

Co-funded by the  
Erasmus+ Programme  
of the European Union



# Akvatična ekotoksikologija

## Aquatic ecotoxicology



Sandra Radić Brkanac i Goran Klobučar

Recenzent: Dragan Škobić

## Predgovor

Ovaj priručnik je pripremljen u okviru projekta „Development of master curricula in ecological monitoring and aquatic bioassessment for Western Balkans HEIs“ (ECOBIAS). Nadamo se da će vam pomoći u razumijevanju osnovnih koncepata Akvatične ekotoksikologije i potaknuti vas na proširivanje znanja iz tog područja, ali i na razmišljanje o krhkosti ekosistema i obavezi zaštite biosfere u kojoj čovjek nije centar, nego samo jedan mali dio.

The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Erasmus + Project No ECOBIAS\_609967-EPP-1-2019-1-RS-EPPKA2-CBHE-JP

Development of master curricula in ecological monitoring and aquatic bioassessment for Western Balkans HEIs

Co-funded by the  
Erasmus+ Programme  
of the European Union





## **SADRŽAJ:**

1. Uvod	1
1.1. Pregled antropogenog utjecaja na okoliš, temeljna načela toksikologije, povijest toksikoloških istraživanja i razumijevanje pojma toksičnosti	1
2. Pregled glavnih vrsta toksikanata i mehanizama njihova toksičnog djelovanja	8
2.1 Anorganski ioni	8
2.1.1 Metali	8
2.1.1.1 Metalne nanočestice	10
2.1.2 Anioni	11
2.2 Organski zagađivači	11
2.2.1 Ugljikovodici	13
2.2.2 Poliklorirani i polibromirani organski zagađivači	14
2.2.3 Pesticidi – organski zagađivači	15
2.2.4 Kontaminanti od rastućeg značaja za okoliš	17
2.2.5. Mikroplastika	19
3. Unos, biotransformacija, akumulacija i ekskrecija ksenobiotika	21
3.1 Opći model sudbine ksenobiotika u organizmu	21
3.1.1 Unos	21
3.1.2 Prijenos	23
3.1.3 Metabolizam (biotransformacija)	23
3.1.4 Pohrana (skladištenje)	27
3.1.5 Ekskrecija (eliminacija)	28
4. Mehanizmi otpornosti/tolerancije na metale	30
4.1 Bioraspoloživost metala u vodi	30
4.2 Unos metala	30
4.3 Pohrana metala u stanici i sekvestracija (izdvajanje)	32
5. Oksidativni stres i antioksidativni obrambeni mehanizmi	35
5.1 Oksidativni stres	35
5.2 Antioksidativni obrambeni mehanizmi	37
6. Testni organizmi	39
6.1 Biomonitoring	39
6.1.1 Biotestovi – animalni i biljni testni organizmi	40
6.1.2 Biološke reakcije okoliša	43
7. Biomarkeri u biomonitoringu	48
7.1 Biološke reakcije okoliša - analize populacija i zajednica	48
7.2 Biološke reakcije okoliša - promjene na razini organizma	50
8. Procjena okolišnog rizika od kontaminanata i ekotoksikologija za 21.stoljeće	57
8.1 Razvoj procjene okolišnog rizika od onečišćenja	57

## 1. Uvod

### 1.1 Pregled antropogenog utjecaja na okoliš, temeljna načela toksikologije, povijest toksikoloških istraživanja i razumijevanje pojma toksičnosti

Svijet se nalazi u Antropocenu. Taj termin je aktualizirao Paul Crutzen, dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 1995. g. za rad na atmosferskoj kemiji koji se odnosi na stvaranje i uništavanje ozonskog sloja. Antropocen je novo geološko razdoblje koje karakterizira intenzivni utjecaj čovjeka na Zemlju s velikim posljedicama na cjelokupnu biosferu.

Negativni antropogeni utjecaj na okoliš možemo grubo podijeliti na nekoliko glavnih načina djelovanja: onečišćenje okoliša, promjena staništa, promjena klime, introdukcija alohtonih vrsta i neplansko korištenje prirodnih resursa. To djelovanje rezultira u promijenjenim ekosistemima, smanjenoj biološkoj raznolikosti te smanjenoj količini i kvaliteti prirodnih resursa.

Čovjekov značajniji negativni utjecaj na okoliš započinje s otkrićem poljoprivrede i krčenjem odnosno spaljivanjem šuma (9 000 - 7 000 p.n.e.). Mnoštvo je vrsta nestalo ili je blizu izumiranja zahvaljujući čovjeku. Pretpostavlja se da je od velikih vrsta ribe (tuna, sabljarka i dr.) u svjetskim morima i oceanima, unatrag 50-ak godina ostalo samo 10% populacija.

S razvojem industrije u 18. i 19. stoljeću započinje novija povijest antropogenog djelovanja na okoliš gdje nastupa intenzivno korištenje prirodnih resursa koje ima za posljedicu značajan porast ispuštanja kemijskih kontaminanata, povećanu količinu otpada, značajno veći broj ekoloških akcidenata (kemijski, nuklearni, izljevi nafte) te povećano ispuštanje plinova koji stvaraju učinak staklenika i oštećuju ozonski omotač.

Danas je općeprihvaćena činjenica da onečišćenje utječe na zdravlje i preživljavanje organizama i može smanjiti biološku raznolikost. Onečišćenje utječe na zdravlje i preživljavanje organizama i smanjuje biološku raznolikost te uzrokuje proliferaciju preostalih vrsta otpornijih na utjecaj polutanata.

U razumijevanju djelovanja onečišćenja odnosno onečišćivala na okoliš i žive organizme koji ga nastanjuju pomaže nam **TOKSIKOLOGIJA** koja proučava štetne učinke kemijskih tvari na žive organizme. Pozornost se pri tome posebice pridaje ciljnim organima te promjenama koje kemikalije mogu izazvati u organizmu, proučava pretvorbu toksikanata u organizmu, tvorbu metabolita te zaštitne mehanizme.

**Toksikologija** (grč. *toxikon* = otrov) u slobodnom prijevodu znači proučavanje otrova. Kada je neki organizam otrovan, to znači da određena tvar u njemu poremećuje njegovu fiziološku ravnotežu u toj mjeri da ga više ne možemo smatrati zdravim. Smatra se da prva saznanja o toksikološkom djelovanju potiču od tvari prirodnog porijekla. Prvi takav dokument nalazimo u Egiptu (1550-1552 p.n.e. - Ebersov papirus). Ipak, jedan od najvažnijih doprinosa toksikologiji dao je švicarski liječnik i alkemičar Paracelsus (Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, 1493.-1541.) koji je svojim istraživanjima došao do slijedećeg zaključka: "Sve su tvari otrovne. Ne postoji ništa što nije otrovno. Doza je ono što razlikuje otrov od lijeka." ili skraćeno: "doza čini otrov". Taj zaključak će postati temeljnim načelom toksikologije.

Francuski liječnik španjolskog podrijetla Mateu J. Bonaventura Orfila (1787-1853.g) smatra se utemeljiteljem moderne toksikologije jer je prvi uveo sistematsko testiranje toksičnosti kemikalija (upotreba pokusnih životinja), kemijsko utvrđivanje otrova u tkivima i tjelesnim tekućinama (arsen) što su počeci forenzične toksikologije te je napisao prvi standardni udžbenik o otrovima: "Traité des poisons" (1813 g.).

Toksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem otrova i njihovim djelovanjem na živi organizam (najčešće čovjek) i usredotočuje se na učinke kemikalija na razini organizma dok se ekotoksikologija bavi učincima kemikalija na razini ekosistema (populacija, zajednica). Termin **ekotoksikologija** prvi put upotrijebio René Truhaut 1969. g. i definirao ju je kao "granu toksikologije" koja se bavi istraživanjem toksičnih učinaka onečišćivala prirodnog i antropogenog porijekla na sastavnice ekosistema (biljke, životinje, mikroorganizme) odnosno ekosistem u cjelini.

Jedan od najvažnijih događaja koji su prethodili razvoju ekotoksikologije bilo je izdavanje knjige "Silent spring" američke biologinje Rachel Carson (1907.-1964.) 1962. g čiji je naslov nagovještavao nestanak ptica i njihovog pjeva u šumama kao rezultat onečišćenja okoliša<sup>1</sup>. Knjiga posebice naglašava opasnosti od dugotrajnog korištenja perzistentnih (postojanih) organskih polutanata (POPs, engl. *persistent organic pollutants*) kao što su primjerice DDT (1,1,1-triklor-2,2-bis(p-klorfenil)etan) i PCB (poliklorirani bifenili) po okoliš. Knjiga je početak osviještenja čovječanstva po pitanju štetnog djelovanja kemikalija koje su se sve više oslobađale u okoliš i rezultira zabranom korištenja najopasnijih spojeva kao što je primjerice DDT u SAD, a kasnije i u ostatku svijeta.<sup>2</sup> DDT je bio prvi moderni kemijski pesticid. Sintetizirao ga je davne 1874. g. bez posebne namjene njemački kemičar Othmar Zeidler dok je 1939. g. Paul H. Müller iz tvrtke Geigy Pharmaceutical (Švicarska) otkrio njegovu učinkovitost kao insekticida i za to otkriće 1948. g. dobio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju. Razlog tome je što je upotreba DDT-a u slijedećih 30-ak godina (potrošeno je ~675 000 tona) spasila oko 25 (prema nekima i 500) milijuna ljudskih života od malarije. DDT je korišten u kontroli populacije komaraca koji su vektori malarije jer prenose njenog uzročnika, protista iz roda Plasmodium. Godišnje se zarazi malarijom ~230 milijuna ljudi, a više od 400 000 ljudi godišnje umire od te bolesti (WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>). DDT je kemijski vrlo stabilan, bioakumulativan i bioperzistentan te se zahvaljujući tim svojim

karakteristikama nakuplja u organizmima akumulacijom kroz hranidbeni lanac rezultirajući u smetnjama u reprodukciji i povećanju smrtnosti vršnih predatora. U piramidi biomase najčešće se broj organizama i njihova zajednička biomasa smanjuju s porastom hranidbene razine uzduž hranidbenih lanaca te se prelaskom na više hranidbene razine gubi biomasa (disanje, metabolizam) dok postojana tvar ostaje u organizmima (grabežljivcima) i tako povećava svoju koncentraciju - koncept biomagnifikacije. U znanstvenoj literaturi vrlo je dobro dokumentirano štetno djelovanje DDT-a na mnoge ptice grabežljivice i morske sisavce. Do tada se smatralo da sve kemikalije koje se otpuštaju u okoliš dospijevaju u kopnene vode i zatim u more gdje se razrjeđuju na vrlo niske koncentracije koje su neškodljive za organizme. Ta paradigma se nazivala "paradigmom razrijeđenja" koju je najbolje opisivala krilatica "razrijeđenje je rješenje" (engl. "*dilution is the solution*"). Osim putem hranidbenog lanca određena tvar se može akumulirati u organizmu i direktno iz medija koji ga neposredno okružuje (preko škrge/epitelno tkivo) što se naziva **biokoncentracija** (najčešće u vodenim organizmima).

Drugi veliki ekotoksikološki problem koji se ukazao u približno istom vremenskom periodu kao i DDT (60-ih godina prošlog stoljeća) danas poznajemo kao Minamata bolest. Taj problem započeo je 1932. g kada tvrtka Chisso Corp. počinje koristiti živin oksid te je do 1968. g. oko 27 tona žive odbačeno kao otpad u zaljev Minamata u Japanu u kojem je tada živjelo ~ 35 000 ljudi koji su se većinom bavili ribarstvom te su konzumirali velike količine ribe (~ 286 g ribe/dnevno zimi i 410 g ribe/dnevno ljeti). 1950. g. počeli su se pojavljivati prvi simptomi trovanja zbog konzumacije ribe koja je sadržavala visoke koncentracije metil-žive. Metil-živa je nastala bakterijskom aktivnošću na dnu Minamata zaljeva i dospjela putem hranidbenog lanca u ribu gdje se i akumulirala. Metil-živa je u ljudima izazvala oštećenja živčanog sustava a u ekstremnijim slučajevima i smrt, ~10 000 ljudi je imalo neku posljedicu trovanja živom dok je njih čak ~ 3 000 umrlo. 1 500 ljudi imalo je teška oštećenja živčanog sustava.

Tako su DDT i metil-živa prva zagađivala koja su postala primjer "bumerang paradigme" koja je zamijenila paradigmu razrijeđenja i koja je naglasila opasnost od akumulacije perzistentnih onečišćivala u organizmima i njihova toksičnog djelovanja. Ovi događaji bili su prvi koji su osvijestili čovječanstvo u pogledu opasnosti koje predstavlja nusproizvod civilizacije – povećano onečišćenje okoliša, te je negativan utjecaj čovjeka na okoliš stvorio potrebu za ekotoksikologijom.

**Ekotoksikologija** je sintetička znanost koja prvenstveno povezuje toksikologiju, kemiju okoliša i ekologiju. Međutim, s godinama je njen razvoj uključio i druge znanstvene discipline poput fiziologije, molekularne biologije i druge znanstvene discipline pomoću kojih se mogu istražiti učinci određenih kemikalija u ekosistemu te je izrasla u jednu od najmultidisciplinarnijih znanosti.

**Bioakumulacija** pak podrazumijeva sveukupnu akumulaciju onečišćivala u nekom organizmu iz svih izvora (voda, zrak, hrana, tlo, sediment i dr.), a ovisi o karakteristikama onečišćivala,

organizma i uvjetima koji vladaju u okolišu te predstavlja zbroj unosa, biotransformacijskih i eliminacijskih procesa unutar jedinke. Ipak, potrebno je naglasiti da je načelo biomagnifikacije kritizirano u modernoj ekotoksikologiji jer ne može uvijek objasniti velike razlike u biomagnifikaciji među vrstama iste hranidbene razine, a poznati su različiti primjeri gdje koncentracija ne raste uzduž hranidbenog lanca nego se čak i smanjuje.

Važno je razjasniti i pojam **biološke dostupnosti** koja podrazumijeva udio od ukupne količine kemikalije koja se nalazi u ekosustavu, a koji je dostupan za unos u žive organizme (što je više tvar vezana za čvrste sastavnice okoliša, manja je njezina dostupnost živim organizmima). Biološka dostupnost mijenja se ovisno o uvjetima u okolišu (fizikalnim i kemijskim svojstvima kemikalije, okoliša i samog organizma). Takve perzistentne i lipofilne tvari koje dopijevaju u organizam bivaju pretvorene u jedan ili više proizvoda putem bioloških mehanizama odnosno biotransformacijom. Ta će tematika biti detaljnije obrađena u poglavlju Unos, biotransformacija, akumulacija i eliminacija organskih polutanata.

Toksikante definiramo kao tvari koje dovode do štetnog učinka u biološkim sustavima, uzrokujući uginuće organizama ili ozbiljno narušavajući njihovu strukturu ili funkciju i narušavajući kvalitetu životne sredine i uvjete za normalan opstanak organizama. Dio toksikanata koje je sintetizirao čovjek i s kojima se živi organizmi nisu susreli tijekom svoje evolucije nazivaju se **ksenobiotici**.

Onečišćenje okoliša je svaka kvalitetna i kvantitetna promjena fizičkih, kemijskih i/ili bioloških karakteristika bitnih komponenti okoliša (voda, zrak, tlo, hrana i dr.), što dovodi do narušavanja zakonitosti u ekosustavu temeljenih na mehanizmima samoregulacije. Faktori koji određuju kretanje toksikanata uključuju njihovu polarnost i topljivost u vodi, partijski koeficijent (koeficijent udjela), tlak para i ostali npr. temperatura, brzina vjetra, cirkulacija zračnih masa, kretanje vode, vodene struje. Faktori koji utječu na sudbinu toksikanata su njihova perzistentnost u okolišu, lokalizacija (raspodjela toksikanata u organizmu), te biokoncentracija i bioakumulacija<sup>3</sup>.

S obzirom na kompleksnost načina na koji čovjek negativno djeluje na svoj okoliš **ekotoksikologija** zadnjih nekoliko desetljeća nadržava svoju prvobitnu ulogu proučavanja utjecaja toksikanata u okolišu na organizme i danas se bavi i problemima kao što je primjerice globalno zatopljenje, svjetlosno onečišćenje, mikro i nanoplastika, nanočestice, UV zračenje, sedimentacija u morima i kopnenim vodama te se njen djelokrug proučavanja proširio na proučavanje šireg područja ekološkog stresa.

Možemo govoriti o tri glavna cilja ekotoksikologije: 1.) prikupljanje dovoljne količine podataka za procjenu okolišnog rizika (POR) i upravljanje okolišem (UO), 2.) zadovoljenje zakonskih uvjeta za razvoj i proizvodnju novih kemijskih spojeva i određivanje njihovih dozvoljenih koncentracija u okolišu i 3.) razvoj empirijskih ili teorijskih principa (paradigmi) za poboljšanje znanja o ponašanju i učinku kemikalija u živim sustavima. Kako bi se zadovoljio prvi cilj,



odnosno prikupljanje podataka za POR i UO bitna je i retrospektivna i prediktivna ekotoksikologija. Retrospektivna ekotoksikologija sakuplja raspoložive povijesne podatke u razumijevanju reakcija na djelovanje toksičnih kemikalija u okolišu dok prediktivna ekotoksikologija teži predvidjeti i spriječiti negativne učinke kemikalija na prirodne populacije, zajednice i ekosisteme tako što koristi rezultate toksikološkog testiranja novih kemikalija prije njihove industrijske proizvodnje. Eksperiment koji određuje toksični učinak jedne ili nekoliko kemikalija na grupu odabranih organizama (ili stanica) iste vrste u određenim i strogo kontroliranim uvjetima koji omogućavaju usporedbu i ekstrapolaciju dobivenih rezultata na uvjete u prirodnom okolišu naziva se **test toksičnosti** ili **biotest**. Toksičnost je svojstvo (potencijal) neke tvari da izazove štetni učinak u nekom organizmu. U testiranju toksičnosti se prati određeni mjerljiv toksični učinak kemikalije. Najčešće se prati letalni učinak odnosno smrt organizma kao najjednostavnija posljedica negativnog djelovanja neke tvari, ali se u suvremenijim istraživanjima sve više prate subletalni učinci koji podrazumijevaju sve učinke toksikanata na organizam osim smrti (primjerice promjene u rastu i razvoju, razmnožavanju, ponašanju, histološke, biokemijske, fiziološke promjene i dr.).

**Toksično djelovanje kemikalije** najviše ovisi o dva parametra: njegovoj dozi odnosno koncentraciji (doza za kopnene i koncentracija za vodene organizme) te o trajanju izlaganja. Prilikom testiranja toksičnosti testni organizmi se izlažu progresivno sve većim koncentracijama/dozama ispitivane tvari te se prati određena reakcija - učinak koji se može lako kvantificirati (npr. smrt).

Doza toksikanta (mg/kg) u testu koja je letalna za 50% organizama određene vrste unutar određenog vremenskog razdoblja je srednja letalna doza (engl. *Lethal Dose*, LD50). Ukoliko je organizam bio izložen mediju koji je sadržavao toksikant (primjerice voda) tu vrijednost izražavamo kao srednju letalnu koncentraciju (LC50). Također, može se mjeriti doza ili koncentracija kod koje toksikant izaziva određeni subletalni učinak u 50% promatrane populacije (engl. *Effective Dose*, ED50 ili *Effective Concentration*, EC50). Ove vrijednosti su osnova prilikom procjenjivanja i usporedbe toksičnosti različitih spojeva.

Navedene vrijednosti srednje letalne ili subletalne doze/koncentracije se uvijek izražavaju za neki određeni vremenski period (najčešće 24, 48 ili 96h) u kojem je proveden test.

Trajanje testova toksičnosti dijelimo na akutno, subkronično i kronično gdje su kratka trajanja (akutna) primjerice 24, 48, 72 i 96 h, srednja trajanja (subkronična) npr. 8-90 dana i duga trajanja (kronična) npr. 7 d - 1 ili više mjeseci. Vremenski period ovisi o dužini života test organizma (uglavnom miš ili štakor). Kronično trajanje podrazumijeva > 1/10 života test organizma.

Vrlo bitan parametar prilikom mjerenja toksičnosti određene kemikalije svakako je razina neučinkovitosti (engl. *No Observed Effect Level* NOEL ili *No Observed Adverse Effect Level*

NOAEL). To je koncentracija ili doza testirane kemikalije pri kojoj u vremenu trajanja testa nije primijećena promjena promatranog biološkog učinka.

Treba naglasiti da su ovakva testiranja ipak donekle aproksimativna i da dobiveni rezultati ovise o mnogim faktorima osim trajanja izlaganja i doze/koncentracije. Na toksičnost određenog spoja utječu sve karakteristike organizma (biotički faktori) ili okoliša (abiotički faktori) koje djeluju na toksičnost neke kemijske tvari. Vrlo je važno naglasiti da se testiranja toksičnosti provode za jedan spoj dok u stvarnosti spojevi u okolišu prisutni u različitim smjesama koje se dinamične i čiji se sastav može brzo promijeniti.

Biotički faktori mogu biti osjetljivost vrste, spol, starost, zdravstveno stanje, genotip, uhranjenost/kondicija a abiotički fizikalno-kemijske karakteristike staništa (temperatura, kisik, pH, svjetlost, UV i dr.). Primjerice, većina spojeva će imati jači učinak pri višoj temperaturi jer je metabolizam organizma tada brži što ubrzava i djelovanje spoja (ali i biotransformacijsku te ekskrecijsku aktivnost organizma).

Prilikom ispitivanja toksičnosti prvo se provodi preliminarni test u kojem se koriste logaritamski odijeljene koncentracije (npr. 0,01, 0,1, 1, 10, 100 mg/l) u traženju raspona koncentracija u kojem se manifestira toksično djelovanje koje će se istražiti u konačnom testu koji se sastoji od kontrolne grupe organizama koji nisu izloženi ispitivanoj kemikaliji, a u istovjetnim su uvjetima kao i grupe test organizama koje su izložene ispitivanoj kemikaliji pri čemu imamo minimalno pet različitih koncentracija gdje je svaka barem 50% veća od prošle, manje koncentracije. Ukoliko je kemikalija trebala biti otopljena u nekom otapalu kako bi se mogla aplicirati, onda se mora provesti i izlaganje organizama istom otapalu u korištenoj koncentraciji. Konačni test se provodi minimalno u tri ponavljanja.

