

## Kako znanost i visoko obrazovanje može pridonijeti zaštiti okoliša – naš primjer

Zlatko Kniewald<sup>1,2</sup>, Jasna Kniewald<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

<sup>2</sup>Akademija tehničkih znanosti Hrvatske, Odjel bioprocesnog inženjerstva, Kačićeva 28, 10000 Zagreb

**Sažetak:** Nalazimo se pred relativno teškim zadatkom, jer današnja potreba zaštite okoliša proizlazi iz posljedica koje su izazvali inženjeri razvitkom novih tehnoloških procesa. Bio je to rezultat želje za proizvodnjom materijalnih dobara svih mogućih proizvoda, procesa ili događaja. Faza industrijske revolucije nije dovoljno vodila računa da je zemaljska kugla zatvoreni sustav koji ima svoju prirodnu ravnotežu u zemlji, vodi i zraku i da se ona ne može i ne smije poremetiti. Istovremeno je (prema Population Reference Bureau i UN) broj stanovništva početkom nove ere iznosio oko 250 milijuna, 2012. godine 7 milijardi, a predviđanja za 2054. godinu su 9 milijardi.

To je nažalost za demografe samo statistika na koju trebaju ukazivati, a potrebno je rješavati nadolazeće izazove s kojima se susreću inženjeri svih struka i čovječanstvo u cijelosti. Naime, sve novo što nas danas okružuje rezultat je tehnološke proizvodnje i zasluga je rada inženjera svih struka. Da bi inženjeri nešto mogli proizvesti, potrebna su prethodna temeljna i primjenjiva (ne primijenjena, jer se tu nema što istraživati) istraživanja. Nažalost, danas, više nego ikada ranije, inženjeri moraju činiti izvanredne napore da pokušaju zaustaviti svoje ranije ostvarene „uspjehe“, ali i negativne učinke po okoliš i pokušaju vratiti ravnotežu na zemlji kao što je bila prije početka prve tehnološke revolucije. Učestali ratovi dodatno uništavaju ono što je pozitivno učinjeno u tehnološkom razvitku i vraćaju stanje na Zemlji svakim danom unazad. Lijepo je razmišljati o naseljavanju Marsa s nekoliko desetina ili stotina ljudi, ali kako u narednih 30-tak godina osigurati dovoljno vode, hrane i prostora na Zemlji za predviđenu populaciju stanovništva.

**Ključne riječi:** Reproductivni sustav sisavaca, Endokrini disruptori, Herbicidi, Zaštita okoliša

## 1. Uvod

Svaki prehrambeni proizvod koristan je organizmu u određenoj količini, ali on može biti štetan u prekomjernom konzumiranju zbog pretilosti i svih pratećih bolesti pa je to dodatna obveza liječnika. Liječnici danas nisu u mogućnosti pratiti suvremena dostignuća u medicini i primjenu novih biotehnoški proizvedenih lijekova i cjepiva bez suradnje inženjera i nove opreme i suvremenih lijekove za potrebe pacijenata. Ovdje treba napomenuti da je sofisticirana tehnologija omogućila dijagnostiku mnogih rijetkih bolesti koji se danas mogu uspješno liječiti, ali uz vrlo visoke troškove.

Zbog povećane populacije na svijetu, dolazi do većih potreba proizvodnje hrane, energije i materijalnih dobara za veći standard čovječanstva. Dolazi nažalost i do sukoba pojedinih tehnoloških divova, sukoba religija ili sukoba političkih ideologija koje uništavaju sve ono što su inženjeri proizveli, ali čiji ostaci ozbiljno mogu i dalje ugrožavati život preostalog čovječanstva (npr. atomska bomba, pesticidi, klimatske promjene, El Nino).

Zbog svega navedenoga, ali i mnogo drugih budućih tehnologija koje razvijaju inženjeri, tema Godišnjaka HATZ za 2023. godinu je jedan od ozbiljnih izazova za sve njezine članice i članove i ne bi trebala biti samo još jedna knjiga na polici HATZ godišnjaka. Ona bi trebala biti poticaj Upravi HATZ da po njezinom izdavanju održi, zajedno sa svim relevantnim strukturama u Hrvatskoj, raspravu o njezinom sadržaju, jer kako se kaže da „krenemo s riječi na djela, ali u kojem pravcu“.

S autorima ovoga rada najbolje je upoznati se na početku, pa prenosim natuknice objavljene u Hrvatskoj tehničkoj enciklopediji vol. 2. objavljenoj 2023. godine:



**Kniewald, Zlatko** (Zagreb, 2. VI. 1938.),  
biotehnoški inženjer, stručnjak za tehnologiju životinjskih i biljnih stanica.

Na Biotehnoškome odjelu Tehnološkoga fakulteta u Zagrebu diplomirao je 1961. i doktorirao 1970. disertacijom *Studija neuroendokrinih odnosa – primjena suvremenih metoda za objašnjenje mehanizama djelovanja steroidnih hormona* (mentor L. Martini, Milano, Italija). Radio je kao voditelj istraživačke jedinice u Tvornici kvasca i špirita Žumberak u Savskom Marofu od 1961.

Bio je od 1972. asistent i samostalni istraživač u Laboratoriju za eksperimentalnu medicinu pri bolnici Dr. Mladen Stojanović u Zagrebu. Od iste je godine savjetnik pri Republičkom savjetu za naučni rad SRH, te od 1975. tajnik skupštine Republičke zajednice za znanstveni rad SRH. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu (PBF) zaposlen je od 1980., a od 1987. kao redoviti profesor. Predavao je kolegije Tehnologija vitamina i hormona, Tehnologija životinjskih i biljnih stanica, Biotehnološka proizvodnja lijekova i specifičnih kemikalija i dr. Bio je 1979–80. direktor Prehrambeno-tehnološkog instituta i jedan od utemeljitelja PBF-a, osnivač i pročelnik Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije 1987–2007. te predstojnik Zavoda za biokemijsko inženjerstvo 1995–99. Utemeljitelj je Biotehničkog fakulteta u Bihaću, BIH 2000. Umirovljen je 2008.

Područja su njegova znanstvenoga i stručnoga interesa tehnologija kulture stanica te unutarstanično izlučivanje i regulacija endokrinih žlijezda, kao i znanstvena politika i zaštita intelektualnoga vlasništva. Među ostalim, autor je udžbenika *Vitamini i hormoni – proizvodnja i primjena* (1992) i *Priručnika za pripravu i izolaciju biološki djelatnih supstancija* (2000). Bio je pokretač edicije *Current Studies of Biotechnology* (1999). Pokrenuo je Smotru Sveučilišta u Zagrebu (1997). Bio je predsjednik Odbora za znanstveno-tehnološku suradnju SFRJ i SAD 1983–87. Suosnivač je više strukovnih udruženja, među kojima i Hrvatskog društva za biotehnologiju, kojega je (1996–2000) bio predsjednik te Biotehničke zaklade (1996), koje je bio upravitelj (1996–2005). Od 1998. član je HATZ-a, predsjednik (2003–09), osnivač i voditelj Biotehnološkoga centra (2003–13). Počasni je član zaklade World Innovation Foundation od 2004. Dobitnik je Nagrade “Ruđer Bošković” (1986) te Nagrade za životno djelo HATZ-a “Moć znanja” (2015). Od 2009. nositelj je zvanja professor emeritus Sveučilišta u Zagrebu.

*Autor: Uredništvo Hrv. Tehn. Enciklop. Vol. 2.; Objavljeno: 26. srpnja 2019.; Ažurirano: 6. lipnja 2022.*



\***Kniewald, Jasna** (Zagreb, 24. VI.1938 – Zagreb, 7. II. 2018), biotehnološka inženjerka, stručnjakinja za toksikologiju.

Na Biotehnološkom odjelu Tehnološkoga fakulteta u Zagrebu diplomirala je 1962. te doktorirala 1965. disertacijom *Kinetika adicije halogena i halogenovodičnih kiselina*

na nezasićene organske kiseline, praćena pomoću redoksokinetičkog efekta (mentori T. Marković i P. Mildner). Znanstveno se usavršavala u Farmakološkom institutu Mario Negri u Milanu 1969–70. Na Zagrebačkom sveučilištu od 1962. radila je u Institutu za fizikalnu kemiju, a od 1975. na Tehnološkome fakultetu odnosno na PBF-u od 1979., gdje je od 1988. bila redovita profesorica.

Predavala je kolegije Toksikologija hrane, Osnove toksikologije, Toksikološki aspekti pripreme hrane, Metodika znanstvenog rada i Zaštita intelektualnog vlasništva. Osnovala je Laboratorij za toksikologiju (1988) kojega je bila pročelnica do umirovljenja 2008. Bavila se toksikologijom hrane i ekotoksikologijom, posebice toksikološkim učincima pesticida na reprodukciju, toksikokinetikom i toksikodinamikom postojećih organskih spojeva te toksičnim učincima endokrino moduliranih spojeva.

Bila je 1985–94. voditeljica dvaju međunarodnih projekata u suradnji s Ministarstvom poljoprivrede SAD-a, za realizaciju kojih je primila više priznanja. Autorica je udžbenika *Metodika znanstvenog rada* (1993). Bila je članica predsjedništva Hrvatskoga biokemijskog društva (1981–95) i Hrvatskoga toksikološkog društva (1992–2007). Članica je HATZ-a od 1994. te dobitnica Medalje Akademije za 2015.

*Autor: Uredništvo Hrv. Tehn. Enciklop. Vol. 2.; Objavljeno: 4. listopada 2019.; Ažurirano: 6. lipnja 2022.*

U daljnjem tekstu prenosim dio istraživanja oboje autora na problematici zaštite okoliša s posebnim osvrtom učinka onečišćivača okoliša na reproduktivni sustav sisavaca, ptica i morskog eko sustava te posljedica koje izazivaju.

