

Biološki učinci srebrnih nanočestica na larvalni razvoj ježinaca *Paracentrotus lividus*

Ilijić, Lucia

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:135206>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LUCIA ILIJIĆ

**BIOLOŠKI UČINCI SREBRNIH NANOČESTICA NA LARVALNI RAZVOJ JEŽINCA
*PARACENTROTUS LIVIDUS***

Završni rad

Pula, veljača 2020.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LUCIA ILIJIĆ

BIOLOŠKI UČINCI SREBRNIH NANOČESTICA NA LARVALNI RAZVOJ JEŽINCA
PARACENTROTUS LIVIDUS

Završni rad

JMBAG : 0303060989

Status : redovna studentica

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Komentorica: doc. dr. sc. Petra Burić

Pula, veljača 2020.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI (završni rad)

Ja, dolje potpisana Lucia Ilijić, kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Lucia Ilijić

U Puli, veljača, 2020. godine



IZJAVA
o korištenju autorskog djela

Ja, Lucia Ilijić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Biološki učinci srebrnih nanočestica na larvalni razvoj ježinca *Paracentrotus lividus*" koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i Sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 2020.

Potpis

Ovaj rad izrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa. Predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (baccalaureus) Znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa i za komentoricu doc. dr. sc. Petru Burić.

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Komentorica: doc. dr. sc. Petra Burić

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Član: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 13. veljača 2020., Pula

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Ovaj je završni rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa, u sklopu Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanosti o moru na Odsjeku za prirodne i zdravstvene studije, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli. Rad je vezan uz projekt Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-5351 pod naslovom "Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama".

Zahvala

Od srca zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu i komentorici doc. dr. sc. Petri Burić na svoj pomoći, uloženom vremenu i iskazanom strpljenju i razumijevanju tijekom pisanja ovog završnog rada.

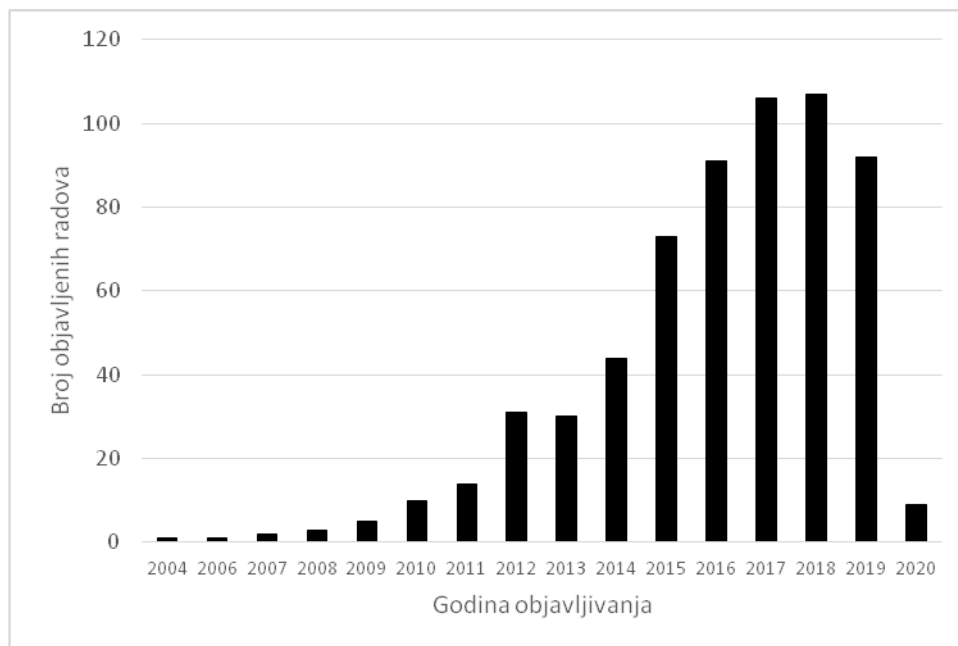
Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Ježinac	4
1.1.1. Građa tijela ježinca	4
1.1.2. Reproductivni sustav i embrionalni razvoj ježinca	9
1.1.3. Ekologija ježinaca	11
1.1.4. Vrsta ježinca <i>Paracentrotus lividus</i>	12
1.1.5. Ježinci kao modelni organizmi u toksikološkim istraživanjima	15
1.1.5.1 Test embrionalnog razvoja ježinca (SUEDT).....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Kemikalije	21
3.2. Sakupljanje odraslih jedinki i gameta (jajnih stanica i spermija)	21
3.3. Oplodnja ježinaca i tretman sa srebrnim nanočesticama	22
3.4. Statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI	26
4.1. Određivanje utjecaja srebrnih nanočestica prema veličini larve ježinca	26
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK.....	36
7. LITERATURA	37

1. UVOD

Pojavom nanotehnologije kao discipline, sve je širi spektar njezine primjene u različitim područjima ljudskoga djelovanja kao što su poljoprivreda, elektronika, biomedicina, farmaceutska i kozmetička industrija i slično. Korist nanotehnologije u najvećoj je mjeri prisutna u sposobnosti čestica na nano skali da daju nova i u velikom broju slučajeva, znatno bolja svojstva materijalima, proširujući tako spektar njihove uporabe. Nanomaterijalom se smatra svaki materijal s barem jednom vanjskom dimenzijom na nanoskali ili s unutarnjom ili površinskom strukturom na nanoskali, odnosno u rasponu od 1 do 100 nm (ISO / TS 54 80004-1, 2015). Mnoge nanočestice i od njih sastavljeni materijali oduvijek su prisutni u prirodi u svim odjeljcima okoliša – vodi, tlu i atmosferi, a potječu uglavnom iz anorganskih izvora kao što su pepeo, čađa, čestice minerala i sumpora. Međutim, uz sve širu uporabu nanomaterijala u raznim područjima znanosti i tehnologije, u okolišu se pojavljuje i sve veća količina umjetno proizvedenih nanočestica (eng. *engineered nanoparticles*, ENPs), koje predstavljaju potencijalan biološki rizik. Nanomaterijali svojim korištenjem, odlaganjem i razgradnjom mogu otpustiti nanočestice u okoliš. Zbog toga se u suvremenim znanstvenim istraživanjima na području kemije i biologije sve češće ispituje utjecaj nanočestica na žive organizme i njihov utjecaj na ekosustav. Nedavna istraživanja dovela su do spoznaje da su toksični učinci nanočestica na žive organizme ovisni o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima (Sukhanova i sur., 2018; Khan i sur., 2017). U usporedbi s česticama većih dimenzija, njihova im veličina znatno olakšava puteve ulaska u žive organizme i interakciju s njihovim biološkim molekulama, stanicama i organima. Osim toga, nanočestice, a posebice nanočestice metala, zbog svojih jedinstvenih svojstava i omjera površine i volumena znatno mijenjaju fizikalna, kemijska i biološka svojstva materijala s kojima stupaju u interakciju. Svjetski oceani su krajnji sakupljači gotovo svih kemikalija koje čovjek proizvodi i koristi. Zbog toga, morska toksikologija ima središnju ulogu u procjenama izloženosti zagađivalima i pruža rano upozorenje na toksične prijetnje organizmima, njihovom ekosustavu i čovjeku. Umjetno proizvedene nanočestice tako postaju i nova kategorija zagađivala sa ekotoksikološkim učincima u morskim ekosustavima, jer čestice mogu vodenim putevima dospjeti u more (Matranga i sur., 2012). Usporedno sa slučajnim ispuštanjem nanočestica u morski okoliš i izloženosti morskih organizama nanočesticama, razvija se i čitav niz novih morskih nanotehnologija, koje

se primjenjuju u proizvodnji i uporabi protuobraštajnih sredstava i sustavima za uklanjanje onečišćenja, a njihova ekološka sigurnost i održivost za morski okoliš su vrlo upitne (Corsi i sur., 2014). Umjetno proizvedene nanočestice dopijevaju u more iz različitih izvora i različitim putevima, što može utjecati na njihovu kemijsku strukturu i posljedično, njihovu sudbinu, ponašanje i toksičnost (Klaine i sur., 2008). Posebni izazov za morske nanoekotoksikologe danas predstavlja identifikacija mogućih transformacija umjetno proizvedenih nanočestica, interakcija i ponašanje u vodenim odjeljcima s visokim sadržajem elektrolita, kao i objašnjenje specifičnih načina djelovanja na žive organizme (Burić i sur., 2015). Razvoj nanotehnologija i nanoproizvoda kontinuirano napreduje, ali nedostatak informacija i podataka koji se odnose na njihov potencijalni utjecaj na morski okoliš postavlja ozbiljna pitanja o rizicima izloženosti morskih životinja, a posljedično putem hranidbenog lanca i ljudi (Matranga i sur., 2012). Sukladno tome, kroz zadnjih nekoliko godina značajno raste i broj istraživanja koja se provode u svrhu otkrivanja mehanizama toksičnosti nanočestica u morskom okolišu (Slika 1).



Slika 1. Broj objavljenih radova na temu ispitivanja toksičnosti nanočestica u morskom okolišu prema godini objavljivanja (izvor: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Na ponašanje i sudbinu umjetno proizvedenih nanočestica u morskom okolišu utječe niz procesa kao što su aglomeracija, agregacija i precipitacija čestica, promjene

različitih fizikalnih i kemijskih čimbenika u moru, poput pH, temperature, saliniteta, ionske jakosti morske vode te količina prirodne organske tvari, kao i interakcije sa živim svijetom. Ukoliko nisu prisutne značajne promjene temperature, ionske jakosti i koncentracije prirodne organske tvari u morskoj vodi, agregati nanočestica mogu vrlo sporo tonuti na dno oceana (Matranga i sur., 2012). Procesi transporta nanočestica kroz morski okoliš uglavnom ostavljaju njihovu strukturu i svojstva nepromijenjenima, a njihova transformacija i biodostupnost ovise o lokalnim kemijskim uvjetima okoliša. Transformacije nanočestica uključuju fizičke, kemijske, fotokemijske i biološke reakcije unutar živih organizama ili u njihovom prisustvu (Ju-Nam i Lead, 2008). Toksični mehanizmi djelovanja nanočestica vezani su uz njihova fizikalno-kemijska svojstva u doticaju s biološkim strukturama. Fizikalni mehanizmi toksičnosti direktno vezani uz veličinu i površinske karakteristike nanočestica uključuju poremećaje strukture staničnih membrana i membranske aktivnosti, sprječavanje transportnih procesa te modifikacije proteina i sprječavanje njihovog pravilnog smatanja. Biokemijski procesi koje nanočestice dokazano uzrokuju unutar živih organizama uključuju pojačanu proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS), oksidativna oštećenja, otpuštanje toksičnih iona, poremećaje u transportnoj aktivnosti elektrona i iona kroz stanične membrane i lipidnu peroksidaciju, a ovakve reakcije posljedično uzrokuju i poremećaje u ranom razvoju organizama i njihovom imunološkom odgovoru (Magesky i Pelletier, 2018).

Posebna pozornost u morskim ekotoksikološkim istraživanjima usmjerena je na proučavanje učinaka nanočestica srebra (AgNP). Sve je češća upotreba nanočestica srebra u medicinske, prehrambene, zdravstvene, potrošačke i industrijske svrhe, zbog njihovih jedinstvenih fizičkih i kemijskih svojstava. To uključuje posebna optička, električka i termalna svojstva, koja ih čine pogodnima za primjenu u različitim proizvodima kao što su kozmetički proizvodi, dodatci prehrani, elektronički uređaji, tekstili, medicinski uređaji i drugi. Snažan utjecaj na ova svojstva imaju oblik i veličina nanočestica srebra. Osobitu važnost i najširi spektar primjene imaju u biomedicinske svrhe, zahvaljujući antibakterijskim, antivirusnim, antiupalnim i antikancerogenim svojstvima (Burduşel i sur., 2018). Nekoliko znanstvenih istraživanja pokazalo je da se nanočestice srebra iz raznih komercijalnih proizvoda ispuštaju u otpadne vode, a posljedično i u morski okoliš (Angel i sur., 2013; Kaegi i sur., 2013; Kaegi i sur., 2011). Iako se velik postotak ukupnog srebra, koje je pretežito vezano za različite

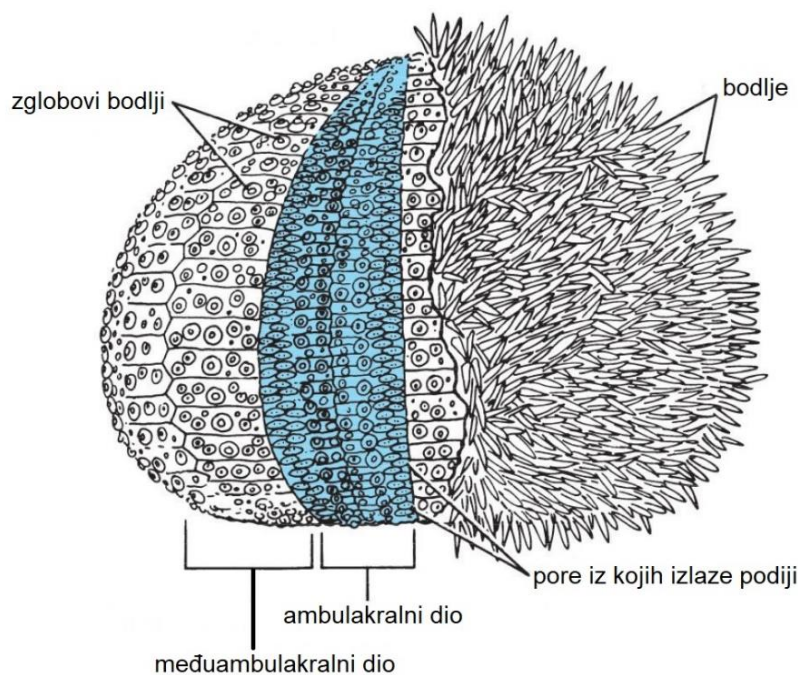
čestice, uspješno uklanja iz otpadnih voda sustavima za pročišćivanje, oko 20% srebra u svom topljivom (ionskom) ili partikularnom obliku ipak se oslobađa u kopnene vode i more (Magesky i Pelletier, 2018). Nanočestice srebra flokuliraju u okolišima s visokom ionskom jakosti, pa se u morskom okolišu očekuje njihova agregacija i aglomeracija, te oslobađanje aktivnih Ag⁺ iona s njihove površine. Već je dugo u znanstvenoj zajednici poznata činjenica da je srebro vrlo toksično za vodene organizme, ali ne postoji suglasnost o tome izazivaju li toksične utjecaje same nanočestice srebra ili Ag⁺ ioni koji se oslobađaju s njihove površine (Šiller i sur., 2013). Kako bi se prepoznalo glavne mehanizme toksičnosti nanočestica srebra, nužno je daljnje istraživanje njihovih kemijskih transformacija unutar bioloških tkiva (Magesky i Pelletier, 2018). U pokušaju da se otkriju i sa sigurnošću utvrde specifični toksični mehanizmi i učinci AgNP, kao modelni organizmi koriste se mnogi morski beskraljnjaci, kao što su mekušci, rakovi, mnogočetinaši i bodljikaši.

