

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

KSENOESTROGENI U VODENIM EKOSUSTAVIMA

XENOESTROGENS IN AQUATIC ECOSYSTEMS

SEMINARSKI RAD

Lea Hiršl

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Goran Klobučar

Zagreb, 2009

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. KSENOESTROGENI.....	4
2.1. Estrogenski aktivne tvari.....	4
2.2. Građa estrogenskog receptora.....	5
2.3. Izvori ksenoestrogena.....	6
3. METODE DOKAZIVANJA KSENOESTROGENOG DJELOVANJA.....	8
4. PREGLED UTJECAJA KSENOESTROGENA NA VODENE ORGANIZME NAJUGROŽENIJIH SKUPINA.....	10
4.1. Beskralježnjaci.....	10
4.1.1. Mekušci.....	10
4.1.2. Rakovi.....	11
4.2. Kralježnjaci.....	11
4.2.1. Vodozemci.....	11
4.2.2. Gmazovi.....	12
4.2.3. Ribe.....	14
4.2.4. Sisavci.....	15
5. ZAKLJUČAK.....	17
6. LITERATURA.....	18
7. SAŽETAK	21
8. SUMMARY.....	22

1. UVOD

Uz živčani sustav, endokrini sustav je jedan od dva oblika komunikacije unutar organizma koji usklađuje i nadzire sve tjelesne funkcije. On prenosi informaciju otpuštajući određene tvari u krvotok koji ih pak prenosi od tkiva do tkiva. Te tvari nazivaju se hormonima. Endokrini sustav ima posebno važnu ulogu u pojedinim životnim stadijima organizma poput spolne diferencijacije prije rođenja, spolnog sazrijevanja tijekom puberteta, reprodukcije, ali i kod rasta i metabolizama. Sve nas to dovodi do činjenice da poremećaji u endokrinom sustavu imaju širok spektar posljedica među kojima su najučestaliji poremećaji u razmnožavanju.

Do poremećaja u endokrinom sustavu, odnosno do endokrine modulacije, najčešće dolazi izlaganjem pesticidima, industrijskim kemikalijama, te raznim sintetičkim spojevima koji specifično reagiraju s normalnim hormonalnim sustavom izloženog organizma. Prvi zabilježeni slučajevi endokrine modulacije uzrokovane zagađenjem datiraju i nekoliko desetljeća unazad. Već u kasnim 1930-tima primijećeno je kako su neke sintetičke kemikalije sposobne vezati se za estrogenski receptor u uterusu štakora. 1962. godine, knjiga Rachel Carson, „Silent spring“ pobudila je masovni interes za utjecaj diklordifeniltrikloretana (DDT) na stanjivanje ljuske jajeta u ptica (Slika 1.) . U ranim 1970-tima utvrdila se i prisutnost imposeksa (razvoj muških reproduktivnih organa u ženki) u raznim vrstama morskih neogastropodnih mekušaca povezanu sa prisutnošću tributilkositra (TBT).



Slika 1. Stanjene ljuske jaja ptica izloženih DDT-u. (Preuzeto iz www.scienceclarified.com)

Endokrini modulatori imaju četiri osnovna principa djelovanja:

- imitirajući steroidne spolne hormone, estrogen i androgen, vežu se za hormonski receptor i potiču unutar-stanične signalne putove
- blokiraju ili izmjenjuju sposobnost vezanja hormona za hormonski receptor
- izmjenjuju proizvodnju i razgradnju prirodnih hormona
- izmjenjuju funkciju hormonskih receptora

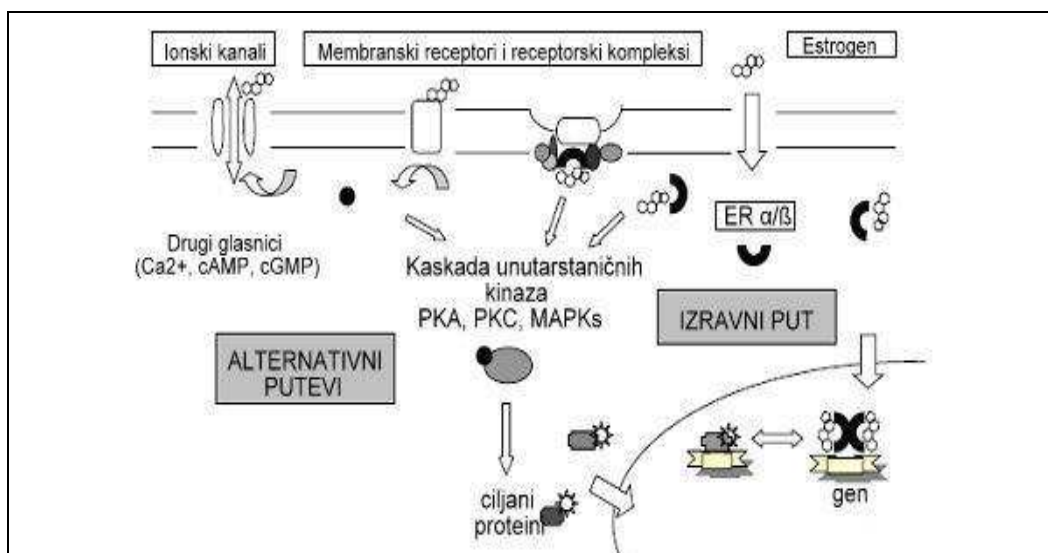
Mnogo je potencijalnih izvora endokrinih modulatora, od raznih industrijskih postrojenja, preko poljoprivrede, pa sve do nas samih. U današnje vrijeme najpopularniji predmet istraživanja među endokrinim modulatorima su *ksenoestrogeni*.

2. KSENOESTROGENI

2.1. Estrogenski aktivne tvari

Stanice tkiva na koja djeluju hormoni imaju receptore za koje se ti hormoni vežu. Prilikom cirkuliranja hormona krvotokom, stanice s receptorima ih hvataju, te dolazi do interakcije. Ovisno o tipu hormona receptori se mogu nalaziti na površini stanice ili unutar nje. Nakon interakcije hormona s odgovarajućim receptorom dolazi do raznolikih biokemijskih procesa unutar same stanice. Od svih endokrinih modulatora danas se najviše pažnje posvećuje ksenoestrogenima zbog njihove mogućnosti imitiranja prirodnog estrogena. Uz to relativno niska specifičnost estrogenskog receptora olakšava estrogensku aktivnost stranih tvari.