Testovi toksičnosti su osnova za donošenje toksikoloških procjena koje su temelj za sve propise o zaštiti okoliša i o zaštiti ljudskog zdravlja. Vrlo pojednostavljeno, pri ovakvim procjenama vrlo često se koristi najviša doza/koncentracija bez štetnog učinka – NOEL. Takva istraživanja toksičnosti provode se na test organizmima (obično glodavci: miš ili štakor) te je potrebno radi procjene **razine prihvatljivog rizika** napraviti ekstrapolaciju na čovjeka primjenom arbitrarnog multiplikativnog faktora ili sigurnosnog faktora (100) koji će uračunati interspecijsku razliku (primjerice 10x) ali i intraspecijsku varijaciju (također primjerice 10x). Zbog određene eksperimentalne nesigurnosti arbitrarni faktor je često i veći: 200, 500 i 1000x. O toj će tematici detaljnije biti govora u poglavlju *Testovi toksičnosti*.

Potrebno je ovdje spomenuti i hormetični učinak kada niske koncentracije toksikanta mogu u nekim slučajevima imati stimulirajući učinak (npr. pojačani rast i reprodukcija) dok se negativan učinak javlja s daljnjim rastom koncentracije.

Zadatak:

Biljke vodene leće su uzgajane u filtratu tla opterećenog teškim metalima (Tablica I). Izračunaj biokoncentracijski faktor ( $BCF = \text{koncentracija toksikanta u organizmu} / \text{koncentracija istog toksikant u vodi}$ ) za navedene metale (obрати pažnju na jedinice).

Tablica I: Sadržaj Mn, Fe i Cd u filtratu tla i u vodenoj leći.

$\mu\text{g/L}$	Filtrat vode	mg/kg	Vodena leća
Fe	35.24	Fe	282.2
Mn	15.62	Mn	196.7
Cd	0.298	Cd	0.071

Literatura:

<sup>1</sup>Carson R (2002) Silent spring. Houghton Mifflin Harcourt.

<sup>2</sup>Hellou J, Lebeuf M, Rudi M (2013) Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. Environ Rev 21(1): 53-69.

<sup>3</sup>Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2006) Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, London.

## 2. Pregled glavnih vrsta toksikanata i mehanizama njihova toksičnog djelovanja

### 2.1 Anorganski ioni

#### 2.1.1 Metali

Metali su kemijski elementi koje karakterizira sjajna površina, dobri su provodnici topline i električne energije, te generalno ulaze u kemijske reakcije kao pozitivni ioni ili kationi. Metali su najčešći biološki nerazgradivi onečišćivači. S izuzetkom radioizotopa, metali su prisutni na Zemlji od njenog postanka. Zagađenje metalima nastaje prije svega kao posljedica ljudske aktivnosti iskopavanjem i taljenjem rude, a kao rezultat raspadanja metalne rudače je relativno rijetko. U periodnom sustavu elemenata (Slika 1), metali su označeni crnim slovima. Skupine elemenata koji dijele slična kemijska svojstva nalaze se unutar pojedinih stupaca (kolona). Ako krenemo s lijeve strane periodnog sustava elemenata, nailazimo na alkalijske (s vodom daju jake lužine ili alkalije) i zemno-alkalijske (čine jake alkalije i česti su sastojci Zemljine kore) elemente koji lako gube jedan ili dva vanjska elektrona pri čemu nastaju jedno- ili dvovalentni kationi. Mnogi među njima su vrlo rašireni u površinskim vodama i u tlu u obliku stabilnih iona npr.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Slijedećih 10 stupaca čine tranzicijski metali čije jezgre (s lijeva na desno) su veće, te je puno manja tendencija da izgube vanjske elektrone, a veća da dijele elektrone s drugim elementima što dovodi do stvaranja kovalentnih veza i kompleksnih iona (npr. Cu, Fe, Co, Ni). Neki od većih atoma nastoje zadržati elektrone i ostati u elementarnom stanju (npr. Ag, Au, tzv. plemeniti metali)<sup>9</sup>.

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F		Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl		Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br		Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I		Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At		Rn	
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts		Og	

La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

**Slika 1.** Periodni sustav elemenata. Označeni su metali, nemetali i metaloidi (Izradila: S.Radić Brkanac).

Neki od tranzicijskih metala npr. Fe i Cu s varijabilnom valencijom, sudjeluju u reakcijama prijenosa elektrona. Ako je u takve reakcije uključen kisik, može doći do stvaranja toksičnih radikala kisika u većoj količini tj. do oksidativnog stresa u biljaka i životinja (taj mehanizam toksičnosti bit će pobliže opisan u poglavlju Oksidativni stres i antioksidativni obrambeni mehanizmi).

Nadalje, iza tranzicijskih metala u periodnom sustavu elemenata nailazimo na metaloide, koji pokazuju svojstva i metala i nemetala, iza čega slijede nemetali te na kraju zadnji stupac sadrži vrlo stabilne plinove, koji su gotovo potpuno nereaktivni.

Dva horizontalna reda ispod glavne klasifikacije sadrže generalno rijetke elemente serije lantanida i aktinida, koji su po svojim svojstvima metali.

Tendencija metaloida i metala blizu njih (u periodnoj klasifikaciji) da stvaraju kovalentne veze, vrlo je važna za njihovu toksičnost. Ti elementi se mogu kovalentno vezati na organske grupe, tako formirajući lipofilne spojeve i ione, npr. tetraalkilno olovo, metil-živa (metil Hg), tributilin oksid (kositrov tributil), metilirane forme arsena (metil As). Zbog njihove lipofilnosti, distribucija tih spojeva u životinjama i biljkama i njihovo toksično djelovanje razlikuje se od onog jednostavnih ionskih formi istih elemenata. Također, ti elementi mogu pokazati toksične efekte vezanjem na nemetalne konstituente makromolekula u stanici, npr. vezanje Hg, Cu, Pb i As na sulfhidrilne grupe (-SH) grupe proteina<sup>1,9</sup>.

Iako upitnog značenja, termin teški metal se redovito javlja u znanstvenoj literaturi. Taj se termin uobičajeno koristi za opis metala koji zagađuju okoliš. Kako bi se neki metal definirao kao teški, mora imati relativnu gustoću (relativnu u odnosu na vodu) veću od 5 g/cm<sup>3</sup>. No, iako su mnogi teški metali toksični, neki od njih su esencijalni, a neki kao Bi imaju vrlo nisku toksičnost. Neki od njih, npr. Al ima relativnu gustoću 1,5 g/cm<sup>3</sup> (nije teški metal) no iznimno je toksičan u kiselim jezerima zbog veće topljivosti (škrge ribe su posebno osjetljive na toksičnost uzrokovanu aluminijem). Stoga su Nieboer i Richardson (1980)<sup>7</sup> predložili klasifikaciju koja, umjesto relativne gustoće, uzima u obzir atomska svojstva metala i ponašanje metalnih iona u otopini. Prema toj klasifikaciji metali se dijele u **Klasu A, Klasu B i Granične** prema kojoj se metali razlikuju u toksičnosti. U Klasu A ubrajaju se alkalijski, zemnoalkalijski elementi, lantanidi, aktinidi i aluminij. U biološkim sustavima, ioni Klase A se dominantno vežu s ligandima koji sadrže kisik kao elektron donor (npr. u proteinima se vežu na karboksilne, karbonilne, hidroksilne, fosfatne i fosfodieterske grupe). U klasu B spadaju neki od tranzicijskih metala i metala koji se u periodnom sustavu elemenata nalaze blizu metaloida. Metalni ioni Klase B formiraju najstabilnije komplekse s ligandima koji sadrže sumpor i dušik (npr. u proteinima se vežu na sulfhidrilne, disulfidne, amino grupe i dušik u heterocikličkim spojevima). U granične elemente ubraja se prvi red tranzicijskih metala, te Ga, In, Cd, Sn i Pb ali i metaloidi Sb i As. Oni mogu formirati komplekse sa svim kategorijama liganada, ali ovisno o tome s kojom klasom graniče, ipak pokazuju veću preferenciju prema ligandima Klase A ili B.

**Tablica 1.** Primjeri nekih esencijalnih i neesencijalnih metala kao zagađivača prema podjeli u klase A, B i granični metali.

Klasa A	Klasa B	Granični
Na, K, Ca, Mg, Sr, Al	Pd, Ag, Au, Hg, Tl, Bi	Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Sn, Sb*, As*

\*metaloide

Što se tiče mehanizama toksičnosti metalnih iona, mogu se općenito podijeliti u tri kategorije: 1) blokiranje esencijalnih funkcionalnih grupa u biomolekulama, 2) „izmještanje“ esencijalnog metalnog iona u biomolekulama i 3) modifikacija aktivne konformacije u biomolekulama. Općenito, za mnoge životinjske i biljne organizme ioni Klase B su najtoksičniji (naročito Hg, Ag i Tl), zatim slijede granični ioni, a najmanji toksični su ioni Klase A.

Metali nisu biorazgradivi kao npr. neki organski pesticidi koji se mogu prevesti do manje štetnih spojeva. Stoga ih biljni i životinjski organizmi mogu detoksicirati tako da aktivne metalne ione vežu na proteine kao što su metalotioneini, fitohelatini i sl., mogu ih pohraniti u netopljivom obliku unutar stanice (unutarstanične granule/vakuola/stanični zid), ili ih mogu izlučiti<sup>9</sup> (detaljnije u poglavlju Unos, biotransformacija, akumulacija i eliminacija organskih polutanata).

Kao što je već spomenuto, mnogi od metala ubrajaju se u esencijalne elemente (makro- i mikronutrijenti). Esencijalni elementi su oni koji su organizmu neophodni za rast i normalnu reprodukciju. Osim C, H, O, N, P i S, životinjama i biljkama su esencijalni Ca, K, Mg. Životinjama su još kao makronutrijenti potrebni Na i Cl. Esencijalni mikronutrijenti za biljke i životinje su Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Ni, za životinje su još I, Se, Cr, V i F, a za biljke B, Cl i Si. Neesencijalni metali kao što su Hg i Cd, osim što su toksični, mogu uzrokovati manjak esencijalnih elemenata zbog kompeticije u aktivnim mjestima u biološki važnim molekulama.

### 2.1.1.1 Metalne nanočestice

Nanočestice metala i metalnih oksida se proizvode dodatkom reducirajućih odnosno oksidirajućih/precipitirajućih agenasa tijekom njihove sinteze. Obzirom na površinu, optička, termička i električna svojstva, čestice metala i metalnih oksida nanometarskih dimenzija pokazuju različita fizikalno-kemijska svojstva od onih mikrometarskih dimenzija. Upravo zahvaljujući jako izraženim električnim i magnetskim svojstvima, te su čestice među najčešće korištenim nanočesticama. Poznat je veliki potencijal nanočestica u polju nanomedicine koja uključuje njihovu upotrebu za specifično prepoznavanje tumorskih stanica i medicinsko oslikavanje. Širokom upotrebom nanočestica metala i metalnih oksida, dolazi do njihovog namjernog ili slučajnog oslobađanja u okoliš s različitim posljedicama.

Za reaktivnost nanočestica s biomolekulama odgovorno je nekoliko čimbenika koji uključuju veličinu nanočestica, oblik, površinska svojstva, stupanj čistoće, stabilnost i metodu sinteze.

Iako je mehanizam toksičnosti tih nanočestica još uvijek u potpunosti nepoznat, može se pripisati stvaranju reaktivnih oblika kisika (engl. *Reactive Oxygen Species* - ROS), iako različite transformacije (kemijske, fizikalne, biološki posredovane i one posredovane interakcijama s makromolekulama) nanočestica u okolišu bitno utječu na njihovu sudbinu, transport, biodostupnost i u konačnici na njihovu toksičnost na biotu. Neki procesi transformacije npr. adsorpcija mogu povećati toksičnost i postojanost nanočestica metalnih oksida u okolišu, dok primjerice agregacija obično smanjuje koncentraciju nanočestica u suspenziji te povećava vjerojatnost njihovog taloženja i time može dovesti do smanjenja toksičnosti<sup>1</sup>.

### 2.1.2 Anioni

Određeni anorganski zagađivači, poput nitrata i fosfata, nisu posebno toksični, no mogu uzrokovati probleme u okolišu obzirom da se upotrebljavaju u velikim količinama. Dušična gnojiva se naširoko upotrebljavaju u poljoprivredi. Tijekom perioda rasta agrokultura, biljke korijenom apsorbiraju većinu gnojiva. Nakon prestanka rasta, tijekom raspadanja mrtvog biljnog materijala dolazi do oslobađanja nitrata u tlo odakle ti spojevi nadalje mogu dospjeti u okolne vodotoke. Porast dostupnog dušika u vodama može dovesti do porasta biomase algi tj. do eutrofikacije koja najzad dovodi do nedostatka kisika (jer mikroorganizmi razgrađuju mrtve alge). Slične probleme s eutrofikacijom mogu izazvati i fosfati kada se koriste kao gnojiva. No, fosfati u sastavu deterdženata mogu dovesti i do većih problema u okolišu.

## 2.2 Organski zagađivači

Pod pojmom organske molekule podrazumijevaju se spojevi koji sadrže ugljik (osim jednostavnih molekula poput CO<sub>2</sub> i CO). Ugljik stvara stabilne spojeve (planarne i prstenaste) s ugljikom (dijamant, grafit), vodikom (ugljikovodici), kisikom i dušikom. Molekule izgrađene samo od ugljika ili od ugljika i vodika imaju nisku polarnost (slabi naboj) i posljedično su slabo topljive u vodi. Ugljikovi spojevi koji sadrže funkcionalne grupe kao OH, HCO i NO<sub>2</sub>, visoko su polarni (jaki naboj) i zato im je i reaktivnost puno veća.

Ponašanje organskih molekula je ovisno o njihovoj molekularnoj strukturi - veličini, obliku i prisutnosti funkcionalnih grupa, što određuje njihovu metaboličku sudbinu i toksičnost. Stoga je vrlo bitno znati strukturu zagađivača kako bi mogli predvidjeti što će se s njima desiti u okolišu. Zagađivači koji će ovdje biti opisani su prije svega tvari nastale antropogenim djelovanjem koje su prisutne u prirodnom okolišu tek od prošlog stoljeća. To je, u evolucijskom smislu, vrlo kratko vrijeme te je zbog toga i ograničena sposobnost organizama da razviju ili

prilagode obrambene mehanizme protiv toksičnih učinaka tih zagađivača (osim već postojećih mehanizama koji štite od prirodnih ksenobiotika). U tom smislu, antropogeni zagađivači se razlikuju od anorganskih zagađivača i jako toksičnih prirodnih ksenobiotika (npr. nikotin, piretrini, rotenon – biljni produkti visoko toksični za insekte). Aromatski ugljikovodici čine poseban slučaj obzirom da su ti spojevi prisutni od pojave biljaka na Zemlji odnosno njihov nastanak je povezan sa sagorijevanjem organske tvari (kao rezultat šumskih požara izazvanih vulkanskom lavom). Njihova se količina (kao i metala) povećava ljudskom aktivnošću (sagorijevanje ugljena, benzina)<sup>9</sup>.

Mnogi od organskih zagađivača su vrlo postojani u okolišu tj. vrlo se sporo raspadaju pa se stoga nazivaju **Postojani Organski Polutanti** (engl. *Persistent Organic Pollutants - POPs*). POPs su najčešće halogeni derivati organskih tvari te su stoga vrlo topljivi u lipidima. Zbog toga imaju visok stupanj bioakumulacije, posebno u masnom tkivu, a zbog svoje postojanosti mogu se transportirati na velike udaljenosti (zbog svojstva djelomične hlapljivosti nalaze se u parnoj fazi ili se apsorbiraju na čestice u atmosferi). Godine 2001. je u Stockholmu održana konvencija međunarodne zajednice o POP na kojoj je raspravljano o utjecaju tih zagađivača na biotu i okoliš s namjerom da se smanji ili strogo zabrani proizvodnja postojanih organskih spojeva. Stockholmska konvencija je usvojena od strane Programa za okoliš Ujedinjenih naroda 2001.g, a stupila je na snagu 2004. g. Prvotno je na listi bilo samo 12 tvari štetnih i toksičnih za okoliš i ljudsko zdravlje: aldrin, klordan, DDT, dieldrin, endrin, heptaklor, heksaklorbenzen, mireks i toksafen, PCB, poliklorirani benzodioksini (PCDD), poliklorirani dibenzofurani (PCDF). Otada je lista proširena pa danas uključuje policiklički aromatski ugljikovodici (engl. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons** – PAH) i druge tvari: klordekon,  $\alpha$ -heksaklorocikloheksan (HCH) i  $\beta$ -HCH, lindan, heksabromodifenileter (heksaBDE), heptaBDE, pentaklorobenzen, tetrabromodifenileter, perfluorooktansulfonska kiselina, heksabromociklododekan, endosulfani<sup>10</sup>.

Na temelju njihovog štetnog utjecaja na okoliš POPs se mogu svrstati u četiri glavne skupine:

- pesticidi - sredstva za zaštitu bilja od štetočina, suzbijanje nametnika na ljudima i životinjama te štetnicima u urbanom okruženju, za zaštitu drva i tekstila i dr.
- halogeni derivati ugljikovodika - sredstva za čišćenje i odmašćivanje u metalnoj, metaloprerađivačkoj i tekstilnoj industriji
- PAH koji se ispuštaju u atmosferu procesom izgaranja goriva
- dioksini i furani koji se ispuštaju u atmosferu pri nepotpunom izgaranju goriva iz stacionarnih ili mobilnih izvora te pri termičkoj obradi otpada

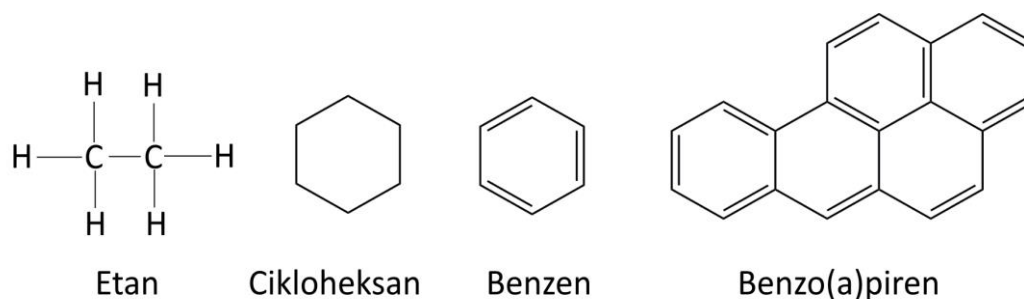


## 2.2.1 Ugljikovodici

Ugljikovodici (CH) su uglavnom tekućine i krutine, no neki npr. metan, etan i etilen (eten) su pri normalnoj temperaturi i tlaku plinovi. Slabo su polarni i slabo topljivi u vodi, ali su dobro topljivi u uljima i većini organskih otapala. Razlikuju se tri velike skupine:

- 1) zasićeni CH (atomi ugljika su vezani samo jednostrukom kovalentnom vezom) koji mogu biti aciklički i ciklički npr. cikloalkani koji imaju jedan prsten,
- 2) nezasićeni CH - atomi ugljika su vezani s dvije (alkeni) ili tri kovalentne veze (alkini),
- 3) aromatski CH (areni) koji sadrže barem jedan aromatski prsten. PAH su ravne molekule sastavljene od tri ili više direktno vezanih benzenskih jezgri.

Glavni izvor CH su naslage petroleja i prirodnih plinova (fosilna goriva) u Zemljinoj kori (biljni i životinjski ostaci uglavnom iz razdoblja karbona). Iako aciklički CH prevladavaju u tim naslagama, sirova (neprerađena) ulja sadrže značajne količine PAH koji također nastaju nepotpunim sagorijevanjem organskih materijala poput ugljena, naftnih produkata, drveta, zatim pušenjem (dim), pripremanjem hrane na roštilju (npr. antracen, fenantren, benz(a)piren). Glavni izvor zagađenja sa CH predstavlja sagorijevanje fosilnih goriva (upotreba smeđeg ugljena u dijelovima istočne Europe) i izlivanje sirovih (neprerađenih) ulja (mrlje nastale izlivanjem tankera)<sup>9</sup>. Neki primjeri CH su prikazani na Slici 2.



**Slika 2.** Strukture pojedinih ugljikovodika – primjer acikličkog alkana, cikloalkana, najjednostavnijeg aromatskog ugljikovodika i policikličkog aromatskog ugljikovodika (S. Radić Brkanac-ChemDraw).

Mnogi PAH-ovi su mutageni, karcinogeni i teratogeni za sve organizme, uključujući i akvatičke organizme. Ulaskom u stanicu, lipofilni PAH se obično vežu na transkripcijski faktor aril-hidrokarbon receptor (engl. *Aryl hydrocarbon Receptor* - AhR) te novonastali kompleks ulazi u jezgru i dovodi do ekspresije gena koji kodiraju za enzime citokrom P450 (CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 gena). Ti enzimi najčešće metaboliziraju PAH u druge, manje toksične metabolite, a nekad stvaraju i reaktivnije intermedijere koji se mogu vezati na DNA i dovesti do mutagenih

učinaka<sup>1</sup>. Biotransformacija organskih zagađivača će detaljnije biti opisana u poglavlju Unos, biotransformacija, akumulacija i eliminacija organskih polutanata.

## 2.2.2 Poliklorirani i polibromirani organski zagađivači

**Poliklorirani bifenili (PCB)** predstavljaju skupinu sintetskih organokloriranih spojeva. To su stabilne, nereaktivne viskozne tekućine niske hlapivosti koji su se koristile kao maziva, tekućine za hlađenje u električnim transformatorima i vakuum pumpama, kao plastifikatori u bojama i sl. Raspadaju se polako, topljivi su u mastima i uljima te se mogu nakupljati u tkivu organizama u visokim koncentracijama (bioakumulacija). Proizvodnja i uporaba PCB-a je određenim zakonskim aktima ograničena u većini zemalja, dok je u nekima u potpunosti zabranjena. Primjeri komercijalnih produkata tj. smjesa su Aroclor 1254, Aroclor 1260, Clophen A60 (dvije zadnje brojke u nazivu odnose se na postotak klora u smjesi).

