

Ježinci u istraživanju toksičnosti u posljednjem desetljeću

Šižgorić Winter, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:137:351963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet prirodnih znanosti
Sveučilišni prijediplomski studij Znanost o moru

DORA ŠIŽGORIĆ WINTER

**Ježinci u istraživanju toksičnosti u posljednjem
desetljeću**

Završni rad

Pula, rujan 2024.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet prirodnih znanosti
Sveučilišni prijediplomski studij Znanost o moru

DORA ŠIŽGORIĆ WINTER

Ježinci u istraživanju toksičnosti u posljednjem desetljeću

Završni rad

JMBAG: 0303091767

Studijski smjer: Prijediplomski studij Znanost o moru

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Predmet: Molekularna toksikologija i ekotoksikologija

Mentor: doc. dr. sc. Petra Burić

Komentor: dr. sc. Moira Buršić

Pula, rujan 2024.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Ježinci | 1 |
| 1.2. Ježinci u toksikološkim studijama | 3 |
| 1.3. Zagađivala u toksikološkim studijama ježinaca | 3 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 6 |
| 3. METODA ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 3.1. Pretraga Scopus baze znanstvenih radova..... | 7 |
| 4. REZULTATI..... | 9 |
| 4.1. Godišnja i prostorna distribucija istraživanja toksičnosti ježinaca u posljednjem desetljeću..... | 9 |
| 4.2. Ježinci u toksikološkim studijama..... | 12 |
| 4.3. Eksperimenti toksičnosti koji su koristili ježince u posljednjem desetljeću | 15 |
| 4.4. Različite vrste kemikalija korištene u istraživanju toksičnosti ježinaca u posljednjem desetljeću..... | 19 |
| 5. RASPRAVA | 25 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 33 |
| 7. LITERATURA..... | 34 |
| 8. SAŽETAK..... | 51 |
| 9. ABSTRACT | 52 |

1. UVOD

1.1. Ježinci

Morski ekosustavi suočeni su s brojnim antropogenim pritiscima, uključujući onečišćenje različitim kemikalijama. Procjena toksičnosti ovih tvari na morske organizme od ključne je važnosti za očuvanje morske bioraznolikosti i usluga ekosustava. U tom kontekstu, morski ježinci (Echinoidea) su se etablirali kao nezaobilazni modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima. Njihova široka rasprostranjenost, ekološka važnost i fiziološke karakteristike čine ih idealnim za proučavanje utjecaja zagađivača na morske organizme. Njihova morfologija, s karakterističnim pokretljivim bodljama i čvrstim egzoskeletom, omogućuje im preživljavanje u različitim staništima, od plitkih obalnih područja do dubokomorskih ekosustava (Smith i sur., 2015). Kao herbivori, ježinci mogu utjecati na gustoću populacije algi i sudjeluju u održavanju ravnoteže ekosustava (Lawrence, 2013).

Ježinci su dugo vremena bili predmet znanstvenog interesa zbog svoje uloge u morskim hranidbenim mrežama i osjetljivosti na promjene u okolišu. Njihova sposobnost regeneracije, jednostavan životni ciklus i dobro proučena genetika čine ih pogodnima za laboratorijska istraživanja (Jones, 2018). Štoviše, njihova ekološka uloga kao herbivora i detritivora te njihova osjetljivost na promjene u okolišu čini ih ključnim indikatorima zdravlja morskih ekosustava (White i sur., 2020a).

U posljednjih nekoliko desetljeća, istraživanja su pokazala da ježinci mogu reagirati na niz toksičnih tvari, uključujući teške metale, pesticide, farmaceutske proizvode i mikroplastiku. Promjene u njihovom ponašanju, fiziologiji i razvoju mogu poslužiti kao rani pokazatelji onečišćenja morskog okoliša. Brown i Thompson (2017) su pokazali da ježinci mogu reagirati na različite toksine u okolišu, što ih čini idealnim za laboratorijska ispitivanja.

Obzirom na sve veću zabrinutost zbog degradacije morskog okoliša, istraživanja na ježincima postaju sve relevantnija. Kako su istaknuli White i sur. (2020b), promjene u staništima ježinaca mogu ukazivati na prisutnost zagađenja, dok biološki odgovori ovih organizama često pružaju dragocjene informacije o potencijalnim ekološkim prijetnjama.

U Jadranskom moru, vrste poput *Paracentrotus lividus* (Slika 1) i *Arbacia lixula* su često korištene u istraživanjima toksičnosti. Njihova široka rasprostranjenost, otpornost na stresne uvjete i dostupnost čine ih idealnim modelima za laboratorijska ispitivanja (Alač, 2018).



Slika 1. Ježinac *Paracentrotus lividus* slikan na otoku Žirju, Hrvatska.

Ježinci su pokazali visoku osjetljivost na različite toksine, uključujući teške metale, pesticide i mikroplastiku (Burić i sur., 2024). Njihova jajašca i embriji su posebno osjetljivi na promjene u okolišu, što omogućuje preciznu procjenu učinaka različitih zagađivala u ranim fazama razvoja (Giudice i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da ježinci mogu akumulirati toksine iz okoliša i da su njihovi biološki procesi osjetljivi na promjene u koncentraciji tih toksina (Gambardella i sur., 2016).

Zaključno, ježinci predstavljaju neprocjenjiv alat u istraživanju utjecaja onečišćenja na morske ekosustave. Njihova ekološka važnost, fiziološke karakteristike i osjetljivost na toksine čine ih idealnim modelnim organizmima za procjenu rizika povezanih s antropogenim aktivnostima.

1.2. Ježinci u toksikološkim studijama

Jedna od najvećih prednosti ježinaca kao modelnih organizama je njihova osjetljivost na širok spektar zagađivala. Osim toga, njihova jednostavna biologija i kratak životni ciklus omogućavaju brze i učinkovite eksperimente. Jajašca i embriji ježinaca su posebno osjetljivi na promjene u okolišu, što ih čini idealnim za proučavanje utjecaja zagađivala na rane faze razvoja (Giudice i sur., 2010). Široka pojavnost ježinaca u različitim morskim staništima čini ih reprezentativnim modelom za ispitivanje učinaka zagađivala u različitim ekološkim uvjetima (Lawrence, 2013).

Ježinci nude brojne prednosti za dugoročne studije o toksičnosti. Njihova sposobnost regeneracije i dugovječnost omogućavaju praćenje kumulativnih učinaka zagađivala tijekom vremena (Brown i Thompson, 2017). Štoviše, dobro proučena embriogeneza ježinaca omogućava detaljno proučavanje učinaka toksičnih tvari na razvoj organizma (Jones, 2018).

Zbog svoje sposobnosti akumulacije toksina iz okoliša, ježinci se često koriste kao bioindikator onečišćenja. Praćenjem različitih stadija njihovog životnog ciklusa, znanstvenici mogu precizno evaluirati dugoročne ekološke posljedice kontaminacije, kako su to nedavno istaknuli White i sur. (2020b).

U posljednjem desetljeću, istraživanja su se fokusirala na specifične vrste ježinaca, kao što su *Paracentrotus lividus* i *Arbacia lixula*, zbog njihove široke rasprostranjenosti i pristupačnosti. Ove vrste su se pokazale kao iznimno korisne u laboratorijskim eksperimentima za ispitivanje učinaka različitih zagađivala na razvoj embrija, genotoksičnost i druge biološke procese (Burić i sur., 2024).

1.3. Zagađivala u toksikološkim studijama ježinaca

Morski okoliš suočava se s brojnim antropogenim pritiscima, a zagađenje je jedan od najvećih problema. Različite tvari, poput teških metala, pesticida, farmaceutskih proizvoda i mikroplastike, dospijevaju u morske ekosustave putem otpadnih voda, industrijskih ispuštanja i drugih izvora. Kako su istaknuli Arnold i sur. (2013), otpadne vode predstavljaju ozbiljnu prijetnju morskim organizmima zbog širokog spektra

kontaminanata koje sadrže.

Istraživanja su pokazala da različiti zagađivači imaju različite, ali često štetne učinke na morske organizme. Na primjer, mikroplastika je postala sveprisutna u morskim ekosustavima, a njezin utjecaj na morske vrste, uključujući ježince i školjkaše, je predmet intenzivnih istraživanja (Sarà i sur., 2011; Koehler i sur., 2018). Unatoč sveprisutnosti mikroplastike, njezini dugoročni utjecaji na morske organizme još uvijek nisu u potpunosti istraženi (Schmidt i sur., 2018).

Teški metali (arsen, kadmij, kobalt, bakar, živa...) predstavljaju još jedan značajan problem za morske ekosustave. Zbog svoje kemijske sličnosti s esencijalnim metalnim ionima, teški metali mogu ometati važne biološke procese u organizmima. Pagano i sur. (2021) su naglasili potrebu za dubljim razumijevanjem mehanizama djelovanja teških metala, posebno na razvoj i zdravlje ježinaca.

Zakiseljavanje oceana i povećano UV zračenje predstavljaju dodatne stresore za morske organizme. Ove promjene u okolišu mogu pojačati toksične učinke zagađivača i otežati oporavak ekosustava (Gao i sur., 2012).

Istraživanja toksičnosti na ježincima su od iznimne važnosti za razumijevanje utjecaja antropogenih aktivnosti na morske ekosustave. Promjene u populacijama ježinaca mogu dovesti do disbalansa u morskim zajednicama, s potencijalnim posljedicama za biološku raznolikost i usluge ekosustava koje su od vitalnog značaja za čovjeka (Smith et al., 2015; Alač, 2018). Na primjer, smanjenje populacije ježinaca može dovesti do prekomjernog rasta algi, što može uzrokovati eutrofikaciju i pogoršanje kvalitete vode.

Kontaminacija morskih ekosustava toksinima koji se bioakumuliraju u prehranbenom lancu može predstavljati ozbiljan rizik za ljudsko zdravlje. Landrigan i sur. (2018) su istaknuli da se teški metali i drugi toksini mogu akumulirati u organizmima poput školjkaša i riba, koji su često ključni sastav prehrane ljudi u obalnim područjima.

Različite vrste ježinaca pokazuju različitu osjetljivost na toksine. Vrste poput *Paracentrotus lividus* često se koriste zbog svoje otpornosti, dok su vrste poput *Arbacia lixula* osjetljivije i mogu pružiti uvid u rizike koji možda ne bi bili otkriveni koristeći samo otpornije vrste (White i sur., 2020a; Burić i sur., 2024). Ova varijabilnost u osjetljivosti među vrstama je ključna za razumijevanje kako različita zagađivala mogu

utjecati na morski ekosustav i, posljedično, na ljudsko zdravlje.

Zaključno, istraživanja toksičnosti na ježincima pružaju kritične podatke za razumijevanje i upravljanje utjecajem zagađenja na morske ekosustave i zdravlje ljudi. Ježinci, kao osjetljivi i važni članovi morskih ekosustava, igraju ključnu ulogu u održavanju biološke raznolikosti i stabilnosti tih sustava.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je analizirati učestalost primjene ježinaca u toksikološkim studijama tijekom posljednjeg desetljeća, s posebnim naglaskom na vrste koje se najčešće koriste, te regije svijeta gdje su ta istraživanja najzastupljenija. Istraživanje također nastoji identificirati najčešće primjenjivane toksikološke testove u laboratorijskim uvjetima i utvrditi koja zagađivala su najčešće istraživana u kontekstu njihove toksičnosti na ježince.

3. METODA ISTRAŽIVANJA

3.1. Pretraga Scopus baze znanstvenih radova

Za potrebe ovog završnog rada provedena je sustavna analiza znanstvene literature s ciljem identificiranja i evaluacije članaka koji su koristili ježince kao modelne organizme za procjenu toksičnosti različitih tvari. Istraživanje je obuhvatilo razdoblje od 2014. do 2023. godine, a podaci su prikupljeni putem baze podataka Scopus. Pretraga je izvršena unutar naslova članaka, sažetaka i ključnih riječi, s fokusom na radove na engleskom jeziku objavljene kao znanstveni članci. Ključne riječi korištene u pretrazi bile su ograničene na pojam "toksičnost", uz dodatak specifičnih pojmova vezanih uz ježince.

Nakon inicijalne pretrage dobiveno je ukupno 237 članaka. Prvi korak u selekciji bio je isključivanje radova u kojima ježinci nisu bili primarni organizmi za ispitivanje toksičnosti, već su se istraživanja bavila drugim bodljikašima poput zvijezdača i trpova. Isključeni su i radovi koji su se bavili strukturama nalik ježincima, poput nanočestica, te oni koji su istraživali pigmente ježinaca, ali ne u kontekstu procjene toksičnosti na samim ježincima. Također, pregledni članci (eng. *review papers*) su isključeni iz analize kako bi se osigurala relevantnost rezultata fokusiranih isključivo na originalna istraživanja. Ovaj postupak rezultirao je isključivanjem nekoliko studija, uključujući one od Gambardella i sur., (2016), Alijagic i Pinsino (2017), Church i sur., (2017), te Gissi i sur., (2020). Studija koja je istraživala učinak pigmenta ježinca na ljudske stanične linije također je isključena jer toksičnost nije ispitivana na ježincima (Lee i sur., 2014).

Nakon primjene navedenih kriterija isključivanja, u analizu je uključeno 209 znanstvenih radova. Među ovim odabranim radovima, 11 nije imalo otvoreni pristup. U tim slučajevima članci su uzeti u obzir samo ako su ključne informacije, poput vrste ježinca, testirane kemikalije i eksperimentalne metode, bile dostupne u naslovu ili sažetku.

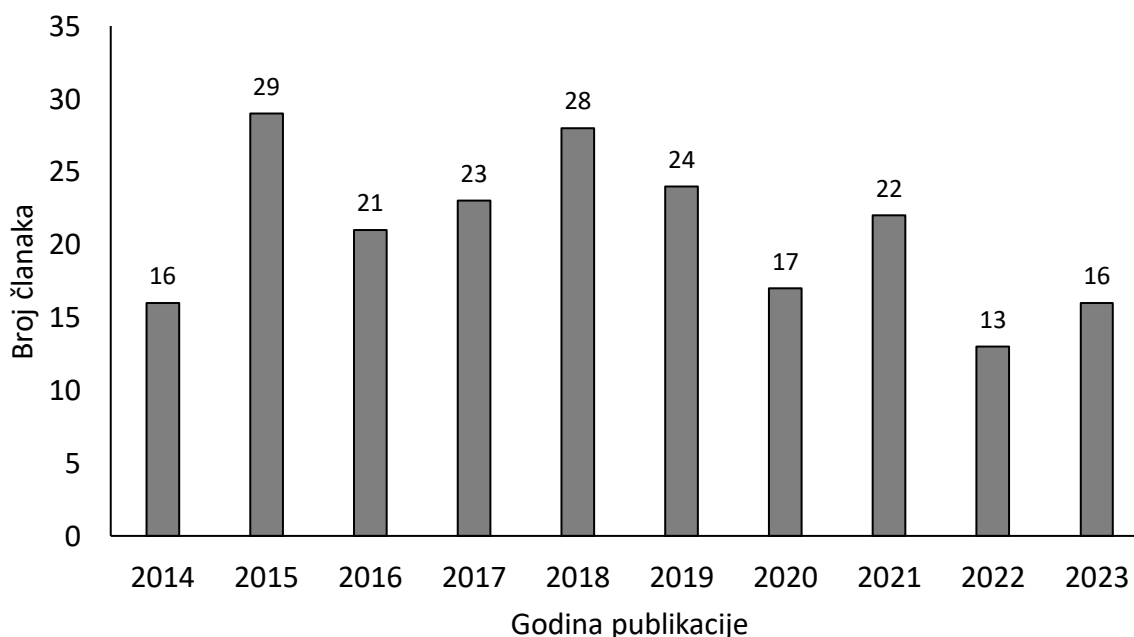
Odabrani članci su detaljno analizirani kako bi se utvrdila učestalost korištenja različitih vrsta ježinaca, testiranih kemikalija i eksperimentalnih metoda korištenih za procjenu toksičnosti. Rezultati su kategorizirani i uspoređeni kako bi se identificirali ključni trendovi i nedostaci postojećoj literaturi. Ova metodologija omogućila je sveobuhvatno razumijevanje trenutnog stanja istraživanja o toksičnosti na ježincima te

identificiranje potencijalnih smjerova za buduća istraživanja u ovom području.

