

ENDOKRINNÍ DISRUPCE

Co je endokrinní disrupce (ED)?

narušení hormonální rovnováhy organismů s potenciálními negativními následky pro celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové a behaviorálních funkce

Co jsou endokrinní disruptory(EDCs)?

- Definice Evropské komise (1999):
Exogenní látky nebo směsi, které mají potenciální schopnost způsobit endokrinní disrupci u zasaženého organismu, jeho potomků nebo (sub)populací
- Antropogenní i přírodní látky, které přímo nebo nepřímo ovlivňují hormonální systém a mohou působit na velmi nízkých koncentracích

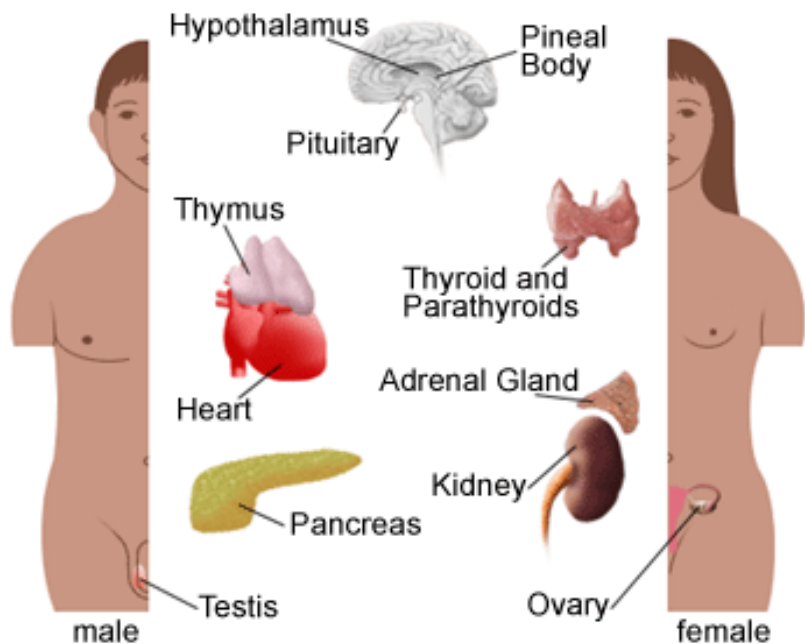
K čemu je endokrinní systém?

Endokrinní Funkce

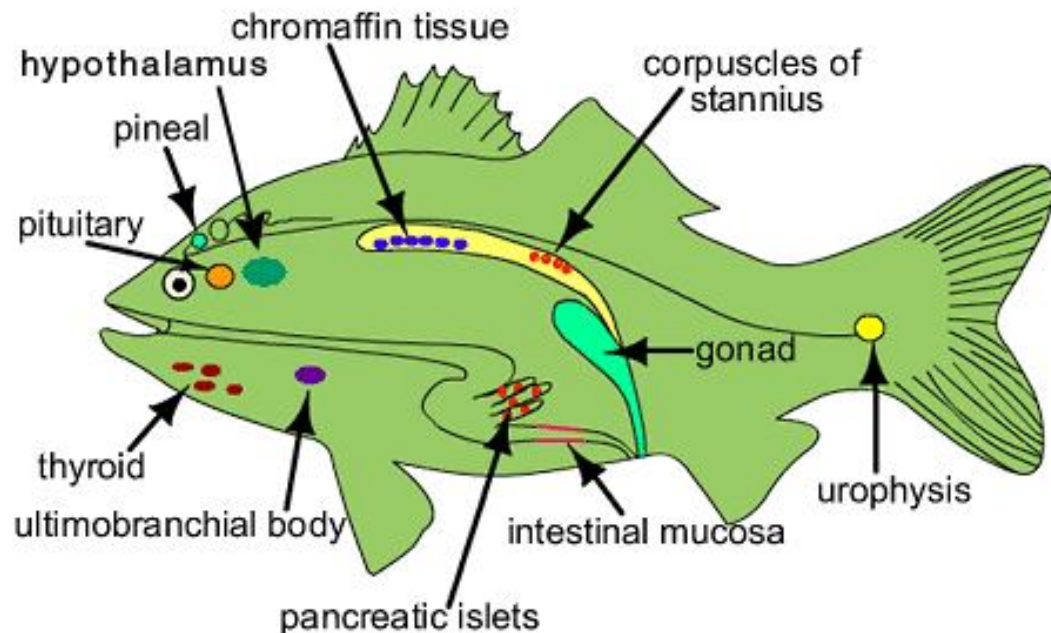
- Udržování vnitřní homeostázy
- Podpora růstu buněk
- Koordinace vývoje
- Koordinace reprodukce
- Zprostředkování odpovědi na vnější impulsy

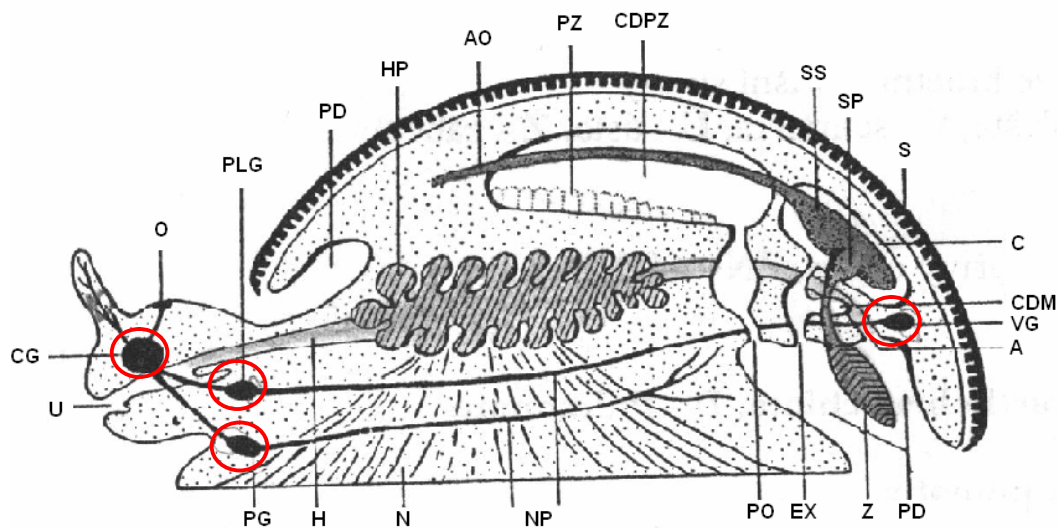
ES je spolu s CNS hlavní řídicí systém organismu

Endocrine System

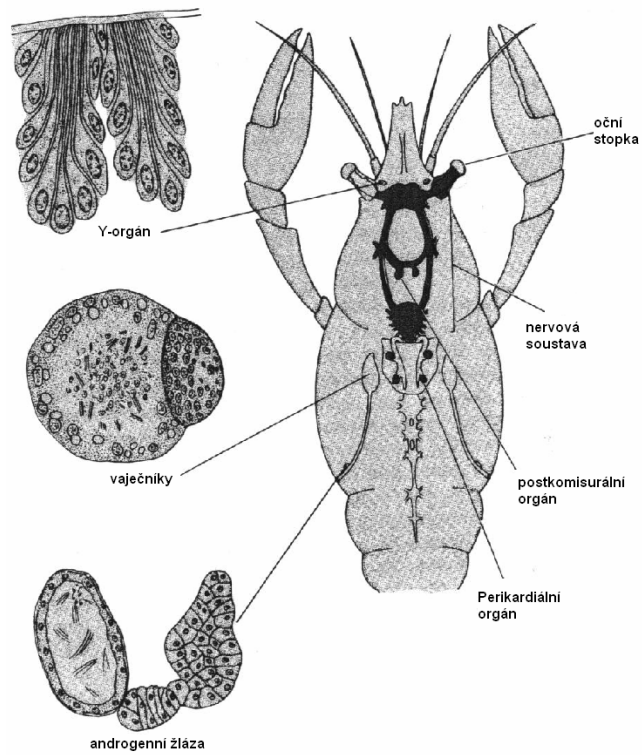


- gonadotropin, růstový h.
- estradiol, testosteron
- glukokortikoidy, mineralokortikoidy, thyroidy
- melatonin, kalcitonin, insulin, „oxytocin“ ...