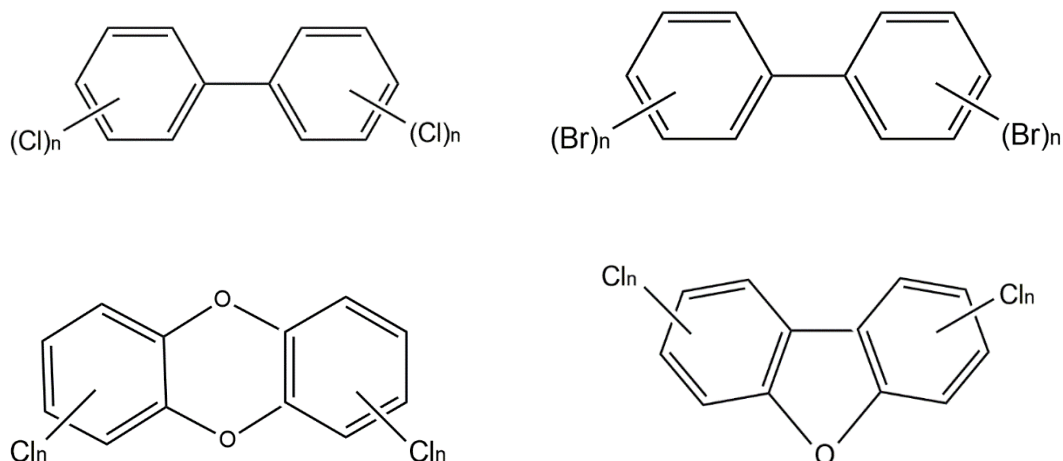
Glavni izvor zagađenja predstavlja industrijski otpad i nepropisno odlaganje PCB-a. Dokazano je da PCB-i mogu poremetiti endokrinu homeostazu organizma, negativno utjecati na njihovu reprodukciju te da djeluju neurotoksično i genotoksično. Stupanj toksičnosti pojedinog PCB-a dosta ovisi o poziciji i broju supstituiranih atoma klora, pri čemu se planarni PCB-i koji u orto položaju nemaju klor smatraju toksičnijima.

**Poliklorirani benzodioksini (PCDD)** ili skraćeno dioksini su kemijski stabilni spojevi, slabo topljivi u vodi, a bolje topljivi u organskim otapalima (lipofilni spojevi). PCDD se ne proizvode komercijalno, već su nusprodukti koji nastaju tijekom sinteze drugih spojeva npr. herbicida. Također nastaju tijekom sagorijevanja PCB-a u interakcijom klorofenola tijekom odlaganja industrijskog otpada. Ostatci PCDD su široko rasprostranjeni u okolišu (naročito u akvatičkom okolišu), iako su detektirani u ribama u relativno niskim koncentracijama. Slično drugim aromatskim ugljikovodicima (PAH, PCB, dibenzo-furanima), toksičnost dioksina povezana je s njihovim velikim afinitetom za vezanje na specifični protein AhR koji je povezan s ekspresijom velikog broja gena koji kodiraju za enzime I i II faze (biotransformacija). Osim što imaju negativan na rast organizma i razvoj središnjega živčanog sustava, također su snažni mutageni i kancerogeni.

**Poliklorirani dibenzofurani (PCDF)** su spojevi koji su slični dioksinima, strukturno i po načinu nastanka tj. ne se proizvode komercijalno, već su neželjeni nusprodukti koji nastaju tijekom sinteze drugih spojeva.

**Polibromirani bifenili (PBB)** su polibromirani analozi PCB-a kojima su slični strukturno i svojstvima (lipofini su, stabilni, nereaktivni). Kao i neki smjese PCB-a, neki kongeneri su vrlo postojani u organizmu i imaju dugo vrijeme poluraspada. Koriste se kao sastojci u sredstvima za gašenje požara. Vjerojatni su kancerogeni.

## Glavne klase toksikanata



**Slika 3.** Osnovne strukture polikloriranih bifenila – PCB (gore lijevo), polibromiranih bifenila – PBB (gore desno), polikloriranih benzodioksina – PCDD (dolje lijevo) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF) (S.Radić Brkanac-ChemDraw).

### 2.2.3 Pesticidi – organski zagađivači

U okviru ovog podpoglavlja biti će spomenuto nekoliko velikih grupa pesticida kao što su organoklorni insekticidi, organofosforni pesticidi, piretoridi, karbamati i neonikotinoidi.

**Organoklorni insekticidi** su relativno velika grupa insekticida raznolikih struktura, svojstava i upotrebe, no mogu se ugrubo podijeliti na tri glavna tipa:

- DDT (diklorodifeniltrikloroetan) i slične tvari
- klorirani ciklodienski insekticidi npr. heptaklor, aldrin, dieldrin
- heksaklorocikloheksani (HCH) npr. lindan

Organoklorni insekticidi su stabilne krutine, visoko lipofilni spojevi slabo topljivi u vodi te djeluju neurotoksično. Neki od njih su vrlo postojani u originalnom obliku ili u obliku svojih stabilnih metabolita. Povijest sinteze DDT-a je opisana u poglavlju *Uvod*. Taj se insekticid niz godina koristio u poljoprivredi, u kontroli bolesti koje prenose insekti i u kontroli ekto parazita domaćih životinja odnosno u kontroli insekata općenito. DDT je umjereno toksičan za kralješnjake (LD50 113-450 mg/kg). No, u određenih vrsta ptica njegov metabolit p,p'-DDE (diklorodifenildikloroeten) dovodi do stanjivanja i krhkosti ljuske jaja pri vrlo niskim dozama. Drugi glavni metabolit je p,p'-DDD (diklorodifenildikloroetan). DDT je od 1945.g. bio široko dostupan u SAD te se preporučivao kao vrlo učinkovit pesticid. Međutim, 1972.g je upotreba DDT-a zabranjena u SAD zbog njegovog utjecaja na zdravlje ljudi i divlje životinje (ptice) te općenito na okoliš (posebno nakon izlaska knjige *Silent Spring* R. Carson 1962.g.). Klorirani ciklodienski insekticidi su se počeli upotrebljavati 50-tih godina prošlog stoljeća, no i neki od njih su vrlo postojani u okolišu i vrlo su toksični za beskralježnjake i kralježnjake. Zbog

spomenute postojanosti, organoklorni insekticidi imaju sposobnost bioakumulacije i biomagnifikacije u akvatičkim i terestrijalnim prehrambenim lancima.

**Organofosforni pesticidi** su po kemijskom sastavu organski esteri fosforne kiseline, i uglavnom dolaze u obliku tekućina lipofilnog karaktera, no polarniji su u komparaciji s organoklorinim insekticidima. Također, akutna toksičnost organofosfornih spojeva je veća nego organoklorinim spojevima, no manje su postojani u okolišu odnosno tj. brže se raspadaju nego organoklorinim spojevi. Prije svega se koriste kao insekticidi, no neki od njih se koriste kao kao kemijsko oružje (nervni plin), a neki se koriste kao usporivači plamena (retardanti). Neurotoksično djelovanje organofosfonih spojeva zasniva se na njihovoj sposobnosti da inhibiraju enzim acetilkolin esterazu (AChE) fosforilacijom čime dolazi do ometanja prijenosa živčanog impulsa. Obzirom da je većina tih spojeva toksična za ljude i životinje, predstavljaju zdravstveni rizik i problem u okolišu. Neki od njih nisu toksični, no njihovi glavni metaboliti npr. oksoni jesu. Apsorbiraju se putem dišnog sustava i kože, kao i putem hrane (topivi su u masnoćama). Primjeri široko korištenih organofosfornih spojeva uključuju malation, paration, metilparation, klorpirifos, diazinon, terbufos. Osim u poljoprivredi, koriste se u kontroli insekata npr. za zaprašivanje komaraca.

**Piretroidni insekticidi** su krutine slabo topive u vodi, a iskazuju neurotoksično djelovanje slično kao DDT. Sintetizirani su na temelju prirodnog piretrina koji ima insekticidno djelovanje a pronađen je u cvjetovima krizantema (*Chrysanthemum* spp.). Piretroidi su stabilniji od piretrina, ali u odnosu na druge insekticide relativno se brzo razgrađuju. Međutim, mogu se vezati na čestice u tlu i sedimentu što utječe na njihovu postojanost u okolišu. Koriste se i u kontroli insekata koji su vektori bolesti (npr. bolesti spavanja).

**Karbamatni insekticidi** su derivati karbamatne (aminokarboksilne) kiseline razvijeni nakon organoklorinim i organofosfornim insekticidima te je prvi takav insekticid upotrijebljen 1956.g. Ova skupina spojeva koristi se ne samo za uništavanje insekata, larvi i nematoda, nego i puževa. Primjeri uključuju karbaril, karbofuran, aldikarb, metomil i dr. Mehanizam toksičnosti je sličan kao kod organofosfornih spojeva tj. inhibiraju AChE i uzrokuju pretjeranu stimulaciju nervnog sustava. No, kao i organofosforni spojevi, brzo se razgrađuju u okolišu.

**Neonikotinoidi** su neurotoksični insekticidi slični nikotinu (mogu se vezati na nikotinske receptore na kolinergičkim sinapsama). Primjer je imidaklopid koji je toksičan za akvatične beskralježnjake (slabije za ptice i sisavce). Brzo se razgrađuju na svjetlosti, no razgradnja tih spojeva je sporija u podzemnim vodama<sup>9</sup>.

Neurotoksično djelovanje karbamata, organoklorinim, organofosfornim i piretroidnim insekticidima bazira se na ometanju prijenosa impulsa kroz živac i/ili preko sinapsi u centralnom i perifernom nervnom sustavu.

Kao što je već spomenuto, ireverzibilni inhibitori AChE uključuju organofosforne i karbamatne pesticide, ali i triazine (atrazin, simazin, propazin), neonikotinoide (imidaklopid, acetamiprid), fenilurea pesticide (linuron, monuron) i dr.. Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa, što može dovesti do paralize dišnog

sustava i u konačnici do smrti organizma. Acetilkinolin (ACh) služi kao esencijalni neurotransmiter (prijenosnik živčanog impulsa) u centralnom nervnom sustavu (CNS) insekata, glodavaca i ljudi. Živčani impuls uzrokuje ispuštanje ACh iz presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu te se nadalje veže na kolinergičke receptore (nikotinski i muskarinski receptori) postsinaptičkog neurona ili na mišićne stanice, što dovodi do depolarizacije membrane i u daljnjem prijenosa signala odnosno živčanog impulsa. AChE brzo razgrađuje ACh u sinaptičkoj pukotini čime se ponovno uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i dolazi do prekida impulsa<sup>2,6</sup>.

Piretroidni insekticidi i DDT ulaze u interakciju s Na<sup>+</sup> kanalima. Naime, prijenos akcijskog potencijala kroz živac je ovisan o toku Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> preko njegove membrane. Navedeni insekticidi usporavaju zatvaranje Na<sup>+</sup> kanala pri čemu nastaje više akcijskih potencijala u odgovoru na jedan podražaj što rezultira nekontroliranim pokretim mišića (tremor) i trzajima. Interakcija tih tvari s Na<sup>+</sup> kanalima je reverzibilna tj. ne uključuje stvaranje kovalentne veze. Dodatno, uz blokiranje zatvaranja kanala za Na<sup>+</sup>, DDT suprimira permeabilnost membrane neurona za K<sup>+</sup>. Klorirani ciklodienski insekticidi ili njihovi aktivni metaboliti (dieldrin, endrin, heptaklor epoksid) djeluju kao antagonisti neurotransmitera  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline (GABA) tj. smanjuju tok Cl<sup>-</sup> kroz membranu živca. Inhibicijski neurotransmiteri poput GABA dovode do hiperpolarizacije postsinaptičke membrane većine centralnih neurona otvarajući Cl<sup>-</sup> kanale koji su integralni dio receptora za GABA. Time se smanjuje membranski potencijal i udaljava od praga za postizanje akcijskog potencijala. Kao rezultat ovog djelovanja dolazi do nepotpune repolarizacije neurona i stanja nekontrolirane ekscitacije zbog čega nastaju konvulzije<sup>9</sup>.

Predloženi zajednički model toksičnog učinka različitih pesticida je induciranje apoptoze do koje može doći uslijed poremećaja redoks ravnoteže u stanici. Oksidacijski stres uzrokovan organoklorinim spojevima nastaje zbog nakupljanja ROS, promjena u mitohondrijima i staničnoj respiraciji, te oksidacijsko/redukcijskog potencijala pesticida<sup>6</sup>.

## 2.2.4 Kontaminanti od rastućeg značaja za okoliš

U recentnoj literaturi se također često spominje termin "kontaminanti od rastućeg značaja za okoliš" (engl. *contaminants of emerging environmental concern*) ili nadolazeći kontaminanti (engl. **Emerging Contaminants** - EC)<sup>8</sup>. Ti mikropolutanti uključuju raznolike nosintetizirane organske molekule i njihove derivate te novo otkrivene spojeve u okolišu kao što su farmaceutici i njihovi razgradni produkti, sintetski hormoni, produkti za osobnu potrošnju (engl. *Personal Care Products* - PCP), pesticidi, biocidi i njihovi razgradni produkti, PAH i njihovi razgradni produkti, boje i njihovi razgradni produkti (Tablica 2).

Neki EC djeluju kao endokrini modulatori (EM). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji EM se definiraju kao egzogene tvari ili smjese koje mijenjaju funkciju endokrinog sustava i mogu dovesti do negativnih efekata u organizmu i/ili njegovom potomstvu. Uključuju postojeće halogenirane tvari (PCB, PBDE, DDT, perfluorirane tvari), manje postojeće (npr. ftalati, PAH,

triklosan, bisfenol A, nonilfenol), farmaceutike npr. etinilestradiol i PCP, organometalne tvari (metilHg, tributilin), prirodne hormone i fitoestrogene.

Dosad je većina istraživanja na EC napravljena na akvatičnim organizmima (protozoa, alge, beskralježnjaci, ribe, vodozemci). No, istraživani su učinci samo pojedinačnih farmaceutika, a vrlo malo istraživanja je rađeno na proizvodima za osobnu upotrebu. Općenito, veća akutna toksičnost farmaceutika utvrđena je za beskralježnjake (*D.magna*) i alge, dok ribe i vodozemci pokazuju različitu osjetljivost prema farmaceuticima (npr. ti su organizmi manje osjetljivi na analgetike i antibiotike, a više na stimulanse). Što se tiče kronične toksičnosti, zasad postoji relativno malo istraživanja na bentičkim beskralježnjacima i ribama<sup>3,4</sup>.

Tablica 2. Primjeri EC.

EC	Primjeri
<b>Farmaceutici</b>	
Antibiotici	Trimetoprim, eritromicin, amoksicilin, lincomicin, sulfametaksozol, kloramfenikol
Analgetici i protuupalni lijekovi	Ibuprofen, diklofenak, paracetamol, kodein, acetaminofen, acetilsalicilna kiselina, fenoprofen
Psihijatrijski lijekovi (psihofarmaci)	Diazepam, karbamazepin, primidon, salbutamol
β-blokeri	Metoprolol, propranolol, timolol, atenolol, sotalol
Regulatori lipida	Bezafibrat, klofibrina kiselina, fenofibrina kis., etofibrat, gemfibrozil
Kontrastna sredstva	Iopromid, iopamidol, diatrizoat
<b>Proizvodi za osobnu upotrebu</b>	
mirisi	Nitro, policiklički i makrociklički mirisi, ftalati
zaštita od sunca	Benzofenon, metilbenziliden kamfor
repelenti protiv insekata	N,N-dietiltoluamid
<b>Plastifikatori</b>	Oktilfenoli, nonilfenoli, Di(2-etilheksil)ftalat (DEHP)
<b>Steroidni hormoni</b>	Estradiol, estron, estriol, dietilstilbestrol (DES)
<b>Perfluorirane tvari</b>	Perfluorotoktan sulfonati (PFOs), perfluoroktanoična kis. (PFOA)
<b>Surfaktanti</b>	Alkilfenol etoksilati, 4-nonilfenol, 4-oktilfenol, alkilfenol karboksilati
<b>Usporivači požara (gorenja)</b>	Polibromirani difenil eteri (PBDEi): polibromirani bifenili (PBBi) – polibromirani dibenzo-p-dioksini (PBDDi) – polibromirani dibenzofurani (PBDFi), Tetrabromo bisfenol A, C10-C13 kloroalkani, Tris (2-kloroetil)fosfati, heksabromociklododekani (HBCDi)
<b>Antiseptici</b>	Triklosan, klorofen

## 2.2.5 Mikroplastika

Zbog široke i raznovrsne upotrebe plastike, današnje doba naziva se i POLIMERNO DOBA, a plastika je postala „željezo i čelik“ 21. stoljeća. Djelovanjem biotičkih i abiotičkih faktora na proizvode od plastike, dolazi do njenog usitnjavanja i nastanka mikroplastike.

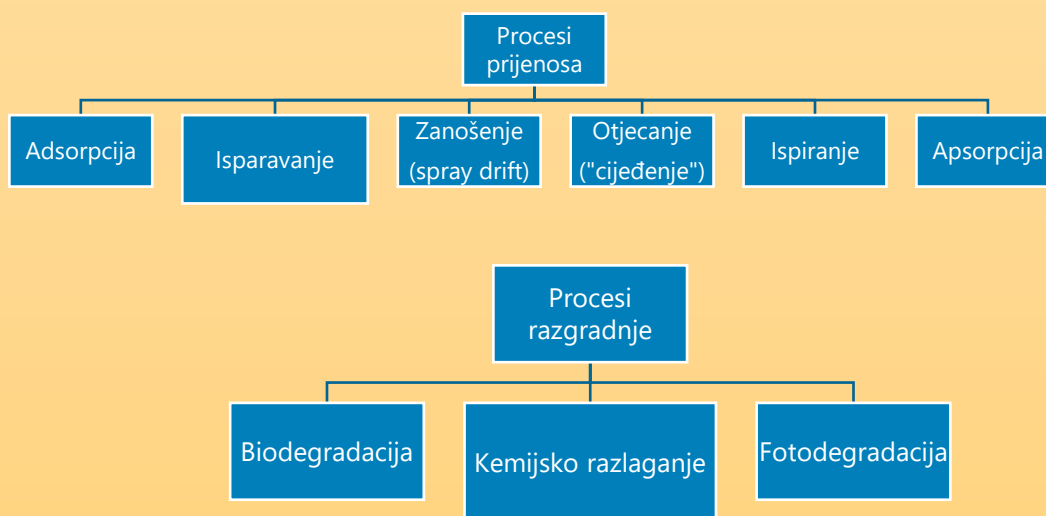
Mikroplastika (MP) je brzorastući onečišćivač te danas znanstvenici, no i javnost općenito upozoravaju o njenom štetnom utjecaju na okoliš. Mikroplastika je postala najčešći kontaminant kopnenih i vodenih ekosustava. Velike količine mikroplastike dolaze u okoliš iz uređaja za pročišćavanje vode i iz sustava za odvodnju oborinskih voda.

Male dimenzije čestica (<5mm) predstavljaju problem pri detekciji, identifikaciji i uklanjanju mikroplastike iz okoliša. Čestice mikroplastike se lako unose hranom i putem okolnog medija (zrak, voda) što dovodi do njihove bioakumulacije. Svojstva usitnjenih čestica mikroplastike su ista kao i kod ishodišnog materijala (postojane tvari).

MP sadrži štetne kemikalije kao POPs i metale kojima je tako olakšan ulazak u hranidbeni lanac. U vodenim ekosustavima polimeri imaju veću specifičnu gustoću u odnosu vodu, pa čestice MP plutaju. Dodatno, čestice MP koloniziraju vodeni organizmi npr. alge. Tako čestice MP završavaju u stupcu vode ili u sedimentu. Životinje čestice MP zamjenjuju za hranu (primjer: ptice i riblja jaja) što dovodi do nakupljanja MP u crijevima i „lažne“ zasićenosti i slabijeg apetita. Moguća je adsorpcija hranjivih tvari na MP pa je i time olakšan unos MP kod organizama koji filtriraju vodu (dagnje, kozice, plankton, ribe). Ugroženi su i bentoski organizmi za koje je utvrđeno da najviše nakupljaju vlaknaste i izdužene oblike mikroplastike<sup>5</sup>.

Zadatak:

Na shemama ispod su prikazani procesi prijenosa i razgradnje pesticida.



1. Koja je razlika između adsorpcije i apsorpcije?
2. Što se podrazumijeva pod kemijskim razlaganjem, što pod biodegradacijom, a što pod fotodegradacijom?

Literatura:

<sup>1</sup>Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Mouneyrac C (2015) *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, Elsevier Inc., London.

<sup>2</sup>Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z (2011) Cholinesterases: Structure, Role, and Inhibition. *Arh Hig Rada Toksikol* 62: 175-190.

<sup>3</sup>Brausch JM, Connors KA, Brooks BW, Rand GM (2012) Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Rev Environ Contam Toxicol* 218: 1-99.

<sup>4</sup>Brausch JM, Rand GM (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82(11):1518-1532.

<sup>5</sup>Burns EE, Boxall ABA (2018) Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. *Environ Toxicol Chem* 37: 2776-2796.

<sup>6</sup>Murati T, Šimić B, Kniewald J, Pleadin J, Kmetič I (2014) Organoklorovi insekticidi – mehanizmi toksičnog djelovanja Organochlorinated insecticides – mechanisms of toxic action. *Croatian Journal of Food Technology* 9 (3-4): 97-109.

<sup>7</sup>Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Poll B* 1: 3-26.

<sup>8</sup>Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Adeel M, Iqbal HMNc(2019) Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ Int* 122: 52-66.

<sup>9</sup>Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2006) *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London.

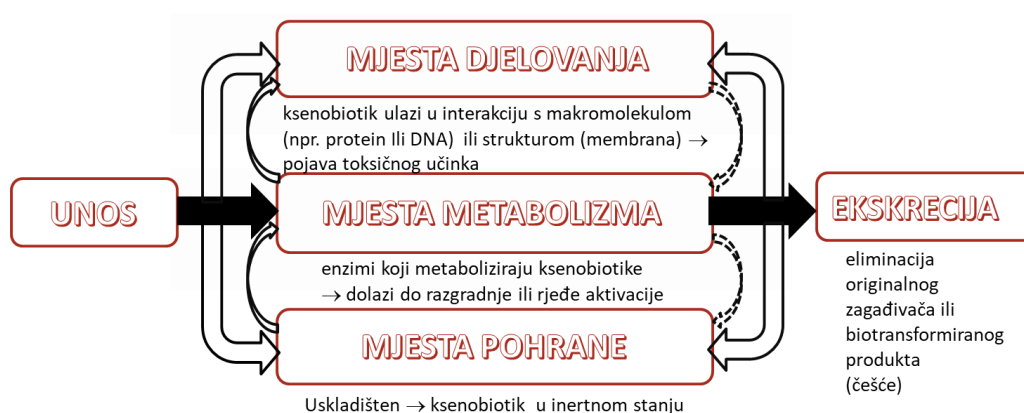
<sup>11</sup><https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>



### 3. Unos, biotransformacija, akumulacija i ekskrecija ksenobiotika

#### 3.1 Opći model sudbine ksenobiotika u organizmu

Organski zagađivači su primjeri ksenobiotika (tvar koja je strana za određeni organizam tj. ne igra ulogu u biokemijskim procesima u pojedinom organizmu). Prema modelu predstavljenom na Slici 4. postoji pet mjesta s kojima ksenobiotik može ući u interakciju: mjesta unosa, mjesta djelovanja, mjesta metabolizma, mjesta pohrane i mjesta ekskrecije.