4. REZULTATI

4.1. Godišnja i prostorna distribucija istraživanja toksičnosti ježinaca u posljednjem desetljeću

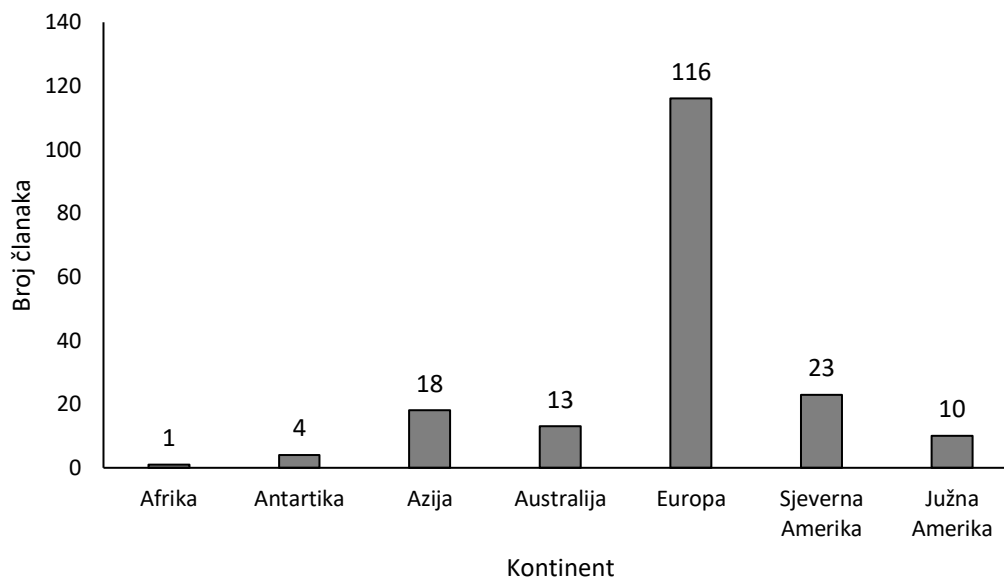
Godišnja distribucija ježinaca korištenih u istraživanju toksičnosti u posljednjem desetljeću prikazana je na Slici 2. Za ovo istraživanje Turska je uključena kao dio Europe zbog triju mjesta za uzorkovanje ježinaca: Seferihisar, Güzelyalı i Çeşme na Egejskoj obali Turske (Erkmen, 2015; Oral i sur., 2017; Rezg i sur., 2022; Paganos i sur., 2023). Prosječan broj članaka godišnje u posljednjem desetljeću bio je 21 ± 5 članaka. Dva maksimuma mogu se uočiti u 2015. i 2018. godini s najvećim brojem od 29 odnosno 28 objavljenih članaka.



Slika 2. Ježinci u toksikološkim istraživanjima u posljednjem desetljeću podjeljeni po broju članaka i godini publikacije članka.

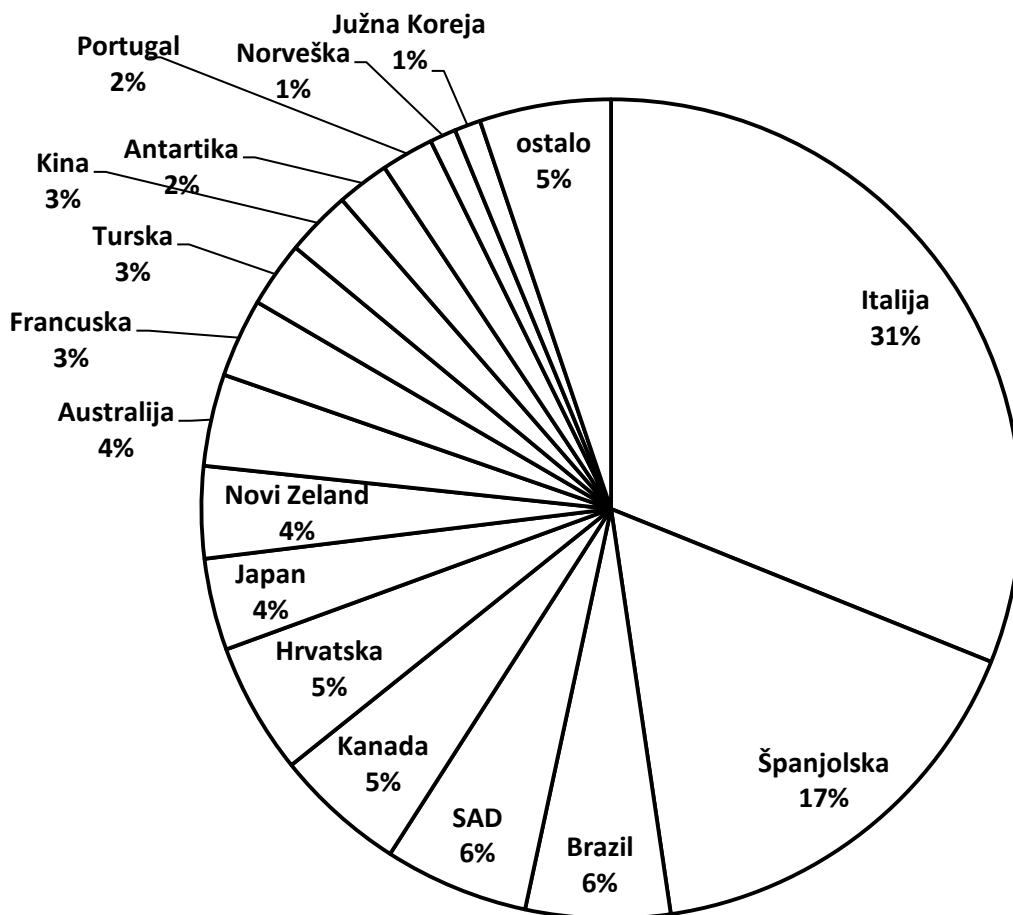
Korištenje ježinaca u istraživanju toksičnosti na različitim kontinentima ilustrirano je na Slici 3. Kao navedeno, ukupno 11 članaka nije imalo otvoren pristup, a 13 članaka nije navelo lokaciju odakle su ježinci uzorkovani. Utvrđeno je da je Europa kontinent na kojem znanstvenici uglavnom koriste ježinace za studije toksičnosti, s značajno velikim brojem od 116 objavljenih radova u posljednjem desetljeću. Na drugom je mjestu Sjeverna Amerika s 23 objavljenih rada u posljednjih deset godina, a slijede Azija (18),

Australija (13) i Južna Amerika (10). Najmanje članaka objavljeno je na kontinentu Antarktici (4) i Africi (1).



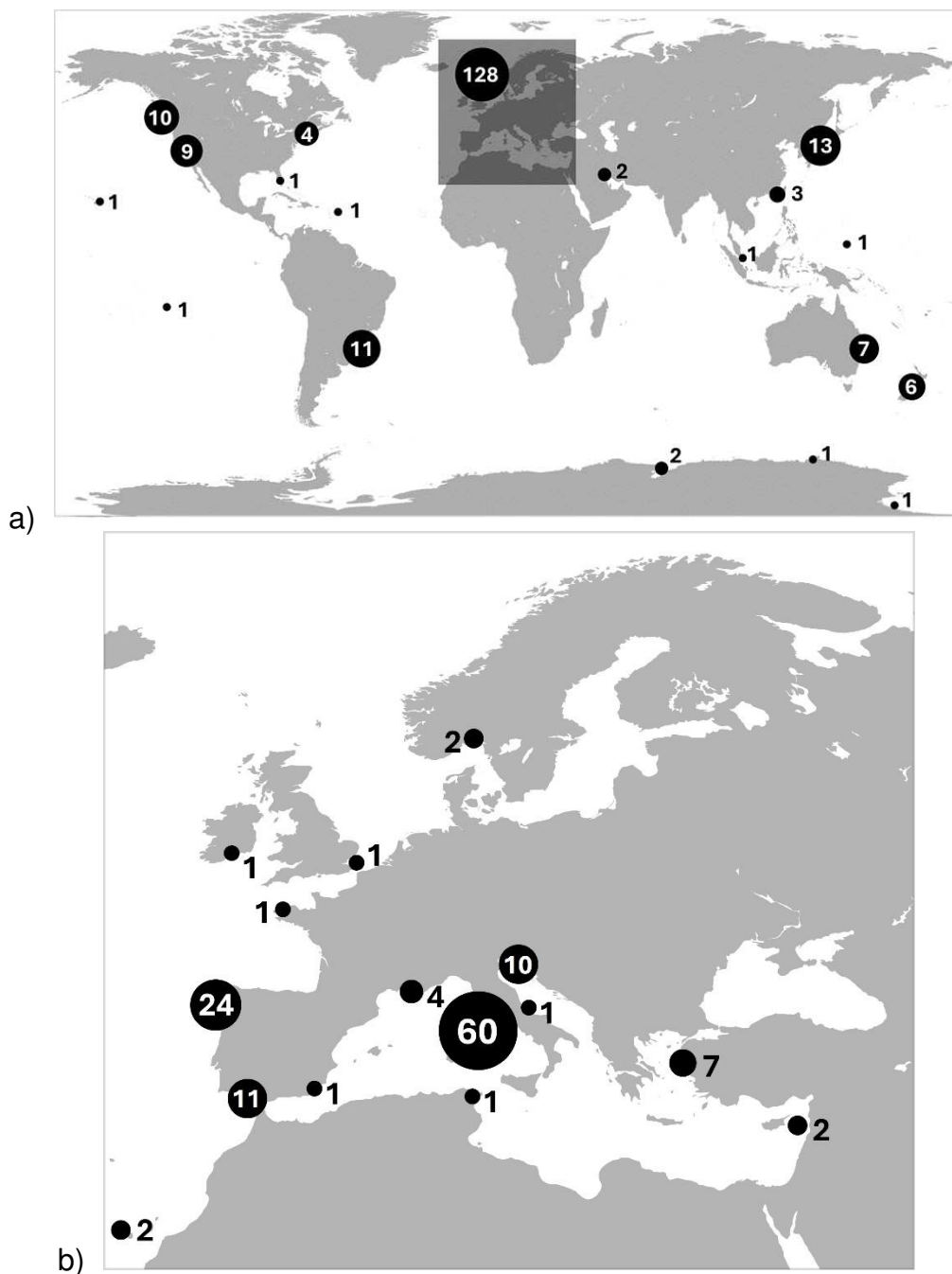
Slika 3. Ježinci u toksikološkim istraživanjima u posljednjem desetljeću podijeljeni po kontinentu.

Ukupno su znanstvenici iz 32 zemlje svijeta objavili radove koji su koristili ježince za istraživanje toksičnosti (Slika 4). Najveći broj objavljenih radova zabilježen je u Italiji s najvišom postotkom od 31 %, a slijedi Španjolska sa 17 %. Zanimljivo je da su Hrvatska i Kanada imale 5 % u ukupnom broju objavljenih radova o ježincima u studijama toksičnosti u prošlom desetljeću te su se tako našle na relativno visokom 5. mjestu. Ježinci u Hrvatskoj uzeti su iz sjevernog Jadrana u blizini gradova Rovinja i Pule za potrebe svih 10 pronađenih istraživanja. Nadalje, 10 zemalja navedenih kao ostalo imalo je samo jedan objavljeni članak o temi od interesa u posljednjih deset godina, a to su: Cipar, Grčka, Guam, Irska, Izrael, Kuvajt, Meksiko, Singapur, Tajvan i Tunis.



Slika 4. Područja iz kojih su ježinci uzorkovani za kasnije upotrebu u toksikološkim studijama u posljednjem desetljeću.

Na Slici 5a prikazane su lokacije u svijetu s kojih su ježinci uzorkovani. Obzirom da su većinu studija proveli znanstvenici na mediteranskoj obali i europskoj atlantskoj obali, ova karta je dodatno uvećana i prikazana je na Slici 5b. Provedeno je ukupno 60 studija na ježincima uzorkovanim u Napuljskom zaljevu i dalje prebačenim u Zoološka postaja Antona Dohrna u Napulju, Italija ili na Odjel za biologiju i evoluciju morskih organizama Sveučilišta Federico II Napulj, Italija na daljnje analize toksičnosti. Nadalje, 24 studije koristile su ježince uzorkovane u zaljevu Cádiz na sjeverozapadu Španjolske i dalje odnesene na Fakultet za studije mora i okoliša Sveučilišta u Cádizu u Španjolskoj radi procjene toksičnosti.



Slika 5. Detaljni pregled lokacija s kojih su uzrokovani ježinci za toksikološke studije u posljednjem desetljeću

4.2. Ježinci u toksikološkim studijama

Vrste ježinaca koje se najčešće koriste kao modelni organizmi u studijama toksičnosti u posljednjem desetljeću navedene su u Tablici 1. U svim odabranim člancima mogu se pronaći vrste ježinaca odabrane za eksperimentalni postupak. Ukupno je korištena 31 vrsta ježinaca. Vrijedno je napomenuti da trenutno postoji 1197 potvrđenih

postojećih vrsta koje pripadaju razredu Echinoidea poznatim iz svjetskih oceana, uključujući Arktička i Antarktička mora (Kroh i Mooi, 2024). To implicira da je samo 2,5 % svjetskih vrsta ježinaca korišteno u studijama toksičnosti u posljednjem desetljeću.

Nadalje, dvije vrste ježinca imale su neprihvaćeni latinski naziv prema Svjetskom registru morskih vrsta (WoRMS) (WoRMS, 2024) te su stoga ispravljene za prikaz rezultata prikazanih u Tablici 1. Naime, latinski naziv ježinca *Stronglyocentrotus franciscanus* (Wynne i sur., 2015) ispravljen je u *Mesocentrotus franciscanus*, a *Strongliocentrotus nudus* u *Mesocentrotus nudus* (Hwang i sur., 2014; Beleneva i sur., 2015; Hwang i sur., 2017; Hosoya i sur., 2019). Prilikom pregleda literature uočeno je da su dvije vrste ježinca *S. purpuratus* i *P. lividus*, koriste isti zajednički naziv "ljubičasti ježinac" (Tellis i sur., 2014; Mesarić i sur., 2015; Cunningham i sur., 2020; Noguiera i sur., 2021; Sherman i sur., 2021; Dron i sur., 2022). Štoviše, nakon pregleda desetljeća objavljenih članaka koji su koristili ježinca *P. lividus* kao modelni organizam, primijećeno je još jedno uobičajeno ime za ovu vrstu, a to je "sredozemni ježinac" (DeForest i Schlekar, 2013; Burić i sur., 2015; Gharred i sur., 2015).

Rezultati su pokazali da je najčešće korištena vrsta sredozemnog ježinca *P. lividus* koja se pojavila u 115 od ukupno 209 radova. Naime, ova vrsta ježinca korištena je u više od polovice odabranih studija (55 %) diljem svijeta. Druge najčešće korištene vrste ježinca bile su *A. lixula* i *S. purpuratus* koje su korištene kao modelni organizmi u 15 objavljenih članaka. Nadalje, *Lytechinus variegatus* korišten je u 11, a *S. granularis* u 9 studija toksičnosti. Jedanaest vrsta ježinaca korišteno je u samo jednoj studiji toksičnosti u prošlom desetljeću. Razlog korištenja tolikog broja vrsta ježinaca u malom broju studija je njihova ograničena rasprostranjenost. Neke od navedenih vrsta specifične su za određeni kontinent. Tako primjerice ježinac *Sterechnus neumayeri* rijetko je korištena vrsta ježinca koja se može pronaći u morskim vodama Antarktike i stoga se koristi u studijama u kojima su ježinci uzorkovani u morskim vodama oko ovog kontinenta (Lister i sur., 2015; Alexander i sur., 2017; Dell'Acqua i sur., 2019; Brown i sur., 2020). U tim studijama uglavnom je proučavan učinak policikličkih aromatskih ugljikovodika (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) u obliku sirove ili bunker nafte i disperzanata nafte zbog mnogih izlivanja nafte koja utječu na sjeverne vode Antarktike.