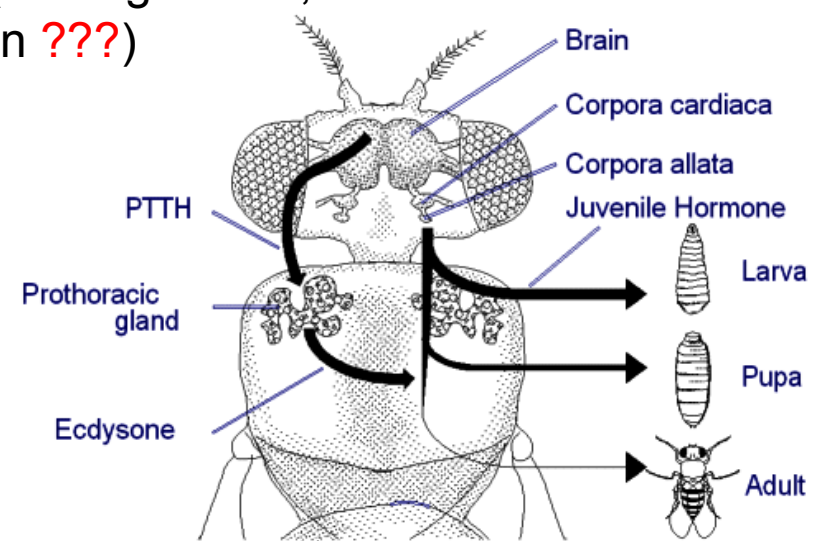


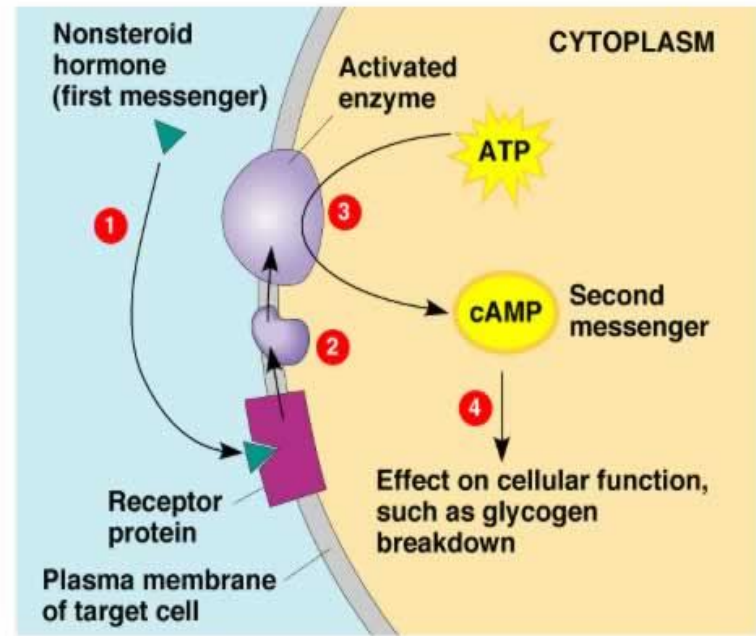
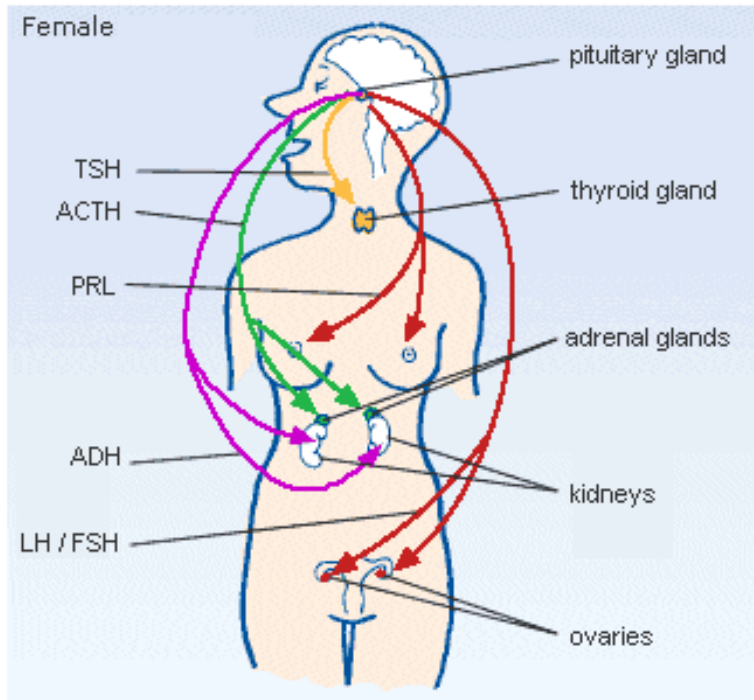


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy ???
- pohlavní hormony (progesteron, testosteron, estradiol) ???

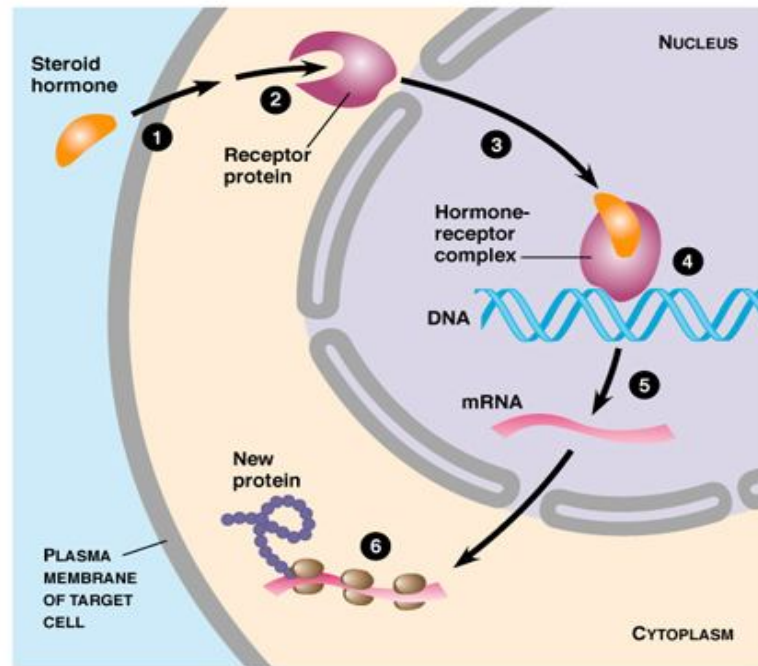
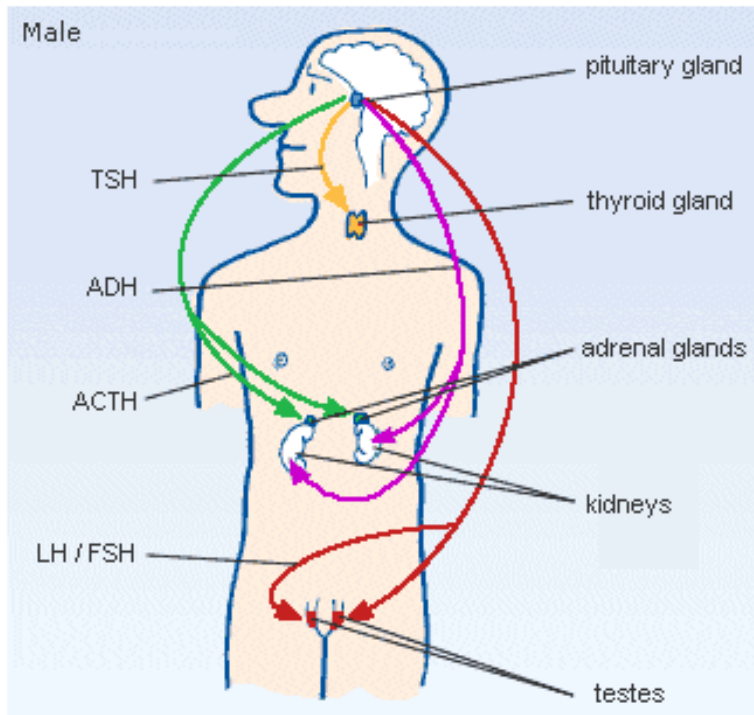


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy (svlékání, vývoj)
- pohlavní hormony (androgenní h.; estradiol, progesteron ???)





©Addison Wesley Longman, Inc.



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Mechanismy účinku EDCs

EDCs mohou působit

- **přímo**

vazbou na receptory jako:

- **agonisté** – chovají se jako přirozené hormony (např. ethinylestradiol, nonylphenol)
- **antagonisté** – blokování receptorů pro přirozené hormony (např. tamoxifen, PCB 77, p,p'-DDE)

- **nepřímo**

ovlivněním biosyntézy, metabolismu, vylučování a/nebo biodostupnosti přirozených hormonů

Příklad:

- **inhibice aromatázy** – blokování přeměny androgenů na estrogeny

Následky disrupce

Neschopnost udržet homeostázu

Narušení růstu & vývoje

Narušení odpovědi na vnější impulsy

Změny chování

Potlačená gametogeneze

Embryonální malformace

Zvýšená neoplasie nebo karcinogeneze

Mezi endokrinní disruptory patří

Pesticidy (herbicidy, insecticidy, ...)

Změkčovače plastů

Rostlinné metabolity

Farmaceutika (antikoncepce, léky,...)

Produkty rozkladu detergentů

Chemikálie z vaření & hoření

Antibiotika

Kovy

Látky s předpokládanou potencí pro endokrinní disrupci

Insecticides	Nematicides
Carbaryl	Aldicarb
Chlordan	DBCP (1,2-Dibrom-3-chlorpropan)
DDT and DDE	
Dicofol	Fungicides
Dieldrin	Benomyl
Endosulfan	Fenarimol
Lindan	Mancozeb
Methoxychlor	Maneb
Mirex	Tributyltin compounds (TBT)
Oxychlordan	Triphenyltin compounds (TPT)
Parathion	Vinclozolin
Toxaphen	Zineb
Pyrethroide	
Herbicides	Industrial chemicals
Alachlor	Alkylphenols
Amitrol	Bisphenol A
Atrazin	Dioxine (2,3,7,8-TCDD)
2,4-Dichlorphenoxy-acetic acid	Pentachlorphenol
Metribuzin	Phthalate
Nitrofen	Polybromated Biphenyls (PBB)
2,4,5-Trichlorphenoxy-acetid acid	Polychlorinated Biphenyls (PCB)

(Oehlmann & Markert, 1997)

Estrogenní potenciál látek

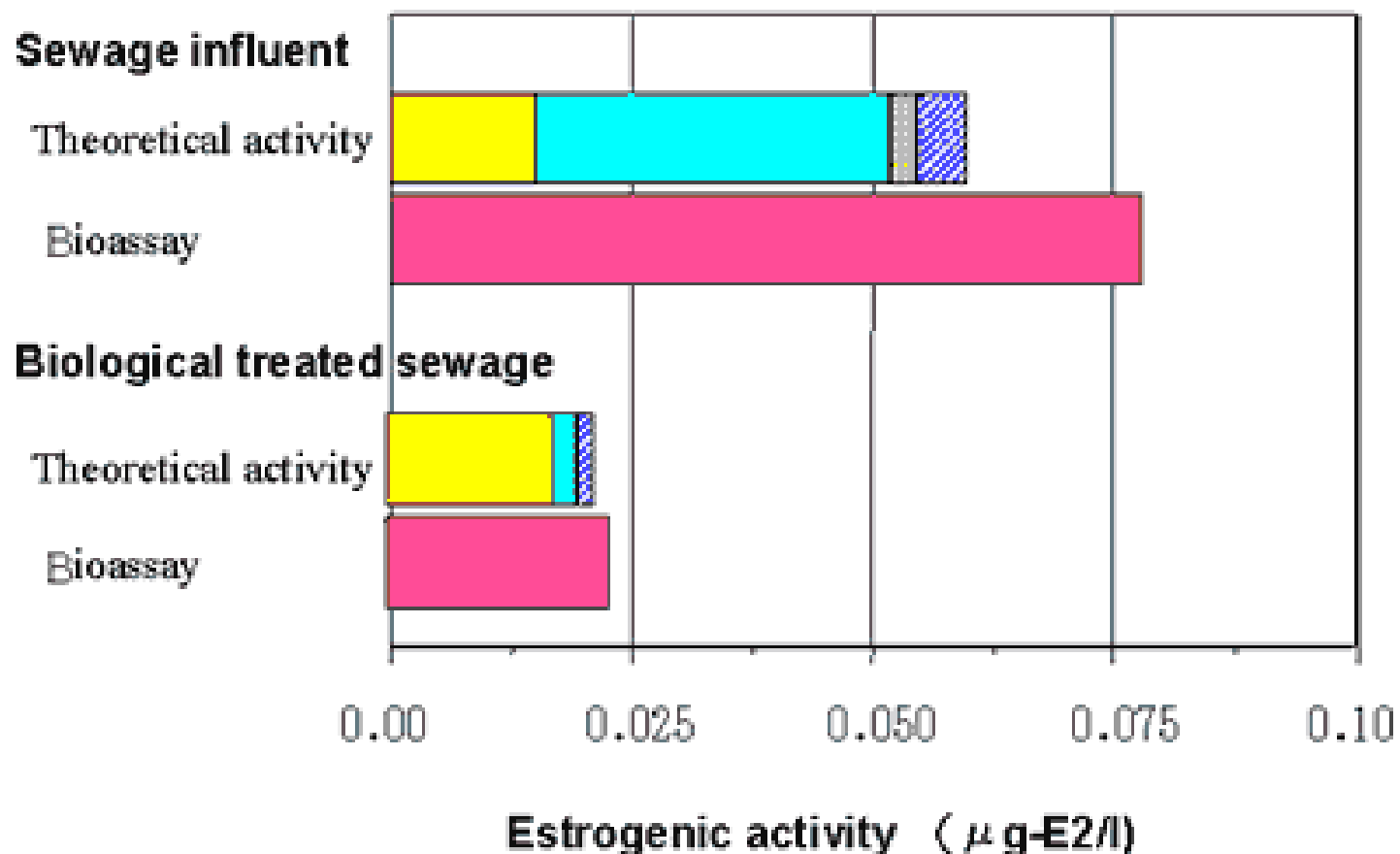
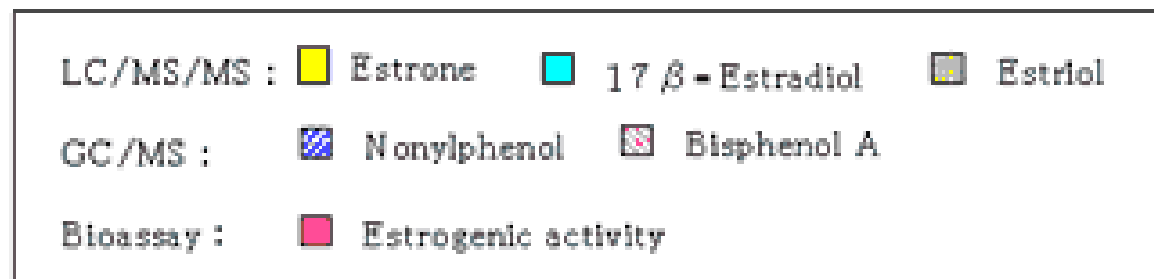
- Jednotlivé polutanty se liší svým estrogenním potenciálem (silou účinku).
 - Lze ho vyjádřit pomocí EEF – estradiol ekvivalentní faktor
- ⇒ Ten se stanovuje většinou pomocí standardních *in vitro* testů (E-SCREEN, kvasinkový test...)