1.1. Ježinac

1.1.1. Građa tijela ježinca

Ježinci (*Echinoidea*) pripadaju rodu beskraljnjaka iz razreda bodljikaša (*Echinodermata*). Organizmi razreda bodljikaša, u koje se ubrajaju zvjezdače, zmijače, trpovi, stapčari i ježinci, uglavnom su bodljikavi, zrakastosimetrični organizmi koji žive sjedilačkim ili polusjedilačkim načinom života u blizini morskoga dna. Skoro svi od otprilike 6,000 vrsta bodljikaša koji žive danas (uz 13,000 vrsta poznatih iz fosilnih zapisa) su morski organizmi; nekoliko vrsta živi u estuarnim sistemima, a u slatkoj vodi ih nema (Pechenik, 2015). Njihovu građu obilježava pentaradijalna simetrija – zrakasta simetrija bazirana na pet dijelova, s iznimkom trpova. Planktonske larve bodljikaša su bilateralno simetrične, a zrakastu simetriju razvijaju kao sekundarno obilježje tek tijekom metamorfoze kao prilagodbu na sjedilački ili polusjedilački način života. Strana tijela bodljikaša na kojoj se nalaze usta naziva se usna (oralna), a njoj suprotna strana naziva se vršna (aboralna). Tijelo im je podijeljeno na 5 sličnih dijelova, poredanih oko središnje oralno-aboralne osi, koja prolazi kroz usta. Obično imaju razvijen cijeli probavni trakt i dobro razvijen celom. Celom, odnosno sekundarna tjelesna šupljina, podijeljena je u 3 para celomskih vrećica koje nastaju tijekom embrionalnog razvoja. Većina bodljikaša ima dobro razvijen endoskelet, koji se sastoji uglavnom (do 95%) od kalcijevog karbonata, od

malenog udjela (do 15%) magnezijevog karbonata i još manjeg udjela drugih soli, metala u tragovima i organskog materijala. Gradivni materijal endoskeleta nastaje u specijaliziranim stanicama porijeklom iz embrionalnog mezoderma (Pechenik, 2015). Glavna karakteristika cijelog razreda bodljikaša je prisutnost vodožilnog (ambulakralnog) sustava, jedinstvenog sustava koji sudjeluje u kretanju, prehrani, disanju i izlučivanju ovih organizama. Vodožilni sustav se sastoji od niza kanala koji su izvedeni iz jednog od 3 para celomskih vrećica. Napunjeni su tekućinom, uglavnom morskom vodom, a iznutra su obloženi kontraktilnim trepetljivim epitelom koji pokreće njihov sadržaj. Vodožilni sustav započinje mjehurićem na površini tijela bodljikaša, koji je prekriven rupičastom pločom koja se naziva sitasta ili madrepora ploča. Preko ovog mjehurića sustav je povezan s okolišnom morskom vodom. Od mjehurića prema središnjem dijelu organizma silazi kameni kanal, u čiju stjenku je ugrađen vapnenac, koji povezuje mjehurić s prstenastim kanalom vodožilnog sustava. Iz prstenastog kanala proteže se pet radijalnih kanala. Iz radijalnih kanala izlaze naizmjenični ili parni ogranci koji se razlikuju prema svojim funkcijama. Neki ogranci završavaju dišnim i osjetilnim izbočinama, a neki tubularnim strukturama tankih stijenki koje se nazivaju podiji ili ambulakralne nožice. Priljevom i odljevom tekućine kroz vodožilni sustav podiji se produžuju i skraćuju i na taj se način organizam pokreće (Pechenik, 2015). Ježinci imaju kruto, najčešće sferično tijelo kojemu oblik daje čahura izgrađena od kalcijevog karbonata, prekrivena velikim brojem krutih bodlji, također izgrađenih od kalcijevog karbonata. Čahura sa svojim ambulakralnim i međuambulakralnim dijelovima te pričvršćenim bodljama prikazana je na Slici 2.

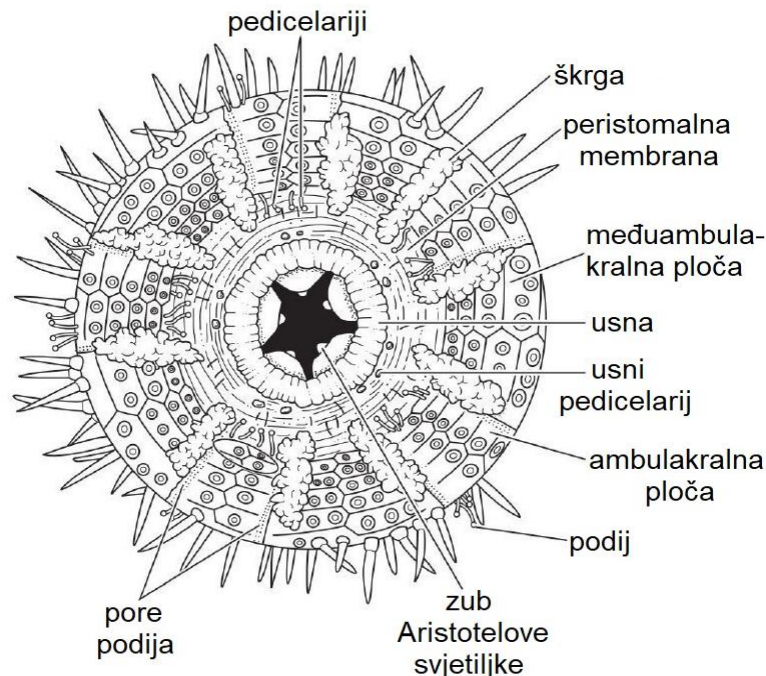


Slika 2. Prikaz čahure ježinca (izvor: Pechenik, 2015)

Bodlje primarno služe kao zaštita, a kod nekih vrsta su i aktivno uključene u pokretanje. Većina vrsta ima dva reda bodlji, dugačke i kratke. Pričvršćuju se za čahuru putem zglobova i mogu se brzo pomicati u različitim smjerovima kontrakcijom specijaliziranih mišićnih tkiva koja povezuju zglob i bodlju. Čahuru prekrivaju koža i mišići, koji se mogu povući kako bi došlo do pomicanja bodlji. Bodlje služe u pričvršćivanju za podlogu, prikupljanju i manipulaciji hranom, te u obrani od predatora. Kod nekih vrsta, kroz bodlje ili žlijezde povezane s bodljama mogu se izlučivati i toksini. Ako su bodlje slomljene ili oštećene, popravljaju se ili u potpunosti zamjenjuju u roku od mjesec do dva (Pechenik, 2015). Osim pomicanjem bodlji, ježinci se pokreću i podijima (ambulakralnim nožicama). Podiji ježinaca su posebno dobro razvijeni i uglavnom imaju ljepljive krajeve. Raspoređeni su vanjskom površinom tijela duž pet dvostrukih redova pora u ambulakralnim pločama čahure. Ambulakralne ploče su raspoređene simetrično oko tijela, u trakama koje se pružaju od usne do vršne strane tijela, a odvojene su jedne od drugih međuambulakralnim područjima koja nemaju podije. Specifične regije podija ježinaca mogu djelovati kao svjetlosni receptori. Iako ježinci nemaju nikakvu strukturu sličnu oku, različite vrste ježinaca pokazuju odgovor na varijacije u intenzitetu svjetlosti. Otkriveno je da se u podijima nalaze fotosenzitivni proteini, koji ispunjavaju minimalne zahtjeve za

usmjeravanjem kretanja putem vida. Ježinci se mogu odmicati od svjetlosti korištenjem ovih svjetlosnih receptora i vlastite sjene kao alata pomoću kojeg otkrivaju njezin točan izvor (Ullrich-Luter i sur., 2011).

Unutar čahure nalazi se celomska šupljina s unutrašnjim organima. Kod ježinaca, usna strana tijela, na kojoj se nalaze usta, okrenuta je prema dolje, a vršna strana, na kojoj se nalaze spolni otvori i u većine vrsta crijevni otvor je okrenuta prema gore. Usna (oralna) strana tijela ježinca prikazana je na Slici 3. Većina vrsta ježinaca posjeduje složeni sustav od 5 zubiju i mišića, koji se naziva Aristotelova svjetiljka, a služi za odgrizanje hrane s morskog dna i žvakanje. Zubi Aristotelove svjetiljke se izbacuju iz usta i pokreću u raznim smjerovima. Dubokomorski ježinci koji se hrane detritusom koriste svjetiljku za razgrtanje mulja. Vrste koje nemaju svjetiljku uglavnom se hrane sitnim organskim otpadom koji sakupljaju pomoću modificiranih podija, bodlji i usnih nožica, tzv. pedicelarija. Većina vrsta ježinaca također posjeduje pet pari vanjskih tankih izbočina tijela koji se nazivaju škrge, raspoređenih oko usta. One imaju glavnu ulogu u izmjeni plinova kod ježinaca koji ih posjeduju.



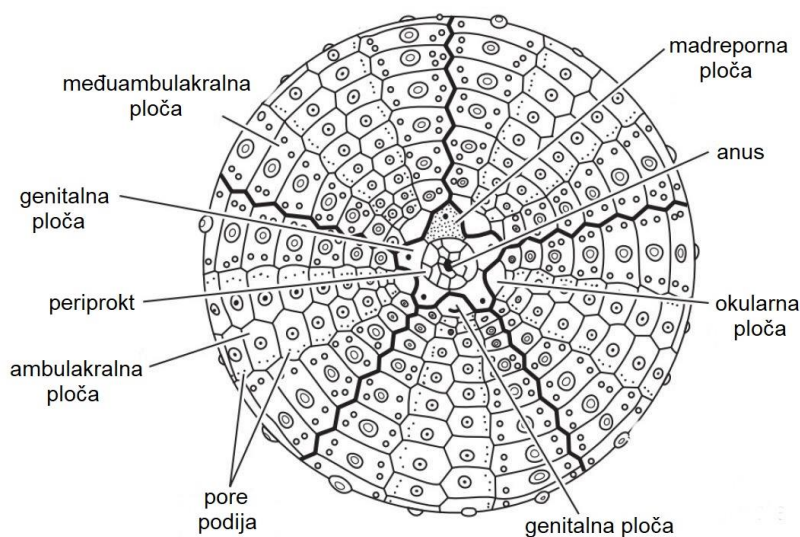
Slika 3. Usna strana tijela ježinca (izvor: Pechenik, 2015)

Ježinci nemaju želudac. Hrana kroz usni otvor i jednjak prolazi u dugačko zavijeno crijevo, u kojem se probavlja i absorbira (asimilirira). Asimilirana hrana zatim prolazi u

celomsku tekućinu, sličnu morskoj vodi. Ta je tekućina glavni transporter hrane i otpada unutar organizma. Unutrašnja strana celomske šupljine je prekrivena trepetljikama koje omogućavaju neprestanu cirkulaciju medija. U celomskoj tekućini nalaze se i slobodno plivajuće stanice coelomociti (fagocitni leukociti), koji služe za nakupljanje i izlučivanje pigmentnih zrnaca (Burić, 2018).

Iako su ježinci u osnovi herbivori, oni su u stvarnosti omnivori. Hrane se pričvršćenim ili plutajućim morskim travama i algama, a putem mogu konzumirati i detritus i sedentarne životinje, kao što su spužve i mahovnjaci. Također je poznato da neke vrste ježinaca redovito konzumiraju male školjkaše i druge beskralješnjake (Pechenik, 2015). U mogućnosti su preživjeti duge periode s malo ili nimalo hrane, jer su sposobni regulirati svoju stopu metabolizma i biološke funkcije (kao što je reprodukcija) ovisno o uvjetima okoliša i dostupnosti hrane (Lawrence, 2013).

Na vršnoj strani tijela ježinca (Slika 4), oko anusa, nalazi se membrana sa nekoliko krutih ploča, od kojih 5 genitalnih sadrži gonopore kroz koje ježinac izbacuje spermije ili jajne stanice, a jedna je modificirana u madrepornu ploču koja regulira vodožilni sustav. Čahura je izgrađena od niza malih karbonatnih pločica koje se nazivaju osikuli. Kako ježinac raste, čahura se istovremeno povećava u svim smjerovima. Ovo povećanje veličine postiže se dodavanjem dodatnog karbonatnog materijala na marginama postojećih osikula i sekrecijom novih osikula na rubovima "okularnih" ploča (eng. *ocular plates*) koje se nalaze oko anusa (Pechenik, 2015).



Slika 4. Vršna strana tijela ježinca (izvor: Pechenik, 2015).

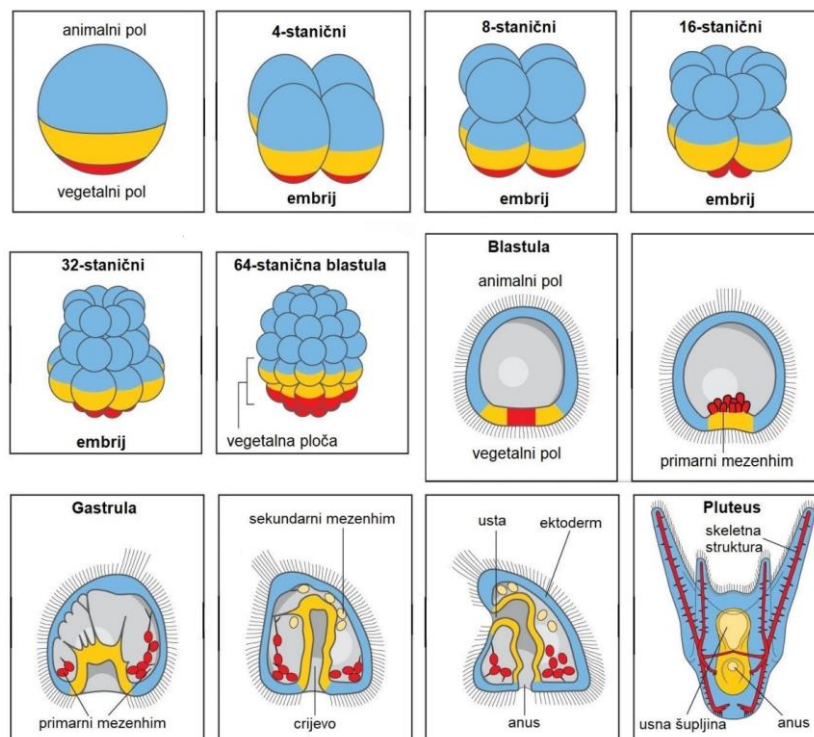
Prema izgledu tijela ježinci su podijeljeni u dva podrazreda: pravilnjake (Regularia) i nepravilnjake (Irregularia). Pravilnjaci imaju gotovo savršenu sferičnu simetriju i mogu se kretati u bilo kojem smjeru. Primjeri najčešćih i najdostupnijih pravilnjaka koji žive u Jadranskom moru su ježinac *Arbacia lixula*, ježinac *Paracentrotus lividus* i ježinac *Sphaerechinus granularis*. Druge vrste pravilnjaka prisutnih u Jadranskom moru uključuju: ježinca *Psammechinus microtuberculatus*, ježinca *Echinus acutus*, ježinca *Centrostephanus longispinus* (Turk, 2011). Nepravilnjaci pokazuju razne stupnjeve bilateralne simetrije, koja se može povezati s aktivnostima kopanja kroz pijesak, blato ili šljunak. Imaju jasno određenu anteriornu i posteriornu stranu tijela, pa se kreću u određenom smjeru. Tijelo im je najčešće spljošteno. Kod nepravilnjaka se ambulakralno područje ne proteže u linijama od usne do vršne površine, već je ograničeno isključivo na usnu i vršnu stranu tijela (Pechenik, 2015). Primjeri nepravilnjaka koji obitavaju u Jadranskom moru su ježinac *Schizaster canaliferus* i ježinac *Spatangus purpureus* (Turk, 2011).