Tablica 1. Različite vrste ježinaca korištene u toksikološkim studijama u posljednjem desetljeću posložene po broju članaka.

| Vrsta ježinca | Broj članaka |
|--|---------------------|
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 115 |
| <i>Arbacia lixula</i> | 15 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 15 |
| <i>Lytechinus variegatus</i> | 11 |
| <i>Sphaerechinus granularis</i> | 9 |
| <i>Evechinus chloroticus</i> | 6 |
| <i>Heliocidaris tuberculata</i> | 6 |
| <i>Strongylocentrotus intermedius</i> | 6 |
| <i>Echinometra lucunter</i> | 5 |
| <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> | 5 |
| <i>Sterechinus neumayeri</i> | 4 |
| <i>Strongylocentrotus nudus</i> | 4 |
| <i>Lytechinus pictus</i> | 3 |
| <i>Arbacia punctulata</i> | 2 |
| <i>Dendraster excentricus</i> | 2 |
| <i>Echinometra mathaei</i> | 2 |
| <i>Heliocidaris crassispina</i> | 2 |
| <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> | 2 |
| <i>Scaphechinus mirabili</i> | 2 |
| <i>Tripneustes gratilla</i> | 2 |
| <i>Centrostephanus rogersii</i> | 1 |
| <i>Cidaris cidaris</i> | 1 |
| <i>Clypeaster japonicus</i> | 1 |
| <i>Diadema africanum</i> | 1 |
| <i>Diadema savignyi</i> | 1 |
| <i>Glyptocidaris crenularis</i> | 1 |
| <i>Pseudechinus huttoni</i> | 1 |
| <i>Pseudocentrotus depressus</i> | 1 |
| <i>Salmacis sphaeroides</i> | 1 |
| <i>Stylocidaris affinis</i> | 1 |
| <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> | 1 |

Dodatno je pretražen broj ježinaca prikupljenih iz okoliša za laboratorijsko ispitivanje toksičnosti. Uočeno je da se rijetko spominje točan broj ježinaca uzetih iz prirode za ispitivanje toksičnosti. Samo 32 rada eksplicitno navode točan broj ježinaca izvađenih iz okoliša. Kada je 11 članaka koji nisu bili u slobodnom pristupu isključeno iz pregleda, samo 16 % članaka navodi broj muških i ženskih jedinki korištenih u istraživanju toksičnosti. U studijama koje su navodile broj ježinaca uzetih iz okoliša, broj je bio nizak i kretao se od dva (Torres i sur., 2016; Saili i sur., 2021) do relativno visokih 60 do 80 ježinaca po studiji. U studijama koje su koristile veći broj odraslih ježinaca iz okoliša

rijetko se navodi točan broj ježinaca, ali se može izračunati iz postavljenog eksperimentalnog dizajna (Lister i sur., 2016; Brooks i sur., 2020; Dron i sur., 2022). Malo je članaka koristilo vrlo mali broj ježinaca u svojim istraživanjima toksičnosti (Gregorin i sur., 2021; Saili i sur., 2021). Naime, u jednoj studiji samo jedna ženka i jedan mužjak vrste *S. purpuratus* korišteni su za testa razvoja embrija ježinca (eng. *Sea Urchin Embryo Development Test*, SUEDT (Saili i sur., 2021)). U istom istraživanju korišteno ponovno mali broj ježinaca, 16 ženki i samo dva mužjaka vrste *Dendraster excentricus*. Nadalje, u jednoj studiji naveden je samo broj ženki korištenih za SUEDT, a broj mužjaka nije spomenut (Gregorin i sur., 2021). Neke studije spominju samo broj mužjaka korištenih u istraživanju zbog testiranja toksičnosti sperme. U istraživanju provedenom na ježincu *P. lividus* dobivenom iz mrijestilišta Camogli (Genova, Italija) 12 mužjaka korišteno je za dobivanje sperme koja je dalje tretirana različitim metalnim nanočesticama. Nakon izlaganje spermija, u eksperiment su dodana jajašca ženki ježinca te je dodatno procijenjen uspjeh oplodnje i razvoj larvi. Usprkos tome, u studiji nije naveden broj ženki uzetih iz okoliša za provođenje ispitivanja toksičnosti (Gambardella i sur., 2013). Štoviše, u jednoj studiji autori navode da su za eksperiment uzeli 54 primjerka ježinca *A. lixula* (Lazzara i sur., 2022). U istom članku navodi se da je prosječna veličina morskog ježinca 16 ± 1 g. Ovakvi podaci su vrlo korisni toksikologu koji radi s ježincima u studijama toksičnosti. Prema iskustvu znanstvenika iz Centra za istraživanje mora u Rovinju, ali i znanstvenika s Fakulteta prirodnih znanosti u Puli ježinci iste vrste s područja sjevernog Jadrana su puno veći. Naime, spomenuti znanstvenici su tijekom posljednje dvije godine proveli uzorkovanje vrste *A. lixula* na lokacijama Lungomare u Puli i Marlera u Ližnjanu, Hrvatska. Na uzorku od 32 jedinke zabilježena je prosječna težina vrste od $44,7 \pm 10,3$ g (neobjavljeni podaci). Stoga, je vrlo koristan podatak navesti i veličinu i težinu vrste koja se koristi u ekotoksikološkim studijama.

4.3. Eksperimenti toksičnosti koji su koristili ježince u posljednjem desetljeću

Gamete, embriji i larve ježinca često se koriste u toksikološkim studijama zbog njihove visoke osjetljivosti na različite vrste zagađivala iz okoliša (Mesarić i sur., 2015; Paredes i Bellas, 2015; Oral i sur., 2017; Morrioni i sur., 2018; Mijangos i sur., 2020; Rial i sur., 2023; Rist i sur., 2023). Stoga su članci dodatno istraženi li eksperiment toksičnosti

proveden na odraslim ježincima ili embrijima/larvama ježinaca. Svi odabrani članci imali su dostupnu navedenu informaciju.

Uočeno je da se eksperiment toksičnosti provodi na odraslom ježincu ako su odrasli analizirani na npr. različite morfometrijske indekse, aktivnost acetilkolinesteraze (AChE), imunotoksičnost, aktivnost različitih enzima oksidativnog stresa, vrijeme ispravljanja i otpornost na više lijekova cijelog ili pojedinih dijelova tijela ježinca. Uočeno je da su svi ostali eksperimenti provedeni na embrijima i/ili larvama ježinca. To je uključivalo obavljene testove embriotoksičnosti, ispitivanja toksičnosti spermija za koje su bile potrebne jajne stanice i mjerenje krajnje uspješnosti oplodnje. Nadalje, eksperiment određivanja pokretljivosti spermija isto tako može se odrediti samo na odraslim i to muškim jedinkama te nema potrebe za jajašcima i testom razvoja embrija ježinca). Osim navedenog, analiza koelomične tekućine, tj. krvi ježinca odvija se isključivo na odraslim jedinkama. Rezultati su ukazali na samo 31 studiju koja je provedena na odraslim ježincima i veliki broj od 183 studije koje su koristile embrije i/ili larve ježinca kako bi se otkrila toksičnost zagađivala od interesa. Važno je napomenuti da se učincima različitih toksikanata na odrasle ježince posvećuje malo pozornosti unatoč njihovoj ekološkoj i ekonomskoj važnosti. Štoviše, u 9 studija znanstvenici su radili i s odraslim jedinkama i s embrijima i/ili larvama ježinca. Gotovo 6 puta manji broj članaka koji rade s odraslim jedinkama mogao bi biti posljedica duljeg eksperimentalnog vremenskog okvira, pa stoga uzima puno vremena.

Proveden je daljnji pregled članaka obzirom na najčešće korištene testove toksičnosti. Naime, u člancima su pretraživani sljedeći testovi toksičnosti s ježincem kao organizmom izbora: citotoksičnost, embriotoksičnost, genotoksičnost, imunotoksičnost, rezistencija na više lijekova (eng. *multixenobiotic resistance*, MXR), neurotoksičnost, procjena oksidativnog stresa, fiziološki status, vrijeme ispravljanja ježinca i ispitivanja toksičnost sperme. Rezultati su prikazani na Slici 6. Vrijedno je napomenuti da su za ovaj pregled izostavljena samo tri članka jer nije bilo moguće otkriti eksperimentalnu metodu korištenu u istraživanju samo iz naslova, sažetka i ključnih riječi (članci sa zatvorenim pristupom).

Ukupno je vrlo velik broj od 180 članaka istraživao embriotoksičnost različitih toksikanata na ježince. Unutar ove skupine dodijeljeni su sljedeći testovi toksičnosti: uspješnost oplodnje, test razvoja embrija/larve (smrtnost embrija/larvi i malformacije

larvi), plivanje i ponašanje larvi pri hranjenju, veličina skeleta larvi i formiranje spikula (istraživanja biomineralizacije). Embriotoksičnost u ovim studijama procijenjena je primjenom SUEDT koji je standardizirani test s protokolom osmišljenim za ispitivanje toksičnosti tvari od interesa na planktonske organizme budući da se embriji i larve ježinca uklapaju u ovaj hranidbeni lanac. Ovaj protokol koristi embrije i larvi ježinca kao uobičajene biološke modele za istraživanje toksičnosti mora, a standardne metode za ispitivanje toksičnosti dostupne su u velikom broju prethodno prijavljenih studija (Burić i sur., 2015; Oral i sur., 2017;; Lavtizar i Okamura, 2019; Trifuoggi i sur., 2019Tommasi i sur., 2023). Kao što je prethodno spomenuto, SUEDT se obično izvodi u skladu s postupcima koje opisuje Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Država (eng. *United States Environmental Protection Agency*, USEPA) (USEPA, 1991; USEPA, 2022) uz neke dodatne prilagodbe ovisno o studiji što ovom testu daje prednost ponovljivosti i usporedivosti dobivenih rezultata između laboratorija diljem svijeta.

Drugi najistraženiji parametar u studijama o ježincima je genotoksičnost s 33 objavljena članka u posljednjem desetljeću. Ova se skupina sastojala od sljedećih eksperimenata: testiranje toksičnosti oštećenja DNA (npr. komet test, DNA metilacija, test inhibicije DNaze, test inhibicije alkalne fosfataze), probir nuklearne stabilnosti bojenjem s DAPI, ekspresija gena (putem RT-PCR i q-PCR). Kao primjer, u studiji Glaviano i sur. (2021) bentoske dijatomeje *Nanofrustulum shiloi* i *Striatella unipunctata*, inkapsulirane u alginatnim kuglicama, negativno su utjecale na reproduktivnu učinkovitost ježinca *P. lividus* mijenjajući ekspresiju gena. S korištenim RT-qPCR-om pokazano je da su obje dijatomeje aktivirale put odgovora na stres u embrijima morskog ježa, preko pojačane regulacije gena hsp60, hsp70, NF- κ B, 14-3-3 ϵ i MDR1. Također, korištenjem komet testa Kukla i sur. (2022) pokazali su značajno povećanje oštećenja molekule DNA na spermatozoidima vrste *Scaphechinus mirabilis* izloženim nanočesticama bakra, što ukazuje na mogući negativni učinak na kasniji razvoj embrija i larvi (kvaliteta potomstva prethodno tretirane sperme). Nadalje, Oral i sur. (2017) zabilježili su povećane kromosomske aberacije i smanjenu mitotičku aktivnost (interfazni embriji) u stadiju morule ježinca *P. lividus* nakon tretmana teškim elementima rijetke zemlje. Toksičnost sperme zabilježena je u 24 objavljena članka. Ti su pokusi uključivali: provjeru pokretljivosti spermija nakon tretmana toksikanta od interesa ili kvalitetu potomstva prethodno obrađene suspenzije sperme. Fiziološki

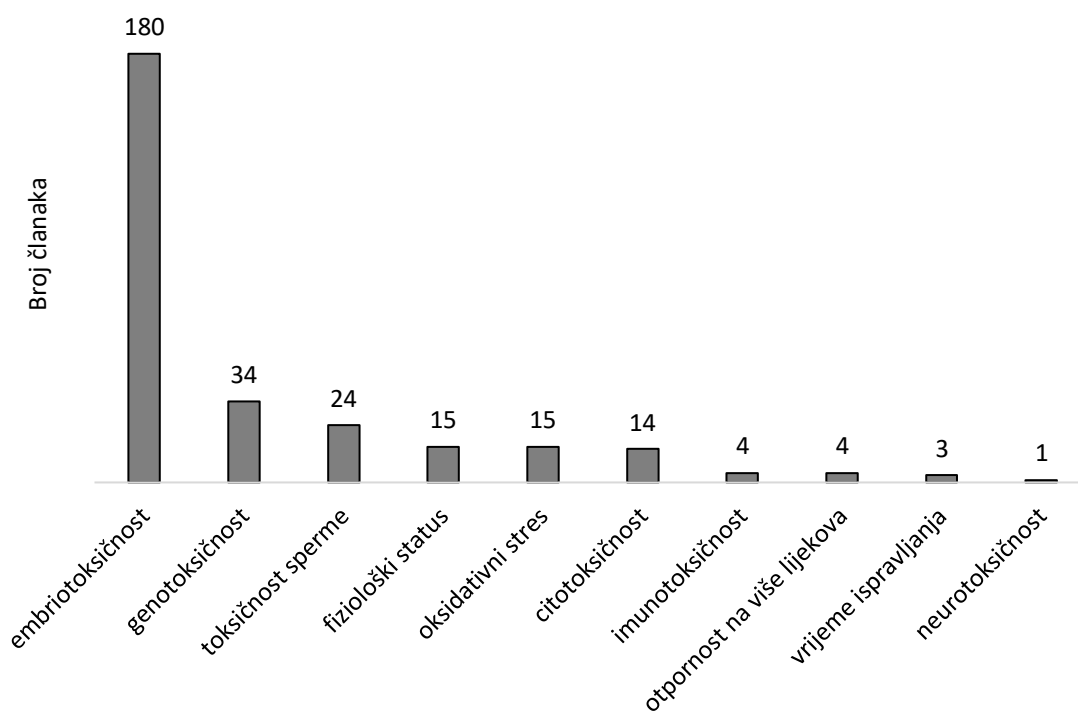
status ježinaca procijenjen je u 15 studija toksičnosti. Ove studije uključivale su testove toksičnosti kao što su: smrtnost jedinke ježinca, stopa potrošnje kisika, histopatologija gonada i gonadni indeks, bioakumulacija toksina u tkivu (npr. Aristotelova svjetiljka, plašt, bodlje i probavni sustav) te procjena hranjenja. Većina istraživanja provedena je na odraslim jedinkama ježinaca zbog čestog određivanja indeksa stanja, posebice gonadosomatskog indeksa (Dell'Acqua i sur., 2019; Dron i sur., 2022). Konkretno, u studiji Dell'Acqua i sur. (2019) 24 odrasle jedinke ježinca *Sterechinus neumayeri* bilo je izloženo niskom pH (zakiseljavanje oceana) mjesec dana i dodatno je provjerena histopatologija gonada.

Nadalje, oksidativni stres zabilježen je u 15 studija. Unutar ove skupine najviše su proučavani testovi antioksidativnih enzima, posebno aktivnosti katalaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze, glutation S transferaze i superoksid dismutaze (Castellano i sur., 2018; Gallo i sur., 2018; Klein i sur., 2019; Rist i sur., 2023). Štoviše, koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta, razine molekularnog antioksidansa glutaciona, karbonilacija proteina, peroksidacija lipida metodom reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (Lewis i sur., 2016.; Oral i sur., 2017.) i razine 8-hidroksiguanozina također su testirani na odraslim ježincima i/ili embrijima (Lister i sur., 2015.).

Citotoksičnost različitih toksikanata procijenjena je u 14 studija. Studije citotoksičnosti uključivale su: provjeru citogenotoksičnosti za različite kromosomske abnormalnosti tijekom stanične diobe, apoptozu i test citotoksičnosti koji je provjeravao održivost različitih tipova stanica (Guida i sur., 2014; Wu i sur., 2015; Oral i sur. 2017; Resgalla i sur., 2018).

