



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

ENDOKRINNÍ DISRUPCE

Klára Hilscherová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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?

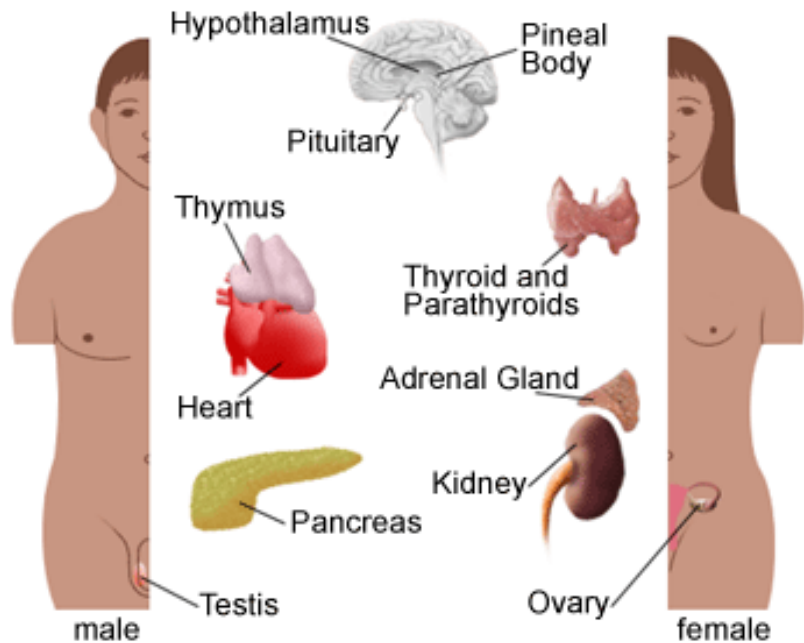
Endokrinní Funkce

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

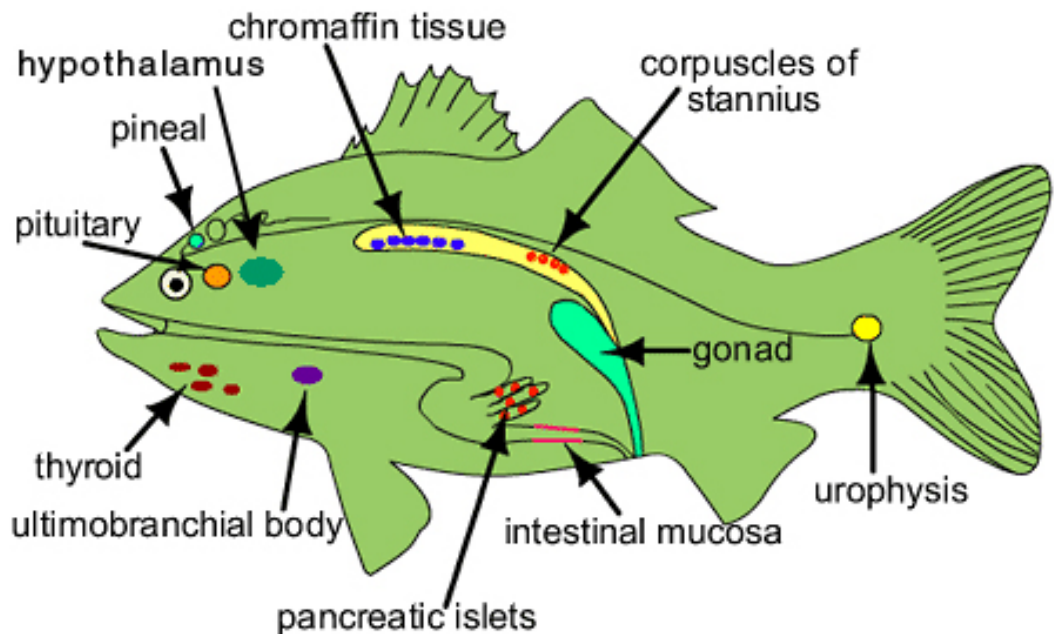
ES je spolu s CNS hlavní řídicí systém organismu

