sadržava jednu oocitu (a), te nakupine oocita (b) kod malousnog pastrvskog grgeča (*Micropterus dolomieu*) (prilagođeno iz BLAZER i sur., 2007.).

Tablica 2. Stupanj feminizacije prema broju oocita po histološkom rezu, (VRECL i JENČIČ, 2016., modificirano po JOBLING i sur., 1998.)

Stupanj 0	normalan testis mužjaka
Stupanj 1	≤ dvije oocite po histološkom rezu
Stupanj 2	3-10 oocita po histološkom rezu
Stupanj 3	11-20 oocita po histološkom rezu
Stupanj 4	21-30 oocita po histološkom rezu
Stupanj 5	➤ 30 oocita po histološkom rezu

3. RASPRAVA

Polazna točka za praćenje promjena u okolišu i onečišćenja vodenih resursa je organiziran skup analiza pod nazivom biomonitoring. Kad je riječ o ribama on se provodi s ciljem što ranijeg otkrivanja endokrinih modulatora i njihovog štetnog djelovanja. Metoda se temelji na biomarkerima i vrlo je važna u procjeni zagađenja okoliša. U većini slučajeva biomarkeri se smatraju kao znakovi odgovara na štetne toksične učinke. Pojedini autori smatraju da ova definicija ima ograničeno značenje iz razloga što štetni učinci mogu biti posljedica djelovanja brojnih faktora uključujući hranidbene navike, metabolizam i samu fiziologiju (ZHOU i sur., 2009.). Stoga bi se nalaz učinaka na molekularnoj razini u akvatičnih organizama eksponiranih kemikalijama ili uzetih iz zagađenog okoliša trebao protumačiti kao znak upozorenja, a ne dokaz učinka toksičnih tvari (LARSSON i KARLSSON, 2005.).

Po pitanju opće priznatih biomarkera kao najzastupljeniji kod riba podvrgnutih istraživanjima navodi se citokrom P450 (ANDERS, 2006.). To je enzim koji vrši biotransformaciju ksenobiotika, tvari stranih organizmu. Zbog fiziologije i načina života riba takve tvari ulaze u njihov organizam i to najčešće prilikom hranjenja (ESTABROOK, 2003.). Osim toga, ima značajnu ulogu i u metabolizmu spojeva kao što su hormoni i masne kiseline (MORCILLO, 1997.). Nadalje, izrazito bitnim biomarkerom pokazao se vitelogenin pronađen u svih istraživanih vrsta riba, te aromataza P450. Opće priznati biomarkeri ne moraju kod svih riba djelovati na isti način (BENNINGHOFT, 2007.; ZHU, 2003.; SANTOS, 2002.).

Za biomonitoring vrlo je važan odabir idealnog uzorka. Idealan uzorak mora sadržavati osobine reprezentativne za većinu organizama, pod uvjetom da udovolji određenim kriterijima (CARVAN i sur., 2000.). Prikladne vrste za istraživanje moraju biti jeftine, lake za uzorkovanje, mnogobrojne, sposobne akumulirati zagađivače, moraju pokazivati jasno definirane posljedice ekspozicije zagađivačima i ne smiju spadati u zakonom zaštićene vrste. Prema tome postoji nekoliko desetaka vrsta riba koje se koriste kao uzorak za toksikološka istraživanja od kojih su neke zebrasta ribica (*Danio rerio*), pastrva (*Salmo trutta*) i jegulja (*Anguilla anguilla*).

Korištenje riba kao uzorka u vodenoj ekotoksikologiji ima brojne prednosti. Naime, ribe su kralježnjaci koji imaju blisku evolucijsku vezu sa sisavcima, a zbog mehanizama koje posjeduju veća je vjerojatnost da će biti relevantni onima kod ljudi.

U riba, kod većine ženki vitelogenin i protein opne jaja sintetiziraju se u jetri pod utjecajem estrogena. Iz hepatocita dospijevaju u cirkulaciju odakle odlaze u rastuće oocite (HAHN i sur., 2006.).

