

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Jelena Šistov

**Histomorfometrijska analiza probavne žlijezde kvrgavog volka
Hexaplex trunculus (Linnaeus, 1758) u Jadranskom moru**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Gordane Lacković-Venturin, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja mag. educ. biologije i kemije.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Gordani Lacković-Venturin na trudu i iznimnom strpljenju, korisnim savjetima te stručnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala tehničarki Zrinki Benčina na nesebičnoj pomoći prilikom laboratorijske izrade rada.

Želim se zahvaliti i svim djelatnicima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta koji su mi svojim radom i trudom tijekom mog studiranja pomogli u stjecanju znanja i praktičnih vještina.

Veliko hvala asistentici dr. sc. Romani Gračan za konstantu podršku, nesebičnu pomoć, razumijevanje, beskrajno strpljenje i stručne savjete kroz cijeli proces nastajanja ovog rada.

Hvala mojim prijateljima koji su studentske dane učinili nezaboravnim, veselim i zanimljivim pružajući svakodnevnu podršku.

Hvala i mojoj rodbini i svim dobrim ljudima koji su bili uz mene i koji su mi na bilo koji način pomogli.

I najveća hvala mom neiscrpnom heroju - majci Branki i nezamjenjivoj braći Mladenu i Mihovilu koji su uvijek bili tu, u svim sretnim i tužnim trenucima, konstantno me bodrili i motivirali, bili vječita inspiracija i pružali bezuvjetnu ljubav tijekom mog cijelog školovanja.

Ovaj rad posvećujem mojoj majci i meni dragim ljudima koji su me nažalost prerano napustili.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Histomorfometrijska analiza probavne žlijezde kvrgavog volka *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) u Jadranskom moru

Jelena Šistov

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Probavna žlijezda puževa ima ulogu u sintezi i izlučivanju probavnih enzima, preuzimanju i konačnoj probavi hrane, naknadnom unosu hranjivih tvari, detoksikaciji te je važno mjesto za sintezu vitelogenina i spolnih steroidnih hormona. Spojevi poput tributil kositra (TBT) koji se koriste kao protuobraštajne boje na brodovima imaju negativan utjecaj na fiziološke procese pridnenih puževa i izazivaju značajne promjene u građi probavnih žlijezda i spolnih organa. U ovom istraživanju analizirano je 147 jedinki kvrgavog volka (*Hexaplex trunculus*) prikupljenih sa 7 lokacija u srednjem Jadranu. Vanjskim pregledom spolnih organa zabilježena je pojava imposeksa (razvoj muških spolnih karakteristika u ženki), dok su histološke promjene u tkivu probavne žlijezde analizirane na digitalnim slikama trajnih histoloških preparata, uz upotrebu histomorfometrijskog računalnog programa. Rezultati su pokazali da volci sa svih 7 lokacija imaju histološke promjene u probavnoj žlijezdi, a one su izraženije na uzorcima s lokacija koje su pod većim utjecajem plovnog prometa, poput područja oko luke Split. Pojava imposeksa je zabilježena u 88,5% analiziranih ženki, pri čemu je ustanovljeno da 67,7% ženki ima uznapredovale stadije koji onemogućavaju reprodukciju. Ustanovljena je statistički značajna razlika u površini lumena kanalića između lokacija, te povezanost površine lumena kanalića i različitih stadija imposeksa. Na histološkim preparatima probavne žlijezde uočeno je povećanje lumena kanalića, vakuolizacija tkiva te nekroza stanica epitela kanalića, što upućuje da su organokositreni spojevi u vodama istraživanih lokacija i dalje prisutni u visokim koncentracijama.

(42 stranice, 8 slika, 8 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: hepatopankreas, imposeks, tributil kositar, srednji Jadran

Voditelj: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Izv.prof.dr.sc. Ines Radanović

Izv.prof.dr.sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 13. srpnja 2016.

BASIC DOKUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Histomorphometric analysis of the hepatopancreas from banded dye-murex *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) in the Adriatic Sea

Jelena Šistov

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hepatopancreas of snails has a role in the synthesis and secreting of the digestive enzymes, taking over and the final digestion of food, the additional taking of nutrients, detoxication and is an important place for the synthesis of vitellogenin and sexual steroid hormones. Compounds like tributyltin (TBT), which are used as antifouling paints for ships, have a negative effect on physiological processes of the bottom-dwelling snails and cause significant changes in the structure of the hepatopancreas and genitals. During this research, 147 banded dye-murex (*Hexaplex trunculus*) were collected from seven different locations in the central Adriatic Sea. By the examination of the external genitals, the occurrence of the imposex (the imposition of male sex characteristics on female snails) has been noticed, while the histological changes in the hepatopancreatic tissue were analysed by using the digital pictures of the histological slides and with the help of the histomorphometric computer program. The results have shown that the banded dye-murex from all 7 locations have histological changes in the hepatopancreas and these changes are more noticeable on the snails found on the locations where sea traffic is heavier, like the areas near Split harbour. The occurrence of the imposex has been noticed in 88.5 % of the analysed female banded dye-murex and in 67.7% of these females we detected advanced stages of imposex, which prevent reproduction. There is statistically significant difference in the surface of the lumen among locations, and between surface of the lumen and different stages of imposex. On the histological slides of the hepatopancreas, the enlargement/extension of the lumen, the tissue vacuolization and the necrosis of the channel epithelial cells have been noticed. This shows that the concentration of the TBT compounds in the waters of the investigated locations is still high.

(42 pages, 8 figures, 8 tables, 76 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: hepatopancreas, imposex, tributyltin, middle Adriatic Sea

Supervisor: Dr. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 13th July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biološke karakteristike morskih puževa iz porodice Muricidae	1
1.1.1. Taksonomija kvrgavog volka.....	2
1.1.2. Biologija kvrgavog volka	2
1.1.3. Istraživanja kvrgavog volka u Jadranskom moru	4
1.1.4. Biološki i komercijalni značaj vrste	5
1.2. Ekologija ishrane i građa probavila.....	5
1.2.1. Građa i funkcija probavne žlijezde	6
1.3. Negativni učinci tributil kositra.....	7
1.4. Ciljevi istraživanja	10
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	11
2.1. Jadransko more	11
2.2. Područje srednjeg Jadrana	13
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Laboratorijska analiza.....	16
3.1.1. Priprema histoloških preparata	16
3.1.2. Bojanje histoloških preparata.....	17
3.1.3. Morfometrijska analiza.....	18
3.1.4. Statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI	21
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA	35
ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

1.1. Biološke karakteristike morskih puževa iz porodice Muricidae

Porodica Muricidae je taksonomski velika i raznolika porodica, od malih do velikih, morskih grabežljivih puževa. S oko 1600 živih vrsta, porodica Muricidae, predstavlja gotovo 10% reda Neogastropoda. Osim toga pronađeno je i oko 1200 fosilnih vrsta čiji najstariji nalazi datiraju još iz geološkog razdoblja Krede. Mnogi predstavnici porodice Muricidae imaju neobične ljuštore, karakteristične spiralne i uzdužne skulpture, različitih oblika, uglavnom s povišenim tornjem i izraženim spiralnim grebenima te bodljama ili kvržicama različitih veličina. Kod ove vrste puževa odsutan je periostrakum, tanka opna oko kućice. Ušće ili apertura kućice je različitih oblika, može biti jajolik do manje ili više produžen, s dobro naglašenim prednjim spiralnim kanalom koji može biti jako dug. Unutarnji dio vanjske usnice ljuske je često nazubljen, ponekad s procesom zuba nalik njezinom rubu (Peharda i Morton 2005). Odrasli puževi često imaju pojačani rub ušća. Krilasta proširenja ili nazubljena ušća nastaju pri kraju rasta i ne postoje u mladim jedinki. Poklopac na stražnjem dijelu stopala, operkulum, je rožnat i različite debljine. Kod mnogih volaka rast kućice nije kontinuiran, izmjenjuje se kratko razdoblje rubnog rasta s duljim razdobljem rasta kućice u debljinu (Matoničkin i sur. 1998).

Većina vrsta porodice Muricidae su mesojedi, aktivni grabežljivci koji se hrane drugim puževima, školjkašima i rakovima. Do mekih dijelova plijena dolaze lučenjem tvari za omekšavanje ljuštore i struganjem pomoću radule. Zbog svog karnivornog načina života, pojedine vrste se smatraju štetočinama jer mogu značajno razoriti prirodna staništa školjkaša kao i područja komercijalnog uzgoja školjkaša. Muricidae igraju važnu ulogu u regulaciji populacijske dinamike njihovog plijena, što uključuje i dagnje, kamenice, priljepke te tako reguliraju strukturu pridnenih zajednica. Muricidae legu jaja u zaštitnoj rožnatoj kapsuli čija veličina i oblik varira ovisno o vrsti. Iz njih se razvijaju puzajuće mlade jedinke ili rjeđe planktonske ličinke (Radwin i D'Attilio 1976).

1.1.1. Taksonomija kvrgavog volka

Kvrgavi volak (*Hexaplex trunculus*, Linnaeus 1758) jedna je od najrasprostranjenijih mediteranskih vrsta puževa iz porodice Muricidae (Peharda i Morton 2005). Sistematski je svrstan u:

- Carstvo: Animalia
- Koljeno: Mollusca
- Razred: Gastropoda
- Podrazred: Orthogastropoda
- Nadred: Caenogastropoda
- Red: Neogastropoda
- Nadporodica: Muricoidea
- Porodica: Muricidae
- Rod: Hexaplex

Najpoznatija imena su mu: kravica, rogulja, vrpalj, kočul, a službeni naziv je kvrgavi volak. Pripada porodici Muricidae zajedno s još 8 vrsta puževa u Jadranu.

1.1.2. Biologija kvrgavog volka

Iako je kvrgavi volak česta vrsta u Jadranu, jako malo se zna o njegovoj ekologiji, osobito o ekologiji prehrane. Populacije kvrgavog volka su gušće na mekom morskom dnu gdje je izobilje europske plosnate kamenice (*Ostrea edulis*) i crne dagnje (*Mytilus galloprovincialis*). U Jadranskom moru kvrgavi volak je široko rasprostranjena komercijalno važna vrsta, koja se skuplja za ljudsku prehranu i koristi kao mamac za ribe.

Volci se najčešće nalaze u zatvorenim uvalama u kojima je veliki broj organizama te lukama u kojima se nakuplja ljudski otpad. Brojan je u svim kanalima srednjeg i sjevernog

Jadrana, a na jugu nije toliko brojan. Tijekom dana najčešće se nalazi dijelom zakopan u pijesku i slabo je pokretna vrsta koja ne prelazi velike prostorne udaljenosti.

Općenito se vjeruje da je kvrgavi volak oportunistička vrsta. Sve do nedavno vrlo malo se znalo o hranidbenom ponašanju ove vrste. Rilov i sur. (2004) su pokazali kako u izrazito oligotrofnim vodama uz obalu Izraela, kvrgavi volak obitava i u plitkim, izoliranim područjima gdje je količina hrane ograničena. Kao posljedica toga kvrgavi volak ima široku prehranu, hrani se različitim školjkama, puževima, plaštenjacima, mahovnjacima, koji obitavaju na stjenovitom i pjeskovitom supstratu. Najčešći plijen su mu sve vrste školjkaša i puževa, a strvine koje padnu na dno ubrzo budu prekrivene volcima.

Upravo njegova široka prehrana kako i sam način života pogodovali su da volak bude dobro rasprostranjena i česta vrsta u našem moru, osobito posljednjih godina kada je sve više organskog otpada kao proizvoda ljudske aktivnosti.

Kvrgavi volak općenito naraste do veličine između 80 mm (Poppe i Goto 1991) i 90 mm (Macedo i sur. 1999), ali se mogu pronaći i veće jedinke. Dugoživuća je vrsta, čiji se životni vijek procjenjuje na oko 7 godina (Vasconcelos i sur. 2006) i odvojena je spola bez vanjskog spolnog dimorfizma (Elhasni i sur. 2010). Prema rezultatima istraživanja Elhasni i sur. (2010) ženke kvrgavog volka prvu spolnu zrelost postižu pri veličini od 40,3 mm, a mužjaci pri 36,9 mm. Prije spolne zrelosti nema razlike u brzini rasta između mužjaka i ženki, ali tijekom i nakon spolne zrelosti ženke brže rastu i postaju veće od mužjaka.

Od svibnja do srpnja volci grade spužvaste tvorevine u kojima pohranjuju svoja jajašca. Većina ljudi na prvi pogled mislit će da se radi o nekoj vrsti spužve žute ili bjelkasto žute boje. Sama kućica volka dok je čista ima purpurno smeđu boju, no najčešće je prekrivena raznim naslagama. Iznutra se ljubičasta boja bolje vidi nego izvana, upravo zbog raznih naslaga na samoj kućici. Na sebi ima kvрге koje dodatno stvrđnu ionako čvrsti oklop (Slika 1).



Slika 1. Kvrgavi volak (preuzeto s <http://www.biolib.cz/en/image/id10195/>)

1.1.3. Istraživanja kvrgavog volka u Jadranskom moru

Većina istraživanja kvrgavog volka odnose se na pojavu imposeksa, a veliko zanimanje predstavlja i karakteristična ljubičasta boja ove vrste.