**Slika 4.** Opći model ADME - Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, i Ekskrecija - koji opisuje sudbinu lipofilnih ksenobiotika u organizmu (prilagođeno prema Walker, 2006).

#### 3.1.1 Unos

Organske molekule, naročito nenabijene i niže molekularne mase ( $M_r < 800$ ), uglavnom se prenose kroz membrane pasivnom difuzijom. Na taj način zagađivači ulaze kroz kutikulu insekata ili biljaka, kožu kralježnjaka, ili kroz membrane u probavnom sustavu, plućima ili traheama. Jako lipofilne tvari se mogu transportirati otopljene u lipoproteinima. Nakon djelomične razgradnje, fragmenti lipoproteina se unose u stanice npr. hepatocite putem endocitoze (noseći pritom lipofilnu molekulu). No, kretanje organskih molekula preko prirodnih barijera pasivnom difuzijom je ovisno o njihovoj topljivosti u vodi i posebno u lipidima jer se barijere obično lipofilne. Dakle, mora postojati određena ravnoteža između njihove topljivosti u lipidima i topljivosti u vodi. Tu ravnotežu pokazuje vrijednost patricijskog koeficijenta između oktanol i vode ( $K_{ow}$ ). Oktanol je lipofilno (hidrofobno) otapalo koje se ne miješa s vodom. Za efikasno kretanje preko lipofilnih barijera, vrijednosti  $K_{ow}$  bi trebala biti 1. Vrijednosti  $K_{ow}$  dosta niže od 1 ukazuju na visoku topljivost u vodi, a nisku topljivost u lipidima. Vrijednosti puno više od 1 ukazuju na vrlo visoku topljivost u lipidima, a nisku u vodi. No, iako

je vrijednost Kow generalno dobar indikator vjerojatnosti efikasnog unosa molekule pasivnom difuzijom treba naglasiti da ne postoji optimalni Kow koji garantira brzi unos molekula u svim situacijama. Potrebno je uzeti u obzir i druge faktore, kao sastav i temperaturu lipofilnih barijera koji određuju stupanj njihove fluidnosti i posljedično opseg difuzije kroz takve barijere. Također, bitna je vrijednost pH okolnog medija. Uobičajeno, nenabijeni oblici molekula lagano prelaze preko lipofilnih barijera. Unos slabih kiselina je favoriziran niskim pH, npr. herbicidi kao 2,4-D brzo prodiru kroz kutikulu biljaka ukoliko su u mediju niskog pH. U probavnom sustavu, slabe kiseline se apsorbiraju u želucu (pH 1-2), a slabe baze u duodenumu, gdje je pH puno viši.

U Tablici 3 su sažeti najvažniji putevi unosa. Akvatički kralježnjaci i beskralježnjaci su direktno izloženi mnogim zagađivačima koji su otopljeni ili suspendirani u površinskim vodama. Unos putem respiratornog sustava ili kože predstavlja važan put ulaska za mnoge zagađivače otopljene u vodi. No, slabija su saznanja o opsegu ulaska zagađivača koji su vezani na sediment ili suspendirane čestice. Unos zagađivača hranom također može biti važan za akvatičke organizme, primjerice u slučaju predatornih vrsta ptica, sisavaca i gmazova koji su na vrhu prehrambenih lanaca. Također, treba napomenuti da se zagađivači mogu prenijeti na potomstvo, npr. preko placente sisavaca u embrio koji se razvija ili putem mlijeka tijekom sisanja. Kod ptica i gmazova, lipofilne tvari se mogu prenijeti u jaja i posljedično u embrio<sup>3</sup>.

**Tablica 3.** Glavni putevi unosa organskih zagađivača

Organizam	Put ulaska	Izvor zagađivača
Ribe	Škrge, koža	okolna voda (otopljeni ili suspendirani zagađivači)
	Probavni sustav	Uglavnom hrana
Akvatički sisavci i ptice	Probavni sustav	Uglavnom hrana, rjeđe okolna voda
Akvatički vodozemci	Probavni sustav	Uglavnom hrana, rjeđe okolna voda
	Koža	okolna voda (otopljeni ili suspendirani zagađivači)
Akvatički beskralježnjaci	Probavni sustav	Uglavnom hrana, rjeđe okolna voda
	Respiratorne površine	okolna voda (otopljeni ili suspendirani zagađivači)
Akvatičke biljke	Listovi	U obliku kapljica, čestica ili para (plinoviti oblik)*
	Korijen	Otopljeni u vodi/sedimentu*

\*važan put unosa za herbicide, sistemske insecticide i fungicide

### 3.1.2 Prijenos

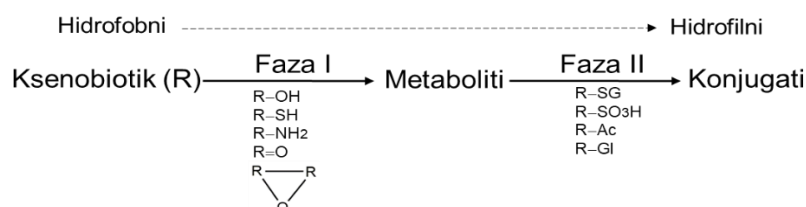
Nakon unosa, zagađivači se prenose do različitih tkiva i organa životinja putem krvi i limfe (kralježnjaci) odnosno hemolimfe (beskralježnjaci). Prilikom apsorpcije zagađivača iz probavnog sustava, većina apsorbiranih zagađivača će putem portalnog venskog sustava ući u jetru. Unos u hepatocite se može odvijati difuzijom preko membrane ili endocitozom uz kotransport s lipoproteinskim česticama. Apsorpcija zagađivača putem pluća ili kože uglavnom vodi do njihove drugačije distribucije, obzirom da krvlju mogu doći i do drugih organa (osim jetre). Organske molekule će u krvi i limfi biti raspoređene između različitih komponenti shodno njihovoj topljivosti. Jako lipofilni spojevi (visoke vrijednosti Kow) vezati će se s lipoproteinima i membranama krvnih stanica, a polarniji spojevi (niske vrijednosti Kow) u otopini (vodi). Organske molekule mogu prijeći krvno-moždanu barijeru no prije svega se to odnosi na lipofilne molekule (nabijene molekule slabo prolaze).

Kod beskralježnjaka, organske molekule se prenose hemolimfom, a njihova raspodjela je slična onoj opisanoj za kralježnjake<sup>3</sup>.

Biljke prenose apsorbirane zagađivače floemom ili transpiracijskom strujom putem ksilema. Molekule koje uđu korijenom, mogu se ksilemom prenijeti do listova, a one koje uđu kroz list, mogu se u struji asimilata floemom prenijeti do drugih dijelova biljke (stabljike, korijen, vegetacijski vršak, plodovi)<sup>1</sup>.

### 3.1.3 Metabolizam (biotransformacija)

Metabolizam većine lipofilnih ksenobiotika odvija se putem enzimski kataliziranih reakcija u dvije faze (Slika 5), kojima se povećava njihova polarnost odnosno topljivost u vodi te posljedično i njihova ekskrecija. Mnogi enzimi faze I su smješteni u membranama endoplazmatskog retikuluma (ER) stanica jetre (kralježnjaci), hepatopankreasa, masnog tkiva i probavila (beskralježnjaci). Lipofilni ksenobiotici se uglavnom obrađuju u ER, a njihovi polarniji biotransformirani produkti uglavnom u citosolu gdje su smješteni neki od enzima II faze (sulfotransferaze, glutation-S-transferaze).



**Slika 5.** Opća shema biotransformacije lipofilnih ksenobiotika u organizmu. (S.Radić Brkanac-ChemDraw)

Faza I uglavnom uključuju reakcije oksidacije, hidrolize, hidracije, demetilacije ili redukcije i obično vode do stvaranja metabolita koji sadrže hidroksilnu (-OH) grupu. Introdukcija -OH u prvom koraku je u većini slučajeva neophodna za slijedeću fazu konjugacije (faza II). Faza I može se odvijati i u više koraka. Većina konjugata je negativno nabijena (anioni) i relativno lako se izlučuje putem žuči ili urina. U većini slučajeva, biotransformacija vodi do smanjenja toksičnosti (detoksikacija), no nekad vodi i do povećanja toksičnosti tj. aktivacije. Aktivacija često uključuje reakcije oksidacije kojima nastaju reaktivni metaboliti koji se mogu vezati na stanične makromolekule. Oksidacijom organofosfornih insekticida (npr. dimetoat, diazinon, malation, klorpirifos) nastaju reaktivni produkti oksoni koji mogu fosforilirati, i stoga inhibirati acetilkolinesterazu u živčanom sustavu. Oksidacijom karcinogena kao što su benzo(a)piren, aflatoxin i vinil klorid nastaju reaktivni metaboliti koji se mogu vezati na DNA. Tako se relativno nereaktivne molekule, koje same ne bi mogle izazvati toksične efekte, mogu prevesti u reaktivne metabolite s kratkim vremenom polu-života koje mogu izazvati značajna oštećenja u stani.

Glavne klase enzima faze I koji metaboliziraju ksenobiotike u životinjama i biljkama prikazani su u Tablici 4. Ti su enzimi slični u životinja i biljaka, no njihove su aktivnosti u biljkama obično niske u usporedbi s onima u životinjama<sup>3</sup>.

**Tablica 4.** Enzimi koji metaboliziraju lipofilne ksenobiotike – faza I

ŽIVOTINJE			BILJKE
Enzim	Supstrat		Enzim
Oksidaze miješanih funkcija (uglavnom citokrom P450 monooksigenaze)	Lipofilni ksenobiotici s Mr < 800		Oksidaze - citokrom P450 monooksigenaze, peroksidaze, fenoloksidaze, katalaze (herbicidi)
Karboksilne esteraze	Lipofilni karboksil esteri		Esteraze
A esteraze	Organofosfatni esteri	Organohalogene tvari	Dehalogenaze
Epoksidne hidrolaze	Organski epoksidi		Epoksidne hidrolaze
Reduktaze (flavo- i hemoproteini koji se ekspimiraju pri niskim razinama O <sub>2</sub> )	Organonitro tvari, neki organohalogene tvari npr. DDT		Reduktaze (flavo- i hemoproteini) npr. nitroreduktaze kataliziraju redukciju NO <sub>2</sub> grupe u eksplozivima (TNT)

**Citokrom P450 monooksigenaze (CYP) /oksidaze miješanih funkcija (OMF)** identificirane su u životinja, biljaka, gljiva, bakterija i virusa (visoko konzervirana porodica enzima), te su odgovorne za oksidaciju ksenobiotika u životinjama i biljkama. Ti enzimi sadrže hem kao kofaktor koji funkcionira kao monooksigenaza. OMF koriste NADPH ili NADH redukcijske

ekvivalente za aktivaciju molekularnog O<sub>2</sub> (jedan atom O se ugrađuje u organski supstrat, a drugi atom O u H<sub>2</sub>O). Prijenosom jednog atoma kisika iz molekule kisika na supstrat, citokrom-P450 ovisne monooksigenaze (CYP) kataliziraju reakcije oksidativne desulfuracije, epoksidacije, hidroksilacije, dealkilacije i redukcije. Životinje imaju OMF ugrađene u membrane ER mnogih organa npr. jetre, bubrega, škruga. Biljke imaju i membranski i topivi (citoplazma) oblik OMF koji bitno povećava kapacitet detoksikacije. OMF kod životinja imaju važne fiziološke uloge primjerice u sintezi hormona, kolesterola i vitamina D, pri razgradnji bilirubina i drugih endogenih te egzogenih tvari. Kod biljaka su OMF također bitne u biosintezi monomera lignina, specijaliziranih biljnih metabolita (npr. fitoaleksina) i biljnih hormona.

Iako CYP uzrokuje detoksikaciju velikog broja ksenobiotika najčešće uvođenjem -OH grupa, postoje iznimke od tog pravila. Oksidativnom desulfuracijom organofosfornih insekticida koji sadržavaju P=S skupinu npr. malation, parathion, diazinon, nastaju oksoni (P=O skupina) koji djeluju kao antikolinesteraze (inhibitori kolinesteraze). Neki organoklorini pesticidi (ciklodieni) mogu se prevesti u toksične epoksidge npr. aldrin prelazi u dieldrin, heptaklor u heptaklor epoksid. Benzo(a)piren (PAH) i mikotoksin aflatoksin B se prevode u epoksidge koji su snažni elektrofilni i mogu se vezati na DNA. Nitrozamini se djelovanjem CYP prevode u metilne radikale i druge reaktivne specije.

Izoforma citokrom P450 1A metabolizira ravne molekule poput PAH i PCB pri čemu mogu nastati aktivni metaboliti npr. epoksidge koji djeluju kao antagonisti tiroksina. Inducirana sinteza enzima CYP1A se stoga često koristi kao biomarker izloženosti organskim kontaminantima, prije svega PAH i PCB (posebno kod riba i nižih kralješnjaka). CYP1 A1 i A2 glavni su izoenzimi uključeni u metabolizam PAH-ova u vodenim kralješnjaka. U riba su uglavnom zabilježene niže aktivnosti tih enzima u odnosu na npr. sisavce, što se može objasniti činjenicom da su ribe manje ovisne o metaboličkoj detoksikaciji obzirom da nenabijene lipofilne molekule mogu pasivnom difuzijom izlučiti u okolni vodeni medij. U tom je kontekstu interesantno da i ptice koje se hrane ribama, imaju relativno niske aktivnosti CYP (potreba za detoksikacijom je niska jer njihova hrana ne sadrži puno ksenobiotika).

Kao što je već spomenuto u drugom poglavlju, indukcija CYP1A se odvija putem citosolnog AhR koji uslijed vezanja ksenobiotika odlazi u jezgru stanice i dovodi do pojačane transkripcije CYP1A gena. AhR je u citoplazmi vezan na protein hsp90 (engl. *heat shock protein*). Ulaskom ksenobiotika u citoplazmu on se veže (ukoliko strukturno odgovara) za AhR koji se pri tome otpušta sa hsp90. Kompleks ksenobiotika i AhR veže se na AhR nuklearni translokator (ARNT), te dopijeva u staničnu jezgru u kojoj se veže na XRE (engl. *Xenobiotic Responsive Element*) regiju na DNA. Vezanje kompleksa na XRE dovodi do transkripcije gena za CYP1A.

Za istraživanje OMF razvijene su brojne metode za određivanje enzimske aktivnosti. Jedna od takvih je i metoda mjerenja aktivnosti enzima etoksirezorufin-O-deetilaze (EROD). Razni spojevi za koje je utvrđeno da izazivaju indukciju monooksigenaza isto tako utječu i na aktivnost EROD. Reakcijom dealkilacije koju katalizira CYP1A (EROD), supstrat 7-etoksirezorufin se prevodi u fluorescentni produkt rezorufin koji se mjeri fluorimetrijski.

Mjerenje EROD aktivnosti bitno je za kvalitativnu procjenu aktivnosti OMF induciranih izlaganjem organizama brojnim kontaminantima.

**Karboksilne esteraze** kataliziraju reakciju hidrolize lipofilnih karboksilnih estera do kiseline i alkohola. Široko su rasprostranjene, uglavnom dolaze u membranama ER mnogih tkiva, ali i citosolu te plazmi (serum) kod kralježnjaka. **A esteraze** sudjeluju u hidrolizi organofosfornih diestera i triestera (s okson grupom); uglavnom dolaze u membranama ER mnogih tkiva, a kod sisavaca i u plazmi (vezana s lipoproteinima visoke gustoće). Esteraze u biljkama su bitne u endogenom metabolizmu herbicida u poljoprivrednim i korovnim biljkama.

**Epoksidne hidrolaze** sudjeluju u hidraciji velikog broja aromatskih i alifatskih epoksida pri čemu nastaju dioli (ne trebaju kofaktor). Uglavnom dolaze u membranama ER mnogih tkiva (jetra), ali i u citosolu. Često prerađuju epoksidge nastale djelovanjem CYP (nekad zaštitni mehanizam), no metaboliziraju i endogene epoksidge npr. steroida, juvenilnog hormona insekata.

**Reduktaze** uglavnom dolaze u membranama ER mnogih tkiva (jetra), ali i u citosolu. Kataliziraju reakciju redukcije nitroaromatskih i organohalogenih ksenobiotika pri čemu kao kofaktor koriste NAD(P)H. Hoće li enzim raditi kao reduktaza, ovisi o dostupnosti kisika. Kada je kisik dostupan, može djelovati kao elektron akceptor (tok elektrona prema kisiku umjesto prema organskoj molekuli). Utvrđeno je da flavoproteini i hemoproteini (kao što je CYP) mogu djelovati kao reduktaze kada je razina kisika niska. Tok elektrona na kisik dovodi do nastanka radikala kisika koji mogu uzrokovati stanična oštećenja.

Nitroreduktaze (NR) kataliziraju redukciju nitro grupa u eksplozivima npr. 2,4,6-trinitrotoluen (TNT); prevođenjem NO<sub>2</sub> u NH<sub>2</sub> smanjuje se mutagenost TNT-a. NR su bitne u fitoremedijaciji tla i voda zagađenih s eksplozivima. Biljke transgenog duhana s genom koji ekspirira bakterijsku NR mogu asimilirati i ukloniti TNT iz tla (upotreba u vojsci).

Enzimi II faze odgovorni su za konjugaciju i/ili degradaciju intermedijera ksenobiotika. Konjugacijom se povećava topivost ksenobiotika i time olakšava ekskrecija ili pohrana (skladištenje). U Tablici 5. prikazani su enzimi II faze u životinjama i biljkama.

**Tablica 5.** Enzimi koji metaboliziraju konjugirane ksenobiotike – faza II

ŽIVOTINJE		BILJKE
Enzim	Supstrat	Enzim
Glukuronil transferaze	Organske tvari s <b>-OH</b> , SH ili NH <sub>2</sub>	Glukuronil transferaze
Sulfotransferaze	Organske tvari s <b>-OH</b>	Sulfotransferaze
	Organske tvari s <b>-OH</b>	O-glukozil transferaze N-glukozil transferaze O-malonil transferaze
Glutation-S-transferaze	Elektrofili uključivo i organohalogene tvari i organski epoksidge	Glutation-S-transferaze

**Glukuronil transferaze** uglavnom su ograničene na membrane ER mnogih tkiva (jetra kod kralježnjaka). Ti enzimi kataliziraju reakciju između ksenobiotika s labilnim –H (obično u –OH) i glukuronske kiseline. Na glukuronsku kiselinu je obično vezan nukleotidni kofaktor – uridin difosfat (UDP), koji se sintetizira u citosolu. Glukuronidi su uglavnom prisutni u obliku aniona pri staničnoj vrijednosti pH (oko 7.4) te se s membrane otpuštaju u citosol.

**Glukozil transferaze** (aktivne kod biljaka) kataliziraju reakciju između glukoze (ili malonske kiseline) i –OH grupa (O-glukozil transferaze), ili NH<sub>2</sub> grupa (N-glukozil transferaze, N-malonil transferaze) ksenobiotika. Do indukcije tih enzima dolazi djelovanjem nekih herbicida i organskih molekula (npr. 3,4-dikloroanilin, 4-nitrofenol i 2,4,5- triklorofenol).

**Sulfotransferaze** kataliziraju prijenos sulfatne grupe iz 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS) na ksenobiotik i endogene supstrate sa slobodnom -OH grupom. Nastali sulfatni konjugati su u obliku aniona koji su vrlo topljivi u vodi. Uglavnom dolaze u citosolu (jetra kod kralježnjaka). Reakcija sulfatacije je bitna u biotransformaciji 17β-estradiola. Izloženost egzogenim (kseno)estrogenima uzrokuje deformacije u gonadama akvatičnih organizama.

**Glutation-S-transferaze** kataliziraju reakciju između elektrofilnog ksenobiotika (s funkcionalnom grupom) i -SH grupe glutaciona. Uglavnom dolaze u citosolu (jetra kod kralježnjaka). Konjugacija s glutationom nije ovisna o prisutnosti –OH grupe. Važni supstrati za te enzime uključuju određene organohalogene tvari i organofosforne insekticide. Nastali konjugati glutaciona se obično prije ekskrecije dodatno modificiraju. Kod kralježnjaka daljnji metabolizam konjugata glutaciona uključuje nastanak konjugata merkapturične kiseline koji su obično dominantni oblici za ekskreciju<sup>3</sup>.

### 3.1.4 Pohrana (skladištenje)

Ksenobiotici se mogu pohraniti na lokacije gdje nije moguća direktna interakcija ksenobiotika s mjestima djelovanja tj. gdje ne mogu ući u metaboličke reakcije (lipofilna odnosno hidrofobna okolina). Kod životinja lokacija za pohranu lipofilnih postojanih tvari je prije svega masno tkivo, ali i lipoproteinske micle te stanične membrane koje nisu blizu mjesta djelovanja enzima koji mogu metabolizirati dotični ksenobiotik. No, u nekim slučajevima npr. kada nema hrane, tijekom bolesti ili migracije, dolazi do mobilizacije masnih naslaga kako bi se osigurala energija. To može dovesti do naglog oslobađanja pohranjenih ksenobiotika u krvotok i do mjesta djelovanja i metabolizma, što posljedično može dovesti do toksičnih učinaka (odgođena toksičnost)<sup>3</sup>.

Kod biljaka, ksenobiotici se mogu pohraniti u vakuolu i staničnu stjenku. Topljivi konjugati (vezani s peptidima, šećerima, aminokiselinama) se nakupljaju u vakuoli, a netopljivi (vezani s pektinom, ligninom, ksilanima i ostalim polisaharidima) se pohranjuju izvan stanice i nakupljaju u staničnoj stijenci<sup>1</sup>.

### 3.1.5 Ekskrecija (eliminacija)

Mnogi akvatični kralježnjaci mogu eliminirati lipofilne ksenobiotike difuzijom u okolnu vodu (ribe putem škrga, vodozemci npr. žabe putem kože)<sup>2</sup>. Akvatične ptice nemaju permeabilne membrane u kontaktu s vodom; koža i perje nisu propusni za polutante. Koža akvatičnih sisavaca (kitovi, pliskavice i tuljani) također je relativno nepropusna za takve tvari.