- **Klíčový faktor vlivu xenoestrogenů na organismy!**

17 β -Estradiol	1
Ethynyl-estradiol	1.2
Estrone	1.6x10 ⁻²
Estriol	1.0
Genistin	2.6x10 ⁻⁴
Diadzein	1.3x10 ⁻⁴
o,p'-DDT	9.1x10 ⁻⁶
Dieldrin	2.4x10 ⁻⁷
4-nonylphenol (NP)	2.3x10 ⁻⁵
4-octylphenol (OP)	1.4x10 ⁻⁶
bisphenol A	7.8x10 ⁻⁶
diethylphthalate	3.2x10 ⁻⁸

(ER-CALUX assay; Legler *et al.*, 1999 a 2002)

Estrogenní aktivita v ČOV



Hormonální regulace biologických procesů je společná charakteristika živočišného kmene – projevy ED u obratlovců i bezobratlých

Následky ED ve volně žijících organismech:

- Abnormální funkce a vzhled štítné žlázy
- Snížená plodnost
- Snížená líhnivost
- Demaskulinizace a feminizace samců
- Defeminizace a maskulinizace samic
- Snížené přežívání mláďat
- Změna funkce imunitního systému
- Změny chování
- Poruchy svlékání a růstu

⇒ vliv na populaci ⇒ vliv na ekosystém

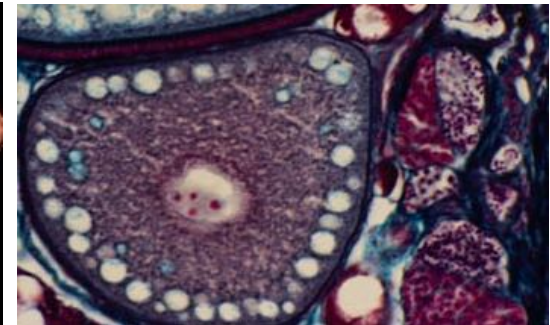
Důležitá fakta o účincích ED ve volně žijících živočiších

- Účinky se projeví po expozici i velmi malými dávkami látek
- Účinky se pravděpodobněji projeví v mláďatech, než v dospělcích
- Účinky jsou velmi ovlivňovány načasováním expozice - stupněm vývoje, na kterém byl jedinec exponován
- Účinky odlišné během doby života organismu (fetus vs. embryo vs. dospělec)
- Účinky často opožděné
 - ke kompletním projevům nemusí dojít až do dospělosti

Projevy u vodních obratlovců

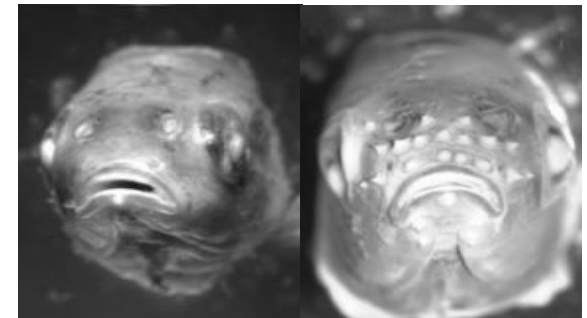
Malformace-změny v pohlavních orgánech. Příklady:

- **Hemi- a minipenis u aligátorů** na Floridě, Jezero Apopka – způsobeno únikem DDT



- **Feminizace samců ryb (ovotestes)** v povrchových vodách znečištěných odpadními vodami v severní Americe a v Evropě

- **Maskulinizace samic kapra** pod výpustmi z papíren



- **Maskulinizace samic střevle potoční** v tocích pod farmami živočišné výroby

Endokrinní disrupce u plazů

- Samci aligátorů z jezera Apopka (Florida) demaskulinizováni
- Výrazně zmenšené sekundární pohlavní znaky (1/3 až 1/2) proti normálním zdravým samcům
- Nízké hladiny testosteronu i estrogenu, ale měli více estrogenu než testosteronu
- Vylíhlá mláďata byla buďto samice s normálními vaječníky nebo samci s intersexem (žádní normální samci) a byla u nich zvýšená mortalita
- Byla snížena líhnivost v populaci



Endokrinní disrupce v populacích ryb

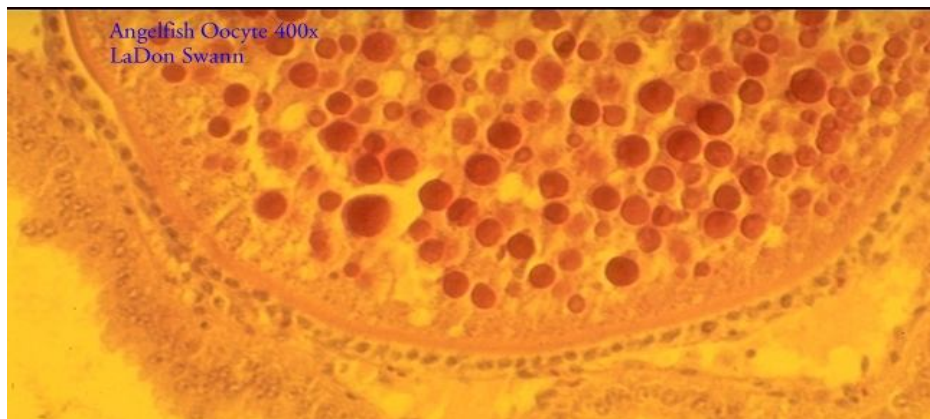
- V závislosti na látce:
 - Feminizace samců
 - Maskulinizace samic
- Změněný poměr pohlaví
- Snížená plodnost, kvalita a kvantita spermatu
- Vymizení populací
 - Jezerní pstruh v jezeře Ontario



Důvod intersexuality v rybách?

- Samci ryb jsou 'feminizováni' estrogeními látkami.
- Mnoho látek s estrogení aktivitou je přítomno ve výpustích ČOV a tak uvolňováno do řek.
- Steroidní estrogeny, jak přírodní (např. estradiol, estrone) tak syntetické (např. ethynylestradiol) jsou pravděpodobně základní příčinou.

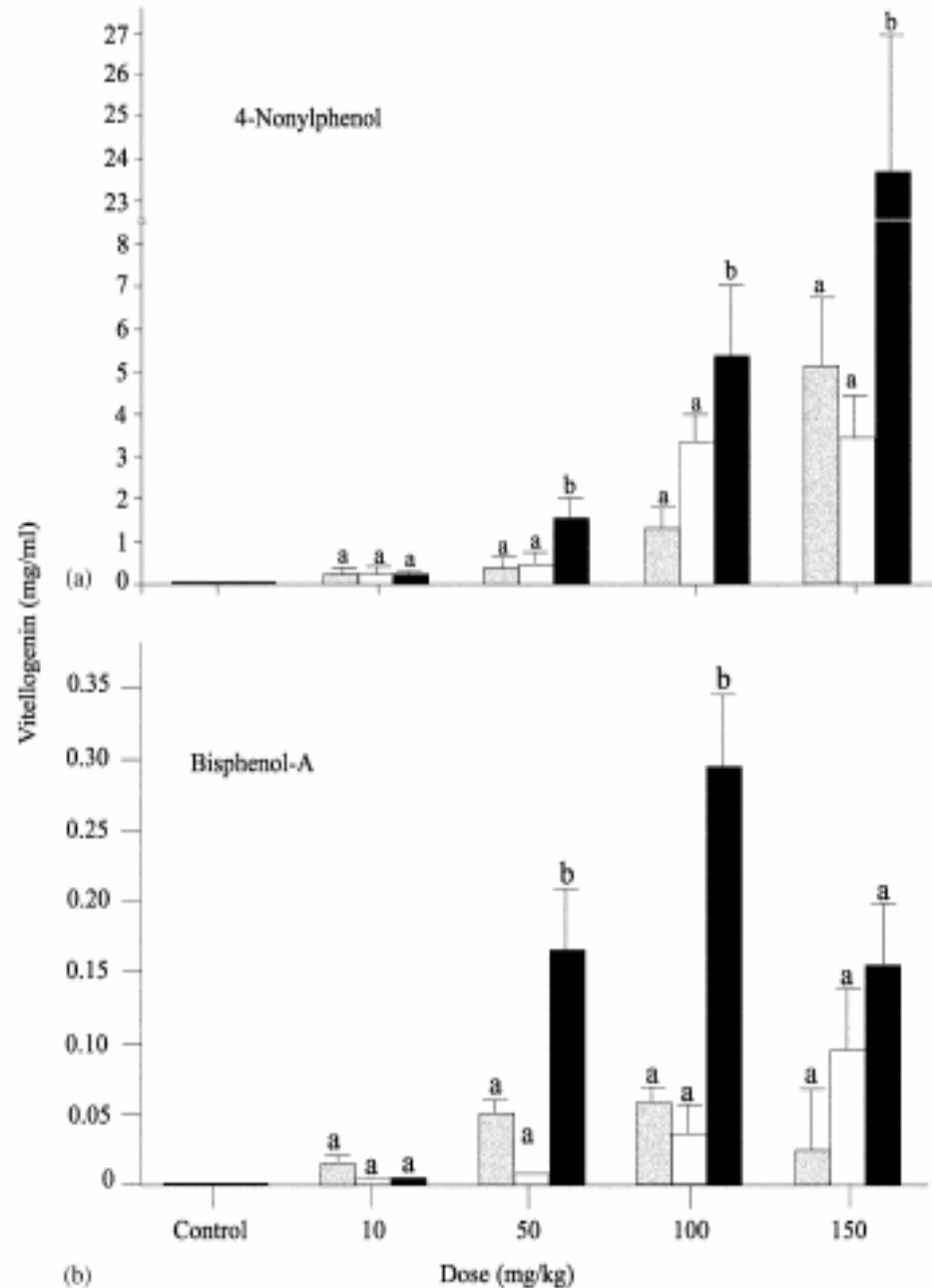
- **Řada důkazů ED a narušení reprodukce v rybách v tocích pod výpustěmi ČOV:**
 - **Poměr pohlaví: velká převaha samic**
 - **Intersex: zvýšený výskyt**
 - **Neobvyklý vývoj ovárií**
 - **Zvýšené hladiny vitellogeninu (proteinu vaječného žloutku) v dospívajících samcích**