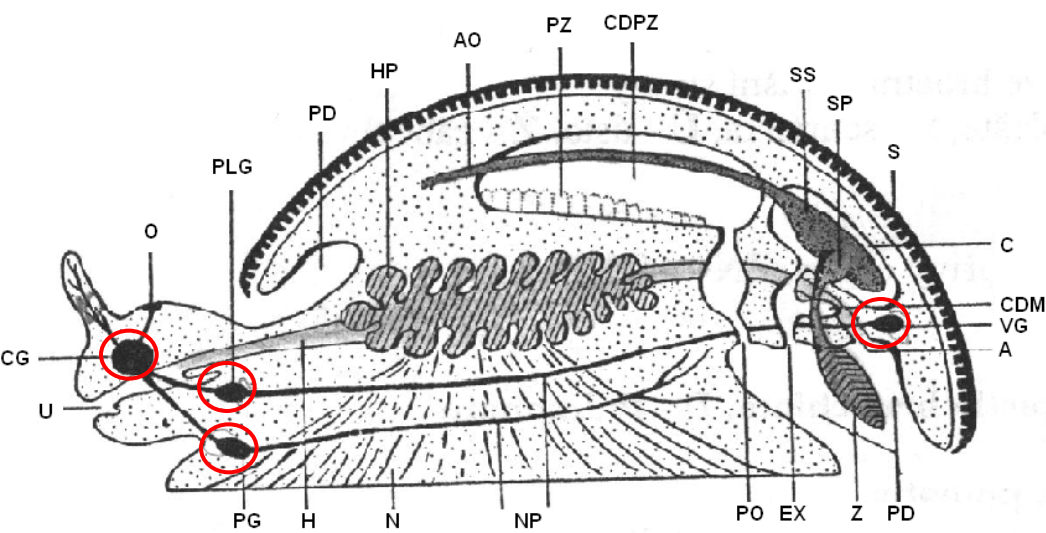


Endocrine System

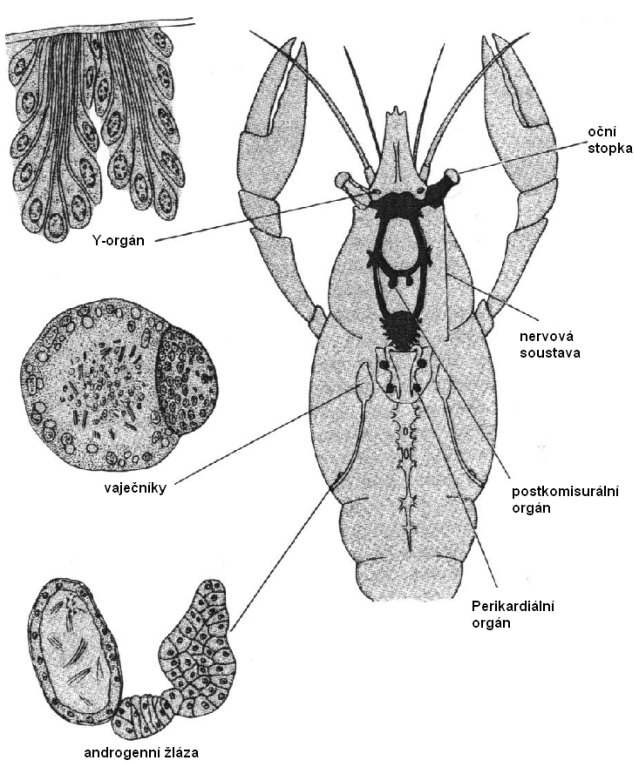


- gonadotropin, růstový h.
- estradiol, testosteron
- glukokortikoidy, mineralokortikoidy, thyroidy
- melatonin, kalcitonin, insulin, „oxytocin“...

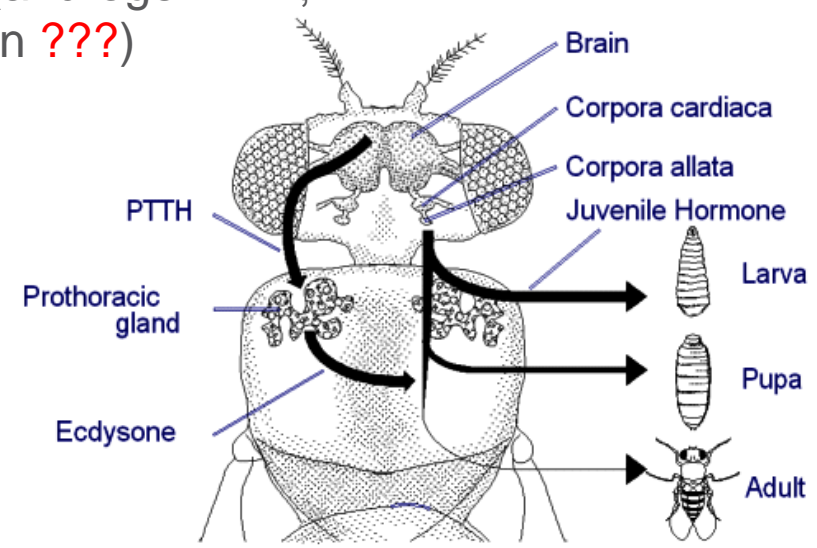


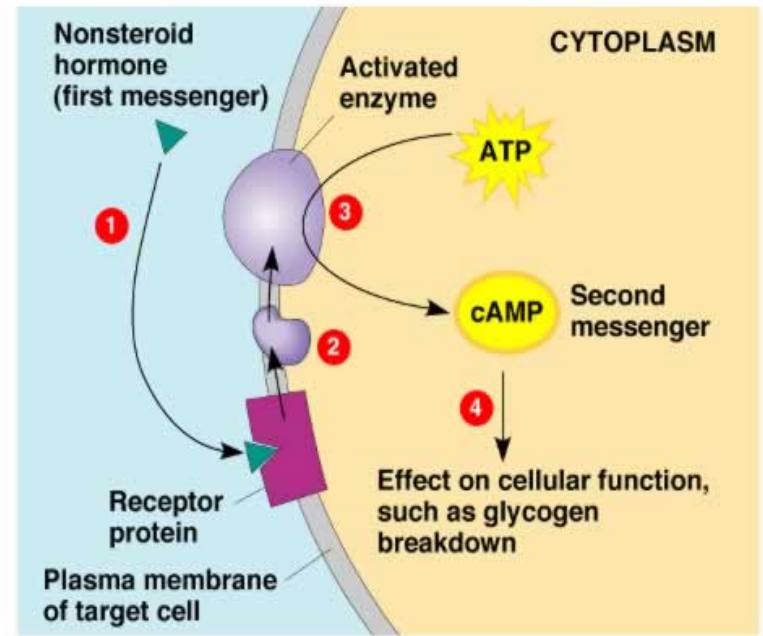
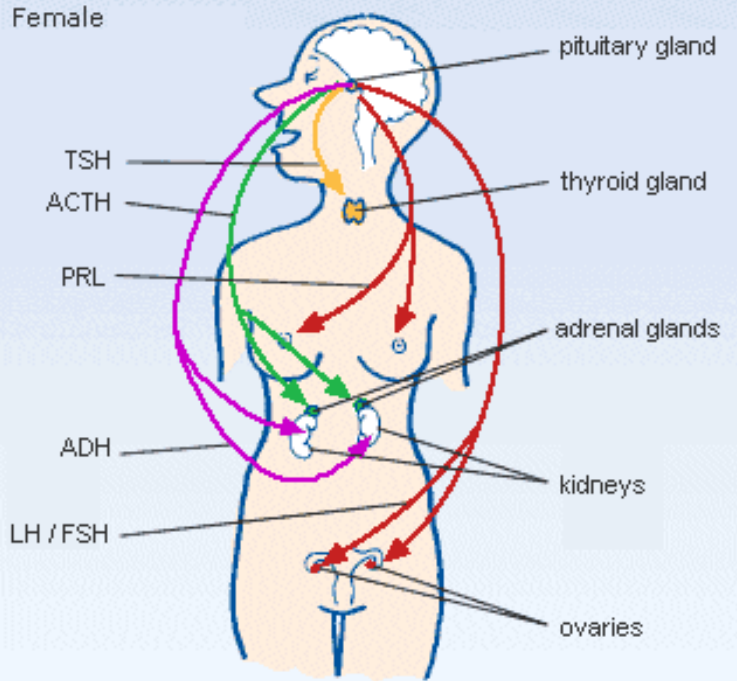


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy ???
- pohlavní hormony (progesteron, testosteron, estradiol) ???