Kod većine kopnenih kralježnjaka i beskralježnjaka efektivna eliminacija lipofilnih ksenobiotika ovisi o njihovoj konverziji u vodotopive konjugate koji se mogu izlučiti (neki jako lipofini ksenobiotici se u manjoj količini mogu izlučiti u mlijeko kod sisavaca, ili u jaja kod ptica, i reptila i beskralježnjaka. Kralježnjaci eliminiraju produkte biotransformacije putem žuči/urina (konjugati s Mr ispod 300 Da putem urina, a s Mr iznad 600 Da uglavnom putem žuči).

Ekskrecija konjugata urinom: topivi metaboliti se iz krvi premještaju u glomerularni filtrat u bubrezima, otkud prolaze u burežne pa u mokraćni mjehur i urinom se izlučuju van. Kod sisavaca izlučivanje urina se odvija neovisno o ekskreciji fecesa, dok je kod ptica, gmazova i vodozemaca ekskrecija urina i fecesa kombinirana.

Ekskrecija konjugata putem žuči: metaboliti se iz hepatocita jetre izlučuju u žučne kanaliće, pa glavni žučovod te se prenose u tanko crijevo, debelo crijevo odakle dolazi do eliminacije konjugata fecesom. Ako metabolizam ksenobiotika kreće u crijevima, nastali metaboliti se mogu reapsorbirati u krvotok pasivnom difuzijom i zatim vratiti u jetru i ponovno ići u konjugaciju. To se naziva enterohepatička cirkulacija, a zbog toga reciklirani metaboliti mogu iskazati svoje toksične učinke. Kod beskralježnjaka, situacija je slična kao kod kralježnjaka samo što hepatopankreas ima ulogu jetre<sup>3</sup>.

Kod biljaka, ksenobiotici koji se apsorbiraju listovima (prijenos kroz floem do korijena) se eliminiraju preko korijena aktivnom transportom u tlo ili otopinu (primjer: alaklor, 2,4 D). Ksenobiotici koji se apsorbiraju korijenom (prijenos kroz ksilem do puči), eliminacija se odvija listovima (primjer: halogeni derivati i fenol), no to je mnogo rjeđe od ekskrecije ksenobiotika preko korijena<sup>1</sup>.



Zadatak:

Parakvat (N,N'-dimetil-4,4'-dipiiridin diklorid) je neselektivni brzodjelujući herbicid toksičan za ljude i životinje.

Ako je primijenjen na korovnoj biljci koja raste u ilovastom tlu, na koju komponentu tog tla će se vezati taj herbicid (pogledaj strukturu)? I zašto?

- a) pijesak
- b) mulj (engl. silt)
- c) glina

2,4 D je selektivni hidrofilni herbicid koji suzbija većinu širokolisnih korova.

U usporedbi s parakvatom, koji bi herbicid bio dostupniji za organizme u tlu?

Literatura:

<sup>1</sup>Kvesitadze G, Khatisashvili G, Sadunishvili T (2004) Mechanisms to Detoxify Selected Organic Contaminants in Higher Plants and Microbes, and Their Potential Use in Landscape Management. European Research Office, U.S. Army Engineer Research and Development Center, United Kingdom.

<sup>2</sup>Schlenk D (2005) Pesticide biotransformation in fish. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6: 171-190.

<sup>3</sup>Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2006) *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis, London.

## 4. Mehanizmi otpornosti/tolerancije na metale

### 4.1 Bioraspoloživost metala u vodi

Slično kao i u tlu, i u vodi na dostupnost metala za životinje i biljke utječu kemijska svojstva metala, pH vrijednost, organski helatori, humične tvari i kompleksirajući agensi, prisutnost drugih metala i aniona, ionska snaga, temperatura, intenzitet svjetla i koncentracija kisika i salinitet što sve utječe na redoks potencijal.

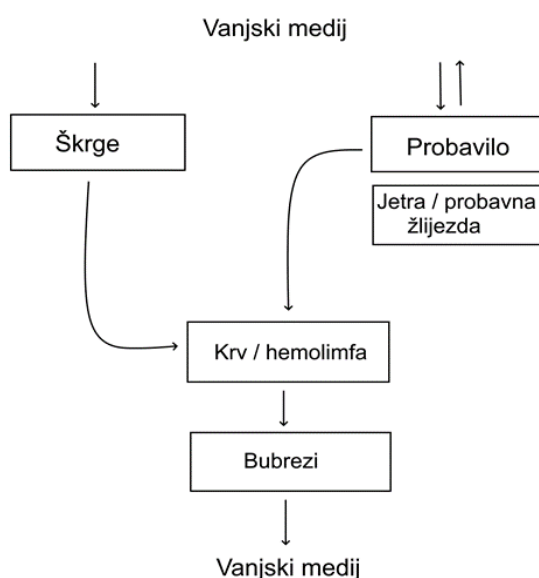
Pri niskoj pH vrijednosti uglavnom se povećava koncentracija većine metala u vodi, čime se povećava i njihova toksičnost. Pri visokoj pH vrijednosti, karbonati, oksidi, hidroksidi i silikati talože metale čime je i njihova potencijalna toksičnost niža. Pri niskom redoks potencijalu, dolazi do vezanja metala na sulfide u sedimentu, što dovodi do smanjenja njihove toksičnosti. Visoki salinitet vodi prema nastajanju metalnih klorida koji su teško topljivi, pa se tako smanjuje toksičnost metala. Pri višoj temperaturi, toksičnost metala raste.

Također, organometalni spojevi npr. metil živa imaju veću biodostupnost. Kod riba, kao ligandi metala služe ksantati, dietilditiokarbamati, ditiosulfati koji povećavaju biodostupnost kadmija<sup>1</sup>.

### 4.2 Unos metala

Većina metala u organizam ulazi putem membranskih proteina prenosioca dizajniranih za primanje nutrijenata (npr. preko Fe-transportera ulaze i kationi toksičnih metala).

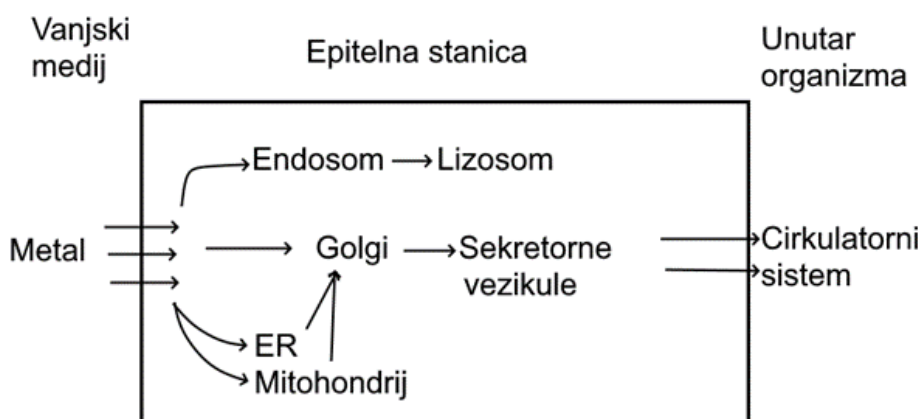
Na Slici 6. prikazan je opći model unosa metala kod akvatičnih životinja<sup>1</sup>.



**Slika 6.** Model za unos, apsorpciju, translokaciju, skladištenje i izlučivanje metala u akvatičnih životinja (prilagođeno prema Deb i Fukushima, 1999).

Unos metala preko epitelnih stanica (škrge, probavni sustav, integument) odvija se olakšanom difuzijom (Slika 7):

- prijenos kroz apikalnu membranu u dodiru s okolnim medijem
- kretanje u stanici i interakcija (intracelularni ligandi)
- efluks preko bazolateralne membrane u dodiru s cirkulacijom



**Slika 7.** Prijenos metala kroz epitelne stanice (prilagođeno prema Deb i Fukushima, 1999).

Esencijalni metali se unose putem ionskih kanala i proteina prenosioca, iako tako mogu ući i toksični metali. Metali također mogu ući endocitozom. Probavne stanice kod beskralježnjaka su sposobne za fagocitozu i intracelularnu digestiju čestica hrane, no i škrge su također sposobne za fagocitozu čestica iz okoliša. Nakon unosa, metali u stanici ulaze u lizosomalne vezikule, odakle mogu ući u cirkulaciju<sup>1</sup>.

Kod biljaka, unos metala odvija se preko apikalne regije korijena ili čitave površine korijena, ulaze u prostor apoplasta (stanična stjenka) koji djeluje kao sito, odakle se, ovisno o koncentraciji metala, prenose kroz membranu u stanicu. Unos metala kod submerznih biljaka odvija se čitavom površinom<sup>3</sup>.

Metali mogu ući u biljke i kroz puči listova npr. elementarna živa, ali i kroz kutikulu (između stanica zapornica i pratilica gdje je kutikula tanja).

Bilo da su ušli kroz korijen ili list, metali se uglavnom prenose ksilemom.

### 4.3 Pohrana metala u stanicama i sekvestracija (izdvajanje)

Kod životinja za sekvestraciju metala služe metalotioneini (MT) i intracelularne vezikule (granule).

MT su cisteinom (Cys) bogati nisko molekularni proteini ( $M_r = 0.5-14$  kDa) u čiji sastav ne ulaze aromatske kiseline s općom strukturom Cys-Cys, Cys-x-Cys, Cys-x-x-Cys, gdje x može biti bilo koja aminokiselina (osim Cys)<sup>6</sup>. Ti proteini služe za vezanje esencijalnih metala (nutrijenti), ali i za kompleksiranje i detoksikaciju toksičnih (neesencijalnih) metala putem -SH grupe cisteina. Loci su u membranama Goldijevog aparata. Široko su rasprostranjeni, ima ih u prokariotima, protozoama, biljkama (npr. grašak, pšenica, kukuruz), kvascima, beskrležnjacima i kralježnjacima. Prema primarnoj strukturi MT klasificirani su u tri klase (ta klasifikacija potječe iz 1987.g): klasa I uključuje proteine koji pokazuju homologiju s MT konja (prvi MT je otkriven i izoliran iz bubrega konja); klasa II uključuje MT koji ne pokazuju homologiju s MT konja; klasa III koja uključuje fitohelatine, cisteinom bogate proteine koji se sintetiziraju enzimatski (fitohelatin-sintaza)<sup>4</sup>. Prema kasnijoj klasifikaciji (datira iz 2001.g) koja u obzir uzima taksonomska svojstva i distribuciju ostataka Cys u sekvenci MT, ti se proteini dijele u 15 porodica (zadnja sadrži biljne MT).

Vezanjem metala na MT, dolazi do njihove pojačane bioakumulacije u organima. MT imaju centralnu ulogu u biodostupnosti Cu i Zn unutar stanice i općenito su vrlo važni u homeostatskoj regulaciji metala. Najjači aktivator enzima za sintezu MT je Cd. MT su identificirani u tankom crijevu, škrkama, jetri/hepatopankreasu rakova, školjkaša, žaba i riba<sup>6</sup>. Cys iz MT mogu vezati i štetne radikale kisika npr. superoksid i hidroksilne radikale. U toj reakciji se cistein oksidira u cistin, pri čemu dolazi do otpuštanja iona metala npr. Zn koji onda može aktivirati sintezu većih količina MT. Taj mehanizam je važan u regulaciji oksidativnog stresa pomoću MT. Utvrđeno je da pesticid deltametrin uzrokuje indukciju CYP1A ali i metalotioneina u kalifornijskoj pastrvi<sup>6</sup>.

Intracelularne vezikule (granule) su asocirane s probavnim ili ekskretornim organima beskrležnjaka (probavna žlijezda, crijevo, hepatopankreas, bubrezi)<sup>1</sup>. Lipofuscin granule utvrđene su u vezivnom tkivu beskrležnjaka i kralježnjaka. Ca-fosfat granule također imaju ulogu u detoksikaciji metala. Sadrže Ca i Mg fosfate, ali mogu sadržavati i visoke koncentracije Al, Ag, Co, Fe, Pb, Zn i Sn. Smatra se da granule nastaju u lizosomima. U bubregu dagnji je utvrđeno da razgradnja MT/metal kompleksa rezultira ugradnjom Cu, Cd, Hg, Zn u lizosomalne granule<sup>2</sup>. Feritin služi za vezanje metala kod rakova, puževa i školjkaša.

Kod biljaka kao ligandi metala odnose se za heliranje i sekvestraciju služe organske kiseline, MT i fitohelatini (PC) koji omogućuju njihov prijenos u vakuolu<sup>3</sup>.

Fitohelatini su oligopeptidi koji nastaju iz glutaciona, s općom strukturom  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , pri čemu je n veći od 2, a može iznositi 11; no uglavnom se n kreće između 2 i 5. Glu i Cys su vezani  $\gamma$ -karboksil-amidnom vezom.

Vrlo važna uloga PC je detoksikacija toksičnih teških metala u biljkama, ali i održavanje homeostaze esencijalnih metalnih iona (pohrana u vakuolu za daljnju upotrebu). Sintezu PC katalizira enzim fitohelatin-sintaza (FS), koju aktiviraju brojni teški metali, no dokazano je da su najbolji aktivatori tog enzima kationi Cd pa Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg i Au.

Fitohelatini su 1981.g utvrđeni u kvasaca, a 1985.g u biljaka. Kasnije su ti peptidi utvrđeni i u algama, gljivama, nematodama i drugim beskraljčnjacima (vrsta koji pripadaju školjkašima, puževima, svitkocima i žarnjacima)

Stres izazvan teškim metalima kod akvatičkih biljaka npr. kod makrofita *Bacopa monnieri* dovodi do povećanja sinteze PC, ali i antioksidacijskih obrambenih mehanizama<sup>5</sup>.

**Mehanizmi otpornosti odnosno tolerancije na metale** kod životinja i biljaka uključuju dvije strategije:

- isključivanje metala (eliminacija bez promjene metala – biljke, životinje)
- nakupljanje metala koje uključuje razne načine detoksikacije:

1. biljke - moguća vezanje na komplekse u rizosferi (npr. eksudati korijena npr. oksalati s Pb čine netopive soli) ili vezanje na mucigel.

2. biljke, životinje - moguće je vezanje i odlaganje metala u citoplazmi u lizosomima/granulama odnosno vakuoli dalje od metaboličkih reakcija (biomineralizacija).

3. biljke, životinje - moguća je biotransformacija metala (metilacija i druge reakcije) čime se mijenja topivost, isparivost i toksičnost pa može doći do eliminacije promijenjenog metala.

Primjer:  $\text{Hg}^{2+}$  ili fenil- $\text{Hg}^{2+}$  biotransformacijom prelazi u elementarno stanje i isparava.

Primjer: isparavanje Se u obliku dimetil-selenida zabilježeno je kod životinja i biljaka, a isparavanje Se obliku metil-selenida utvrđeno je kod biljnih vrsta *Astragalus racemosus* i *Medicago sativa*.

4. biljke, životinje – vezanje na polipeptide i proteine kao što su metalotioneini i fitohelatini i dr. Oni omogućavaju odlaganje metala u vakuoli/lizosomu u obliku netopivih kompleksa.

5. biljke, životinje - aktivacija antioksidacijskog sustava

### Literatura:

<sup>1</sup>Deb SC, Fukushima T (1999) Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *Int J Environ Stud* 56: 385-417.

<sup>2</sup>George SG (1983) Heavy metal detoxication in *Mytilus kidney*-an in vitro study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 76(1): 59-65.

<sup>3</sup>Hasan Md. Kamrul, Cheng Yuan, Kanwar Mukesh K., Chu Xian-Yao, Ahammed Golam J., Qi Zhen-Yu (2017) Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress-A Review. *Front Plant Sci* 8: 1492.

<sup>4</sup>Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M (1998). Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic Res* 29 (2): 93–101.

<sup>5</sup>Rodrigo MAM, Anjum NA, Heger Z, Zitka O, Vojtech A, Pereira E, Kizek R (2016) Role of Phytochelatins in Redox Caused Stress in Plants and Animals. In: *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, Shanker AK, Shanker C (Eds.). IntechOpen, DOI: 10.5772/62160. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/49796>.

<sup>6</sup>Wang W-C, Mao H, Ma D-D, Yang W-X (2014) Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Front Mar Sci* 1: 34. doi: 10.3389/fmars.2014.00034

## 5. Oksidativni stres i antioksidativni obrambeni mehanizmi

### 5.1 Oksidativni stres

ROS nastaju u malim količinama u raznim dijelovima stanice i stalni su produkti normalnog staničnog metabolizma. Osim slobodnih radikala kisika, u stanicama nastaju i slobodni radikali dušika, sumpora, klora, lipida i dr. U ovom ćemo se poglavlju uglavnom fokusirati na ROS.

ROS uključuju superoksidni radikal, hidroksiperoksilni radikal, hidroksilni radikal, peroksilne i alkoksilne radikale, ali i vodikov peroksid (nije radikal jer nema nesparenih elektrona) i singletni kisik<sup>3</sup>.

Kada je produkcija ROS veća od kapaciteta antioksidativnog sustava, dolazi do oksidacijskog stresa. Oksidativni stres uzrokuje svako stanje u kojem je narušena homeostaza staničnih redoks-reakcija.

No, što su ROS, gdje nastaju i zašto su štetni u prevelikim količinama?

ROS su djelomično reducirani i elektronski pobuđeni oblici kisika. Visoko su reaktivni, kratko živeći i nestabilni (nastoje postati stabilni oduzimanjem  $e^-$  od neke druge molekule). Nastaju prijenosom elektrona tijekom različitih bioloških procesa ili apsorpcijom dovoljne količine energije za promjenu spina jednog od dvaju nesparenih elektrona. U biološkim sustavima donori elektrona su uglavnom redoks parovi  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ,  $Cu^+/Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}/Mn^{3+}$ .

Glavni endogeni izvori ROS kod biljaka i životinja su uglavnom transportni lanci elektrona. Kod biljaka najveća izvor ROS su kloroplasti, a kod životinja mitohondriji. No, i kod biljaka i životinja ROS mogu nastati i u peroksisomima, ali i aktivnošću brojnih enzima npr. CYP, NAD(P)H oksidaza i lipoksigenaza.

Egzogeni izvori ROS su kod životinja primjerice UV svjetlo, ionizirajuće zračenje, toksikanti iz okoliša, patogeni. Slično je i kod biljaka, iako obzirom da su biljke sesilne, na njih djeluju brojni abiotički (intenzivna svjetlost, salinitet, suša, ekstremne temperature, razni organski i anorganski polutanti) i biotički stresni faktori koji mogu dovesti do povećanja količine ROS.

Kisik se u osnovnom stanju može smatrati radikalom zbog svoje elektronske konfiguracije - dva nesparena elektrona s paralelnim spinovima (biradikal) - no to je najstabilniji oblik kisika. Naime, kisik zbog paralelnog spina može primiti samo jedan po jedan elektron (monovalentna redukcija) te je i reakcija s neradikalima npr. organskim molekulama vrlo spora jer su elektroni takvih molekula sparni i antiparalelnog spina. Zato je molekularni kisik relativno nereaktivan. Kisik se može aktivirati bilo apsorpcijom energije dovoljne da "obrne" spin jednom od nesparenih elektrona ili monovalentnom redukcijom (prijenos jednog elektrona). Prvim načinom aktivacije nastaje singletni kisik koji može sudjelovati u reakcijama divalentne

redukcije (istovremeni prijenos dva elektrona). Stoga taj oblik pokazuje puno veću reaktivnost prema organskim molekulama od kisika.

Monovalentnom redukcijom kisika u postepenim koracima nastaju superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) i voda. Kod niske pH vrijednosti protoniranjem  $O_2^{\cdot-}$  stvara se perhidroperoksidni radikal ( $\cdot HO_2$ ), koji zajedno s  $O_2^{\cdot-}$  opet može dati  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  je neradikalni štetni produkt kisika, a može ponovno krenuti u reakciju dajući najjači poznati oksidans - hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) u tzv. Fentonovoj reakciji gdje se  $Fe^{2+}$ -kompleks oksidira u  $Fe^{3+}$ -kompleks. Fentonova reakcija je ciklička jer se  $Fe^{3+}$ -kompleks reducira s  $O_2^{\cdot-}$ , što rezultira obnovljenim nastankom  $Fe^{2+}$ -kompleksa što omogućava još jedno reagiranje s  $H_2O_2$  (Haber-Weiss-ov ciklus). Prvi korak u redukciji kisika je endoterman tj. zahtijeva energiju, a daljnje redukcije su spontane i zahtijevaju samo donore elektrona ili protona, čime se ostvaruje nastanak štetnih radikala i spojeva kisika. Oksidacija organskih supstrata može se odvijati na dva načina -  $\cdot OH$  se može vezati na organsku molekulu ili može oduzeti vodikov atom organskoj molekuli pri čemu nastaju voda i organski radikal. Reagirajući s kisikom, takav radikal stvara peroksilni radikal koji onda dovodi do lančane reakcije oksidirajući druge organske molekule<sup>1,3</sup>.

Aktivirani oblici kisika induciraju brojne lezije u DNA koje dovode do mutacija i ostalih letalnih učinaka na gene. Šećerne i bazne komponente DNA su osjetljive na oksidaciju pri čemu dolazi do razgrađivanja baza, jednolančanih lomova i unakrsnog vezanja na proteine. Razgradnjom baza nastaju razni produkti poput hidroksimetil uree, timin glikola ili dolazi do otvaranja prstena timina i adenina. Najčešći uzrok jednolančanih lomova je oksidacija šećernih komponenti uzrokovana hidroksilnim radikalom.

ROS također mogu uzokovati promjene u fizičkim karakteristikama i funkcijama membrane koje ukazuju na postojanje oksidacijskog stresa. Glavne sastavnice membranskih lipida su polinezasićene masne kiseline koje su izrazito osjetljive na lipidnu peroksidaciju. Aktivacijom kisika u stresnim okolnostima stvara se hidroksilni radikal i singletni kisik koji potom reagiraju s metilnim skupinama polinezasićenih masnih kiselina formirajući štetne konjugirane diene, lipidne peroksilne radikale i lipidne hidroperoksidge. Lipidnom peroksidacijom mogu nastati brojni sekundarni produkti; aldehidi, ketoni, ugljikohidrati, epoksidi i aktivni radikali. Malondialdehid (MDA), jedan od završnih produkata procesa lipidne peroksidacije, je pouzdan marker oksidativnog stresa u organizmu.