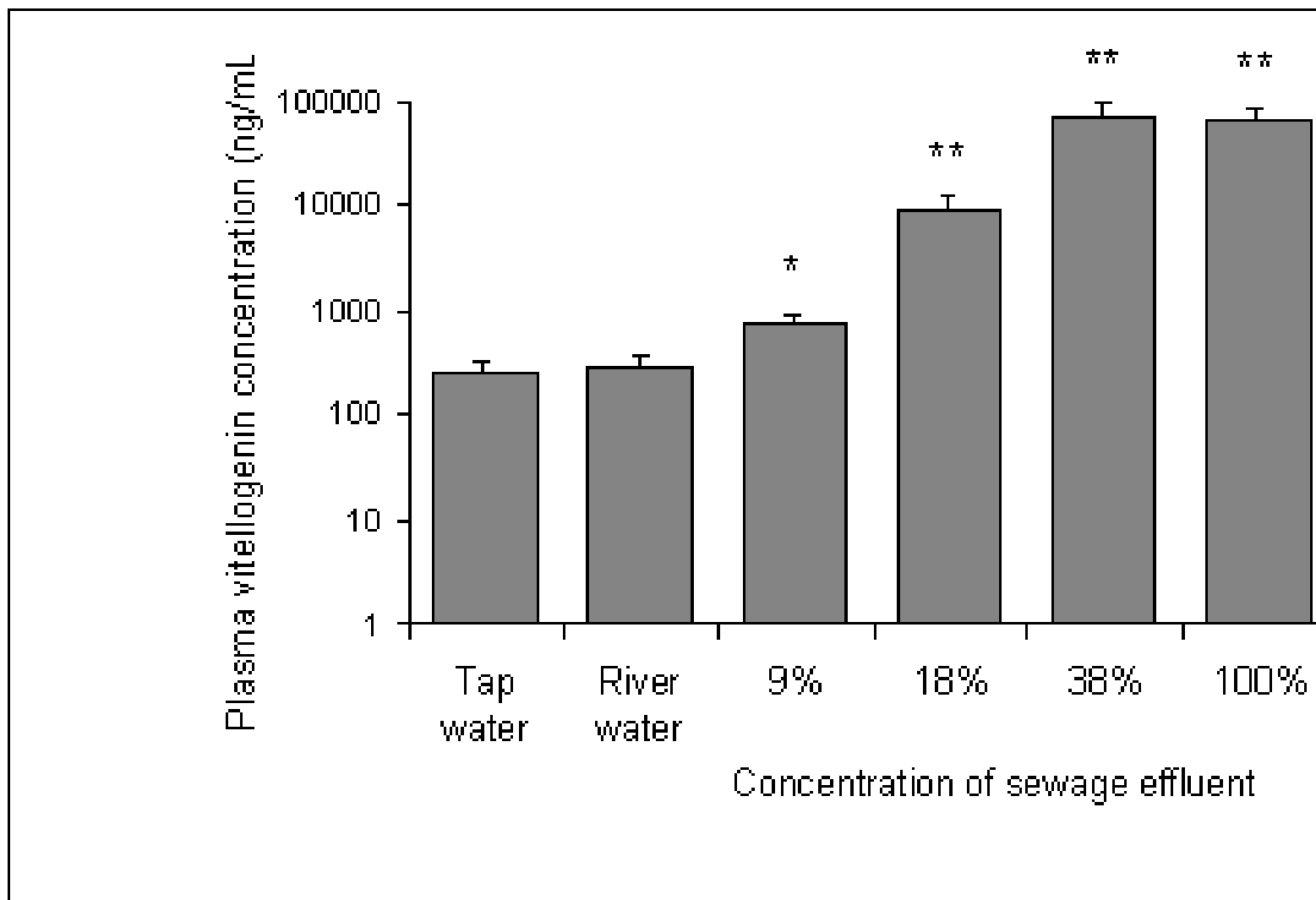
Expozice dospělých ryb estrogenními látkami vede k feminizaci samců

Halančík
(*Fundulus heteroclitus*)

- 3 populace
- 2 estrogenní látky
 - NP, BPA



Produkce vitellogeninu v samcích ryb exponovaných látkami z výpustí ČOV v prostředí



Ekosystémová studie – Kanada

2000-2005

Estrogen (17 α -ethynylestradiol) aplikován
do jezera – cílová konc. 5 ng/L

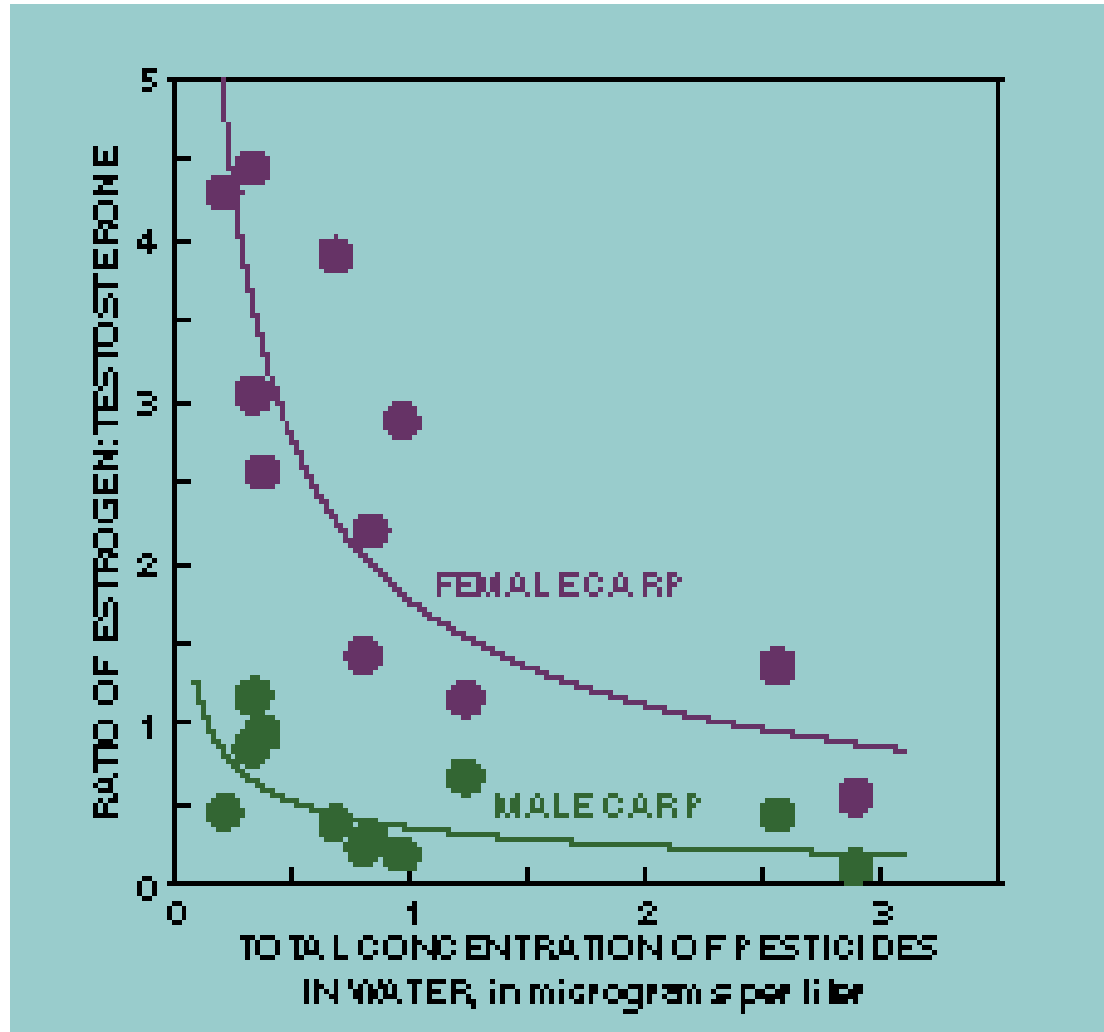
(v povrchových vodách v Evropě 0–23ng/L)

- poločas života 12 dní
- aplikován 3x týdně po 21 týdnů (jaro-podzim)
- 1. rok - nejvýznamnější účinky u ryb s kratší dobou života, které se třou jen 1x za sezonu (střevle) – **zvýšení hladin VTG 9000x u samců, zpoždění vývoje gonád**
- 2.,3. rok – vajíčka v samčích gonádách, pokles reprodukce, téměř žádná nová generace střevlí – **kolaps populace**
 - podobné, ale méně výrazné účinky u tloušťů - výskyt **intersexu** (delší doba života, více tření za sezonu)
- 3. rok pokles populací a méně mladých i u dravých ryb – pstruha jezerního – především díky nedostatku potravy
⇒ OVLIVNĚNÍ CELÉHO EKOSYSTÉMU
- Po ukončení aplikace – za 2 roky – **recovery** – znovubudování populací střevlí a tloušťů, zvýšení populačních hustot pstruha