1965. godine osnovan je u Bolnici “Dr. Mladen Stojanović” (danas KB “Sestre milosrdnice”) Laboratorij za eksperimentalnu medicinu (LEM) pod vodstvom prof. dr. sc. Stevana Milkovića, profesora farmakologije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine sam zaposlen u LEM kao asistent i počeo radom na opremanju Laboratorija za plinsku kromatografiju s ECD (engl. *electron capture detector*). 1966. godine magistrirao sam na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu poslijediplomski studij Fizikalne metode u analitičkoj kemiji. Magistarski rad radio sam na Institutu “Ruđer Bošković” pod vodstvom dr. sc. Zvonimira Pučara. Tema je bila „Utjecaj visokih koncentracija nekih elektrolita na elektroforetsku pokretljivost  $\text{Na}^{22}$ ,  $\text{Sr}^{90}$  i  $\text{Cl}^{36}$  iona“. Rezultati rada su objavljeni u radu:

*Electrophoretic mobilities of  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{90}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  ions in concentrated aqueous solutions of some inorganic 1:1, 2:1, 1:2 and 2:2 salts and in sea water [1].*

U radu je istraživana pokretljivost navedenih radionuklida u otopinama anorganskih soli i u morskoj vodi zbog onečišćenja okoliša. Istraživanja su provedena visokonaponskom elektroforezom navedenih radionuklida.

1968. godine dobio sam stipendiju Ford-ove fundacije za usavršavanje na Institutu za farmakologiju Sveučilišta u Milanu u grupi Prof. Dr.sc. Luciana Martinija.

U isto vrijeme Jasna Kniewald je dobila postdoktorsku stipendiju u Institutu za farmakološka istraživanja „Mario Negri“ u Milanu. Istraživala je kinetiku nakupljanja i eliminacije fenobarbiturata i difenilhidantoina u masnom tkivu.

*Relationship between lipolysis and storage of phenobarbital in adipose tissue* [2].

*Relationship between lipolysis and storage of diphenylhydantoin in adipose tissue* [3].

Ova istraživanja poslužila su joj kasnije za nastavak toksikoloških istraživanja na Zavodu za biokemiju PBF-a i njezino formiranje u međunarodno priznato toksikologinju i sveučilišnu profesoricu.

Naša istraživanja tijekom cjeloživotnog rada podijelio bih u tri osnovna dijela koji će obuhvatiti samo one znanstvene radove koji su u neposrednoj svezi s područjem navedenim na početku ovoga rada.

1. Istraživanje temeljnih fizioloških procesa u organizmima na kopnu i u vodi,
2. Primjenu novih istraživačkih postupaka i njihovu prilagodbu potrebama istraživačkih programa u tijeku,
3. Odabir najčešće primjenjivanih kemikalija (herbicida) u okolišu i ukazivanje na njihovu toksičnost za ljude, životinje i okoliš.

## Ad 1.

Tijekom boravka u Milanu, pored dogovorenoga organiziranja Laboratorija za plinsku kromatografiju s ECD poput našega u LEM-u u Zagrebu, započeo sam rad na istraživanju reproduktivnog sustava u pokusnim životinjama (štakorima) primjenom radioaktivno obilježenih spojeva. Već ranije bila je poznata biosinteza testosterona u Leydigovim stanicama u testisima koja započinje iz molekule kolesterola. Kemijsku sintezu androgenih hormona otkrio je 1933.-34. dobitnik Nobelove nagrade L. Ružička. Međutim, do tada se smatralo, da je testosteron muški spolni hormon odgovoran za androgena svojstva u mužjaka, uključujući i spermatogenezu. Tijekom rada u Milanu, došao sam do saznanja, zbog kojega sam gotovo ostao bez Ford-ove stipendije. Naime, tijekom istraživanja metabolizma  $C^{14}$  obilježene molekule testosterona (*steroidni hormon s androgenim djelovanjem u mužjaka sisavaca*) utvrdio sam da bi aktivan oblik testosterona morao biti dihidrotestosteron, koji nastaje iz testosterona pod djelovanjem enzima  $5\alpha$ -reduktaze. Kada sam te svoje rezultate prikazao na dnevnim sastancima u laboratoriju, Prof. L. Martini mi je doslovce rekao: „dragi Zlatko ove rezultate možeš pokazati pijancima u baru, ali ne u mojem Laboratoriju“.

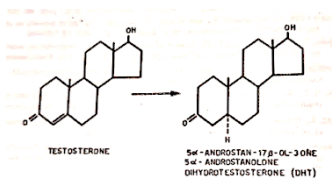


Figure 27.1. Conversion of testosterone into its "active metabolite."

Slika 1: Objavljeno u [4]

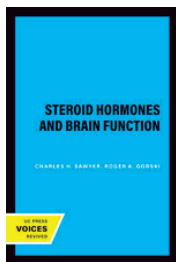
Ja sam odgovorio, rezultati su provjereni i mogu ih ponoviti. U to vrijeme održavao se znanstveni skup članica NATO-a na kojem je Prof. L. Martini, trebao prikazati rezultate istraživanja svoje velike međunarodne istraživačke skupine. Bilo nas je 19 istraživača iz 14 zemalja. Iz bivše SFRJ bili smo Irena Simonović iz Novog Sada i ja iz Zagreba. Moji rezultati nisu bili uključeni u prezentaciju na tom skupu. Nastavio sam sa započetim istraživanjima i višekratnim ponavljanjem dobio identične rezultate. Konačno na konferenciji u Los Angelesu 24.-27. svibnja 1970. Prof. L. Martini, održao je predavanje objavljeno u Zborniku radova:

*Feedback mechanisms and the control of the hypothalamo-hypophyseal complex* [4].

Na tom predavanju i u Zborniku radova objavljena je informacija o dihidrotestosteronu (DHT) kao aktivnom obliku testosterona (Slika 1).

Prof. C.H. Sawyer, jedan od urednika i plenarni predavač na toj Konferenciji u svojem uvodnom radu napisao je:

*“What are the fundamental principles of neuroendocrinology? Assume the neuron to be a representative neuroendocrine cell. Essentially by definition it must terminate in the median eminence (ME)(dio bazalnog hipotalamusa op. aut.) in association with portal vessels where it releases its neurosecretory product. This cell is greatly influenced by the environment, and may respond directly to neural input from the external environment, or indirectly through an induced change in the chemical internal environment. Neural input emanating from the internal environment can also influence this cell. In response to this varied input the neuroendocrine cell changes its secretion of releasing (or inhibiting) different important neuroendocrine processes.” (op. aut. U ovoj poruci jasno je navedeno da na neuroendokrine stanice djeluju endogeni, ali da mogu djelovati i egzogeni činitelji. Zbog specifičnosti terminologije prijevod prepuštam čitatelju.)*



**Slika 2:** Naslovnica knjige Steroid Hormones and Brain Function, 2023

Upravo u vrijeme pisanja ovog rada, stigla je putem baze ResearchGate informacija:

NOVEMBER 2023

Steroid Hormones and Brain Function

CHARLES H. SAWYER, ROGER A. GORSKI (Eds)

Copyright Date: 1971

Edition: DGO - Digital original, 1

Published by: [University of California Press](https://www.ucpress.edu/)

<https://doi.org/10.2307/jj.8501536>

<https://www.jstor.org/stable/jj.8501536>

Search for reviews of this book

## Description

### Steroid Hormones and Brain Function

This title is part of UC Press’s Voices Revived program, which commemorates University of California Press’s mission to seek out and cultivate the brightest minds and give them voice, reach, and impact. Drawing on a backlist dating to 1893, Voices Revived makes high-quality, peer-reviewed scholarship accessible once again using print-on-demand technology. This title was originally published in 1971.

EISBN

978-0-520-31862-5

Izvod iz sadržaja knjige:

*27. FEEDBACK MECHANISMS AND THE CONTROL OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAL COMPLEX*

(pp. 289-300)

Z. KNI EWALD,, R. MASSA, M. MOTTA and L. MARTINI,

<https://doi.org/10.2307/jj.8501536.56>

<https://www.jstor.org/stable/jj.8501536.56>

Ovo je rijetki i neuobičajen pokazatelj, da se poslije 52 godine ocijeni, da rezultati objavljeni u ovom djelu zavrjeđuju da se znanstvenici u svijetu ponovno obavijeste o znanstvenim rezultatima od kojih su mnogi promijenili dotadašnje znanstvene spoznaje.

1971. Prof. Luciano Martini, bio je član komisije za obranu moje doktorske disertacije “Studija neuroendokrinih odnosa – primjena suvremenih metoda za objašnjenje mehanizama djelovanja steroidnih hormona” koja je održana na Tehnološkom fakultetu – Biotehnološkom odjelu Sveučilišta u Zagrebu 21. siječnja 1971. Tada sam postao doktor biotehnoloških znanosti. Od tada pa do danas, Laboratorij u Milanu istražuje mehanizme djelovanja enzima 5 $\alpha$ -reduktaze na pregradnju testosterona u 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron i njegov učinak na mehanizam povratne sprege hipotalamus-hipofiza-gonade u sisavaca. Učinak testosterona, koji u organizmu cirkulira putem krvi, moguć je jedino ako se prethodno izvrši pregradnja molekule testosterona u 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron, veže za specifične receptore na/u stanicu i potom u jezgri stanice izazove biološki učinak.

Za postignute rezultate tijekom stipendije u Milanu, dobio sam od Ford-ove fondacije istraživački grant za istraživanja u području reproduktivne biologije i obrazovanje mladih istraživača u Zagrebu. Grant (No.720-0440) u iznosu od 256.000 USA \$ od 1972. – 1979. je u potpunosti namjenski utrošen.

Poslije povratka u Zagreb 1970. nastavio sam rad kao asistent u LEM-u, ali radio sam i u Milanu do 1972. na obradi i objavljivanju započelih istraživanja.

*Conversion of testosterone into 5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one at the anterior pituitary and hypothalamic level [5].*

*Studies on the biosynthesis of testosterone in the rat [6].*



*The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and anterior pituitary [7].*

Zahvaljujući sredstvima Ford-ove fondacije nabavljena je u LEM-u oprema za rad s radionuklidima, a u Institutu za medicinska istraživanja završio sam dodatno osposobljavanje za rad i zaštitu pri radu s radioaktivno obilježenim spojevima. Ovdje bih želio napomenuti da tijekom izrade magistarskog rada na Institutu Ruđer Bošković, nisam dobio nikakvo obrazovanje ili upozorenje o radu s  $\gamma$ -emiterima, nego sam koristio znanje stečeno tijekom služenja vojnog roka kao ročnik u ABH jedinici bivše JNA. Eto, nije sve bilo baš uzaludno.