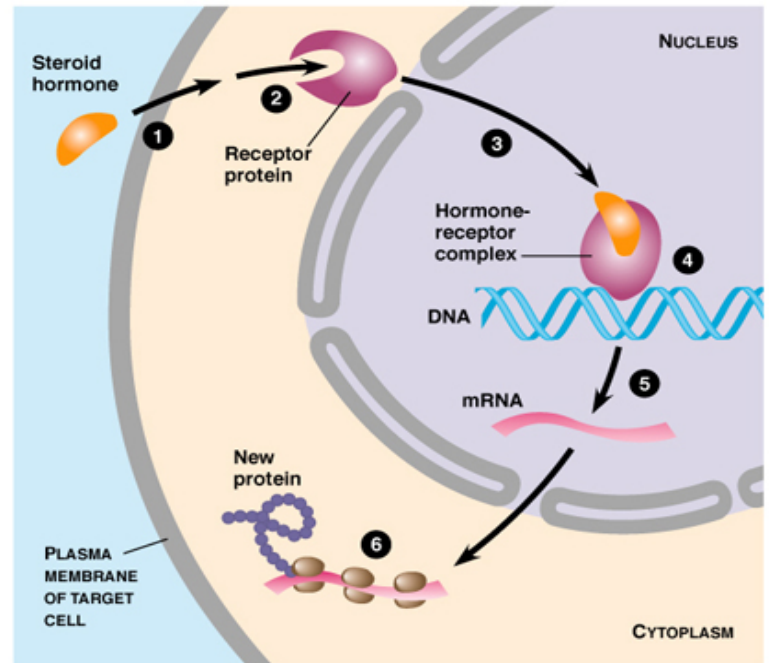
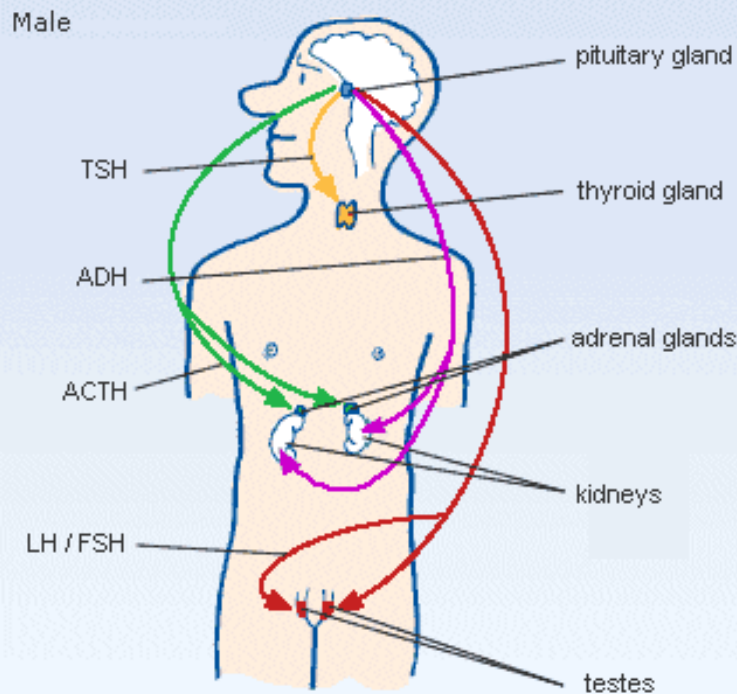


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy (svlékání, vývoj)
- pohlavní hormony (androgenní h.; estradiol, progesteron ???)





©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



Potenciální EDCs (Category 1 in European Commission 2014)

Classification	Relevant compounds
Persistent organic pollutants	1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) and derivates, 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin, brominated diphenylether (BDE) 209, chlordane, hexachlorobenzene, hexachlorocyclohexanes, mirex, PCBs, PCDDs/PCDFs, short and intermediate chain chlorinated paraffins, toxaphene, trichlorobenzene
Pesticides	2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3,4-dichloroaniline, acetochlor, alachlor, amitrol, atrazine, bifenthrin, boric acid, carbaryl, chlordimeform, cyhalothrin, deltamethrin, dibromochloropropane, dibromoethane, fenarimol, fenitrothion, kepone (chlordecone), linuron (lorox), loxynil, mancozeb, maneb, metam natrium, methoxychlor, metiram (complex), metribuzin, nitrofen, omethoate, picloram, quinalphos = chinalphos, resmethrin, stannane, terbutryn, thiram, trifluralin, vinclozolin, zineb
Pharmaceuticals	cyclophosphamide, ketoconazol, mestranol, mestranol
Personal care product ingredients	2,6-cis diphenyl hexamethylcyclotetrasiloxane, 2-ethyl-hexyl-4-methoxycinnamate, 3-(4-methylbenzylidene)camphor, 3-benzylidene camphor, cyclotetrasiloxane, ethyl 4-hydroxybenzoate, methyl p-hydroxybenzoate
Plasticizers and other additives in materials and goods	2,2'-bis(2-(2,3 epoxypropoxy)phenyl)-propane, 4-nitrotoluene, butylbenzylphthalate (BBP), di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), dicyclohexyl phthalate, diethyl phthalate (DEP), di-n-butylphthalate (DBP), dipentylphthalate (DPP), epichlorohydrin (1-chloro-2,3-epoxypropane), methyl tertiary butyl ether, mono 2 ethyl, hexylphthalate, mono-n-butylphthalate, resorcinol, styrene, tert. butylhydroxyanisole
Polycyclic aromatic chemicals	3,9-dihydroxybenz(a)anthracene, 3-methylcholanthrene, ,6-cyclopento-1,2-benzanthracene, 7,12-dimethyl-1,2 benz(a)anthracene, benzo[a]pyrene
Halogenated phenolic chemicals	1,1-trichloro-2,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethane, hydroxy - PCBs, pentachlorophenol
Non-halogenated phenolic chemicals	4,4'-biphenol, 4,4'-dihydroxybenzophenon, 4-cyclohexylphenol, 4-nonylphenol and nonylphenol (2 compounds), 4-isooctylphenol, 4-octyl-phenol, 4-phenylphenol 4-tert-octylphenol, benzophenone-2, bisphenol A (BPA), bisphenol B, n-butyl p-hydroxybenzoate, nonylphenoethoxylate, n-propyl p-hydroxybenzoate, octylphenol, p-benzylphenol, phenolphthaleine, resbenzophenone
Chemicals containing tin	fentin acetate, methoxyetylacrylate tinbutyltin, copolymer, phenol, 2-[[[(tributylstannyl)oxy]carbony], stannanes (9 compounds), tetrabutyltin, tributyltin carboxylate, tributyltin compounds, tributyltin hydride, tributyltinnaphthalate, tributyltin oxide = bis(tributyltin) oxide, tributyltin polyethoxylate, tri-n-propyltin, triphenyltin
Other chemicals	1,3-dichloro-2,2-bis(4-methoxy-3-methylphenyl)propane, ethylene thiourea, p-coumaric acid, o,p'-DDA-glycinat = n-(2-chlorophenyl)(4-chlorophenyl), acetylglycin