Imunotoksičnost je zabilježena u samo četiri studije. Imunotoksičnost je uključivala: analizu neutralnog crvenog vremena zadržavanja (eng. *Neutral red retention time assay*, NRRTA) na kolomocitima ježinca i ukupni broj celomocita (Magesky i sur., 2017). Alijagic i sur. (2020) zaključili su da ježinac *P. lividus* predstavlja sjajan model koji nije sisavac za proučavanje fundamentalne i translacijske imunologije *ex vivo*. Imunološke stanice ježinca slobodni su pokretni kolomociti koji su sposobni detektirati male promjene okoliša putem složenog niza izvanstaničnih i unutarstaničnih imunoloških receptora, regulatora i efektor (Magesky i sur., 2017; Marques-Santos i sur., 2018.; Alijagic i sur., 2020; Milito i sur., 2020).

Nadalje, toksičnost zagađivala koja su otporna na više lijekova također je primijećena u 4 studije, a studije su istraživale efluksne transportere kazete koja veže adenozin trifosfat u embrijima i razvojnu toksičnost vinblastina (utvrđeni supstrat adenozin trifosfat transportera) (Wu i sur., 2015). Nadalje, vrijeme uspravljanja ježinca korišteno je u tri studije toksičnosti u posljednjem desetljeću (Bonaventura i sur., 2018; Fernandez i sur., 2019; Suckling i Richard, 2020) dok je neurotoksičnost zabilježena u samo jednoj studiji. Naime, nakon tretmana nanočesticama bakrenog oksida uočeno je oštećenje kolinergičkih živčanih sustava na 24 h embrijima ježinca *A. lixula* (Maisano i sur., 2015).



Slika 6. Različite krajnje točke toksičnosti korištene u toksikološkim studijama s ježincima u posljednjem desetljeću.

4.4. Različite vrste kemikalija korištene u istraživanju toksičnosti ježinaca u posljednjem desetljeću

Članci su pregledani na različite kemikalije korištene u studijama toksičnosti ježinaca. Kategorije kemikalija za potrebe ove studije bile su grupirane kako su prethodno opisali Cesar i sur. (2014) te Maranho i sur. (2015) s dodatkom sljedećih zagađivala;

nanočestice, plastika, morski toksini i tri fizička faktora stresa. Dodavanje ovih onečišćujućih tvari učinjeno je zbog njihove veće zastupljenosti u objavljenim člancima.

Zagađivalo je klasificirano prvenstveno na temelju njegove primarne primjene. Kemikalije su odgovarale jednoj od sljedećih skupina: uzorci okoliša (npr. uzorci sedimenta ili vode), ugljikovodici, morski toksini, metali, nanočestice, raspršivači ulja, lijekovi i/ili proizvodi za osobnu njegu, fizički stresori (zakiseljavanje oceana, salinitet, temperatura i UV zračenje), pesticidi, plastika, poliklorirani bifenili (eng. *Polychlorinated biphenyls* PCB), per- i poli-fluoroalkilne tvari (eng. *Per- and polyfluoroalkyl substances*, PFAS) i drugo.

Najviše objavljenih članaka (48) bavilo se istraživanjem toksičnosti metala (Slika 7). Među najistraženijim metalima bili su tzv. teški metali kao što su arsen, kadmij, kobalt, bakar, živa, nikal i cink (Nogueira i sur., 2021; Saili i sur., 2021; Golding i sur., 2022; Morroni i sur., 2023; Rial i sur., 2023; Sartori i sur., 2023). Teški elementi rijetke zemlje (eng. *Heavy rare earth elements*, HREE) poput itrija, lantana, cerija, neodimija, samarija, europija i gadolinija također su kategorizirani kao metali za potrebe ovog istraživanja (Oral i sur., 2017; Gravina i sur., 2018; Trifuoggi i sur., 2019). U mnogim je studijama dobro dokumentirano da metali mogu izazvati abnormalnosti embrija i larvi ježinca i zaustaviti njihove razvojne faze (Blewett i sur., 2021; Chiarelli i sur., 2021; Nogueira i sur., 2021; Al-Qattan i sur., 2022; Golding i sur., 2022). Razlog za ovu toksičnost je, barem djelomično, zbog konkurentskih interakcija toksičnih, teških metala s esencijalnim metalnim ionima za mjesta vezivanja („biotički ligandi”) (Tellis i sur., 2014). Interakcija se događa zbog kemijske sličnosti teških metala koji su sposobni "oponašati" neke bitne metalne ione. Kadmij i cink mogu djelovati kao analozi kalcija, čime izravno mijenjaju homeostazu Ca^{2+} iona (Nogueria i sur., 2021; Sherman i sur., 2021).

Drugo najistraženije zagađivalo s 35 uključenih članaka o ježincima bili su uzorci iz okoliša poput sedimenta (Ferraz i sur., 2017; Basallote i sur., 2018; Tommasi i sur., 2023) i morske vode (Al-Qattan i sur., 2022; Dron i sur., 2022). U ovoj kategoriji, uglavnom su sedimenti iz različitih onečišćenih područja ispitani u SUEDT. Sedimenti služe kao konačno spremište za sva prethodno spomenuta zagađivala u morskom okolišu i stoga sadrže kombinacije poznatih i prethodno neidentificiranih opasnih tvari, obično u razrijeđenim koncentracijama. Posljednjih desetljeća raste interes za

korištenje osjetljivih bioloških testova za provjeru toksičnosti kontaminanata sedimenta, s ciljem pružanja točnije procjene njihovih toksikoloških rizika (Vethaak i sur., 2017). S druge strane, s otpadnim vodama se rijetko pristupalo u studijama toksičnosti ježinaca u posljednjem desetljeću (Dron i sur., 2022).

Uz samo jedan rad manje, 34 objavljena članka, proučavana je toksičnost plastike. Kategorija plastike uključivala je mikroplastiku od polietilena (PE), polistirena (PS) i polimetil metakrilata (PMMA), bisfenol S (BP-S) i bisfenol A (BP-A), plastične iscjedne vode, bioplastiku i plastiku skupljenu na plažama. Među njima, mikroplastične čestice s kemijskom strukturom PE i PS bile su najproučavaniji oblik plastike korišten u studijama toksičnosti (Parolini i sur., 2020; Pyl i sur., 2022; Quade i sur., 2022; de Mello Souza i sur., 2023). Nekoliko studija nije pokazalo nikakav učinak kada su različite vrste i oblici plastičnog materijala primijećeni na odraslim jedinkama ili embrijima ježinaca (Beiras i sur., 2018; Beiras i López-Ibáñez, 2019; Suckling i Richard, 2020). U jednoj studiji pokazalo se da mikroplastične čestice ne utječu na odrasle jedinke ježinca *Arbacia punctulata* (Suckling i Richard, 2020). Mikroplastične čestice nisu blokirale pore madreporita ježinca, što ukazuje na uklanjanje čestica cilijama i pedicelarijama. Nadalje, polietilenske mikroplastične čestice nisu povećale toksičnost hidrofobne organske kemikalije za larve *P. lividus* niti su pokazale bilo kakvu toksičnost za embrionalni razvoj *P. lividus* iako su čestice aktivno progutane i zabilježene u probavnom traktu larvi (Beiras i sur., 2018; Beiras i López-Ibáñez, 2019).

Ukupno 28 studija koristilo je različite vrste nanočestica za istraživanje toksičnosti na ježincu kao modelnom organizmu. Najviše su istraživane metalne nanočestice: titanijev dioksid, bakrov oksid, cinkov oksid i nanočestice srebra (Burić i sur., 2015; Magesky i sur., 2016; Oliviero i sur., 2019; Alijagic i sur., 2020; Genevière i sur., 2020). Tijekom 2015. i 2016. godine nanočestice su bile najčešće proučavano zagađivalo u eksperimentima toksičnosti ježinaca.

Nadalje, 24 studije koristile su farmaceutske proizvode i/ili proizvode za osobnu njegu (eng. *personal care product*, PCP) za procjenu toksičnosti ježinca. U kategoriji lijekova ispitivane su različite vrste ljudskih lijekova kao što su antibiotici (npr. sulfametoksazol, novobiocin), estrogenski hormon 17α -e tinilestradiol, metotreksat, tamoksifen, diklofenak, propranolol, simvastatin, sertralin, kofein, ibuprofen, karbamazepin i kokain. U istoj kategoriji za PCP-ove istraživani su sljedeći sastojci: 4-metilbenziliden

kamfor, propilparaben, triklokarban, acetilsalicilna kiselina, gemfibrozil, triptantrin, etilheksil dimetil *p*-aminobenzojeva kiselina, trikloretilen i natrijev dodecil sulfat. U studiji znanstvenika da Silva i de Souza Abessa (2019) procijenjene su geološki relevantne koncentracije 17 α -etinilestradiola (EE2), acetilsalicilne kiseline (eng. *acetylsalic acid*, ASA) i bis-fenola-A (BPA) u embrio-larvalnom razvoju ježinca *Echinometra lucunter*. Rezultati su ukazali na značajnu embriotoksičnost sva tri ispitana spoja, čak i s najnižim, ekološki relevantnim koncentracijama, ukazujući tako na potencijalni rizik koji ti kontaminanti mogu predstavljati za morski organizam.

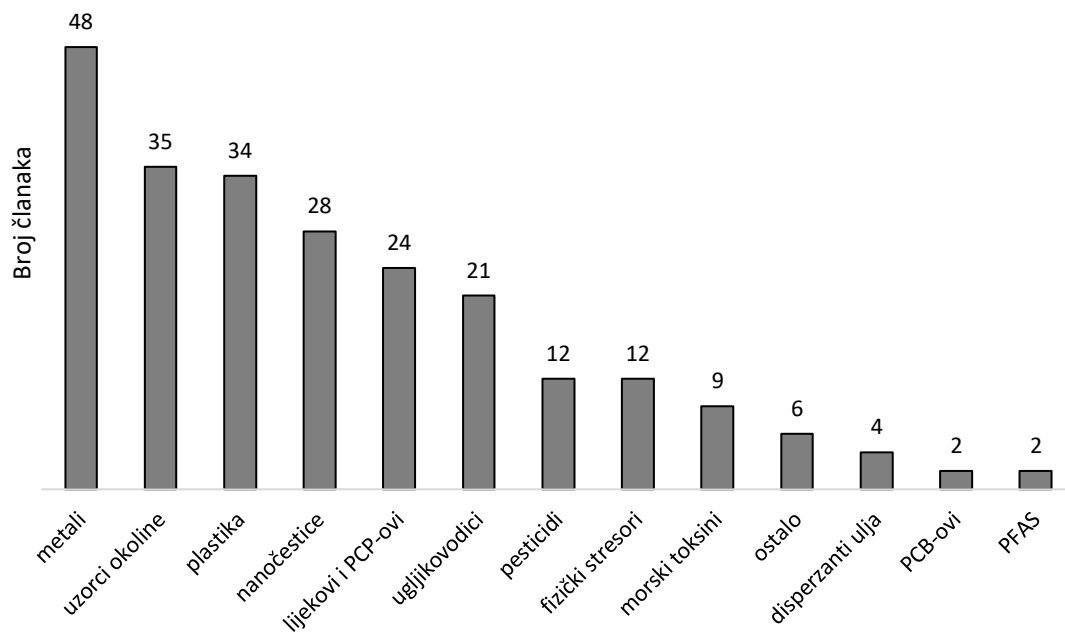
Toksičnost različitih vrsta ugljikovodika na ježince procijenjena je u 21 objavljenom istraživačkom radu u posljednjem desetljeću. U ovoj kategoriji najviše su zabilježeni naftni ugljikovodici koji uključuju acenaften, acenaftilen, antracen, benzo(a)antracen, krizen, fluoranten, fluor, fenantren, piren, sirovu i bunker naftu. Nadalje, 12 studija istraživalo je toksičnost različitih pesticida (npr. klorpirifos, deltametrin, biocidi protiv obraštanja; tralopiril, kapsaicin, trifenilboran piridin). Odluka da se istraži toksičnost pesticida razumljiva je zbog njihove svrhe.

Dvanaest studija istraživalo je učinak nekoliko fizičkih stresora (npr. zakiseljavanje oceana, povećana temperatura i UV zračenje) na ježince. Brojne studije istraživale su učinak zakiseljavanja oceana na embrije ježinca i potom na razvoj larvi (Lewis i sur., 2016; Marčeta i sur., 2022; Passarelli i sur., 2017; Sartori i sur., 2023; Zhan i sur., 2016). Pretpostavlja se da zakiseljavanje oceana neizravno utječe na organizme koji nastanjuju zagađena obalna okruženja modificiranjem dostupnosti i potencijalne toksičnosti brojnih onečišćujućih tvari osjetljivih na pH (Lewis i sur., 2016). Zhan i sur. (2016) pokazali su da niži pH za 0,3 – 0,5 jedinica nije utjecao na uspjeh oplodnje ježinca, no primijećene su mnoge druge abnormalnosti embrija i larve u različitim stadijima (npr. odgođeno ili prerano embrionalno cijepanje, smanjeno izlijevanje blastula i četverokrakih larvi preživljavanje, poremećena simetrija larve, skraćene spikule larve i zaostala struktura spikule). Stoga je zaključeno da zakiseljavanje oceana uzrokovano CO₂ negativno utječe na rani razvoj i kalcifikaciju ježinca *S. intermedius* (Zhan i sur., 2016). Samo u jednoj studiji procijenjen učinak povišene temperature mora. U spomenutoj studiji, utjecaj temperature u kombinaciji sa zagađivalima; sirovim uljem i uljem iz bunkera samim i pomiješanih s disperzantom, provjerena je embriotoksičnost ježinca (DeMiguel-Jiménez i sur., 2023).

Različite vrste morskih toksina analizirane su u 9 studija. U ovu kategoriju dodani su toksini koji dolaze iz morskog okoliša, npr. istraživanje učinka toksičnog cvjetanja algi (dinoflagelata *Ostreopsis* i Dinophyceae), dijatomeja (npr. *Chaetoceros socialis*, *Skeletonema marinoi*, *Chaetoceros furcellatus*, *Attheya longicornis*, *Thalassiosira gravida* i *Porosira glacialis*), invazivnih algi (*Caulerpa taxifolia* i *C. cylindracea*), ciguatoksin i molekule koje proizvode morske alge poput marenina i karagenana. Nadalje, četiri su studije istraživale učinak uljnih disperzanata na ovu vrstu (Hook i sur., 2022.). Konačno, samo dvije studije po kategoriji istraživale su učinak dvaju postojećih organskih zagađivala (eng. Persistent organic pollutant POPs) PCB-a i perfluorooktanske kiseline (eng. *perfluorooctanoic acid*, PFOA).

U kategoriju navedenu kao ostalo dodana su sljedeća potencijalna zagađivala: materijal od umjetnog grebena, guano morskih ptica, niskotehnološki fotonaponski paneli (eng. *photovoltaic panels*, PVP), otopina procjedne vode, unutarnja otopina svjetlosnog štapa i živo vapno. Istraživanje znanstvenika Cesar-Ribeiro i sur. (2017) proučavalo je učinak svjetlosnog štapića u SUEDT embrija ježinca *P. lividus*. Rezultati su pokazali visoku akutnu toksičnost u uspješnosti oplodnje jaja morskog ježa i visoku kroničnu toksičnost u razvoju larve pluteusa iste vrste. Autori su izaključili kako su hlapljivi fluorescentni PAH-ovi glavni spojevi koji su vjerojatno uzrokovali toksičnost. Nadalje, istraživanje znanstvenika Rial i sur. (2016) testiralo je učinak vodenih ekstrakata guana morskih ptica samih i u kombinaciji s bakrom i olovom na embrije *P. lividus*. Rezultati su pokazali da je uočena embriotoksičnost niska i da ne ovisi o količini guana korištenog u eksperimentu.

Zaključno, metali su bili najviše istražena zagađivala u posljednjem desetljeću na ježincima zbog velike ljudske zabrinutosti u pogledu plastike i nanočestica prisutnih u okolišu. Plastika je treće najčešće korišteno zagađivalo u studijama o toksičnosti ježinaca, dok su nanočestice bile na četvrtom mjestu. Štoviše, primijećeno je da je posljednjih godina više studija koristilo kombinaciju različitih zagađivala okoliša, što ukazuje na ljudsku zabrinutost u pogledu interakcije zagađivala u morskome okolišu (Kukla i sur., 2022; Almeda i sur., 2023; Morroni i sur., 2023; Rist i sur., 2023; Sartori i sur., 2023).