Predavanja o postignutim rezultatima istraživanja održao sam na Third International Congress on hormonal steroids, Hamburg, Njemačka (1970), IV<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Washington, SAD (1972), 6<sup>th</sup> Congress of the Hungarian Society Endocrinology and Metabolism, Pecs, Mađarska (1973), Fourth International Congress on Hormonal Steroids, Mexico City, Meksiko (197.), 5<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids, New Delhi, Indija (1978), 6<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Melbourne, Australija, (1980) i Workshop on Metabolism of Hormonal Steroids in the Neuroendocrine Structures, Carmel, Kalifornija, SAD (uvodno predavanje 1983).

U to vrijeme pokusi su se provodili na pokusnim životinjama (npr. štakori soja Fischer ili Wistar) i na tkivnim naresecima pojedinih organa životinja u pokusu i kontrolne (ne tretirane) skupine koji reguliraju gonadotropni mehanizam povratne sprege u organizmu sisavaca (*feedback mechanism*) i to: bazalni hipotalamus (*eminentia mediana*), prednji režanj hipofize, gonade (testisi, prostata). Istovremeno je bilo potrebno slijediti i put biokemijske sinteze testosterona u testisima, kao i metabolizam testosterona i drugih steroidnih hormona u kori nadbubrežne žlijezde (*adrenal cortex*).

Tijekom rada uvodili smo i rabili niz novih i postojećih metoda čiju primjenu je bilo potrebno ispitati na novim biološkim uzorcima. U LEM-u je uspostavljena animalna jedinica za do 800 pokusnih životinja (štakora soja Fisher) koji su živjeli i razmnožavali se u kontroliranim uvjetima svijetla, temperature i vlažnosti. Svi procesi u animalnoj jedinici bili su strogo nadzirani i o njima su se prema uputama za takve jedinice vodili protokoli. Istovremeno je osposobljen zaseban Laboratorij za rad s radioaktivno obilježenim spojevima ( $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$ ) koji je bio registriran u suglasju sa svim važećim propisima i sve osoblje podučeno i prema propisima praćeno dozimetrima na moguću izloženost prekomjernom radioaktivnom zračenju. U eksperimentima su sudjelovali diplomandi, poslijediplomandi i doktorandi Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od kojih su neki kasnije nastavili svoj rad kao nastavnici na istom fakultetu. Za potrebe Laboratorija unutar LEM nabavljen je *Liquid Scintillation Counter* (tekućinski scintilacijski brojač) i metaboličke tresilice uz ostalu prateću laboratorijsku opremu. U središtu znanstvenog interesa bila su *in vivo* istra-

živanja s operativnim zahvatima (adrenalektomija, gonadoktomija, hipofizektomija) i njihovog tretmana da bi se njihova tkiva ispitivala u *in vitro* pokusima. *In vitro* postupak se temeljio na inkubaciji tkiva u hranjivom mediju, kontroliranoj atmosferi i temperaturi uz dodatak  $^{14}\text{C}$ -4-testosterona. Ekstrakcijom medija organskim otapalom i uparavanjem istoga, dobiven je uzorak koji je poslije kromatografije na tankom sloju i autoradiografije određen kvantitativno u *Liquid Scintillation* brojaču. U suradnji s liječnicima pojedine patogene promjene kod pacijenata provjeravane su *in vivo* i *in vitro* na pokusnim životinjama.

*Ethinodiene 0.5 as an oral estrogenic, progestagenic, anticoncipiens – Clinical observations, secretion of pregnanediol, FSH and LH during therapy* [8].

*Effects of coincubation of the pituitary and hypothalamus of intact and castrate male rats and the influence of LH-RH on pituitary 5 $\alpha$ -reductase activity* [9].

*The effects of ovariectomy and adrenalectomy on the 5 $\alpha$ -reduction of testosterone and corticosterone by female rat tissue in vitro* [10].

*Induction der ovulation durch synthetisches LH-RH nach erfolgloser stimulation mit Clomid* [11].

*Ethinodiene anticoncezionale orale estro-progestinico* [12].

*Pituitary-ovarian relationship during pregnancy of rat* [13].

*Ispitivanje gonadotropnog integriteta hipofize sintetskim LH-RH, u žena sa sekundarnom amenorejom* [14].

*Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino acids into rat hypothalamus* [15].

*Mode of androgen action at male and female calf pituitary level* [16].

*Androgen metabolism in neuroendocrine organs of different species* [17].

*Klinički i endokrinološki aspekt insuficijencije žutog tijela u ranim spontanim pobačajima* [18].

*Androgen hydroxysteroid dehydrogenases under the influence of pyridoxine derivatives* [19].

*Influence of ethynodiol diacetate on the formation of A-homo-3-oxa-5 $\alpha$ -pregnane-4,20-dione in female rats* [20].

*The effect of new growth promoter CABRPP on biomass production of BHK-21[C13] cells* [21].

*Induction and detection of apoptosis in BHK21-[C13] cells* [22].

## Ad 2.

Slijede radovi u kojima su opisane metode i njihove prilagodbe, da bi ih se moglo primijeniti i dolaziti do novih znanstvenih rezultata i zaključaka o biološkom djelovanju endogenih spojeva ili spojeva iz okoliša na ključne reproduktivne procese u sisavaca.

Plinska kromatografija i kromatografija na tankom sloju, kao rutinske metode primijenjene su na biološkim uzorcima uz primjenu autoradiografije (kada su u primjeni bili markirani ( $^{14}\text{C}$  obilježeni) spojevi).

*Gas chromatographic determination of plasma testosterone* [23].

*Identifikacija metabolita testosterona nakon inkubacije s tkivom centralnog živčanog sustava (CŽS) u štakora pomoću kromatografije na tankom sloju i plinske kromatografije* [24].

Da bi se moglo odrediti koncentraciju progesterona potrebno je bilo provesti određene predradnje u cilju uklanjanja *20 $\alpha$ -hydroxyprogesterona* (*20 $\alpha$ -OHP*) iz uzoraka plazme. Acetiliranjem hidroksilne skupine *20 $\alpha$ -hydroxyprogesterona*, smanjena je njegova sposobnost vezanja na transkortin na samo 1% u odnosu na molekulu progesterona. Na taj način bilo je moguće ukloniti njegovu prisutnost prilikom određivanja progesterona pomoću *competitive protein binding* metode. Tijekom rada korištene su radioaktivno obilježene molekule kortikosterona, progesterona i *20 $\alpha$ -hydroxyprogesterona* za ispitivanje uzoraka plazme ženki štakora u proestrus i estrus fazi i plazme žena u prvom, drugom i trećem dijelu menstrualnog ciklusa. Ovom prilagodbom bilo je moguće analizirati veliki broj uzoraka u mnogo kraćem razdoblju i značajno jeftinije.

*A simple competitive protein binding method for determination of progesterone in the rat plasma* [25].

Prilikom primjene gotovih ploča za kromatografiju na tankom sloju (TLC) utvrdili smo da je biološke molekule osjetljive na oksidativnu razgradnju nepouzdana kvantitativno istraživati tom tehnikom. Stoga smo pripremili u laboratoriju TLC ploče kojima smo u sloj dodali kao antioksidans askorbinsku kiselinu (C-vitamin). Oksidativna razgradnja askorbinske kiseline spriječila je razgradnju molekula koje su osjetljive na oksidativnu razgradnju poput kortikosteroida.

*Ascorbic acid as an antioxidant in thin layer chromatography of corticosteroids* [26].

Kratko vrijeme poslije objavljivanja ovog rada i najveći proizvođač ploča za TLC u Europi, počeo je proizvodnju ploča s antioksidativnim učinkom. Jasno bez ikakve autorske naknade, jer objavljeni znanstveni radovi ne podliježu zakonu o zaštiti intelektualnog vlasništva (IPR). Ova napomena bi trebala biti upozorenje i našim nadležnim

tijelima da se pored inzistiranja na broju radova referiranih u *Web of Science* (WOS) pri unapređenju u viša zvanja, prethodno uvedu u ustanove u STEM područjima tijela koja bi dala suglasnost za objavu nekih istraživanja koja mogu, ako se primjene, pridonijeti gospodarstvu RH i trebaju biti zaštićena kao autorsko vlasništvo.

*Intelektualno vlasništvo i uloga Sveučilišta* [27].

*Importance of intellectual property rights protection in Croatia – education and the role of the Croatian Academy of Engineering* [28].

Primjena mikrokalorimetrije i nabavka novog LKB Mikrokalorimetra na Zavodu za biokemiju PBF otvorila je novo područje pri istraživanju mogućnosti vezanja hormona za proteine (visoko specifične receptore). Entalpiju vezivanja moguće je bilo pratiti u zatvorenoj ćeliji ili u protočnoj ćeliji, kada miješanjem reaktanata dolazi do mikrotermičkih promjena u reakciji. Ispitane su promjene koje nastaju pri dodavanju pojedinih inhibitora ili aktivatora procesa bitnih u metabolizmu ljudi i životinja.

*Thermochemistry of fumarase-inhibitor binding* [29].

*A new approach to the study of hormone-protein interaction using the microcalorimetric method* [30].

*Binding of testosterone, dihydrotestosterone and progesterone to rat prostate cytosol – Application of microcalorimetry* [31].

*Calorimetric study of inhibitors binding to fumarase under physiological conditions* [32].

*Calorimetric approach to the study of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and estradiol receptors in rat hypothalamus cytosol* [33].

*Calorimetric study of ligand binding to fumarase* [34].

*Application of flow microcalorimetry in studies of biooxidation by means of mixed culture* [35].

Autoradiografija koja se provodila poslije kromatografije na tankom sloju, pri radu s markiranim spojevima, pokazala se kao vrlo pouzdana metoda za praćenje aktivnosti pojedinih enzima u nazočnosti kojih dolazi do metaboličkih promjena u ciljnim tkivima sisavaca i ptica. Istraživanja su provedena na pokusnim životinjama ženki sisavaca koje su tretirane tijekom graviditeta. Cilj je bio utvrditi promjene u potomstvu (broj, težina, spol) kod potomstva, ako su majka ili otac ili oboje bili podvrgnuti djelovanju nekih egzogenih spojeva prije oplodnje ili samo ženke tijekom graviditeta.

*Maintenance of the plasma corticosterone concentration of adrenalectomized rat by the fetal adrenal glands* [36].