Imposeks je patološko stanje gdje se muška spolna obilježja, poput razvoja muških spolnih organa (penisa i sjemenovoda), formiraju u ženki puževa (Garaventa i sur. 2007). Kako imposeks završava neplodnošću ženke, prirodna vrsta zahvaćena njime je pred istrebljenjem.

U Hrvatskoj je 2008. godine na području Kaštelanskog zaljeva napravljeno istraživanje o pojavi imposeksa. Za procjenu pojave i intenziteta imposeksa korištene su vrijednosti indeksa stupnja sjemenovoda i dužine penisa ženki dobivenih analizom primjeraka kvrgavih volaka prikupljenih sa sedam postaja u Kaštelanskom zaljevu. Na istraživanim postajama analizom 131 ženke utvrđena je potpuna zahvaćenost imposeksom. Štoviše, većina zahvaćenih ženki bila je u uznapredovalom stadiju imposeksa što ukazuje na znatnu zagađenost organokositrenim spojevima (Stagličić i sur. 2008).

Nemanić i sur. (2002) objavili su rezultate istraživanja provedenog na kvrgavom volku u sjevernom dijelu Jadranskog mora. Navode kako je koncentracija tributil kositra (TBT-a) u analiziranim jedinkama iznosila oko 200 nanograma, a ljeti, kada je promet intenzivniji, i do 630 nanograma, što je 600 puta više od dozvoljenih vrijednosti.

U Hrvatskoj je od siječnja 2008. godine zakonom propisana maksimalna dozvoljena koncentracija TBT-a u vodama od $1,5 \text{ ngL}^{-1}$ (NN 137/2008).

Iako je uporaba TBT-a u premazima brodskih trupova zabranjena, i dalje se bilježi prisutnost TBT-a u vodenim sredinama zbog njegove uporabe kao biocida u potrošačkim i industrijskim proizvodima, kao i moguće ilegalno korištenje u bojama za premaz brodskih trupova (Mikulić i sur. 2004; Brodogradnja 2008).

1.1.4. Biološki i komercijalni značaj vrste

Ljudima ovaj puž služi za mnoge svrhe, a kod turista, naravno kao i svaki drugi puž koristi se kao ukras. Mali (mladi) volci najčešće imaju malo kamenca te su puno ljepši od starijih, no velike jedinke su upravo zbog veličine, koja može biti i preko 15 cm u ekstremnim slučajevima, isto traženi ukrasi.

Osim kao ribolovni mamac, volci se koriste i za jelo. Volak se najprije skuha, zatim izvadi s nožićem ili iglicom te nakon toga koriste za razna jela koja su prava delicija za ljubitelje plodova mora. Kroz povijest, najvažniju ulogu imao je u proizvodnji ljubičasto grimize boje koju proizvode njegove žlijezde. Cijeli jedan narod ostao je zapamćen po boji koju su proizvodili od volka. Taj narod su bili Feničani (grčki „ljubičast“). Volak se nalazio na prvim novčanicama Feničana kao i Rimljana koji su ovu dragocjenu boju zvali carska ljubičasta, jer su najbogatiji slojevi društva trošili svoje bogatstvo da bi nosili ljubičastu odjeću. Dok su proizvodili purpurnu boju, stari narodi vadili su volke u velikim količinama, što je u ono doba ugrozilo njihovu brojnost. Nakon što je negdje 800 godina poslije Krista proizvodnja postala preskupa, nikad se više nije vratila u modu i volci kao vrsta se ne koriste za izradu boja već tisuću godina (<http://www.podvodni.hr/more/ekologija/1123-volak-i-purpura>).

1.2. Ekologija ishrane i građa probavila

Probavilo puževa različito je građeno i u uskoj je vezi s načinom prehrane. Među puževima ima mikrofaga, makrofaga, grabežljivaca i biljojeda. Dio između usnog otvora i ždrijela često je prevučen kutikulom koja može biti pojačana sa svake strane čeljustima. U ždrijelu se nalazi tzv. trenica ili radula. To je vrlo gipka hitinozna membrana na kojoj je veći ili

manji broj hitinskih zubića zavnutih unatrag. Broj, veličina i oblik zubića vrlo su različiti, što je povezano s njihovom upotrebom.

Mnogi puževi buše kamenice ili druge mekušce. Pri bušenju ne sudjeluje samo radula. Određeno mjesto na ljusci plijena natopi se izlučinom žlijezde na stopalu i rilu (proboscis). Izlučina omekša ljusku da bi zubići trenice mogli djelovati. Žlijezde koje se nalaze u usnoj šupljini vrlo su različite po obliku i funkciji. Obično se nalazi par slinskih žlijezda, iako ih može biti više (stražnjoškržnjaci). Jednostavne slinske žlijezde izlučuju sluz, a imaju ih oblici što se hrane malim česticama koje struže trenica. Sluz podmazuje trenicu i čeljusti te hrana postaje sklizava i lakše prolazi. Često su u sluznici i druge tvari koje imaju posebno djelovanje. Neki grabežljivi puževi izlučuju sumpornu kiselinu koja otapa vapnene tvari. Slina u volka sadrži dipeptidaze.

Na ždrijelo se nastavlja dugačak jednjak. Sve žlijezde jednjaka nisu homogene. Jednjak je u mnogih puževa proširen u oblik volje, gdje se hrana zadrži zbog preliminarne probave. Volja postoji u karnivora i u herbivora, ali je značajnija za herbivore. Hrana u volji miješa se sa slinom, a ovdje počinju djelovati i neki enzimi. Volja obično sadrži hitinske pločice i zubiće te mišiće pomoću kojih drobi hranu. U takvih oblika volja obavlja ulogu mišićnog želuca. Neki mesojedi progutaju cio plijen pa u tom slučaju volja djeluje također kao mišićni želudac.

Iz jednjaka hrana prelazi u želudac koji je usko povezan s parom velikih probavnih žlijezda. Karnivora obično imaju jednostavan vrećasti želudac. Herbivora, međutim, imaju želudac složenije građe. Jednostavni oblik želuca ima dio za razdvajanje, vrećicu za prutić i površinu za drobljenje. Ta su tri dijela želuca kod puževa različito razvijena s obzirom na način hranjenja. Crijevo završava analnim otvorom koji je na različitim mjestima. U nekih karnivora rektalna je žlijezda katkada uz analni otvor (Matoničkin i sur. 1998).

1.2.1. Građa i funkcija probavne žlijezde

Probavna žlijezda ili hepatopankreas je za skupinu mekušaca ključni organ za metabolizam. Ona je glavni izvor proizvodnje probavnih enzima te je uključena u apsorpciju hranjivih tvari, skladištenje i izlučivanje hrane (Barker 2002).

Kombinira mnoge funkcije jetre, gušterače, crijeva i drugih organa u kralješnjaka (Caceci i sur. 1988). i u fokusu istraživanja znanstvenika je više od 180 godina (Gibson i Barker 1979), a smatra se i kao izvrstan model za probavu hrane i izlučivanje (Icely i Nott 1992;

Loizzi 1971). Njena primarna uloga je sinteza i izlučivanje probavnih enzima, gutanje i konačna probava uzete hrane i naknadni unos hranjivih tvari. Probavna žlijezda je uključena u skladištenje i izlučivanje anorganskih rezervi, lipida, ugljikohidrata. Nadalje, glavni je metabolički centar za proizvodnju materijala potrebnih za vremenski različite događaje mitarenja i stvaranje žumanjka (McVicar i Shivers 1985).

Probavna žlijezda je sastavljena od velikog broja kanalića (tubula) koji su međusobno zbiti, a razdvaja ih vrlo malo vezivnog tkiva s homolimfatičnim prostorima. Tubuli su međusobno povezani sistemom sekundarnih kanala koji se sjedinjuju u deset do trideset primarnih kanala (Morton 1969; 1993, Peurača 1990; Claudi i Mackie 1994).

Probavna žlijezda rakova i mekušaca, slična onoj kod morskih puževa, pokazuje uglavnom dva tipa stanica u probavnim divertikulima (Trevor i Reader 1976; Herrera-Álvarez i sur. 2000). Manje, tamno obojene stanice nalaze se na lateralnim dijelovima tubula, uvijek su u grupama od dvije ili tri i imaju trepetljike. Drugi tip čine probavne stanice koje su veće i sadrže velike vakuole s fagocitiranim sadržajem. Velike vakuole potiskuju jezgre prema bazalnoj membrani. Ove stanice nemaju trepetljike, a njihov oblik varira od kubičnih do visoko prizmatičnih stanica s izrazito granuliranom citoplazmom (Claudi i Mackie 1994). Sekretorne stanice su odgovorne za izvanstaničnu probavu, a probavne stanice sudjeluju u apsorpciji, unutarstaničnoj probavi i prijenosu hranjivih tvari. Zbog svojih različitih funkcija, probavna žlijezda je odličan indikator za metabolizam, prehrambeni status i bolesti (Al-Mohanna i Nott 1989; Bautista i sur. 1994; Rosas i sur. 1995) i predstavlja važnu ulogu u detoksikaciji.

Jednostavni mekušci imaju parne probavne žlijezde kao i mnogi puževi. Te žlijezde nisu jednake zbog torzije. U puževa dešnjaka veća je lijeva žlijezda, a u ljevaka desna. Izvodni kanali probavnih žlijezda otvaraju se u želudac (Matoničkin i sur. 1998).

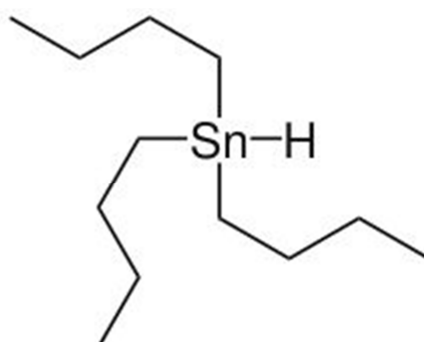
1.3. Negativni učinci tributil kositra

Morski obraštaj uzrokuje ozbiljne probleme na podvodnim strukturama i stvara ekonomske gubitke. Ti problemi su ključni za trupove brodova, industriju akvakulture, naftne platforme za bušenje i slično (Armstrong i sur. 2000). Uobičajena metoda izbjegavanja nastanjivanja obraštajnih morskih organizama na plovnim objektima su boje za zaštitu od obraštanja.

Kasnih 50-ih godina prošlog stoljeća otkrivena su biocidna svojstva organskih spojeva, osobito tributil kositra (TBT-*eng.tributyltin*), trifenil kositra (TPhT) i tricikloheksil kositra, i

počinju se primjenjivati kao zaštita za drvo (Hoch 2001). Nakon toga počeli su se koristiti i u bojama protiv obraštanja kao fungicidi, moluskicidi, nematocidi, ovidi, kao i sredstva za odbijanje glodavaca (Garaventa i sur. 2007).

Organokositreni spojevi se također koriste i kao pesticidi u agrokulturi (trifenil kositar – TPT), te kao stabilizatori topline u proizvodnji PVC cijevi (dibutil kositar – DBT) (NCI 2000). Najčešće korišteni spoj je TBT (Slika 2) koji se zbog svoje jake biocidne aktivnosti široko koristio za sprječavanje obrastanja plovila, u bojama za zaštitu trupa i drugih uronjenih površina na brodovima, rashladnih tornjeva, očuvanje drva i druge slične primjene (Chagot i sur. 1990).



Slika 2. Strukturna formula tributil kositra (TBT) (preuzeto s <http://suppversity.blogspot.hr/2011/06/fat-and-impotent-due-to-tributyltin-not.html>)

Međutim, otkriveno je da obraštajni premazi na bazi organskih spojeva, uglavnom TBT-a kao aktivnog agensa, predstavljaju ozbiljnu svjetsku prijetnju morskom okolišu (Ellis i Pattisina 1990; IMO 1990). U slatkovodnom, estuarijskom i morskom ekosustavu (Fent 1996) pokazuje izrazitu endokrinu toksičnost koja stvara prijetnje za sve vodene organizme (Santos i sur. 2002).

Najštetnija posljedica toksičnog djelovanje TBT-a može se očitovati u pojavi imposeksa. Imposeks faze ženke puža *Nucella lapillus* (Bryan i sur. 1986, 1987, 1988, 1989; Evans i sur. 2000; Gibbs i Bryan 1986; Gibbs i sur. 1987) i drugih (*Nucella lima*, *Hexaplex trunculus*)(Axiak i sur. 1995, 2003; Terlizzi i sur. 1998, 1999, 2004) se koriste širom svijeta u praćenju razine tributil kositra. Izgled i građa penisa i sjemenovoda ženke i mužjaka se koriste kao indikatori uznapredovalosti imposeksa, sve u svrhu motrenja razine TBT-a u morskom okolišu (Garaventa i sur. 2007).