U zebraste ribice (*Danio rerio*) i drugih ciprinida proteini opne jaja sintetiziraju se samo u zrelim oocitama pa ih nije moguće ustanoviti u cirkulaciji estrogeniziranih riba. Uzrok toga još uvijek je nepoznat. No, kod pastrve (*Salmo trutta*) vitelogenin i proteini opne jaja predstavljaju korisne biomarkere za detekciju ksenoestrogena (ZHOU i sur., 2009.).

Nadalje, za biomonitoring je vrlo važna i sezona mriješćenja. Nedavno je u Kanadi napravljen izvještaj o 60 vrsta riba koje se trenutno koriste u tu svrhu. S obzirom na veličinu riba i period mriješćenja preporučuje se standardni uzorak za svih 60 vrsta. Za sinkronizirana i višestruka mriješćenja smatra se da je najbolje vrijeme prikupljanja uzoraka 2-3 tjedna prije sezone mrijesta (BARRETT i MUNKITTRICK, 2010.). Prilikom jednog istraživanja kod brancina je uočeno da je pojavnost «interseksualnosti» znatno veća u predmrijesnoj sezoni (proljeće) u odnosu na postmrijesnu sezonu (ljetu). Iako je dokazano da pojavnost «interseksualnosti» ovisi o sezoni, autori je rijetko uzimaju u obzir (BLAZER i sur., 2007.).

Istraživanje feminizacije kod riba dobilo je na važnosti zbog uske povezanosti s onečišćenjem voda, te utjecaja na zdravlje ljudi. BARNHOORN i sur., (2004.) bavili su se proučavanjem pojavnosti «interseksualnosti» kod sjevernoameričkog soma (*Clarias gariepinus*) prikupljenih iz voda zagađenih estrogenim tvarima u Gutengu (Južnoafrička Republika). Prikupljeni su uzorci od 100 somova, nasumično odabranih, iz područja brane Marais i Rietvlei (prirodni rezervat Rietvlei). Koristeći vakutajner izvađeni su uzorci krvi iz kaudalne aorte (BARNHOORN, 2001.), koji su potom hlađeni na ledu sve do centrifugiranja. Uzorci seruma, namijenjeni za daljnje pretage, uskladišteni su na -20°C. Na temelju procjene vanjske papile, uzorci su klasificirani u sljedeće spolne kategorije: 1) mužjake, 2) ženke, 3) nedefiniran spol (DE GRAAF and JANSSEN, 1996.). Pomoću laparotomije gonade su makroskopski pregledane te razvrstane u kategorije: 1) muške, 2) ženske, 3) nedefinirane (BARNHOORN i sur., 2004.). Nakon uzimanja gonada mjerena je njihova težina, a potom su gonade stavljene u 10% formalin, te su dehidrirane u etanolu i fiksirane u parafinski vosak. Dobiveni parafinski blokovi izrezrani su u mikrotomu na rezove

debljine 5 μm koji su nakon toga obojeni hematoksilinom i eozinom (HE) (ROMEIS, 1968.). Histološkom pretragom kod mužjaka, prikupljenih s obje lokacije utvrđen je normalni razvoj testisa. U tubulima su nađeni samo spermatociti bez naznaka prisutnosti primarnih oocita. U nekoliko uzoraka pretragom je utvrđena pojava «interseksualnosti» i to nalazom primarnih oocita unutar testikularnog tkiva.

VRECL i JENČIČ, (2016.) proveli su istraživanje koje se sastojalo od dva dijela. U prvom dijelu kao uzorci uzete su različite vrste riba iz rijeke Ljubljanice, dok se drugi dio bazirao na kalifornijske (*Salmo gairdneri*) i potočne pastrve (*Salmo trutta*) uzete iz 30 rijeka i potoka duž Slovenije. Od srpnja do listopada 2008. godine prikupljeno je 56 uzoraka oba spola iz rijeke Ljubljanice. Drugi dio uključivao je samo mužjake kalifornijske (136) i potočne pastrve (107) koji su prikupljeni u razdoblju od siječnja do ožujka 2011. godine. Nakon što su sve ribe usmrćene s 2-fenoksietanolom, te su iz njih uklonjene gonade, izradili su se histološki preparati. Na dobivenim histološkim preparatima gonada određivala se učestalost pojave i stupnja «interseksualnosti». U prvom dijelu istraživanja histološkom pretragom nisu pronađeni znakovi maskulinizacije kod ženki, dok je kod jednog mužjaka utvrđena feminizacija. U drugom dijelu baziranom na mužjacima kalifornijske i potočne pastrve utvrđeni su tipični znakovi «interseksualnosti». Na temelju dobivenih rezultata, autori smatraju da je nalaz «interseksualnosti» u uzročno-posljedičnoj vezi sa zagađenjem okoliša endokrinim modulatorima.