*An in vitro study of sex hormones metabolism in the pituitaries and gonads of neonatal and young rats, -the effects of prenatal reduction of litter size [37].*

Prvijenac u našim istraživanjima bilo je istraživanje monoslojne kulture kardiomiocita izoliranih iz srca 2 dana starih štakora i uspostavljanje monoslojne stanične kulture. Provedeno je oživljavanje pojedinačnih stanica izoliranih iz tkiva srčanog mišića. Poslije prihvaćanja stanica za podlogu i uspostavljanja stanične kulture, stanice su poslije 48 h daljnje inkubacije počele pojedinačno pulsirati, ali različitim ritmom. Daljnjim razvitkom monoslojne kulture došlo je do povezivanja stanica i nastanka strukture tkiva gdje jednolično pulsiraju kao srčani mišić, što je osnova za razvitak tkiva srca. Dodatkom različitih aktivatora ili inhibitora moguće je bilo na taj način unaprijed predvidjeti djelovanje nekog aktivatora ili inhibitora na rad srčanog mišića ili utvrditi malformacije u kardiomiocitima koje mogu biti ključne za dijagnostiku pedijataru kardiologa. Tom prigodom je praćen i proces apoptoze (programirano odumiranje stanica pri formiranju organa).

*Application of flow cytometry in the study of apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes [38].*

### ***Bioreaktori u proizvodnji biomase pojedinačnih životinjskih stanica***

Da bi mogli istraživati ponašanje stanica sisavaca (ovdje su uključene i humane stanice) potrebno je bilo iz komercijalno nabavljene stanične linije proizvesti određenu količinu stanica (*internu banku stanica*) za njihovo ispitivanje na djelovanje spojeva iz okoliša ili farmaceutskih proizvoda (lijekova). Ranija istraživanja provodila su se na pokusnim životinjama. Uvođenjem međunarodnih propisa o znatnom smanjenju i ograničenju upotrebe pokusnih životinja u znanstvenim ispitivanjima, primjena stanica sisavaca znatno je ubrzala istraživanja i dolazak do pouzdanih rezultata. Ujedno su znatno skraćeni vrijeme i sniženi troškovi istraživanja. Iako je novim postupcima znatno smanjena potreba za pokusnim životinjama, one ipak ne mogu biti u potpunosti isključene. Naime, posljednja faza ispitivanja nekog novog lijeka mora se poslije svih prethodnih toksikoloških istraživanja provesti *in vivo* na životinjama, a tek potom, a prije davanja suglasnosti za uporabu, može se krenuti s ispitivanjima na ljudima prema jasno definiranim protokolima. Da bi Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a (voditelj Z. Kniewald) i Laboratorij za toksikologiju PBF-a (voditeljica J. Kniewald) mogli izvršavati programske i nastavne obveze prema nastavnim planovima i zaključenim istraživačkim projektima, potrebno ih je bilo opremiti za rad u sterilnim uvjetima s monoslojnim staničnim kulturama i različitim tipovima bioreaktora za umnažanje biomase stanica u suspenziji. Posebna pozornost znanstvene javnosti posvećena je našoj primjeni nove tehnologije u radu sa stanicama u suspenziji u Wave bioreaktoru, švicarskog proizvođača. O ostvarenim rezultatima na toj suradnji nalazi se prilog u Godišnjaku HATZ 2020. str. 71-81.

*Lindane induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster ovary (CHO K1) cells [39].*

*BHK-21[C13] cells for Aujeszky's disease virus production using the multiple harvest process [40].*

*Aujeszky's disease virus production in disposable bioreactor [41].*

*Growth characteristic of Channel Catfish Ovary cells – influence of glucose and glutamine [42].*

*Effect of porcine brain growth factor on primary cell cultures and BHK-21 [C-13] cell line [43].*

*Influence of different ammonium, lactate and glutamine concentrations on CCO cell growth [44].*

*Primjena životinjskih stanica u proizvodnji cjepiva protiv bolesti Aujeszzkoga [45].*

### Ad 3.

Primjena pesticida za zaštitu i poboljšanje prinosa ratarskih usjeva u stalnom je porastu. Ekološke studije onečišćenja okoliša i opasnosti po zdravlje izazvane raznim pesticidima su u tijeku, ali poznavanje interakcije pesticida s endokrinim sustavom sisavaca je u 80-tim godinama 20-tog stoljeća bilo izrazito loše. Najviše pesticida je topljivo u lipidima, pa je stoga njihova nazočnost u reproduktivnim organima, koji sadrže značajne količine lipida, bila logična. U to vrijeme je već bilo otkriveno da pesticidi proizvode promjene u organima ovisnim o hormonima kao što su maternica ili prostata.

Endokrini disruptori su umjetne ili prirodne kemijske tvari koje nakon izlaganja mijenjaju reproduktivno zdravlje mužjaka ometajući hormonalnu homeostazu i spermatogenezu. Nekoliko je studija poduprlo hipotezu da je smanjenje broja spermija u posljednjih nekoliko desetljeća posljedica izloženosti zagađivačima (*onečišćivačima*) iz okoliša koji posjeduju estrogena ili antiandrogena svojstva. Bisfenol A, ftalati, alkilfenoli i poliklorirani bifenili neke su od kemikalija koje ometaju rad endokrinog sustava i često su prisutne u proizvodima koje svakim danom koristimo ili konzumiramo. Za ove spojeve se pokazalo da predstavljaju značajnu prijetnju reproduktivnom zdravlju. Ovdje je potrebno uzeti u obzir količinu, duljinu konzumacije ali i interakciju s drugim spojevima koji se također nalaze u okolišu. Mnoge kemikalije u pojedinačnim minimalno dozvoljenim količinama u zajedničkom djelovanju djeluju toksično pa izravno ili neizravno utječu na endokrini sustav, mijenjajući metabolizam, spolnu diferencijaciju, rast, odgovor na stres, rodno ponašanje i reprodukciju. Poremećaj endokrinog puta moguć je preko membranskih receptora ili nuklearnih receptora i inhibicije pojedinih enzima. Ugroženost reproduktivnog zdravlja muškaraca povezana je s povećanom prisutnošću kemijskih onečišćivača u našem okolišu poput pesticida i plastike. Učinak endokrinih disruptora na reproduktivno zdravlje danas je pravi problem za javno zdravstvo. Ovaj rad je naš doprinos znanstvenoj javnosti o kemikalijama iz okoliša koje imaju potencijal ometanja endokrinog sustava i njihov učinak na reproduktivni sustav sisavaca oba spola.

To nas je već 1978. godine potaknulo da detaljnije proučimo učinak atratona (*selektivni s-triazin herbicid*), na hipotalamus, hipofizu i prostatu. U kasnijim istraživanjima ispitani su lindan, atrazin, i drugi. Atraton se u velikim količinama koristio za tretiranje polja te je stoga postojala velika vjerojatnost da se nalazi i u organima sisavaca. U hipotalamusu smo pratili učinak na sintezu LHRF (*luteinizing hormone-releasing factor*) koji prelazom u hipofizu regulira sintezu LH i FSH. U hipofizi smo dokazali blokirajući učinak na aktivnost 5 $\alpha$ -reduktaze i na taj način smanjeni učinak testosterona iz cirkulacije na gonadotropni mehanizam povratne sprege. Ova i ostala istraživanja naše grupe istraživača sve do 2011. godine pokazala su štetne učinke sredstava za zaštitu bilja na reproduktivni sustav životinja u okolišu, ali i na čovjeka. Tehnike su se vremenom mijenjale s *in vivo* i *in vitro* pokusa na tehnologiju staničnih kultura u svim tipovima bioreaktora.



*Effects of atratone on hormone dependent reactions in hypothalamus pituitary and prostate gland [46].*

*Effects of s-triazine herbicides on hormone-receptor complex formation, 5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities at the anterior pituitary level [47].*

*Effects of s-triazine herbicides on 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone receptor complex formation in hypothalamus and ventral prostate [48].*

*Effects of s-triazine herbicides on the mode of androgen action on calf pituitary [49].*

*Indirect influence of s-triazines on rat gonadotropic mechanisms at early postnatal period [50].*

*Atrazine biodegradation in rats – a model for mamalian metabolism [51].*

*Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence [52].*

*Pesticide influence on pubertal female reproductive system [53].*

*Reversibility of inhibitory effect of atrazine and lindane on cytosol 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone receptor complex formation in rat prostate [54].*

*Effects of atrazine on reproductive performance in the rat [55].*

*Effect of s-triazine compounds on testosterone metabolism in the rat prostate [56].*

*Environmental impact, healthful food and education in toxicology – Trends in Croatia [57].*

*Application of anterior pituitary cell culture in toxicological research [58].*

*Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine [59].*

*Hypothalamo-pituitary-ovarian axis in rats under the influence of gonadoliberin or atrazine [60].*

*Effects of atrazine on 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone regulated mechanisms in rat prostate nuclei [61].*

*Pesticide presence and risk in the environment – Benefits of biotechnology [62].*

*Effect of atrazine on sperm parameters in rats [63].*

*Risk evaluation from pesticide residues in food [64].*

*Cytotoxic effects of organochlorine insecticides in Baby Hamster Kidney (BHK21[C13]) cell line [65].*



*Alternative models for toxicity testing of xenobiotics* [66].

*Atrazine exposure decreases cell proliferation in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cell line* [67].

*Application of Chinese Hamster Ovary cell culture as an alternative test system in toxicity testing of PCB-77* [68].

*Lindane induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster ovary (CHO K1) cells* [69].

*Comparison of cytotoxicity induced by 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and diethylstilbestrol in fish CCO and mammalian CHO-K1 cell lines* [70].

*Cytotoxic and apoptotic effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and diethylstilbestrol on CHO-K1 cells* [71].

*Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes* [72].

Zbog značajnog onečišćenja vodotokova i posebice mora, dodatna istraživanja su još potrebna i s kulturama stanica organizama iz mora i to posebno dubokih mora koja su znanstvenicima još uvijek nepoznata i nedostupna. Nažalost onečišćenje koje proizvodi čovjek dolazi do najudaljenijih područja na zemaljskoj kugli i do najvećih dubina mora. Istraživanja dubokih mora skrivaju mnoge nepoznate organizme i izvore bolesti koje postoje u najtežim oblicima za život.