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...)

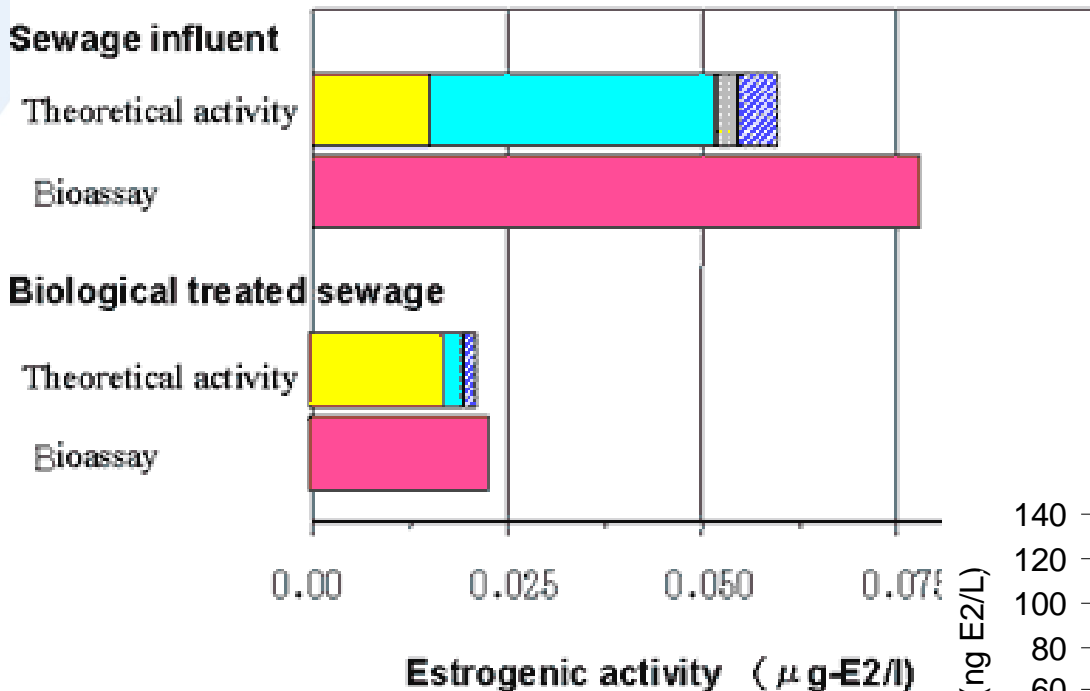
- **Klíčový faktor vlivu xenoestrogenů na organismy!**

17β-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

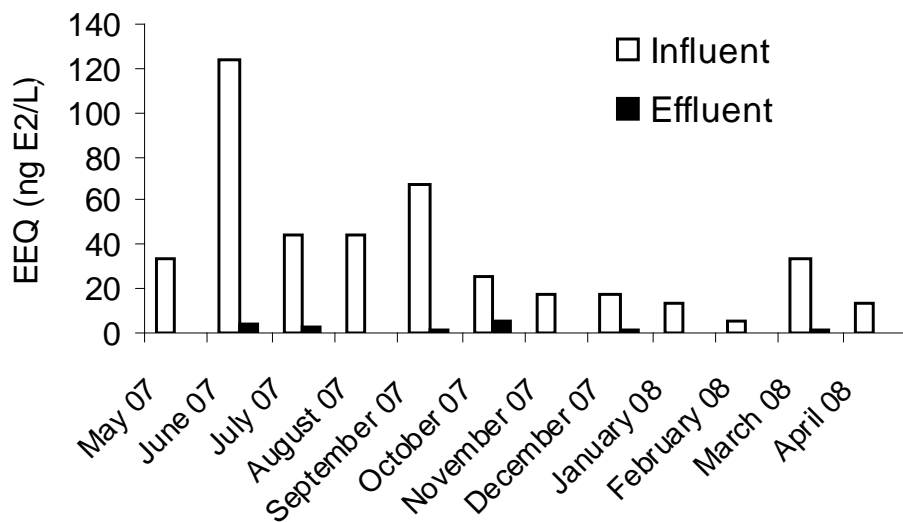


Estrogenní aktivita v ČOV

LC/MS/MS : Estrone 17β-Estradiol Estriol
 GC/MS : Nonylphenol Bisphenol A
 Bioassay : Estrogenic activity