(Kidd et al., 2006, 2007)



Některé kontaminanty mohou působit jako androgeny (anti-estrogeny)



Organocíny

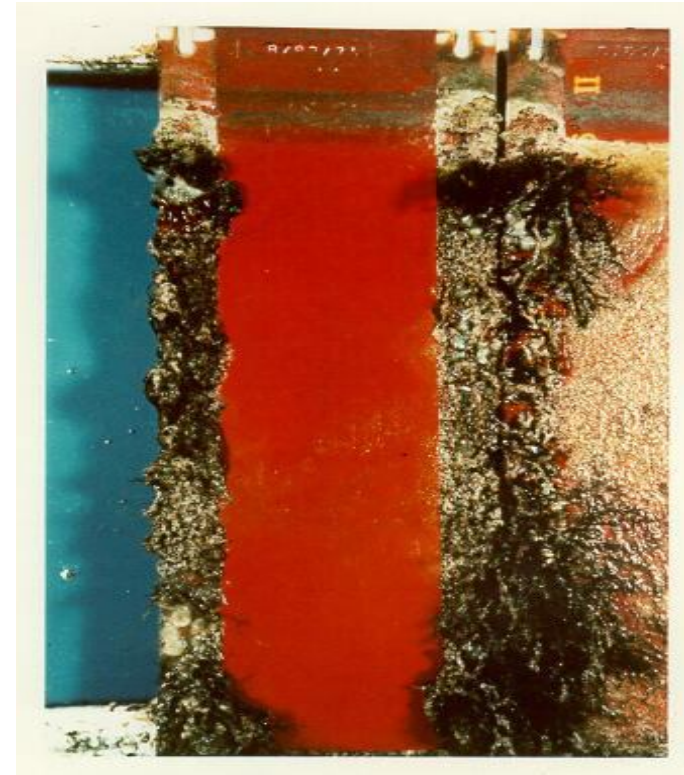


Stabilizátory plastů

Biocidy: Fungicidy
Insekticidy
Bactericidy

Nátěry proti zarůstání a
nánosům na trupech lodí
(Anti-fouling paints)

TBT = tributylcín



Pomalá biodegradace

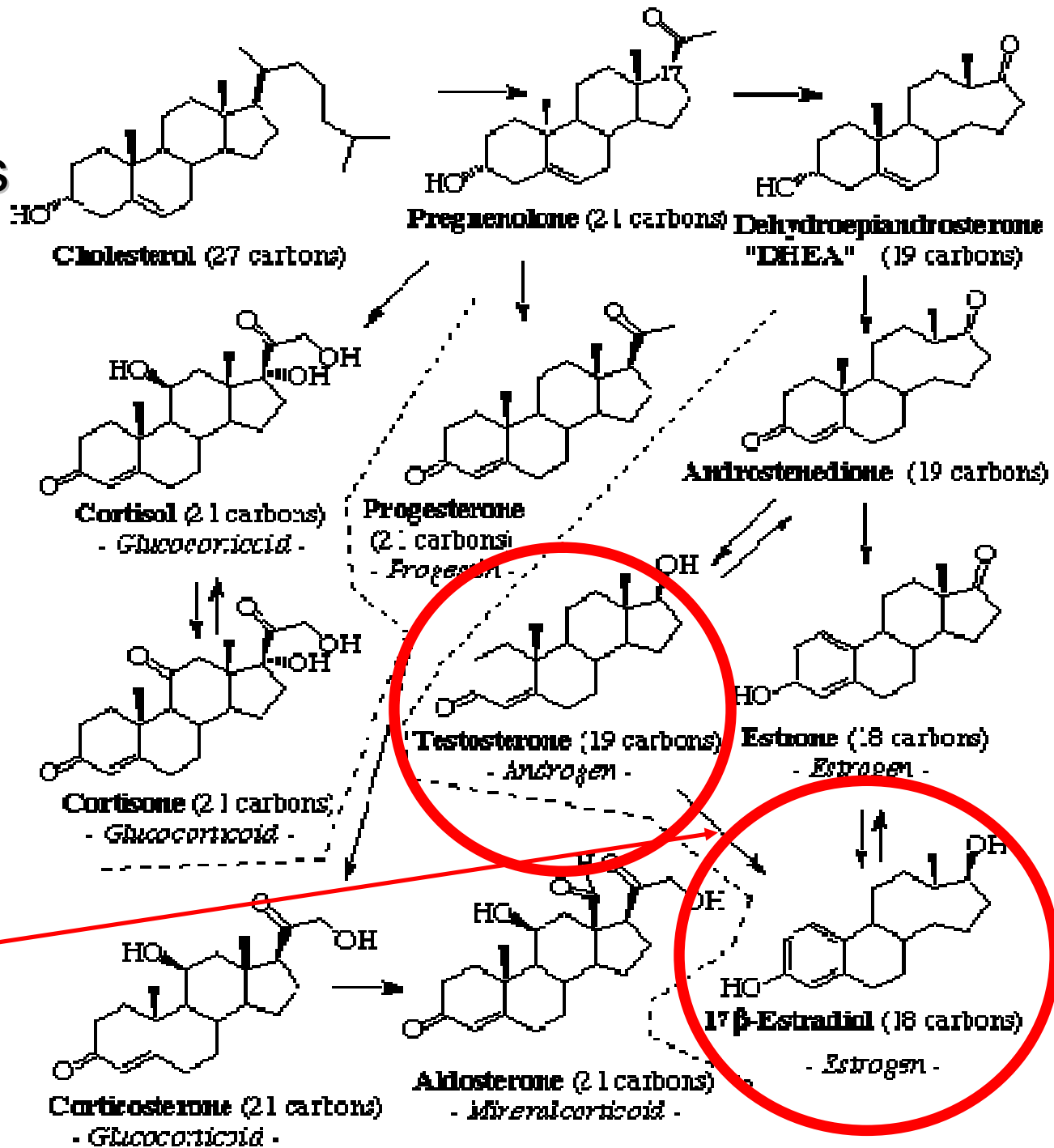
Akumulace ve vodě a sedimentu

Bioakumulace

TBT používán na lodě od 60. let
První efekty na měkkýších - 70. léta
Zákaz používání v EU - 2003

Image by M & T Chemicals Inc., Woodbridge, NJ.

Vliv na metabolismus steroidních hormonů

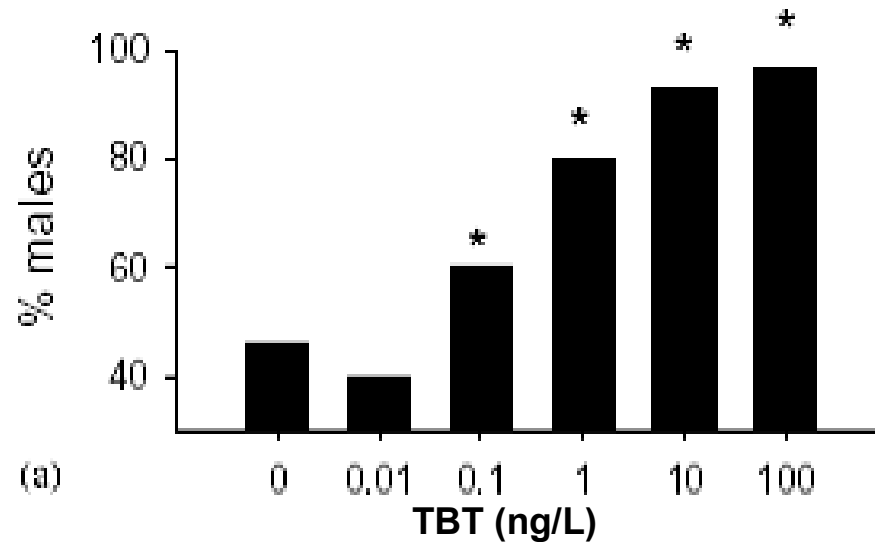


TBT



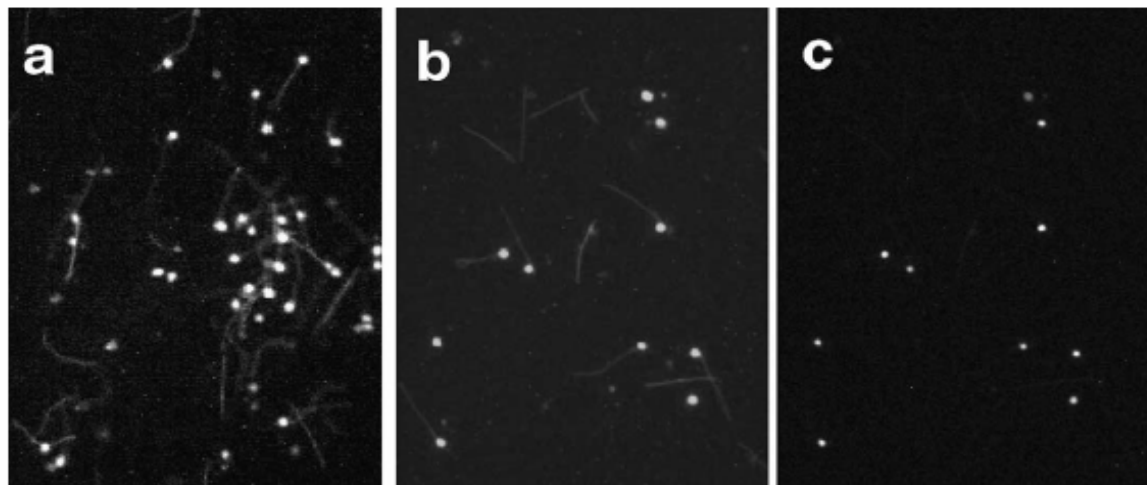
P450 aromatase

TBT způsobuje maskulinizaci ryb



Danio pruhované
(*Danio rerio*)

Ryby exponované TBT od vykolení po 70 dní



Spermie po 3 - 5 měsících expozice

McAllister & Kime, 2003

Endokrinní disrupce u dravých ptáků

DDT a ztenčování skořápek v dravých (i rybožravých) ptácích

- DDT bylo hojně používáno přes 30 let
- Biokoncentruje se v potravním řetězci
- V dravých ptácích způsobilo ztenčování skořápek
- To způsobilo, že se mnoho vajíček rozbilo ještě před vylíhnutím
- Populace některých dravých ptáků dramaticky poklesly
- Po zákazu DDT (70. léta) zase vzrostly