Pretpostavlja se da postoje dva signalna puta u djelovanju estrogena (Slika 2.). U klasičnom ili izravnom putu, estrogen se veže za receptor i taj kompleks djeluje kao transkripcijski faktor regulirajući ekspresiju gena ovisnih o estrogenu. Drugi, alternativni put, je nešto složeniji te uključuje estrogenske receptore na membrani ili čak mehanizme neovisne o receptoru.



Slika 2. Mogući signalni putevi u odgovoru stanice na prirodni ili strani estrogen. (Preuzeto i prilagođeno iz Porte i sur. 2006)

Neke od estrogenski aktivnih tvari su:

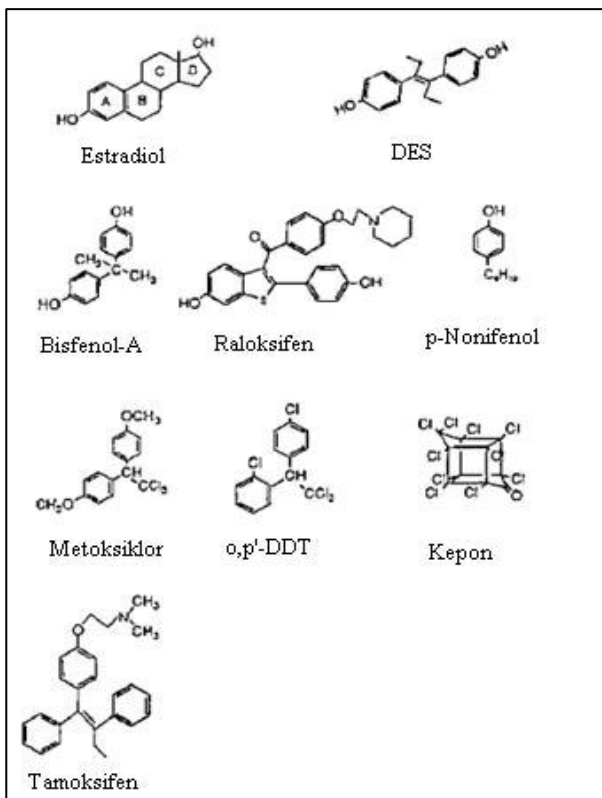
- *steroidni estrogene*: prirodni [estradiol(E_2), estriol (E_3), estrone (E_1)] i sintetički [etinilestradiol (EE_2), mestranol (MES)]
- *nesteroidni sintetički estrogene*: nonilfenol(NP), nonilfenol etoksilat(NPE), nonilfenol karboksilat (NPC), oktilfenol (OP), oktilfenol etoksilati (OPE), benzofenon (BP), bisfenol A (BPA)
- *fitoestrogene*: genistein
- *pesticidi*: endosulfan, DDT, dieldrin, alaklor, atrazin, nitrofen
- *poliklorirani bifenili* (PCB)
- *tvari za proizvodnju plastičnih masa*: ftalati
- *teški metali*: živa, kadmij, olovo

Zahvaljujući lipofilnosti i sporoj razgradivosti, mnogi ksenobiotički estrogene i njihovi metaboliti se bioakumuliraju i biomagnificiraju u raznim okolišnim osjeljcima. Biodegradacija estrogene u prirodi ovisi o raznim faktorima poput prisutnosti bakterija, temperaturi, vremenu retencije mulja, te ventilaciji. Sposobnost biodegradacije ovisi i o prirodi samog spoja. Primjerice etinilestradiol (EE_2) je puno otporniji na biodegradaciju u usporedbi s estradiolom (E_2), kao što je i nonilfenol (NP) u usporedbi s nonilfenol etoksilatom (NPE).

2.2. Građa estrogenskog receptora

Mnogi hormoni, poput estrogene i androgene, jednim se imenom nazivaju steroidima jer su svi derivati kolesterola. Svima je zajednička „steroidna“ struktura (Slika 3.) od 3 heksagonalna (A, B, C) i 1 pentagonalnog prstena (D). Do danas se za više od stotinu nesteroidnih tvari pokazalo da se vežu za estrogenski receptor i imaju estrogeno ili antiestrogeno djelovanje.

Estrogenski receptor je zbog svoje građe „promiskuitetan“. To znači da može reagirati s velikim brojem tvari koje se na prvi pogled dosta razlikuju od estrogene (Slika 3.). Zbog čega? Odgovor leži u mehanizmu vezanja supstrata za receptor. Vezna domena estrogenskog receptora u prostoru orijentirana je kao džep u kojega sjeda molekula estradiola.



Slika 3. Prikaz struktura prirodnog estradiola i nekih od najpoznatijih ksenoestrogena. (Preuzeto i prilagođeno iz: Witorsch, 2002)

Za afinitet vezanja odgovorne su kemijske interakcije između hormona i receptora. Ispitivanjem strukture estradiola uvidjelo se da je sastavljena od steroidne jezgre i hidroksilnih skupina na krajevima molekule. Jedna hidroksilna skupina nalazi se vezana na A prstenu (3-OH), a druga vezana za D prsten (17-OH). Te tri komponente su bitne za sjedanje estradiola u džep estrogenskog receptora. Prvi kontakt pri vezanju ostvaruje 3-OH skupina interagirajući s točno određenim mjestom unutar veznog džepa. U tom prvom koraku prepoznaje se slobodna fenolna konfiguracija A prstena, hidroksilna skupina vezana za nezasićeni heksagonalni prsten. 17-OH skupina koja nije dio fenola reagira s drugim

mjestom na drugom kraju džepa, dok steroidna jezgra reagira s brojnim mjestima duž srži džepa. Ukoliko strana tvar ima neke od ovih strukturnih sličnosti s estradiolom, poprimit će svojstvo ksenoestrogena i bit će sposobna vezati se za estrogenski receptor.

Uz iznimku sintetičkog estrogena DES-a (dietilstilbestrol), većina ksenoestrogena se veže slabim afinitetom, od 1/1000 do 1/1000 000 jačine vezanja prirodnog estradiola. Zbog smanjenog afiniteta vezanja za receptor ksenoestrogeni imaju slabije biološko djelovanje, ali ukoliko je njihova koncentracija dovoljno visoka njihovo djelovanje više nije zanemarivo.