## 2. Međunarodna suradnja kao članovi HATZ

HATZ je članica svjetskog udruženja akademija tehničkih znanosti CAETS sa sjedištem u Washingtonu D.C., SAD. Članice CAETS su delegacije 31 zemlje iz cijeloga svijeta. HATZ je postala članica CAETS 2000. godine i od tada redovito sudjeluje i aktivna je u aktivnostima CAETS u cilju izvršavanja njegovih Statutom preuzetih obveza i programskih opredjeljenja.

16. zasjedanje Međunarodnog Savjeta Akademija inženjerstva i tehnoloških znanosti (CAETS) održano je 10.-14. srpnja 2005. u Cairns, Queensland, Australija.

Na 16-tom zasjedanju CAETS J. Kniewald predsjednica Odbora za međunarodnu suradnju HATZ i članica delegacije HATZ održala je na Konferenciji “Oceans and the world future” predavanje “The ocean and its environment as a source of food production”.



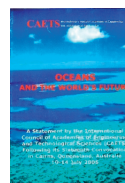
**Slika 3:** Otvorenje međunarodne Konferencije



**Slika 4:** J. Kniewald supredsjedateljica Konferencije



**Slika 5:** J. Kniewald tijekom predavanja



**Slika 6:** Zaključni dokument i sveobuhvatne preporuke

Poslije završetka rada Konferencije (nekoliko predavanja i poslije diskusija) usvojeni su slijedeći zaključci i preporuke:

“Čak i pod idealnim institucionalnim uvjetima more nije neiscrpan opskrbljivač hranom, stoga moramo biti oprezni i ne zanemariti geografske razlike u stanovništvu i rastu njihova prihoda, kao i učinke ovih različitih stopa rasta na ribarsku industriju u svijetu. Ravnoteža morskog ekosustava ne smije se radikalno poremetiti. Trebat će nam mnogo više informacija kako bismo procijenili stvarne mogućnosti održivog povećanja prinosa u morskoj akvakulturi. Jaruzanje i korištenje mineralnih sirovina iz dubokog mora poremetit će obalne i oceanske ekosustave. Industrijski, poljoprivredni, kućni i energetske onečišćivači okoliša negativno će utjecati na biološku produktivnost u obalnim vodama i ometati akvakulturu. Nastavak krčenja šuma dovest će do destruktivnog taloženja mulja na obalnim područjima. Očito je da pesticidi smanjuju uništavanje usjeva od štetočina i kontaminaciju zaliha hrane opasnim mikroorganizmima i toksinima koje proizvode, ali istina je da samo 1% korištenih agrokemikalija

dospijeva na mjesto gdje se moraju koristiti. Većina takvih spojeva ispire se kišom i predstavljaju netočkaste izvore koji utječu na kvalitetu hrane u oceanu. Ostaci, iz stare tehnologije u obalnom području nekoliko nerazvijenih zemalja, ispušteni u rijeke ili izravno u ocean, još uvijek povećavaju trenutnu razinu nečistoća i to će se nastaviti još nekoliko desetljeća u budućnosti. Samo je pitanje kada će izvori hrane iz oceana postati nejestivi, kao što su izvori hrane iz nekih rijeka ili jezera u Europi već sada. Stoga u budućnosti trebamo zdrav i produktivan morski okoliš i očekujemo daljnji razvoj novih tehnologija.”

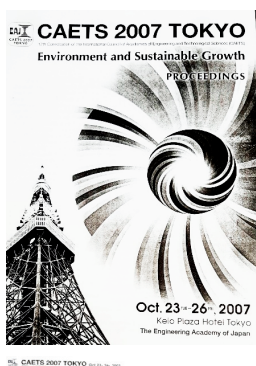
Predavanje J. Kniewald održano na Konferenciji „Ocean and the world’s future“:

*The Ocean and its environment as a source of food production* [73].



Slika 7: Uručeno Priznanje Z. Kniewald poslije završenog mandata u Savjetu direktora CAETS

17. zasjedanje Međunarodnog savjeta akademija inženjerstva i tehnoloških znanosti (CAETS) održano je u Tokiju, Japan, 23.-26. listopada 2007.



Slika 8: Zbornik Konferencije



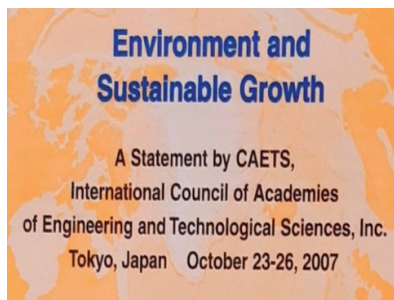
Slika 9: Z. Kniewald tijekom predavanja

*Participation of Croatia as a Western-Balkan country in European scenarios about energy and greenhouse gas emissions [74].*



**Slika 10:** Rasprava tijekom zasjedanja Predsjedništva CAETS

Poslije Konferencije i zasjedanja Predsjedništva CAETS usvojena je deklaracija o „Okolišu i održivom razvoju“ čiji zaključak je sljedeći:



**Slika 11:** Zaključni dokument

“Članovi CAETS-a dobro su pripremljeni za predstavljanje objektivnih podataka kako bi se olakšala rasprava o pitanjima okoliša od strane vlada i nacionalnih zajednica.

Za angažiranje njihovih vlada, akademije članice CAETS potaknut će povećanje ulaganja u istraživanje i razvoj energije i promicanje politika za poticanje izbjegavanja i ublažavanja onečišćenja okoliša i globalnog zatopljenja. Kroz njihovo vodstvo u tehnološkim znanostima i inženjerstvu, CAETS akademije će nastaviti doprinositi ciljevima održivog razvoja diljem svijeta. Inženjeri i tehnolozi moraju raditi zajedno za dobrobit čovječanstva i promovirati mudro korištenje darova prirode.”

*(napomena: prijevod autora članka)*

2008 SSR Annual Meeting (Society for the Study of Reproduction)  
27.-30.5.2008. Kailua-Kona, Hawaii

The Society for the study of reproduction (SSR) osnovano je 1967. kako bi promicalo proučavanje reprodukcije poticanjem interdisciplinarnе komunikacije među znanstvenicima, održavanjem konferencija i izdavanjem znanstvenog časopisa *Biology of reproduction*. Članovi su iz 50 zemalja, ali najviše iz SAD. Društvo je posvećeno unapređenju znanosti o plodnosti i reproduktivnom zdravlju za dobrobit ljudi i životinja.

Društvo je udruženje znanstvenika i liječnika zainteresiranih za istraživanja u reprodukciji. Članovi se bave temeljnim, primijenjenim istraživanjima ili obavljaju kliničku praksu. Svi su posvećeni unapređenju znanja o reproduktivnim procesima u životinja i ljudi.

Ja sam bio član SSR od 1991. do 2009. godine i u tom razdoblju bio član Development and Endowment Committee 1992-1995 i član Membership Committee 2008-2009.

**SOCIETY**  
for the  
STUDY OF REPRODUCTION

11 March 2008

ADMINISTRATIVE OFFICERS  
Judit Jansen, Executive Director  
600 Belmont Avenue  
Madison, Wisconsin 53711-0005  
Phone: 608.255.2772  
Fax: 608.255.4610

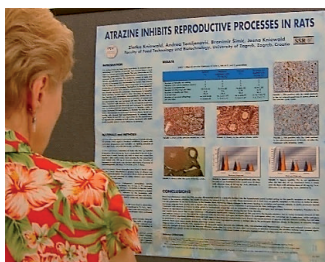
MEMBERSHIP COMMITTEE  
John J. Kopeck  
Chair

11 March 2008

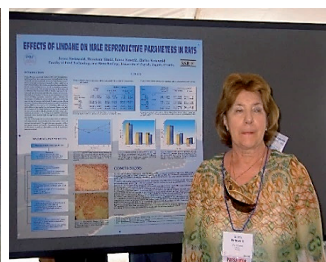
Zdravko Kniwald  
Dept. of Biomedical Eng. Viti & Hormone  
Univ. of Zagreb  
Bijenjski put 4, Kvarčeva St. 26  
10000 Zagreb  
CROATIA

DELO: Zdravko Kniwald

One of the reasons the Society for the Study of Reproduction has been so successful is that individuals like you have willing to contribute valuable time and effort to serve on SSR committees. Every year, approximately 100 people are selected to serve on committees. On behalf of the Officers and Directors of SSR, we thank you for accepting an appointment to the Membership Committee.



Slika 13: Poster Z. Kniwald i sur.



Slika 14: Poster J. Kniwald i sur.



Slika 15: Razgovori pred posterima

Jasna Kniewald, Zlatko Kniewald

### PROIZVODNJA HRANE U OVISNOSTI O PRIMJENI PESTICIDA - - MOGUĆNOSTI BIOTEHNOLOŠKIH RJEŠENJA



Poljoprivredna proizvodnja u proteklih je nekoliko desetljeća bilježila stalan porast proizvodnje, no porast broja stanovništva čini stalan pritisak na daljnje povećanje proizvodnje. Povećanje proizvodnje hrane prati istovremena proizvodnja tzv. **agrokemikalija** na kojima počiva ekonomska stabilnost onih zemalja koje, ako same ne oskudijevaju hranom, zainteresirane su da se proizvodnja umjetnih gnojiva i potrošnja pesticida neprekidno povećavaju. Ne treba posebno naglašavati koliko je potrebno energije da bi se proizvele agrokemikalije koje potom izazivaju pored određenih korisnih efekata i ozbiljno oštećenje kvalitete okoline (npr. svega 0,1% insekticida dopijeva do štetnih kukaca, a sav preostali dio ima negativno djelovanje na okoliš). Zbog toga u narednom razdoblju treba provoditi zaštitu usjeva samo kada je potrebno, a kao jednu od alternativa stihijskoj primjeni pesticida koristiti tzv. **integrated pest management (IPM)** program.

Hrvatska kao značajan proizvođač žitarica, a napose kukuruza troši znatne količine herbicida, posebice atrazina, u kombinaciji s drugim sredstvima za zaštitu bilja. Naši rezultati dobiveni *in vivo* i *in vitro* potvrdili su pretpostavke da pesticidi pojedinačno ali i u smjesi djeluju štetno na organe za reprodukciju, i to ne samo na prvu generaciju ispitnika (model životinja), već izazivaju i određene genetske promjene i na potomstvu prve i druge generacije.