ROS mogu uzrokovati brojne promjene u strukturi proteina koje dovode do gubljenja enzimskih funkcija proteina, i posljedično do poremećaja staničnih funkcija. Zbog svoje ireverzibilne prirode karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina. Karbonilne grupe nastaju oksidacijom izloženih bočnih lanaca hidrofilnih aminokiselina prolina, arginina, lizina i treonina, često kataliziranom metalima, što ih čini hidrofobnijim i time sklonim agregaciji. Upotreba karbonilnih skupina proteina kao biomarkera oksidativnog stresa



ima brojne prednosti u odnosu na ostale metode zbog svog, relativno brzog nastajanja i stabilnosti karboniliranih proteina. Većina testova za detekciju karbonilnih grupa proteina uključuje derivatizaciju karbonilne grupe s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), koji vodi do formiranja stabilnog dinitrofenil (DNP) hidrazona, koji se može detektirati različitim metodama<sup>2</sup>.

ROS imaju dvostruku ulogu, u prevelikim količinama mogu uzrokovati razna oštećenja u stanicama, kao što su lipidna peroksidacija, oksidacija proteina, oštećenja DNA, strukturna oštećenja i općenito dovesti do nekontroliranih redoks reakcija. No, ROS u malim količinama su neophodni u regulaciji rasta (stanična diferencijacija i proliferacija), programiranoj staničnoj smrti, regulaciji signalne transdukcije i transkripcije, kontroli aktivacije obrambenih mehanizama i drugim procesima.

## 5.2 Antioksidativni obrambeni mehanizmi

**Prva linija obrane** protiv oksidativnog stresa uključuje izbjegavanje overprodukcije ROS, a to se može ostvariti tako da se transportni lanci elektrona održavaju u oksidiranom stanju tj. da se održava ravnoteža između dostupnosti supstrata i zahtjeva za energijom (ATP). Biljke mogu aktivirati tzv. alternativnu oksidazu u stresnim uvjetima kao i rotenon-otpornu NAD(P)H dehidrogenazu<sup>1</sup>.

**Druga linija obrane** uključuje razgradnju odnosno detoksikaciju ROS. Superoksid dismutaze su metaloproteini (SOD) koji kataliziraju dismutaciju (razgradnju) superoksidnog radikala do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>. SOD je prisutan u svim aerobnim organizmima i u gotovo svim odjeljcima stanice gdje se stvara kisik te stoga ima središnju ulogu u obrani od oksidacijskog stresa. Postoji tri porodice SOD ovisno o metalnom kofaktoru: bakar/cink (Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>), mangan (Mn<sup>2+</sup>) ili željezo (Fe<sup>3+</sup>) i nikal (Ni<sup>3+</sup> prokarioti).

Vodikov peroksid se nadalje razgrađuje pomoću katalaza (CAT) do vode i kisika. To su tetramerni enzimi s hem skupinom, prisutni u svim aerobnim organizmima. Ti enzimi imaju veliku brzinu reakcije, ali afinitet za supstrat im je dosta nizak. Zbog toga reakcija zahtjeva simultano vezanje dviju molekula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na aktivno mjesto CAT. U životinjskim i biljnim stanicama CAT dolaze u peroksisomima i u citosolu.

Za finu regulaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zaslužna je kod biljaka askorbat peroksidaza, a kod životinja glutathion peroksidaza. Peroksidaze (POX) ili vodik peroksid oksidoreduktaze su glikoproteini koji sadrže hem skupinu, a prisutne su u biljaka, životinja i mikroorganizama.

Glutathion reduktaze (GPX) sudjeluju u regeneraciji reduciranog glutathiona<sup>3</sup>.

Glavni neenzimski antioksidans u biljkama je askorbat, a zatim tokoferol, karotenoidi i polifenoli. Kod životinja glavni endogeni antioksidans je glutathion, ali i vitamine A, C, E i karotenoide.

**Treća linija obrane** uključuje popravak staničnih oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom.

Utvrđeno je da mnogi ksenobiotici (npr. pesticidi) i metali induciraju oksidativni stres u akvatičnih životinja, ali do povećanja ROS došlo je i uslijed promjena u temperaturi ili koncentraciji kisika. Stoga se može zaključiti da svi, dovoljno jaki, stresni uvjeti su praćeni nastankom oksidativnog stresa<sup>3</sup>.

Literatura:

<sup>1</sup>Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82: 1227-1238.

<sup>2</sup>Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38.

<sup>3</sup>Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101(1):13-30.

## 6. Testni organizmi

### 6.1 Biomonitoring

Na tržištu u EU egzistira više od 100 000 kemikalija (<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/ec-inventory>). Velik broj tih kemikalija nije detaljno testiran na toksičnost, a nekima nedostaju osnovni podaci o toksičnosti. Razlog tome leži u financijski zahtjevnom procesu testiranja koji uglavnom traje godinama. Osim toga, velik broj kemikalija je na tržištu desetljećima - iz vremena kada se nije zahtijevalo detaljnije testiranje toksičnosti.

Stvari su se donekle promijenile uvođenjem novog EU sustava: REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemikalija (EC 1907/2006 i Direktiva 2006/121/EC) koji se počeo primjenjivati u EU od 2007., a u Hrvatskoj od 2008. g (Zakon o provedbi Uredbe REACH-a (NN 53/2008)). Ovaj sustav zahtijeva registraciju kemikalija u ECHA (European Chemicals Agency, Helsinki), gdje se do 2021. g registriralo nešto više od 23 000 kemikalija.

Registracija zahtijeva rigoroznija i puno detaljnija ispitivanja od donedavnih te je odgovornost za provođenje tih ispitivanja na samoj industriji. Možda najznačajniji napredak u REACH sustavu je namjera da se testiranje na životinjama svede na minimum i podržava razvoj alternativnih metoda testiranja koja predstavljaju budućnost ekotoksikologije i o kojima će biti riječi na kraju ovog priručnika.

Za ekotoksikologiju i procjenu utjecaja kemikalija na okoliš (PUO) vrlo je važno biti svjestan da su kemikalije koje dospjevaju u okoliš tamo prisutne u smjesi više desetina, pa i tisuća različitih kemikalija. Legislativa se temelji na procjenama toksičnosti pojedinačnih kemijskih spojeva na određene malobrojne vrste organizama i to najčešće u kratkoročnom testiranju. Stoga nije problem zaključiti da je gotovo nemoguće u potpunosti analizirati/predvidjeti i motriti djelovanje i dijela tih kemikalija u okolišu i prirodnim populacijama organizama koje nastanjuju takav okoliš. Nažalost, kao što smo već napomenuli, okoliš je onečišćen smjesom nedovoljno testiranih kemikalija. U smjesi kemikalije mogu djelovati aditivno ( $1 + 2 + 3 = 6$ ), sinergistički ( $1 + 2 + 3 \gg 10$ ) ili, manje vjerojatno, antagonistički ( $1 + 2 + 3 < 6$ ) što također otežava predikciju negativnog djelovanja na biotu<sup>2</sup>.

Kako bi barem donekle mogli predvidjeti negativno djelovanje onečišćenja na okoliš mora se provoditi detaljno testiranje toksičnosti pojedinih kemikalija prije dospijevanja na tržište i koje će završiti u okolišu i tako stvarati zakonodavni okvir kojim ćemo se truditi spriječiti njihov negativni utjecaj. Zbog mnoštva nepoznanica u načinu djelovanja kemikalija i njihovog međusobnih interakcija istovremeno je neophodno i provoditi biološki nadzor okoliša za koji smatramo da je ugrožen. Takav nadzor nazivamo još i **biomonitoring** (grč. bios-život, lat. monere-upozoriti, podsjetiti). To je zbir analiza biološke komponente okoliša i njenih reakcija koje koristimo za otkrivanje promjena u okolišu nastalih onečišćenjem a svrha mu je

pravovremeno otkriti negativne promjene u okolišu uzrokovane antropogenim djelovanjem i pokušati kvantificirati stupanj izloženosti organizama onečišćenju.

Prekretnica u monitoringu onečišćenja okoliša desila se 60-tih godina prošlog stoljeća (već spomenuta knjiga Rachel Carson „Silent Spring“ kao i otkriće negativnog utjecaja onečišćivala u okolišu poput DDT-a i metil-žive). Nakon shvaćanja da čovjek uzrokuje nakupljanje toksičnih tvari u okolišu i organizmima koji ga nastanjuju uključujući i samog čovjeka intenzivirala su se istraživanja koja su mjerila koncentracije kemijskih tvari u okolišu (voda, tlo, zrak, biota). Kemijske analize okoliša pružaju vrijedne podatke, no ne daju informacije o djelovanju izmjerenih koncentracija na biološku komponentu. Osim toga kemijske analize često daju samo trenutni uvid u stanje okoliša (primjerice uzorak riječne vode) i imaju relativno visoku cijenu. Stoga u istraživanjima procjene utjecaja onečišćenja na okoliš (i ljude) dolazi do povećanog istraživanja reakcija biološke komponente okoliša odnosno mjerenja reakcija organizama na onečišćenje.

Biološke analize, za razliku od kemijskih, mogu dati informacije o djelovanju onečišćenja na biološku komponentu (proporcionalno biološki dostupnoj količini onečišćivala) i pružaju kumulativnu informaciju o jednom duljem vremenskom razdoblju, no često ne daju dovoljno informacija o uzroku uočenih promjena (vrsti onečišćenja). U takve **biološke analize** ubrajamo bilo koju analizu/mjerenje koja ukazuje na interakciju između biološkog sistema i potencijalno štetnog kemijskog (ali i fizikalnog ili biološkog) djelovanja. Radi lakšeg razumijevanja podijeliti ćemo ih na laboratorijske testove toksičnosti ili biotestove i biološke reakcije okoliša. Biotestovi analiziraju djelovanje uzorka okoliša (vode, sedimenta, tla) ili određene kemikalije na organizme/stanice u kontroliranim uvjetima (laboratorij) dok biološke reakcije okoliša podrazumijevaju reakcije koje bilježimo u prirodnim populacijama ili izlaganjem jedinki u prirodi odnosno in situ<sup>2</sup>.

### 6.1.1 Biotestovi – animalni i biljni testni organizmi

Biotestovi koji se najčešće koriste u procjeni rizika za okoliš od djelovanja onečišćenja su standardizirani ekotoksikološki testovi gdje su laboratorijski test organizmi (ili kulture stanica) izloženi uzorku okoliša u kontroliranim standardnim uvjetima kako bi rezultati bili međusobno usporedivi između različitih laboratorija. U ovom dijelu priručnika spomenuti ćemo samo neke od najčešće korištenih test organizama koji spadaju u praživotinje, životinje, alge i biljke<sup>2</sup>.

Jedan od najpoznatijih standardiziranih biotestova koji kao modelni organizam koristi praživotinje *Tetrahymena thermophila*) je **Microtox** (ISO 11348-3. 2007). Navedeni test prati rast kulture praživotinja (odnosno procjenjuje njihovu biomasu) kako bi se utvrdilo postoji li inhibicija rasta kulture kao posljedica toksičnog djelovanja. Procjenjuje se prema potrošnji

hrane tako što se mjeri optička gustoća medija (suspenzija hrane) koja će biti veća ukoliko su praživotinje inhibirane toksičnim djelovanjem.

Uz ribe najpoznatiji i najkorišteniji testni vodeni organizam je planktonski račić iz roda *Daphnia* (vrste: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*). **Daphnia test** je zapravo imobilizacijski test u kojem mjerimo postotak nepokretnih jedinki nakon (24 i 48 h) izlaganja ispitivanom uzorku. Prednosti ovog standardiziranog testa (ISO 6341:2012) su njegova relativna jednostavnost i brzina, osjetljivost, te dostatnost malih količina uzorka. Test koristi jedinke dafnija stare 24 h dobivene iz jajašaca partenogenetskih ženki što znači da su sve korištene jedinke ženke klonovi i da je moguća usporedba rezultata između svih tako dobivenih organizama. U gotovim komercijalnim laboratorijskim kitovima kupuju se zimska jaja koja imaju poseban jajni ovoj ephippium od odebljalog specijalnog dijela ženkinе ljuske (hitinske čahurice) s leđne strane te mogu ostati u stanju mirovanja godinama (do 12 g), preživljavajući smrzavanje i isušivanje.

Postoje i drugi zooplanktonski organizmi koji se mogu koristiti u ovakvim istraživanjima toksičnosti: račići - rašljoticalci (Cladocera) i veslonošci (Copepoda), te kolnjaci (Rotifera). Kolnjaci imaju istu prednost kao i vodenbuhe - partenogenetske ženke produciraju čiste linije (klonovi) koje se koriste u testiranjima (ISO 19827:2016).

Od riba (Actinopterygii) najpoznatiji testni organizam sigurno je *Danio rerio* – zebrica.

**Test toksičnosti na ribljim embrijima** (ISO 15088:2007, ISO 15088:2009) analizira nepravilnosti u prvih 96 h razvoja embrija riba zebrica. Odstupanja od normalnoga rasta i razvoja jedinke - te njezine anatomske i morfološke promjene mogu biti indikator toksičnoga djelovanja onečišćenja posebice tijekom osjetljivog, embrionalnoga razvoja organizma. Rast i razvoj organizma može biti i usporen, a mogu se pojaviti i različite malformacije kao što su primjerice: koagulacija embrija, nepravilnosti u formiranju somita i repa, pigmentacija tijela i dr.

Budući da su alge i biljke proizvođači kisika i početni organizmi svakog prehrambenog lanca nužno je znati kako pojedini onečišćivači okoliša na njih djeluju. Testiranje toksičnosti herbicida (pesticid za suzbijanje korova) obavezno se izvodi na fotosintetskim organizmima (algama i biljkama) jer herbicidi nemaju učinak na životinje.

Laboratorijski testovi s akvatičnim biljnim vrstama se najčešće izvode kao statički test, no mogu se izvoditi kao testovi s periodičkim obnavljanjem hranjive podloge i kao protočni testovi.

Alge su u pravilu jednostanični, višestanični ili zadružni fotoautotrofni eukariotski organizmi bez diferenciranih tkiva koji fotosintezom proizvode gotovo polovinu atmosferskog kisika na Zemlji, a time i ugljikohidrate koje potom upotrebljavaju ostali organizmi<sup>1</sup>. Alge stoga (naročito mikroalge) zauzimaju važno mjesto kao primarni producenti u akvatičkim ekosustavima i

osnovasu mnogih prehrambenih lanaca. Stoga je poznavanje učinka toksikanata na alge kao i na ostale komponente prehrambenog lanca vrlo važno.

**Testovi toksičnosti na algama** (Tablica 6) izvode se kao test inhibicije rasta (48-72h) (USEPA, 1996; OECD, 2002; OEHHA, 2004).

**Tablica 6.** Vrste alge koje se koriste u biotestovima.

Vrsta	Habitat	Preporučeni sojevi
Zelene alge		
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (prije <i>Selenastrum capricornatum</i> ) <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	slatkovodne slatkovodne slatkovodne	ATCC22662, CCAP278/4, 61.81 SAG 86.81 SAG
Dijatomeje		
<i>Naviculla pelliculosa</i> <i>Skeletonema costatum</i>	slatkovodne morske	UTEX 664
Cijanobakterije		
<i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Synechococcus leopoliensis</i>	slatkovodne morske	UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A UTEX 625, CCAP 1405/1

**Testovi toksičnosti na biljkama** se također uglavnom izvode kao testovi inhibicije rasta.

Neki makrofiti imaju svojstva koja ih čine pogodnima za toksikološka istraživanja, a među njima je većina vrsta iz porodice Lemnaceae. One su osjetljive, brzo se razmnožavaju i lako kultiviraju. Zahvaljujući brzom razmnožavanju u kratkom vremenu se mogu dobiti genetički jednake biljke (klonovi). Prednost vodenih makrofita je i činjenica da oni nisu toksikantu izloženi samo preko korijena, već i većim dijelom ili čak čitavom svojom površinom (plutajući makrofiti). Laboratorijski testovi na vodenim makrofitima izvode se na sličan način kao i oni na algama<sup>3</sup>.

U ovom će poglavlju biti riječi o **Lemna-testu**. U tom se biotestu kao testni organizmi koriste više vrsta iz porodice Lemnaceae, ali najčešće *Lemna minor*, *L. gibba*, *Spirodela polyrrhiza* i *Wolffia arrhiza*.

Međunarodna organizacija za standardizaciju (The International Organisation for Standardisation - ISO) i Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj (The Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD) je 2004. g. razvila standardizirani protokol

Lemna-testa (ISO 20079) (ISO 2004, OECD 2004). Test se izvodi kao 7-dnevni statički test toksičnosti u kojem se prati inhibicija rasta *L. minor* (preporučeni klonovi DWC118, 9439, 9553). Dok su OECD testovi primarno bili usmjereni na toksične tvari i produkte, ISO testovi su specifično razvijeni za uzorke iz okoliša. Iako, izuzev hranjive podloge, ISO i OECD testovi su prilično slični. Parametri inhibicije i vrijednosti efektivne koncentracije u ISO standardu se temelje na stopama rasta. Time je po prvi put omogućena pouzdana usporedba toksičnosti između testova s istim vrstama (*L. minor*) koje imaju različite stope rasta, testova s različitim vrstama iz porodice vodenih leća (*L. gibba*, *Spirodela polyrrhiza*) i testova s različitim vrstama iz različitih rodova.

S jedne strane vodene leće su visoko osjetljive biljne vrste, a s druge jako tolerantni organizmi sposobni akumulirati toksične tvari. Objašnjenje ovoga nalazi se u njihovoj mogućnosti prilagodbe određenim uvjetima. Ako se kultura vodene leće nalazi u optimalnim uvjetima, biljka će odgovarati na dodatak toksičnih tvari promjenom brzine razmnožavanja i drugim pokazateljima. No, u prisustvu subletalnih količina nekih tvari biljka će zahvaljujući brzom razmnožavanju i sposobnosti pohranjivanja toksičnih tvari u vakuolu preživjeti takve nepovoljne uvjete.

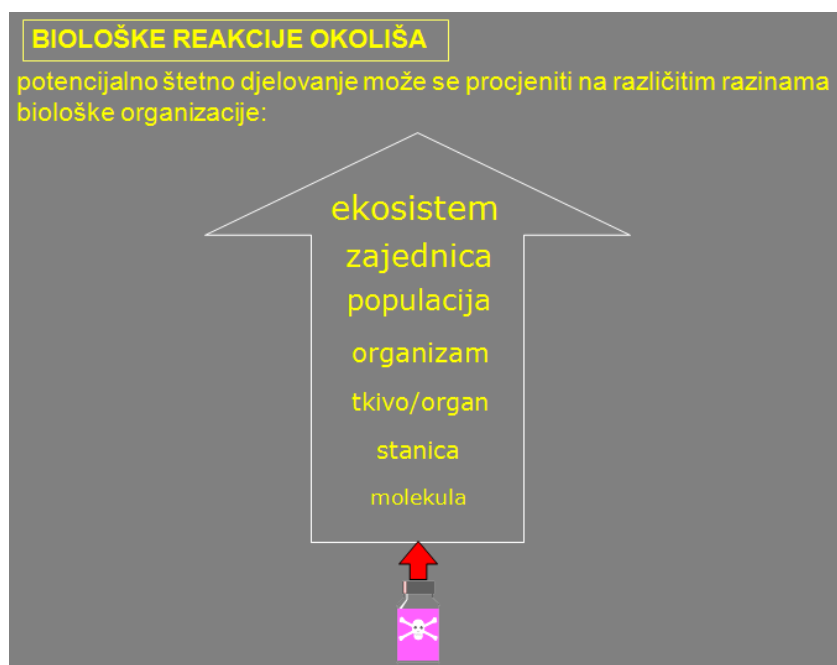
Lemna-test se već niz godina koristi u biljnoj fiziologiji i fitokemiji za određivanje biološke aktivnosti različitih tvari te u toksikologiji za procjenu toksičnosti pojedinih kemikalija<sup>4</sup>. Tvari čiji se učinak želi istražiti dodaju se u tekuću hranjivu podlogu na kojoj se uzgaja neka od vrsta iz porodice Lemnaceae. Na temelju rasta i razvoja biljaka procjenjuje se učinak ili toksičnost istraživanih tvari. U prirodi su vodene leće nađene na staništima koja su imala pH vrijednost prirodne vode u rasponu od 3.5 do 10.5. Dugotrajni rast bez uočljive inhibicije moguć je u uvjetima pH vrijednosti od 5 do 8.

Prilikom korištenja laboratorijskih testova toksičnosti potrebno je imati u vidu i njihove nedostatke. Postavlja se pitanje usporedbe dobivenih rezultata u laboratorijskim i prirodnim uvjetima gdje postoji velika razlika u abiotičkim i biotičkim faktorima (biološka raspoloživost, zdravstveno stanje, uhranjenost životinja). Veliki nedostatak biotestova je uglavnom njihova kratkotrajnost, zatim relativno mali broj "uhodanih" vrsta za testiranje koje onda potenciraju veći raspon interspecijskih razlika i ekstrapolaciju rezultata između različitih životinjskih skupina<sup>2</sup>.

### 6.1.2 Biološke reakcije okoliša

Biološke reakcije okoliša na onečišćenje možemo detektirati pomoću reakcija organizama u njihovom prirodnom okolišu. Reakcije se mogu pratiti na svim razinama biološke organizacije od molekularne razine do razine populacija, zajednica i čitavih ekosistema (Slika 8). Promjene

koje se dešavaju na višim razinama biološke organizacije nazivamo ekološkim indikatorima i obično su rezultat dugotrajnijeg negativnog učinka onečišćenja.

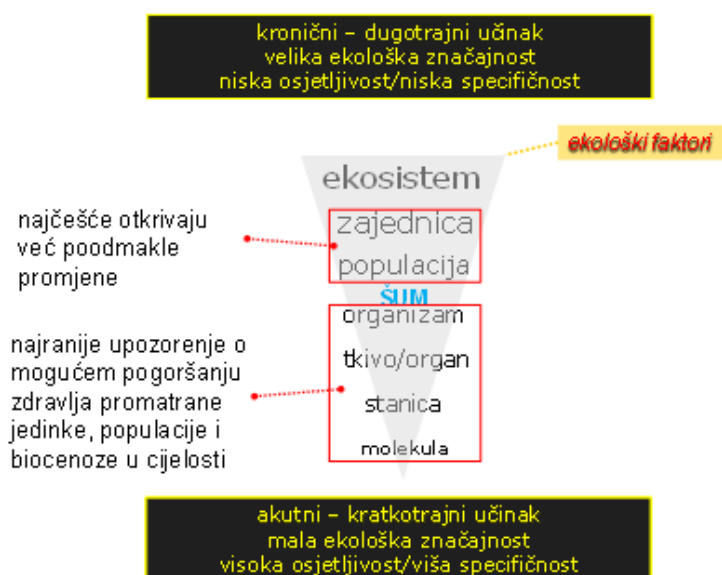


**Slika 8.** Biološke reakcije okoliša na različitim razinama biološke organizacije. (prilagođeno prema McCarthy i Shugart, 1990).