Odbourávání estrogenní aktivity v ČOV Brno



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

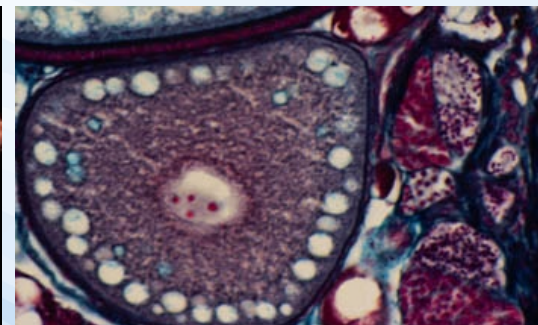
- Účinky se projeví po expozici i velmi malými dávkami látek
- Účinky se pravděpodobněji projeví v mláďatech, než v dospělých
- Účinky jsou velmi ovlivňovány načasováním expozice - stupněm vývoje, na kterém byl jedinec exponován
- Účinky odlišné během doby života organismu (fetus vs. embryo vs. dospělec)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



Projevy u vodních obratlovců

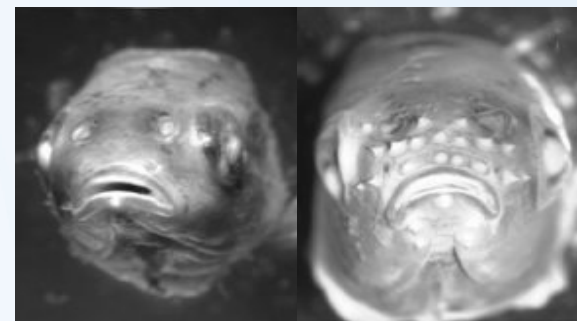
Malformace-změny v pohlavních orgánech. Příklady:

- **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

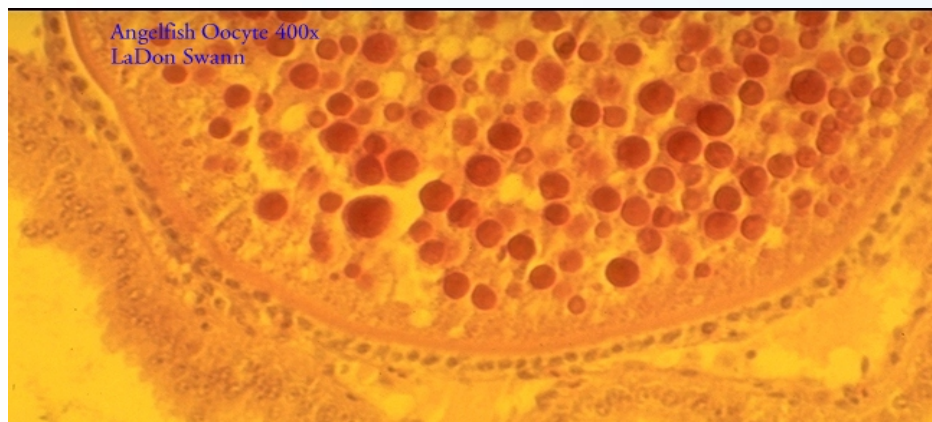


Důvod intersexuality v rybách?

- Samci ryb jsou ‘feminizováni’ estrogeními látkami.
- Mnoho látek s estrogení aktivitou je přítomno ve výpustích ČOV a tak uvolňováno do řek.
- Steroidní estrogény, 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