Biotehnologija primjenom genetičkog inženjerstva može u narednom razdoblju proizvesti biljke otporne na bolesti, spriječiti rast nekih nepoželjnih korova te osigurati znatne količine energije iz tzv. obnovljivih izvora. U svemu tome Hrvatska ima svoje mjesto, a svojim znanjem i iskustvom i pored ograničenih materijalnih i ljudskih kapaciteta može koristeći agroklimatske prednosti osigurati ravnotežu proizvodnje hrane — primjene agrokemikalija — kvalitete okoline, na razini koja je i iznad tehnološki razvijenih zemalja Europe.

Ovaj tekst je sažetak našeg rada koji je objavljen u Godišnjaku Hrvatske akademije tehničkih znanosti za 1994. godinu. str. 136-142. Ja sam postao član HATZ 1998. godine, dok je Jasna Kniewald imala čast da bude članica Akademije pod prvobitnim nazivom. Ostala nam je samo kratica HATZ.

Iz sažetka rada je vidljivo što je u radu i detaljnije opisano a i naši kasniji radovi ukazali su na bit problema i moguća rješenja.

*Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes* [75].

Reprint ovog rada objavljen je u Godišnjaku HATZ 2015. str. 257-279 i uključuje rezultate i naših istraživanja. To ukazuje da je naša znanost u potpunosti kompatibilna sa svjetskim istraživanjima bez obzira na značajnu razliku u ukupnim sredstvima za istraživanja. Rad je do sada citiran više od 360 puta.

Istraživanja i prezentaciju dobivenih rezultata u znanstvenim časopisima i na znanstvenim skupovima\*\* od 1968. do 2008. godine osigurali su svojim sredstvima: The Ford Foundation, United States Department of Agriculture (USDA), Samoupravna interesna zajednica za znanstveni rad SRH (SIZ-IV), Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (MZOŠ) i PLIVA d.d.

Svima se ovim putem najljepše zahvaljujemo.



*\*\*Pregled znanstvenih skupova na kojima su autori članka ili njihove suradnice/-i prikazali znanstvenoj javnosti rezultate istraživanja prije njihovog objavljivanja u znanstvenim časopisima (navedenima u popisu literature).*

1. Conference on "Steroid Hormones and Brain Function", Los Angeles, SAD, 1970
2. Third International Congress on Hormonal Steroids, Hamburg, Njemačka, 1970
3. 3. Kongres medicinskih biokemičara Jugoslavije, Bled, SFRJ, 1971
4. IV. International Congress of Endocrinology, Washington, SAD, 1972
5. 6th Congress of the Hungarian Society of Endocrinology and Metabolism, Pecs, Mađarska, 1973
6. Fourth International Congress on Hormonal Steroids, Mexico City, Meksiko, 1974
7. 1 Kongres biokemije Jugoslavije, Portorož, SFRJ, 1976
8. 3rd International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry, "Recent Advances in Steroid Biochemistry", Helsinki, Finska, 1976
9. 3rd International Symposium on Microcalorimetry - Application in Biology, London, Velika Britanija, 1977
10. International Symposium on "Receptors and Steroid Hormones in Brain", Zagreb, 1977
11. International Symposium on "Neuroendocrine regulatory mechanisms", Beograd, SFRJ, 1978
12. Satellite Symposium of 7th International Congress of Pharmacology "Pharmacological Modulation of Steroid Action" Torino, Italija, 1978
13. 5th International Congress on Hormonal Steroids, New Delhi, Indija, 1978
14. 2. Sastanak prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista Hrvatske, Zagreb, 1979
15. 1st International Congress on Hormones and Cancer, Rim, Italija, 1979
16. 6th International Congress of Endocrinology, Melbourne, Australija, 1980
17. 2. Kongres Saveza biokemijskih društava Jugoslavije, Beograd, SFRJ, 1980
18. Course in Endocrinology "Hormones and Cancer", Dubrovnik, 1980
19. 14th FEBS Meeting Edinburgh, Velika Britanija, koautor-poster 1981
20. 3. Kongres Saveza biokemijskih društava Jugoslavije Skopje, SFRJ, 1983
21. Workshop on Metabolism of hormonal Steroids in the Neuroendocrine Structures, Carmel, Kalifornija, S.A.D. 1983
22. 16th FEBS Meeting Moskva, SSSR, 1984
23. 7th International Congress on Hormonal Steroids Madrid, Španjolska, 1986

24. 7th Balcan Biochemical and Biophysical days, Dubrovnik, 1988
25. 1st European Conference on Ecotoxicology, Kopenhagen, Danska, 1988
26. High Technology Conference, New Delhi, 1988
27. Znanstveni skup "Sveučilište u razvoju znanosti od 1669. do danas", Zagreb, 1989
28. 1. sastanak "Genetičko inženjerstvo i biotehnologija" Savjet zajednica za nauku Jugoslavije Zagreb, 1989
29. 5. Kongres Saveza biokemijskih društava Jugoslavije, Novi Sad, SFRJ, 1989
30. 3. Savjetovanje kemičara i tehnologa Slavonije i Baranje, Osijek, 1989
31. 9th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry "Recent Advances in Steroid Biochemistry", Las Palmas, Španjolska, 1989
32. 9th Regional Meeting of Biochemists, Biophysicists and Biotechnologists, Opatija, 1990
33. 2nd European Congress of Endocrinology, Ljubljana, Slovenija, 1990
34. Conference on Public Health and the Environmental Crisis in Central Europe, Washington, SAD, 1990
35. Conference on "Physiological and Biochemical Approaches to the Toxicological Assessment of Environmental pollution", Utrecht, Nizozemska, 1990
36. 8th International Congress on Hormonal Steroids, The Hague, Nizozemska, 1990
37. Simpozij "Ecologically rational development of chemical technologies" Zagreb 1991
38. Conference on "Effects of Food on the Immune and Hormonal Systems", Zürich, Švicarska, 1991
39. TERRA Symposium "Androgens and Antiandrogens", New Paltz, New York, SAD, 1991
40. Znanstveni skup "Prehrambeno-biotehnoški fakultet - na raskrižju između znanosti i gospodarstva", Zagreb, 1992
41. Godišnji sastanak hrvatskih biokemičara, Zagreb, 1993
42. Godišnji sastanak hrvatskih biokemičara, Zagreb, 1993
43. EUROTOX'93 (32nd European Congress of Toxicology), Uppsala, Švedska, 1993
44. Central/Eastern European Conference. "Biotechnology and Business", Prag, Češka, 1993
45. 2. Hrvatski kongres prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, 1994
46. 2. Hrvatski kongres prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, 1994
47. 27th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Ann Arbor,



- S.A.D. 1994
48. The British Council seminar “Industry and higher education working together” , Southampton, Velika Britanija, 1995
  49. 7th European Congress on Biotechnology, Nica, Francuska, 1995
  50. 1st Croatian Congress of Toxicology, Zagreb, 1996
  51. Svečani sastanak hrvatskih biokemičara uz 20 god. društva, Zagreb, 1996
  52. 1st Croatian Congress of Toxicology, Zagreb, 1996
  53. 30th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction, Portland, Oregon, S.A.D. 1997
  54. Šesti kongres biologa Hrvatske, Opatija, 1997
  55. Znanstvena konferencija – “Hrvatska biotehnologija u svijetu”, Zagreb, 1997
  56. II. Triazine Research Meeting – Mode of Action, Hilton Head Island, Georgia, SAD, 1997
  57. 37th European Congress of Toxicology – EUROTOX 97, Aarhus, Danska, 1997
  58. Workshops on Reproductive Toxicology, Granada, Španjolska, 1997
  59. Cell Culture Engineering VI, San Diego, SAD 1998
  60. International Congress of Toxicology – ICT VIII, “Chemical Safety for the 21st Century”, Pariz, Francuska, 1998
  61. 1. Skup Hrvatskog društva za biotehnologiju, Zagreb, 1998
  62. 3. Hrvatski kongres prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, 1998
  63. 1st Congress of the Croatian Society for Electron Microscopy, Zagreb, 1999
  64. Konferencija “Biotechnology and Biomedicine” Zagreb, predsjednik, 1999
  65. Konferencija “Biotechnology and Biomedicine” Zagreb, 1999
  66. 8th European Congress on Biotechnology, Brisel, Belgija, 1999
  67. Application of Genomics to Animal Models for Pharmaceutical Studies, Boston, SAD 2000
  68. Konferencija “Biotechnology and Environment” Zagreb, 2001
  69. 34th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Ottawa, Kanada, 2001
  70. 39th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2001), Istanbul, Turska , 2001
  71. 40th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2002), Budimpešta, Mađarska, 2002
  72. 4th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists - Central European Meeting, Opatija, 2002
  73. Konferencija “Biotechnology and Food” Zagreb, 2003

74. 9th European Congress on Biotechnology, Ženeva, Švicarska, 2003
75. Konferencija “PharmaBioTec Europe” Trst, Italija 2004
76. 3rd Croatian Congress of Toxicology, Plitvice 2004
77. 10th International congress of toxicology, Tampere, Finska, 2004
78. 7th WFEO World Congress on Engineering Education “MOBILITY OF ENGINEERS” Budimpešta, Mađarska, 2006