1.1.2. Reproductivni sustav i embrionalni razvoj ježinca

Ježinci su odvojenih spolova. Njihove gonade, odnosno spolni organi, nalaze se slobodne u celomskoj šupljini. Gonade su, osim svoje reproduktivne funkcije, jedini organi ježinaca koji su sposobni za skladištenje hranjivih tvari. Zbog toga su reprodukcija i skladištenje hranjivih tvari kod ovih organizama usko povezani. Gonade se sastoje od reproduktivnih stanica i stanica za skladištenje, koje se koriste za razvoj gameta ili kao izvor nutrijenata kada je dostupnost hrane ograničena. Stanice za skladištenje također imaju sposobnost da fagocitiraju neiskorištene reproduktivne stanice nakon mrijesta. Omjer ovih dvaju tipova stanica u gonadama se mijenja ovisno o fazi reproduktivnog ciklusa. Ježinci se obično mrijeste dva puta godišnje, na proljeće i u ranu jesen, a pojedine vrste se mrijeste tijekom cijele godine (poput primjerice ježinca *S. granularis*). Ispuštaju spolne stanice u vodeni stupac, nakon čega se odvija oplodnja. Nakon ispuštanja spolnih stanica, ježinci prolaze kroz fazu mirovanja u kojoj su gonade uglavnom male. Zatim slijedi povećanje broja stanica za skladištenje, pa se gonade povećavaju volumenom. Nakon toga se odvija gametogeneza, tijekom koje se stanice za skladištenje zamjenjuju reproduktivnim stanicama. Broj reproduktivnih stanica se povećava do trenutka kada su ježinci ponovno spremni za mriještenje. Doba godine u kojem se ježinci mrijeste je ovisno o

okolišnim čimbenicima i može varirati između geografskih lokacija, pa čak i u manjim ograničenim područjima. Sezonske varijacije u temperaturi morske vode, količina svjetlosti i gustoća populacije su faktori koji dokazano utječu na reproduktivni ciklus ježinaca (James, 2018).

Nakon oplodnje jajne stanice ježinca, oko nje se stvara fertilizacijska membrana koja okružuje stanicu u obliku tanke opne. Ona u roku od par minuta postaje čvrsta i sprječava polispermiju (oplodnju jedne jajne stanice s više od jednog spermija). Nakon stvaranja fertilizacijske membrane dolazi do fuzije jezgara i stvaranja zigote – haploidna jezgra spermija se spaja s haploidnom jezgrom jajne stanice. Zatim započinju prve diobe novostvorene zigote. Razvoj iz zigote u završni stadij larve ježinca prikazan je na Slici 5. Zigota se brazda kroz 10 uzastopnih mitotičkih diobi. Ovim diobama nastaju nove stanice koje se nazivaju blastomere. U prve dvije diobe, zigota se brazda u smjeru polova. Treća dioba je ekvatorijalna, odnosno okomita u odnosu na prve dvije. Njome nastaje osam jednakih blastomera: četiri gornje koje predstavljaju animalni pol i četiri donje koje označavaju vegetativni pol.



Slika 5. Embrionalni razvoj ježinca (izvor:

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_06/devo_06.html)

Nakon četvrte diobe, u 16-staničnom stadiju embrija, stanice su diferencirane prema veličini. Daljnjim dvjema diobama nastaje 64-stanični embrij koji ima oblik kugle i naziva se morula. Nakon sedme diobe embrij ima 128 stanica i iz morule nastaje blastula. U stadiju blastule, nakon desete diobe, mladi embrij počinje sintetizirati vlastite proteine. Većina stanica blastule ima trepetljike na vanjskim membranama, pa se blastula počinje rotirati unutar fertilizacijske membrane. Nakon toga stanice vegetativnog pola počinju formirati vegetativnu ploču, a stanice animalnog pola luče enzim koji razgrađuje fertilizacijsku membranu. Embrij izlazi iz membrane i postaje slobodno plivajuća blastula. Zatim slijedi proces gastrulacije kojim blastula postaje gastrula. Dolazi do premještanja stanica blastule i pojavljuju se zametni listići – ektoderm, mezoderm i endoderm. U području vegetativne ploče dolazi do uvrtanja (invaginacije) u unutrašnjost blastule, čime nastaje pracijsko (arhenteron) i formira se otvor – blastopora, iz kojeg nastaje anus. Usta se otvaraju naknadno na drugom površinskom dijelu gastrule. U zadnjem stadiju gastrule, crijeva i usta su potpuno formirani i moguća je samostalna prehrana sitnim planktonskim algama. Produljivanjem gastrule razvija se larva dipleurula, koja je bilateralno simetrična. Iz dipleurule se razvija larva pluteus, koja ima 4 duga nastavka („nožica“) prekrivenih trepetljikama pomoću kojih pliva. Larve slobodno plivaju oko mjesec dana. Pred kraj ličninačkog razdoblja se počinju razvijati skeletne pločice, zbog kojih pluteus tone na dno mora, te dolazi do metamorfoze bilateralne larve u pentaradijalnog mladog ježinca. U prosjeku, morski ježinci dostižu spolnu zrelost s oko dvije godine starosti. Duljina životnog vijeka varira od vrste do vrste, a istraživanja su pokazala da su neke jedinke stare i preko 200 godina, ne smanjuje im se reproduktivna sposobnost s godinama i ne pokazuju jasne znakove starenja (Ebert, 2008).

1.1.3. Ekologija ježinaca

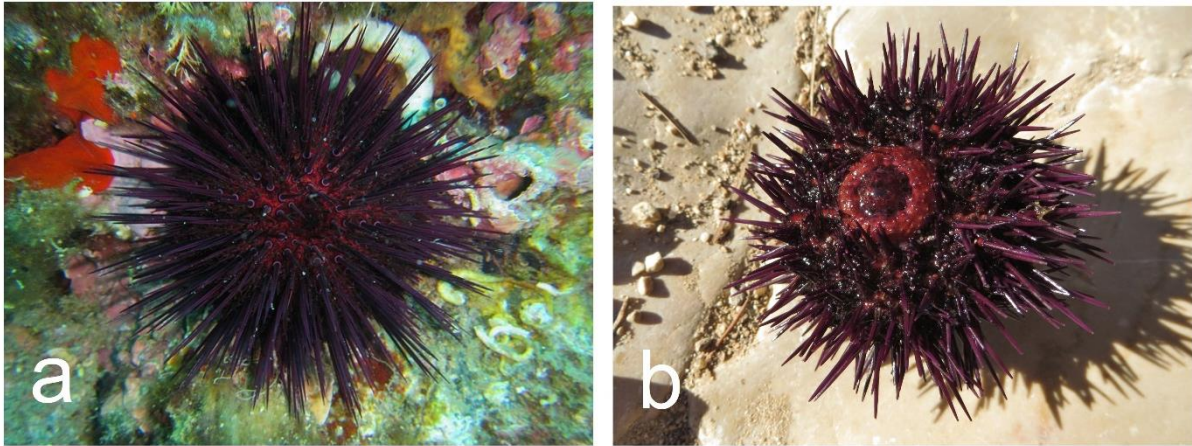
Istraživanje ježinaca ima veliku važnost za područja poput evolucije, paleontologije, embriologije i fiziologije. S nešto više od 1000 poznatih vrsta, oni predstavljaju brojčano relativno malenu skupinu morskih beskralješnjaka, ali unatoč tome imaju istaknutu ekološku ulogu u morskim zajednicama. Njihov utjecaj na bentičke zajednice u kojima žive je dobro dokumentiran i često značajan. S obzirom na to da se u nekim zemljama uzgajaju i izlovljavaju, određene vrste imaju i ekonomsku važnost. Na vrste koje obitavaju u plitkim morima vrlo je izgledan i utjecaj predviđenog globalnog zagrijavanja oceana. Zbog toga je nužno ulaganje napora u

razumijevanje biologije i ekologije, upravljanje i očuvanje ovih vrsta. Ježinci imaju bogat fosilni zapis. Broj imenovanih fosilnih svojiti ježinaca deset puta premašuje broj postojećih (Lawrence, 2013), s prvim nalazima iz razdoblja ordovicija. Danas su široko rasprostranjeni po svim svjetskim oceanima i naseljavaju bentička staništa u svim klimatskim područjima, od tropskih do polarnih. Iako većina vrsta preferira plitka mora, može ih se pronaći i na velikim dubinama. Uobičajena mjesta na kojima žive su stjenoviti bazeni u plimnoj zoni, stijene izložene valovima, livade morskih cvjetnica, mulj, koraljni grebeni i šume kelpa. Najznačajniji utjecaj na strukturu bentičkih zajednica u kojima žive ostvaruju svojim načinom prehrane kojim ograničavaju biomasu višestaničnih fotosintetskih organizama. Glavni prirodni neprijatelji su im rakovi, velike ribe, morske vidre, jegulje, ptice i ljudi. Količina, kvaliteta i dostupnost hrane te ugroženost od strane predatora su okolišni čimbenici koji u najvećoj mjeri određuju karakteristike životnog vijeka ježinaca. Izbjegavanje predatora postižu nastanjivanjem staništa s visokom energijom vode i kriptičnim ponašanjem, što smanjuje ugroženost, ali i dostupnost hrane (Lawrence, 2013).

Trenutačno, ježinci imaju bogate populacije diljem svijeta te se čini da im ne prijete neposredna opasnost od ugroženosti ili nestanka pojedinih vrsta. Međutim, u prošlosti su zabilježeni događaji lokalnih masovnih pomora ježinaca u slučajevima povećanog zagađenja morskog okoliša i u slučajevima prekomjernog izlovljavanja od strane ljudi (npr. Napuljski zaljev, Italija za vrstu *A. lixula*). Iako su očito prilagodljivi promjenama u okolišu, zbog globalnog zagrijavanja, koje ubrzano povisuje temperaturu oceana, a posebice plitkih mora u kojima obitava većina vrsta, ježinci bi potencijalno mogli postati ugroženi u budućnosti.

1.1.4. Vrsta ježinca *Paracentrotus lividus*

Ježinac *Paracentrotus lividus* je relativno velik morski ježinac. Promjer njegove čahure bez bodlji kod najvećih jedinki može doseći 7.5 cm. Naziva se još i ljubičasti ježinac, hridinski ježinac ili ježinac kamenjar. Ima duge oštre bodlje koje su najčešće tamnoljubičaste boje, ali mogu biti i smeđe ili zelene, te čahuru zelenkaste boje (Slika 6).



Slika 6. Vršna (aboralna) strana tijela (a) i usna (oralna) strana tijela (b) ježinca *P. lividus* (izvor: Wikipedia, <https://i.pinimg.com/originals/ef/3d/da/ef3ddab827975027862948a2df3b713e.jpg>).

Rasprostranjen je u Sredozemnom moru i istočnom Atlantskom oceanu, od Škotske i Irske do južnog Maroka i Kanarskih otoka, uključujući otočje Azore. Posebno je česta vrsta u područjima gdje zimska temperatura mora varira između 10 i 15 °C, a ljetna između 18 i 25 °C, kao što je zapadno Sredozemno more, obala Portugala i zaljev Biscayne. Analiza varijacije sekvenci mitohondrijskog gena sugerira da ježinac *P. lividus* ima dvije populacije, u zapadnom Sredozemnom moru i u istočnom Atlantskom oceanu, te da se jedinke nasumično pare unutar ovih populacija i među njima (Duran i sur., 2004). Ježinac *P. lividus* se uobičajeno pojavljuje u podplimnoj zoni, u rasponu od srednjeg vodostaja do 20 m dubine i u bazenima omeđenim stijenama u plimnoj zoni. Gornja granica pojavnosti i preživljavanja određena je isušivanjem. U Sredozemnom moru, u kojem su morske mijene niske amplitude, kada razina mora padne neuobičajeno nisko, jedinke koje ostaju na suhom vrlo brzo ugibaju. Planktonske larve podnose puno veći pritisak od odraslih jedinki i mogu plivati na dubinama i od nekoliko stotina metara (Lawrence, 2013).

U otvorenom moru, ježinac *P. lividus* se pojavljuje uglavnom na čvrstom kamenju i stijenama, te u livadama morskih cvjetnica kao što su vrste *Posidonia oceanica* i *Zostera marina* (Lawrence, 2013). Iako im je morska trava *Cymodocea nodosa* preferirana hrana, ona za njih ne predstavlja i preferirano stanište, najvjerojatnije zbog prisutnosti pijeska među njezinim busenima koji im otežava kretanje. Jedinke u plićem moru puno su izloženije predatorima i utjecaju valova. Odupiru se negativnom utjecaju energije valova ukopavanjem u supstrat (npr. pješčenjak, vapnenac, granit),

stvarajući šupljine u obliku čaše u kojima privremeno ili stalno žive. Takvo ponašanje im pruža i zaštitu od predatora. Kada je gustoća populacije velika, supstrat u koji se jedinke ukopavaju može poprimiti strukturu šupljina sličnu saću. U litoralnim lagunama ježinac *P. lividus* može živjeti i na mekšim supstratima, kao što su krupni pijesak ili čak blato. Mlade i male jedinke, koje su posebno laka meta predatorima, kako bi se zaštitile stalno žive u rupama, pukotinama, ispod šljunka i stijena, a ponekad i pod gustim pokrovom višestaničnih fotosintetskih organizama. Veće jedinke se više kreću u potrazi za hranom, nakon čega se mogu i ne moraju vratiti u skloništa. Najveće gustoće pokazuju populacije u plitkim staništima. Lokalno se pojavljuju u vrlo gustim nakupinama, najvjerojatnije zbog obrane od predatora, ishrane i mriještenja. Populacije mogu biti stabilne gustoće godinama, ali često se događaju brze i dugotrajne promjene u gustoći velikih jedinki. Kratkoročne i dugoročne promjene u gustoći populacija smatraju se posljedicama niza različitih faktora, kao što su neravnomjerni mrijest, gubitci tijekom larvalnog stadija života, migracije, prirodne promjene u količini predatora, prelov predatora, zagađenje i bolesti. Hrane se uglavnom višestaničnim fotosintetskim organizmima, ali mogu postati oportunisti i svejedi, posebice u uvjetima ograničenih resursa. Ovakvim ponašanjem i sposobnošću da se preusmjere s preferiranih, ali ograničenih resursa na manje preferirane ali brojnije resurse znatno utječu na strukturu bentičkih zajednica u kojima žive, a posebice na gustoću populacija višestaničnih fotosintetskih organizama. Hrane se uglavnom noću. Ježinac *P. lividus* često prekriva svoju vršnu stranu tijela različitim predmetima, kao što su lišće, prazne školjke, kamenčići, fragmenti plastike i slično (Lawrence, 2013). Smatra se da takvo ponašanje može biti u svrhu zaštite od svjetlosti, ultraljubičastog zračenja i predatora. U mnogim zemljama, kao što su Francuska, Italija, Španjolska, Malta i dijelovi Hrvatske, ježinci ove vrste se često izlovljavaju, a u nekim slučajevima i izvoze, jer se njihove gonade smatraju gastronomskim specijalitetom.