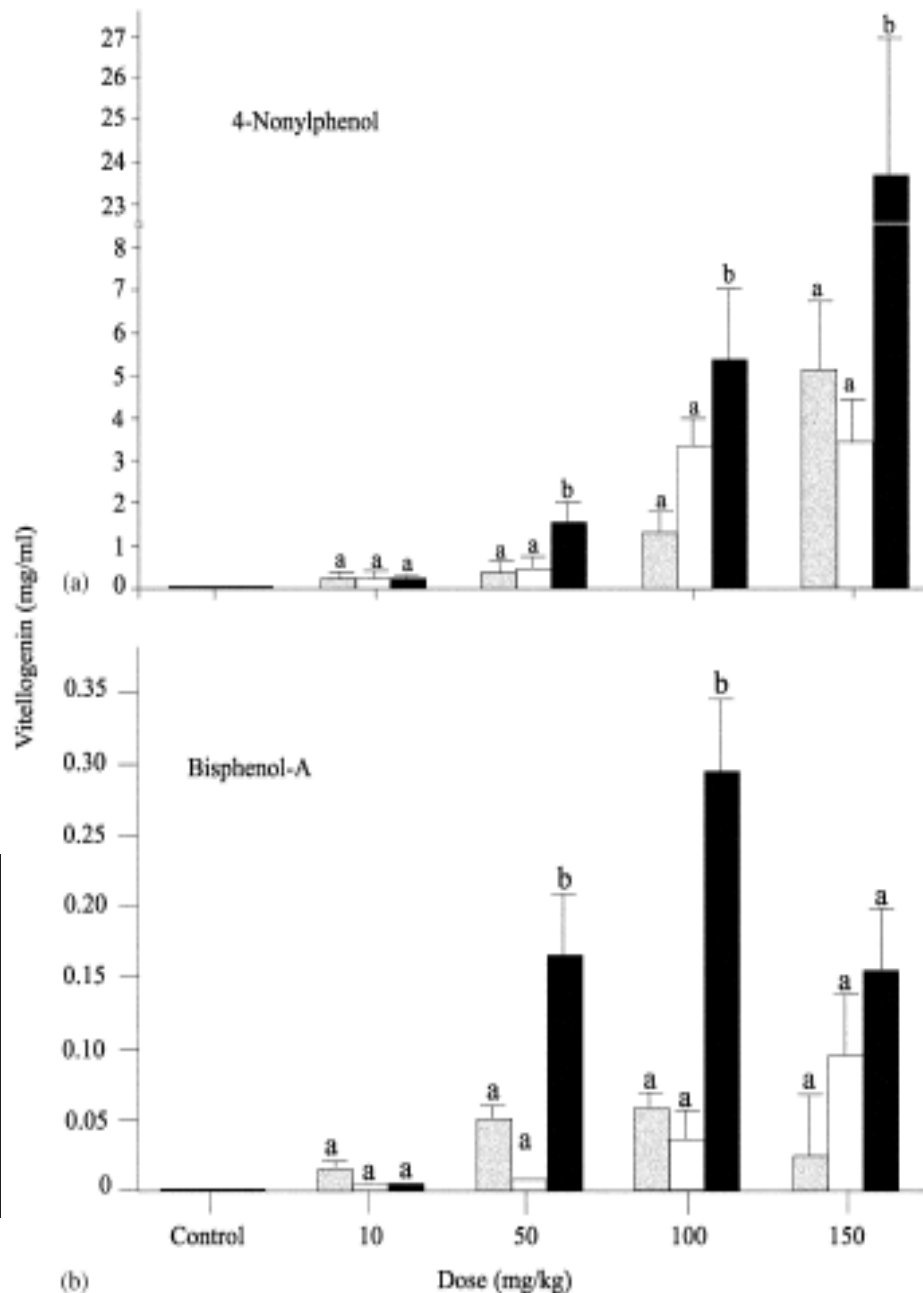


Expozice dospělých ryb estrogenními látkami vede k feminizaci samců

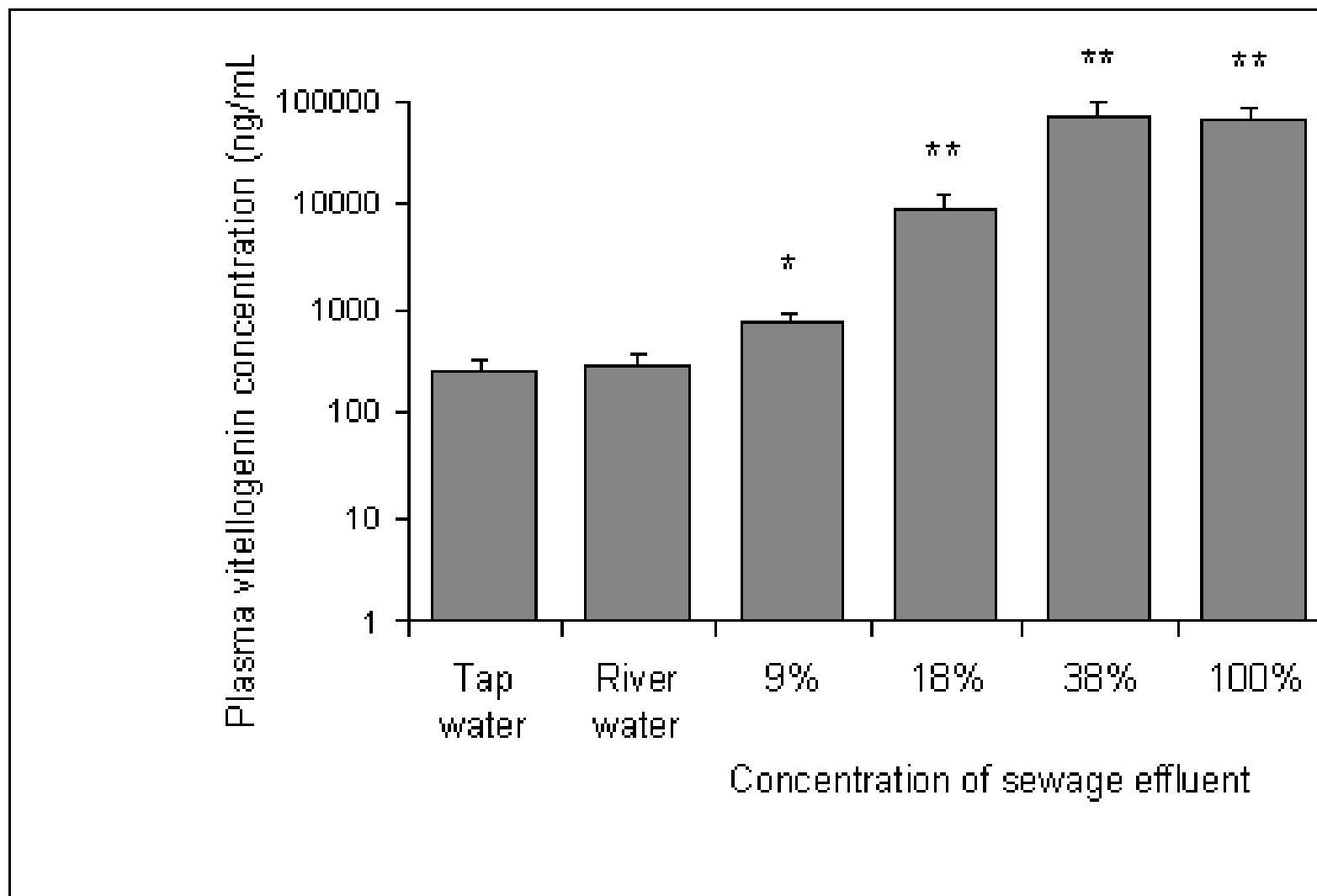
Halančík

(*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

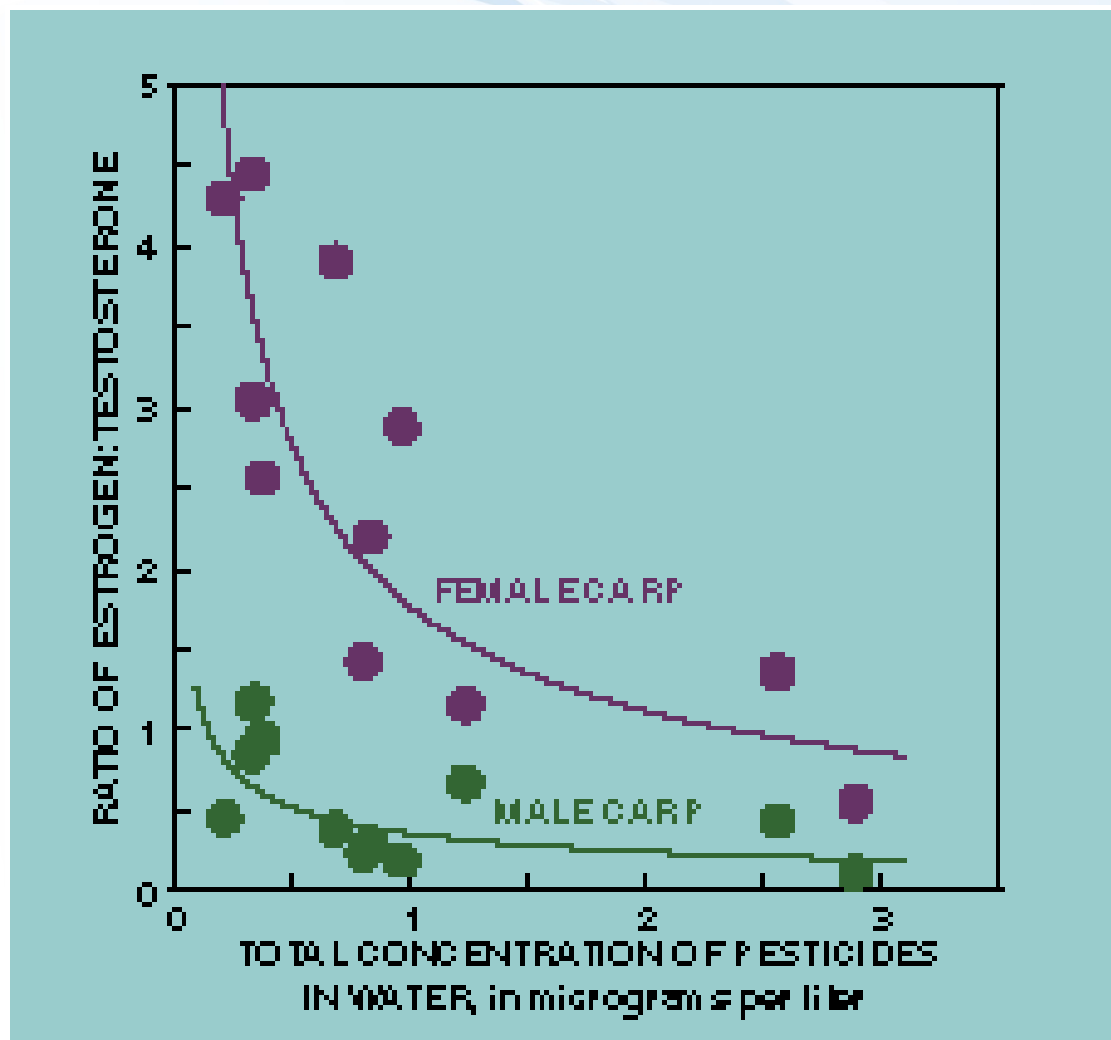
(v povrchových vodách v Evropě 0–23ng/L)