### 3. Literatura

- [1] Kniewald, Z., Pučar, Z.: Electrophoretic mobilities of  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{90}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  ions in concentrated aqueous solutions of some inorganic 1:1, 2:1, 1:2 and 2:2 salts and in sea water, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, **72** (1976) 987-995, doi: 10.1039/F19767200987
- [2] Kniewald, J., Bizzi, A., Garattini, S.: Relationship between lipolysis and storage of diphenylhydantoin in adipose tissue, *Experientia* **28** (1972) 628-629, doi:10.1007/BF01944940
- [3] Kniewald, J., Bizzi, A., Garattini, S.: Relationship between lipolysis and storage of Phenobarbital in adipose tissue, *European Journal of Pharmacology*, **17** (1972) 186-188, doi: 10.1016/0014-2999(72)90289-0
- [4] Kniewald, Z., Massa, R., Motta, M., Martini, L.: Feedback mechanisms and the control of the hypothalamo-hypophysial complex, U *Steroid hormones and brain function*, Sawyer C.H., Gorski R.A. (Eds.): Proceedings of a Conference held May 24-27, 1970, University of California, Los Angeles, Izd. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, (1971) 289-299, PMID: 4562773
- [5] Kniewald, Z., Massa, R., Martini, L.: Conversion of testosterone into  $5\alpha$ -androstane- $17\beta$ -ol-3-one at the anterior pituitary and hypothalamic level. *Excerpta medica international congress series No. 219 Hormonal steroids*, Proceedings of the third international congress, Hamburg, September 1970. publ. (1972) 784-791
- [6] Kniewald, Z., Zanisi, M., Martini, L.: Studies on the biosynthesis of testosterone in the rat, *Acta endocrinologica (Copenhagen)* **68** (1971) 614-624, doi: 10.1530/acta.0.0680614
- [7] Massa, R., Stupnicka, E., Kniewald, Z., Martini, L.: The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and anterior pituitary, *Journal of Steroid Biochemistry*, **3** (1972) 385-399, doi: 10.1016/0022-4713(72)90085-4
- [8] Smiljanić, N., Klinc, S., Šimić, B., Kniewald, Z.: Etinodiene 0.5 as an oral estrogenic, progestagenic, anticoncipient – Clinical observations, secretion of pregnanediol, FSH and LH during therapy, *Volume degli Atti del 56° Congresso nazionale della Società di ostetricia e ginecologia*, Padova, Tipografia Mattioli Firenze, (1974) 1331-1341
- [9] Has, B., Kniewald, Z., Milković, S.: Effects of coincubation of the pituitary and hypothalamus of intact and castrate male rats and the influence of LH-RH on pituitary  $5\alpha$ -reductase activity, *Neuroendocrinology*, **19** (1975) 36-43, doi: 10.1159/000122423
- [10] Frgačić Čala, S., Kniewald, Z., Milković, S.: The effects of ovariectomy and adrenalectomy

- on the 5 $\alpha$ -reduction of testosterone and corticosterone by female rat tissue *in vitro*, *Journal of Steroid Biochemistry*, **6** (1975) 1329-1332, doi:10.1016/0022-4731(75)9036-1
- [11] Smiljanić, N., Ciglar S., Šimić, B., Kniewald, Z.: Induction der ovulation durch synthetisches LH-RH nach erfolgloser stimulation mit Clomid, *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **105** (1975) 499-501, PMID: 766163
- [12] Smiljanić, N., Klinc, B., Šimić, B., Kniewald, Z.: Ethinodiene anticoncezionale orale estrogeno-progestinico, *Minerva Ginecologica*, **27** (1975) 1-7
- [13] Kniewald, Z., Čala, S.: Pituitary-ovarian relationship during pregnancy of rat, *Periodicum Biologorum*, **78** (1976) 45-50
- [14] Smiljanić, N., Kniewald, Z., Singer, S., Šimić, B.: Ispitivanje gonadotropnog integriteta hipofize sintetskim LH-RH, u žena sa sekundarnom amenorejom, *Jugoslavenska ginekologija i opstetricija*, **16** (1976) 33-38
- [15] Kordić, D., Kniewald, Z.: Incorporation of <sup>14</sup>C-amino acids into rat hypothalamus, *Endocrinologia Experimentalis*, **11** (1977) 3-10, PMID: 322995
- [16] Kniewald, Z., Kniewald, J.: Mode of androgen action at male and female calf pituitary level, *Journal of Steroid Biochemistry*, **15** (1981) 433-437, doi: 10.1016/0022-4731(81)90310-1
- [17] Kniewald, J., Šimić, B., Kniewald, Z.: Androgen metabolism in neuroendocrine organs of different species. U *Metabolism of hormonal steroids in the neuroendocrine structures*. Cellotti, F., Naftolin, F., Martini, L. Eds., Raven Press, New York, (1984) 68-78
- [18] Podobnik, M., Smiljanić, N., Ciglar, S., Korenić, B., Parag, G., Ročić-Đebo, S., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Klinički i endokrinološki aspekt insuficijencije žutog tijela u ranim spontanim pobačajima, *Jugoslavenska ginekologija i perinatologija*, **27** (1987) 11-14
- [19] Kniewald, Z., Zechner V., Kniewald, J.: Androgen hydroxysteroid dehydrogenases under the influence of pyridoxine derivatives, *Endocrine Regulations*, **26** (1992) 47-51, PMID: 1421208
- [20] Šimić, B., Kniewald, J., Kniewald, Z.: Influence of ethynodiol diacetate on the formation of A-homo-3-oxa-5 $\alpha$ -pregnane-4,20-dione in female rats, *Endocrine Regulations*, **32** (1998) 125-131, PMID: 10196509
- [21] Kniewald, Z., Gaurina-Srček, V.: The effect of new growth promoter CABRPP on biomass production of BHK-21[C13] cells. U *Current Studies of Biotechnology – Biomedicine*, **1** Kniewald Z. ured. str. 61-68. ISBN 953-98094-0-1, Zagreb, veljača 1999. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju (2000) Zagreb
- [22] Jeličić A., Gaurina-Srček, V., Polančec D., Sladić D., Kniewald, Z.: Induction and detection of apoptosis in BHK21-[C13] cells. U *Current Studies of Biotechnology – Environment*, **2** (2001) Kniewald, Z. ured. str.183-194. ISBN 953-98094-3-6, Zagreb, veljača 2001. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju, (2001) Zagreb
- [23] Kniewald, Z., Massa, R., Martini, L.: Gas Chromatographic determination of plasma testosterone. U *The Endocrine function and the human testis*, vol. **I**. Acad. Press Inc., New York, London, (1973) 121-148
- [24] Kniewald, Z., Martini, L., Milković, S.: Identifikacija metabolita testosterona nakon inkuba-

- cije s tkivom centralnog živčanog sustava (CŽS)u štakora pomoću kromatografije na tankom sloju i plinske kromatografije. U *Zbornik referata 3. Kongresa medicinskih biokemikov Jugoslavije*, Bled svibanj 1971, Maribor- Ljubljana, (1975) 702-720
- [25] Marić, Z., Kniewald, Z., Milković, S.: A simple competitive protein binding method for determination of progesterone in the rat plasma, *Steroids*, **22** (1973) 113-121, doi: 10.1016/0039-128x(73)90076-7
- [26] Frgačić S., Kniewald, Z.: Ascorbic acid as an antioxidant in thin layer chromatography of corticosteroids, *Journal of Chromatography*, **94** (1974) 291-293, doi: 10.1016/s0021-9673(01)92381-7
- [27] Kniewald, Z.: Intelektualno vlasništvo i uloga sveučilišta. *Državnost* (publ. Zaklada hrvatskog državnog zavjeta ISSN 1331-3037), **2** (1998) 289-298
- [28] Gaurina-Srček, V., Radošević, K., Kniewald, Z.: Importance of intellectual property rights Protection in Croatia – Education and the Role of the Croatian Academy of Engineering, *Annual 2009 of the Croatian Academy of Engineering*. Izd. Croatian Academy of Engineering, Zagreb, 2009, 15-34
- [29] Kniewald, J., Mildner, P.: Thermochemistry of fumarase-inhibitor binding, *FEBS Letters*, **53** (1975) 2, 225-228, doi: 10.1016/0014-5793(75)80025-1
- [30] Kniewald, J., Kniewald, Z., Mildner, P.: A new approach to the study of hormone-protein interaction using the microcalorimetric method, *Steroids*, **25** (1975) 4, 477-485, doi: 10.1016/0039-128x(75)90025-2
- [31] Žuković, B., Kniewald, J., Kniewald, Z., Mildner, P.: Binding of testosterone, dihydrotestosterone and progesterone to rat prostate cytosol – Application of microcalorimetry, *Endocrinologia Experimentalis*, **10** (1976) 119-124, PMID: 179781
- [32] Kniewald, J., Mildner, P.: Calorimetric study of inhibitors binding to fumarase under physiological conditions, *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, **26** (1976) 1, 37-43, doi: 10.1016/0014-5793(75)80025-1
- [33] Kniewald, J., Čala, S., Mildner, P., Kniewald, Z.: Calorimetric approach to the study of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and estradiol receptors in rat hypothalamus cytosol, *Journal of Steroid Biochemistry*, **7** (1976) 11/12, 1077-1081, doi: 10.1016/0022-4731(76)90036-4
- [34] Kniewald, J., Mildner, P.: Calorimetric study of ligand binding to fumarase, *Croatica Chemica Acta*, **49** (1977) 3, 567-571, YU ISSN 0011-1643 541.11:547.96.
- [35] Glanser, M., Ban, S., Kniewald, J.: Application of flow microcalorimetry in studies of bio-oxidation by means of mixed culture, *Process Biochemistry*, (1979) February, 17-25
- [36] Milković, K., Paunović, J., Kniewald, Z., Milković, S.: Maintenance of the plasma corticosterone concentration of adrenalectomized rat by the fetal adrenal glands, *Endocrinology*, **93** (1973) 115-118, doi: 10.1210/endo-93-1-115
- [37] Kniewald, Z., Milković, S., Peruzović, M., Milković, K.: An *in vitro* study of sex hormones metabolism in the pituitaries and gonads of neonatal and young rats, the effects of prenatal reduction of litter size, *Journal of Endocrinological Investigation* **1** (1978) 203-208, doi: 10.1007/BF03350381