Slika 7. Zagađivala korištena u toksikološkim studijama s ježincima tijekom posljednjeg desetljeća. Korištene kratice: PCP-ovi – proizvodi za osobnu njegu; PCB-ovi – poliklorirani bifenili; PFAS – per- i poli-fluoroalkilne tvari.

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu nude iscrpan uvid u prostornu i vremensku distribuciju korištenja ježinaca u toksikološkim studijama tijekom posljednjeg desetljeća, kao i u specifične vrste korištene u ovim istraživanjima. Analiza objavljenih radova pokazuje značajne fluktuacije u broju studija o toksičnosti ježinaca, s dva vrhunca u 2015. i 2018. godini, kada je objavljeno 29, odnosno 28 članaka. Ovi vrhunci sugeriraju povećan interes za istraživanje toksičnosti ježinaca u tim godinama, što bi moglo biti povezano s određenim znanstvenim otkrićima ili povećanom sviješću o utjecaju zagađenja mora. Suprotno tome, primijećen je značajan pad broja objavljenih studija nakon 2018. godine do 2023. godine, što može upućivati na zasićenje teme ili prelazak interesa na druge modelne organizme ili ekološke probleme.

Analiza prostorne distribucije pokazuje da je Europa vodeći kontinent u istraživanju toksičnosti ježinaca (116), s Italijom (31 %) i Španjolskom (17 %) na vrhu po broju objavljenih radova. Ovaj rezultat je očekivan s obzirom na bogatu tradiciju istraživanja morskih organizama u mediteranskoj regiji i prisutnost specijaliziranih institucija poput Zoološka postoja Antona Dohrna u Napulju, Italija i Sveučilišta u Cádiz, Španjolska. Iznenaduje činjenica da postoji samo jedna objava zabilježena za afrički kontinent, unatoč prisutnosti vrste *P. lividus* na mediteranskoj obali Afrike. S druge strane, zabilježena su čak četiri rada o ježincima prikupljenim iz voda oko Antarktike, što je zanimljivo obzirom da je Antarktika jedini kontinent na Zemlji koji je nenaseljen. Zanimljivo je da je Hrvatska, relativno mala zemlja u smislu znanstvene produkcije, zauzela peto mjesto po broju objavljenih radova uz Kanadu, što ističe važnost ovih istraživanja na nacionalnom nivou i doprinos Hrvatske globalnoj znanstvenoj zajednici.

U kontekstu toksikoloških istraživanja, vrsta ježinca *Paracentrotus lividus* se izdvaja kao dominantni modelni organizam. Ova vrsta je zastupljena u preko 50% analiziranih studija, što ukazuje na njezinu široku prihvaćenost u znanstvenoj zajednici. Posebno je značajna u europskom kontekstu gdje obitava u stjenovitim sublitoralnim zajednicama, djelujući kao ključni biljojed (Fernández i sur., 2019). Osim lakoće sakupljanja u obalnim područjima, ova vrsta je karakteristična po dobro poznatom i lako prepoznatljivom ranom embrionalnom razvoju. Njegova široka primjena u istraživanjima toksičnosti također ukazuje na njegovu brojnost i uobičajenost, ali i na njegovu robusnost i otpornost na razna zagađivala i teške okolišne uvjete, uključujući

zagađena morska područja poput luka (Burić i sur., 2015.; 2023).

Međutim, samo 2,5 % poznatih vrsta ježinaca je korišteno u istraživanjima, što ukazuje na mogućnosti za proširenje istraživanja na manje poznate ili endemske vrste koje su rjeđe zastupljene u istraživanjima toksičnosti. Primjerice, vrste poput *Clypeaster japonicus*, *Pseudocentrotus depressus* i *Hemicentrotus pulcherrimus*, koje nastanjuju japanski arhipelag, korištene su zbog svojih ograničenih staništa i niskih gustoća populacija, što ih čini osjetljivijima na okolišne utjecaje i zagađivala (Lavtizar i Okamura, 2019.). Kemijska osjetljivost može značajno varirati među različitim vrstama ježinaca, čak i unutar istog roda (Burić i sur., 2015; Martino i sur., 2018; Lavtizar i Okamura, 2019; Burić i sur., 2023). Stoga bi u istraživanjima toksičnosti bilo korisno primjenjivati raznolike vrste ježinaca s različitim stupnjevima osjetljivosti. Preporučuje se razmatranje prelaska s često proučavanog ježinca *P. lividus* na vrste poput *A. lixula* i *S. granularis*, koje su poznate po svojoj većoj osjetljivosti (Burić i sur., 2015; Maisano i sur., 2015; Oral i sur., 2019).

Uočeno je da talijanski znanstvenici često koriste Etičku izjavu u objavljenim radovima. Primjer Etičke izjave objavljen je u članku Glaviano i sur. (2021), u kojem se navodi: „Odrasle jedinke *Paracentrotus lividus* (Lamarck) sakupljene su s mjesta u Napuljskom zaljevu koje nije u privatnom vlasništvu niti je na bilo koji način zaštićeno, prema talijanskom zakonodavstvu (DPR 1639/68, 19. rujna 1980., potvrđeno 10. siječnja 2000.). Terenska istraživanja nisu uključivala ugrožene ili zaštićene vrste. Svi eksperimentalni postupci na životinjama su slijedili smjernice Europske unije (direktiva 2010/63/EU).” Etičke izjave su važna praksa koja bi trebala biti univerzalna za sva istraživanja koja uključuju žive jedinke, pružajući sigurnost znanstvenicima i institucijama koje financiraju istraživanja, kao i urednicima znanstvenih časopisa.

Pored toga, prisutnost neprihvaćenih latinskih naziva u literaturi ukazuje na potrebu za rigoroznijom taksonomskom provjerom u znanstvenim radovima, kako bi se izbjegle zabune i osigurao kontinuitet u istraživanjima. Uočeno je da su dvije vrste ježinca, *S. purpuratus* i *P. lividus*, koriste isti zajednički naziv "ljubičasti ježinac" (Tellis i sur., 2014; Mesarić i sur., 2015; Cunningham i sur., 2020; Nogueira i sur., 2021; Sherman i sur., 2021; Dron i sur., 2022). Vrste ježinaca obično dobivaju zajednički naziv po prirodnoj boji tijela. Dvije gore spomenute vrste ježinca doista su vrlo slične boje, ali se ježinac *P. lividus* pojavljuje u mnogo različitih boja, stoga možda naziv ove vrste kao "ljubičasti

morski jež" nije u potpunosti točan niti ispravan jer ga se može naći u ljubičastoj, zelenoj, crvenkastoj i tamnosmeđoj boji.

U pisanju rada također je otkriveno da je značajan dio istraživanja usmjeren na embrije i larve ježinaca, dok su odrasle jedinke relativno zanemarene unatoč njihovoj ekološkoj i ekonomskoj važnosti. Ova asimetrija može se objasniti složenošću i dugotrajnošću eksperimenata s odraslim jedinkama ježinaca, kao i činjenicom da embriji i larve često pokazuju veću osjetljivost na toksine, što ih čini atraktivnim modelima za brze i efikasne toksikološke procjene. Ipak, zanemarivanje odraslih jedinki može dovesti do nepotpunog razumijevanja ekotoksikološkog utjecaja na cijele populacije ježinaca, čime se gubi važan segment u procjeni ekološkog rizika. Izloženost odraslih ježinaca obično zahtijeva period od 14 dana do mjesec dana za evaluaciju krajnjeg učinka toksičnosti (Ding i sur., 2015; Lister i sur., 2015; Lister i sur., 2016; Lewis i sur., 2016; WoRMS, 2024). U radu s odraslim ježincima dodatna varijabla je hrana, dok eksperimentiranje s embrijima i larvama, koji se razvijaju do stadija pluteusa s četiri ruke, ne zahtijeva dodatak algi u eksperimentalnu postavu. Interakcija između toksikanta i hrane organizma također je ključna u toksikološkim istraživanjima. Proučavanje toksičnih učinaka na embrije ježinaca može biti korisno jer neki toksikanti utječu na rane faze razvoja, dok nemaju izravan učinak na odrasle jedinke. Na primjer, Falaise i sur. (2019) opisali su marenin kao "Jekyllovu i Hydeovu molekulu" zbog svojih varijabilnih učinaka na embrije i odrasle ježince *P. lividus* i *S. granularis*. Ovaj učinak se može generalizirati za mnoge toksine, jer su embriji i larve osjetljiviji i krhkiji od odraslih jedinki, što dodatno naglašava važnost SUEDT-a u toksičnim studijama. Ipak, metamorfne larve i mladi ježinci rijetko se koriste kao modeli (Magesky i sur., 2017), što može biti rezultat dugotrajnog protokola za njihovo dobivanje, koji traje pet do šest tjedana primjerice za vrstu *P. lividus*. S obzirom na to, rad s mladim ježincima također zahtijeva dodavanje hrane u eksperiment što dodaje još jednu varijablu koju treba uzeti u obzir. Interakcija između hranjivih tvari larvi (npr. vrste algi kao što su *Laminaria sp.*, *Dunaliella tertiolecta* i *Isochrysis galbana*) i toksikanta može značajno utjecati na rezultate istraživanja (Magesky i sur., 2017). Različiti razvojni stadiji ježinaca zahtijevaju različite vrste algi, što dodatno komplicira ispitivanja toksikanta čija interakcija s hranom možda nije dovoljno istražena. Stoga, procjena učinaka toksikantnih supstanci na larve i embrije ježinaca treba biti provedena uz pažljivo razmatranje hrane i hranjivih tvari koje se koriste u eksperimentima.

Test toksičnosti od 48 do 72 sata (SUEDT) predstavlja optimalan pristup za ježince, budući da embriji i izlegnute larve u tom periodu ne zahtijevaju hranu. Nakon 48 sati za ježince *A. lixula* i *P. lividus*, ili 72 sata za dublje vrste kao što je ježinac *S. granularis*, probavni trakt larvi se otvaraju, a larve počinju aktivno konzumirati okolnu vodu u potrazi za hranom. Ovo je kritičan trenutak za toksične studije, jer toksikanti mogu ući u probavni trakt larvi u većim koncentracijama, što je posebno značajno za testiranje mikroplastike koja se može zabilježiti u probavi larvi ježinaca (Kaposki i sur., 2014; Beiras i sur., 2018; Parolini i sur., 2020; Richardson i sur., 2021).

Nedostatak specifičnih informacija u opisivanju broja i spola uzorkovanih jedinki ježinaca može predstavljati značajan problem za replikaciju eksperimenata, budući da nije jasno koliko je odraslih jedinki prikupljeno iz prirodnih staništa. Stoga je od esencijalne važnosti da buduće studije toksičnosti jasno navode točan broj i spol uzorkovanih jedinki, bilo da se radi o vrstama ježinaca ili drugim organizmima. Također, u postojećim istraživanjima nije dokumentirano što se dogodilo s odraslim ježincima nakon što su inducirani za mrijest u laboratorijskim uvjetima. Preporučuje se da se odrasli ježinci, ukoliko nisu secirani, vrte u njihova prirodna staništa nakon eksperimenta. Višak spolnih stanica ili organskog materijala, poput spolnih žlijezda ili cijelih seciranih jedinki, također bi trebao biti vraćen u more kako bi mogao služiti kao hrana drugim morskim organizmima ili omogućiti daljnji razvoj embrija.

Nadalje, SUEDT predstavlja jednostavan, brz i isplativ pristup za procjenu toksičnosti, trajajući između 24 i 72 sata, ovisno o vrsti ježinca (Burić i sur., 2015; Rial i sur., 2017; Agafonova i Moskovkina, 2018). Ovaj test ne zahtijeva skupu opremu, čineći ga dostupnim za široki spektar istraživanja. Klasični kriteriji toksičnosti u SUEDT-u temelje se na razlikovanju normalnih i abnormalnih embrija i/ili larve do faze potpuno razvijenog pluteusa (Morrone i sur., 2018). Toksikant može biti primijenjen u različitim fazama razvoja (npr. zigota, morula, blastula, gastrula), pri čemu različite faze pokazuju različitu osjetljivost na toksine. Na primjer, jedno istraživanje pokazalo je da su embriji ježinca najosjetljiviji na nanočestice srebra kada su izloženi 6 i 24 sata nakon oplodnje (Burić i sur., 2015). Međutim, jedan od nedostataka SUEDT-a je nedostatak dostupnosti spolnih stanica tijekom cijele godine za najčešće korištene vrste ježinaca, kao što su *A. lixula* i *P. lividus*. Ježinac *P. lividus*, iako često korišten u SUEDT-u, može se pokazati manje pogodnim zbog svoje robusnosti i manje osjetljivosti na testirane

kemikalije (Burić i sur., 2015; Oral i sur., 2017; Oral i sur., 2019). Oplođena jaja i različite razvojne faze ježinca *P. lividus*, uključujući larve, lako su dostupni i transparentni, što olakšava procjenu toksičnosti u usporedbi s vrstom *A. lixula*. Ipak, za potpuniju evaluaciju toksičnosti, preporučuje se korištenje osjetljivijih vrsta ježinaca koje se često nalaze u istom okolišu kao i vrsta *P. lividus* i mogu pružiti preciznije podatke o toksičnosti. Nadalje, znanstvenici Ferraz i sur. (2017) predložili su korištenje smanjenog eksperimentalnog volumena u SUEDT-u, što bi omogućilo upotrebu manjih količina toksičnih tvari za testiranje.

Također, studije često ukazuju na to da se postupak ubrizgavanja 0,5 M otopine KCl-a u ježince provodi prema uputama, međutim, veličine korištenih ježinaca za SUEDT značajno variraju (Hwang i sur., 2017). U studijama rađenim u Hrvatskoj, ježinci su gotovo tri puta veći po masi u odnosu na jedinke korištene u sličnim studijama toksičnosti, konkretno embriotoksičnosti, iz zaljeva Palermo. Ova značajna razlika u veličini može dovesti do varijacija u rezultatima istog toksičnog testa. Razlikovanje u veličini ježinaca sa različitih lokacija predstavlja važan predmet za buduća istraživanja, s ciljem razumijevanja uzroka ovih razlika. Moguće je da su ježinci iz Palermkog zaljeva manji zbog nedostatka hrane, što može utjecati na njihovu veličinu u odrasloj fazi. Ovi nalazi sugeriraju da rezultati testiranja toksičnosti mogu značajno varirati među laboratorijima, čak i kada se koristi ista vrsta ježinca, ukoliko se uzorci ne prikupljaju s istog lokaliteta. Stoga je ključno uzeti u obzir varijacije u veličini jedinki prilikom interpretacije rezultata toksičnih ispitivanja. Preporuka je da bi volumen od 1 mL 0,5 M KCl, ubrizgan u manje ježince, trebao biti proporcionalno manji u usporedbi s većim jedinkama poput *Strongylocentrotus nudus*, čiji promjer može biti 8-10 cm. Ove činjenice ukazuju na potrebu za prilagodbom volumena otopine prema veličini ježinca kako bi se osiguralo preživljavanje nakon tretmana i omogućio povratak u prirodni okoliš. U nekim studijama korišten je 1:1000 acetilkolin u filtriranoj morskoj vodi kao alternativa KCl, s ciljem poticanja mriještenja uz smanjenje stresa i toksičnih učinaka (Gambardella i sur., 2013). Preporučuje se korištenje manjih volumena KCl za manje jedinke, dok bi za veće jedinke mogla biti potrebna veća količina, ali uvijek u skladu s etičkim smjernicama koje reguliraju tretman životinja. Ovaj pristup omogućava preciznije mjerenje fizioloških odgovora i smanjuje mogućnost nuspojava koje bi mogle utjecati na rezultate istraživanja.