2.3. Izvori ksenoestrogena

Najveći izvor otpadnih tvari, a time i ksenoestrogena, su industrijska postrojenja koja svoje otpadne vode otpuštaju u obližnja mora, rijeke ili jezera. Zbog toga su vode u blizini takvih ispusta najugroženiji ekosustav i daju veliki udio jedinki abnormalnog fenotipa. U

usporedbi s ostalim morima, Sredozemno more jedno je od najugroženijih morskih ekosustava zbog iznimno male izmjene vode s Atlantikom. Uz to još je i okruženo gusto naseljenim i izrazito industrijaliziranim područjima. Iz tog razloga su razine ksenobiotika više nego u ostalim morima i oceanima. Vršni predatori, poput pelagičkih riba i morskih sisavaca, akumuliraju velike količine organokloriranih zagađivača i toksičnih metala. U sredozemnim dupinima (*Stenella coeruleoalba*) razina tih tvari je za 1-2 reda veličine viša nego u populaciji iste vrste nastanjene u Atlantskom i Tihom oceanu (Marsili i Focardi, 1996)

Uz industrijska postrojenja, poljoprivreda je također jedan od većih izvora zagađenja ksenoestrogenima. Među prvim tvarima za koje se ustanovila sposobnost endokrine modulacije bili su pesticidi. Neki od najpoznatijih pesticida sa takvim djelovanjem su atrazin, DDT, dikofol, dieldrin, nonifenoli, te razni poliklorirani bifenili. Unatoč tome što je upotreba nekih od njih danas zabranjena, mnogi se još uvijek svakodnevno koriste u poljoprivredi jer se smatra da koncentracija u kojoj se nalaze u prirodi nije toksikološki relevantna.

Zadnjih godina i farmaceutska industrija je postala jedan od većih izvora zagađenja u vodenim ekosustavima. Nakon korištenja u kućanstvima, bolnicama ili industrijskim pogonima farmaceutski metaboliti se otpuštaju u otpadne vode. U velikom broju slučajeva te tvari se ne razgrade do kraja, pa na kraju završe u površinskim vodama. Problem je u tome što su brojni lijekovi koje generira farmaceutska industrija predviđeni za jedinke određene vrste i u određenom razvojnom stadiju, te izloženost tim lijekovima traje jedan kratak period. U vodama su prisutne jedinke različitih vrsta i razvojnih stadija te su one tim tvarima trajno izložene, ponekad i tijekom cijeloga života.

Ljudske i životinjske izlučevine također se smatraju izvorom estrogena u vodenim ekosustavima. Uz to zadnjih par desetljeća upotreba estrogena i progesterona u humanoj medicini sve više raste. U ljudi se koristi za liječenje neplodnosti, endometrioze (rast endometrijskih stanica izvan endometrija i miometrija maternice), te poremećaja menstrualnog ciklusa, dok se kod životinja koristi kao poticatelj rasta ili pri dobivanju jednospolnih populacija.

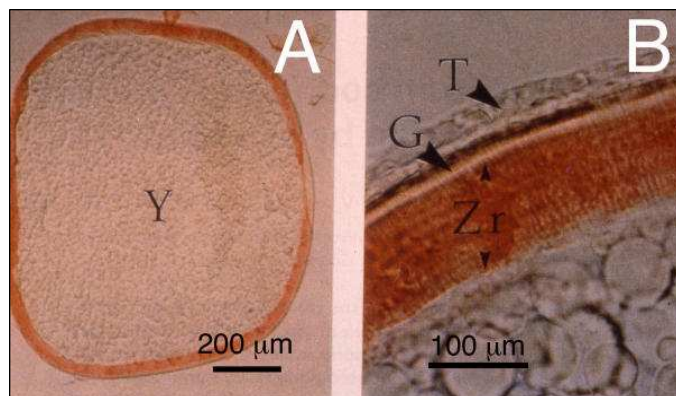
3. METODE DOKAZIVANJA KSENOESTROGENOG DJELOVANJA

Postoji široki spektar potencijalnih biomarkera koji bi se mogli primijeniti za proučavanje utjecaja endokrinih modulatora na organizme u vodenim ekoustavima.

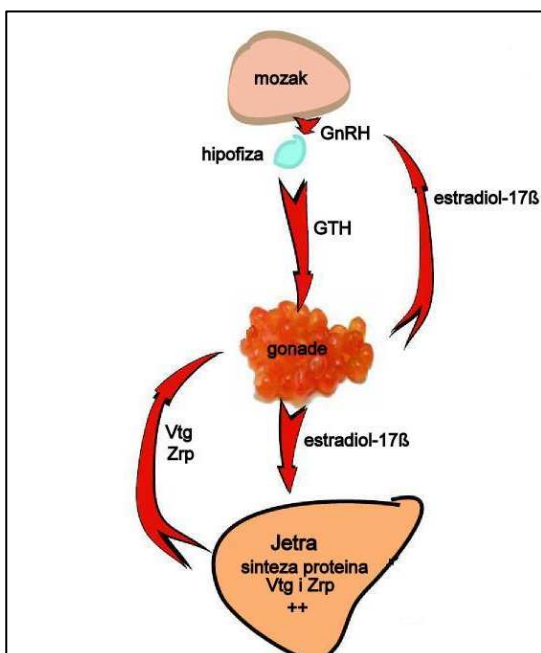
Neki od najčešće korištenih biomarkera su:

- titar hormona
- abnormalan razvoj gonada
- niska vijabilnost gameta
- smanjenje fertilitnosti
- promjene u aktivnosti nekih enzima
- razine proteina (Vtg, proteini *zone radiate*)

U današnje vrijeme najčešće se koriste metode mjerenja razine proteina vitelogenina i *zone radiate* (Slika 4.). Vitelogenin (Vtg) je prekursor žumanjčanog proteina kojeg normalno nalazimo isključivo u ženjkama. Skupa s vitelogeninom, proteini *zone radiate* (Zrp)