4. ZAKLJUČCI

Zbog prisustva endokrinih modulatora u slatkovodnim i morskim vodama, česta je pojava «interseksualnosti» kod riba i to prvenstveno u obliku feminizacije mužjaka s nalazom oocita unutar testisa. To upućuje na onečišćenje voda, što štetno djeluje kako na životinje tako i na ljude. Kako bi se otkrilo zagađenje voda endokrinim modulatorima i posljedična feminizacija riba, važna je provedba biomonitoringa. S obzirom da se u Republici Hrvatskoj još uvijek nisu provela istraživanja o pojavnosti feminizacije riba naglasak treba staviti na nužnost njihove provedbe. Na temelju dosadašnjih literaturnih podataka kao model za istraživanja najboljim su se pokazali potočna pastrva (*Salmo trutta*), crvenooka (*Rutilus rutilus*) i som (*Silurus glanis*) u slatkovodnim vodama, dok su u morskim vodama istraživanja najčešće vršena na brancinu (*Dicentrarchus labrax*) i listu (*Solea vulgaris*). Ukoliko bi se odlučili za provedbu istraživanja u Republici Hrvatskoj navedene ribe predstavljale bi idealan model. Histološka pretraga gonada mužjaka i ženki najčešće je korištena metoda dokazivanja feminizacije kod riba. Iz ekonomskih razloga, lakoće izvedbe, te učestalosti korištenja ova metoda pokazala se kao najbolji izbor kod provedbe istraživanja.

5. LITERATURA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATDSR) (2001): Toxicological profile for di-n-butyl phthalate (DBP). Final Report, ATDSR/TP-135. Atlanta: Public Health Service, US Department of Health and Human Services.

ALLEN, Y., P. MATTHIESSEN, A.P. SCOTT, S. HAWORTH, S. FEIST, J.E. THAIN (1999): The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. *Sci. Total Environ.*, 233, 5-20. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00175-8.

ANDERS, G. (2006): Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 69, 175-184.

ANON (2001): European Union Council. Decision No. 2455/2001/EC establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Off J Eur Commun* 2001;L 331:1-5.

ANON (2008): European Chemical Bureau, European Union Risk Assessment Report; bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2008., <http://echa.europa.eu/documents/10162/e614617d-58e7-42d9-b7fbd7bab8f26feb>

ARUKWE, A., F.R. KNUDSEN, A. GOKSØYR (1997): Fish *Zona radiata* (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.*, 105, 418 –22.

BALAFAS, D., K.J. SHAW, F.B. WHITFIELD (1999) : Phthalate and adipate esters in Australian packaging materials. *Food Chem.* 65, 279-87. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00240-4.

BARNHOORN, I.E.J. (2001): Selected enzymes and heat shock protein 70 as biomarkers of pollution in the reproductive organs of fresh-water fish, PhD thesis. Auckland Park, South Africa: Rand Afrikaans University.

BARNHOORN, I.E.J., M.S. BORNMAN, G.M. PIETERSE, J.H.J. VAN VUREN (2004): Histological Evidence of Intersex in Feral Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) from an Estrogen-Polluted Water Source in Gauteng, South Africa. Wiley Periodicals, Inc. Environ. Toxicol., 19, 603–608.

BARNHOORN, I.E., J.C. VAN DYK, G.M. PIETERSE, M.S. BORNMAN (2010): Intersex in feral indigenous freshwater *Oreochromis mossambicus*, from various parts in the Luvuvhu River, Limpopo Province, South Africa. Ecotoxicol. Environ. Saf., 73, 1537-42. doi: 10.1016/j.ecoenv.07.026.