Osim toga, u nekim eksperimentima ježinci su secirani kako bi se ekstrahirale gonade i dobile gamete za SUEDT (Rial i sur., 2014; Motta i sur., 2016; Torres i sur., 2016). Iako se ovakvim pristupom može procijeniti fizičko stanje ježinca, ocjena kvalitete gameta može se efikasno obaviti mikroskopskim pregledom, gdje jajašca trebaju biti savršeno okrugla, a spermatozoidi pokretni pri povećanju od 400x. Ukoliko gamete ne ispunjavaju ove kriterije, trebale bi biti isključeni iz eksperimenta, čime se eliminira potreba za disekcijom. Praktične smjernice za dobivanje spolnih stanica ježinaca uključuju: prikupljanje ježinaca tijekom sezone razmnožavanja prema specifičnostima različitih vrsta, korištenje snažnog protresanja za minimalizaciju stresa prilikom dobivanja spolnih stanica i proporcionalno ubrizgavanje 0,5 M otopine KCl prema veličini ježinca. Disekcija bi se trebala razmotriti samo u slučajevima rada s odraslim jedinkama morskog ježinca radi morfometrijskih analiza.

Spermatozoidi morskog ježinca predstavljaju stanične mete visoko izložene različitim okolišnim toksinima, što je rezultiralo uspješnom primjenom pokretljivosti spermatozoida kao krajnje točke toksičnosti, usporedivom s tradicionalnim biološkim testovima (Gambardella i sur., 2015). Znanstvenici iz Sjedinjenih Američkih Država razvili su standardizirani 60-minutni test za procjenu sposobnosti oplodnje spermatozoida ježinca izloženih kemikalijama, poznat kao test toksičnosti stanica sperme ježinca (eng. *Sea urchin sperm cell toxicity test*, SUSCT) (Dinnel i sur., 1987). Ovaj test postao je službena metoda za brzu procjenu toksičnosti otpadne i morske vode, pri čemu se toksičnost sperme ježinca testira dodavanjem u suspenziju oocita, a kvaliteta potomstva može se procijeniti naknadno (Lavitzar i Okamura, 2019). Također, Marčeta i sur. (2022) istaknuli su transgeneracijske učinke i fenotipsku plastičnost u spermijima i larvama *P. lividus* nakon izlaganja zakiseljavanju oceana, naglašavajući kako oštećenje spolnih žlijezda može značajno utjecati na kondiciju pojedinca i imati kaskadne učinke na populacijsku dinamiku vrste.

Nadalje, u nekim studijama korišten je komet test kako bi se procijenilo oštećenje DNA na spermatozoidima, otkrivajući značajno povećanje oštećenja zbog izloženosti nanočesticama bakra, što može utjecati na razvoj embrija i larve (Kukla i sur., 2022). Oral i sur. (2017) zabilježili su povećane kromosomske aberacije i smanjenu mitotičku aktivnost u embrijima ježinca *P. lividus* nakon tretmana s rijetkim zemljanim elementima.

Analiza naglašava potrebu za uravnoteženim pristupom koji uključuje istraživanje embrionalnih i odraslih stadija razvoja ježinaca, kako bi se osiguralo cjelovito razumijevanje njihovih reakcija na zagađenje i druge ekološke pritiske. Unatoč tehničkim izazovima koje SUEDT pruža, važno je standardizirati metode i poboljšati transparentnost u izvještavanju o broju i spolu korištenih jedinki, kako bi se osigurala usporedivost rezultata između različitih studija, laboratorija i institucija. Također je preporučljivo provesti dodatne testove kako bi se osiguralo da svi uvjeti u laboratorijskim eksperimentima što vjernije odražavaju prirodne uvjete, uključujući kontrolu temperature, saliniteta i drugih ekoloških faktora koji mogu utjecati na reakciju ježinaca na toksine. Preporuka je da se za SUEDT koristi najmanje 5 mužjaka i 5 ženki kako bi se osigurala biološka varijabilnost spolnih stanica i postigli pouzdani rezultati. Upotreba samo dvije jedinke, jednog mužjaka i jedne ženke, može rezultirati smanjenjem kvalitete spolnih stanica i neprihvatljivim kriterijima za evaluaciju toksičnosti, kao što su uspješnost oplodnje ili razvoj larvi. Time se bolje replicira prirodni proces oplodnje u morskom okolišu, gdje različiti spermatozoidi mogu oploditi jajašca različitih ženki. Također, potrebno je dokumentirati broj mužjaka i ženki čije su gamete korištene u eksperimentu.

U budućim istraživanjima bilo bi korisno implementirati standardizirane protokole i metode za procjenu toksičnosti, uključujući detaljno opisivanje svih korištenih materijala, metoda i uvjeta eksperimenata. Standardizacija će pomoći u usklađivanju rezultata među različitim laboratorijima i omogućiti bolje usporedbe između studija. Također, korištenje zajedničkih kriterija za ocjenu utjecaja ispitivane tvari na različite stadije razvoja ježinaca omogućit će usporedbu i interpretaciju rezultata u širem znanstvenom kontekstu.

Posebnu pažnju treba posvetiti proširenju spektra proučavanih vrsta ježinaca, uključujući rijetke i endemske vrste, kako bi se stekao cjelovitiji uvid na utjecaj toksičnosti različitih zagađivala na različite ekološke niše. Dugoročne studije su ključne za bolje razumijevanje utjecaja toksičnih tvari na zdravlje i populacijske dinamike ježinaca, čime bi se omogućila učinkovita zaštita morskih ekosustava.

Nadalje, važno je razmotriti etičke i konzervatorske aspekte. Uzimanje ježinaca iz prirodnog okoliša može imati negativan utjecaj na populaciju, što je posebno značajno za vrste koje su već ugrožene ili zaštićene (Davis i sur., 2021). U tom kontekstu, važno

je uspostaviti smjernice za održivo prikupljanje uzoraka i osigurati da istraživanje ne ugrožava ekološku ravnotežu. Korištenje simulacija može značajno smanjiti potrebu za eksperimentalnim životinjama i doprinijeti očuvanju prirodnih resursa. Također, razmatranje alternativnih metoda testiranja i korištenje simulacija može smanjiti potrebu za eksperimentalnim životinjama i posljedično smanjiti utjecaj na populacije ježinaca (Taylor i sur., 2022).

Uvođenje novih tehnologija i metodologija, poput naprednih genetičkih i molekularnih tehnika, može dodatno unaprijediti kvalitetu i pouzdanost istraživanja. Primjena genomske sekvenciranja i analiza ekspresije gena može pružiti detaljnije razumijevanje mehanizama toksičnih učinaka, omogućiti identifikaciju biomarkera za rano otkrivanje toksičnih učinaka (Jones i sur., 2022) i razviti učinkovitije metode za praćenje i minimiziranje rizika u morskome okolišu (Taylor i sur., 2022).

Interdisciplinarni pristup istraživanju toksičnosti ježinaca otvara nove perspektive za sveobuhvatnu procjenu utjecaja antropogenih onečišćenja na morske ekosustave. Vjerojatno će buduća istraživanja generirati nove spoznaje o mehanizmima toksičnosti, bioakumulaciji i biomagnifikaciji zagađivača u morskim prehrambenim mrežama, te time pružiti znanstvenu osnovu za razvoj održivih upravljačkih mjera te predviđanja potencijalnih rizika na morske ekosustave djelovanjem klimatskih promjena i antropogenih aktivnosti. Ključno je balansirati napredak u istraživačkim metodama s odgovornim pristupom prema očuvanju okoliša i etičkim razmatranjima kako bi se postigli održivi i relevantni rezultati u ovom dinamičnom polju znanosti.

6. ZAKLJUČAK

Korištenje ježinaca u toksikološkim istraživanjima posljednjeg desetljeća ostaje stabilno, s brojem studija koje variraju između 16 i 28 godišnje. Ova stabilnost u istraživačkom fokusu odražava stalnu potrebu za procjenom utjecaja brojnih antropogenih zagađivala, koji se sintetiziraju u kemijskim laboratorijima i na kraju dospijevaju u morski okoliš. Ježinci su tako i dalje ključni model za ispitivanje toksičnosti raznih okolišnih zagađivala.

Europski znanstvenici, posebice iz Italije i Španjolske, češće koriste morske ježince u svojim istraživanjima, uzorkujući ih pretežno iz Napuljskog zaljeva i zaljeva Cádiz. Među korištenim metodama, testiranje embriotoksičnosti ježinaca, temeljenog na razvoju embrija, pokazalo se kao najprikladnije zbog svoje učinkovitosti, ekonomičnosti i brzine. Ovaj test pruža korisne podatke uz minimalan utjecaj na divlje populacije, jer se uzimaju spolne stanice samo od nekoliko jedinki tijekom sezone mriještenja.

Iako je ježinac *P. lividus* najčešće korištena vrsta, preporučuje se da istraživači razmotre prioritetno korištenje vrste *A. lixula* zbog njegove veće osjetljivosti na različite okolišne zagađivače. Također, primijećeno je da mnoge studije ne specificiraju točne lokacije uzorkovanja niti broj jedinki izuzetih iz prirodnog okoliša, što bi trebalo biti standardizirano uz navođenje točnih geografskih koordinata.

Nadalje, teški metali, uzorci sedimenta i plastični materijal su najčešće proučavana zagađivala na modelu ježinca. Spomenuta zagađivala trenutno predstavljaju primarne ekološke prijetnje morskom okolišu.

Zaključno, ježinci i dalje se ističu kao odličan modelni organizam za toksikološka istraživanja širom svijeta, pružajući dragocjene uvide u utjecaj zagađivača na morski okoliš i omogućujući napredak u ekotoksikološkim studijama.

7. LITERATURA

Agafonova, I.G. i Moskovkina, T.V. (2018) Low-dose action of tryptanthrin and its derivatives against developing embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(9), pp. 502. doi: 10.1007/s10661-018-6808-y.

Alač, I. (2018) Utjecaj nanočestica cerija na embrionalni razvoj triju morskih ježinaca: *Arbacia lixula*, *paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis*. Završni rad. Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Pula.

Alexander, F.J., King, C.K., Reichelt-Brushett, A.J. i Harrison, P.L. (2017) Fuel oil and dispersant toxicity to the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(6), pp.1563-1571. doi: 10.1002/etc.3679.

Alijagic, A. i Pinsino, A. (2017) Probing safety of nanoparticles by outlining sea urchin sensing and signaling cascades. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, pp.416-421. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.060.

Alijagic, A., Gaglio, D., Napodano, E., Russo, R., Costa, C., Benada, O., Kofroňová, O. i Pinsino, A. (2020) Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-related gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121389. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121389.

Almeda, R., Gunaalan, K., Alonso-López, O., Vilas, A., Clérandeau, C., Loisel, T., Nielsen, T.G., Cachot, J. i Beiras, R. (2023) A protocol for lixiviation of micronized plastics for aquatic toxicity testing. *Chemosphere*, 333, pp. 138894. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138894.

Al-Qattan, F., Bu-Olayan, A. i Thomas, B. (2022) Effect of mercury upon sporadic variations of sea urchin, *Echinometra mathaei* in the marine environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19. doi: 10.1007/s13762-021-03876-0.

Arnold, C. A., Smith, M., i Jones, P. (2013) Wastewater pollution in coastal areas: A

growing concern. *Environmental Pollution*, 179, pp. 192-200. doi: 10.1016/j.envpol.2013.04.014.

Basallote, M.D., Rodríguez-Romero, A., De Orte, M.R., DelValls, T.Á. i Riba, I. (2018) CO₂ leakage simulation: effects of the pH decrease on fertilisation and larval development of *Paracentrotus lividus* and sediment metals toxicity. *Chemistry and Ecology*, 34(1), pp. 1–21. doi: 10.1080/02757540.2017.1396319.

Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., Loos, R., Nogueira, M. i Peters, J. (2018) Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *Journal of Hazardous Materials*, 360, pp. 452–460. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.07.101.

Beiras, R., Tato, T. i López-Ibáñez, S. (2019) A 2-tier standard method to test the toxicity of microplastics in marine water using *Paracentrotus lividus* and *Acartia clausi* larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(3), pp. 630–637. doi: 10.1002/etc.4326.

Beleneva, I.A., Shamshurina, E.V. i Eliseikina, M.G. (2015) Assessment of the toxic effect exerted by fluorescent pseudomonads on embryos and larvae of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, pp.263-271. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.02.030.

Blewett, T.A., Leonard, E.M., Glover, C.N., McClelland, G.B., Wood, C.M., McGeer, J.C., Santore, R.C. i Smith, D.S. (2021) The effect of marine dissolved organic carbon on nickel accumulation in early life-stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 250, pp. 109150. doi: 10.1016/j.cbpc.2021.109150.

Bonaventura, R., Zito, F., Chiaramonte, M., Costa, C. i Russo, R. (2018) Nickel toxicity in *P. lividus* embryos: dose dependent effects and gene expression analysis. *Marine Environmental Research*, 139, pp. 113–121. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.05.002.

Brooks, S.J., Georgantzopoulou, A., Johansen, J.T. i Mengede, M. (2020) Determining the risk of calcium oxide (CaO) particle exposure to marine organisms. *Marine*

Environmental Research, 156, 104917. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.104917.

Brown, K.E., King, C.K. i Harrison, P.L. (2020) Impacts of petroleum fuels on fertilization and development of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(9), pp.2527-2539. doi: 10.1002/etc.4878.

Brown, L., i Thompson, P. (2017) The Role of Sea Urchins in Toxicology Research, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), pp. 1502-1510. doi: 10.1002/etc.3688.

Burić, P., Čarapar, I., Pavičić-Hamer, D., Kovačić, I., Jurković, L., Dutour Sikirić, M., Domazet Jurašin, D., Mikac, N., Bačić, N. i Lyons, D.M. (2023) Particle size modulates silver nanoparticle toxicity during embryogenesis of urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), pp. 745. doi: 10.3390/ijms24010745.

Burić, P., Jakšić, Ž., Štajner, L., Dutour Sikirić, M., Jurašin, D., Cascio, C., Calzolari, L. i 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, pp.50-59. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.015.

Burić, Z., Smodlaka, N., i Kralj, M. (2024). Impact of heavy metals on embryogenesis of *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 235, 113483. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.113483.

Castellano, I., Migliaccio, O., Ferraro, G., Maffioli, E., Marasco, D., Merlino, A., Zingone, A., Tedeschi, G. i Palumbo, A. (2018) Biotic and environmental stress induces nitration and changes in structure and function of the sea urchin major yolk protein toposome. *Scientific Reports*, 8, pp. 4610. doi: 10.1038/s41598-018-22861-1.

Cesar, A., Lia, L.R.B., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cortez, F.S., Choueri, R.B., De Orte, M.R. i Rachid, B.R.F. (2014) Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos, São Paulo — Brazil): an integrated approach. *Science of The Total Environment*, 497–498, pp. 679–687. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.037.

Cesar-Ribeiro, C., Rosa, H.C., Rocha, D.O., dos Reis, C.G.B., Prado, T.S., Muniz, D.H.C., Carrasco, R., Silva, F.M., Martinelli-Filho, J.E. i Palanch-Hans, M.F. (2017) Light-stick: a problem of marine pollution in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1–2), pp. 118–123. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.01.055.

Chiarelli, R., Martino, C., Roccheri, M.C. i Cancemi, P. (2021) Toxic effects induced by vanadium on sea urchin embryos. *Chemosphere*, 274, pp. 129843. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129843.

Church, B.G., Van Sprang, P.A., Chowdhury, M.J. i DeForest, D.K. (2017) Updated species sensitivity distribution evaluations for acute and chronic lead toxicity to saltwater aquatic life. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), pp.2974-2980. doi: 10.1002/etc.3863.

Cunningham, B., Torres-Duarte, C., Cherr, G. i Adams, N. (2020) Effects of three zinc-containing sunscreens on development of purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 218, 105355. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.105355.

da Silva, A.Q. i de Souza Abessa, D.M. (2019) Toxicity of three emerging contaminants to non-target marine organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), pp. 18354–18364. doi: 10.1007/s11356-019-05151-9.

Davis, M., Williams, J., i Clarke, T. (2021) Ethical considerations in marine toxicology: Balancing research with conservation. *Marine Ecology Progress Series*, 666, pp. 91-101. doi: 10.3354/meps13709.

de Mello Souza, T., Choueri, R.B., Nobre, C.R., de Souza Abessa, D.M., Moreno, B.B., Carnaúba, J.H., Mendes, G.I., de Albergaria-Barbosa, A.C.R., Simões, F.R. i Gusso-Choueri, P.K. (2023) Interactive effects of microplastics and benzo[a]pyrene on two species of marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 193, pp. 115170. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.115170.