Slika 4. A) Oocita bakalara (*Gadus morchua*). B) Teška (T), zrnati sloj (G) i proteini zone radiate (Zr) specifično obojeni imunohistokemijskim metodama. (Preuzeto iz www.comparative-hepatology.com)



sintetiziraju se u jetri ženki riba na podražaj niske koncentracije endogenog estrogena (Slika 5.). Normalno, mužjaci i juvenilne ribe imaju ekstremno nisku koncentraciju estrogena, tako da u njima ne nalazimo te proteine u većim koncentracijama. Ipak,

Slika 5. Shematski prikaz puta sinteze vitelogenina i proteina zone radiate. (Preuzeto i prilagođeno iz www.comparative-hepatology.com)

te iste jedinice imaju sve potrebno za sintezu tih proteina pa stoga u slučaju izlaganja većim koncentracijama egzogenog estrogena dolazi do njihove sinteze. Osim za ribe, ti biomarkeri vrijede i za ostale oviparne kralježnjake, te za neke skupine beskralježnjaka. Razvijeno je nekoliko metoda kojima se može detektirati razina Vtg-a: imunološke metode temeljene na specifičnim protutijelima kao radioimunotest, ELISA, Western blot i razne imunohistokemijske metode. U uporabi se mogu naći i razni testovi poput „RNA protection assay“, analiza transkripata Northern blottingom te razne varijacije PCR-a.

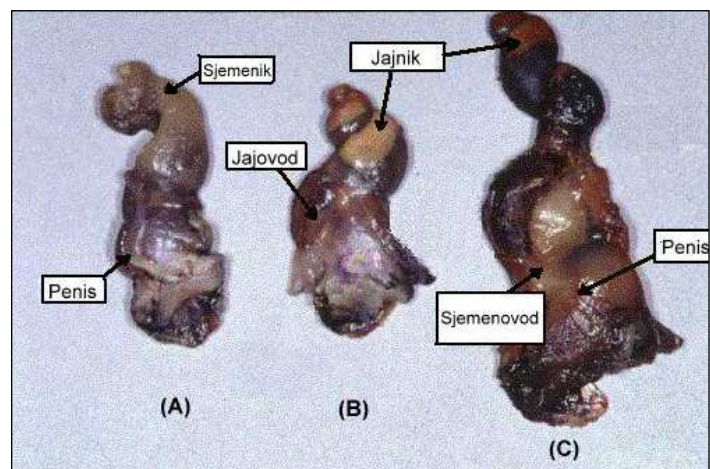
4. PREGLED UTJECAJA KSENOESTROGENA NA VODENE ORGANIZME NAJUGROŽENIJIH SKUPINA

Postoje brojni publicirani radovi koji upućuju na reproduktivne nepravilnosti u populacijama raznih životinjskih vrsta koje se povezuju ili je njihova povezanost sa endokrinim modulatorima kao uzročnicima već dokazana.

4.1 Beskralježnjaci

4.1.1. Mekušci

Danas je već poznato da izlaganje tributilkositru (TBT) dovodi do pojave imposeksa u nekim vrstama morskih puževa. Imposeks (pseudohermafroditizam) se odnosi na stanje koje nastaje stvaranjem muških reproduktivnih organa u ženskih jedinki (Slika 6.). Može se manifestirati od nastanka penisa u ženka na mjestima gdje ga normalno nalazimo u mužjaka, pa do diferencijacije sjemenovoda i struktura nalik sjemenim mjehurićima. TBT u vrlo niskim koncentracijama može inicirati diferencijaciju muških spolnih organa u genetički ženskim jedinkama jednospolnog volka (*Hexaplex trunculus*) (Garaventa i sur. 2006). Stupanj maskulinizacije može biti toliko visok da ženke više nisu sposobne za normalnu reprodukciju. TBT povišuje razinu androgena inhibirajući enzim aromatazu te na taj način sprječava aromatizaciju testosterana u estradiol.



Slika 6. (A) mušjak , (B) ženka i (C)maskulinizirana ženka(imposeks) u kamenice (*Thais clavigera*) izložene TBT-u. (Preuzeto i prilagođeno iz www.nies.go.jp)

Ekperimentalno je dokazano da izlaganje kamenice (*Crassostrea gigas*), u larvalnom stadiju, niskim dozama nonilfenola (NP) može uzrokovati promjene u omjeru spolova, hermafroditizam pa čak i smanjenje vijabilnosti (Nice i sur. 2000).

4.1.2. Rakovi

Sintetički estrogen dietilstilbestrol (DES), kao i estrogeni pesticid disulfan i polikloriranibifenili (PCB) uzrokuju zakašnjelo presvlačenje u populaciji voden-buhe (*Daphnia magna*) (Zou i Fingerman 1997). Daljnja istraživanja ukazala su da ti isti spojevi inhibiraju djelovanje enzima hitobijaze u epidermisu dekapodnog raka (*Uca pugnator*) (Zou i Fingerman 1997). Taj je enzim potreban za razgradnju hitinske kutikule, a njegova je aktivnost pod kontrolom hormona ekdisona.

Nije zanemariva ni neobično visoka učestalost pojave interseksa u kopepodnih rakova iz skupine Harpacticoida u vodama u blizini Edinburgha gdje utječu otpadne kanalizacijske vode (Moore i Stevenson, 1994). Interseks je stanje koje nastaje nakon poremećene diferencijacije gonada, a podrazumijeva postojanje tkiva jajnika i tkiva testisa u jednoj gonadi.

Istraživanja utjecaja ksenoestrogena na vodenim beskralježnjacima su od velike važnosti jer oni predstavljaju 95% poznatih vrsta životinjskog carstva i vrlo su važni za održavanje ravnoteže ekosustava. Problem je u tome što se o njihovom endokrinom sustavu ne zna ni približno toliko koliko o endokrinom sustavu kralježnjaka. Danas još nemamo dovoljno podataka o postojanju, ulozi i mehanizmu djelovanja njihovog hormonskog sustava.