BARRETT, T.J., K.R. MUNKITTRICK (2010): Seasonal reproductive patterns and recommended sampling times for sentinel fish species used in environmental effects monitoring programs in Canada. Environ. Rev., 18, 115-135.

BENNINGHOFT, A.D. (2007): Toxicoproteomics - the next step in the evolution of environmental biomarkers? Toxicol. Section. Sci., 95, 1-4.

BERESFORD, N., S. JOBLING, R. WILLIAMS, J.P. SUMPTER (2004): Endocrine disruption in juvenile roach from English rivers: a preliminary study. J. Fish. Biol. 64, 580-6. doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00311.x.

BERGE, J.A., E.M. BREVIK, A. BJØRGE, N. FØLSVIK, G.W. GABRIELSEN, H. WOLKERS (2004): Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. J. Environ. Monitor., 6, 108-12.

BERNET, D., A. LIEDTKE, D. BITTNER, R.I.L. EGGEN, S. KIPFER, C. KUNG, C.R. LARGIADER, J.F. SUTER MARC, T. WAHLI, H. SEGNER (2008): Gonadal malformations in whitefish from Lake Thun: Defining the case and evaluating the role of EDCs. Chimia, 62, 3838. doi: 10.2533/chimia.2008.383.

BJERREGAARD, L.B., B. KORSGAARD, P. BJERREGAARD (2006a): Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams. Ecotoxicol. Environ. Saf., 64, 321-8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.05.018.

BJERREGAARD, L.B., A.H. MADSEN, B. KORSGAARD, P. BJERREGAARD (2006b): Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. Ecotoxicol., 15, 315-27. doi:10.1007/s10646-006-0061-9.

BLAZER, V.S., L.R. IWANOWICZ, D.D. IWANOWICZ, D.R. SMITH, J.A. YOUNG, J.D. HEDRICK, S.W. FOSTER, S.J. REESER (2007): Intersex (testicular oocytes) in smallmouth bass from the Potomac River and selected nearby drainages. *J. Aquat. Anim. Health.*, 19, 242–253.

BROWN, S.B., R.E. EVANS, L. VANDENBYLLARDT, K.W. FINNISON, V.P. PALACE, A.S. KANE, A.Y. YARECHEWSKI, D.C. MUIR (2004): Altered thyroid status in lake trout (*Salvelinus namay cush*) exposed to co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquat. Toxicol.*, 67, 75-85.

CARVAN, M.J., T.P. DALTON, G.W. STUART, D.W. NEBERT (2000): Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Annals of the New York Academy of Sci.*, 919, 133 - 147.

CHEN, Y.C., Y.F. LU, I.C. LI, S.P. HWANG (2012): Zebrafish Agr2 is required for terminal differentiation of intestinal goblet cells. *PLoS ONE* 7, e34408.

CHOU, K., R.O. WRIGHT (2006): Phthalates in food and medical devices. *J Med Toxicol* ; 2:126-35. doi: 10.1007/BF03161027.

CIMA, F., L. BALLARIN (2012): Genotoxicity and immunotoxicity of organotins. In: Pagliarani, A., Trombetti, F., Ventrella, V. (Eds.), *Biochemical and Biological Effects of Organotins*. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, 2012., pp. 97-111.

CINAROGLU, A., C. GAO, D. IMRIE, K.C. SADLER (2011): Activating transcription factor 6 plays protective and pathological roles in steatosis due to endoplasmic reticulum stress in zebrafish. *Hepatology*. 54, 495-508.

CRISP, T.M., E.D. CLEGG, R.L. COOPER, W.P. WOOD., D.G. ANDERSON, K.P. BAETCKE, J.F. HOFFMANN, M.S. MORROW., D.J. RODIER., J.E. SCHAEFFER, L.W. TOUART, M.G. ZEEMAN, Y.M. PATEL (1998): Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, *Environ. Health Perspect.*, 106,11-56. doi: 10.1289/ehp9810611.

DAVID, F., P. SANDRA, B. TIENPONT, F. VANWALLEGHEM, M. IKONOMOU (2003): Analytical methods review. U: Staples CA, urednik. *The Handbook of Environmental Chemistry. Part Q, Phthalate Esters. Vol. 3*. Berlin: Springer; pp. 9-56.