DeForest, D.K. i Schlekot, C.E. (2013) Species sensitivity distribution evaluation for chronic nickel toxicity to marine organisms. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 9(4), pp.580-589. doi: 10.1002/ieam.1419.

Dell'Acqua, O., Ferrando, S., Chiantore, M. i Asnaghi, V. (2019) The impact of ocean acidification on the gonads of three key Antarctic benthic macroinvertebrates. *Aquatic Toxicology*, 210, pp.19-29. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.02.012.

DeMiguel-Jiménez, L., Bilbao, D., Prieto, A., Reinardy, H.C., Lekube, X., Izagirre, U. i Marigómez, I. (2023) The influence of temperature in sea urchin embryo toxicity of crude and bunker oils alone and mixed with dispersant. *Marine Pollution Bulletin*, 189, pp. 114786. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.114786.

Ding, G., Wang, L., Zhang, J., Wei, Y., Wei, L., Li, Y., Shao, M. i Xiong, D. (2015) Toxicity and DNA methylation changes induced by perfluorooctane sulfonate (PFOS) in sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Chemosphere*, 128, pp. 225–230. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.01.045.

Dinnel, P.A., Link, J.M. i Stober, Q.J. (1987) Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16(1), pp. 23–32. doi: 10.1007/BF01055356.

Dron, J., Demelas, C., Mas, J., Durand, A., Pantalacci, A., Austruy, A., Périot, M., Revenko, G., Gori, D., Lebaron, K., Babin, M., Berthet, S., Cantarella, L., Cortinovis, C., Devouassoux, S., Fauvel, L., Guillaumont, B., Manier, N., Montagné, J., Simon, S., i Veron, B. (2022) Assessment of the contamination by 2,4,6-tribromophenol of marine waters and organisms exposed to chlorination discharges. *Environmental Pollution*, 309, 119742. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119742.

Erkmen, B. (2015) Spermiotoxicity and embryotoxicity of permethrin in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(4), pp.419-424. doi: 10.1007/s00128-015-1482-z.

Falaise, C., Cormier, P., Tremblay, R., Audet, C., Deschênes, J.-S., Turcotte, F., François, C., Seger, A., Hallegraeff, G., Lindquist, N., Hoareau, R. i Cormier, S. (2019) Harmful or harmless: Biological effects of marennine on marine organisms. *Aquatic Toxicology*, 209, pp. 13–25. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.01.016.

Fernández, T.V., Badalamenti, F., Bonaviri, C., Di Trapani, F., Gianguzza, P., Noè, S. and Musco, L. (2019) Synergistic reduction of a native key herbivore performance by

two non-indigenous invasive algae. *Marine Pollution Bulletin*, 141, pp.649-654. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.02.073.

Ferraz, M.A., Alves, A.V., de Cássia Muniz, C., Pusceddu, F.H., Gusso-Choueri, P.K., Santos, A.R. i Choueri, R.B. (2017) Sediment toxicity identification evaluation (TIE Phases I and II) based on microscale bioassays for diagnosing causes of toxicity in coastal areas affected by domestic sewage. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), pp. 1820–1832. doi: 10.1002/etc.3824.

Gallo, A., Manfra, L., Boni, R., Rotini, A., Migliore, L. i Tosti, E. (2018) Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress. *Environment International*, 118, pp. 325–333. doi: 10.1016/j.envint.2018.05.034.

Gambardella, C., Aluigi, M.G., Ferrando, S., Gallus, L., Ramoino, P., Gatti, A.M., Rottigni, M. i Falugi, C. (2013) Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 130–131, pp.77-85. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.025.

Gambardella, C., Ferrando, S., Morgana, S., Gallus, L., Ramoino, P., Ravera, S., Bramini, M., Diaspro, A., Faimali, M. i Falugi, C. (2015) Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal bio-mineralization processes and larval plasticity. *Aquatic Toxicology*, 158, pp.181-191. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.11.014.

Gambardella, C., Ferrando, S., Gatti, A.M., Cataldi, E., Ramoino, P., Aluigi, M.G., Faimali, M., Diaspro, A. i Falugi, C. (2016) 'Review: Morphofunctional and Biochemical Markers of Stress in Sea Urchin Life Stages Exposed to Engineered Nanoparticles', *Environmental Toxicology*, 31(12), pp. 1552–1562. doi:10.1002/tox.22159.

Gambardella, C., Ferrando, S., Gatti, A.M., Cataldi, E., Ramoino, P., Aluigi, M.G., Faimali, M., Diaspro, A. i Falugi, C. (2016) Review: Morphofunctional and biochemical markers of stress in sea urchin life stages exposed to engineered nanoparticles. *Environmental Toxicology*, 31(11), pp.1552-1562. doi: 10.1002/tox.22159.

Gao, K., Xu, J., Gao, G., Li, Y., Hutchins, D. A., Huang, B., Zhang, Y., Yang, Y., Zhou,

Y., i Riebesell, U. (2012) Rising CO₂ and increased light exposure synergistically reduce marine primary productivity. *Nature Climate Change*, 2(8), pp. 519-523. doi: 10.1038/nclimate1556.

Genevière, A.-M., Derelle, E., Escande, M.-L., Grimsley, N., Klopp, C., Ménager, C., Michel, A. i Moreau, H. (2020) Responses to iron oxide and zinc oxide nanoparticles in echinoderm embryos and microalgae: uptake, growth, morphology, and transcriptomic analysis. *Nanotoxicology*, 14(10), pp. 1342–1361. doi: 10.1080/17435390.2020.1827074.

Gharred, T., Ezzine, I.K., Naija, A., Bouali, R.R. i Jebali, J. (2015) Assessment of toxic interactions between deltamethrin and copper on the fertility and developmental events in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 193. doi: 10.1007/s10661-015-4407-8.

Gissi, F., Wang, Z., Batley, G.E., Leung, K.M.Y., Schlekot, C.E., Garman, E.R. i Stauber, J.L. (2020) Deriving a chronic guideline value for nickel in tropical and temperate marine waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(10), pp.2540-2551. doi: 10.1002/etc.4880.

Giudice, G., Casotti, R., i Roccheri, M. C. (2010) Autophagy and its Role in Sea Urchin Embryos During Stress Conditions. *Marine Biology*, 157(3), pp. 531-540, doi: 10.1007/s00227-009-1383-7

Glaviano, F., Ruocco, N., Somma, E., De Rosa, G., Campani, V., Ametrano, P., Caramiello, D., Costantini, M. i Zupo, V. (2021) Two benthic diatoms, *Nanofrustulum shiloi* and *Striatella unipunctata*, encapsulated in alginate beads, influence the reproductive efficiency of *Paracentrotus lividus* by modulating the gene expression. *Marine Drugs*, 19(4), pp. 230. doi: 10.3390/md19040230.

Golding, L.A., Valdivia, M.V., Dam, J.W. van, Batley, G.E. i Apte, S.C. (2022) Toxicity of arsenic(v) to temperate and tropical marine biota and the derivation of chronic marine water quality guideline values. *Environmental Chemistry*, 19(1), pp. 116–131. doi: 10.1071/EN22039.

Gravina, M., Pagano, G., Oral, R., Guida, M., Toscanesi, M., Siciliano, A., Di Nunzio,

A., Burić, P., Lyons, D.M., Thomas, P.J., Vance, T., Becker, K. i Cole, T. (2018) Heavy rare earth elements affect *Sphaerechinus granularis* sea urchin early life stages by multiple toxicity endpoints. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100, pp. 641–646. doi: 10.1007/s00128-018-2309-5.

Gregorin, C., Albarano, L., Somma, E., Costantini, M. i Zupo, V. (2021) Assessing the ecotoxicity of copper and polycyclic aromatic hydrocarbons: Comparison of effects on *Paracentrotus lividus* and *Botryllus schlosseri*, as alternative bioassay methods. *Water*, 13, 711. doi: 10.3390/w13050711.

Guida, M., Pagano, G., Rocca, C.D. i Meriç, S. (2014) Toxicity evolution of alum-coagulated municipal wastewater to sea urchin embryogenesis and fertilization. *Desalination and Water Treatment*, 52(12), pp. 3004–3011. doi: 10.1080/19443994.2013.868830.

Hook, S.E., Strzelecki, J., Adams, M.S., Binet, M.T., McKnight, K., Golding, L.A. i Elsdon, T.S. (2022) The influence of oil-in-water preparations on the toxicity of crude oil to marine invertebrates and fish following short-term pulse and continuous exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(8), pp. 2580–2594. doi: 10.1002/etc.5437.

Hosoya, N., Motomura, K., Tagawa, E., Nagano, M., Ogiwara, C. i Hosoya, H. (2019) Effects of the fungicide ortho-phenylphenol (OPP) on the early development of sea urchin eggs. *Marine Environmental Research*, 143, pp.24-29. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.10.018.

Hwang, J., Suh, S.-S., Chang, M., Yun Park, S., Kwon Ryu, T., Lee, S. i Lee, T.-K. (2014) Effects of triclosan on reproductive parameters and embryonic development of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, pp.148-152. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.029.

Hwang, J., Suh, S.-S., Park, M., Park, S.Y., Lee, S. i Lee, T.-K. (2017) Differential gene expression patterns during embryonic development of sea urchin exposed to triclosan. *Environmental Toxicology*, 32(5), pp.426-433. doi: 10.1002/tox.22246.

Jones, P.D. (2018). Marine pollution and its impact on coastal communities.

Oceanography, 26(2), pp. 45-56. doi: 10.5670/oceanog.2018.219.

Jones, L., Edwards, H., i Roberts, P. (2022) Advancements in genomic methods for environmental toxicity assessment. *Journal of Environmental Science and Health*, 57(7), pp. 763-774. doi: 10.1080/03601234.2022.2048383.

Klein, R.D., Nogueira, L.S., Domingos-Moreira, F.X.V., Gomes Costa, P., Bianchini, A. i Wood, C.M. (2019) Effects of sublethal Cd, Zn, and mixture exposures on antioxidant defense and oxidative stress parameters in early life stages of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Aquatic Toxicology*, 217, 105338. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.105338.

Koehler, A., Gill, S. J., i Mitchelmore, C. L. (2018) Uptake and effects of microplastics in marine organisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(3), pp. 495-511. doi: 10.1002/etc.4104.

Kroh, A. i Mooi, R. (2024) World Echinoidea Database., doi:10.14284/355.

Kukla, S.P., Slobodskova, V.V., Zhuravel, E.V., Mazur, A.A. i Chelomin, V.P. (2022) Exposure of adult sand dollars (*Scaphechinus mirabilis*) (Agassiz, 1864) to copper oxide nanoparticles induces gamete DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(60), pp. 39451–39460. doi: 10.1007/s11356-021-18318-0.

Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N., Bell, J. E., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J. I., Breyse, P. N., Cavanagh, D., Chiles, T., Coffin, R., Corvalán, C., Finkel, A., Gaughan, A., George, C., Gouveia, N., Graber, N., Green, S., Jansen, H. A., Kambal, A., Karagas, M. R., Kuehl, S., Laloo, R., Luby, S., Mathur, P., Matus, C. S., McCluskey, S., Mormede, S., Nascimento, S., Nriagu, J., O'Reilly, D., Osornio-Vargas, A. R., Prüss-Üstün, A., Ramesh, S., Rattan, L., Rehfuess, E., Roberts, A., Rockström, J., Sear, R., Sevcikova, H., Silva, J. R., St. Clair, A., Stein, A., Stow, C., Tiwari, A., Valdes, R., van den Berg, H., Von Schirnding, Y., Wang, M., Wright, R., i Zhong, M. (2018) The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391(10119), pp. 462-512. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32345-0.

Lavtizar, V. i Okamura, H. (2019) Early developmental responses of three sea urchin species to tralopyril and its two degradation products. *Chemosphere*, 229, pp.256-261.

doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.202.

Lawrence, J.M. (2013) *Sea Urchins: Biology and Ecology*. 3rd ed. San Diego: Elsevier.

Lazzara, V., Mauro, M., Celi, M., Cammilleri, G., Vizzini, A., Luparello, C., Bellini, P., Ferrantelli, V. i Vazzana, M. (2022) Effects of sulfamethoxazole on fertilization and embryo development in the *Arbacia lixula* sea urchin. *Animals*, 12, 2483. doi: 10.3390/ani12182483.

Lee, S.R., Pronto, J.R.D., Sarankhuu, B.-E., Ko, K.S., Rhee, B.D., Kim, N., Mishchenko, N.P., Fedoreyev, S.A., Stonik, V.A. i Han, J. (2014) Acetylcholinesterase inhibitory activity of pigment echinochrome A from sea urchin *Scaphechinus mirabilis*. *Marine Drugs*, 12(7), pp.3560-3573. doi: 10.3390/md12063560.

Lewis, C., Ellis, R.P., Vernon, E., Elliot, K., Newbatt, S. i Wilson, R.W. (2016) Ocean acidification increases copper toxicity differentially in two key marine invertebrates with distinct acid-base responses. *Scientific Reports*, 6, pp. 21554. doi: 10.1038/srep21554.

Lister, K.N., Lamare, M.D. i Burritt, D.J. (2015) Pollutant resilience in embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* reflects maternal antioxidant status. *Aquatic Toxicology*, 161, pp.61-72. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.01.031.

Lister, K.N., Lamare, M.D. i Burritt, D.J. (2016) Dietary pollutants induce oxidative stress, altering maternal antioxidant provisioning and reproductive output in the temperate sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Aquatic Toxicology*, 177, pp.106-115. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.05.013.

Magesky, A., Ribeiro, C.A.O. i Pelletier, É. (2016) Physiological effects and cellular responses of metamorphic larvae and juveniles of sea urchin exposed to ionic and nanoparticulate silver. *Aquatic Toxicology*, 174, pp. 208–227. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.02.018.

Magesky, A., de Oliveira Ribeiro, C.A., Beaulieu, L. i Pelletier, É. (2017) Silver nanoparticles and dissolved silver activate contrasting immune responses and stress-induced heat shock protein expression in sea urchin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), pp. 1872–1886. doi: 10.1002/etc.3709.

Maisano, M., Cappello, T., Catanese, E., Vitale, V., Natalotto, A., Giannetto, A., Barreca, D., Brunelli, E., Mauceri, A. i Fasulo, S. (2015) Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay. *Marine Environmental Research*, 111, pp. 121–127. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.05.010.

Maranho, L.A., Garrido-Pérez, M.C., DelValls, T.A. i Martín-Díaz, M.L. (2015) Suitability of standardized acute toxicity tests for marine sediment assessment: pharmaceutical contamination. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, pp. 65. doi: 10.1007/s11270-014-2273-6.

Marčeta, T., Locatello, L., Alban, S., Hassan, M.S.A., Azmi, N.-N.N.M., Finos, L., Badocco, D. i Marin, M.G. (2022) Transgenerational effects and phenotypic plasticity in sperm and larvae of the sea urchin *Paracentrotus lividus* under ocean acidification. *Aquatic Toxicology*, 248, pp. 106208. doi: 10.1016/j.aquatox.2022.106208.

Marques-Santos, L.F., Grassi, G., Bergami, E., Faleri, C., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., Canesi, L. i Corsi, I. (2018) Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype. *Nanotoxicology*, 12(7), pp. 847–867. doi: 10.1080/17435390.2018.1482378.

Martino, C., Costa, C., Roccheri, M.C., Koop, D., Scudiero, R. i Byrne, M. (2018) Gadolinium perturbs expression of skeletogenic genes, calcium uptake and larval development in phylogenetically distant sea urchin species. *Aquatic Toxicology*, 194, pp. 57–66. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.11.004.

Mesarič, T., Sepčić, K., Drobne, D., Makovec, D., Faimali, M., Morgana, S., Falugi, C. i Gambardella, C. (2015) Sperm exposure to carbon-based nanomaterials causes abnormalities in early development of purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Aquatic Toxicology*, 163, pp.158-166. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.04.012.