Objavljen je niz znanstvenih istraživanja koja pokazuju ovisnost kontaminacije mora TBT-om s intenzitetom tankerskog prometa. To posebno vrijedi za relativno zatvorena mora,

poput Crvenog mora, Baltičkog ili Jadranskog mora. Također, rezultati brojnih istraživanja ukazuju na toksično djelovanje TBT-a na vodene organizme već pri malim koncentracijama od oko 1 ng/l (Grinwis i sur. 1998; Fisher i sur. 1999). Vrijeme raspadanja TBT-a u vodi varira od nekoliko dana do nekoliko desetaka desetljeća. Raspadanje je znatno usporeno na područjima gdje je isključena prisutnost kisika, kao kod sedimentnih područja gdje to može iznositi i nekoliko godina. Tako su vode s više sedimentnim dnom pod većim rizikom da budu zagađene TBT-om i dugi niz godina (Dowson i sur. 1996; Gadd 2000).

Chagot i sur. (1990) u svom istraživanju navode kako TBT inducira oštećenja stanica u tkivima pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas*), kao što su probavni divertikuli, škrge, vezivno tkivo i bubrezi te probavne žlijezde.

TBT se brzo apsorbira u organskom materijalu kao što su bakterije i alge, ili se apsorbira na suspendirane čestice u vodi (Burton i sur. 2004; Gadd 2000; Luan i sur. 2006). Nakon toga lako se filtriranjem prilikom hranjenja ugradi u tkivo zooplanktona, a potom procesom hranjenja akumulira u tkivo beskralježnjaka i na kraju i u viših organizama kao što su ribe, vodene ptice i sisavci (Berge i sur. 2004; Borghi i Porte 2002; Harino i sur. 2000; Ohji i sur. 2007).

Ljudi mogu bit izloženi djelovanju TBT-a preko hrane, prvenstveno ribe. TBT koncentracije u hrani uglavnom nisu štetne za čovjeka i rizik unosa preko hrane je malen.

U prosincu 2003. godine USEPA (*engl.* The United States Environmental Protection Agency – Agencija za zaštitu okoliša SAD-a) izdala je dokument pod nazivom „Kriterij kvalitete života vodenog okoliša za tributil-kositar“ (*engl.* „Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin“). U dokumentu se navodi kako je koncentracija TBT-a za kronični efekt u slatkoj vodi za vodene organizme 72 ng/l dok je za akutni toksični efekt potrebno 460 ng/l. U oceanskoj morskoj vodi odgovarajuća koncentracija za kronični efekt je 7,4 ng/l dok je za akutni toksični efekt potrebno 420 ng/l (Landeka 2009).

Iako se štetni učinak organokositrenih spojeva već znao i ranih 70-ih godina prošlog stoljeća, tek 1980. godine vlade počinju djelovati u ograničavanju njihove uporabe. Međunarodna javnost je posebno skrenula pozornost na ovaj problem nakon dva slučaja zagađenja u Europi. Prvi slučaj zabilježen je u Francuskoj gdje je industrija uzgajanja kamenica u zaljevu Arcachon gotovo nestala zbog utjecaja TBT-a na reproduktivni ciklus kamenica. Francuska je ujedno i prva zemlja koja je 1982. godine, nakon uspostavljanja veze između TBT-a i pada produktivnosti kamenica, zabranila uporabu TBT premaza na

brodovima manjim od 25 m. Drugi slučaj zagađenja se dogodio u Velikoj Britaniji gdje je zabilježen razvoj imposeksa kod morskih organizama u prolazu Plymouth. Utvrđeno je da je ovaj fenomen više raširen u obalnim vodama, s većom učestalošću blizu luka i marina. Također, Vlada Velike Britanije 1985. godine donosi zakon o ograničenoj primjeni premaza na bazi TBT-a koji se primjenjuju kao biocidi (Alzieu i sur. 1991; Champ 2000).

2001. godine Međunarodna pomorska organizacija (International Maritime Organization-IMO) usvojila je Međunarodnu konvenciju o štetnim protuobraštajnim brodskim sustavima (*The International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships*) poznatu i kao „AFS Konvencija“ kojom se zabranjuje uporaba štetnih tvari u protuobraštajnim premazima brodskih trupova. Stupila je na snagu 17. rujna 2008. god. nakon što su je ratificirale 34 države koje raspolažu s ukupno 52,81% svjetske trgovačke tonaže. Zaključno s 31. svibnja 2009. Konvenciji je pristupilo 39 država s ukupno 66,89% svjetske brodske tonaže. Hrvatska je pristupila Konvenciji 02.12.2006. godine, dakle dok još sama Konvencija nije niti stupila na snagu.

1.4. Ciljevi istraživanja

S obzirom na to da se organokositreni spojevi poput TBT-a akumuliraju u područjima s većom količinom brodova (brodogradilišta, marine, uzgajališta, luke...) uzorci volaka su prikupljeni na 6 lokacija koje su pod većim antropogenim opterećenjem te na 1 udaljenijoj (čistoj) lokaciji. Cilj istraživanja je utvrditi postoje li histološke promjene u tkivu probavne žlijezde kvrgavog volka prikupljenog na različitim lokacijama u Jadranskom moru te kvantificirati uočene promjene, i njihovu povezanost s pojavom imposeksa. Dobiveni rezultati pokazat će u kojoj su mjeri analizirani primjerci pod utjecajem štetnih spojeva u moru, te ukazati koje su lokacije pod većim organokositrenim opterećenjem.

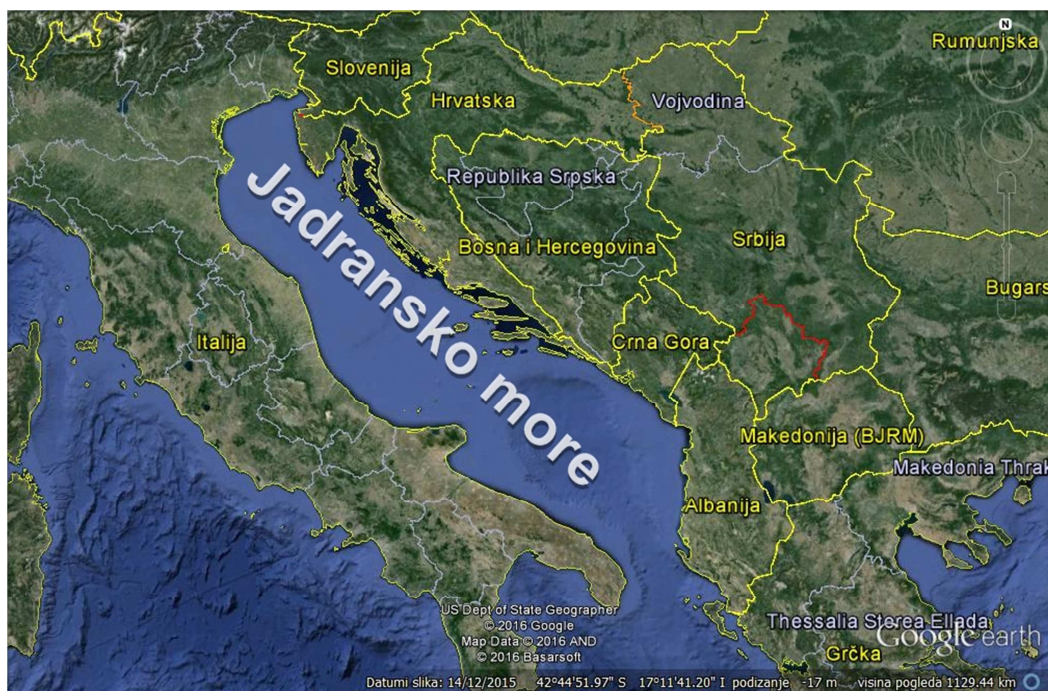
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

2.1. Jadransko more

Jadransko more je zaljev Sredozemnog mora i najsjeverniji dio Mediterana. Smješteno je između Balkanskog i Apeninskog poluotoka do Otrantskih vrata na jugoistoku čija širina iznosi oko 40 nm (74,08 km) i dubine oko 741 m. Dužina Jadranskog mora iznosi 870 km, širina 159,3 km, a površina, zajedno s otocima 138 595 km², što je oko 4,6% od ukupne površine Mediterana.

Utjecaj geografskih, geomorfoloških, klimatskih, bioloških i drugih različitih ekoloških čimbenika (uglavnom hidrografskih) iz prošlosti, ali i sadašnjih, posljedica su današnje flore i faune Jadranskog mora. Poznavanje tih značajki Jadranskog mora važno je za razumijevanje životnih prilika i života u njemu.

Jadransko more (Slika 3) je duga uleknina ili sinklinala koje je u sadašnjem obliku i veličini nastalo transgresijom početkom kvartara. Zbog posebnih morfoloških osobitosti dijeli se na sjeverni, srednji i duboki južni dio koji je nastao urušavanjem Zemljine kore u mlađem tercijaru. Tim su procesom nastala i Otrantska vrata koja spajaju Jadransko i Jonsko more (Jardas 1996).



Slika 3. Jadransko more s okolnim područjem (preuzeto i prilagođeno s

<https://earth.google.com/>)

Najvećim dijelom Jadransko more je plitko, a kontinentska podina ili šelf, tj. površina morskog dna do oko 200 m dubine, zauzima čak 102 415 km² ili 73,9%. Sjeverniji dijelovi Jadrana ne prelaze dubinu od 50 m, a idući od sjeverozapada prema jugoistoku, dubina Jadranskog mora se postupno povećava. Veće dubine od 200 m nalazimo samo na području Jabučke (273 m) i Južnojadranske kotline (1 330 m) (Jardas 1996).

S obzirom na fizičku strukturu i različite facijese morskog dna, razlikujemo hridinasto (kamenito), šljunkovito, ljuštuno, pjeskovito i muljevito dno. Najveću površinu jadranskog šelfa prekrivaju muljeviti i pjeskoviti sedimenti. Sjeverni Jadran karakteriziraju pjeskoviti, a južni Jadran muljeviti sedimenti, dok je srednji Jadran prijelazno područje. Osobito čvrstu vezu sa sedimentima dna pokazuju bentonski i bentopelagični organizmi, a slabu ili nikakvu vezu pelagični organizmi.

U jugoistočnom dijelu Jadrana slanost je oko 38‰, a prema sjeverozapadnom dijelu opada na manje od 35‰, dok je u dubljim dijelovima veća i ujednačenija (oko 38,5‰) (Russo i sur. 2012).

Jadran je toplo more s izraženim godišnjim hodom površinske temperature mora. Prosječna godišnja temperatura iznosi 11 °C. Zimi se temperature kreću od 7 °C na sjeveru do 16 °C na jugu (Otrantska vrata). Ljetne temperature mora dosežu visoke iznose, čak 22-25 °C, a u godinama izrazito zagrijane atmosfere i do 27 °C (Krstulović i sur. 2012). Gibanje vodenih masa ovisi ponajviše od geomorfoloških, meteoroloških (npr. zagrijavanja, utjecaja vjetrova) i hidrografskih značajka (npr. zbog nastalih razlika u temperaturi i salinitetu, odnosno gustoći morske vode) (Jardas 1996).

Priobalna područja imaju umjereni trofički stupanj, dok su otvorene vode oligotrofne. Visoki stupanj trofije karakterizira i otvorene vode sjevernog Jadrana, što je rezultat utjecaja rijeke Po, ali i ostalih velikih talijanskih rijeka.

Za relativno malo more kao što je Jadransko, vrlo je velika raznolikost od oko 850 pravih zooplanktonskih vrsta ili holoplanktonata, te 20 puta više povremenih ili meroplanktonata, odnosno ličinki bentonskih organizama i riba. Niska razina organske produkcije posljedica je male količine hranjivih soli u vodi, posebno fosfora i dušika. No sjeverni se Jadran, zbog različitih specifičnih utjecaja, smatra jednim od najproduktivnijih područja u Sredozemnom moru. U Jadranskom moru do sada nađeno je između 6 000 i 7 000 biljnih i životinjskih vrsta, a veliki broj skupina, posebice beskralježnjaka, nedovoljno je istražen.