DE GRAAF, G.J., J.A.L. JANSSEN (1996): Artificial reproduction and pond rearing of the African catfish, *Clarias gariepinus* in sub-Saharan Africa—a handbook. FAO Fisheries Technical Paper, No. 362. Rome: FAO. 73 p.

DENSLOW, N.D., CHOW, M.C., KROLL, K.J., L. GREEN (1999): Vitellogenin as a Biomarker of Exposure for Estrogen or Estrogen Mimics, *Ecotoxicol.*, 8, 385-398, doi:10.1023/A:1008986522208.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., J.P. BOURGUIGNON, L.C. GIUDICE, R. HAUSER, G.S. PRINS, A.M. SOTO, R.T. ZOELLER, A.C. GORE (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocr. Rev.*, 30, 293–342. doi: 10.1210/er.2009-0002.

ESTABROOK, R.W. (2003): A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 1461-1473.

GERALD, T., ANKLEY, D.C. BENCIC, M.S. BREEN, T.W. COLLETTE, R.B. CONOLLY, N.D. DENSLOW, S.W. EDWARDS, D.R. EKMAN, N. GARCIA-REYERO, K.M. JENSEN, J.M. LAZORCHAK, D. MARTINOVIĆ, D. H. MILLER, E. J. PERKINS, E. F. ORLANDO, D. L. VILLENEUVE, R. L. WANG, K. H. WATANABE (2009): Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action, *Aquat Toxicol.*, 92, 168-78.

GERCKEN, J., H. SORDYL (2002): Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Mar. Environ. Res.*, 54, 651-5. doi: 10.1016/S0141-1136(02)00156-3.

GIMENO, S., A. GERRITSEN, T. BOWMER, H. KOMEN (1996): Feminization of male carp. *Nature*, 384, 221-2. doi: 10.1038/384221a0.

GOLDEN, R.J., K.L. NOLLER, L. TITUS-ERNSTOFF, R.H. KAUFMAN, R. MITTENDORF, E.A. REESE (1998): Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28: 109–227.

GRIFFITHS, R., K.J. ORR, A. ADAM, I. BARBER (2000): DNA sex identification in the three-spined stickleback. *J. Fish Biol.*, 57, 1331-1334.

GROSS-SOROKIN, M.Y., S.D. ROAST, G.C. BRIGHTY (2004): Causes and consequences of feminisation of male fish in English rivers Science Report SC030285/SR. *Envir. Agen.*, Rio House, Water. Drive, Aztec West, Almonds., Bristol, BS32 4UD, 2-10.

GROSS-SOROKIN, M.Y., S.D. ROAST, G.C. BRIGHTY (2006): Assessment of feminization of male fish in English rivers by the environment agency of England and Wales. *Environ. Health Perspect*, 114,147-51. doi: 10.1289/ehp.8068.

HAHN, M.E., S.I. KARCHNER, B.R. EVANS, D.G. FRANKS, R.R. MERSON, J.M. LAPSERITIS (2006): Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J. Experi. Zool. A.*, 305, 693-706.

HARRIES, J.E., A. JANBAKSH, S. JOBLIN, P. MATTHIESSEN, J.P. SUMPTER, C.R. TYLER (1999): Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 932–937.

HARSHBARGER, J.C., M.J. COFFEY, M.Y. YOUNG (2000): Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Mar. Environ. Res.*, 50, 247-50. doi: 10.1016/S0141-1136(00)00055-6.

HEUDORF, U., V. MERSCH-SUNDERMANN, J. ANGERER (2007): Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Env. Health* 210:62334. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.011.

HILL, R.L.J., D.M. JANZ (2003): Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*). I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquat. Toxicol.* 63, 417–429.

HINCK, J.E., V.S. BLAZER, N.D. DENSLOW, K.R. ECHOLS, T.S. GROSS, T.W. MAY, P.J. ANDERSON, J.J. COYLE, D.E. TILLITT (2007): Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Sci. Total Environ.* 378, 376-402.

HINCK, J.E., V.S. BLAZER, N.D. DENSLOW, K.R. ECHOLS, R.W. GALE, C. WIESER, T.W. MAY, M.R. ELLERSIECK, J.J. COYLE, D.E. TILLITT (2008): Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern U.S. *Sci. Total Environ.* 390, 538-557.