Mijangos, L., Krauss, M., de Miguel, L., Ziarrusta, H., Olivares, M., Zuloaga, O., Izagirre, U., Schulze, T., Brack, W., Prieto, A., García, M.A., Goti, M., i Gómez, A. (2020) Application of the sea urchin embryo test in toxicity evaluation and effect-directed analysis of wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science &*

Technology, 54(14), 8890–8899. doi: 10.1021/acs.est.0c01504.

Milito, A., Murano, C., Castellano, I., Romano, G. i Palumbo, A. (2020) Antioxidant and immune response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different re-suspension patterns of highly polluted marine sediments. *Marine Environmental Research*, 160, pp. 104978. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.104978.

Morrone, L., Giuliani, S., Pellegrini, D. i Sartori, D. (2018) In situ embryo toxicity test with sea urchin: Development of exposure chamber for test execution. *Chemosphere*, 196, pp.354-360. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.174.

Morrone, L., Gaion, A., Broccoli, A., Ferrari, S., Pellegrini, D. i Sartori, D. (2023) Influence of salinity on copper toxicity in *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* embryos. *Water*, 15(1), pp. 65. doi: 10.3390/w15010065.

Motta, C.M., Cerciello, R., De Bonis, S., Mazzella, V., Cirino, P., Panzuto, R., Ciaravolo, M., Simoniello, P., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., i Avallone, B. (2016) Potential toxicity of improperly discarded exhausted photovoltaic cells. *Environmental Pollution*, 216, pp. 786–792. doi: 10.1016/j.envpol.2016.06.048.

Nogueira, L.S., Domingos-Moreira, F.X.V., Klein, R.D., Bianchini, A. i Wood, C.M. (2021) Influence of environmentally relevant concentrations of Zn, Cd and Ni and their binary mixtures on metal uptake, bioaccumulation and development in larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Aquatic Toxicology*, 230, 105709. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105709.

Oliviero, M., Tato, T., Schiavo, S., Fernández, V., Manzo, S. i Beiras, R. (2019) Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*, 247, pp. 706–715. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.098.

Oral, R., Pagano, G., Siciliano, A., Gravina, M., Palumbo, A., Castellano, I., Migliaccio, O., Thomas, P.J., Guida, M., Tommasi, F., Burić, P., Kaur, P., i Lyons, D.M. (2017) Heavy rare earth elements affect early life stages in *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* sea urchins. *Environmental Research*, 154, 240-246. doi: 10.1016/j.envres.2017.01.011.

- Oral, R., Pagano, G., Siciliano, A., Toscanesi, M., Gravina, M., Di Nunzio, A., Palumbo, A., Thomas, P.J., Tommasi, F., Burić, P., Di Donato, P., Guida, M., Vance, T. i Becker, K. (2019) Soil pollution and toxicity in an area affected by emissions from a bauxite processing plant and a power plant in Gardanne (Southern France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, pp. 55–61. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.122.
- Pagano, G., Thomas, P.J., Di Nola, A., i Trifuoggi, M. (2021) Toxicity of heavy metals on the embryogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Environmental Research*, 164, 105212. doi: 10.1016/j.marenvres.2021.105212.
- Paganos, P., Ullmann, C.V., Gaglio, D., Bonanomi, M., Salmistraro, N., Arnone, M.I. i Jimenez-Guri, E. (2023) Plastic leachate-induced toxicity during sea urchin embryonic development: Insights into the molecular pathways affected by PVC. *Science of The Total Environment*, 864, 160901. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160901.
- Paredes, E. i Bellas, J. (2015) The use of cryopreserved sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) in marine quality assessment. *Chemosphere*, 128, pp.278-283. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.007.
- Parolini, M., Ferrario, C., De Felice, B., Gazzotti, S., Bonasoro, F., Candia Carnevali, M.D., Ortenzi, M.A. i Sugni, M. (2020) Interactive effects between sinking polyethylene terephthalate (PET) microplastics deriving from water bottles and a benthic grazer. *Journal of Hazardous Materials*, 398, pp. 122848. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122848.
- Passarelli, M.C., Cesar, A., Riba, I. i DelValls, T.A. (2017) Comparative evaluation of sea-urchin larval stage sensitivity to ocean acidification. *Chemosphere*, 184, pp. 224–234. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.001.
- Pinsino, A., Matranga, V., i Roccheri, M.C. (2011). Manganese-induced apoptosis in sea urchin embryos. *Metallomics*, 3(11), pp. 1129-1137. doi: 10.1039/C1MT00027B.
- Pyl, M., Taylor, A., Oberhänsli, F., Swarzenski, P., Hussamy, L., Besson, M., Danis, B. i Metian, M. (2022) Size-dependent transfer of microplastics across the intestinal wall of the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Aquatic Toxicology*, 250, pp. 106235. doi: 10.1016/j.aquatox.2022.106235.

Quade, J., López-Ibáñez, S. i Beiras, R. (2022) Mesocosm trials reveal the potential toxic risk of degrading bioplastics to marine life. *Marine Pollution Bulletin*, 179, pp. 113673. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113673.

Resgalla, C., Máximo, M.V., Brasil, M. do N. i Pessatti, M.L. (2018) Colorimetric method for determining viability of sea urchin sperm applied in toxicity tests. *Ecotoxicology*, 27(4), pp. 499–504. doi: 10.1007/s10646-018-1936-2.

Rezg, R., Oral, R., Tez, S., Mornagui, B., Pagano, G. i Trifuoggi, M. (2022) Cytogenetic and developmental toxicity of bisphenol A and bisphenol S in *Arbacia lixula* sea urchin embryos. *Ecotoxicology*, 31(7), pp.1087-1095. doi: 10.1007/s10646-022-02568-w.

Rial, D., Murado, M.A., Beiras, R. i Vázquez, J.A. (2014) Toxicity of four spill-treating agents on bacterial growth and sea urchin embryogenesis. *Chemosphere*, 104, pp. 57–62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.057.

Rial, D., Santos-Echeandía, J., Álvarez-Salgado, X.A., Jordi, A., Tovar-Sánchez, A. i Bellas, J. (2016) Toxicity of seabird guano to sea urchin embryos and interaction with Cu and Pb. *Chemosphere*, 145, pp. 384–393. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.064.

Rial, D., León, V.M. i Bellas, J. (2017) Integrative assessment of coastal marine pollution in the Bay of Santander and the upper Galician Rias. *Journal of Sea Research*, 130, pp. 239–247. doi: 10.1016/j.seares.2017.03.006.

Rial, D., Bellas, J., Vidal-Liñán, L., Santos-Echeandía, J., Campillo, J.A., León, V.M., i Albentosa, M. (2023) Microplastics increase the toxicity of mercury, chlorpyrifos and fluoranthene to mussel and sea urchin embryos. *Environmental Pollution*, 336, 122410. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122410.

Richardson, C.R., Burritt, D.J., Allan, B.J.M. i Lamare, M.D. (2021) Microplastic ingestion induces asymmetry and oxidative stress in larvae of the sea urchin *Pseudechinus huttoni*. *Marine Pollution Bulletin*, 168, pp. 112369. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112369.

Rist, S., Le Du-Carrée, J., Ugwu, K., Intermite, C., Acosta-Dacal, A., Pérez-Luzardo,

O., Zumbado, M., Gómez, M. i Almeda, R. (2023) Toxicity of tire particle leachates on early life stages of keystone sea urchin species. *Environmental Pollution*, 336, 122453. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122453.

Saili, K.S., Cardwell, A.S. i Stubblefield, W.A. (2021) Chronic toxicity of cobalt to marine organisms: Application of a species sensitivity distribution approach to develop international water quality standards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40, pp.1405-1418. doi: 10.1002/etc.4993.

Sarà, G., Lo Martire, M., i Montalto, V. (2011) Effects of microplastics on marine species: A review on their interaction with marine life. *Marine Environmental Research*, 111, pp. 26-35. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.002.

Sartori, D., Scatena, G., Vranceanu, C.A. i Gaion, A. (2023) Increased sensitivity of sea urchin larvae to metal toxicity as a consequence of the past two decades of climate change and ocean acidification in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 194, pp. 115274. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.115274.

Schmidt, C., Krauth, T., i Wagner, S. (2018) Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environmental Science & Technology*, 51(21), pp. 12246-12253. doi: 10.1021/acs.est.8b03403.

Sherman, S., Chen, W., Blewett, T.A., Smith, S., Middleton, E., Garman, E., Schlekot, C. i McGeer, J.C. (2021) Complexation reduces nickel toxicity to purple sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*), a test of biotic ligand principles in seawater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112156. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112156.

Smith, D., Roberts, J., i Green, M. (2015). Toxicity of emerging contaminants to sea urchins. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3), pp. 543-550. doi: 10.1002/etc.2915.

Suckling, C.C. i Richard, J. (2020) Short-term exposure to storm-like scenario microplastic and salinity conditions does not impact adult sea urchin (*Arbacia punctulata*) physiology. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(4), pp. 495–500. doi: 10.1007/s00244-020-00706-1.

Taylor, R., Johnson, A., i Wilson, M. (2022) Reducing animal testing in marine toxicology: The role of alternative methods. *Toxicology Reports*, 9, pp. 123-135. doi: 10.1016/j.toxrep.2022.02.002.

Tellis, M.S., Lauer, M.M., Nadella, S., Bianchini, A. i Wood, C.M. (2014) The effects of copper and nickel on the embryonic life stages of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(4), pp.453-464. doi: 10.1007/s00244-014-0069-8.

Tommasi, F., Lyons, D.M., Pagano, G., Oral, R., Thomas, P.J., Eccles, K.M., Tez, S., Toscanesi, M., Giarra, A., Siciliano, A., Greco, S. i D'Angelo, C. (2023) Geospatial pattern of topsoil pollution and multi-endpoint toxicity in the petrochemical area of Augusta-Priolo (Eastern Sicily, Italy). *Chemosphere*, 333, 138802. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138802.

Torres, T., Cunha, I., Martins, R. i Santos, M.M. (2016) Screening the toxicity of selected personal care products using embryo bioassays: 4-MBC, propylparaben and triclocarban. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1762. doi: 10.3390/ijms17101762.

Trifuoggi, M.; Pagano, G.; Oral, R.; Pavičić-Hamer, D.; Burić, P.; Kovačić, I.; Siciliano, A.; Toscanesi, M.; Thomas, P.J.; Paduano, L.; Guida, M. i Lyons, D.M. (2019) Microplastic-Induced Damage in Early Embryonal Development of Sea Urchin *Sphaerechinus granularis*. *Environmental Research*, 179, 108815. doi:10.1016/j.envres.2019.108815.

USEPA (1991) Earl-Standard Operating Procedure Conducting the Sea Urchin *Arbacia Punctulata* Fertilization Test. Environmental research laboratory, Narragansett, RI, p. 125e131;.

USEPA (2022) Method 1008.0: Sea Urchin, *Arbacia Punctulata*, Fertilization Test; Chronic Toxicity. In Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms; Washington, DC; p. 239e331.

Vethaak, A.D., Hamers, T., Martínez-Gómez, C., Kamstra, J.H., de Weert, J.,

Leonards, P.E.G. i Smedes, F. (2017) Toxicity profiling of marine surface sediments: a case study using rapid screening bioassays of exhaustive total extracts, elutriates and passive sampler extracts. *Marine Environmental Research*, 124, pp. 81–91. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.03.002.

White, G., Black, H., i Gray, N. (2020a) Environmental Indicators in Marine Biology: Sea Urchins as a Model. *Ecological Indicators*, 110, pp. 105872. doi: 10.1016/j.ecolind.2019.105872.

White, K. N., Scott, A. P., Verhaegen, Y., i D'Angelo, L. (2020b) The role of sea urchins in marine ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 215, 105300. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.105300.

WoRMS Editorial Board (2024) World Register of Marine Species. Dostupno na <https://www.marinespecies.org> u VLIZ. Pristupljeno 2024-08-30. doi:10.14284/170

Wu, B., Torres-Duarte, C., Cole, B.J. i 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 & Technology*, 49(10), pp. 5760–5770. doi: 10.1021/acs.est.5b00345.

Wynne, J., LaDouceur, E.E.B. i Ryan, H. (2015) Clinical copper toxicosis in a large mixed group of marine invertebrates. *Zoological Association of Metropolitan Detroit*, 46, pp.601-604. doi: 10.1638/2014-0153.1.

Zhan, Y., Hu, W., Zhang, W., Liu, M., Duan, L., Huang, X., Chang, Y. i Li, C. (2016) The impact of CO₂-driven ocean acidification on early development and calcification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1–2), pp. 291–302. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.003.

8. SAŽETAK

Toksičnost kemikalija i zagađivala postaje sve relevantnija zbog rastućih globalnih ekoloških problema, poput zagađenja mora i klimatskih promjena. Ježinci (Echinoidea) su u posljednjem desetljeću postali jedan od najčešće korištenih modelnih organizmi u ekotoksikološkim studijama zbog njihove osjetljivosti na zagađivala i jednostavnosti uzgoja u laboratorijskim uvjetima. Ovaj rad analizira prostornu i vremensku distribuciju istraživanja toksičnosti na morskim ježincima u razdoblju od 2014. do 2023. godine. Pretragom Scopus baze podataka identificirano je 209 relevantnih znanstvenih radova koji se bave ovom tematikom. Rezultati pokazuju da je Europa vodeći kontinent po broju provedenih studija, s Italijom i Španjolskom kao najaktivnijim zemljama, dok se ježinac *Paracentrotus lividus* ističe kao najčešće korištena vrsta, prisutna u 55 % analiziranih studija. Istraživanja su obuhvatila širok spektar zagađivala, uključujući teške metale, mikroplastiku, farmaceutske proizvode, te nanočestice, od kojih su metali najzastupljenija skupina. Studije su također pokazale značajan interes za kombinirane učinke više zagađivala, što ukazuje na sve veću zabrinutost zbog složenih interakcija unutar morskih ekosustava. Najčešće korištene metode uključuju embriotoksičnost, genotoksičnost i testove oksidativnog stresa. Ova istraživanja pružaju ključne uvide u utjecaj zagađivala na rani razvoj morskih organizama, kao i na dugoročne ekološke posljedice. Zaključci ovog rada naglašavaju važnost nastavka istraživanja toksičnosti na morskim ježincima, ne samo zbog njihovog doprinosa razumijevanju ekoloških rizika, već i zbog njihove uloge u oblikovanju strategija zaštite morskih ekosustava. Ovi nalazi mogu poslužiti kao temelj za buduća istraživanja koja će se baviti ispitivanjem novih zagađivala i njihovim kumulativnim učincima na morske organizme i ekosustave.

Ključne riječi: ježinci, toksičnost, zagađivala mora, eksperiment embrionalnog razvoja ježinca

9. ABSTRACT

The toxicity of chemicals and pollutants is becoming increasingly relevant due to growing global environmental problems, such as marine pollution and climate change. In the last decade, sea urchins (Echinoidea) have become often used model organisms in ecotoxicological studies due to their sensitivity to pollutants and ease of rearing in laboratory conditions. This paper analyzes the spatial and temporal distribution of toxicity research on sea urchins in the period from 2014 to 2023. A search of the Scopus database identified 209 relevant scientific papers dealing with this topic. The results show that it is the leading continent in Europe in terms of the number of conducted studies, with Italy and Spain as the most active countries, while the sea urchin *Paracentrotus lividus* stands out as the most frequently used species, present in 55% of the analyzed studies. The research covered a wide range of pollutants, including heavy metals, microplastics, pharmaceutical products, and nanoparticles, of which metals were the most represented group. Studies have also shown considerable interest in the combined effects of multiple pollutants, indicating increasing concern about the complex interactions within marine ecosystems. The most commonly used methods include embryotoxicity, genotoxicity and oxidative stress tests. These studies provide key insights into the impact of pollutants on the early development of marine organisms, as well as long-term ecological consequences. The conclusions of this work emphasize the importance of continuing toxicity research on sea urchins, not only because of their contribution to the understanding of ecological risks, but also because of their role in shaping strategies for the protection of marine ecosystems. These findings can serve as a foundation for future research that will address new pollutants and their cumulative effects on marine organisms and ecosystems.

Key words: sea urchin, toxicity, marine pollutants, sea urchin embryo development test