Přírodní populace: Dravci a DDT

Mechanismus není zcela znám

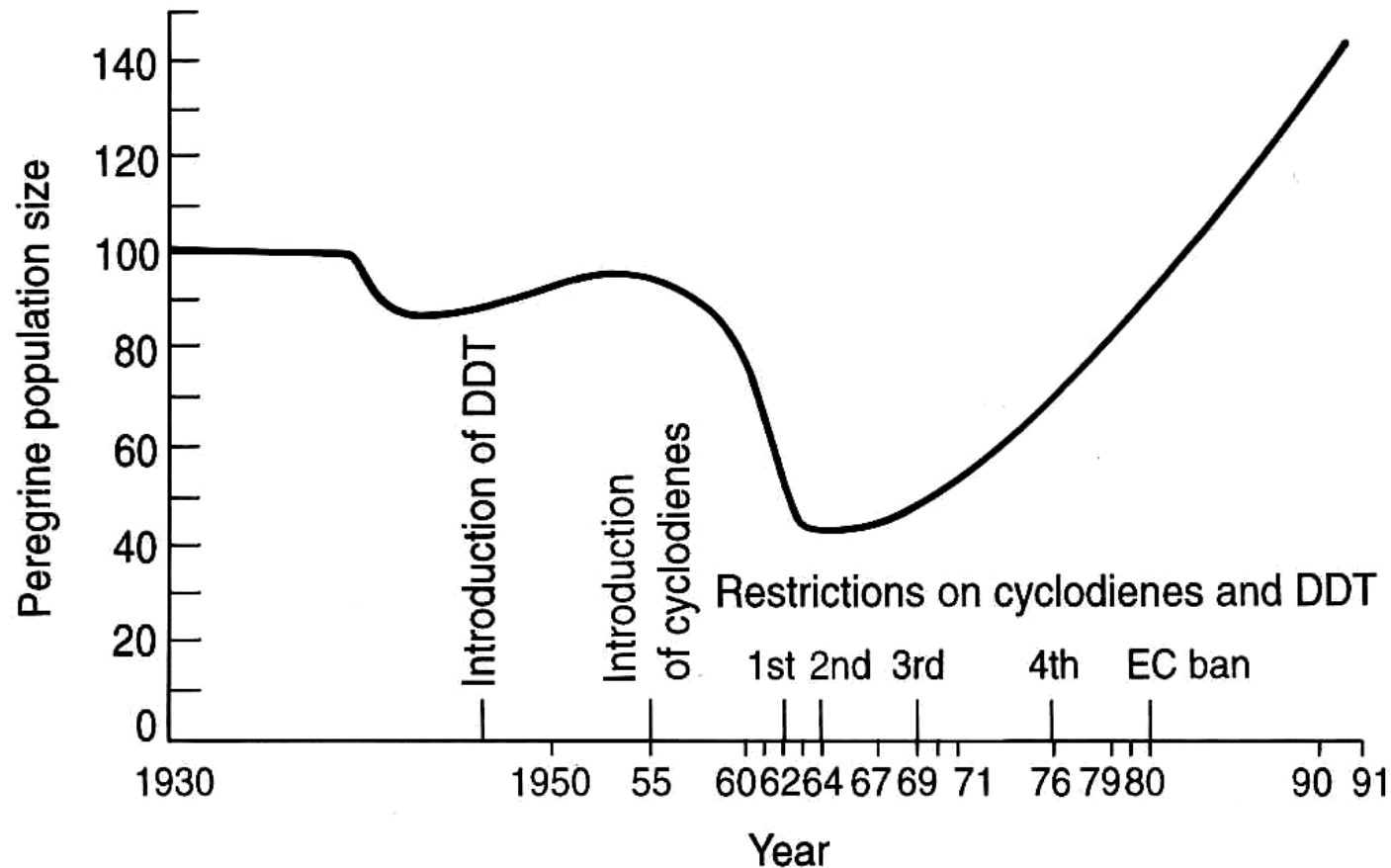
hypotéza: ovlivnění prostaglandinu → transportu Ca a Na_2CO_3

zjištěno ztenčení skořápek po expozici estradioly

⇒ na úrovni ED ?



Populace sokolovitých ptáků ve Velké Británii



Narušení endokrinního systému obojživelníků

U obojživelníků působí ED's na několika úrovních:

- v embryonálním a larválním období
- při metamorfóze
- v období diferenciacce gonád
- v období sekundární pohlavní diferenciacce a v dospělosti (narušením chování)

**Obojživelníci mají vyšší citlivost k
znečištění prostředí (transdermální přenos)**



Endokrinní disrupce u obojživelníků

Ovlivnění procesu metamorfózy

Následkem předčasné metamorfózy vznikají **extrémně malí jedinci**, neschopní reagovat na změny přírodních podmínek, živit se větší potravou a s nízkými energetickými rezervami.

Možný abnormální vývoj končetin - výskyt **malformací končetin**.



Ovlivnění sexuálního vývoje

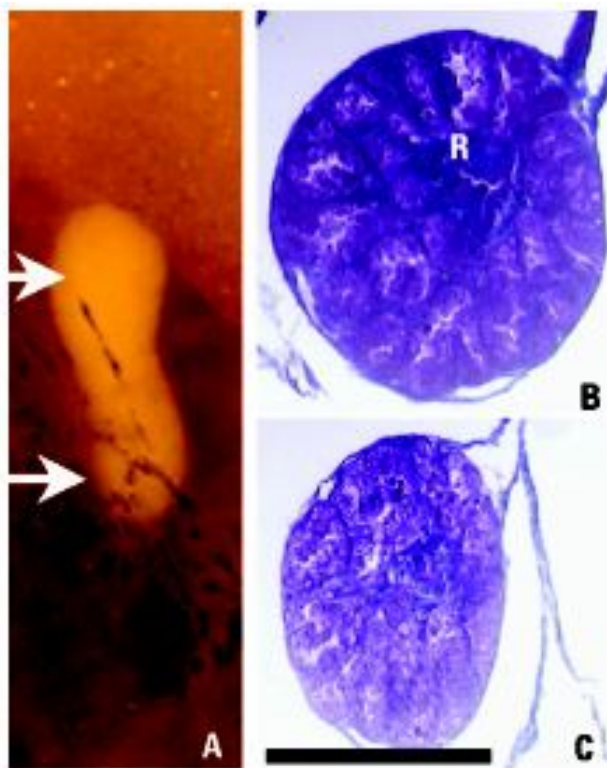
Některé EDCs ovlivňují regulační systém pohlavních steroidů. Pokud takové EDCs působí na populaci larev v období vývoje gonád, dochází ke **změně poměru pohlaví, intersexu**.

Ovlivnění druhotných pohlavních znaků - velikost svalů *m. dilatator laryngis*. U samců je tento sval vyvinut mohutněji. Při působení xenoandrogenů se sval zvětšuje.

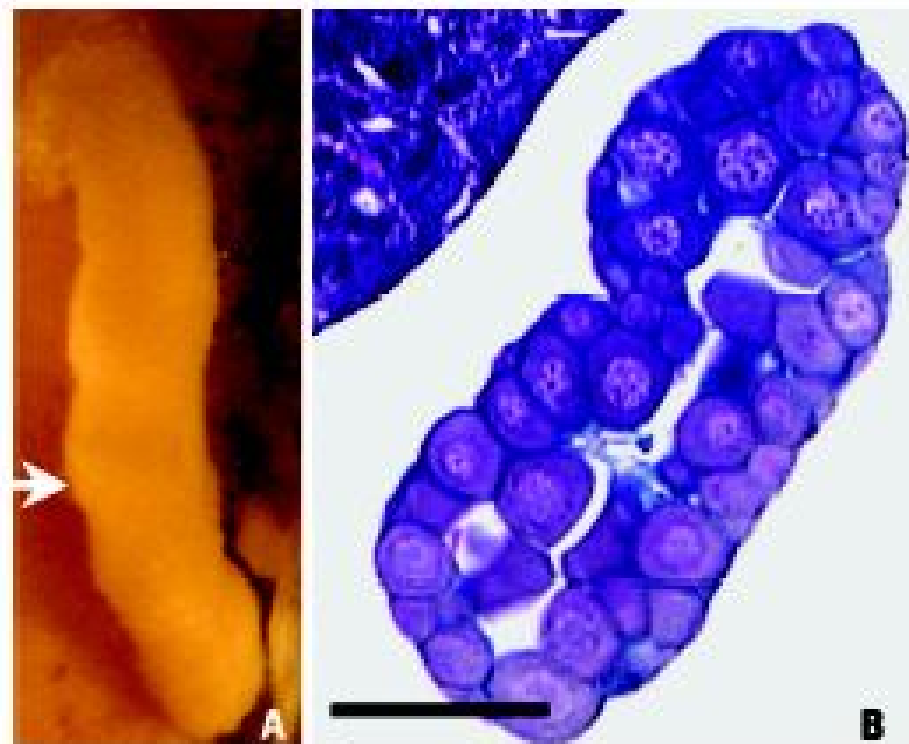


Michel Cussan

Rana pipiens (skokan levhartí)