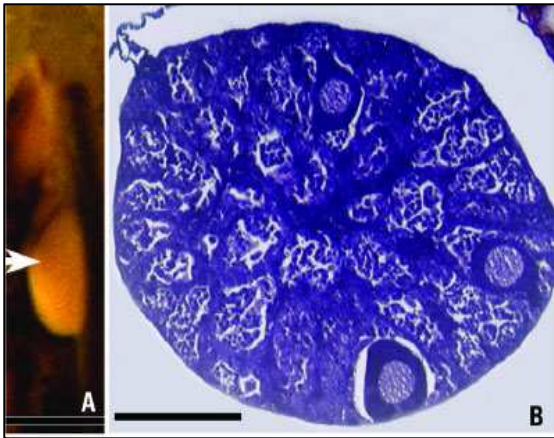
4.2. Kralježnjaci

4.2.1. Vodozemci

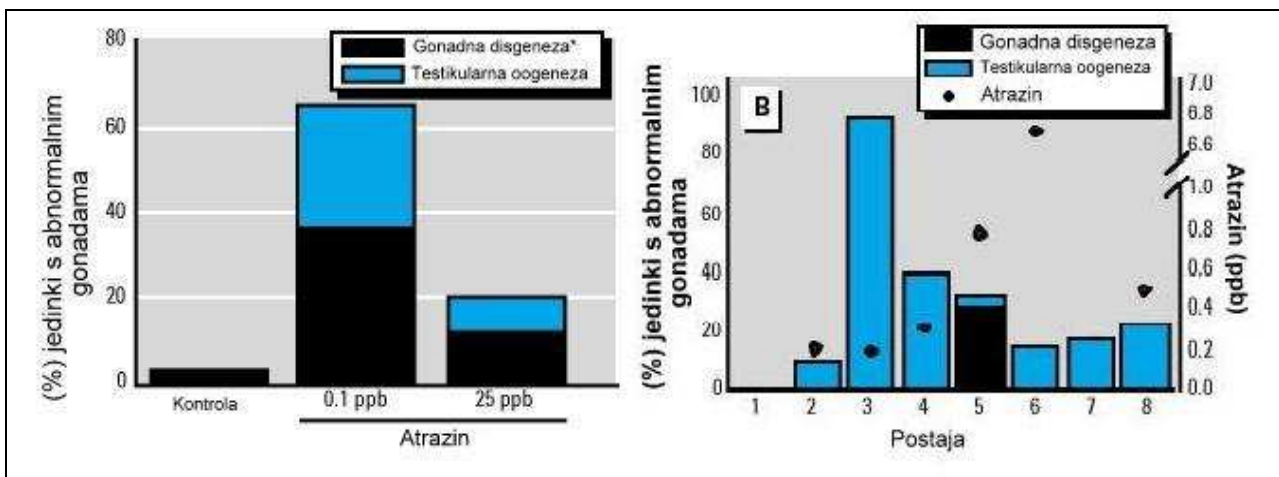
Atrazin je selektivni herbicid koji se koristi za kontrolu rasta korova u poljoprivredi. Jedan je od najzastupljenijih herbicida u svijetu. Smatra se da atrazin potiče djelovanje aromataze, enzima koji je sposoban pretvarati testosteron u estrogen. *In vitro* i *in vivo* pokusima utvrđeno je da atrazin uzrokuje pojavu hermafroditizma u afričke žabe (*Xenopus leavis*) i leopard žabe (*Rana pipiens*) (Hayes i sur. 2002). U uzorcima jedinki *R. pipiens* sakupljenih sa 8 postaja iz središnjeg i zapadnog dijela SAD-a utvrđeno je da izlaganje punoglavaca koncentracijama atrazina od 0.1 do 25 ppb uzrokuje abnormalnosti u reproduktivnom sustavu muških žaba (Slika 8.). Naime, u njihovim testisima nađene su oocite (Slika 7.). Smatra se da atrazin potiče aromatazu, enzim koji je sposoban pretvarati testosteron u estrogen. Razina testosterona u odraslih mužjaka bila je smanjena blizu 90% pri izloženosti

žaba atrazinu s 25 ppb tijekom 46 dana. Atrazin ima štetan učinak na žabe u koncentracijama višestruko nižim nego one koje nalazimo u jezerima, rijekama, potocima pa čak i u kišnici.. Do demaskulinizacije dolazi pri izlaganju koncentraciji 10 000- 30 000 puta manjoj, nego što se prethodno smatralo netoksičnim za žabe. Uz atrazin i estrogenski aktivne tvari nonilfenol i

bisfenol A uzorkuju feminizaciju populaciji u *X. Leavis* (Mosconi i sur. 2002) povećavajući tako udio ženskog fenotipa.



Slika 7. Gonada mužjaka *R. pipiens*. (A) Testis je fiksiran u Bouinovoju otopini, bijela strelica označava mjesto reza. (B) Lobule u testisu ispunjene spermamidama i 3 lobule koje sadže i spermamide i jajnu stanicu. (Preuzeto iz Hayes i sur.2003)



* Gonadna disgeneza-poremećaj u razvoju reproduktivnog sustava.

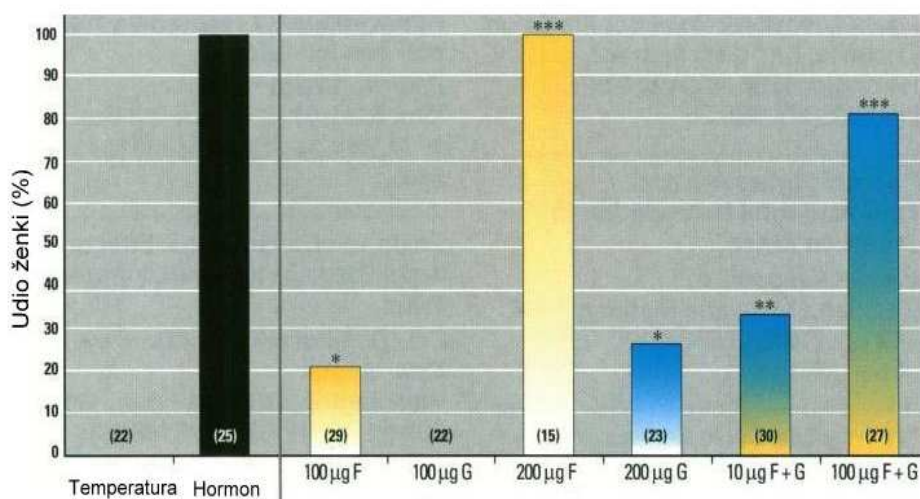
Slika 8. Ovisnost udjela jedinki s abnormalnim gonadama o koncentraciji atrazina kojemu su izložene u laboratorijskom eksperimentu (A) i na svojim vlastitim staništima(B). Oba grafa ukazuju na izuzetno štetan učinak atrazina i pri vrlo niskim koncentracijama. (Preuzeto i prilagođeno iz Hayes i sur. 2003)