- 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 tlušťů - 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 tlušťů, zvýšení populačních hustot pstruha

(Kidd et al., 2006, 2007)



Některé kontaminanty mohou působit jako androgeny (anti-estrogeny)



Organocíny



Stabilizátory plastů

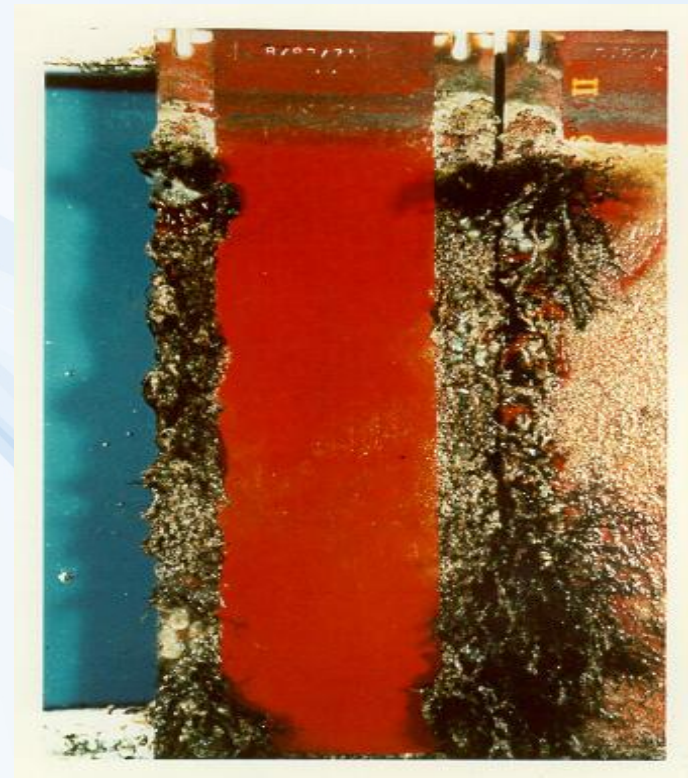
Biocidy: Fungicidy
Insekticidy
Bactericidy