IGUCHI, T. , H. WATANABE, Y. OHTA Y , B. BLUMBER (2008): Developmental effects: oestrogen-induced vaginal changes and organotin-induced adipogenesis. *Int. J. Androl.*, 31, 263-268.

JOBLING, S., M. NOLAN , C.R. TYLER, G. BRIGHTY, J.P. SUMPTER (1998): Widespread sexual disruption in wild fish. *Env. Sci. Tech.*, 32, 2498–2506.

JORN, P.S., K. MARTIN, H. CHRIS, R. GISEP (2007): Habitat-specific adaptation of immune responses of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) lake and river ecotypes. *Proc. R. Soc. B.* 274, 1523-1532.

JU, S.M., J.J. PARK, J.S. LEE (2009): Induction of intersex and masculinization of the equilateral venus *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: *Veneridae*) by zinc. *Ani. Cell. Sys.* 13, 339–344.

JURICA, K., (2008): Pojavnost i značenje ftalata u alkoholnim pićima, magistarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

KATSIADAKI, I., A.P. SCOTT, R. HURST, P. MATTHIESSEN, I. MAYER (2002): Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 1946-1954.

KATSIADAKI, I., A.P. SCOTT, M.R. HURST (2004): working title: A vitellogenin assay for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and a dose response curve for ethinylestradiol. in preparation, *Environ. Health Perspect* , 114, 115-21.

KAVANAGH, R.J., G.C. BALCH, Y. KIPARISSIS, A.J. NIIMI, J. SHERRY, C. TINSON, C.D. METCALFE, (2004): Endocrine disruption and altered gonadal development in white perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. *Environ. Health Perspect.* 112, 898–902.

KELLY, M.A., A.M. REID, K.M. QUINN-HOSEY, A.M. FOGARTY, J.J. ROCHE, C.A. BROUGHAM (2010): Investigation of the estrogenic risk to feral male brown trout (*Salmo trutta*) in the Shannon International River Basin District of Ireland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73, 1658-65. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.018.

KERKEZ, J. (2016): Utjecaj endokrinih modulatora na okoliš, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, str. 16-6.

KEYMER, I.F., G.A. WELLS, C.F. MASON, S.M. MACDONALD (1988): Pathological changes and organochlorine residues in tissues of wild-otters (*L. lutra*). *Vet. Rec.* 122, 153-155.

KIRBY, M.F., Y.T. ALLEN, R.A. DYER, S.W. FEIST., I. KATSIADAKI, P. MATTHIESSEN, A.P. SCOTT, A. SMITH, G.D. STENTIFORD, J.E. THAIN, K.V. THOMAS, L. TOLHURST, M.J. WALDOCK (2004): Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: Temporal trends, 1996 to 2001. *Envir Toxicol Chem* 23, : 748–758.

KOZARIĆ, Z. (2001): Morfologija riba. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za anatomiju histologiju i embriologiju, Zagreb, str. 48-53.

KRNIĆ, M. (2014): Prisutnost i biološki učinci tributil-kositra u okolišu, Završni rad Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 1-35.

KWON, J.Y., C.H. LEE, J.Y. KIM, S.H. KIM, D.J. KIN, H.K. HAN, H.K. LIM, S.G. BYUN (2006): Disruption of sex differentiation by exogenous sex steroid hormones in Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Dev. Reprod.* 10, 247–254.

LARSSON, J., S. KARLSSON (2005): The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncog.*, 24, 5676-5692.

LAVADO, R., R. THIBAUT, D. RALDUA, R. MARTIN, C. PORTE (2004): First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 196, 247-57. doi: 10.1016/j.taap.2003.12.012.

LEE, J.S., H.S. CHO, Y.G. JIN, J.J. PARK, Y.K. SHIN (2009): Reproductive disrupting effect of organotin compound in the ark shell *Scapharca broughtonii* (Bivalvia: Arcidae) Ani. Cell. Sys. 13, 223–227.

MARTIN-SKILTON, R., R. LAVADO, R. THIBAUT, C. MINIER, C. PORTE (2006): Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. Environ. Pollut., 141, 60-8. doi: 10.1016/j.envpol.2005.08.016.