4.2.2. Gmazovi

Kada govorimo o gmazovima, vjerojatno je najpoznatiji slučaj aligatora (*Aligator mississippiensis*) iz jezera Apopka u blizini Orlanda, Florida. To je jezero imalo vrlo visoki stupanj onečišćenja iz raznih izvora: poljoprivrednih otpadnih voda, kanalizacijskih voda te izljeva organokloriranog pesticida dikofola i sumporne kiseline 1980. godine. Taj dikofol bio je i kontaminiran DDT-om i njegovim metabolitima. Kao posljedica tog izljeva, populacija

aligatora u tom jezeru pala je za 90% od 1984. godine, dakle 4 godine nakon katastrofe. Na aligatorima iz jezera Apopka vršena su mnoga istraživanja. Uvidjelo se kako njihova jaja sadrže povišene koncentracije *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD (metaboliti DDT-a), dieldrina i cis-klordana u odnosu na jaja populacije iz kontrolnog jezera Woodruff. Juvenilni aligatori izlegnuti iz tih jaja imali su abnormalnu morfologiju gonada, kao i razinu spolnih hormona u usporedbi s kontrolnom skupinom. Mužjaci su imali nepravilno razvijene testise s aberantnim strukturama u sjemenim cjevčicama. U šestomjesečnih ženki također su nađene abnormalne strukture jajnika s neobično velikim brojem multinuklearnih oocita. U oba spola nađeni su abnormalni plazmatski steroidni hormoni, u mužjaka snižena razina testosterona, a u oboje povišena razina 17 β -estradiola u usporedbi s kontrolom. Testisi aligatora iz jezera Apopka proizvodili su više estradiola nego onih iz jezera Woodruff.

Istraživanja na kornjači (*Chelydra serpentina*), iz Velikih Jezera na sjeveru SAD-a, pokazala su da jaja izložena visokom zagađenju organokloriranim tvarima imaju značajno veću učestalost davanja deformiranih embrija, a i smrtnost je mnogo veća nego u kontrolnoj populaciji s manjim zagađenjem (Bishop i sur. 1995). Eksperimentalno je pokazano da određeni poliklorirani bifenili (PCB) utječu na spolnu determinaciju koja je u normalnim uvjetima kontrolirana temperaturom kod crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta*) (Crews i sur. 1995). Tretiranjem površine jaja s PCB-om dobivene su ženke na temperaturi koja inače daje mužjake (Slika 9.).

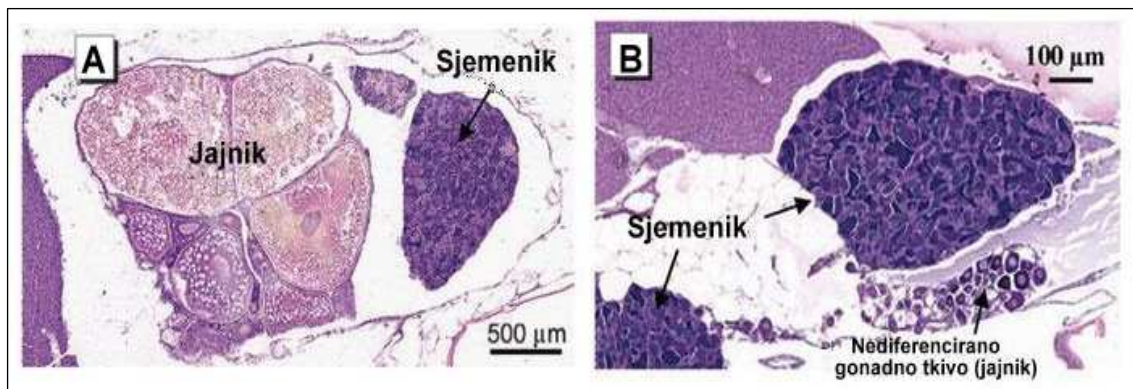


Slika 9. Udio izlegnutih ženki crvenouhe kornjače (*T. scripta*) na temperaturi koja daje isključivo mužjake (26°C) nakon tretiranja dvjema vrstama PCB-a: 2',4',6'-triklor-4-bifenilol (F) i 2',3',4',5'-tetraklor-4-bifenilol (G). (Preuzeto i prilagođeno iz Bergeron i sur. 1994)

4.2.3. Ribe

Niz istraživanja pokazao je visoku frekvenciju pojave interseksa u populaciji bodorke (*Rutilus rutilus*) u vodama zagađenim utjecanjem pročišćene kanalizacijske vode koja i nakon tretiranja često sadrži toksične organske i anorganske tvari. U interseksualnih riba pronađene su malformacije reproduktivnih vodova, njihovo začepljenje uz smanjen volumen mliječi, snižena gustoća i mobilnost spermija. Feminizirani mušjaci su imali smanjenu sposobnost fertilizacije jajašca pa je tako i uspjeh oplodnje smanjen za 75% u usporedbi s kontrolom (Jobling i sur. 2002).

Interseks je također pronađen kod još jedne slatkovodne ribe (*Margariscus margarita*) uzete iz jezera koje je eksperimentalno tretirano etinilestradiolom (EE₂) kroz period od 3 godine. Koncentracija EE₂ je bila u intervalu od 4.5-8.1 ng/L što se smatra relevantnim za okoliš (Palace i sur. 2006). Uz pojavu interseksa nađeni su još i edem jajnika i slab razvoj testisa kod izloženih riba u usporedbi s kontrolnom populacijom. Također je bio smanjen i broj jedinki starosti do jedne godine što ukazuje na smanjenu uspješnost oplodnje na populacijskoj razini. Zanimljivo je da je na isti način bila izlagana i populacija jezerske pastrve (*Salvelinus namaycush*) u koje nisu nađeni značajni poremećaji u reprodukciji i reproduktivnom sustavu, što ukazuje na razliku u osjetljivosti na EE₂ između vrsta.