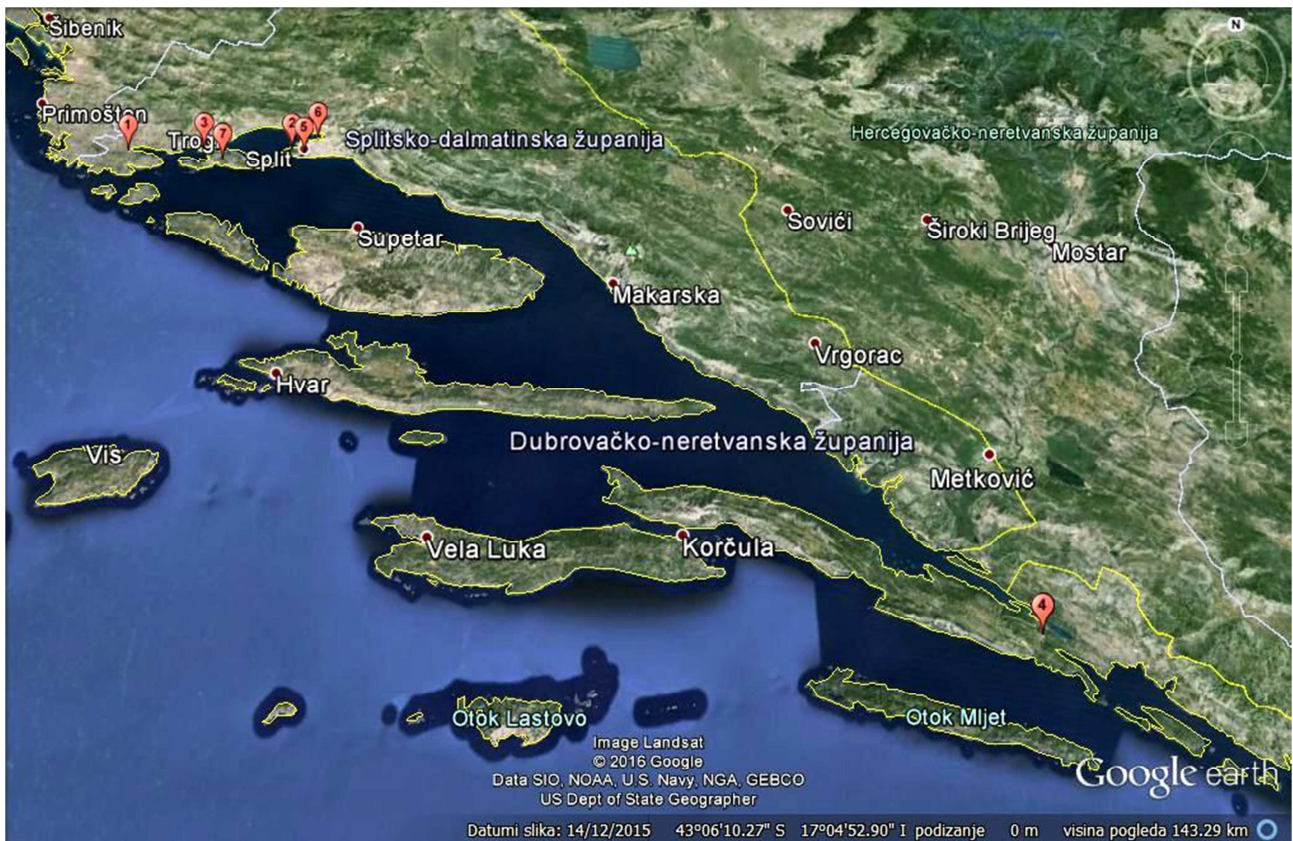
Stanje otvorenih voda Jadranskog mora, prema dostupnim podacima o stanju makroalga i morskih cvjetnica te bentoskih beskralježnjaka, može se smatrati općenito dobrim. U

priobalnom području postoje izdvojena područja (npr. Kaštelanski i Šibenski zaljev) s izraženim negativnim utjecajem na prirodno stanje zajednica uslijed povećanog onečišćenja zbog blizine velikih urbanih cjelina, luka, industrije i lokalnih geomorfoloških posebnosti (zatvoreni zaljev, ušća rijeka i sl.). Unatoč relativno dobrom stanju u cijelom Jadranskom moru, vrlo je malo potpuno netaknutih područja gdje funkcioniranje ekosustava nije na neki način poremećeno, kao i područja pod učinkovitom zakonskom zaštitom. Trenutne prijetnje su rezultat ljudskih aktivnosti i potrebna je povećana pažnja i strože upravljanje kako bi se održalo prirodno funkcioniranje ekosustava u budućnosti (Krstulović i sur. 2012).

2.2. Područje srednjeg Jadrana

Područje srednjeg Jadrana je razvedeno područje s brojnim lukama i marinama. Iako su luke u Jadranskom moru s najvećim prometom robe smještene na sjeverozapadnom dijelu Jadrana (Lušić i Kos 2006), nije zanemariv i plovni promet srednjeg Jadrana.

Područje srednjeg Jadrana (Slika 4) obuhvaća plovni promet Splitsko-dalmatinske županije i dijela Dubrovačko-neretvanske županije (Tablica 1). Prema podacima iz istraživanja Pomorskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci iz 2014.godine, u 2013. godini iz luka Splitsko-dalmatinske županije isplovilo je ukupno oko 53.000 brodova, od toga 92% je promet prema domaćim lukama.



Slika 4. Područje srednjeg Jadrana s označenim lokacijama uzorkovanja (1.Marina uzgajalište, 2.Split lučica Špinut (s vanjske strane lukobrana), 3.Trogir brodogradilište, 4.Ston, 5.Split gradska luka, 6.Vranjići i 7.Čiovo) (preuzeto i prilagođeno s <https://earth.google.com/>)

Tablica 1. Promet u državnim lučkim upravama na području srednjeg Jadrana u 2012. godini prema podacima Ministarstva pomorstva, prometa i infrastrukture (http://www.mppi.hr/UserDocsImages/PROMET%202012%2019-3_13.pdf)

LUČKA UPRAVA	UKUPNI TERETNI PROMET (t)	UKUPNI PUTNIČKI PROMET (broj putnika)	UKUPNI PROMET VOZILA (broj vozila)
Split	2.825.192,00	4.253.135,00	642.103,00
Ploče	2.582.109,00	0,00	0,00
Dubrovnik	0,00	1.234.139,00	18.534,00

Luka Split bilježi kontinuirani rast putničkog prometa, kako domaćeg tako i međunarodnog. Sličnu tendenciju rasta pokazuje i plovni promet Dubrovačko-neretvanske županije. Iz godine u godinu povećava se broj brodova koji plove ovim dijelom Jadranskog mora, a planiraju se i projekti izgradnje i proširenja plovnih postaja. Uz neosporne pozitivne učinke na gospodarstvo i turizam ovog područja Jadrana to donosi i osjetno povećanje opterećenja morskog okoliša i obalnog područja. Razvojem pomorskog prometa i cjelokupnog gospodarstva dolazi do sve većih ekoloških problema. Ubrzana urbanizacija, industrija, turizam i rekreacija, transport, ribarstvo te ostale djelatnosti razvijene na području srednjeg Jadrana uzrokuju značajne ekološke probleme (Barkiđija i sur. 2011).

U projektu „Program zaštite okoliša Splitsko-dalmatinske županije“ izdanog 2008. godine od strane Instituta za primijenjenu ekologiju među najznačajnije izvore onečišćenja s mora navodi se pomorski promet, uz koji se vezuju nelegalna ispuštanja kaljužnih voda, ispiranje tankova, izmjena balastnih voda, štetni spojevi iz protuobraštajnih boja i dr. s mogućnošću posljedica koje variraju od ozbiljnih do katastrofalnih.

U području srednjeg Jadrana kvrgavi volak je česta i dobro rasprostranjena vrsta. Uz obalna područja susrećemo velike populacije volka čemu je razlog njegova izrazito dobra prilagodba na različite uvjete okoliša. Kao slabo pokretna vrsta, relativno dugog životnog vijeka i sposobnošću bioakumulacije dobar je test-organizam za istraživanja stanja okoliša pa tako i ovog dijela Jadrana.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu analizirane su probavne žlijezde kvrgavog volka koji su uzorkovani na sedam lokacija u Jadranskom moru (Split gradska luka, Vranjić, Marina uzgajalište, Ston, Split lučica Špinut (s vanjske strane lukobrana), Trogir brodogradilište i Čiovo). Uzorkovane jedinke su skupljene mrežom (mamcem) i ronjenjem, a ukupno je prikupljeno 147 jedinki, od kojih je 96 bilo ženskog, a 51 muškog spola. Uzorci su prikupljeni u travnju 2014. godine.

3.1. Laboratorijska analiza

3.1.1. Priprema histoloških preparata

Jedinke su dostavljene u laboratorij gdje se izdvojio dio tkiva s gonadama i probavnom žlijezdom.

Izdvojeno tkivo probavne žlijezde i gonada kvrgavog volka fiksirano je tijekom 24-72 h Davidsonovim fiksativom čiji je sastav:

- glicerol 400 mL
- 95% etanol 1200 mL
- filtrirana morska voda 1200 mL
- 36% formalin 800 mL
- ledena octena kiselina 400 mL

Nakon fiksacije tkivo je uklopljeno u paraplast, smjesu parafina i plastične mase. Parafin je mješavina ugljikovodika koja se koristi za prožimanje i uklapanje tkiva kod izrade histoloških preparata.

Prije uklapanja u paraplast tkivo se priprema na sljedeći način:

- 1.) 70% alkohol (48 sati)
- 2.) 80% alkohol (60 min.)
- 3.) 96% alkohol (60 min.)
- 4.) 100% alkohol (dva puta po 60 min.)
- 5.) kloroform (~12 sati)

Na ovaj način tkivo je dehidrirano jer u nizu rastućih koncentracija alkohola iz tkiva izlazi voda. Slijedi prožimanje tkiva kloroformom jer paraplast u koji se uklapa tkivo nije topiv u etanolu.

Paraplast se također, dan prije uklapanja, stavlja na taljenje u termostat na temperaturu 60 °C. Uklapanje se nastavlja sljedećeg dana, a potrebno je naglasiti kako se svi postupci odvijaju u termostatu na temperaturi 60 °C što je moguće brže zbog hlađenja paraplasta. Kloroform ispari pod utjecajem topline, a paraplast ispuni sve stanične i međustanične prostore tkiva. Tijekom uklapanja tkivo se prebacuje iz otopina s većim udjelom kloroforma u paraplastu, u otopine s manjim udjelom kloroforma u paraplastu da bi završilo uklopom u čisti paraplast i to na sljedeći način:

- 1.) kloroform-paraplast u omjeru 1:1 (30-60 min.)
- 2.) paraplast I (30-60 min.)
- 3.) paraplast II (30-60 min.)
- 4.) čisti paraplast

Tako priređeni uzorci tkiva su stavljani u pripremljene kalupe od papira, tzv. "lađice" i zaliveni paraplastom. Uzorci u lađicama se izvade iz termostata na sobnu temperaturu i označe brojem. Dobiveni blokovi se hlade na sobnoj temperaturi do daljnje obrade. Stvrdnuti blokovi paraplasta s uzorkom tkiva režu se na rotacijskom mikrotomu na debljinu 6-8 µm. Rezovi se prenose u vodenu kupelj kako bi se izravnali, a potom se nanose na predmetno stakalce prethodno premazano glicerom i bjelanjkom. Tako priređeni histološki preparati suše se na sobnoj temperaturi.

3.1.2. Bojanje histoloških preparata

Osušeni rezovi koji sadrže poprečne presjeke probavne žlijezde bojali su se kombinacijom histoloških boja hemalaun-eozin (HE). Prije bojanja iz rezova treba ukloniti paraplast postupkom deparafiniranja i rehidrirati rezove tkiva provlačeći ih kroz sljedeće otopine:

- 1.) ksilol I (15 min.)
- 2.) ksilol II (15 min.)
- 3.) 100% alkohol (5 min.)
- 4.) 96% alkohol (5 min.)
- 5.) 80% alkohol (5 min.)
- 6.) 70% alkohol (5 min.)

7.) destilirana voda (2 x 5 min.)

Nakon deparafiniranja i rehidriranja slijedi bojanje rezova hemalaun-eozinom. Rezovi se najprije uranjaju u bazičnu boju hemalaun (Mayerova otopina), a zatim u kiselu boju eozin. Hemalaun boji plavo-ljubičasto kisele strukture u stanici, a eozin boji crveno-ružičasto bazične strukture u stanici.

Priprema boje 0.1%-tni eozin:

0.1 g boje u prahu otopi se u 100 ml 75%-tnog alkohola. Doda se 2-3 kapi ledene octene kiseline pri čemu boja fosforilira (pH oko 4.5). Ako ima taloga, boju je potrebno filtrirati.

Postupak bojanja HE:

- 1.) hemalaun (Mayerova otopina) (6-10 min.)
- 2.) tekuća voda (2 x 5 min. (u drugoj vodi ostaviti i do 20 minuta jer tek u vodi preparat dobro poplavi))
- 3.) eozin (2-4 min.)
- 4.) destilirana voda (2 x 5 min.)