Krajem 19. stoljeća vrsta *P. lividus* prepoznata je i usvojena u znanstvenom radu kao iznimno koristan modelni organizam za različita istraživanja na području molekularne, evolucijske i stanične biologije, a prvenstveno za proučavanje embrionalnog razvoja, zbog karakteristika, poput prozirnosti jajnih stanica i embrija, koje omogućavaju lako izvođenje i praćenje takvih eksperimenata u laboratorijskim uvjetima (Kanold i sur., 2016; Burić i sur., 2015; Manzo i sur., 2013).

1.1.5. Ježinci kao modelni organizmi u toksikološkim istraživanjima

Proučavanje akutne i kronične toksičnosti na morskim organizmima, posebice na njihovim ranim razvojnim stadijima, od velike je važnosti jer pomaže u otkrivanju stupnja osjetljivosti pojedinih organizama na širok spektar zagađivala te u razumijevanju osnovnih principa kao što su bioakumulacija unutar pojedinog organizma, biomagnifikacija kroz prehrambeni lanac te utjecaj fizikalnih i kemijskih svojstava tvari na razmjer tih procesa. Osim toga, morski organizmi imaju velik potencijal kao modeli pomoću kojih se može definirati toksične mehanizme i učinke tvari (Pritchard, 1993).

Ježinci su jedni od najosjetljivijih i najprikladnijih modelnih organizama za biološke analize. Mnoga osnovna i primijenjena ispitivanja na ovim organizmima su uvelike doprinijela znanju na područjima kao što su embriologija, citologija, biokemija, fiziologija i molekularna biologija. Ipak, ježinci se najčešće koriste u ispitivanju toksičnosti i procjenama zagađenja mora i kvalitete vode. Kao česti modelni organizmi u toksikologiji usvojeni su krajem 20.st. te su na njima testirani brojni agensi, uključujući fizikalne i kemijske agense, organske i anorganske kemikalije, lijekove, toksične tvari prirodnog porijekla, industrijske i kućanske otpadne vode i slično. Većina ovih istraživanja provodi se na embrijima ježinaca jer su rani razvojni stadiji morskih organizama uglavnom osjetljiviji na toksične tvari od odraslih jedinki, ali i zato što se pokazalo da su embriji ježinaca sposobni obraniti se od toksičnih agenasa nizom različitih biokemijskih puteva unutar organizma (Arslan i Karaarlan, 2016; Banks, 2014). Postoji niz značajki zbog kojih su ježinci preferirani organizmi u ispitivanju toksičnosti. U brojnim slučajevima predstavljaju ključnu komponentu bentičkih zajednica, te ih sedentarni i oportunistički način života čini izrazito osjetljivima na okolišno zagađenje. Osim toga, najviše koncentracije različitih potencijalno toksičnih tvari antropogenog porijekla očekuju se upravo u priobalnim morskim staništima zbog ispiranja tla, ulijevanja rijeka te ispuštanja otpadnih voda u more. Također, pripadaju organizmima na višim razinama trofičkog lanca, što ih čini podložnima procesima biomagnifikacije (Cameron, 2002). Zbog toga se često koriste kao biološki i biokemijski indikatori okolišnog stresa i lokalnog zagađenja, te u programima praćenja i procjene rizika okoliša (Banks, 2014). Poseban interes za proučavanje odgovora ovih organizama na okolišne stresore leži i u njihovoj

filogenetskoj poziciji. Ježinci su deuterostomi poput kralješnjaka. Zbog ove bliske srodnosti pokazuju sličnosti s kralješnjacima u vidu fizioloških procesa i hormonskih puteva, a moguće je i da dijele sličan odgovor na zagađenje, na razini stanica, tkiva i cijelog organizma, kako s drugim životinjskim vrstama tako i s ljudima (Sugni i sur., 2017, Janer i sur., 2005).

1.1.5.1. Test embrionalnog razvoja ježinca (SUEDT)

Ježinci se već dugo koriste kao modelni organizmi za istraživanja u području embriologije. Zahvaljujući njihovoj dostupnosti, pristupačnosti i jednostavnosti praćenja embrionalnog razvoja, jajne stanice i embriji ježinaca uvelike su pomogli znanstvenicima u razumijevanju procesa ishodišnih oplodnji i staničnoj diobi, te drugim morfogenetskim procesima (Banks, 2014). Uz to, embriji ježinaca pokazali su opsežnu sposobnost prilagodbe u odgovoru na varijacije različitih parametara i eksperimentalnih uvjeta. Test embrionalnog razvoja morskog ježinca (eng. *Sea Urchin Embryonal Development Test*, SUEDT) se često koristi kao brz, osjetljiv i isplativ test za ispitivanje toksičnosti i procjene kvalitete vode diljem svijeta. Kao široko rasprostranjeni organizmi, ježinci se često javljaju u većini morskih okoliša i lako ih je uhvatiti. Ispuštaju veliku količinu spolnih stanica u okoliš, te je istraživanja moguće provoditi kroz cijelu godinu, izmjenjujući vrste ovisno o njihovom vremenu mrijesta. Na Slici 7 prikazana su razdoblja mrijesta, rasprostranjenost i veličina jajnih stanica tri vrste ježinaca uobičajenih za provođenje testa embrionalnog razvoja. Budući da ježinci imaju vanjsku oplodnju, postupak oplodnje jajnih stanica se može jednostavno obaviti u laboratorijskim uvjetima, a prozirnost embrija omogućava lako praćenje procesa vezanih uz oplodnju, kao što je pojava fertilizacijske membrane i praćenje pojedinih razvojnih stadija. Osim toga, proces oplodnje i razvoja embrija se odvija vrlo brzo, a trošak provođenja testova nije velik. Kroz kratak vremenski period moguće je pratiti više povezanih procesa, koji uključuju oplodnju, mitotičku aktivnost i razvoj larvi. Jasno su vidljivi poremećaji u reproduktivnoj ravnoteži i embriotoksični utjecaji, a test je pokazao visoku osjetljivost na različite vrste ispitivanih agenasa (Esposito, 1986).

Biološki testovi mogu se provoditi na embrijima, spermijima i jajnim stanicama ježinaca, u standardiziranim laboratorijskim uvjetima, nakon čega se promatraju promjene u ranim fazama embrionalnog razvoja, sve do larvalnog stadija pluteusa.

Larve se izlažu ispitivanim agensima kroz čitav embrionalni razvoj, koji može trajati od 48 do 72 sata, ovisno o vrsti. Izlaganje se također provodi u razdobljima prije oplodnje i poslije izlijevanja embrija, u svrhu otkrivanja najosjetljivijih faza razvoja ježinaca na ispitivani agens i razjašnjavanja mehanizama djelovanja agensa. Izlaganje jajnih stanica agensima prije oplodnje može pružiti dodatne informacije o sposobnosti zagađivala da izazove nepopravljive abnormalnosti u razvoju (Esposito, 1986.). Biotestovi na spermijima ježinaca pokazali su se izrazito osjetljivim bioindikatorima zagađenja mora, pokazujući odgovor na iznimno male koncentracije zagađivala (Oral i sur., 2017; Gambardella i sur., 2015; Esposito, 1986).

Vrsta	Mjesto	Sezona	Veličina (μm)
<i>Arbacia lixula</i>	Mediteran; atlantska obala Sjeverne Afrike; neki atlantski otoci; Brazil	Cijele godine, osim ljeti (u južnom Mediteranu)	79
<i>Paracentrotus lividus</i>	Mediteran; atlantski otoci; sjeverozapadna obala Afrike; Irska i Škotska	Cijele godine, osim ljeti (u Mediteranu)	90 - 100
<i>Sphaerechinus granularis</i>	Mediteran i zapadni Atlantski ocean	od Studenog do Srpnja	98

Slika 7. Geografska distribucija, sezona mriješta i veličina jajnih stanica triju vrsta ježinaca (izvor: Giudice, 1973)

Često se provode istraživanja utjecaja različitih koncentracija određenih nanočestica na ježince, kao i usporedna istraživanja učinka određenih nanočestica na različite vrste ježinaca, kako bi se utvrdile razlike u njihovoj osjetljivosti i odgovoru. Otkriveni su različiti učinci izloženosti nanočesticama (Slika 8). Manno i sur. (2012) izlagali su larve ježinca *P. lividus* nanočesticama ugljika (CNP). Otkrili su da interakcija larvi s CNP aktivira jedan od gena koji kontroliraju skeletogenezu i inducira proces biomineralizacije. Larve su inkorporirale CNP u novi biomaterijal sličan biseru, koji nikada prije nije zapažen kod ježinaca. Manzo i sur. su 2013. po prvi put ispitivali utjecaj nanočestica cinka (ZnNP) na istoj vrsti ježinca. Izlagali su jajne stanice

nanočesticama cinka tijekom oplodnje i pratili njihov rani embrionalni razvoj. ZnNP pokazale su toksični učinak u vidu promjene strukture kostura pri manjoj koncentraciji i potpunom zaustavljanju normalnog larvalnog razvoja pri višim koncentracijama. Iste godine, Šiller i sur. ispitivali su utjecaj nanočestica srebra na ježinca *P. lividus*. Izlagali su embrije različitim koncentracijama AgNP i iona srebra (Ag^+) 2 sata nakon oplodnje. Izlaganje AgNP, ovisno o dozi, uzrokovalo je zaostajanje u embrionalnom razvoju, asimetriju tijela i skraćene ili nepravilno razvijene nožice larvi, kao i promjene u ponašanju, odnosno plivanju. Također se pokazalo da su koncentracije AgNP toksičnije od svojih ekvivalentnih doza Ag^+ iona. Wu i sur. (2015) proveli su ispitivanje toksičnosti nanočestica bakra i nanočestica cinka izlaganjem embrija ježinca *Lytechinus pictus* nanočesticama 30 min nakon oplodnje. U oba slučaja izlaganje pri manjim koncentracijama pokazalo je povećanje u unutarstaničnim reaktivnim vrstama kisika, dok izlaganje većoj koncentraciji nije pokazalo povećanje u nastajanju ROS-a, možda zbog prejakog citotoksičnog utjecaja. Torres-Duarte i sur. (2015) izlagali su embrije ježinca *L. pictus* nakon oplodnje dvjema različitim vrstama nanočestica bakrovog oksida kroz period od 72 sata, dok embriji nisu dosegli fazu razvijenog pluteusa. Sintetizirane nanočestice Cu pokazale su veću toksičnost i otapanje u usporedbi s manje čistim, komercijalnim nanočesticama Cu. Gambardella i sur. (2015) ispitivali su potencijalnu toksičnost nanočestica silicija (SiO_2NP) na ježincu *P. lividus*. Mjerili su postotak jajnih stanica oplodjenih spermom izloženom SiO_2NP , postotak anomalija i nerazvijenih embrija i larvi te promjene u enzimatskoj aktivnosti, pri različitim koncentracijama nanočestica. Sposobnost spermija da oplodi jajne stanice nije bila smanjena niti pri jednoj koncentraciji, ali je značajan postotak embrija pokazao anomalije i zastoj u razvoju. Također, SiO_2NP uzrokovale su neurotoksična oštećenja i smanjenje ekspresije acetilkolinesteraze neovisno o dozi. Anold i sur. (2016) ispitivali su potencijalni toksični utjecaj nanočestica nikla na ježincu *P. lividus*. Pratili su embrionalni razvoj ježinaca izloženih različitim koncentracijama nanočesticama nikla nakon oplodnje kroz period od 48 sati. Nije uočena smrtnost niti pri jednoj koncentraciji, ali su nanočestice uzrokovale smanjenje duljine razvijenih larvi.

Nanočestice	Ispitivane koncentracije	Oštećenje embrionalnog razvoja	Uspješnost oplodnje	Oštećenja larvi	Ostali utjecaji
C	$10^8 - 10^9$ np/ml	+			biomineralizacija
	$10^{12} - 10^{14}$ np/ml	+			ekspresija ciklofilina
ZnO	10^{-6} M	+	+	+	transkripcijski odgovor gena 14-3-3
ZnO i CuO	0.5 ppm	+			kemosenzitivatori; pojačana konc. MXR proteina
Različite CuO	0.5 – 5 ppm	+			promjene redox potencijala
SiO ₂	$1g^{-50}$ mg/L	+	+		smanjena aktivnost kolinesteraze
Co, TiO ₂ i Ag	$1g^{-1}$ mg/L	+	+	+	biomineralizacija
Ag	1-300 g/L	+			osjetljivost ovisna o vrsti
AgNP vs. Ag ⁺	20 500 g/L	+			
TiO ₂	1 ili 5 µg/L	+			fagocitoza
Ni	0.03 –3 mg/L	+			aktiviran mehanizam internalizacije

Slika 8. Rezultati istraživanja učinaka nanočestica na rane razvojne stadije ježinaca (Pagano i sur., 2017).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je primjenom testa embrionalnog razvoja ježinca ispitati potencijalnu toksičnost nanočestica srebra (AgNP) na embrionalni razvoj ježinca *Paracentrotus lividus*. Ispitivalo se kako na embrionalni razvoj ježinca, specifično na duljinu larvi, utječe izlaganje zigota nanočesticama srebra netom nakon oplodnje, te je praćena uspješnost embrija u dostizanju stadija pluteusa.