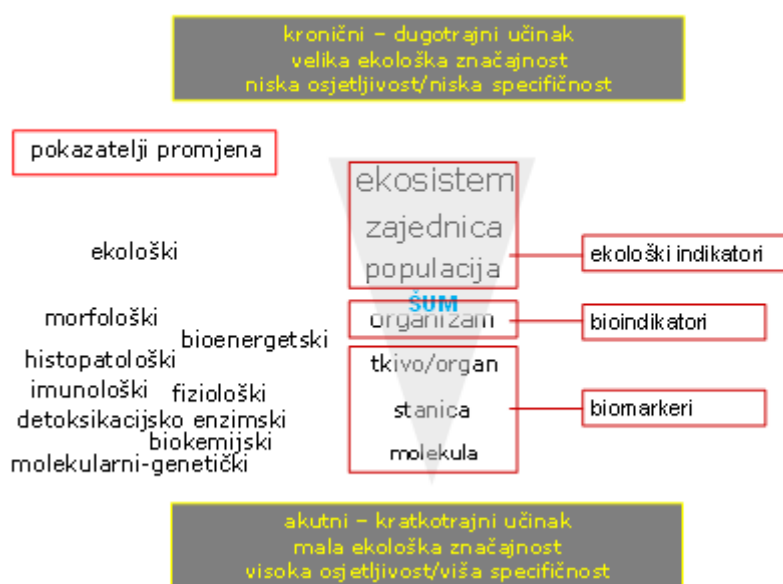
Kada se takve promjene dogode imaju veću ekološku značajnost a istovremeno često, zbog djelovanja mnogobrojnih ekoloških faktora (uz onečišćenje – tzv. šum), nisu indikativne o uzroku koji ih je pokrenuo (Slika 9). Suprotno tome, promjene na nižim razinama biološke organizacije (biomarkeri: molekularna, stanična, tkivna razina) desit će se znatno prije i predstavljaju tako najranije moguće upozorenje o pogoršanju zdravlja promatrane jedinke odnosno populacije (Slike 9 i 10). Takve promjene su većinom rezultat kratkotrajnog učinka jer su takvi pokazatelji promjena osjetljiviji te često možemo lakše detektirati uzrok nastale promjene. Te promjene imaju manju ekološku značajnost od promjena na razini populacija i zajednica. Organizmi čija prisutnost ukazuje na određeno stanje okoliša nazivaju se **bioindikatorskim vrstama**.



## Testni organizmi



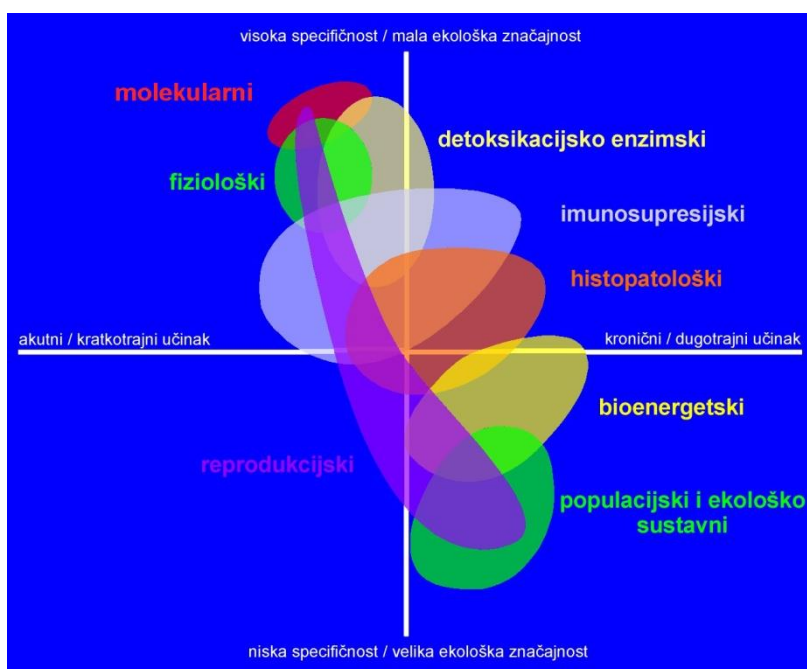
**Slika 9.** Razlike u brzini i važnosti bioloških reakcija okoliša na različitim razinama biološke organizacije (prilagođeno prema McCarthy i Shugart,1990).



**Slika 10.** Pokazatelji promjena na određenim biološkim razinama organizacije i njihove kategorije. (G.Klobučar- prilagođeno prema McCarthy i Shugart,1990).

## Testni organizmi

Treba također naglasiti da svaki poremećaj na staničnoj i molekularnoj razini ne mora nužno biti praćen poremećajem na razini populacije i zajednica, ali svakom poremećaju na razini populacije i zajednica (uzrokovanom onečišćenjem) prethodi poremećaj na staničnoj i molekularnoj razini (Slika 11).



**Slika 11.** Međusobna povezanost promjena izazvanih onečišćenjem na različitim razinama biološke organizacije odnosno njihovi pokazatelji (prilagođeno prema McCarthy i Shugart,1990).

## Testni organizmi

Zadatak:

Testni organizmi su izlagani rastućim koncentracijama industrijskog efluenta (% efluenta) u akutnom testu toksičnosti te se određivao % mortaliteta. Nakon 1h izlaganja su dobivene slijedeće vrijednosti.

% efluenta	izloženi	živi	mrtvi	% mortaliteta nakon 1h
0%	10	8	2	0%
10%	10	8	2	0%
18%	10	9	1	0%
32%	10	10	0	10%
56%	10	10	0	20%
100%	10	10	0	20%

U Excelu (ili bilo kojem sličnom odgovarajućem programu) nacrtajte graf (na x os % efluenta, na y os % mortaliteta) tj. krivulju koncentracija-odgovor nakon 1h izlaganja.

Nakon 24 i 48h izlaganja su dobivene slijedeće vrijednosti % mortaliteta (pri istim % efluenta):

% mortaliteta nakon 24h	0%	10%	25%	60%	95%	100%
% mortaliteta nakon 48h	0%	15%	35%	83%	100%	100%

Na isti graf (gdje je vidljiva krivulja nakon 1h izlaganja), umetnite krivulju koncentracija-odgovor nakon 24 i 48h izlaganja te izračunajte odgovarajuće LC50 (najtočnije koliko možete).

### Literatura:

<sup>1</sup>Ma J, Zheng R, Xu L, Wang S (2002b) Differential Sensitivity of Two Green Algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 Pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 52: 57-61.

<sup>2</sup>McCarthy, J. and Shugart, L. (1990). Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publ. Boca Raton. USA.

<sup>3</sup>Wang W (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Res* 52: 7-22.

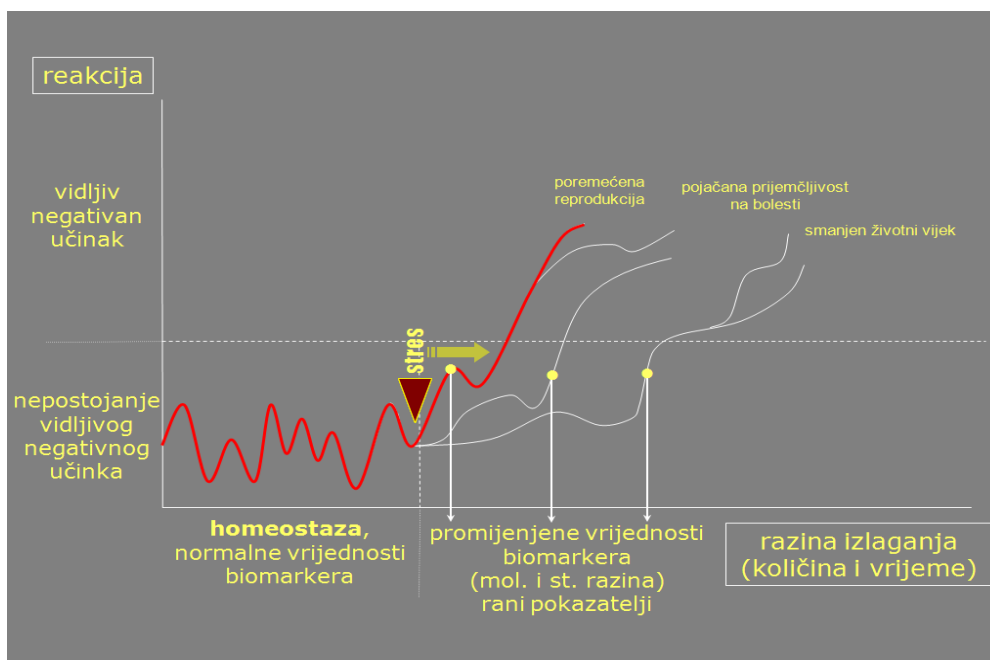
<sup>4</sup>Wang W (1992) Use of plants for the assessment of environmental contaminants. *Rev Environ Contam Toxicol* 126: 87-127.

## 7. Biomarkeri u biomonitoringu

### 7.1 Biološke reakcije okoliša - analize populacija i zajednica

Vrste su uglavnom rezultat njihove specifične evolucije u određenom okolišu. Promjene u sastavu zajednica i karakteristikama populacija određenih vrsta rezultat su promjena uvjeta staništa u što spada i njegovo onečišćenje. Navedene promjene na razini populacija i zajednica obraditi će drugi autori u sklopu ovog priručnika. Ipak, spomenuti ćemo samo jednu stvar koja je bitna u svim ekotoksikološkim istraživanjima. Kako bi utvrdili ima li promjena u ekosistemu koje su uzrokovane onečišćenjem trebamo uvijek imati kontrolni odnosno referentni uzorak. To bi mogao biti uzorak koji je uzet prije nego su nastupile promjene u slučaju da smo pratili stanje prije djelovanja onečišćenja što je moguće, ali zapravo vrlo rijetko (npr. neke gospodarski važne vrste). Uglavnom odabiremo stanište za koje znamo da nije izloženo stresu – kontrolnu postaju, a koja je vrlo slična staništu koje je predmet procjene utjecaja onečišćenja.

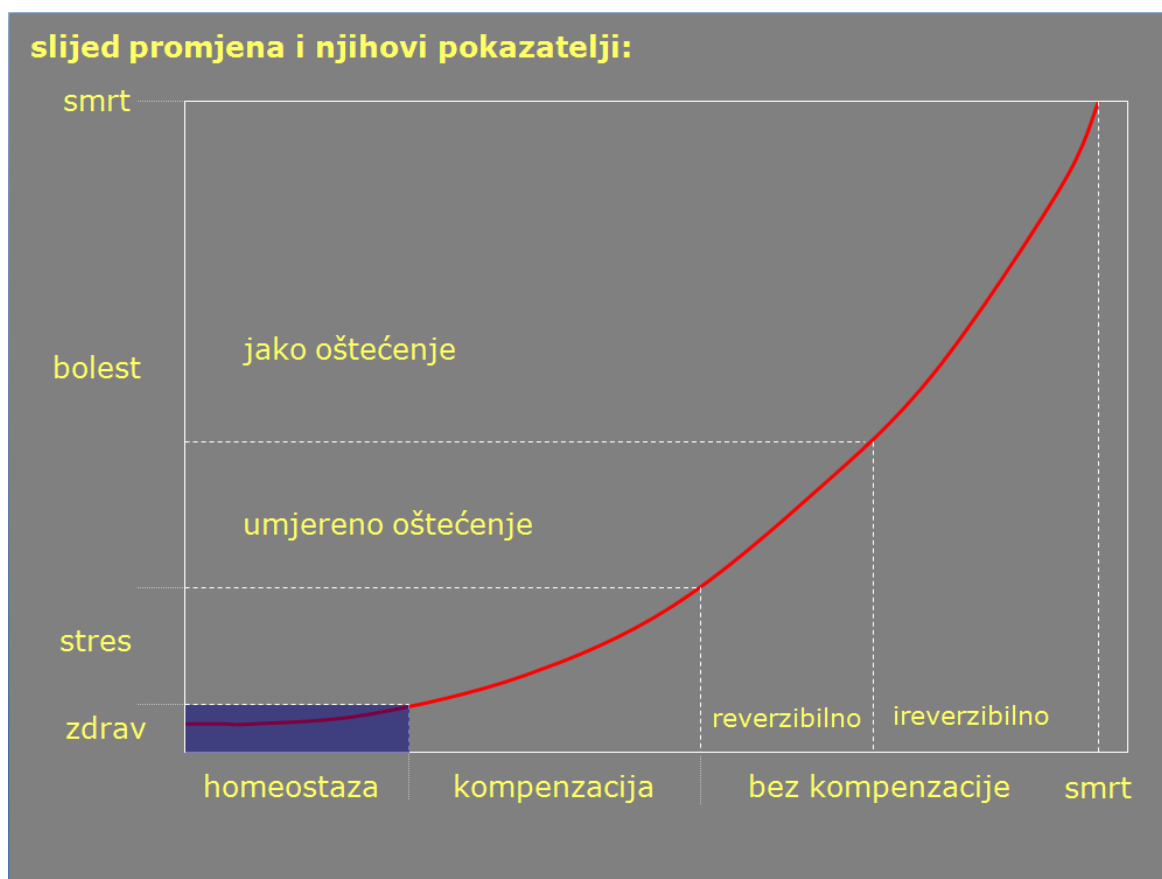
U normalnim uvjetima i bez prisutnosti stresa izazvanog onečišćenjem mjerene biološke vrijednosti kreću se u određenom intervalu normalnih vrijednosti karakterističnom za homeostazu (Slika 12). Nakon djelovanja stresora (onečišćenje) te se vrijednosti mogu promijeniti što može izazvati vidljiv negativni učinak kao što je primjerice povećani mortalitet, smanjena reproduktivna sposobnost ili povećana prijemljivost na bolesti i sl. Potrebno je stoga utvrditi promijenjene vrijednosti biomarkera prije nego li nastupe takve promjene<sup>4</sup>.



**Slika 12.** Promjene vrijednosti određenih biomarkera u odnosu na pojavu stresa uzrokovanog onečišćenjem (prilagođeno prema Van der Oost i sur. 1993).

Slijed bioloških promjena uzrokovanih toksičnim djelovanjem onečišćivala možemo podijeliti u tri glavne faze (Slika 13) od kojih svaka uključuje specifične pokazatelje odnosno biomarkere:

1. aktiviranje kompenzacijskih mehanizama odnosno povišenje ili smanjenje jednog ili više staničnih ili fizioloških procesa koji su sastavni dio održavanja homeostaze u organizmu (detoksikacijski enzimi, antioksidativni enzimi, stres proteini i sl.)
2. ako se izlaganje nastavi ili pojača, kompenzacijski mehanizmi bivaju nadvladani i javljaju se prva umjerena oštećenja, a s njima i fiziološki mehanizmi popravka oštećenja DNA (destabilizacija membrana, histopatologija, imunološke metode, bioenergetika npr. lipidi, indeksi kondicije)
3. slijede jača oštećenja i ozbiljnije slabljenje organizma (smanjenje težine, povećanje jetre...) te eliminacija organizma iz populacije (analize populacije, analize zajednice)<sup>1</sup>.



**Slika 13.** Slijed bioloških promjena uzrokovanih toksičnim djelovanjem onečišćivala. (prilagođeno prema Depledge i sur., 1993).

U ovakvom mnogostrukom odgovoru organizama na neko toksično djelovanje nije cilj utvrditi točnu dozu toksikanta (ili njihove mješavine) kojem je organizam izložen već odrediti gdje je istraživana populacija smještena na ovom kontinuumu/prijelazu između homeostaze i bolesti<sup>3</sup>.

Mnogi molekularni i stanični biomarkeri su mjerenja staničnih i fizioloških procesa koji pokušavaju održati normalan metabolizam / homeostazu (odgovarajuće uvjete za normalan život tog organizma - kompenzacijski mehanizmi). Biomarker je relevantniji što ga se bolje može povezati sa smanjenjem vjerojatnosti preživljavanja i razmnožavanja promatranih organizama (Darwinian fitness).

Koje kriterije bi trebao zadovoljiti dobar biomarker? Analiza mora biti osjetljiva, pouzdana i što jednostavnija. Prirodna razina/aktivnost biomarkera treba biti poznata kako bi se mogle razlučiti promjene izazvane toksikantom od normalne/prirodne varijabilnosti. Treba dobro poznavati biologiju proučavanog organizma kako bi se minimalizirali izvori prirodnih varijacija – već prije spomenuti "šum" (rast i razvoj, reprodukcija, vrsta hrane). Trebali bi biti poznati svi vanjski i unutrašnji faktori koji utječu na dobivene vrijednosti biomarkera. Endogeni faktori: fiziologija organizma, zdravstveno stanje, starosna dob, plijen/predator stres, sezonske varijacije, reproduktivna faza, spol, aktivnost kompenzacijskih mehanizama i aktivnost mehanizama popravka, aklimacija, adaptacija, razlike u genotipu i dr. Egzogeni faktori: fizikalno-kemijski faktori okoliša (temperatura, koncentracija kisika, pH i dr.), promjena staništa, vrsta i količina hrane. U vanjske faktore naravno uključujemo i onečišćenje (koncentracija toksikanata, trajanje izlaganja, fizikalno-kemijske karakteristike medija i kemikalije, interakcija s drugim kemikalijama, način ulaska toksikanata u organizam i dr.). Također, poželjno je da upotreba biomarkera ne zahtijeva žrtvovanje proučavanih jedinki.

## 7.2 Biološke reakcije okoliša - promjene na razini organizma

Promjena u ponašanju je vrlo osjetljivi pokazatelj djelovanja onečišćivala na razini organizma koji se zbog svoje osjetljivosti sve više koristi u ekotoksikološkim procjenama. Pri tome se prate razne promjene brzine reagiranja na različite stimulanse, stupanj aktivnosti, hranjenje, respiratorne aktivnosti, reproduktivno ponašanje, odnos plijen-predator, socijalne interakcije i dr.).

Jedan od najjednostavnijih pokazatelja stanja organizma koji se mogu primijeniti u procjeni onečišćenja okoliša je indeks kondicije (IK). Primjerice u školjkaša to može biti omjer između suhe težine mekog tkiva i dužine ljuštare ili suhe težine mekog tkiva i suhe težine ljuštare ili pak ukupne težine jedinke i njene dužine dok za ribe to može biti omjer ukupne težine i dužine. Ipak, IK se ne mogu upotrebljavati samostalno u procjeni onečišćenja okoliša već je njihova vrijednost kao dodatnih parametara koji mogu pojasniti vrijednosti ostalih bioloških pokazatelja/biomarkera. Nešto specifičniji odgovor daju organosomatski indeksi koji iskazuju

omjer težine određenog organa prema cijelom organizmu npr. jetreni indeks čiji porast (veća jetra) može indicirati izloženost toksikantu ili gonadni indeks koji može indicirati pojačanu rasplodnu aktivnost.

Anatomske i morfološke promjene mogu biti posljedica stresa izazvanog djelovanjem antropogenih kemikalija u najosjetljivijim periodima rasta i razvoja organizma

Svaki organizam teži optimalnom razvoju u određeni fenotip i bilo koji suboptimalni okolišni faktor koji ima negativno (toksično) djelovanje dovoljno da izazove stres može poremetiti razvojnu stabilnost (engl. developmental stability) pri čemu stanice u stresu prolaze niz, često nepovratnih, biokemijskih i strukturnih promjena. Organizam reagira na utjecaje okoliša pomoću kompleksnog fiziološkog sustava homeostatskih ili ublažavajućih mehanizama (aktivnih i u odgovoru na djelovanje onečišćivala) koji reguliraju optimalni razvoj jedinke. U stresnim situacijama ovi homeostatski mehanizmi popuštaju i prestaju djelovati što može izazvati promjene u razvoju i promjene u fenotipu populacije odnosno promjenjivu asimetriju (engl. fluctuating asymmetry - FA) što se uzima kao mjera razvojne stabilnosti odnosno stresa za vrijeme razvoja jedinke. Dakle, promjene u okolišu mogu uzrokovati promjene u izgledu životinja (promjenu simetrije, razne deformitete i sl.). Najčešće se to vidi u malim odstupanjima od idealne (bilateralne) simetrije (npr. broj vena u lijevom i desnom krilu kukaca, lijeva i desna strana lista i dr.). Promjene se mogu pratiti u bilo kojim bilateralno simetričnim životinjskim organizmima, ali i u biljnim organizmima (širina lijeve i desne plojke lista ili iglica crnogorice u jednom paru). U riba se često prati simetrija (broj šipčica) prsnih i trbušnih peraja<sup>2</sup>. U pravilu se u prirodnim populacijama, pod konstantnim uvjetima sredine, održava određena niska razina asimetrije. Nedostatak ovog parametra kao biomarkera onečišćenja je povećanje asimetrije prilikom narušavanja ravnoteže gena (protok gena od druge populacije) i promjenom faktora okoliša.

Već smo spominjali test toksičnosti na ribljim embrijima (engl. fish embryo toxicity test, FET) gdje se analiziraju nepravilnosti u prvih 96 h razvoja embrija riba zebrića (*Danio rerio*). Bilježe se odstupanja od normalnoga rasta i razvoja jedinke te njezine anatomske i morfološke promjene - indikator toksičnoga djelovanja onečišćenja tijekom osjetljivog, embrionalnoga razvoja organizma.

Na embrijima zebriće, ali i na svim ostalim organizmima koje nađemo u onečišćenom okolišu mogu se provesti histološke analize u kojima se traga za pojavom abnormalnog tkiva kao posljedice prisutnosti toksikanata u okolišu koji mogu prouzročiti varijacije ili promjene u raznim organima kao posljedicu patoloških promjena na staničnoj i tkivnoj razini. Takve histopatološke promjene često su dio ekotoksikoloških istraživanja i mogu se koristiti kao biomarkeri onečišćenja okoliša. Pri tome se često istraživanja usmjeravaju na određene organe/organske sustave koji su izloženiji djelovanju toksikanata: dišni sustav, jetra, hematopoetski organi, tjelesne tekućine, reproduktivni sustav i dr. Uočavaju se promjene kao

što su: hipertrofija tkiva, različiti upalni procesi, neoplazije (povećanje broja stanica (hiperplazija) koje je, barem djelomično uzrokovano nasljednim abnormalnostima tih stanica), tumori, karcinomi, nekroza tkiva i dr. Analiza histopatoloških promjena je uglavnom kvalitativna i temelji se na procjeni osobe koja provodi analizu.