MCALLISTER, B.G., D.E. KIME (2003): Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). Aquat. Toxicol. 65, 309-316.

MCGINNIS, C.L., J.F. CRIVELLO (2011): Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish. Aquat. Toxicol. 103, 23-31.

MORCILLO, Y., C. PORTE (1997): Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean, Aquatic Toxicol., 38, 35-46.

NOLAN, M., S. JOBLING, G. BRIGHTY, J.P. SUMPTER, C.R. TYLER (2001): A histological description of intersexuality in the roach. J. Fish Biol. 58, 160-176.

OHJI, M., T. ARAI, N. MIYAZAKI (2007): Comparison of organotin accumulation in the masu salmon *Oncorhynchus masou* accompanying migratory histories. Estuar. Coast. Shelf. Sci., 72, 721-31.

PAGLIARANI, A., S. NESCI, F. TROMBETTI, V. VENTRELLA (2012): Organotin effects in different phyla: discrepancies and similarities. In: Pagliarani, A., Trombetti, F., Ventrella, V. (Eds.), Biochemical and Biological Effects of Organotins. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, 2012., pp.174-196.

PURDOM, C.E., P.A. HARDIMAN, V.J. BYE, N.C. ENO, C.R. TYLER, J.P. SUMPTER (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem Ecol 8, : 275–285.

ROMEIS, B. (1968): Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg Verlag. München, Wien.

SANTOS, M.M., C.C. TEN HALLERS-TJABBES, N. VIEIRA, J.P. BOON, C. PORTE (2002): Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk (*Buccinum undatum*) from the open North sea. *Mar. Environ. Res.* 54, 661-665.

SANTOS, M.M., J. MICAEL, A.P. CARVALHO, R. MORABITO, P. BOOY, P. MASSANISSO, M. LAMOREE, M.A. REIS-HENRIQUES (2006): Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 142, 151-155.

SCHNITZLER, J.G., E. KOUTRAKIS, U. SIEBERT, J.P. THOMÉ, K. DAS (2008): Effects of persistent organic pollutants on the thyroid function of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from the Aegean sea, is it an endocrine disruption? *Mar. Poll. Bull.* 56, 1755-1764.

SCHULZ, R.W., H.J.T. GOOS (1999): Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquacult.* 177, 5-12.

SNOEIJ, N.J., A.H. PENNINKS, W. SEINEN (1987): Biological activity of organotin compounds-an overview. *Environ. Res.* 44, 335-353.

STENTIFORD, G.D., M. LONGSHAW, B.P. LYONS, G. JONES, M. GREEN, S.W. FEIST (2003): Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.*, 55, 137-59. doi: 10.1016/S0141-1136(02)00212-X.

STENTIFORD, G.D., S.W. FEIST (2005): First reported cases of intersex (ovotestis) in the flatfish species dab *Limanda limanda*: Dogger Bank, North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 301,30710. doi: 10.3354/meps301307.

STERNBERG, R.M. (2012): Organotins as endocrine disruptors: an examination of tributyltin-induced imposex in neogastropods. In: Pagliarani, A., Trombetti, F., Ventrella, V. (Eds.), *Biochemical and Biological Effects of Organotins*. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, 2012., pp. 75-82.

STRAND, J., J.A. JACOBSEN (2005): Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *Sci. Total Environ.* 350, 72-85.

SUMPTER, J.P., S. JOBLING (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103, 173– 8.

SYLVAIN, D.G., M. DANIEL, B. PIERRE, F. MICHEL (1995): Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environ. Health. Perspect.* 103, 73-77.

THRESHER, R., R. GURNEY, M. CANNING (2011): Effects of lifetime chemical inhibition of aromatase on the sexual differentiation, sperm characteristics and fertility of medaka (*Oryzias latipes*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 105, 355-360.

TYLER, C.R., E.J. ROUTLEDGE (1998): Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment, oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* 70:1795–1804.

TYLER, C.R., S. JOBLING (2008): Roach, sex, and gender-bending chemicals: the feminization of wild fish in English Rivers. *Biosc.* 58, 1051–1059

University of Pretoria, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATDSR), (2002): Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Final Report, ATDSR/TP-9. Atlanta: Public Health Service, US Department of Health and Human Services.