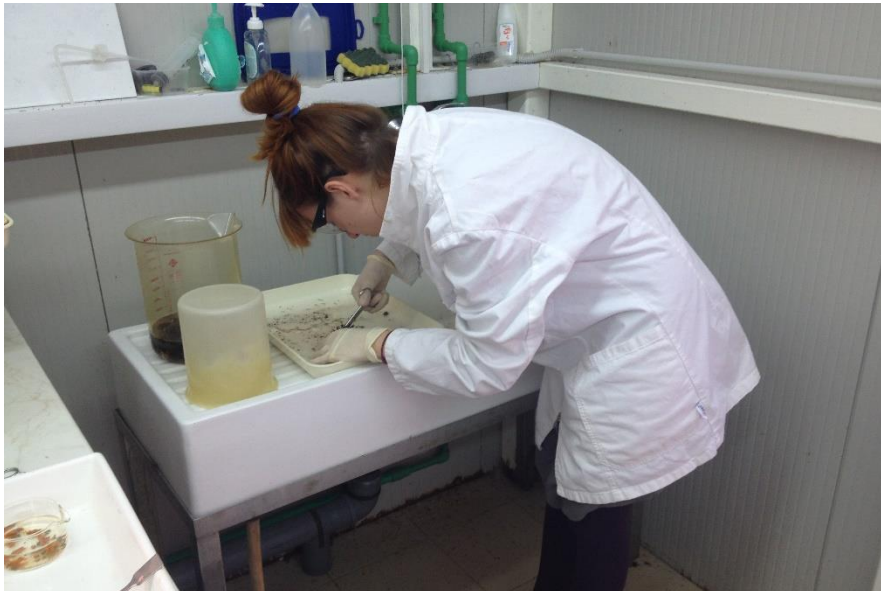
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom završnom radu korištene su sljedeće kemikalije: štok disperzija nanočestica srebra koncentracije 20 mg/L (promjer čestica 60 nm) i kalijev kromov (III) sulfat kupljeni od dobavljača Sigma-Aldrich.

3.2. Sakupljanje odraslih jedinki i gameta (jajnih stanica i spermija)

Dana 17.5.2017. u uvali Šćuza u blizini Premanture sakupljene su odrasle jedinke ježinca *P. lividus* u jutarnjim satima za vrijeme oseke. Ukupno deset jedinki mehanički je secirano na način da su otvorene škarama uokolo usnog otvora i utvrđen im je spol, a zatim su im izvađene gonade (Slika 9).



Slika 9. Seciranje sakupljenih ježinaca (osobna arhiva).

Gonade ženki izvađene su iz šest jedinki i sakupljene u čašice u koje je prethodno dodana morska voda (Slika 10). Gonade ježinca *P. lividus* su narančaste boje. Nakon filtriranja kroz fitoplanktonsku mrežicu veličine pora od 100 μm , gonade su pregledane inverznim mikroskopom pod povećanjem od 400x. Dvije jedinke nisu uzete u obzir za daljnju oplodnju zbog toga što su imale nezrele jajne stanice manjeg oblika i dodatno prisutne nečistoće u suspenziji jajnih stanica. Muške gonade su izvađene iz 3 jedinke i stavljene na tanjurić na suho. Spermija ježinca se aktivira u trenutku doticaja s morskom vodom i kratko ostaje pokretna, pa stoga ne smije doći u

kontakt s morskom vodom do samog trenutka oplodnje jajnih stanica. Nakon filtriranja kroz fitoplanktonsku mrežicu, sperma je pregledana inverznim mikroskopom pod povećanjem od 1000x uz korištenje imerzijskog ulja i ostavljena na suhom u čašicama od 10 mL (Slika 11).



Slika 10. Gonade ženki ježinca *P. lividus* u čašama s morskom vodom (osobna arhiva).



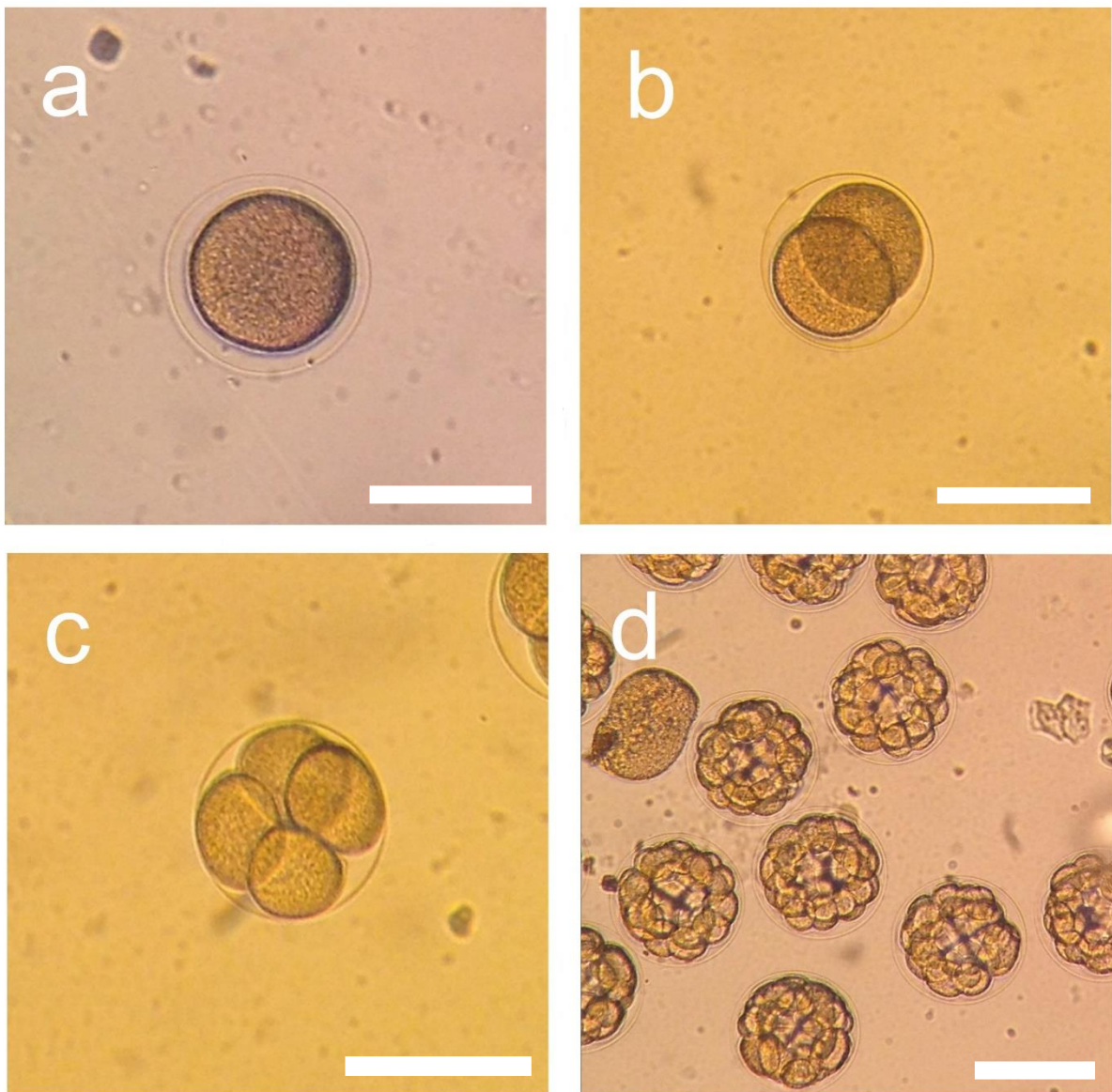
Slika 11. Gonade muškaka ježinca *P. lividus* (osobna arhiva).

3.3. Oplodnja ježinaca i tretman sa srebrnim nanočesticama

Oplodnja jajnih stanica ježinaca izvršena je u četiri čaše volumena od 500 mL. Suspenzija jajnih stanica u morskoj vodi razrijeđena je do koncentracije od otprilike 1000 stanica/mL. Suspenzija je bila svijetlo žute boje. Zatim je u svaku od čaša dodano 0.5 mL razrijeđene suspenzije sperme koja se sastojala od 50 μ L

koncentrirane izolirane sperme suspendirane u 4.950 mL filtrirane morske vode. Morska voda je filtrirana preko filter papira kako bi se iz nje uklonile veće prisutne čestice.

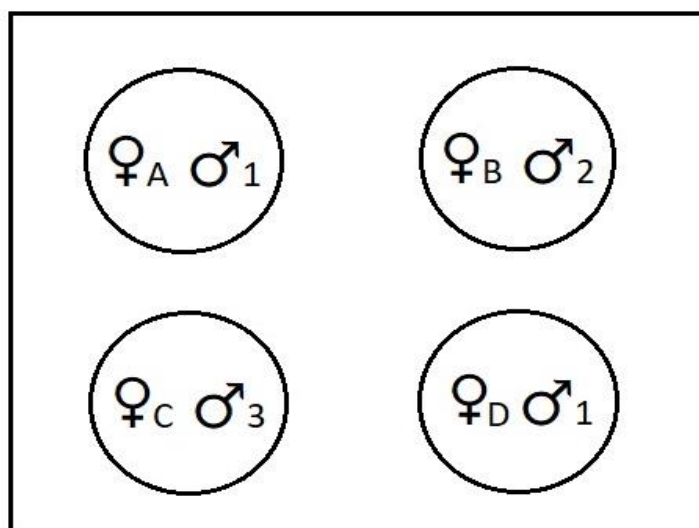
Zatim su čaše ostavljene 30 minuta kako bi se dozvolila uspješna oplodnja jajnih stanica. Nakon 30 minuta uspješnost oplodnje je provjerena pod inverznim mikroskopom i potvrđena pojavom fertilizacijske membrane oko jajnih stanica, a u pojedinim slučajevima čak i prvim diobama.



Slika 12. Fotografije zigota *P. lividus* pod inverznim mikroskopom u različitim stadijima: (a) oplodjena jajna stanica okružena fertilizacijskom membranom; (b) nakon prve diobe; (c) nakon druge diobe; (d) zigota u stadiju morule fotografirana 1 h i 30 min nakon oplodnje (mjerilo 80 μm) (osobna arhiva).

U međuvremenu je izvršen tretman sa AgNP veličine 60 nm. Kako bi se osiguralo da su čestice sasvim raspršene, prije korištenja štok disperzija AgNP je sonificirana 30 minuta sonifikatorom naziva Sonorex Digitec, proizvođača Bandelin.

Eksperiment je izvršen u 4 mikrotitarske ploče s po 4 jažice. Svaka ploča odgovarala je određenoj koncentraciji AgNP: 0 (kontrolni uzorak), 50, 100 i 500 $\mu\text{g/L}$. Najprije je u jažice dodan toksikant, odnosno ultračista miliQ voda u kojoj su AgNP suspendirane. U kontrolnu ploču, u svaku od jažica dodano je 250 μL miliQ vode. U ploču koja je odgovarala koncentraciji toksikanta od 50 $\mu\text{g/L}$ dodano je 25 μL štok disperzije AgNP, u ploču koja je odgovarala koncentraciji toksikanta od 100 $\mu\text{g/L}$ dodano je 50 μL disperzije AgNP, a u ploču koja je odgovarala koncentraciji od 500 $\mu\text{g/L}$ dodano je 250 μL štok disperzije AgNP. Zatim je u svaku od jažica dodano 9 mL morske vode filtrirane preko filter papira. Nakon što je utvrđena uspješna oplodnja, u svaku jažicu dodan je 1 mL zigota. Zigote od 4 ženke i 3 mužjaka su nanošene u jažice križanjem kako je prikazano na Slici 13.



Slika 13. Shema dodavanja zigota u jažice.

Nakon 48 sati, larve su fiksirane kalij kromovim (III) sulfatom i fotografirane na inverznom mikroskopu Zeiss AxioVert 200. Fotografirano je 38 do 50 larvi po uzorku, kako bi se naknadno u programu AxioVision mjerila duljina larvi.

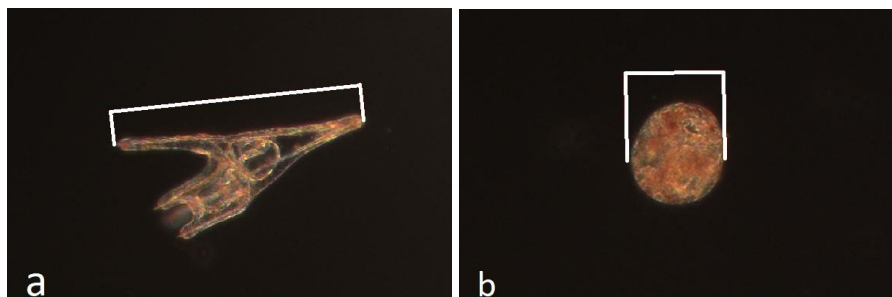
3.4. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost \pm standardna odstupanja, a ispitani su na normalnost distribucije (Shapiro-Wilkinsov testom) i homogenost varijance (Leveneovim testom). Podaci koji su udovoljili tim zahtjevima testirani su jednosmjernom ANOVA-om nakon čega je uslijedio post-hoc Tukeyev test. Za podatke koji nisu zadovoljili prethodne pretpostavke, primijenjen je neparametrijski pristup, odnosno analiza varijance među grupama Kruskal-Wallisovim testom i Mann-Whitney-jevim U testom. Razina statistički značajne razlike između grupe tretiranih embrija u odnosu na kontrolne uzorke odabrana je kao $p < 0.05$.

4. REZULTATI

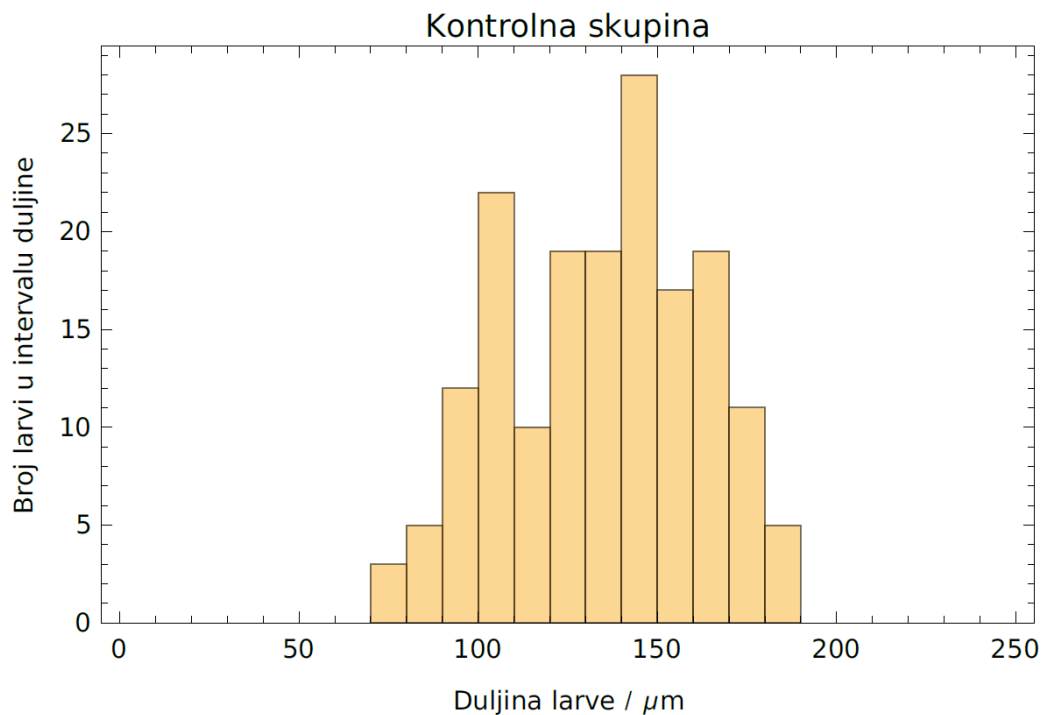
4.1. Određivanje utjecaja srebrnih nanočestica prema veličini larve ježinca

U programu AxioVision izmjerene su duljine ukupno 688 larvi ježinaca iz četiri skupine uzoraka: kontrolne skupine te skupina tretiranih s koncentracijama od 50, 100 i 500 $\mu\text{g/L}$ AgNP. Duljina larvi u stadiju pluteusa mjerila se od apikalnog vrha tijela do vrha najduže “nožice” larve, a u slučaju ranijih razvojnih stadija, mjerio se promjer tijela (Slika 14).