Slika 10. Gonade zebreice (*D. rerio*) izložene etinilestradiolu (EE₂) u koncentraciji od 5ng/L tijekom cijeloga života. (A) Gonade sadrže i jajnik i sjemenik. (B) Gonade čine dva sjemenika i jedan još nepotpuno diferencirani jajnik. Oba stanja su primjer interseksa. (Preuzeto i prilagođeno iz Nash i sur. 2004)

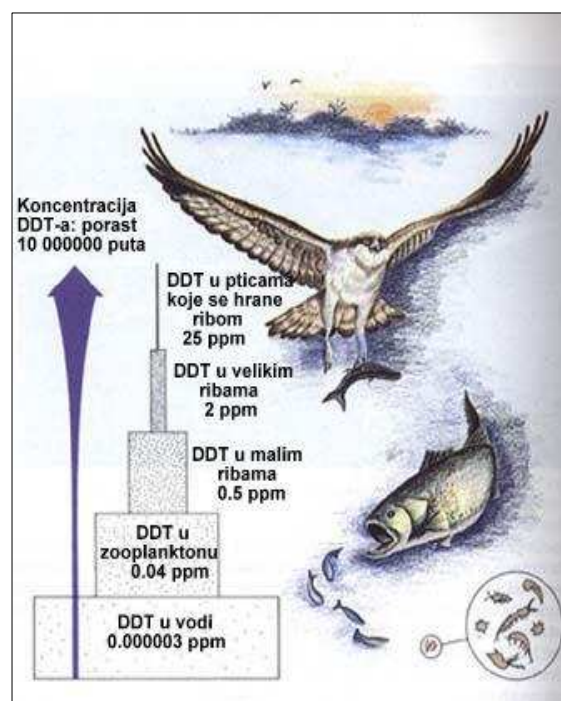
I gonade zebreice (*Danio rerio*) izložene etinilestradiolu (EE₂) u koncentraciji od 5ng/L tijekom cijeloga života su sadržavale obilježja oba spola (Nash i sur. 2004) (Slika 10.). Eksperimentalna istraživanja s malim koncentracijama EE₂ koje se nalaze u okolišu dala su slične rezultate kao u prethodno navedena dva slučaja. Mušjaci velikoglavog klena,

(*Pimephales promelas*), izloženi koncentraciji EE₂ od 0.32 i 0.96 ng/L tijekom cijeloga života imali su smanjenu sposobnost fertilizacije jajne stanice (Parrot i Blunt 2005). Slično tome, u glavočića crnotrusa (*Pomatoschistus minutus*) izloženih 7 mjeseci 6 ng/L EE₂ ili 0.3% ili 0.03% v/v kanalizacijske vode, ustanovljeno je narušeno sazrijevanje mužjaka, smanjen fekunditet u ženki i smanjena sposobnost jajašaca za oplodnju. Populacija je bila reducirana za 90% u usporedbi s kontrolom (Robinson i sur. 2003).

Uz EE₂, postoje i drugi kontaminanti koje nalazimo u vodama, a koji također mogu uzrokovati smanjenu fertilitet u riba. U tu skupinu spadaju: TBT, bisfenol A, tetrabrombisfenol A (TBBPA) i nitrati.

Ptice, unatoč tome što nisu u direktnom doticaju sa zagađenom vodom, često bivaju izloženi zagađivačima hraneći se organizmima koji su u sebi akumulirali toksine (Slika 11.). Najčešće su to ribe. Posljedično tome u ptica najčešće dolazi do stanjivanja ljuske jajeta. Danas se pretpostavlja da je razlog tomu narušen transport kalcija u ljusku zbog tvari poput DDT-a. Stanjenje ljuske jajeta i smanjena reprodukcija vjerojatno su uzrokovani organoklorinim tvarima nađenim u ptica koje se hrane ribom na Velikom Jezerima, SAD.

Slika 11. Biomagnifikacija DDT-a duž hranidbeni lanac. (Preuzeti i prilagođeno iz www.fws.gov)



4.2.4. Sisavci

Najviše istraživanja na sisavcima vršeno je na sivom tuljanu (*Halichoerus grypus*), običnom tuljanu (*Phoca vitulina*), prstenastom tuljanu (*Phoca hispida*), te na bijeloj belugi (*Delphinapterus leucas*).

Populacija običnog tuljana (*P. vitulina*) na području Waddenskog mora u Nizozemskoj zabilježila je drastičan pad, odnosno spustila se s 3000 na manje od 500 jedinki u razdoblju od 1950. do 1975. godine. Toksikološke analize vode ukazale su na povišenu

razinu polikloriranih bifenila, vjerojatno podrijetlom iz rijeke Rhine, koji su smanjili reprodukciju (Reijnders, 1986). Gotovo ista stvar ustanovljena je kod vrste bijele beluge (*D. leucas*) iz ušća St. Lawrence, Quebec, Canada, čija je populacija smanjena s nekoliko tisuća na manje od 500 jedinki (De Guise i sur. 1995). U tkivima nereproduktivnih ženki sivih (*H. grypus*) i prstenastih tuljana (*P. hispicla*) nađene su više koncentracije PCB-a i DDT-a u usporedbi s reproduktivnim kontrolnim jedinkama (Jensen i sur.1979).

5. ZAKLJUČAK

Ksenoestrogeni su heterogena skupina hormonski aktivnih tvari koje se unose u okoliš tek zadnjih 70 godina sa strane industrijskih, poljoprivrednih i kemijskih kompanija, ali i njihovih potrošača. Njihov potencijalni učinak na ljudsko zdravlje i okoliš trenutno se intenzivno istražuje. Iako postoje mnoga oprečna mišljenja da se ksenoestrogeni ne nalaze u prirodi u toksično relevantnim koncentracijama, nedavna istraživanja pokazuju da te tvari imaju snažne učinke na hormonski sustav i u izuzetno niskim dozama. Zbog toga što se izravno upleću u sustav spolnih hormona i narušavaju sposobnost reprodukcije, postoji realna zabrinutost za opstanak mnogih životinjskih vrsta. Učinak ksenoestrogena ne staje na životinjskom svijetu vodenih ekosustava već je izložen i sam čovjek. Pijući kontaminiranu vodu ili hraneći se biljkama i životinjama pri čijem se uzgoju koristila ta voda, čovjek postaje jednako ugrožena skupina. Danas se ksenoestrogeni povezuju sa naglim padom plodnosti zadnjih par desetljeća. Osim njihovog učinka na muški reproduktivni sustav koji rezultira padom kvalitete sperme (broj i vijabilnost spermija, volumen ejakulata), pripisuje im se i potencijalno djelovanje na onkogene koje dovodi do povećanja učestalosti raka testisa te raka dojke u žena.