- [38] Kniewald, H., Malčić, I., Radošević, K., Gaurina-Srček, V., Slivac, I., Polančec, D., Matijašić, M., Kniewald, J., Kniewald, Z.: Application of flow cytometry in the study of apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **29** (2007) 681-687, doi: 10.1358/mf.2007.29.10.1147767
- [39] Kmetić, I., Radošević, K., Murati, T., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Lindane induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster ovary (CHO K1) cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, **19** (2009) 518-523, doi: 10.1080/15376510903280107
- [40] Gaurina-Srček, V., Čajavec S., Sladić D., Kniewald, Z.: BHK-21[C13] cells for Aujeszky's disease virus production using the multiple harvest process, *Cytotechnology*, **45** (2004) 101-106, doi: 10.1007/s10616-004-2551-z
- [41] Slivac, I., Gaurina-Srček, V., Radošević H., Kmetić, I., Kniewald, Z.: Aujeszky's disease virus production in disposable bioreactor, *Journal of Biosciences*, **31** (2006) 3, 363-368, doi: 10.1007/BF02704109
- [42] Slivac, I., Gaurina-Srček, V., Radošević, K., Porobić, I., Bilić, K., Fumić, K., Kniewald, Z.: Growth characteristic of Channel Catfish Ovary (CCO) cells – influence of glucose and glutamine, *Cytotechnology*, **57** (2008) 273-278, doi: 10.1007/s10616-008-9171-y
- [43] Gaurina Srček, V., Radošević, K., Kniewald, H., Slivac, I., Kmetić, I., Kniewald, Z.: Effect of porcine brain growth factor on primary cell cultures and BHK-21 [C-13] cell line, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, **45** (2009) 28-31, doi: 10.1007/s11626-008-9148-3
- [44] Slivac, I., Blajić, V., Radošević, K., Kniewald, Z., Gaurina-Srček, V.: Influence of different ammonium, lactate and glutamine concentrations on CCO cell growth, *Cytotechnology*, **62** (2010) 584-594, doi: 10.1007/s10616-010-9312-y
- [45] Slivac, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K., Kmetić, I., Kniewald, Z.: Primjena životinjskih stanica u proizvodnji cjepiva protiv bolesti Aujeszzkoga, *Godišnjak Akademije tehničkih znanosti Hrvatske*, **1** (2020) 71-81
- [46] Kniewald, Z., Kniewald, J., Kordić, D., Mildner, P.: Effects of atratone on hormone dependent reactions in hypothalamus pituitary and prostate gland, *Journal of Steroid Biochemistry*, **9** (1978) 449-453, doi: 10.1016/0022-4731(78)90614-3
- [47] Kniewald, J., Mildner, P., Kniewald, Z.: Effects of s-triazine herbicides on hormone-receptor complex formation, 5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity at the anterior pituitary level, *Journal of Steroid Biochemistry*, **11** (1979) 1, 833-838, doi: 10.1016/0022-4731(79)90018-9
- [48] Kniewald, J., Mildner, P., Kniewald, Z.: Effects of s-triazine herbicides on 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone receptor complex formation in hypothalamus and ventral prostate, In *Pharmacological modulation of steroid action*: Genazzani, E.; di Carlo F., Mainwaring W. I. (eds.). Raven Press: New York, N.Y., USA. ISBN 0-89004-373-6.; 0 (0). (1980) 159-170
- [49] Kniewald, Z., Kniewald, J.: Effects of s-triazine herbicides on the mode of androgen action on calf pituitary, *Periodicum Biologorum*, **85** (1983) 115-122
- [50] Kniewald, J., Peruzović, M., Gojmerac, T., Milković, K., Kniewald, Z.: Indirect influence

- of s-triazines on rat gonadotropic mechanisms at early postnatal period, *Journal of Steroid Biochemistry*, **27** (1987) 1095-1100, doi: 10.1016/0022-4731(87)90195-6
- [51] Gojmerac, T., Kniewald, J.: Atrazine biodegradation in rats – a model for mammalian metabolism, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **43** (1989) 2, 199-206, doi: 10.1007/BF01701748
- [52] Babić-Gojmerac, T., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Testosterone metabolism in neuroendocrine organ sin male rats under atrazine and deethylatrazine influence, *Journal of Steroid Biochemistry*, **33** (1989) 1, 141-146, doi: 10.1016/0022-4731(89)90369-5
- [53] Kniewald, J., Težak, Ž., Šimić, B., Kniewald, Z.: Pesticide influence on pubertal female reproductive system, U *Proceedings of the interdisciplinary conference on "Effects of food on the immune and hormonal system"*. May 23-24. Zürich, Švicarska, (1991) 170-174. ISBN 3-906516-02-4
- [54] Šimić, B., Kniewald, Z., Davies, J. E., Kniewald, J.: Reversibility of inhibitory effect of atrazine and lindane on cytosol 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone receptor complex formation in rat prostate, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **46** (1991) 92-99, doi: 10.1007/BF01688260
- [55] Šimić, B., Kniewald, J., Kniewald, Z.: Effects of atrazine on reproductive performance in the rat, *Journal of Applied Toxicology*, **14** (1994) 401-404, doi: 10.1002/jat.2550140603
- [56] Kniewald, J., Osredečki, V., Gojmerac, T., Zechner, V., Kniewald, Z.: Effect of s-triazine compounds on testosterone metabolism in the rat prostate, *Journal of Applied Toxicology*, **15** (1995) 3, 215-218, doi: 10.1002/jat.2550150312
- [57] Kniewald, J., Kniewald, Z.: Environmental impact, healthful food and education in toxicology – Trends in Croatia, *Central European Journal of Public Health*, **3** (1995) 163-168, PMID: 8535378
- [58] Zechner-Krpan, V., Kniewald, J., Kniewald, Z.: Application of anterior pituitary cell culture in toxicological research, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **49** (1998) 219-229, PMID: 10376353
- [59] Kniewald, J., Jakominić, M., Tomljenović, A., Šimić, B., Romac, P., Vranešić, Đ., Kniewald, Z.: Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine, *Journal of Applied Toxicology*, **20** (2000) 61-68, PMID: 10641017
- [60] Tomljenović A., Zechner-Krpan, V., Kniewald, Z.: Hypothalamo-pituitary-ovarian axis in rats under the influence of gonadoliberin or atrazine, U *Current Studies of Biotechnology–Biomedicine 1*, Kniewald, Z.: ured., str. 69-74. ISBN 953-98094-0-1. Zagreb, veljača 1999. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju (2000) Zagreb
- [61] Jakominić, M., Jeličić, A., Šimić, B., Kniewald, J.: Effects of atrazine on 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone regulated mechanisms in rat prostate nuclei, U *Current Studies of Biotechnology–Biomedicine 1*, Kniewald, Z.: ured., str. 51-60. ISBN 953-98094-0-1. Zagreb, veljača 1999. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju (2000) Zagreb
- [62] Kniewald, J.: Pesticide presence and risk in the environment – Benefits of biotechnology, U *Current Studies of Biotechnology – Environment*, **2**, (2001) Kniewald, Z. ured. ISBN 953-98094-3-6, Zagreb, veljača 2001. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju, (2001) Zagreb,



35-54

- [63] Šimić, B., Jakominić, M., Romac, P., Kniewald, J.: Effect of atrazine on sperm parameters in rats. U *Current Studies of Biotechnology – Environment*, **2**, (2001) Kniewald, Z. ured. str. 195-202, ISBN 953-98094-3-6, Zagreb, veljača 2001. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju, (2001) Zagreb
- [64] Kniewald, J.: Risk evaluation from pesticide residues in food. U *Current Studies of Biotechnology-Food* **3**, Kniewald, Z.: ured., ISBN 953-176-209-0. Zagreb, veljača 2003. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju Zagreb (2003) 149-160
- [65] Kmetić, I., Gaurina-Srček, V., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Cytotoxic effects of organochlorine insecticides in Baby Hamster Kidney (BHK21[C13]) cell line. U *Current Studies of Biotechnology-Food* **3**, Kniewald, Z.: ured., ISBN 953-176-209-0. Zagreb, veljača 2003. Izd. Hrvatsko društvo za biotehnologiju Zagreb. (2003) 177-184
- [66] Kniewald, J., Kmetić, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z.: Alternative models for toxicity testing of xenobiotics, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **56** (2005) 195-204
- [67] Kmetić, I., Gaurina-Srček, V., Slivac, I., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Atrazine exposure decreases cell proliferation in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cell line, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **81** (2008) 205-209, doi: 10.1007/s00128-008-9425-6
- [68] Kmetić, I., Muštra, J., Murati, T., Šimić, B., Kniewald, J.: Application of Chinese Hamster Ovary cell culture as an alternative test system in toxicity testing of PCB-77, *Hrvatski veterinarski vjesnik*, **31** (2008) 1-2, 51-57
- [69] Kmetić, I., Radošević, K., Murati, T., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J.: Lindane induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster ovary (CHO K1) cells, *Toxicology mechanisms and methods*, **19** (2009) 518-523, doi: 10.1080/15376510903280107
- [70] Radošević, K., Tonković, T., Slivac, I., Kniewald, Z., Gaurina-Srček, V.: Comparison of Cytotoxicity Induced by 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Diethylstilbestrol in Fish CCO and Mammalian CHO-K1 Cell Lines, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **86** (2011) 3, 252-257, doi: 10.1007/s00128-011-0217-z
- [71] Radošević K., Novak, R., Slivac, I., Mihajlović, M., Dumić, J., Kniewald, Z., Gaurina-Srček, V.: Cytotoxic and apoptotic effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and diethylstilbestrol on CHO-K1 cells, *Food Technology and Biotechnology*, **49** (2011) 4, 447-452
- [72] Hayes, B. T., Anderson, L. L., Beasley, R. V., de Solla, R. S., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, S. V., Luque, H. E., McCoy, A. K., Muñoz-de-Toro, M., Oka T., Oliveira, A. C., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, E. L., Trudeau, L. V., Victor-Costa Bolivar, A., Willingham, E.: Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **127** (2011) 64-73, doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.015
- [73] Kniewald, J., Kniewald, Z.: The Ocean and its environment as a source of food production, U *Annual 2006 of the Croatian Academy of Engineering*. Publ. Croatian Academy of Engineering, Zagreb (2007) 15-36

- [74] Kniewald, Z., Granić, G., Kniewald, J.: Participation of Croatia as a Western-Balkan country in european scenarios about energy and greenhouse gas emissions. *Proceedings of the 17<sup>th</sup> CAETS Convocation Conference "Environment and Sustainable Growth"*, 23.-26. 10. 2007. Tokyo, Izd. The Engineering Academy of Japan, Tokyo (2007) 67-73
- [75] Hayes, B. T., Anderson, L. L., Beasley, R. V., de Solla, R. S., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, S. V., Luque, H. E., McCoy, A. K., Muñoz-de-Toro, M., Oka T., Oliveira, A. C., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, E. L., Trudeau, L. V., Victor-Costa Bolivar, A., Willingham, E.: Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. U *Annual 2015 of the Croatian Academy of Engineering*. Publ. Croatian Academy of Engineering, Zagreb (2016) 257-278 (reprint: objavljeno u *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **127** (2011) 64-73).