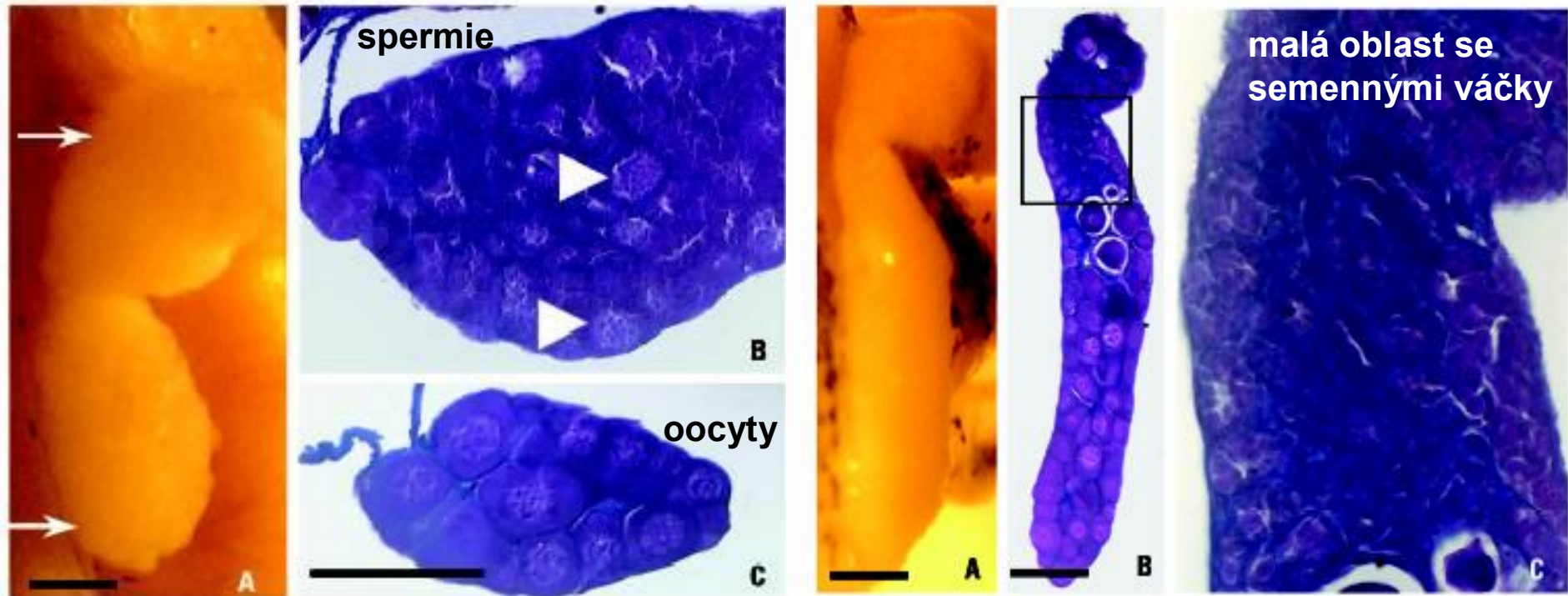


Kontrolní samec - testes



Kontrolní samice - ovaria

Expozice atrazinem způsobuje hermafroditismus u samců žab

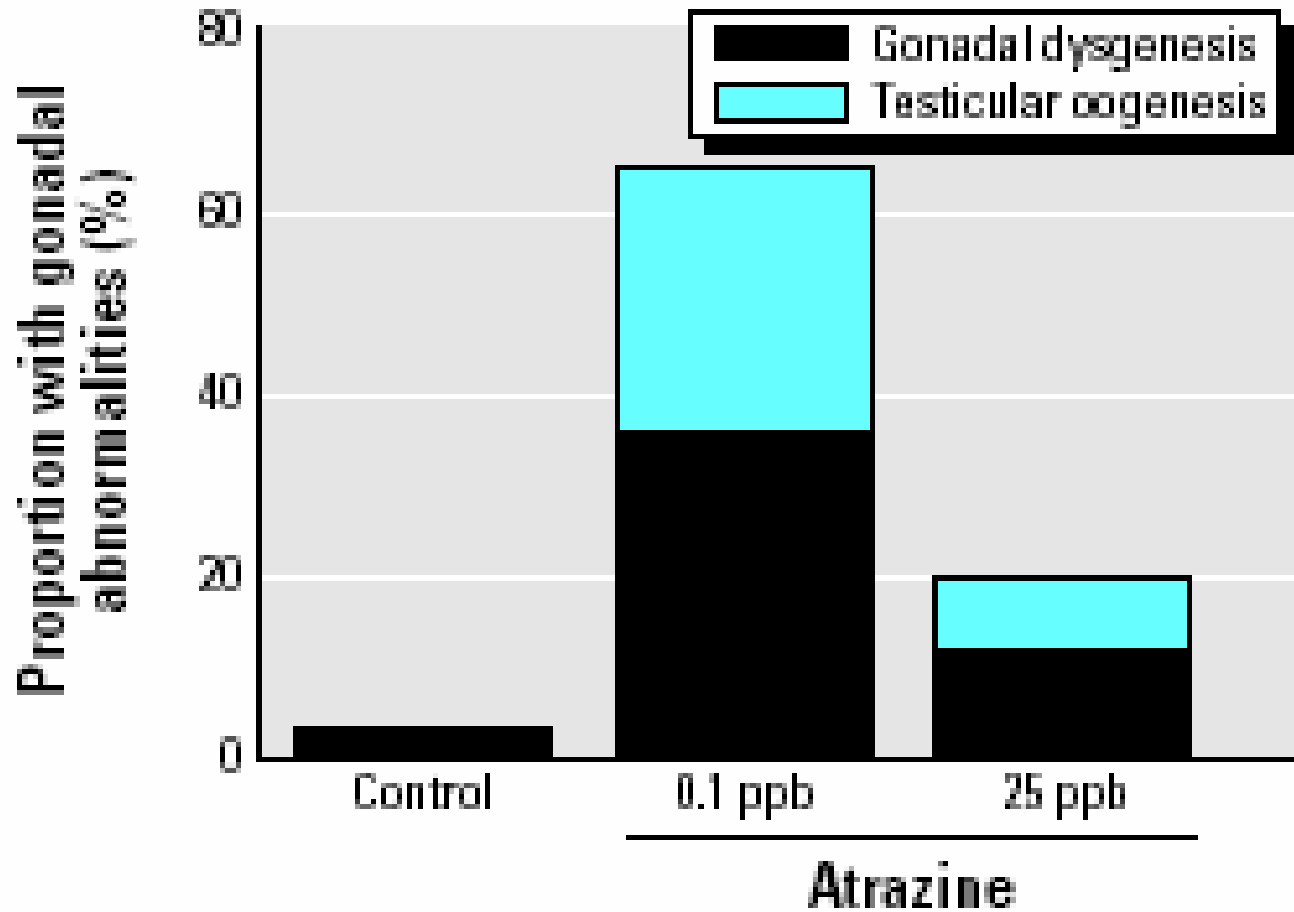


Samec – testes → oocyty v testes

Samec – testes → ovaria

0.1 ppb atrazin (30 krát méně než US limit na pitnou vodu a 2000 krát méně než standard pro krátkodobou lidskou expozici)

Abnormality gonád u samců žab exponovaných atrazinem



Projevy ED u bezobratlých:

Narušení reprodukce, rodivosti (fekundita)

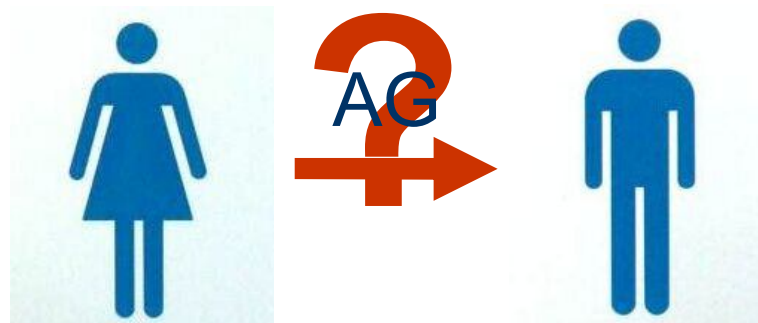
Poruchy růstu, sexuálního dozrání (maturace)

Zvětšení/zmenšení pohlavních žláz

Narušení sexuálního dimorfismu, Intersex, Imposex,

další procesy řízené hormony: pigmentace,

regenerace končetin, diapauza



Imposex

- Zkratka pro „superimposed sex“:
dodatečná tvorba samčích pohlavních znaků v samicích gonochoristických předožábřích plžů, která vede ke sterilitě
- Je indukován působením přírodních i syntetických androgenů
- Byl pozorován u více než 160 druhů na světě



Intersex

- Změna nebo nahrazení samičích pohlavních znaků u samic samčími znaky a naopak
- Postupná přeměna morfologie samičích pohlavních znaků k morfologické struktuře samčích znaků a naopak
- Je hodnocen jako Intersexový Index (ISI) = průměrná hodnota všech stupňů intersexu ve vzorku

Superfemale

- abnormální velikost, počet nebo funkce samičích pohlavních orgánů
- Je indukován působením přírodních i syntetických estrogenů