Imunosni sustav se smatra jednim od sustava koji su najpodložniji utjecaju onečišćenja. On održava homeostazu u uskoj suradnji s neuroendokrinim sustavom što čini imunosne procese posebno osjetljivim na okolišni stres, odnosno toksikante. Svaka se ozbiljnija ili dugotrajnija promjena u okolišu odražava u promjeni funkcionalne aktivnosti imunokompetentnih stanica (npr.: diferencijalni i ukupni broj stanica tjelesne tekućine, fagocitna aktivnost stanica tjelesne tekućine, vrijeme aglutinacije i dr.). Često se u procesima procjene onečišćenja okoliša koriste imunološke metode kao što je mjerenje fagocitne aktivnosti hemocita mekušaca. Za razliku od kralježnjaka, beskralježnjaci nemaju limfni sustav niti visokospecifična protutijela te je fagocitoza glavni mehanizam unutrašnjeg obrambenog sustava mekušaca a utjecaj onečišćenja uglavnom možemo detektirati kroz pad fagocitne aktivnosti.

Nadalje, histokemijske /citokemijske metode omogućavaju proučavanje promjena u staničnoj biokemiji te strukturi tkiva i pripadajućih stanica dajući tako informaciju o promijenjenoj fiziologiji životinje pa se i one često koriste u procjeni onečišćenja okoliša. Lizosomski sustav je vrlo osjetljiv na djelovanje toksikanata. Lizosomi su stanični organeli sa semipermeabilnom lipoproteinskom membranom koji se nalaze u gotovo svim eukariotskim stanicama i sadržavaju mnoštvo hidrolitskih enzima. Lizosomska membrana predstavlja zaštitnu barijeru između lizosomskih hidrolitskih enzima i ostatka stanice. Lizosomi su uključeni u katabolizam endogenih i egzogenih spojeva i makromolekula, te u akumulaciju i detoksikaciju različitih organskih i anorganskih toksikanata, sudjeluju u imunološkom odgovoru, reprodukciji, embriogenezi, apoptozi a porast propusnosti lizosomske membrane dobro je poznata reakcija na širok opseg okolišnih onečišćivala<sup>3</sup>.

Osnovne metode za mjerenje stabilnosti lizosomske membrane u mekušaca su zadržavanje vitalne boje neutralnog crvenila u lizosomima i detektiranje izvanlizosomalne aktivnosti hidrolitskog enzima  $\beta$ -N-acetilheksozaminidaze.

Analize enzimatske aktivnosti vrlo su često dio procjene utjecaja onečišćenja na okoliš. Tako se kao pokazatelj aktivnosti faze i detoksikacije mjeri aktivnost enzima nespecifične monooksigenaze O-deetilacijom etoksirezorufina (EROD) u tkivu organizama za koje se pretpostavlja da su izloženi onečišćenju. Ukoliko se sumnja na onečišćenje okoliša pesticidima iz skupine organofosfata i karbamata analizira se aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) koju ovi insekticidi inhibiraju i tako sprječavaju hidrolizu neurotransmitera acetilkolina u sinapsama živčanih stanica u kolin i octenu kiselinu što može rezultirati u abnormalnoj respiraciji, kretanju, hranjenju te promijenjenim socijalnim interakcijama. Postoji mnoštvo enzima čija se aktivnost može mjeriti kako bi se detektrale promjene uzrokovane onečišćenjem



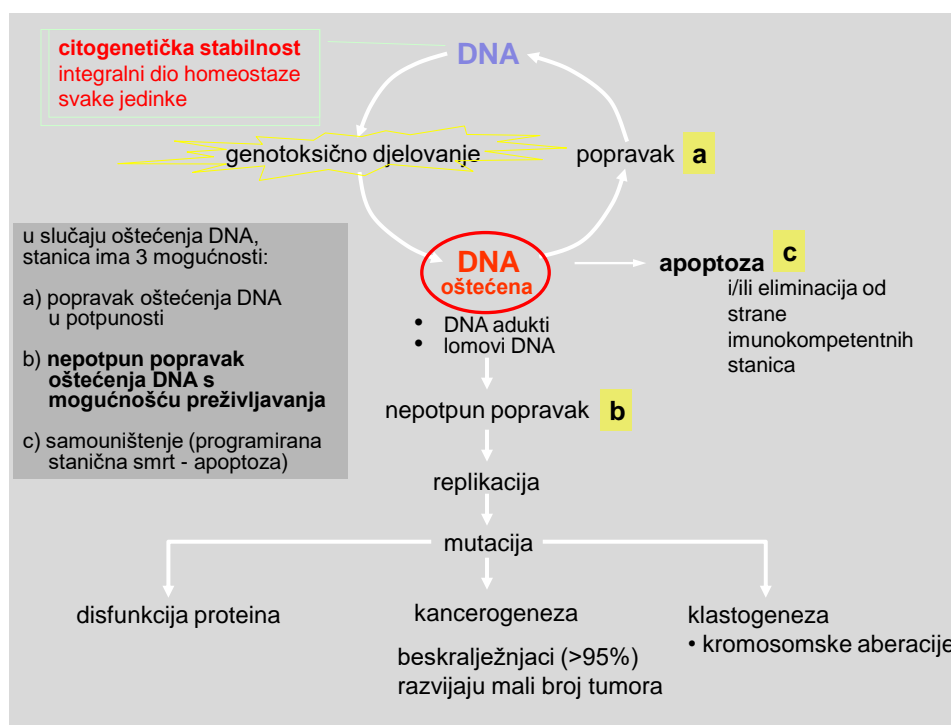
(npr. delta aminolevulinat dehidraza, adenozin trifosfataza, piruvat kinaza, laktat dehidrogenaza i dr.).

Osim enzima postoji još jedna velika skupina proteina koja je vrlo korisna u procesima detekcije toksičnog utjecaja a to su stresni proteini (SP). Oni se nalaze u svim eukariotskim stanicama - visoko su konzervirani i većinom nespecifični. Aktiviraju se pri staničnom stresu izazvanom različitim djelovanjima (povišena temperatura, UV svjetlo, teški metali, oksidativni stres, anoksija, ksenobiotici...) dok se istovremeno u organizmu suprimira sinteza ostalih staničnih proteina. SP imaju važnu ulogu u homeostazi proteina: štite ih od denaturacije i agregacije uvjetovane izlaganjem ekstremnijim fizikalnim ili kemijskim uvjetima tako što se vežu na hidrofobne regije, uređuju pravilno savijanje i sastavljanje proteina u njihovu funkcionalnu konformaciju a pretpostavlja se da mogu i popravljati denaturirane proteine. Dijele se na: 1. **heat shock proteine** (HSP) koji su bili prvobitno povezani s povišenjem temperature, 2. **glukozom regulirani proteine** (GRP) koji su dio staničnog odgovora na nedostatak glukoze i hipoksiju kao i kod poremećaja homeostaze kalcija (strukturalno i funkcionalno povezani sa HSP) i 3. **stres specifični proteine** (SSP) npr. MT, hem oksigenaze koji nisu strukturalno ni funkcionalno povezani s prethodnim grupama (nema značajne indukcije pri temperaturnom stresu). Metalotioneini se smatraju specifičnim biomarkerom za onečišćenje teškim metalima, topivi, termostabilni proteini male molekularne težine (6-7 kDa) koji posjeduju veliki afinitet prema kationima teških metala (Cu, Cd, Hg, Zn i dr.).

U posljednjih nekoliko desetljeća sve je više znanstvenih dokaza da određene kemikalije imaju sposobnost narušavanja hormonske homeostaze. Takvi endokrini modulatori imitiraju ili blokiraju djelovanje spolnih hormona (testosteron i estrogen) ili djeluju na njihov metabolizam. Okolišni androgeni su kemikalije koje oponašaju androgene hormone, a okolišni estrogeni (ksenoestrogeni) su kemikalije koje oponašaju estrogene hormone i imaju estrogeno djelovanje. Svi ti spojevi izazivaju promjene u razvoju spolnih organa, ponašanju (razmnožavanje) i plodnosti životinja.

Za detekciju estrogenog djelovanja najčešće se mjeri sposobnost kemikalije ili medija da izazove sintezu žumanjčanog proteina vitelogenina. Vitelogenin se, pod kontrolom spolnih hormona, proizvodi u jetri i krvlju putuje u oocite. Samo odrasle ženke proizvode vitelogenin u velikim količinama dok u mužjaka dolazi do porasta koncentracije vitelogenina pod utjecajem ksenoestrogena. Pojava vitelogenina u krvi mužjaka ili juvenilnih (spolno nezrelih) riba indicira povećanje prisutnosti ksenoestrogena i vjerojatnu feminizaciju odnosno demaskulinizaciju čitave populacije što ima za posljedicu smanjenje nataliteta i brojnosti populacije. Za detektiranje i kvantificiranje povećane produkcije vitelogenina u krvi oviparnih kralježnjaka koriste se specifična protutijela u osjetljivoj kompetitivno imunokemijskoj metodi – ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Citogenetička stabilnost integralni je dio homeostaze svake jedinke. Postoje mnoge tvari čije djelovanje izaziva oštećenje DNA. U tom slučaju stanica ima 3 mogućnosti: a) popravak oštećenja DNA u potpunosti, b) nepotpun popravak oštećenja DNA s mogućnošću preživljavanja, ili c) samouništenje (programirana stanična smrt - apoptoza) (Slika 14). Najveći problem za organizam predstavlja nepotpun popravak oštećenja DNA stanice pri čemu potencijalna mutacija može izazvati različite negativne posljedice za organizam ali i njegove potomke<sup>3</sup>.



**Slika 14.** Posljedice oštećenja DNA: a) popravak oštećenja DNA u potpunosti, b) nepotpun popravak oštećenja DNA s mogućnošću preživljavanja, ili c) samouništenje (programirana stanična smrt - apoptoza) (prilagođeno prema Shugart, 1996).

Najranije metode utvrđivanja genotoksičnog djelovanja uključivale su vizualno detektiranje neoplazija (tumor, lokalno bujanje tkiva), kromosomskih aberacija - koje mogu biti brojčane (promjene broja kromosoma – poliploidija (3n, 4n...) ili aneuploidija (2n-1, 2n+1)) ili strukturne kao što je učestalost mikronukleusa u stanicama ili učestalost izmjene sestrinskih kromatida (ISK) i dr.

Mikronukleus (MN) je samostalna kromatinska struktura u citoplazmi koja je potpuno odvojena od jezgre koja može potjecati od zaostalih kromosoma (u anafazi) kao posljedica oštećenja mitotičkog mehanizma (aneugeni učinak) ili od acentričnih kromosomskih fragmenata koji su posljedica oštećene kromosomske strukture (klastogeni učinak). Za nastajanje mikronukleusa nužno je da stanica uđe u diobu. 1959. g prvi puta upotrijebljeno brojanje stanica s MN kao metoda procjenjivanja citogenetičkog oštećenja - mikronukleus-

test (MNT). MNT je primarno korišten kao test na stanicama koštane srži i limfocitima sisavaca, a kasnije je njegova primjena proširena i na druge vrste stanica - smatra se bržim i jednostavnijim od ostalih analiza strukturnih aberacija kromosoma. Metoda je vrlo jednostavna: na fiksirani razmaz tjelesne tekućine (krv, hemolimfa) nanese se specifična boja za DNA i zatim se broje stanice sa mikronukleusom (broji se od 2000 - 10000 stanica po jedinki).

Danas se sve više primjenjuju analize primarnih oštećenja DNA kao što su metode za utvrđivanje DNA adukata i metode alkalne denaturacije DNA ali i druge.

Poznato je da se određeni toksikanti (npr. PAH) mogu u organizmima bioaktivirati u elektrofilne metabolite koji se mogu kovalentno vezati na DNA ili druge molekule u stanicama (proteini, lipidi). Takvi DNA adukti se mogu detektirati radioaktivnim označavanjem (engl.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling) gdje se izoliraju nukleotidi i pomoću polinukleotid kinaze označe radioaktivnim  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  te se razdvoje od ostatka DNA multidimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom (ili elektroforezom) i vizualiziraju autoradiografijom (osjetljivost: 1 adukt na 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> nukleotida ~ 1 adukt po stanici) te se na taj način detektiraju ukupni adukti.

Kao posljedica genotoksičnog djelovanja nastaje kratkotrajna "prijelazna populacija DNA" s različitim vrstama strukturalnih promjena koju nazivamo DNA niskog integriteta (DNAni). Omjer DNA visokog integriteta i DNA niskog integriteta koristi se kao mjera oštećenja DNA.

Očekuje se da će organizmi koji su izloženi genotoksičnom djelovanju imati pomaknutu ravnotežu u smjeru DNAni. Treba naglasiti da je zbog stalne metaboličke aktivnosti u stanici uvijek prisutna određena količina DNAni. Određivanje količine DNAni najčešće se radi pomoću alkalnog ispiranja DNA gdje je danas posebno popularna metoda - Komet test. Tehnikama alkalne denaturacije DNA (u koje spada i Komet test) utvrđuju se: jednolančani lomovi, mjesta osjetljiva na lužnate uvjete, unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein. Metoda se temelji na činjenici da se dvostruka zavojnica DNA počinje odmatati pri izlaganju alkalnoj sredini (pH > 11,8) te da količina odmotane DNA ovisi o količini oštećenja DNA jer odmatanje započinje na mjestu loma DNA.

Komet test (engl. *single cell gel electrophoresis assay*) je mikrogel elektroforeza jezgara u kojoj DNA, ukoliko su prisutni lomovi, migrira prema anodi. Komet testom se dakle mogu utvrditi: lomovi DNA (do nekoliko stotina lomova po stanici), mjesta osjetljiva na lužnate uvjete (apurinska i apirimidinska (AP) mjesta) te unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein. Ovisno o pH mogu se detektirati određena oštećenja, tako pri pH 7-8 detektiramo samo dvolančane lomove, pri pH 12,1 jednolančane lomove, a iznad pH 13 jednolančane lomove i mjesta osjetljiva na lužnate uvjete. Prednost Komet testa pred ostalim citogenetičkim metodama za detekciju oštećenja DNA je što ne zahtijeva mitotički aktivne stanice niti malobrojne i velike kromosome, što je primjenljiv na bilo koji eukariotski tip stanica dok je broj stanica potreban za provođenje testa malen. Komet test je visoko osjetljiv i otkriva oštećenja u pojedinačnim

stanicama (učinci toksikanata često su tkivno i stanično specifični, a ostali testovi daju podatke o oštećenju cjelokupne DNA jedne stanične populacije). Jedini zahtjev je da stanice budu u suspenziji odnosno razdvojene te su baš zato pogodne stanice tjelesnih tekućina.

Literatura:

<sup>1</sup>Depledge MH, Amaral-Mendes JJ, Daniel BRSH., Halbrook RS, Kloepper-Sams P, Moore MN, Peakall DB (1993) The conceptual basis of the biomarker approach. In: Peakall DB, Shugart LR (Eds.) Biomarkers. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

<sup>2</sup>Sanchez-Galan S, Linde AR, Izquierdo JI, García-Vázquez E (1998) Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 412: 219-225.

<sup>3</sup>Shugart LR (1996) Molecular markers to toxic agents. In: Newman MC, Jagoe CH (Eds.) *Ecotoxicology: A hierarchical treatment*, CRC Press, pp. 133-161.

<sup>4</sup>Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.

## 8. Procjena okolišnog rizika od kontaminanata i ekotoksikologija za 21.stoljeće

### 8.1 Razvoj procjene okolišnog rizika od onečišćenja

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do razvoja metodologija koje polako istiskuju klasični (in vivo) pristup toksikološkim istraživanjima koja koriste životinjske test organizme s pristupačnijim verzijama in vitro testiranja na staničnim kulturama i linijama i in silico pristupu zahvaljujući razvoju digitalne tehnologije i računalnog modeliranja<sup>1,4,5</sup>.

Kemijske analize okoliša su neophodne za sveobuhvatnu procjenu okolišnog rizika, ali ne mogu dati informaciju o učinku na biološku komponentu ukoliko nisu odrađena toksikološka istraživanja odnosno ukoliko ne znamo koje su koncentracije spojeva opasne po žive organizme. Nažalost, takav klasičan pristup se ispostavio nedovoljnim i manjkavim zbog visokih troškova testiranja pa je za više od 75% spojeva na tržištu u EU (više od 100000) na raspolaganju nedovoljno podataka o njihovoj toksičnosti<sup>3</sup>. Stoga se danas sve više pokušava dobiti podatke o biološkoj aktivnosti odnosno toksičnosti spojeva izbjegavanjem izlaganja životinja u testovima toksičnosti umjesto kojih se sve više koristi in vitro i in silico pristup odnosno prediktivna (eko)toksikologija (Slika 15)<sup>6</sup>.

	<i>In silico</i> pristup	<i>In vitro</i> profiliranje	Konvencionalno testiranje ( <i>in vivo</i> )
<b>Test sustavi</b>	Računalno	Stanični i molekularni testovi	Testiranje životinjama na
<b>Korištenje životinja u testu</b>	Nema	Minimalno	Ekstenzivno
<b>Troškovi testiranja</b>	\$	\$\$	\$\$\$\$
<b>Trajanje testiranja</b>	dani	dani/tjedni	mjeseci/godine
<b>Potrebna količina spoja za testiranje</b>	Nema	µg - mg	g - kg
<b>Kapacitet (brzina)</b>	srednje do visoko	srednje do visoko	nisko
<b>Doziranje</b>	nije primjenjivo	5 do 10 doza	tipično 3 razine

**Slika 15.** Izvori podataka o toksičnom učinku kemikalija (prilagođeno prema Settivari i sur., 2015).

**Prediktivna toksikologija** zahtijeva povezivanje kemijskih i bioloških podataka u cilju procjene negativnog utjecaja na žive organizme. Razvoj brže i učinkovitije metodologije za procjenu rizika onečišćenja postiže se integracijom analitičkih metoda nove generacije sposobnih za kvantificiranje većeg broja antropogenih spojeva u okolišu s podacima o njihovim kemijskim karakteristikama i biološkim učincima u dostupnim bazama (npr. ToxCast, Comparative Toxicogenomics Database, ECOTOX i sl.) i računalnim (in silico) modeliranjem (modeli kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti; engl. *Quantitative structure-activity relationship* - QSAR). QSAR metoda predviđa biološki učinak (toksičnost) iz kemijske strukture spoja.

Jedan od najpoznatijih i najvažnijih izvora podataka o toksičnim učincima velikog broja spojeva koji se kontinuirano generira korištenjem visokoprotočnog in vitro testiranja toksičnosti koje provodi US EPA je Toxicity ForeCaster (ToxCast) projekt i s njime povezani Tox21 programi<sup>2,4</sup>. U posljednjih desetak godina procijenili su toksično djelovanje više od 10000 spojeva koristeći 1200 in vitro testova kojima su obuhvatili više od 300 signalnih puteva. Takvi podaci o koncentracijama spojeva koje mogu izazvati biološki učinak uspoređuju se s okolišnim koncentracijama kako bi se dobile relevantne procjene okolišnog rizika i prioritizirali spojevi koji imaju veću vjerojatnost naštetiti okolišu (npr. Exposure - Activity Ratio (EAR) = koncentracija izlaganja / bioaktivni učinak (podaci iz ToxCast baze). Osim ToxCast baze podataka postoje i druge baze podataka s informacijama o biološkoj aktivnosti različitih spojeva koje možemo koristiti u procjeni djelovanja na žive organizme i okoliš kao što je Comparative Toxicogenomics Database koja sadrži podatke iz cjelokupne svjetske znanstvene literature o djelovanju većeg broja spojeva na specifične gene ili Search Tool for Interactions of Chemicals (STITCH) koja ima podatke o djelovanju spojeva na određene proteine u organizmima.

#### Literatura:

<sup>1</sup>Babić S, Barišić, J., Stipaničev D, Repec S, Lovrić M, Malev O, Martinović-Weigelt D, Čož-Rakovac R, Klobučar G (2018) Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization. *Sci Total Environ* 643: 435-450.

<sup>2</sup>Brack W, Dulio V, Ågerstrand M, Allan I, Altenburger R, Brinkmann M, Bunke D, Burgess RM, Cousins I, Escher BI, Hernández FJ, Hewitt LM, Hilscherová K, Hollender J, Hollert H, Kase R, Klauer B, Lindim C, Herráez DL, Miège C, Munthe J, O'Toole S, Posthuma L, Rüdél H, Schäfer RB, Sengl M, Smedes F, van de Meent D, van den Brink PJ, van Gils J, van Wezel AP, Vethaak AD, Vermeirssen E, von der Ohe PC, Vrana B (2017) Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and

management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci Total Environ* 576: 720-737.

<sup>3</sup>EEA, 1998: *Chemicals in the European Environment: Low Doses, High Stakes?*

<sup>4</sup>Li S, Villeneuve DL, Berninger JP, Blackwell BR, Cavallin JE, Hughes MN, Jensena KM, Jorgenson Z, Kahl MD, Schroeder AL, Stevens KE, Thomas LM, Weberg MA, Ankley GT (2017) An integrated approach for identifying priority contaminant in the Great Lakes Basin—Investigations in the Lower Green Bay/Fox River and Milwaukee Estuary areas of concern. *Sci Total Environ* 579 :825-837.

<sup>5</sup>Malev O, Lovrić M, Stipaničev D, Repec S, Martinović-Weigelt D, Zanella D, Ivanković T, Đuretec VS, Barišić J, Li M, Klobučar G (2020) Toxicity prediction and effect characterization of 90 pharmaceuticals and illicit drugs measured in plasma of fish from a major European river (Sava, Croatia). *Environ Pollut* 266: 115162.

<sup>6</sup>Settivari RS, Ball N, Murphy L, Rasoulpour R, Boverhof DR, Carney EW (2015) Predicting the future: opportunities and challenges for the chemical industry to apply 21st-century toxicity testing. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 54(2): 214-223.

Co-funded by the  
Erasmus+ Programme  
of the European Union



## *Development of master curricula in ecological monitoring and aquatic bioassessment for Western Balkans HEIs)*

The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Erasmus + Project No ECOBIAS\_609967-EPP-1-2019-1-RS-EPPKA2-CBHE-JP

Development of master curricula in ecological monitoring and aquatic bioassessment for Western Balkans HEIs