Slika 14. Mjerenje duljine larvi u stadiju u pluteusa (a) i u stadiju kasne morule (b).

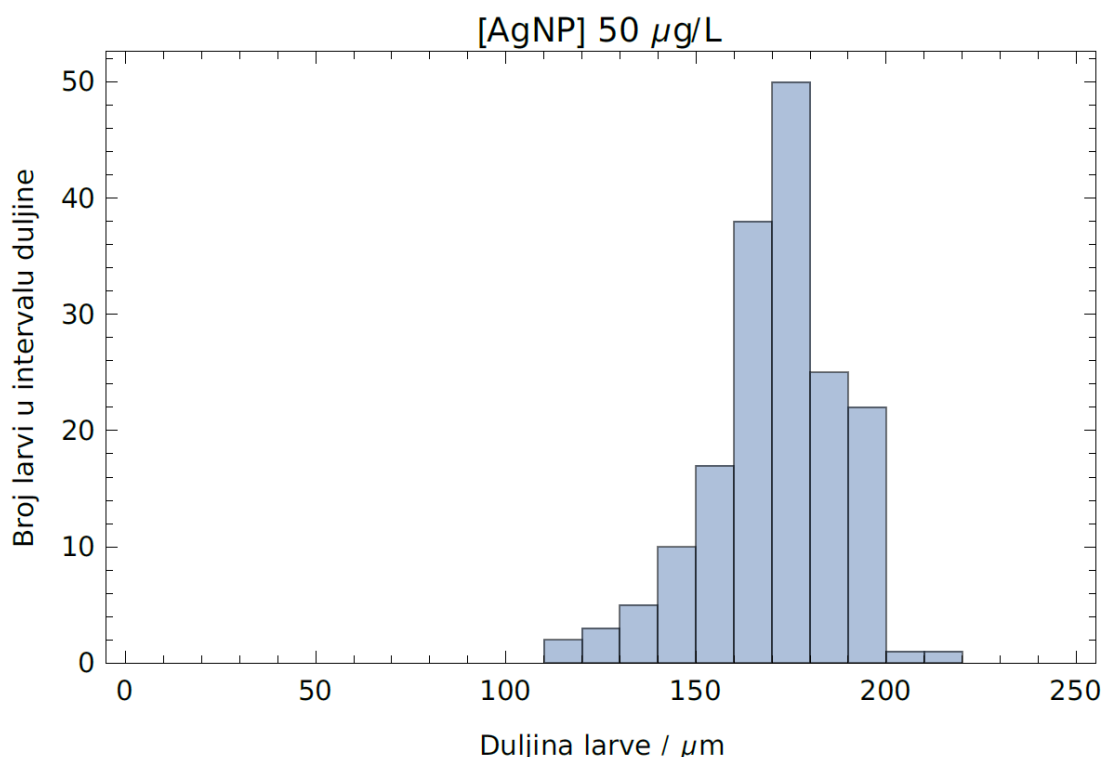
U rezultatima prikazane su veličinske distribucije larvi ježinaca unutar četiri skupine uzoraka. U slučaju kontrolne skupine (Slika 15), gotovo sve jedinice uspješno su dosegle fazu pluteusa.



Slika 15. Histogram veličinske distribucije larvi ježinaca *P. lividus* iz kontrolne skupine

Minimalna duljina larvi unutar ove skupine iznosi 74.17 μm , a maksimalna duljina 182.36 μm . Najzastupljeniji su veličinski interval od 100 do 110 μm i interval od 140 do 150 μm , u kojem se razvio najveći broj larvi. Srednja vrijednost duljine je 134.34 μm , a standardno odstupanje iznosi 26.66 μm .

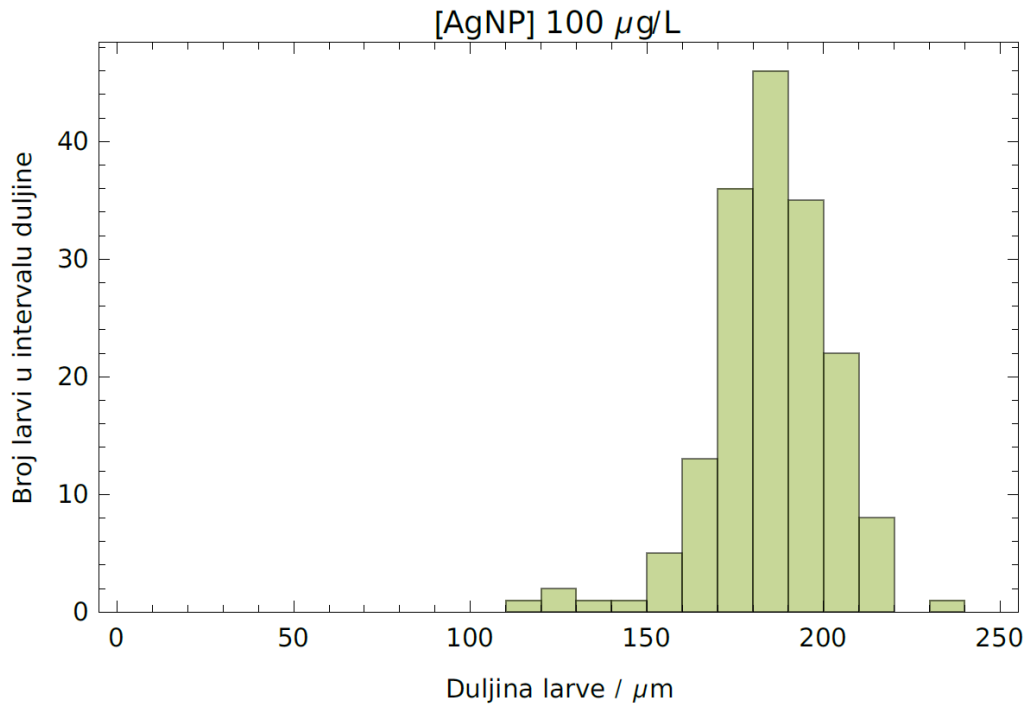
Unutar skupine tretirane s koncentracijom od 50 $\mu\text{g/L}$ AgNP (Slika 16), sve su jedinke uspješno dosegle fazu pluteusa. Minimalna duljina larvi iznosi 118.44 μm , a maksimalna duljina 212.41 μm . Vidljivo je povećanje u prosječnoj duljini jedinki, s najvećim brojem larvi u veličinskom intervalu od 170 do 180 μm . Srednja vrijednost duljine je 170.72 μm , a standardno odstupanje iznosi 16.86 μm . Zastupljenost manjih i većih veličinskih intervala u odnosu na onaj s najvećim brojem larvi je smanjena u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije vidljiv negativan utjecaj ove koncentracije toksikanta na razvoj larvi.



Slika 16. Histogram veličinske distribucije larvi ježinaca *P. lividus* iz skupine tretirane s [AgNP] 50 $\mu\text{g/L}$

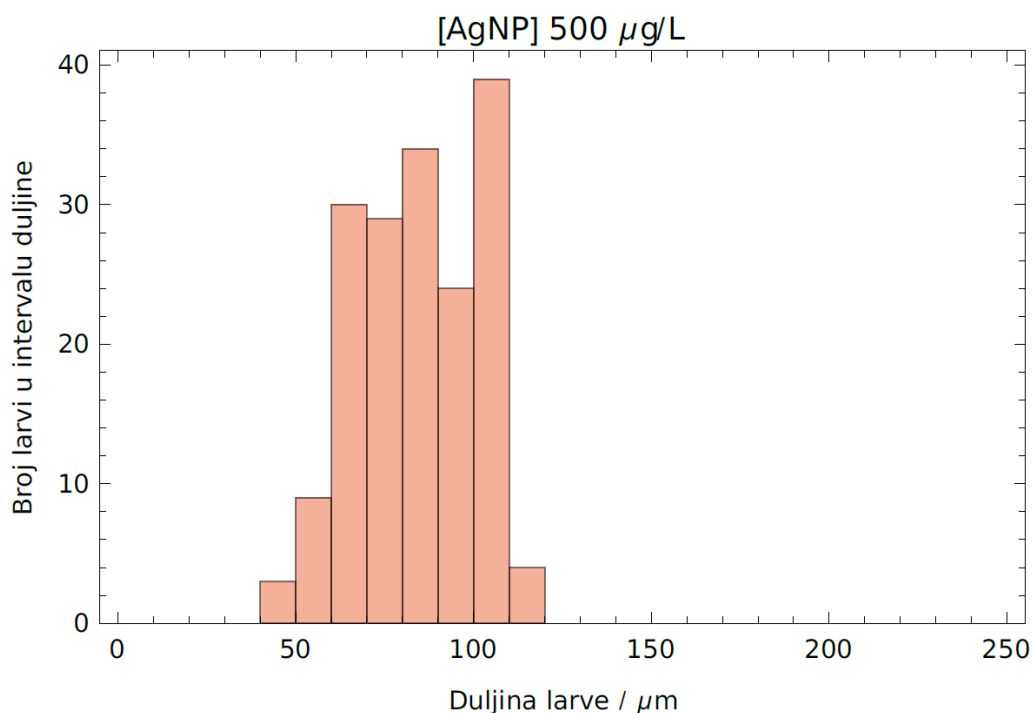
Unutar skupine tretirane s koncentracijom od 100 $\mu\text{g/L}$ AgNP (Slika 17), također nije bilo zaostajanja u razvoju larvi. Minimalna duljina larvi iznosi 117.48 μm , a maksimalna duljina 232.59 μm . Srednja vrijednost duljine je 184.98 μm , a standardno odstupanje iznosi 17.1 μm . Kao i u slučaju prethodne koncentracije, nije vidljiv negativan utjecaj tretmana na razvoj larvi. Najveći broj larvi razvio se u intervalu

duljine od 180 do 190 μm . Vidljivo je dodatno povećanje vrijednosti najzastupljenijeg intervala duljine u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu tretiranu s 50 $\mu\text{g/L}$ AgNP. Gotovo sve larve imaju vrijednosti duljine u rasponu od 170 do 210 μm , a udio zastupljenosti larvi u drugim veličinskim intervalima je vrlo malen.



Slika 17. Histogram veličinske distribucije larvi ježinaca *P. lividus* iz skupine tretirane s [AgNP] 100 $\mu\text{g/L}$

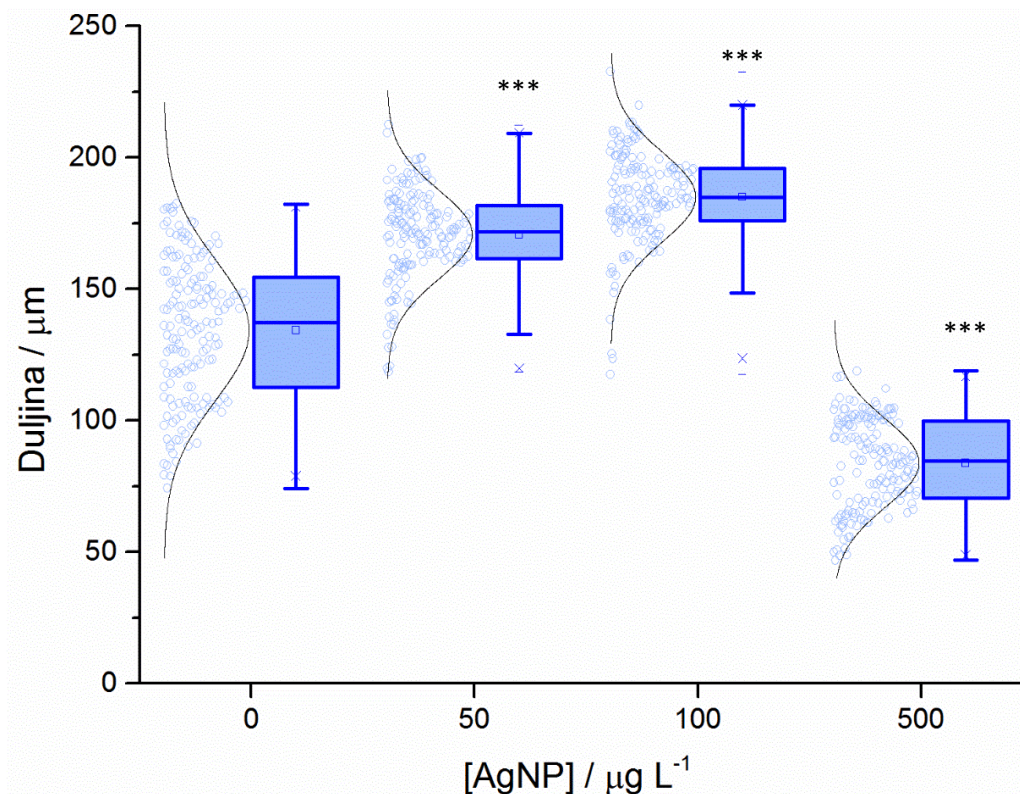
Unutar skupine tretirane s koncentracijom od 500 $\mu\text{g/L}$ AgNP (Slika 18), jasno je vidljiv toksični utjecaj AgNP na razvoj larvi ježinca. Malen broj larvi zaostao je u stadiju gastrule, većina larvi je stala s razvojem u stadiju između gastrule i pluteusa (rana prizma), a samo nekoliko jedinki se razvilo u rani stadij pluteusa.



Slika 18. Histogram veličinske distribucije larvi ježinaca *P. lividus* iz skupine tretirane s [AgNP] 500 µg/L

Minimalna duljina larvi iznosi 46.82 µm, a maksimalna duljina 118.83 µm. Najveći broj larvi razvio se u veličinskom intervalu od 100 do 110 µm. Srednja vrijednost duljine je 83.86 µm, a standardno odstupanje iznosi 16.73 µm.