Kako bi se pripremili trajni histološki preparati potrebno je iz tkiva potpuno ukloniti vodu postupkom dehidriranja i razbistriti uzorke uranjanjem u ksilol na sljedeći način:

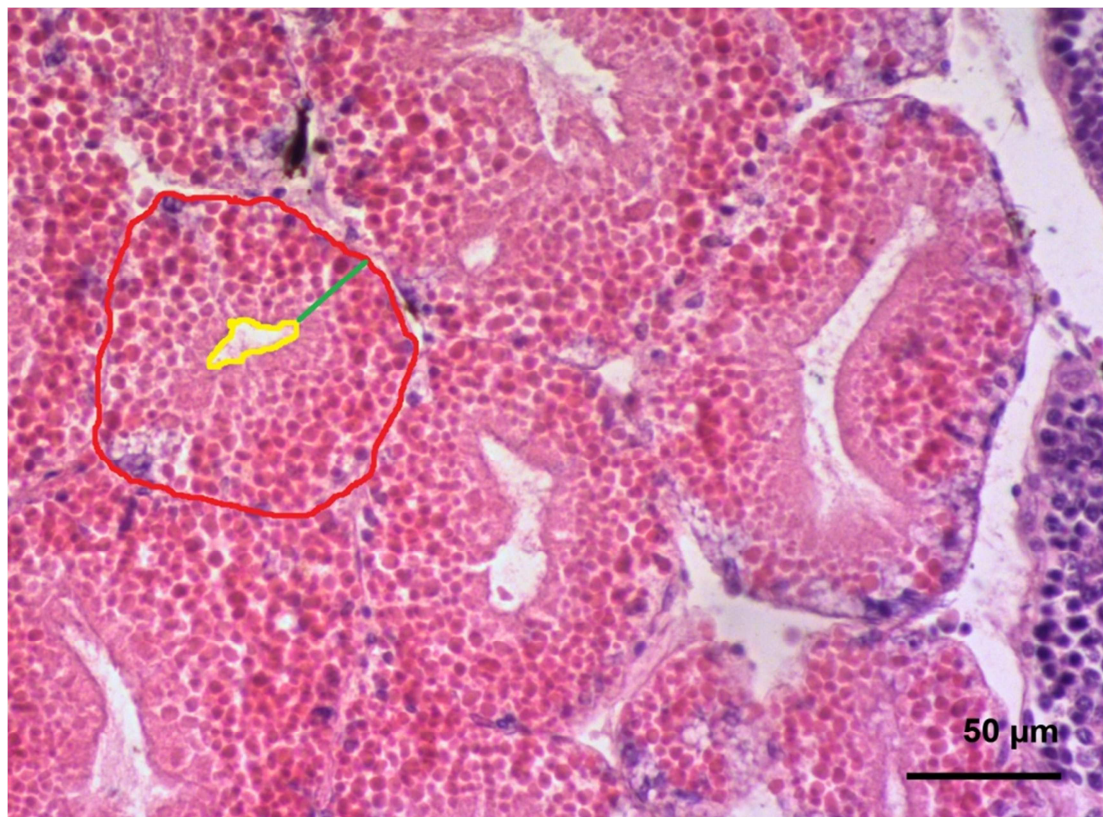
- 1.) 70% alkohol (5 min.)
- 2.) 80% alkohol (5 min.)
- 3.) 96% alkohol (5 min.)
- 4.) 100% alkohol (5 min.)
- 5.) ksilol III (5 min.)
- 6.) ksilol IV (5 min.)

Na obojene histološke prereze tkiva na predmetnim stakalcima nakapa se kanadski balzam i potom se poklope pokrovnicom. Kanadski balzam je prirodna smola neutralnih sastojaka koja ne utječe na kemijski sastav tkiva niti na rezultate bojanja preparata. Tako pripremljeni histološki preparati nakon jednodnevnog sušenja su trajni i spremni za mikroskopiranje.

3.1.3. Morfometrijska analiza

Preparati su pregledani na mikroskopu Nikon Eclipse E600 na povećanju 20x. Mikroskop je spojen na kameru Nikon DXM 1200. Fotografiranje i mjerenje mikroskopskih preparata načinjeno je u programu ZEN 2 lite (*blue edition*). Mjerena je površina kanalića probavne

žlijezde, površina lumena kanalića i visina epitela kanalića (Slika 5) na 5 različitih mjesta. Na svakom uzorku izmjereno je 20 kanalića.



Slika 5. Morfometrijske mjere kanalića (crvena linija označava mjerenu površinu kanalića, žuta linija označava mjerenu površinu lumena kanalića, zelena linija označava mjerenu visinu epitela kanalića) (HE x200) (foto: Jelena Šistov).

3.1.4. Statistička obrada podataka

Tip raspodjele podataka testiran je Kolmogorov-Smirnov testom. S obzirom na to da raspodjela podataka nije slijedila normalnu distribuciju (Kolmogorov-Smirnov test $p < 0,05$) u daljnjim statističkim analizama korišteni su neparametrijski testovi.

Sve vrijednosti izmjerenih površina kanalića i lumena i visina stanica prikazane su kao prosječna vrijednost, standardna devijacija (SD) te minimumi i maksimumi vrijednosti.

Odnos dužine tijela životinja i morfometrijski izmjerenih površina kanalića i lumena hepatopankreasa analiziran je pomoću Spearmanove korelacije. Mann-Whitney U test je

korišten da bi se utvrdilo postojanje razlika u histomorfometrijskim mjeranjima kanalića hepatopankreasa između spolova.

Postojanje razlika u morfometrijskim mjerama hepatopankreasa, u odnosu na lokalitete s kojih su životinje prikupljene testirano je pomoću Kruskal-Wallis testa. U slučajevima kad su rezultati bili statistički značajni ($p < 0,05$), dodatno je korišten *post-hoc* Mann-Whitney U test (Dytham, 2003). Mann-Whitney U test je također korišten za usporedbu lokacije koja je smatrana čistom (Čiovo) u odnosu na ostalih šest lokacija.

Da bi se utvrdilo postoji li relacija između određenih stadija imposeksa i razlika u morfometrijskim mjerama hepatopankreasa između ženki volka, životinje su razvrstane u pet stadija imposeksa prema klasifikaciji Terlizzie i sur. (1999):

- Stadij 0 – ženke bez muških spolnih karakteristika
- Stadij 1 – prvi znak imposeksa, pojava početka penisa iza desnog očnog kapka, vas deferens još uvijek nije razvijen
- Stadij 2 – prisutan mali penis s početkom vas deferensa
- Stadij 3 – penis veći nego u stadiju 2, vas deferens još ne dopire do vaginalnog otvora. Ovaj stadij još uvijek dopušta reprodukciju
- Stadij 4 – vas deferens dosegne vaginalni otvor, prolazi ga i prolazi uz kapsule žlijezde u trbušni dio, veličina penisa odgovara onoj kod mužjaka iste veličine tijela, vaginalni otvor je nepromijenjen
- Stadij 5 – vas deferens prolazi duž cijele dužine kapsule žlijezde. Stidnica nije vidljiva, kapsula žlijezde je otečena, često podijeljena s otvorima lumena u plaštanu šuplinu. U ovom stadiju ženke se mogu smatrati sterilnim.

S obzirom da veličina uzorka nije bila ravnomjerna između svih 5 stadija, ženke kojima je utvrđen imposeks su podijeljene u dvije grupe: ženke koje se mogu uspješno razmnožavati (stadij 1-3) i ženke u uznapređovalom stadiju imposeksa (stadij 4-5). Te dvije grupe su uspoređene pomoću Mann-Whitney U testa.

Sve statističke analize rađene su u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD).

4. REZULTATI

U ovom radu histomorfometrijskom analizom obrađeno je 147 jedinki kvrgavog volka uzorkovanog na sedam lokacija u Jadranskom moru (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo), od čega je bilo 96 ženki i 51 mužjak.

Analizirane su morfometrijske mjere probavne žlijezde kvrgavog volka te stadiji impanseksa kod ženki volka.

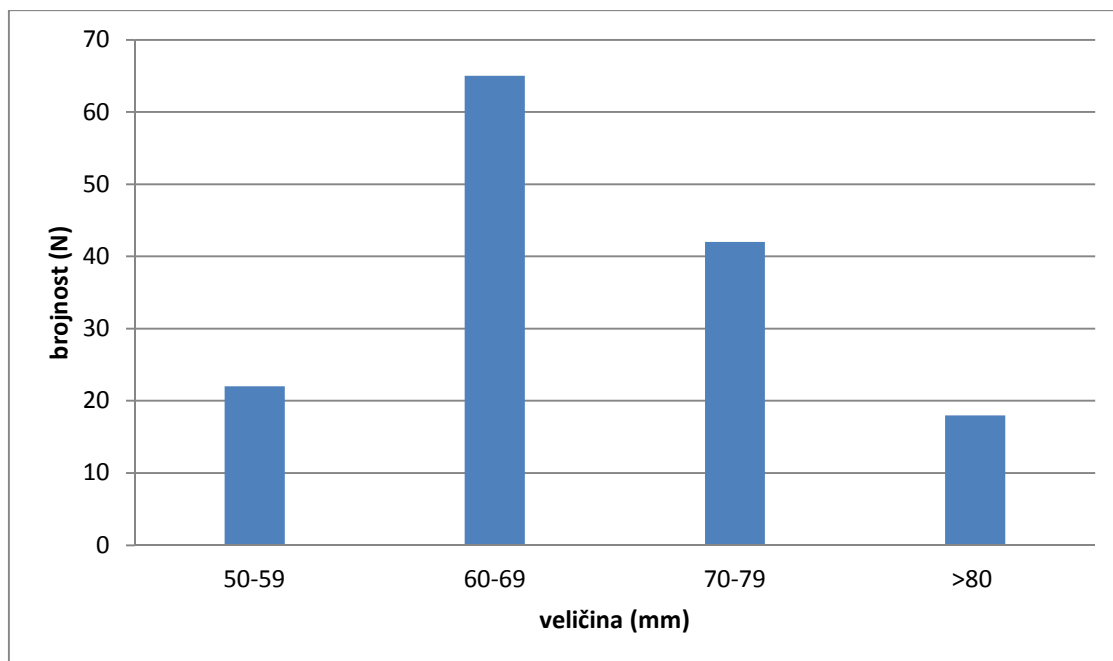
U Tablici 2 su navedene lokacije uzorkovanja te brojnost i prosječna veličina prikupljenih jedinki na svakoj lokaciji.

Tablica 2. Lokacije uzorkovanja, brojnost i prosječna veličina jedinki.

LOKACIJA (oznaka)	BROJNOST (N)	VELIČINA ± ST. DEVIJACIJA (mm)
Marina-uzgajalište (M)	20	71,4 ± 7,7
Split-lučica Špinut (L)	22	75,0 ± 10,0
Trogir-brodogradilište (T)	13	69,0 ± 4,0
Ston (SN)	20	63,0 ± 5,0
Split-gradska luka (ST)	30	71,0 ± 7,0
Vranjić (V)	19	65,0 ± 7,0
Čiovo (Č)	23	63,4 ± 9,2

Prikupljene su životinje kojima je dužina tijela (kućice) bila između 50,92 i 93,1 mm (sred. vrijed. ± SD 68,28±8,76 mm). S obzirom na rezultate istraživanja Eshani i sur. (2010) u kojem se navodi kako ženke kvrgavog volka prvu spolnu zrelost postižu pri veličini od 40,3 mm, a mužjaci pri 36,9 mm, svi uzorci analizirani u ovom radu bili su spolno zreli.

Slika 6 prikazuje veličinsku distribuciju analiziranih volaka.



Slika 6. Veličinska distribucija analiziranih uzoraka kvrgavih volaka prikupljenih u srednjem Jadranu.

U Tablici 3 je navedena zastupljenost mušjaka i ženki unutar četiri kategorije veličine.

Tablica 3. Zastupljenost mušjaka i ženki analiziranih volaka unutar veličinskih kategorija.

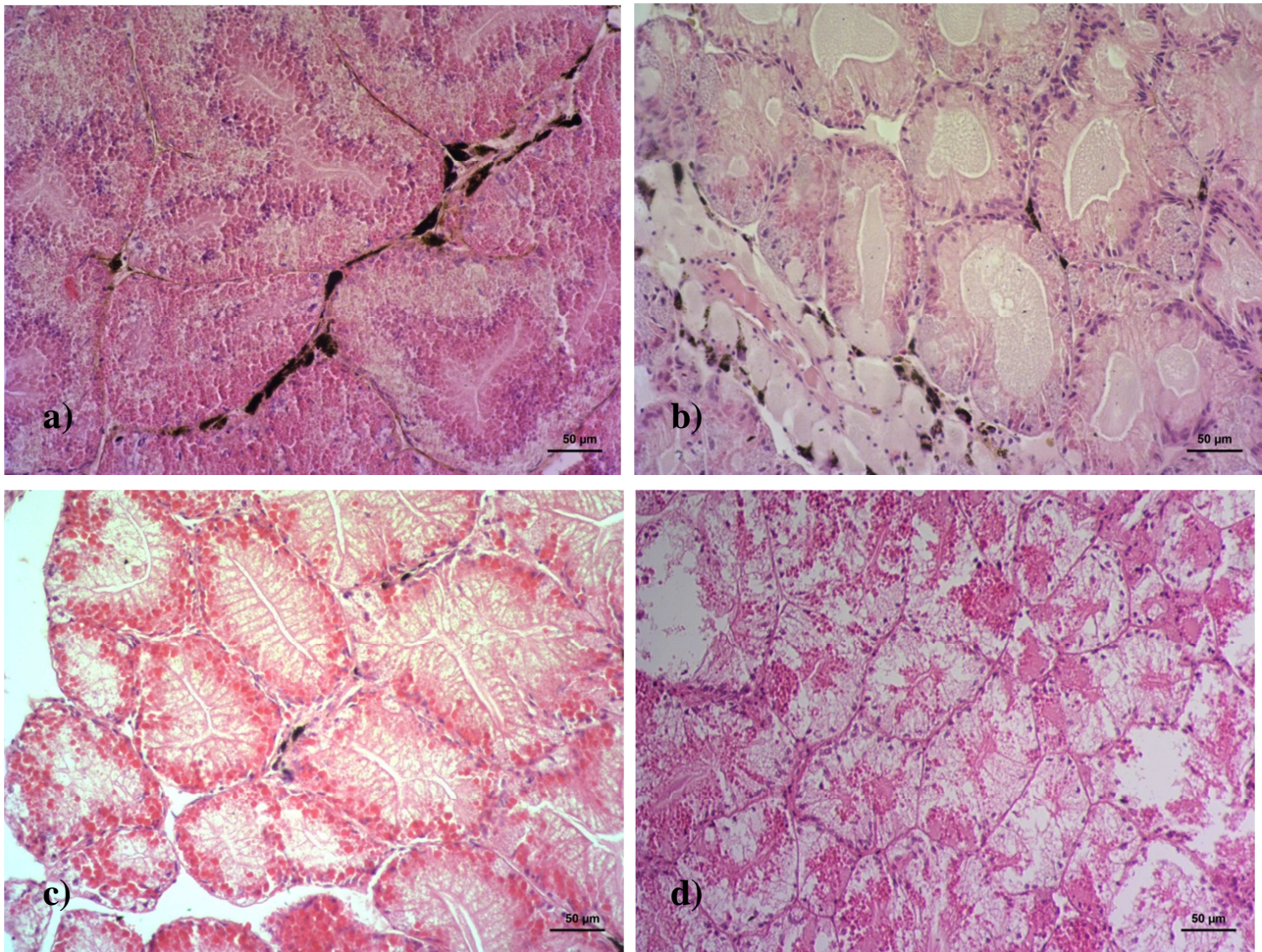
VELIČINA (mm)	50-59	60-69	70-79	>80
BROJNOST ŽENKI (N)	14	42	27	13
BROJNOST MUŠJAKA (N)	8	23	15	5
UKUPNO (N)	22	65	42	18

U Tablici 4 navedena je brojnost ženki po utvrđenim stadijima imposeksa, utvrđena prema klasifikaciji Terlizzie i sur. (1999) na lokacijama.