Projevy intersexu u korýšů

**Blešivec potoční
(*Gammarus fossarum*)**

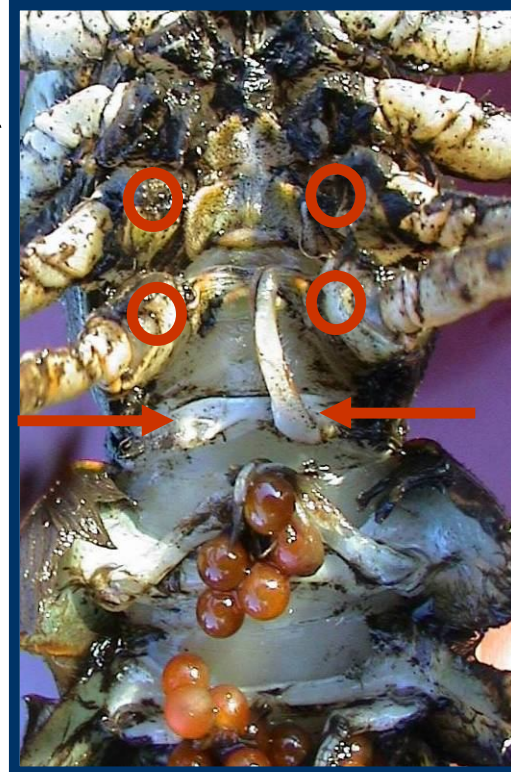


**Intersex u přírodní populace
raka bahenního (*Pontastacus
leptodactylus*)**

Ostrava-Karviná

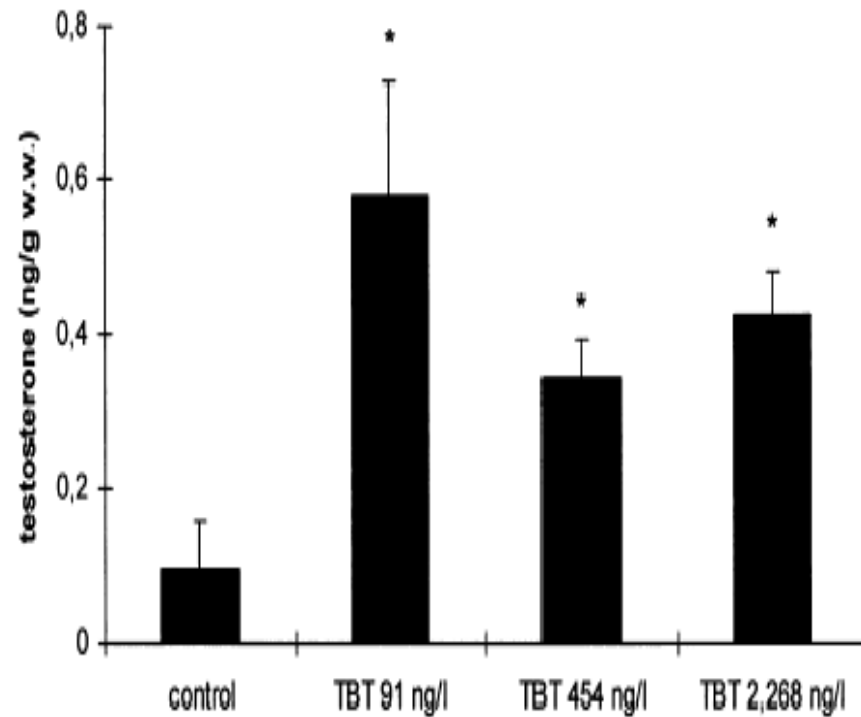
- zatopené poklesové plochy
- reflatce

- Chráněný druh

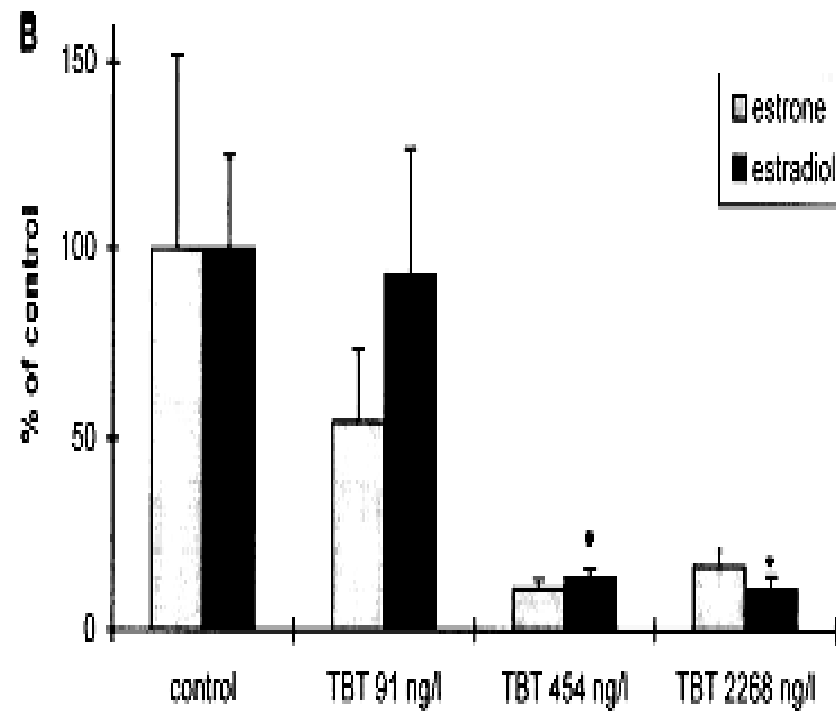


TBT narušuje hormonální rovnováhu u měkkýšů

Velká kobercová škeble (Ruditapes decussatus)



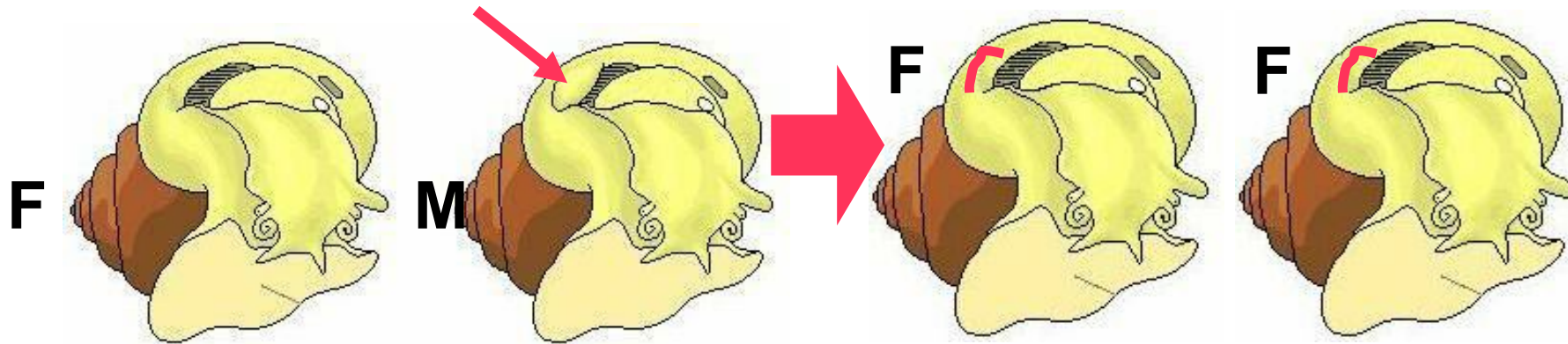
Hladina testosteronu



Hladina estrogenů

Morcillo & Porte 2000

IMPOSEX u předožábřých plžů



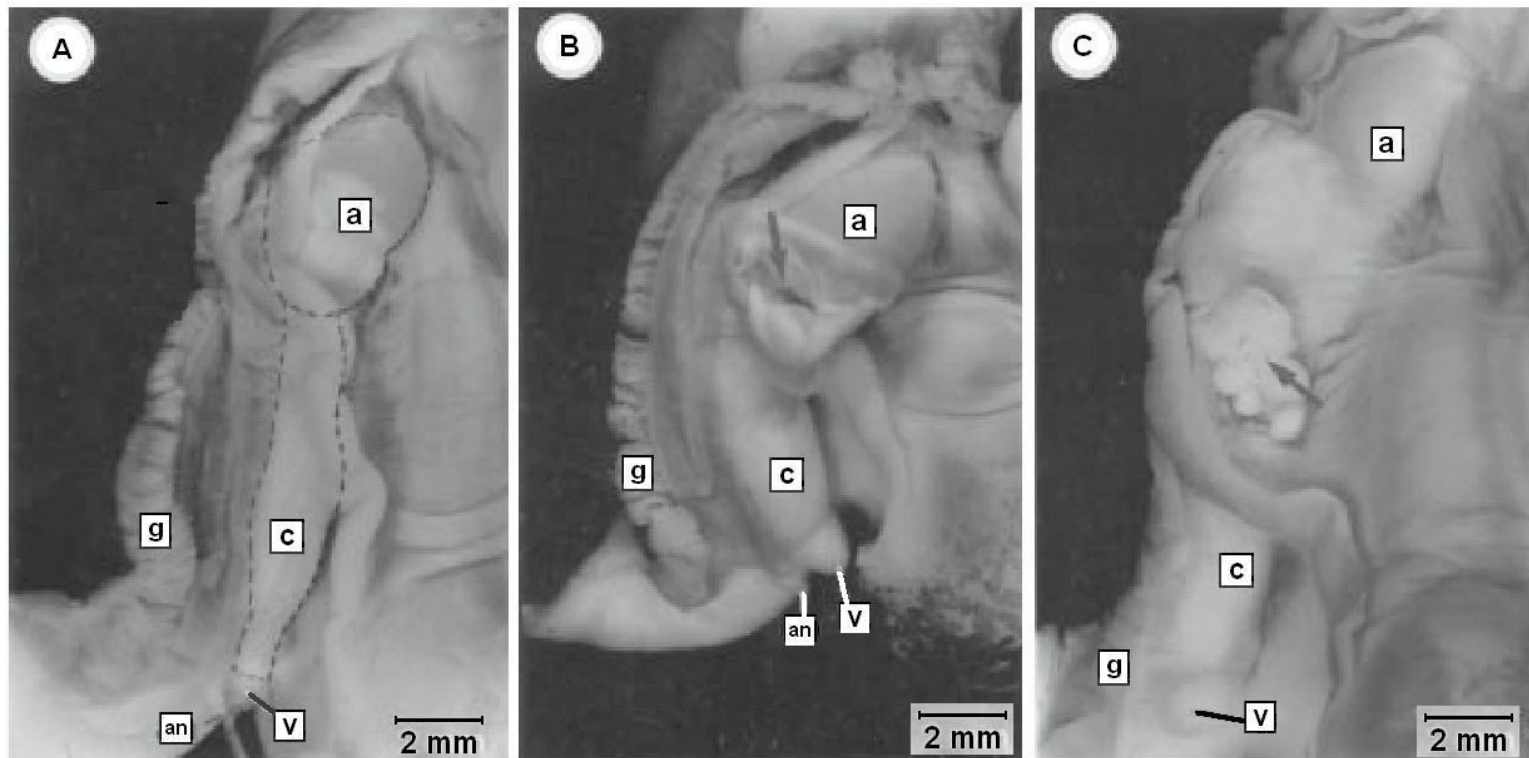
Nepřímý xeno-androgenní efekt organocínů (persistentní, používány na nátěry lodí)

- Tvorba penisu a chámovodu u samic
- Maskulinizace samic
- Efekt chronické expozice biocidu TBT u necílových organismů (EC50=0.72µg TPhT/kg u *P. antipodarum*)

Důsledek: lokální vymizení populací měkkýšů

SUPERFEMALE u předožábřých plžů

Estrogenní efekt alkylfenolů na samičku ampulárky
(*Marisa cornuarietis*)



A - negativní kontrola

B, C – expozice BPA
superfemale – ruptura oviduktu způsobená
nadprodukcí vajíček

Širší souvislosti kontaminace organocíny ve vodním prostředí

Kolaps populace měkkýšů



Snížení spásání řas a makrofyt



***Velký rozvoj populací vodních rostlin,
zarůstání vodních toků***



Pokles populací ryb

**Takto je dramaticky ovlivněn celý
akvatický ekosystém**

Standardní testy OECD

- **Androgenised Female Stickleback Screening Assay** - anti-androgenní aktivita u koljušky
- **21-day Fish Endocrine Screening Assay** – ED u střevle a dania
- **Repeat Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats** - ED u potkanů
- **Hershberger Assay** – detekce androgenní agonistů, antagonistů a inhibitorů 5 α -reduktázy u potkanů
- **Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay** – *in vitro* estrogení aktivita na receptoru lidských rakovinných buněk
- **Uterotrophic Bioassay** – estrogení aktivita u potkanů
- **Reprodukční standardní *in vivo* testy** – ryby, ptáci, hlodavci, kroužkovci, hlísti, chvostoskok, dafnie

Problémy testování ED

- Prokázání kauzality expozice – efekt
- Nelinearita křivky dávka/odpověď
- Nedostatečné informace o mechanismech účinku, zaměření pouze na efekty na receptorech
- Problém environmentálních vzorků, směsí
- Nedostatečné informace o ED potenciálu látek
- Velmi nízké účinné koncentrace EDCs

Shrnutí

- Endokrinní disruptory jsou rozšířeny v prostředí a zahrnují přírodní i antropogenní látky
- Mají různou chemickou strukturu a působí na velmi nízkých koncentracích – obtížně chemicky stanovitelné
- Mohou mít závažné důsledky pro volně žijící organismy, neboť přímo narušují reprodukci a tím i „evoluční kondici“
- Biologické testy hrají významnou roli v detekci, charakterizaci potenciálního vlivu endokrinních disruptorů, a hodnocení jejich odstraňování v čistírenských procesech, což je velmi aktuální problematika