Raspodjele sve četiri skupine uzoraka prikazane su na Slici 19. Svaka od četiri skupine prikazana je box-plot dijagramom. Najviša oznaka odgovara najvećoj, a najniža oznaka najmanjoj izmjerenoj vrijednosti u danoj skupini, dok granice pravokutnika u sredini prikaza govore o medijanu te o granicama kvartila raspodjele. Osim što ovaj prikaz jasno ukazuje na ubrzani razvoj i povećanje veličine larvi tretiranih sa koncentracijama od 50 i 100 µg/L AgNP, te na, suprotno od toga, usporavanje rasta u skupini tretiranoj sa 500 µg/L AgNP, lako je uočiti da je raspodjela kontrolne skupine znatno šira od raspodjela skupina tretiranih nanočesticama. Promatranje ovog grafa raspodjele nije dovoljno za donošenje zaključaka, pa je provedena potpunija analiza primjenom odgovarajućih statističkih metoda.



Slika 19. Box-plot dijagram distribucija svih ispitivanih skupina larvi ježinaca *P. lividus*

Iako su razlike u distribuciji skupina vidljive iz box-plot dijagrama, provedene su i statističke provjere podataka. Shapiro-Wilkinsovom provjerom, s razinom značajnosti postavljenom na 0.05, za kontrolnu skupinu dobivena je vjerojatnost (p-vrijednost) 0.0031, za skupinu tretiranu s 50 $\mu\text{g/L}$ AgNP dobivena je vrijednost 0.0017, za skupinu tretiranu sa 100 $\mu\text{g/L}$ AgNP dobivena je vrijednost 4.0×10^{-5} , a za skupinu tretiranu s 500 $\mu\text{g/L}$ AgNP dobivena je vrijednost 4.9×10^{-4} . Obzirom da su sve dobivene vjerojatnosti manje od zadane razine značajnosti, mjerenja ne proizlaze iz normalnih raspodjela. Zbog toga su provedene daljnje provjere koje se ne oslanjaju na pretpostavku o normalnoj raspodjeli. Nadalje, Levene-ova provjera međusobne jednakosti varijanci različitih skupina, s razinom značajnosti zadanom na 0.05, pokazala je da se varijance skupina značajno razlikuju. Neparamtarska ANOVA Kruskal Walis provjera pokazala je, uz razinu značajnosti zadanu na $p < 0.001$, da postoji značajna razlika između grupa. Provedba Mann-Whitney-jeve -provjere nad kontrolnom skupinom i skupinom tretiranom s 50 $\mu\text{g/L}$ AgNP, kao i nad kontrolnom skupinom i skupinom tretiranom sa 100 $\mu\text{g/L}$ i 500 $\mu\text{g/L}$ AgNP, pokazale su da svi parovi skupina proizlaze iz različitih raspodjela ($p < 0.001$).

5. RASPRAVA

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da nanočestice prisutne u morskom okolišu mogu nanijeti štetu organizmima. U provedenom istraživanju toksikant su bile AgNP veličine 60 nm, a njihov učinak na razvoj larvi ježinca *P. lividus* ovisio je o primijenjenoj koncentraciji. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da post-fertilizacijsko izlaganje larvi koncentraciji od 50 µg/L AgNP nije uzrokovalo negativan utjecaj na organizme, već je uočeno ubrzanje rasta i povećanje veličine larvi u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, pri izlaganju koncentraciji od 100 µg/L AgNP uočen je sličan stimulacijski učinak, s dodatnim povećanjem srednje veličine larvi iz ove skupine za 8.35% u odnosu na skupinu tretiranu s 50 µg/L AgNP. Negativan utjecaj toksikanta na organizme vidljiv je u veličinskoj distribuciji skupine tretirane s koncentracijom od 500 µg/L AgNP, koja je uzrokovala usporavanje rasta i smanjenje veličine larvi. Srednja vrijednost larvi iz ove skupine smanjila se za 37.58% u odnosu na kontrolnu skupinu. Učinak toksikanta pri koncentracijama od 50 i 100 µg/L AgNP, odnosno uočeno ubrzanje rasta i povećanje veličine larvi u ovim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom, može se objasniti mehanizmom koji se naziva *hormesis* (grč. *hórmēsis* – brzo kretanje, spremnost). U toksikologiji, *hormesis* je pojam koji se odnosi na adaptivne odgovore bioloških sustava na umjerene razine okolišnog stresa, kroz koje sustavi poboljšavaju svoju funkcionalnost i potencijalno toleranciju na veće razine okolišnog stresa. Organizmi izloženi različitim koncentracijama određenog toksikanta pokazuju dvofazni odgovor karakteriziran stimulacijom rasta i razvoja pri nižim koncentracijama te inhibicijom istih pri višim koncentracijama. Uzevši u obzir važnost procjene odgovora bioloških sustava, ovisnih o dozi, na prisutne niske koncentracije umjetno proizvedenih nanočestica (ENP) ispuštenih u okoliš, ovaj je mehanizam postao bitno područje interesa i za nanoekotoksikologe (lavicoli i sur., 2018). Istraživanja su pokazala hormetičke odgovore više vrsta ENP na različitim razinama biološke organizacije, a posebice AgNP. Tyne i sur. (2015) u svojem su istraživanju ispitali utjecaj 8 nm AgNP u koncentracijama od 0 do 4 µg/mL na brojnost potomstva oblića vrste *Caenorhabditis elegans* kroz period od 72 h. Pri koncentraciji od 0.0625 µg/mL AgNP brojnost potomstva se povećala (89 i 117 potomaka u prvom i drugom mjerenju) u odnosu na kontrolnu skupinu (75 potomaka), dok je pri višim koncentracijama (2, 4 µg/mL AgNP) brojnost bila znatno smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Saggese i sur. (2016) u svojem su istraživanju ispitali utjecaj AgNP na lesepsijsku vrstu morskog

školjkaša *Brachidontes pharaonis*. Jedinke su izlagane koncentracijama od 2 do 40 $\mu\text{g/L}$ AgNP kroz period od 8 dana. Stopa disanja jedinki povećala se pri koncentracijama od 2 i 40 $\mu\text{g/L}$ AgNP, dok pri koncentraciji od 20 $\mu\text{g/L}$ nije pokazala povećanje u odnosu na kontrolu. Imajući u vidu hormetički učinak koji su AgNP pri niskim koncentracijama izazvale kod drugih organizama, moguće je da se odgovor ježinaca uočen u ovom radu, pri koncentracijama od 50 i 100 $\mu\text{g/L}$, također može objasniti hormetičkim utjecajem na razvoj larvi. Međutim, točni molekularni mehanizmi ove pojave uzrokovane nanočesticama još uvijek su nepoznati. Sporno je jesu li odgovori na tretmane s NP karakterizirani stimulacijom određenih bioloških procesa posljedica *hormesis*-a ili su u vezi s količinom iona koji se ispuštaju s površine nanočestica. Kada uđu u žive stanice, AgNP se oksidativno rastapaju, mijenjaju svojstva kao što su masa i morfologija i oslobađaju ione s njihove površine. Time stanični sadržaj postaje izložen složenoj mješavini nanočestica, slobodnih aktivnih iona i kompleksa iona i liganda, što otežava identifikaciju oblika srebra koji izaziva promatrani toksični učinak. Određena su istraživanja sugerirala da AgNP unutar stanica djeluju putem takozvanog mehanizma „Trojanskog konja“. Jednom kada uđu u žive stanice, AgNP mogu zauzeti ulogu glavnog izvora ionskog srebra. Reakcijom vodikovog peroksida (H_2O_2), jednog od glavnih unutarstaničnih reaktivnih oblika kisika, s nanočesticama srebra nastaje sve više toksičnih iona srebra (Hsiao i sur., 2015). Iz tog razloga se oksidativni stres induciran prekomjernim nastajanjem reaktivnih vrsta kisika smatra glavnim procesom zaslužnim za oštećenja DNA, aktivaciju antioksidativnih molekula i inaktivaciju proteina. Pored toga, poznato je da se u nekim slučajevima AgNP nakupljaju u unutarstaničnim odjeljcima, raspadaju unutar endolizosomalnih vezikula te otpuštaju Ag^+ ione i reagiraju s ionima klora te antioksidativnim molekulama kao što su cistein i glutation (Magesky i Pelletier, 2018). Drugi predloženi mehanizam citotoksičnosti AgNP uzročnikom smatra ione Ag^+ koji nastaju izvan stanice. Šiller i sur. (2013) u svojem su istraživanju proveli post-fertilizacijsko izlaganje larvi ježinca *P. lividus* koncentracijama od 3, 0.3 i 0.03 mg/L AgNP. Također su ispitali i utjecaj odgovarajućih koncentracija Ag^+ iona: 0.03, 0.003 i 0.0003 mg/L. Odgovor ježinca ovisio je o primijenjenoj dozi. Tretman s 0.03 mg/L AgNP pokazao je slične rezultate kao i kontrolna skupina. U tretmanu ekvivalentom količinom Ag^+ koja bi bila ispuštena tretirajući larve s odgovarajućom koncentracijom AgNP (3 mg/L), ioni su uzrokovali značajne nedostatke u razvoju larvi pri koncentraciji od 0.03 mg/L nakon 48 h. Nakon 24 h razvoja pri nižim

koncentracijama, postotak nerazvijenih larvi bio je oko 20% ili manji. Suprotno tome, značajne promjene su uočene pri koncentraciji od 3 mg/L AgNP, gdje niti jedna larva nije uspjela doseći stadij blastule ili gastrule. Dok su se larve iz kontrolne skupine kroz 48 h uspješno razvile do stadija pluteusa, oko 93% larvi tretiranih koncentracijom od 0.3 mg/L AgNP nakon 48 h pokazale su zastoj u stadiju kasne prizme ili ranog pluteusa, s dobro razvijenim probavnim traktom i tjelesnom simetrijom, ali s vrlo kratkim „nožicama“, dok su u nekoliko slučajeva uočene i dodatne skeletne strukture. Spomenuti negativni učinci na razvoj larvi ne mogu povezati isključivo s otpuštanjem Ag⁺ jer su značajno jači nego pri odgovarajućoj koncentraciji Ag⁺ samih. Iz rezultata ovog rada zaključeno je da AgNP izazivaju veće toksične učinke na ježinca *P. lividus* od njima odgovarajućih koncentracija Ag⁺. Sličan rezultat potvrđen je od strane Burić i sur. (2015) gdje su AgNP, pri niskim koncentracijama, u nekim slučajevima pokazali veći negativni učinak na embrionalni razvoj u usporedbi s odgovarajućom masom Ag⁺.

Saco-Alvarez i sur. (2010) proveli su istraživanje utjecaja različitih abiotičkih parametara na rani embrionalni i kasniji larvalni razvoj ježinca *P. lividus*, u svrhu optimiziranja parametara korištenih pri provedbi SUEDT. Također su definirali kriterije valjanosti izmjerenih vrijednosti kontrolne skupine, koji služe kako bi ukazali na potencijalnu lošu biološku kvalitetu testnih organizama. Pri izradi krivulja osjetljivosti na različite parametre uzete su u obzir 3 krajnje točke testa izmjerene 48 h nakon oplodnje: morfološki izgled larve (4 dobro razvijene „nožice“), duljina normalne larve, i rast larve definiran kao povećanje u maksimalnoj dimenziji (normalne larve ili ranijih razvojnih stadija). Prema tim kriterijima kontrola se smatra valjanom ako srednja vrijednost duljine larvi premašuje 340 µm. U ovom je istraživanju srednja vrijednost duljine larvi iz kontrolne skupine samo 134.34 µm, čemu je razlog vjerojatno to što su ježinci uzgajani pri nižoj temperaturi što je rezultiralo sporijim razvojem. Saco-Alvarez i sur (2010) naveli su da temperatura ima snažan utjecaj na razvoj embrija i rast larvi. Uspješan razvoj i rast uočava se u rasponu od 18 do 22°C (80-100% uspješnosti u odnosu na kontrolu), dok je u rasponu od 12 do 16 °C uspješnost bila 0 - 30% u odnosu na kontrolu. U ovom radu, larve su uzgajane pri temperaturi od 18 °C. Nadalje, rezultati od Saco-Alvarez i sur. (2010) pokazali su da su rani razvojni stadiji larvi *P. lividus* jako osjetljivi na promjene saliniteta i pH medija. Raspon saliniteta u kojem embriji postižu optimalni razvoj je od 30‰ do 35‰, a pri nižim i višim

salinitetima razvoj embrija i rast larvi značajno je smanjen. U ovom radu salinitet je iznosio 38‰ što je nakon 48 h, uz niske temperature tijekom razvoja, rezultiralo malim embrijima. Niz drugih faktora mogao je imati učinak na razvoj larvi. Isti učinak je utvrđen i za pH vrijednosti niže od 7.0 i više od 8.5. Suprotno tome, na količinu otopljenog O₂ nije utvrđena visoka osjetljivost, s uspješnim razvojem embrija i larvi u širokom rasponu oko standardne koncentracije otopljenog O₂ od 6.2 mg/L i naglim smanjenjem uspješnosti razvoja tek ispod 2 mg/L. Neionizirani amonijak prisutan u mediju pokazao se visoko toksičnim za embrije. Snažna inhibicija i nagli pad uspješnosti razvoja embrija uočeni su pri koncentracijama većim od 80 µg/L u rezultatima Saco-Alvarez i sur. (2010).