6. LITERATURA

- Bergeron J. M., Crews D., McLachlan J. A., 1994. PCBs as Environmental Estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives* **102** (9).
- Bishop C. A., Ng P., Pettit K. E., Kennedy S. W., Stegeman J. J., Norstrom R. J., Brooks R. J., 1998. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes—St Lawrence River basin (1989–1991). *Environmental Pollution* **101**, 143-156
- Crews D., Bergeron J.M. i McLachlan J.A., 1995. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. *Environmental Health Perspectives* **103**, 73-77.
- De Guise S., Martineau D., Beland P., Fournier M., 1995. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environmental Health Perspectives* **103**, 73-76.
- Garaventa F., Pellizzato F., Faimali M., Terlizzi A., Medaković D., Geraci S., Pavoni B., 2006. Imposex in Hexaplex trunculus at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. *Hydrobiologia* **555**, 281–287.
- Guillette L. J., Edwards T. M., 2008. Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife. *American Society for Reproductive Medicine* **89**, 21–24.
- Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C., Vonk A., 2003. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 PPB in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence. *Environmental Health Perspectives* **111**, 568-575
- Hayes T., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A.A., Vonk A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide, atrazine, at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 5476-5480.
- Isidori M., Bellotta M., Cangiano M., Parrella A., 2009. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environment International* **35**, 826–829.
- Jensen, Jansson B., 1979. Number and identity of anthropogenic substances known to be present in baltic seals and their possible effects on reproduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **320**, 436-448.

- Jobling S., Coey S., Whitmore J.G., Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Beresford N., Henshaw A.C., Brighty G., Tyler C.R., Sumpter J.P., 2002. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction* **67** (2), 515-524.
- Marsili L. i Focardi S., 1996. Organochlorine levels in subcutaneous blubber biopsies of fin whales (*Balaenoptera physalus*) and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* **91** (1), 1-9.
- McKinlay R., Plant J.A., Bell J.N.B., Voulvoulis N., 2008. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* **34**, 168–183.
- Moore C.G. i Stevenson J.M., 1994. Intersexuality in benthic harpacticoid copepods in the Firth of Forth, Scotland. *Journal of Natural History* **28**, 1213-1230.
- Mosconi G., Carnevali O., Franzoni M. F., Cottone E., Lutz I., Kloas W., Yamamoto K., Kikuyama S., Polzonetti-Magni A. M., 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *General and Comparative Endocrinology* **126** (2), 125-129.
- Nash J. P., Kime D. E., Van der Ven L. T. M., Wester P. W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C. R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* **112** (17).
- Nice H. E., Thorndyke M. C., Morritt D., Steele S. i Crane M., 2000. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin* **40** (6), 491-496
- Palace V. P., Wautier K. G., Evans R. E., Blanchfiels P. J., Mills K. H., Chalanchuk S. M., Godard D., McMaster M. E., Tetreault G. R., Peters L. E., Vandenbyllaardt L., Kidds K. A., 2006. Biochemical and hystopathological effects in pearl dace (*Margariscus margarita*) chronically exposed to a synthetic estrogen in a whole lake experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25** (4), 1114–1125.
- Parrott J. L. i Blunt B. R., 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethynylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology* **20** (2), 131-141.
- Porte C., Janer G., Lorusso L.C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P., Fossi M.C., Canesi L., 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **143** (3), 303-31.

- Robinson C. D., Brown E., Craft J- A., Davies I. M., Moffat C. F., Pirie D., Robertson F., Stagg R.M., Struthers S., 2003. Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquatic Toxicology* **62** (2), 119-134.
- Reijnders P.J.H., 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* **24**, 456-457.
- Taylor M.R., Harrison P.T.C., 1999. Ecological effects on endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere* **39** (8), 1237-1248.
- Witorsch R. J., 2002. Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **36**, 118–130.
- Zou E.i Fingerman M., 1999. Effects of estrogenic agents on chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **42** (2), 185-190
- Zou E. i Fingerman M., 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water Flea (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**, 281-285.

<http://www.comparative-hepatology.com/content/2/1/4>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Xenoestrogen>

<http://www.fws.gov/Pacific/ecoservices/envicon/pim/reports/Olympia/HoodCanalEagle.htm>

<http://www.nies.go.jp/archiv-edc/english/Eibonisi.htm>

<http://www.ourstolenfuture.org/>

<http://www.scienceclarified.com/Co-Di/DDT-dichlorodiphenyltrichloroethane.html>

7. SAŽETAK

Pravilan rad endokrinog sustava neophodan je za sklad i ravnotežu unutar svakog organizma. Danas, kao posljedica zagađenja, u vodenim ekosustavima postoji velik broj tvari koje imaju sposobnost uplitanja u pravilno funkcioniranje endokrinog sustava. Mnogo je potencijalnih izvora endokrinih modulatora, od raznih industrijskih postrojenja, preko poljoprivrede pa sve do nas samih. Smatra se da su među najvažnijima ksenoestrogeni, tvari sposobne za vezanje na estrogenski receptor zbog njegove slabe specifičnosti. Ksenoestrogeni uzrokuju niz deformacija organa reproduktivnog sustava, a time i smanjenje uspješnosti oplodnje i preživljavanje potomaka u mnogih životinjskih vrsta čije je stanište kontaminirano. I sam čovjek izložen je tim tvarima, direktno, koristeći kontaminiranu vodu, ili indirektno kao dio hranidbenog lanca.

8. SUMMARY

Proper function of endocrine system is essential for inner harmony and balance of every organism. As an outcome of environmental pollution, there is a huge amount of substances in aquatic ecosystems, which are capable of interfering in function of endocrine system. There are many potential sources of endocrine modulators, industry, agriculture and even ourselves. The most significant endocrine modulators are considered to be xenoestrogens, substances capable of binding to estrogen receptor because of its low specificity. Xenoestrogens cause number of reproductive organ deformations which lead to decrease in fertility success and offspring viability of many animal species inhabiting contaminated territory. Even human population is exposed to those substances, either directly by using contaminated water or indirectly as a member of a food chain.