Tablica 4. Brojanost ženki kvrgavog volka kojima su utvrđeni stadiji imposeksa na 7 istraživanih lokacija (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo) u srednjem Jadranu.

Lokacije	<u>Stadij imposeksa</u>					Ukupno
	1	2	3	4	5	
M	0	1	0	3	9	13
L	0	0	0	6	8	14
T	0	0	0	5	2	7
SN	2	3	2	4	0	11
ST	0	0	2	5	6	13
V	0	0	1	2	11	14
Č	1	3	5	4	0	13
Ukupno	3	7	10	30	36	85

Na histološkim preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom kanalići hepatopankrassa su sadržavali stanice u kojima su bile vidljive crvene granule i stanice s vakuolama, dok su u vezivnom tkivu između kanalića bile vidljive crne granule u većim i manjim količinama, neorganizirane stanice tkiva, abnormalni lumeni kanalića te vakuolizaciju tkiva (Slika 7).



Slika 7. Uočene histološke promjene u probavnoj žlijezdi kvrgavog volka: a) crne granule između kanalića, b) abnormalni lumeni kanalića i vakuolizacija tkiva, c) crvene granule unutar stanica kanalića, d) neorganizirane stanice tkiva (HE x200) (foto: Jelena Šistov).

Rezultati morfometrijskih mjera kanalića hepatopankreasa prikazani su u Tablici 5.

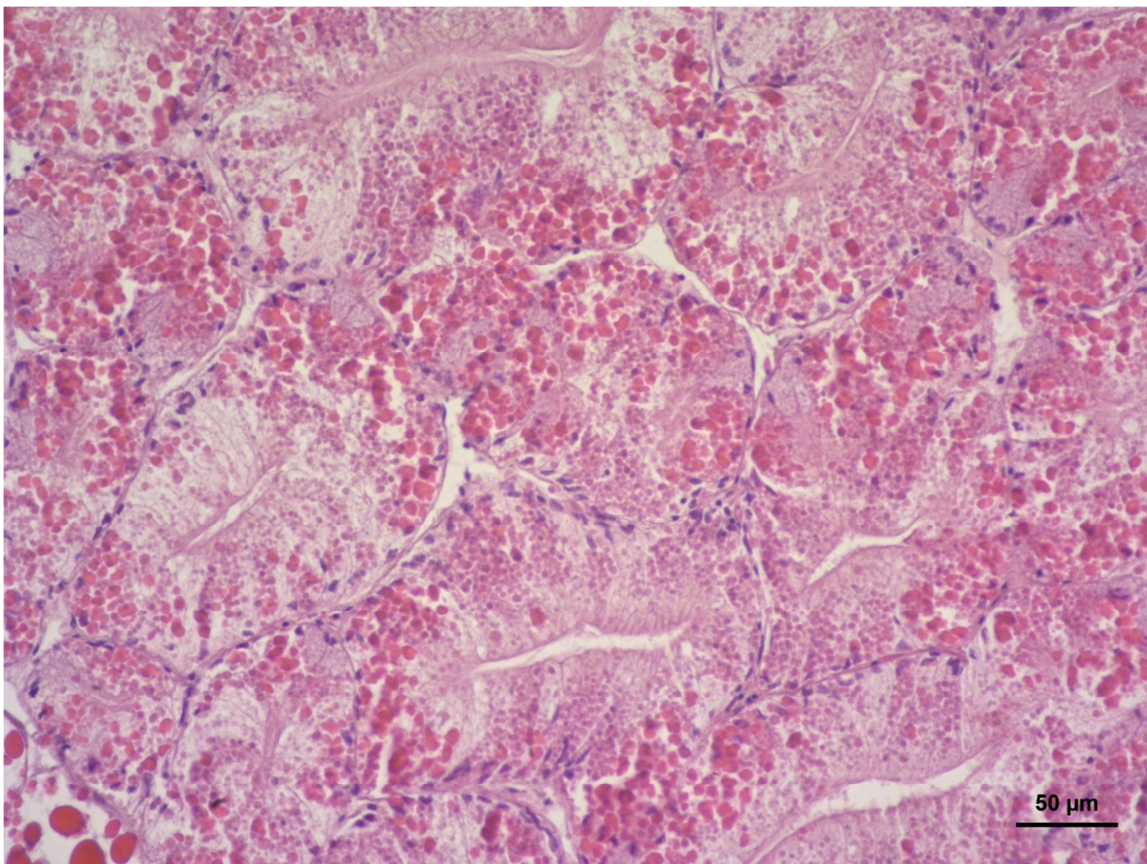
Tablica 5. Histomorfometrijske mjere kanalića u probavnim žlijezdama kvrgavih volaka u srednjem Jadranu, za svaku pojedinu lokaciju (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo).

	površina kanalića (μm^2)				površina lumena (μm^2)				visina stanica (μm)			
	srednja		standardna		srednja		standardna		srednja		standardna	
	minimum	maksimum	vrijednost	devijacija	minimum	maksimum	vrijednost	devijacija	minimum	maksimum	vrijednost	devijacija
M	7417,7	22328,2	15972,5	4338,8	123,4	909,7	415,8	208,9	35,9	69,7	55,5	10,2
L	8445,6	34997,6	17098,3	8404,6	106,4	5347,3	683,8	1054,2	37,5	83,0	54,7	13,7
T	7414,9	20574,0	15104,5	4767,0	143,3	1103,4	342,8	246,1	33,9	67,4	53,7	10,6
SN	3455,0	72831,3	19514,3	20316,6	112,0	3365,0	1119,3	944,3	18,8	116,7	49,5	29,1
ST	9449,3	30918,0	16005,7	5391,7	214,9	1945,6	539,8	349,4	38,5	85,5	54,1	10,3
V	2766,5	26140,4	14828,4	6231,0	50,1	902,6	405,5	213,6	18,8	78,9	51,5	15,1
Č	6742,2	24988,8	13820,0	5137,7	286,4	2335,5	1044,3	538,1	23,4	71,7	45,7	13,2

Neparametrijska Spearmanova korelacija nije pokazala statistički značajnu korelaciju između veličine analiziranih životinja i morfometrijskih mjera hepatopankreasa ($r_s = 0,081 - 0,126, p > 0,05$).

Nadalje, rezultati Mann-Whitney U testa pokazali su da nema statistički značajnih razlika u morfometrijskim mjerama hepatopankreasa između mužjaka i ženki kvrgavog volka, u mjerenjima površine kanalića ($U=2408, p > 0,05$), površine lumena kanalića ($U=2393, p > 0,05$) te visine epitela kanalića ($U=2434, p > 0,05$).

Pomoću Mann-Whitney U testa uspoređene su životinje prikupljene na Čiovu, za kojeg se smatra da je čišći lokalitet (manje opterećen brodskim prometom), i ostalih lokacija koje se nalaze oko Splita. Ovim testom ustanovljena je značajna razlika u morfometrijskim mjerama za površinu lumena kanalića ($U=480, p < 0,05$) i visinu epitela kanalića hepatopankreasa ($U=1005, p < 0,05$) između čisteg morskog staništa, i staništa koja su pod većim opterećenjem od broskog prometa.



Slika 8. Građa probavne žlijezde kvrgavog volka uzorkovanog na uzgajalištu Marina pokazuje smanjene površine lumena kanalića (HE x200) (foto: Jelena Šistov).

Kada je svih sedam lokacija međusobno uspoređeno, ustanovljena je statistički značajna razlika u histomorfometrijskim mjerama površine lumena kanalića (chi-square=45,175, $p < 0,05$), stoga su sve lokacije pojedinačno uspoređene. Rezultati Mann-Whitney U testa, koji pokazuju međusobno usporedbu lokaliteta, prikazani su u Tablici 6, 7 i 8.

Tablica 6. Rezultati Mann-Whitney U testa koji pokazuju razlike u morfometrijskim mjerama površine kanalića hepatopankreasa životinja prikupljenih na 7 različitih lokacija (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo) (* - statistički značajan rezultat, $p < 0,05$).

	L	T	SN	ST	V	Č
M	U=200, p=0,614	U=114, p=0,556	U=154, p=0,213	U=278, p=0,663	U=171, p=0,593	U=167, p=0,125
L		U=140, p=0,918	U=188, p=0,420	U=311, p=0,725	U=199, p=0,794	U=204, p=0,266
T			U=109, p=0,439	U=184, p=0,771	U=123, p=0,985	U=130, p=0,521
SN				U=245, p=0,276	U=171, p=0,593	U=217, p=0,752
ST					U=272, p=0,790	U=258, p=0,118
V						U=193, p=0,519

Morfometrijska mjerenja površine lumena kanalića hepatopankreasa pokazala su da su lokacije Stona i Čiova značajno različite od ostalih lokacija. Dok su lumeni kanalića na Čiovu dosta veliki (srednja vrijednost površine lumena \pm SD: $1044 \pm 538 \mu\text{m}^2$, lumeni kanalića u brodogradilištu u Trogiru (sred. vrijed. \pm SD: $342 \pm 246 \mu\text{m}^2$), uzgajalištu Marini (sred. vrijed. \pm SD: $415 \pm 208 \mu\text{m}^2$) i Splitskoj luci (sred. vrijed. \pm SD: $539 \pm 349 \mu\text{m}^2$) su bili značajno manji (Tablica 7).

Tablica 7. Rezultati Mann-Whitney U testa koji pokazuju razlike u morfometrijskim mjerama površine lumena hepatopankreasa životinja prikupljenih na 7 različitim lokacija (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo) (* - statistički značajan rezultat, $p < 0,05$).

	L	T	SN	ST	V	Č
M	U=171, p=0,217	U=93, p=0,173	U=96, p=0,05*	U=231, p=0,172	U=189, p=0,978	U=43, p=0,000*
L		U=61, p=0,005*	U=134, p=0,030*	U=329, p=0,985	U=145, p=0,094	U=66, p=0,000*
T			U=51, p=0,004*	U=88, p=0,005*	U=84, p=0,130	U=21, p=0,000*
SN				U=181, p=0,018*	U=90, p=0,005*	U=206, p=0,559
ST					U=211, p=0,129	U=102, p=0,000*
V						U=42, p=0,000*

Rezultati mjerenja visine epitela u kanalićima hepatopankreasa, pokazali su da se lokalitet na Čiovu značajno razlikuje u odnosu na većinu drugih lokaliteta. Dok je prosječna visina epitela hepatopankreasa volaka na Čiovu iznosila $45,7 \pm 13,1 \mu\text{m}$, životinje prikupljene na Stonu su imale srednju vrijednost visine epitela $49,5 \pm 29,1 \mu\text{m}$, u Trogiru $53,7 \pm 10,6 \mu\text{m}$, a na uzgajalištu Marina $55,5 \pm 10,2 \mu\text{m}$.

Tablica 8. Rezultati Mann-Whitney U testa koji pokazuju razlike u morfometrijskim mjerama visine epitela hepatopankreasa životinja prikupljenih na 7 različitih lokacija (M - Marina uzgajalište, L – Split lučica Špinut s vanjske strane lukobrana, T – Trogir brodogradilište, SN - Ston, ST – Split gradska luka, V - Vranjić i Č - Čiovo) (* - statistički značajan rezultat, $p < 0,05$).