Chan i sur. (2015) u svojem su istraživanju ispitivali utjecaj različitih pH vrijednosti (8.0, 7.6, 7.2) na razvoj i putanje plivanja larvi ježinca *S. droebachiensis*. Rezultati su pokazali da su promjene u pH utjecale na rast larvi, ali ne i na stopu mortaliteta i putanje plivanja. Niži pH uzrokovao je sporiji rast i morfološke promjene u odnosu na kontrolu, što bi moglo uzrokovati produljenje pelagičkog perioda života larvi te bi tako preživjele larve mogle izrasti u manje odrasle jedinke. Međutim suprotno očekivanjima, ove morfološke promjene nisu utjecale na putanje plivanja. U ovome slučaju, larve *S. droebachiensis* pokazale su snažnu fenotipsku plastičnost pod uvjetima sniženog pH, odnosno povišene kiselosti medija. Liu i sur. (2006) svoje su istraživanje usmjerili na proučavanje učinka hranjenja larvi *P. lividus* različitim vrstama hrane: mikroalgama vrste *Dunaliella tertiolecta*, kapsuliranom formulom hrane i koncentriranom pastom algi, te su pratili stopu preživljavanja i metamorfoze. Pasta nije podržala rast larvi. Iako su larve pokazale najveću sklonost prema mikroalgi *D. tertiolecta* kao hrani i postigle najbržu stopu rasta kada su bile hranjene ovom algom, nisu zamijećene značajne razlike u stopi rasta i metamorfoze između skupina hranjenih mikroalgom, kapsuliranom formulom ili njihovom kombinacijom. Larve hranjene kapsuliranom formulom su pod visokom učestalošću hranjenja održale normalnu stopu rasta, a post-larvalni razvoj je u ovoj skupini bio značajno uspješniji u odnosu na skupinu hranjenu mikroalgom. Ovo su primjeri koji potkrepljuju rezultat dobiven u ovom radu, odnosno ukazuju na sposobnost larvi ježinaca da pod utjecajem stresora i čimbenika koji nisu karakteristični za njihov razvoj u prirodnom okruženju razvijaju prilagodbe, te u pojedinim slučajevima ovakvi čimbenici pojačavaju funkcionalnost bioloških puteva unutar organizma i stimuliraju

rast i razvoj. S obzirom na to da je u ovom radu praćen razvoj larvi 48h od oplodnje, ne može se utvrditi je li u ovom slučaju najviša koncentracija AgNP (500 µg/L) uzrokovala isključivo znatno usporavanje rasta ili i mortalitet larvi, te ostaje nepoznato kako bi se pod utjecajem toksikanta odvijao kasniji razvoj larvi i kakve bi on daljnje učinke imao na njihovu morfologiju i ponašanje u morskom okolišu, odnosno bi li se imunološki sustav, koji obuhvaća različite stanične i podstanične obrambene mehanizme, reaktivirao da umanjuje utjecaj toksikanata kojima su bili izloženi embriji u ranoj fazi razvoja.

6. ZAKLJUČAK

Sa sve većim razvojem nanotehnologije i povećanjem zastupljenosti proizvoda koji sadrže nanočestice te njihovim ispuštanjem u morski okoliš, raste i važnost istraživanja negativnih učinaka nanočestica na morske organizme. Ovaj se rad bavi istraživanjem učinka različitih koncentracija nanočestica srebra (AgNP) na ježinca *P. lividus*. Rezultati istraživanja pokazuju da, unatoč opaženom pozitivnom stimulacijskom učinku AgNP na rast larvi pri manjim koncentracijama, pri većim koncentracijama one imaju toksičan učinak i rezultiraju zastojem u razvoju larvi. Ovaj zanimljiv rezultat, koji se može povezati s principom poznatim kao *hormesis*, do sada nije potvrđen u literaturi te ostaje i dalje kontroverzna ideja. Nova istraživanja vezana za utjecaj AgNP na embrionalni razvoj trebaju uključivati mjerenja pH, kao i otopljeni kisik i amonijak kako bi se utvrdilo način djelovanja tih abiotičkih parametara na brzinu otpuštanja Ag⁺ iona s površine AgNP kao i utjecaje koji proizlaze s paralelnim djelovanjem abiotičkih faktora i AgNP. Nadalje, na temelju ovih rezultata potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdio točan mehanizam interakcije AgNP s oplođenim jajnim stanicama kao i točni molekularni putevi koji utječu na embrionalni razvoj. Također, bilo bi korisno provesti usporedno istraživanje učinka post-fertilizacijskog izlaganja AgNP na razvoj i duljinu larvi ježinaca različitih vrsta, kako bi se utvrdile razlike u njihovom odgovoru i osjetljivosti na ispitivani toksikant.

7. LITERATURA

Angel, B. M., Batley, G. E., Jarolimek, C. V., Rogers, N. J. (2013.) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*. 93(2). str. 359–365.

Arslan O. C., Karaaslan M. A. (2016.) Bioavailability of Sea Urchin to Aquatic Toxicity Tests. *Journal of Aquatic Pollution and Toxicology*. 1. str. 1-6.

Banks, Edgar R. Sea Urchins: Habitat, Embryonic Development and Importance in the Environment, Nova Science Publishers, Inc., 2014.

Burduşel, A.-C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Fikai, A., Andronescu, E. (2018.) Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials*. 8(9). str. 681.

Burić, P., Jakšić, Ž., Štajner, L., Dotour Sikirić, M., Jurašin, D., Cascio, C., Calzolari, L., Lyons, D. M. (2015.) Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. *Marine Environmental Research*. 111. str. 50-59.

Burić, P., Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralješnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca, doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018.

Cameron, R. A. (2002.) Sea urchin developmental genetics and culture. In: Matranga Smolenicka (Eds) The sea urchin: From basic biology to aquaculture. Swets and Zeitlinger Lisse, pp: 31–36.

Chan, K. Y. K., García, E., Dupont, S. (2015.) Acidification reduced growth rate but not swimming speed of larval sea urchins. *Scientific Reports*, 5(1)

Corsi, I., Cherr, N. I., Lenihan, S. H., Labille, J., Hasselov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puentes, V., Della Torre, C., Pinsino, A., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., Matranga, V. (2014.) Common Strategies and Technologies for the Ecosafety Assessment and Design of Nanomaterials Entering the Marine Environment. *ACS NANO*. 8. str. 9694-9709.

- Duran, S., Palacin, C., Beccerto, M. A., Turon, X., Giribert, G. (2004.) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*. 13(11). str. 3317–3328.
- Ebert, T. A. (2008.) Longevity and lack of senescence in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Experimental Gerontology*. 43(8). str. 734–738.
- Esposito, A., Cipollaro, M., Corsale, G., Ragucci, E., Giordano, G. G., Pagano, G. (1986.) The Sea Urchin Bioassay in Testing Pollutants. Strategies and Advanced Techniques for Marine Pollution Studies, str. 447–455.
- Gambardella, C., Morgana, S., Bari, G.D., Ramoino, P., Bramini, M., Diaspro, A., Falugi, C., Faimali, M. (2015a) Multidisciplinary screening of toxicity induced by silica nanoparticles during sea urchin development. *Chemosphere* 139, str. 486-495.
- Giudice, G. Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo. Academic Press, 1973.
- Hsiao, I.-L., Hsieh, Y.-K., Wang, C.-F., Chen, I.-C., & Huang, Y.-J. (2015.) Trojan-Horse Mechanism in the Cellular Uptake of Silver Nanoparticles Verified by Direct Intra- and Extracellular Silver Speciation Analysis. *Environmental Science & Technology*. 49(6). str. 3813–3821.
- Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., Calabrese, E. (2018.) Nanoparticle Exposure and Hormetic Dose–Responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(3). str. 805.
- James, P., Siikavuopio, S. A Guide to the Sea Urchin Reproductive Cycle and Staging Sea Urchin Gonad Samples, skripta istraživačkog instituta Nofima AS, 2018.
- Ju-Nam, Y., Lead, J.R. (2008.) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental problems. *Science of the Total Environment* 400. str. 396-414.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., Mueller, E. (2013.) Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Research*. 47(12). str. 3866-3877.

- Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H. (2011.) Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*. 45(9). str. 3902-3908.
- Kanold, J.M. , Wang, J., Brummer, F., Šiller, L. (2016.) Metallic nickel nanoparticles and their effect on the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*. 212. str. 224-229.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017.) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(7). str. 908-931.
- Klaine, J.S., Alvarez, J.J.P., Batley, E.G., Fernandes, F.T., Handy, D.R., Lyon, Y.D., Mahendra, S., McLaughlin, J.M., Lead, R.J. (2008.) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and affects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27. str. 1825-1851.
- Lawrence, John M. Edible Sea Urchins: Biology and Ecology, London: Elsevier Science, 2013.
- Liu, H., Kelly, M. S., Cook, E. J., Black, K., Orr, H., Zhu, J. X., Dong, S. L. (2007.) The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, I. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (*Echinodermata*). *Aquaculture*, 264(1-4). str. 247–262.
- Magesky, A., Pelletier, É. (2018.) Cytotoxicity and Physiological Effects of Silver Nanoparticles on Marine Invertebrates. *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, str. 285–309
- Manno, D., Carata, E., Tenuzzo, B. A., Panzarini, E., Buccolieri, A., Filippo, E., Rossi, M., Serra, A., Dini, L. (2012.) High ordered biomineralization induced by carbon nanoparticles in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Nanotechnology*. 23: 495104
- Manzo, S. Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G. (2013.) Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Hazardous Materials*. 15, str. 254-255
- Matranga, V., Corsi, I. (2012.) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*. 76. str. 32 – 34.

Oral, R., Pagano, G., Siciliano, A., Gravina, M., Palumbo, A., Castellano, I., Migliaccio, O., Thomas, P. J., Guida, M., Trifuoggi, M. (2017.) Heavy rare earth elements affect early life stages in *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* sea urchins. *Environmental Research*. 154. str. 240-246

Pagano, G., Guida, M., Trifuoggi, M., Thomas, P., Palumbo, A., Romano, G., Oral, R. (2017.) Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: I. Inorganics, Organics, Complex Mixtures and Natural Products. *Expert Opinion on Environmental Biology* 2017. 6:1

Pechenik, Jan A. Biology of the Invertebrates. Boston: McGraw-Hill, 2015. Press Inc. 469 pp.

Pritchard, J.B. (1993.) Aquatic toxicology: past, present, and prospects. *Environmental Health Perspectives*. 100. str. 249-257.

Saco-Álvarez, L., Durán, I., Ignacio Lorenzo, J., Beiras, R. (2010.) Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73(4). str. 491–499.

Saggese, I., Sarà, G., Dondero, F. (2016.) Silver Nanoparticles Affect Functional Bioenergetic Traits in the Invasive Red Sea Mussel *Brachidontes pharaonis*. *BioMed Research International* 2016, 1872351

Sugni, M., Mozzi, D., Barbaglio, A., Bonasoro, F., & Candia Carnevali, M. D. (2007.) Endocrine disrupting compounds and echinoderms: new ecotoxicological sentinels for the marine ecosystem. *Ecotoxicology*.16(1). str. 95–108.

Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018.) Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, 13: 44

Šiller, L., Lemloh, M.L., Pitiicharoenphun, S., Mendis, B.G., Horrocks, B. R., Brümmer, F., Medaković, D. (2013.) Silver nanoparticles toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*. 178. str. 498-502.

Torres-Duarte, C., Adeleye, A.S., Pokhrel, S., Madler, L., Keller, A. A., Cherr, G. N. (2015.) Developmental effects of two different copper oxide nanomaterials in sea urchin (*Lytechinus pictus*) embryos. *Nanotoxicology* 8. str. 1-9.

Turk, T. Pod površinom Mediterana. Školska knjiga, Zagreb, 2011.

Tyne, W., Little, S., Spurgeon, D.J., Svendsen, C. (2015.) Hormesis depends upon the life-stage and duration of exposure: Examples for a pesticide and a nanomaterial. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 120. str. 117–123.

Ullrich-Luter, E. M., Dupont, S., Arboleda, E., Hausen, H., & Arnone, M. I. (2011.) Unique system of photoreceptors in sea urchin tube feet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(20). str. 8367–8372.

Wu, B., Torres-Duarte, C., Cole, B.J., Cherr, G.N. (2015.) Copper oxide and zinc oxide nanomaterials act as inhibitors of multidrug resistance transport in sea urchin embryos: their role as chemosensitizers. *Environmental Science and Technology*. 49. str. 5760-5770.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Biološki učinci srebrnih nanočestica na larvalni razvoj ježinca *Paracentrotus lividus*

LUCIA ILIJIĆ

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

SAŽETAK

Nanočestice srebra (AgNP) imaju široku primjenu u medicinske, prehrambene, zdravstvene, potrošačke i industrijske svrhe. S obzirom na sve veću zastupljenost proizvoda koji sadrže AgNP očekuje se i sve veća opterećenost okoliša ovim nanočesticama, te raste važnost istraživanja koja se bave njihovim utjecajem na žive organizme. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalnu toksičnost AgNP na larvalni razvoj ježinca *Paracentrotus lividus* primjenom testa embrionalnog razvoja ježinca (SUEDT). Oplođene zigote ježinaca izložene su koncentracijama od 50, 100 i 500 µg/L AgNP te se nakon 48h mjerila duljina larvi. Pri koncentracijama od 50 i 100 µg/L AgNP, uočen je porast u brzini razvoja i veličini larvi u odnosu na kontrolnu skupinu, a koncentracija od 500 µg/L AgNP uzrokovala je zastoj u razvoju larvi i značajno smanjenje duljine u odnosu na kontrolnu skupinu. S toga, provedba testa dokazala je da AgNP imaju toksičan učinak na ispitivanu vrstu ovisan o primijenjenoj dozi, a opaženi stimulacijski učinak nižih koncentracija na larvalni razvoj moguća je posljedica znanstvenog principa poznatog kao *hormesis*. Međutim, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdili točni mehanizmi paralelnog djelovanja AgNP i različitih abiotičkih faktora (pH, otopljeni kisik, temperatura, amonijak) na larvalni razvoj ove vrste te kako bi se utvrdio točan mehanizam interakcije AgNP sa oplođenim jajnim stanicama.

Ključne riječi:

larvalni razvoj, *Paracentrotus lividus*, srebrne nanočestice, SUEDT

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

doc. dr. sc. Petra Burić

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić

doc. dr. sc. Ines Kovačić

prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Datum obrane: 13. 2. 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula
University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Bachelor thesis

Biological impact of silver nanoparticles on the larval development of sea urchin *Paracentrotus lividus*

LUCIA ILIJIĆ

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have gained widespread use in medical, health, consumer and industrial applications. Given the increasing use of products containing AgNPs, an increase in the amount released into the environment is also expected. Therefore, it is of growing importance to study the effects of AgNPs on living organisms. The aim of this study was to investigate the potential toxicity of AgNPs on the larval development of sea urchin *Paracentrotus lividus*. For this purpose, the sea urchin embryonal development test (SUEDT) was used. Fertilised zygotes of *P. lividus* were exposed to concentrations of 50, 100 and 500 µg/L AgNPs and larval length was measured after 48 hours. Larvae treated with 50 and 100 µg/L AgNPs showed an increase in size and development rate compared to the control, while larvae treated with 500 µg/L AgNPs exhibited a reduced development rate and were significantly smaller in size compared to the control. Thus, the test has shown that AgNPs have toxic effects on the test species dependent on the dose administered. The stimulatory effects observed in larvae treated with lower concentrations of AgNPs could possibly be related to hormesis. However, further studies should be conducted in order to clarify the precise mechanisms that AgNPs and different abiotic factors (pH, dissolved oxygen, temperature, ammonia) simultaneously exert on larval development. In addition, further studies should aim to improve understanding of the ways AgNPs interact with fertilised eggs of *P. lividus*.

Key Words:

Larval development, *Paracentrotus lividus*, silver nanoparticles, SUEDT

Supervisor: Prof. Daniel Mark Lyons, PhD

Asst. Prof. Petra Burić, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Mauro Štifanić, PhD

Asst. Prof. Ines Kovačić, PhD

Prof. Daniel Mark Lyons, PhD

Thesis defence: 13/2/2020.