VAJDA, A.M., L.B. BARBER, J.L. GRAY, E.M. LOPEZ, J.D. WOODLING, D.O. NORRIS (2008): Reproductive disruption in fish downstream from an Estrogenic wastewater effluent. *Environ Sci Technol*;42:3407-14. doi: 10.1021/es0720661

VAN AERLE, R., M. NOLAN, S. JOBLING, L.B. CHRISTIANSEN, J.P. SUMPTER, C.R. TYLER (2001): Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Env Toxicol Chem* 20, : 2841–2847.

VIGANO L., A. ARILLO, S. BOTTERO, A. MASSARI, A. MANDICH (2001): First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Sci. Total Environ.*, 269, 189-94. doi: 10.1016/S00489697(00)00821-4.

VRECL, M., V. JENČIČ (2016): Occurrence of intersex in wild freshwater fish in Slovenian rivers: a histological evaluation. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 67, 216-222.

ZHOU, J., X.S. ZHU, Z.H. CAI (2009): Endocrine disruptors: an overview and discussion on issues surrounding their impact on marine animals, *J. Mar. Animal. Ecol.*, 2, 2, 7-17.

ZHU, Y., C.D RICE, Y. PANG, M. PACE, P. THOMAS (2003): From the cover: cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 2231-2236.

6. SAŽETAK

Brojna istraživanja diljem svijeta izvijestila su o raširenoj pojavi abnormalnog seksualnog razvoja slatkovodnih i morskih riba. U riba su utvrđene povišene koncentracije vitelogenina u krvnoj plazmi mužjaka, te nalaz oocita u testikularnom tkivu kao znak feminizacije reproduktivnog sustava. Ovakva pojava oocita uočena je u riba kod zagađenja voda endokrinim modulatorima koji na taj način utječu na njihovu feminizaciju. Endokrini modulatori su prirodni i sintetički spojevi koji utječu antagonistički ili agonistički na endokrini sustav organizma, a mogu se pronaći u brojnim proizvodima, kao što su plastika, lijekovi, pesticidi, fungicidi i kozmetika. Najčešća metoda određivanja feminizacije u riba je mikroskopska metoda pretrage histoloških preparata testisa. S ciljem da se što ranije otkriju endokrini modulatori i njihovo štetno djelovanje na ribe provodi se biomonitoring. Takva metoda temelji se na biomarkerima i vrlo je važna u procjeni promjena u okolišu.

Ključne riječi: ribe, vitelogenin, feminizacija, endokrini modulatori, biomonitoring

7. SUMMARY

Morphology of fish feminization

Abnormal sexual development in fish has become the topic of interest in scientific circles. Many studies have shown that intersexual changes are present in population of wild fish and also in marine fish. An analysis of plasma that was collected from male adults revealed high concentrations of vitellogenin and also the presence of oocytes in testicular tissue. Those changes are sign of feminization of the reproductive system. This phenomenon was found in fish from the area of water pollution that was caused by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Endocrine disruptors are both natural and synthetic compounds that are present in various products such as plastic, pesticides, fungicides, medicines and cosmetics. Influence of EDCs is based on its agonistic and antagonistic effects on the endocrine system. The most common method that was used to determine fish feminization is hystological examination of testicles from male adults. Biomonitoring is carried out with the aim of early detection of the influence of EDCs. The method is based on biomarkers and is very important in the assessment of environmental change.

Key words: fish, vitellogenin, feminization, endocrine disrupting chemicals (EDCs), biomonitoring

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. ožujka 1992. u Koblenzu, Savezna Republika Njemačka. Osnovnu školu pohađala sam u Šibeniku, po čijem sam završetku upisala Gimnaziju Antuna Vrančića. Istu sam završila 2010. godine kada upisujem Veterinarski fakultet. Tijekom studija aktivno sam sudjelovala u radu Klinike za porodništvo i reprodukciju. Na navedenoj klinici sam provela godinu dana kao volonter. Stručnu praksu odradila sam na Klinici za egzotične životinje koja je dio Sveučilišta Szent István Egyetem u Budimpešti. Kao student aktivno sam sudjelovala u studentskim udrugama.