	L	T	SN	ST	V	Č
M	U=193, p=0,497	U=117, p=0,632	U=136, p=0,083	U=255, p=0,373	U=155, p=0,325	U=130, p=0,015*
L		U=32, p=0,707	U=160, p=0,131	U=313, p=0,753	U=197, p=0,754	U=63, p=0,041*
T			U=92, p=0,161	U=192, p=0,937	U=112, p=0,659	U=95, p=0,073
SN				U=210, p=0,075	U=155, p=0,325	U=218, p=0,770
ST					U=265, p=0,682	U=210, p=0,015*
V						U=165, p=0,176

Usporedbom morfometrijskih mjera hepatopankreasa između ženki volaka koje se mogu uspješno razmnožavati (stadij 1-3) i ženki u uznapredovalom stadiju imposeksa (stadij 4-5) ustanovljena je statistički značajna razlika u površini lumena kanalića (Mann-Whitney $U=336$, $p < 0,05$). Ženke kojima je ustanovljen uznapredovali stadij imposeksa imale su manji lumen kanalića (srednja vrijednost \pm SD: $577 \pm 683 \mu\text{m}^2$) u odnosu na ženke u početnim stadijima imposeksa (srednja vrijednost \pm SD: $1022 \pm 827 \mu\text{m}^2$).

5. RASPRAVA

Od 95 analiziranih ženki kvrgavog volka kod njih 85 je zabilježena pojava imposeksa u različitim stadijima. Od toga je samo 20 uzoraka pripadalo u prva tri stadija imposeksa u kojima je još uvijek moguća reprodukcija, dok je kod njih čak 65 zabilježen teži (4. i 5.) stadij imposeksa (Terlizzi i sur. 1999) što za posljedicu ima nemogućnost reprodukcije ovih jedinki, a time i ugroženost same populacije. Bez obzira na veliku rasprostranjenost i brojne populacije ove vrste, ovakvi rezultati ugroženosti spolne reprodukcije bi u skorije vrijeme mogli dovesti do izumiranja vrste, kako navode i Furdek i sur. (2012) u svom istraživanju.

Također, usporedbom morfometrijskih mjera hepatopankreasa između ženki volka u različitim stadijima imposeksa ustanovljena je značajna razlika u površini lumena kanalića, što potvrđuje direktnu povezanost razvoja imposeksa s histološkim promjenama u probavnoj žlijezdi kvrgavog volka. S obzirom na to da je probavna žlijezda važno mjesto za sintezu vitelogenina i spolnih steroidnih hormona (Swevers i sur. 1991; Yang i sur. 2005; Li i sur. 2006) te glavni metabolički centar za proizvodnju materijala potrebnih za vremenski različite događaje mitarenja i stvaranja žumanjka (McVicar i Shivers 1985), uočene histološke promjene u probavnoj žlijezdi znače i poremećaj njezine funkcije, a samim time i funkcije spolnog sustava kvrgavog volka što za posljedicu ima i pojavu imposeksa.

U istraživanju Revathi i sur. (2013) na slatkovodnim kozicama (*Macrobrachium rosenbergii*) dokazano je da TBT smanjuje razinu vitelogenina i vitelina usporavajući vitelogenezu, narušava ravnotežu spolnih hormona i oogenezu. Isto tako uočen je utjecaj na razvoj jajnika, sazrijevanje gonada i u konačnici štetan utjecaj na samu gametogenezu. Također se navodi smanjenje sadržaja proteina i lipida u tkivima.

Iyapparaj i sur. (2013) su pokazali kako u probavnoj žlijezdi TBT uzrokuje smanjenje debljine bazalne membrane, smanjenje veličine probavnih tubula, abnormalne lumene i vakuolizaciju tkiva, kao i pojavu neorganiziranih stanica epitela. Ovakve histološke promjene su uočene i na većini uzoraka analiziranih u ovom radu, a neke od njih su prikazane na Slici 7.

Chagot i sur. (1990) navode kako TBT inducira oštećenja stanica u tkivima Pacifičke kamenice (*Crassostrea gigas*), kao što su probavni divertikuli, škrge, vezivno tkivo, bubrezi te probavne žlijezde. Histološke promjene tkiva probavne žlijezde uočene su i pri koncentracijama nižim od 2 ng/l. Na razvoj larvi vrste *Crassostrea gigas* utječe

onečišćenje morske vode veće od 20 ng/l. Također, navode kako razina oštećenja tkiva, kao i mogućnost oporavka, ovise ne samo o koncentraciji TBT-a nego i vremenu izloženosti njegovom utjecaju.

Furdek i sur. su 2012. godine objavili rezultate svog istraživanja, provedenog na 48 lokacija duž Jadranske obale od kojih su neke bile obuhvaćene i u ovom radu. Rezultati su pokazali prisutnost TBT-a na svim lokacijama, čak i na onima koje su smatrane čistima. Koncentracija TBT-a u 94% uzoraka na ispitivanim lokacijama je bila viša od maksimalne dozvoljene koncentracije popisane našim regulativama, a koja iznosi $1,5 \text{ ngL}^{-1}$. Na pojedinim lokacijama koncentracija TBT-a je bila čak i do 25 puta veća od maksimalne dozvoljene.

Rezultati ovoga rada potvrđuju prijašnja istraživanja i visoku razinu TBT-a u Jadranskom moru, budući da je utjecaj ovih štetnih spojeva i dalje vidljiv na promijenjenim histološkim tkivima probavnih žlijezda kvrgavih volaka. Osim toga, volci kao slabo pokretne pridnene vrste relativno dugog životnog vijeka i sa sposobnošću bioakumulacije, potvrdili su se kao dobri indikatori stanja u okolišu, budući da su utvrđene razlike u građi probavne žlijezde između lokacija odgovarale opterećenosti ekosustava brodskim prometom.

Usporedba morfometrijskih mjera hepatopankreasa između mužjaka i ženki kvrgavog volka nije pokazala statistički značajnu razliku. Mužjaci i ženke pokazuju podjednake histomorfometrijske promjene hepatopankreasa što znači da toksično djelovanje TBT-a ne pokazuje razlike među spolovima, nego su podjednako ugrožene i muške i ženske jedinke. Čiovo, kao čista lokacija, pokazuje značajne razlike u histomorfometrijskim mjerama hepatopankreasa u odnosu na ostale lokacije, posebice u mjerama za površinu lumena kanalića i visinu epitela kanalića hepatopankreasa. Dobiveni rezultat se može objasniti manjim antropogenim utjecajem kao i manjim plovnim prometom na lokaciji Čiovo u odnosu na ostale lokacije. Rezultati istraživanja o koncentraciji TBT-a u marinama (Furdek i sur. 2012) pokazuju da je osim broskog prometa, bitna i izloženost lokacije morskim strujama. Stoga je u najvećoj marini, po površini i broju vezova, pronađena niska koncentracija TBT-a, jer se marina nalazi u velikoj i otvorenoj uvali. Nasuprot tome, visoke koncentracije TBT-a pronađene su u dvjema malim marinama, koje se nalaze u malim i zaklonjenim uvalama s plitkim morem i malim strujanjima vode. Isto tako lokacija Čiovo na kojoj su prikupljeni uzorci se nalazi na otvorenoj obali s većim strujanjem vode u odnosu na ostale lokacije koje su smještene u uvalama i s malim strujanjem vode.

Bez obzira na ovakve razlike, ne možemo reći da je Čiovo potpuno čista lokacija jer i uzorci prikupljeni na toj lokaciji pokazuju karakteristične promjene uzrokovane TBT-om,

npr. pojavu imposeksa i histološke promjene tkiva probavne žlijezde, koje su ipak manje izražene u odnosu na ostale lokacije. Ovakvi rezultati su u skladu i s rezultatima istraživanja imposeksa kojeg su, na kvrgavom volku, proveli Prime i sur. (2006) na području srednjeg i južnog Jadrana. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali visok stupanj imposeksa u marinama i lukama, umjeren u skrovitim uvalama, ali prisutan čak i u netaknutim područjima kao što je u ovom istraživanju lokacija Čiovo.

Međusobnom usporedbom svih sedam lokacija ustanovljena je statistički značajna razlika u morfometrijskim mjerama površine lumena kanalića .

Iz rezultata (Tablica 7) je vidljivo kako lokacija Ston (SN) pokazuje statistički značajne razlike u površini lumena hepatopankreasa u odnosu na sve ostale lokacije, osim čiste lokacije Čiovo. Na osnovu takvih rezultata mogli bismo ju svrstati u čistiju lokaciju u odnosu na ostale lokacije. Lokacija Ston je udaljenija od ostalih 6 lokacija, što je vidljivo i na karti srednjeg Jadrana (Slika 4) i nalazi se na području Dubrovačko-neretvanske županije, dok ostale lokacije pripadaju području Splitsko-dalmatinske županije. Općenito je područje Dubrovačko-neretvanske županije manje plovno područje u odnosu na područje Splitsko-dalmatinske županije, što se može zaključiti i iz podataka o brodskom prometu navedenih u Tablici 1. Na osnovu razlike u plovnom prometu, a i statistički značajne razlike u morfometrijskim mjerama površine lumena između lokacije Ston i ostalih lokacija (izuzev lokacije Čiovo), možemo reći da je utjecaj plovnog prometa na lokaciji Ston znatno manji u odnosu na ostale lokacije, a samim time i toksičnog djelovanja TBT-a.

Crvene granule u stanicama kanalića hepatopankreasa i crne granule u vezivnom tkivu između kanalića vidljive na Slici 7 nisu identificirane, ali to i nije bio cilj ovog istraživanja. U velikoj količini su prisutne u većini uzoraka pa bi njihova identifikacija i razlog pojavljivanja mogli biti predmetom budućih istraživanja.

Rezultati istraživanja u ovom radu potvrđuju prisutnost TBT-a u vodama srednjeg Jadrana i njegov štetni utjecaj na morske organizme. Unatoč zabrani uporabe protuobraštajnih boja na bazi TBT-a, od siječnja 2008.godine, i danas se potvrđuje prisutnost TBT-a u vodama srednjeg Jadrana. Razlog tome je vrijeme raspadanja TBT-a u vodi koje varira od nekoliko dana do nekoliko desetaka desetljeća, a znatno je sporije u područjima sa sedimentnim dnom (Dowson i sur. 1996; Gadd 2000).

Furdek i sur. su u istraživanju iz 2012. godine, analizom uzoraka morske vode i procesa raspadanja TBT-a u vodi potvrdili uporabu protuobraštajnih boja na bazi TBT-a na jadranskoj obali i nakon njihove zabrane.

Upravo rezultati ovog rada i drugih sličnih istraživanja ukazuju na to kako treba pojačati inspekcijski nadzor protuobraštajnih brodskih sustava u Republici Hrvatskoj kao i provedbu daljnjih istraživanja zagađenosti morskog okoliša.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata histomorfometrijske analize hepatopankreasa kvrgavog volka u Jadranskom moru možemo izvesti sljedeće zaključke:

- ✓ ogranokositreni spojevi, poput TBT-a, prisutni u moru uzrokuju pojavu imposeksa i histološke promjene probavne žlijezde kvrgavog volka;
- ✓ pojava i stadij imposeksa u direktnoj je vezi s razlikama u histomorfometrijskim mjerama hepatopankreasa i histološkim promjenama u probavnoj žlijezdi;
- ✓ kao posljedica toksičnog djelovanja TBT-a na hepatopankreasu kvrgavog volka uočene su neorganizirane stanice epitela, abnormalni i povećani lumeni, vakuolizacija i nekroza tkiva, promjene u visini epitela kanalića;
- ✓ ne postoje statistički značajne razlike u morfometrijskim mjerama hepatopankreasa kvrgavog volka između mužjaka i ženki;
- ✓ lokacije s izraženijim plovnim prometom pokazuju značajno veće histološke promjene hepatopankreasa kvrgavog volka u odnosu na manje prometne lokacije: s obzirom na to da su najveće histološke promjene u građi hepatopankreasa zabilježene u Trogirskom brodogradilištu, uzgajalištu Marina, lučici Špinut te u Splitskoj luci, vidljivo je da je TBT i dalje prisutan u morskoj vodi koja je pod većim opterećenjem brodskim prometom;
- ✓ kao dvije čišće lokacije u kojima životinje pokazuju manje histoloških promjena u probavnoj žlijezdi i imposeksu istaknule su se Čiovo i Ston, što je i očekivano budući da te lokacije nemaju toliko broskog prometa te su pod utjecajem izraženih morskih strujanja.

7. LITERATURA

1. Alzieu, C., Michel, P., Tolosa, I., Bacci, E., Mee, L. D., Readman, J. W. (1991): Organotin compounds in the Mediterranean: a continuing cause for concern. *Marine Environmental Research*, **32**:261-270.
2. Antizar-Ladislao, B. (2008): Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review, *Environment International* **34**:292-308.
3. Armstrong, E., Boyd, K.G., Pisacane, T., Peppiat, C.J., Burgess, J. (2000): Marine microbial natural products in antifouling coatings. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. **16**:215-224.
4. Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., Mintoff, B. (2003): Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environment International*, **28**:743-749.
5. Axiak, V., Vella, A. J., Micallef, D., Chircop, P., Mintoff, B. (1995): Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology*, **121**:685-691.
6. Barker, G. M. (2002): *Mollusks as Crop Pests* Center for Agricultural Bioscience International Publishing, Walling-ford, Oxon, UK 441.
7. Barkidžija, M., Bušić, D., Srdoč, J. (2011): *Ekološki problemi u fokusu pomorske politike na Mediteranu*. Sveučilište u Rijeci, Pomorski fakultet Rijeka.
8. Berge, J. A., Brevik, E. M., Bjørge, A., Følsvik, N., Gabrielsen, G. W., Wolkers, H. (2004): Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *Journal of Environmental Monitoring*, **6**:108-12.
9. Borghi, V., Porte, C. (2002): Organotin pollution in deep-sea fish from the northwestern Mediterranean. *Environmental Science & Technology*, **36**:4224-8.
10. Brodogradnja, Časopis brodogradnje i brodograđevne industrije, str.414; Godina 59, Broj 2, Prosinac 2008; *Štetni brodski premazi izvan zakona*, članak prenesen iz *The MotorShip*, Sep 2008.
11. Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., Burt, G. R. (1986): The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around the south west of England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, **66**:611-640.

12. Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., Burt, G. R. (1987): The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long term field and laboratory experiments. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, **67**:525-544.
13. Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Burt, G. R. (1988): A comparison of the effectiveness of tri-n butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, **68**:733-744.
14. Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Huggett, R. J., Curtis, L. A., Bailey, D. S., Dauer, D. M. (1989): Effects of tributyltin pollution on the mud snail *Ilyanassa obsoleta* from the York River and Bay. *Marine Pollution Bulletin*, **20**:458-462.
15. Burton, E. D., Phillips, I. R., Hawker, D. W. (2004): Sorption and desorption behavior of tributyltin with natural sediments. *Environmental Science & Technology*, **38**:6694-700.
16. Caceci, T., Neck, K., Lewis, D., Sis, R. F. (1988): Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **68**:323-337.
17. Chagot, D., Alzieu, C., Sanjuan, J., Grizel, H. (1990): Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostera gigas*. *Aquatic Living Resour*, **3**:121-130.
18. Champ, M. A. (2000): A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, **258**:21-71.
19. Claudi, R., Mackie, G. L. (1998): Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, 227 str.
20. Dowson, P. H., Bubb, J. M., Lester, J.N. (1996): Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **42**:551-62.
21. Dytham C. (2003): Choosing and using statistics. A biologist's guide, 2nd edition. Blackwell Science. Melbourne.
22. Elhasni, K., Ghorbel, M., Vasconcelos, P., Jarboui, O. (2010): Reproductive cycle and size at first sexual maturity of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda:Muracidae) in the Gulf of Gabès (southern Tunisia). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, **54**:213-225.

23. Ellis, D.V., Pattisina, A. (1990): Widespread neogastropod imposex: a biological indicator of global TBT contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **21**:248-253.
24. Evans, S. M., Kerrigan, E., Palmer, N. (2000): Causes of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its use as a biological indicator of tributyltin contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **40**:121-219.
25. Fent, K. (1996): Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, **26**:1-117.
26. Fisher, W.S., Oliver, L.M., Walker, W.W., Manning, C.S., Lytle, T.F. (1999): Decreased resistance of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide. *Marine Environmental Research*, **47**:185-201.
27. Furdek, M., Vahčić, M., Ščančar, J., Milačič, R., Kniewald, G., Mikac, N. (2012): Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. *Marine Pollution Bulletin*, **64**:189-199.
28. Gadd, G. M. (2000): Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Science of the Total Environment*, **258**:119-27.
29. Garaventa, F., Centanni, E., Pellizzato, F., Faimali, M., Terlizzi, A., Pavoni, B. (2007): Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian Coast (Croatia). *Baseline/Marine Pollution Bulletin* **54**:602-625.
30. Gibbs, P. E., Bryan, G. W. (1986): Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, **66**:767-777.
31. Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L., Burt, G. R. (1987): The use of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, **67**:507-523.
32. Gibson, R., Barker, P. L. (1979): The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*, **17**:285-346.
33. Grinwis, G. C. M., Boonstra, A., Van Den Brandhof, E. J., Dormans, J. A. M. A., Engelsma, M., Kuiper, R. V., Van Loveren, H., Wester, P. W., Vaal, M. A., Vethaak, A. D., Vos, J. G. (1998): Short-term toxicity of bis (tris-n-butyltin) oxide in flounder (*Platichthys flesus*): Pathology and Immune Function *Aquatic Toxicology*, **42**:15-36.

34. Harino ,H., Fukushima, M., Kawai, S. (2000): Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**:13-9.
35. Herrera-Àlvarez, L., Fernàndez, I., Benito, J., Pardos, F. (2000): Ultrastructure of the Midgut and Hindgut of *Derocheilocaris remanei* (Crustacea, Mystacocarida). *Journal of Morphology*, **244**:177-189.
36. Hoch, M. (2001): Organotin compounds in the environment; an overview. *Applied Geochemistry*, **16**:719-743.
37. Icelly, J. D., Nott, J. A. (1992): Digestion and absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic anatomy of invertebrates. Decapod Crustacea*, **10**:147-201.
38. IMO, (1990): International Maritime Organization. MEPC Marine Environmental Protection Committee of the International Maritime Organization IMO. Background Papers and Meeting Notes. MEPC 29th-30th Sessions. IMO. London, SE1 7SR.
39. Iyapparaj, P., Revaathi, P., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Anantharaman, P., Immanuel, G., Palavesam, A. (2013): Antifouling activity of the methanolic extract of *Syringodium isoetifolium*, and its toxicity relative to tributyltin on the ovarian development of brown mussel *Perna indica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (New York, NY), **89**:231-238.
40. Landeka, T. (2009): AFS Konvencija – Međunarodna konvencija o kontroli štetnih Anti-vegetativnih sustava na brodovima. Sveučilište u Splitu, Pomorski fakultet u Splitu.
41. Lehmann, D. W., Levine, Y. F., Law, J. M. (2007): Polychlorinated Biphenyl Exposure Causes Gonadal Atrophy and Oxidative Stress in *Corbicula fluminea* Clams. *Toxicologic Pathology* (Lawrence, KS), **35**:356-365.
42. Li, K., Chen, L.Q., Zhou, Z.L., Li, E., Zhao, X.Q. i sur. (2006): The site of vitellogenin synthesis in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **143**:453–458.
43. Loizzi, R. F. (1971): Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **113**:420-440.
44. Lušić, Z., Kos, S. (2006): Glavni plovidbeni putovi na Jadranu. *Naše more: znanstveni časopis za more i pomorstvo*, **53**:198-205.

45. Macedo, M.C.C., Macedo, M.I.C. & Borges, J.P. (1999): Conchas Marinhas de Portugal (Seashells of Portugal). Editorial Verbo, Lisboa.
46. Mantecca, P., Vailati, G., Bacchetta, R. (2006), Histological changes and Micronucleus induction in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. *Histology and Histopathology*, **21**:829-840.
47. McVicar, L. K., Shivers, R. R. (1985): Gap junctions and intercellular communication in the hepatopancreas of the crayfish (*Orconectes propinquus*) during molt. *Cell and Tissue Research*, **240**:261-269
48. Mikulic, N., Orescanin, V., Legovic, T., Zugaj, R. (2004): Estimation of heavy metals (Cu, Zn, Pb) input into Punat Bay. *Environmental Geology*, **46**:62-70.
49. Morton, B. S. (1969): Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. *Proc Malacol Soc London*, **38**:301-321.
50. Morton, B. S. (1993): The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the heteromyarian form in the Dreissenidea. U: Nalepa, T. F., Schloesser, D. W. (eds.): *Zebra mussels: Biology, Impacts, and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, str. 185-216.
51. NCI Natinal Chemicals Inspectorate (2000): Organotin stabilisers in PVC- assessment of risks and proposals for risk reduction measures. Solna, Sweden: Swedish Chemicals Agency. Summary of Report, vol. **6/00**.
52. Nemenić, T.M., Leskovšek, H., Horvat, M., Vrišer, B., Bolje, A. (2002): Organotin compounds in the marine environment of the Bay of Piran, northern Adriatic Sea. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**:426-30.
53. Ohji, M., Arai, T., Miyazaki, N. (2007): Comparison of organotin accumulation in the masu salmon *Oncorhynchus masou* accompanying migratory histories. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **72**:721-31.
54. OIKON d.o.o Institut za primjenjenu ekologiju (2008): Program zaštite okoliša Splitsko-dalmatinske županije.
55. Peurača, J. (1990): Toksičnost natrij-pentaklorofenolata i njegovo djelovanje na histomorfološke i histkemijske promjene kod vrste *Dreissena polymorpha* Pall. (Mollusca, Bivalvia). Magistarski rad. Prirodoslovno matematički fakultet. Sveučilište u Zagrebu, 79 str.
56. Poppe, G.T. & Goto, Y. (1991): *European Seashells, Vol. 1 (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastrea, Gastropoda)*. Verlag Christa Hemmen, Germany.

57. Prime, M., Peharda, M., Jelić, K., Mladineo, I., Richardson, C.A., 2006: The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. *Marine Pollution Bulletin*, **52**:800-815.
58. Radwin, G. E., D'Attilio, A. (1976): *The Murex shells of the World*, Stanford University press, ISBN 0-8047-0897-5.
59. Revathi, P., Iyapparaj, P., Vasanthi, L. A., Munuswamy, N., Krishnan, M. (2013): Impact of TBT on the vitellogenesis and sex hormones in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Peranandam et al. Aquatic Biosystems*, **9**:10.
60. Santos, M. M., Ten Haller- Tjabbes, C. C., Santos, A. M., Vieira, N. (2002): Imposex in *Nucella lapillus*, a bio indicator for TBT contamination. Resurvey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *Journal of Sea Research*, **48**:217-223.
61. Stagličić, N., Prime, M., Zoko, M., Erak, Ž., Brajčić, D., Blažević, D., Madirazza, K., Jelić, K., Peharda, M. (2008): Rasprostranjenost imposeksa kod vrste *Hexaplex trunculus* u Kaštelanskom zaljevu, Jadransko more. *ACTAADRIATICA*, **49**:159-164.
62. Swevers, L., Lambert, J.G.D., Loof, A.D. (1991): Metabolism of vertebrate-type steroids by tissues of three crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **99**:35-41.
63. Tay, K. L., Teh, S. J., Doe, K., Lee, K., Jackman, P. (2003), Histopathologic and Histochemical Biomarker Responses of Baltic Clam, *Macoma balthica*, to Contaminated Sydney Harbour Sediment, Nova Scotia, Canada. *Environmental Health Perspectives* (Research Triangle Park, NC), **111**:273-280.
64. Terlizzi, A., Delos, A. L., Garaventa, F., Faimali, M. (2004): Limited effectiveness of Marine Protected Areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. *Marine Pollution Bulletin*, **48**:164-192.
65. Terlizzi, A., Geraci, S., Gibbs, P. E. (1999): Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. *Italian Journal of Zoology*, **66**:141-146.
66. Terlizzi, A., Geraci, S., Minganti, V. (1998): Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of Italy as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae). *Marine Pollution Bulletin*, **36**:749-752.
67. Trevor, A., Reader, J. (1976): Studies on the ultrastructure, histochemistry and cytochemistry of the uninfected digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca:

- Gastropoda) and on the ultrastructure of this host organ in snails infected with larval digeneans. *Parasitology Research*, **50**:11-30.
68. Vasconcelos, P., Gaspar, M.B., Pereira, A.M. & Castro, M. (2006): Growth rate estimation of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) based on mark/recapture experiments in the Ria Formosa lagoon (Algarve coast, southern Portugal). *Journal of Shellfish Research*, **25**:249-256.
69. Yang, F., Xu, H.T., Dai, Z.M., Yang, W.J. (2005): Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **142**:456-464.
70. Zarai, Z., Boulais, N., Karray, A., Misery, L., Bezzine, S., Rebai, T., Gargouri, Y., Mejdoub, H. (2011), Immunohistochemical localization of hepatopancreatic phospholipase A₂ in *Hexaplex trunculus* digestive cells. *Lipids in Health and Disease*, **10**:91.
71. Zec, D. (2014): Prometno-plovidbena studija – plovno područje Split, Ploče i Dubrovnik. Sveučilište u Rijeci, Pomorski fakultet u Rijeci.
72. <https://earth.google.com/>
73. <http://www.biolib.cz/en/image/id10195/>
74. http://www.mppi.hr/UserDocsImages/PROMET%202012%2019-3_13.pdf
75. <http://www.podvodni.hr/more/ekologija/1123-volak-i-purpura>
76. <http://suppversity.blogspot.hr/2011/06/fat-and-impotent-due-to-tributyltin-not.html>

ŽIVOTOPIS

Jelena Šistov rođena je 25. 07. 1990. u Bugojnu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu pohađala je u Šibeniku i Bugojnu, a srednju medicinsku školu , smjer: Primalja, je završila u Novoj Biloj, BiH. 2009. godine upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, smjer:nastavnički, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i završava ga 2016. godine.

Tijekom studiranja sudjelovala je na fakultetskim manifestacijama „Otvoreni dan kemije“ 2011. i 2013. godine te „Noć biologije“ 2014. godine.

Metodičku praksu nastave biologije odradila je u V. gimnaziji u Zagrebu, a Metodičku praksu nastave kemije u OŠ Retkovec u Zagrebu.