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

TBT = tributylcín



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Pomalá biodegradace

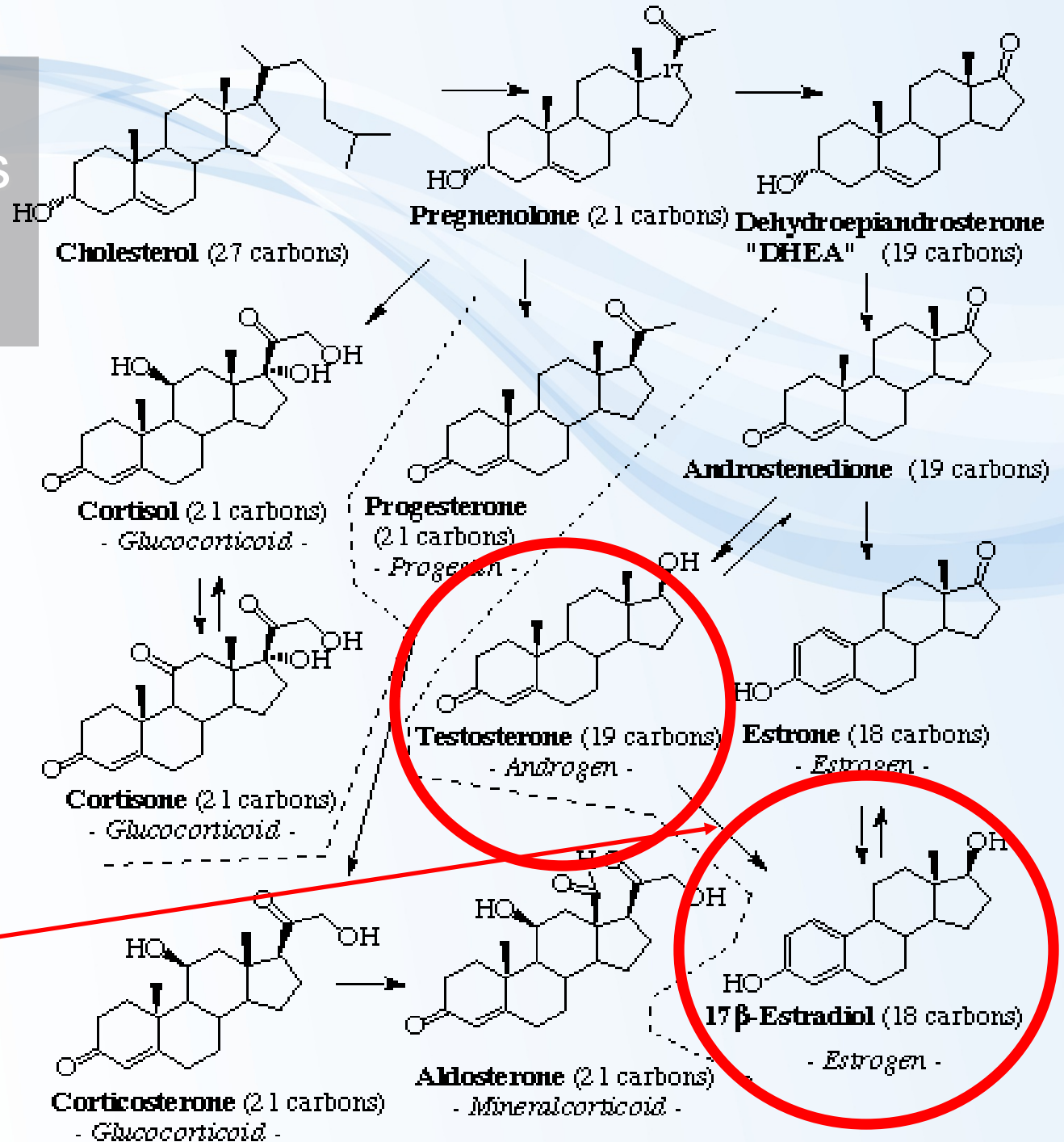
Akumulace ve vodě a sedimentu

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



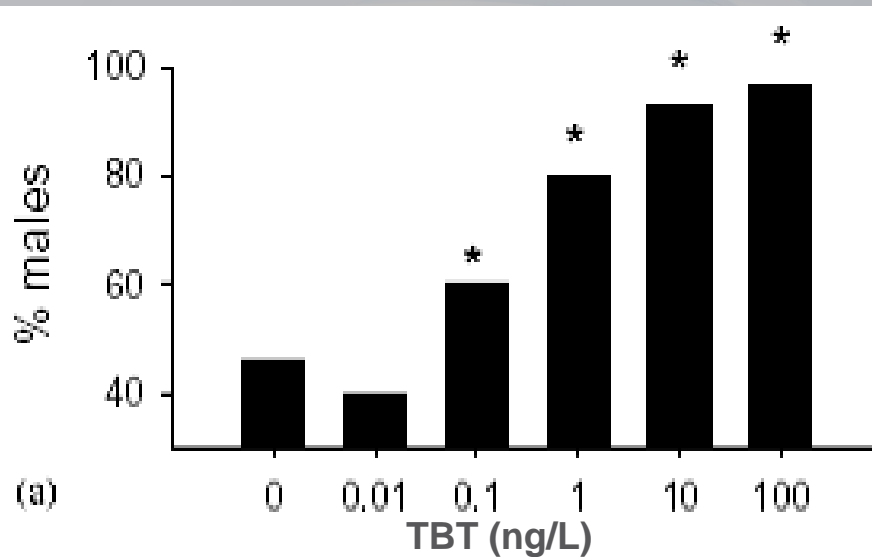
TBT



P450 aromatase

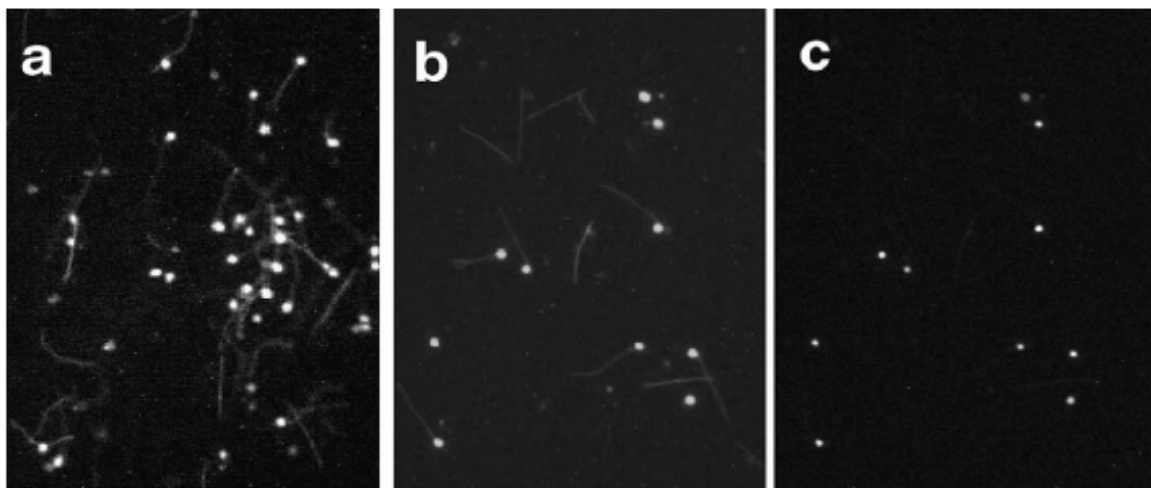


TBT způsobuje maskulinizaci ryb



Danio pruhované
(*Danio rerio*)

Ryby exponované TBT od vykolení po 70 dní



Spermie po 3 - 5 měsících expozice



toxických látek
v prostředí

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

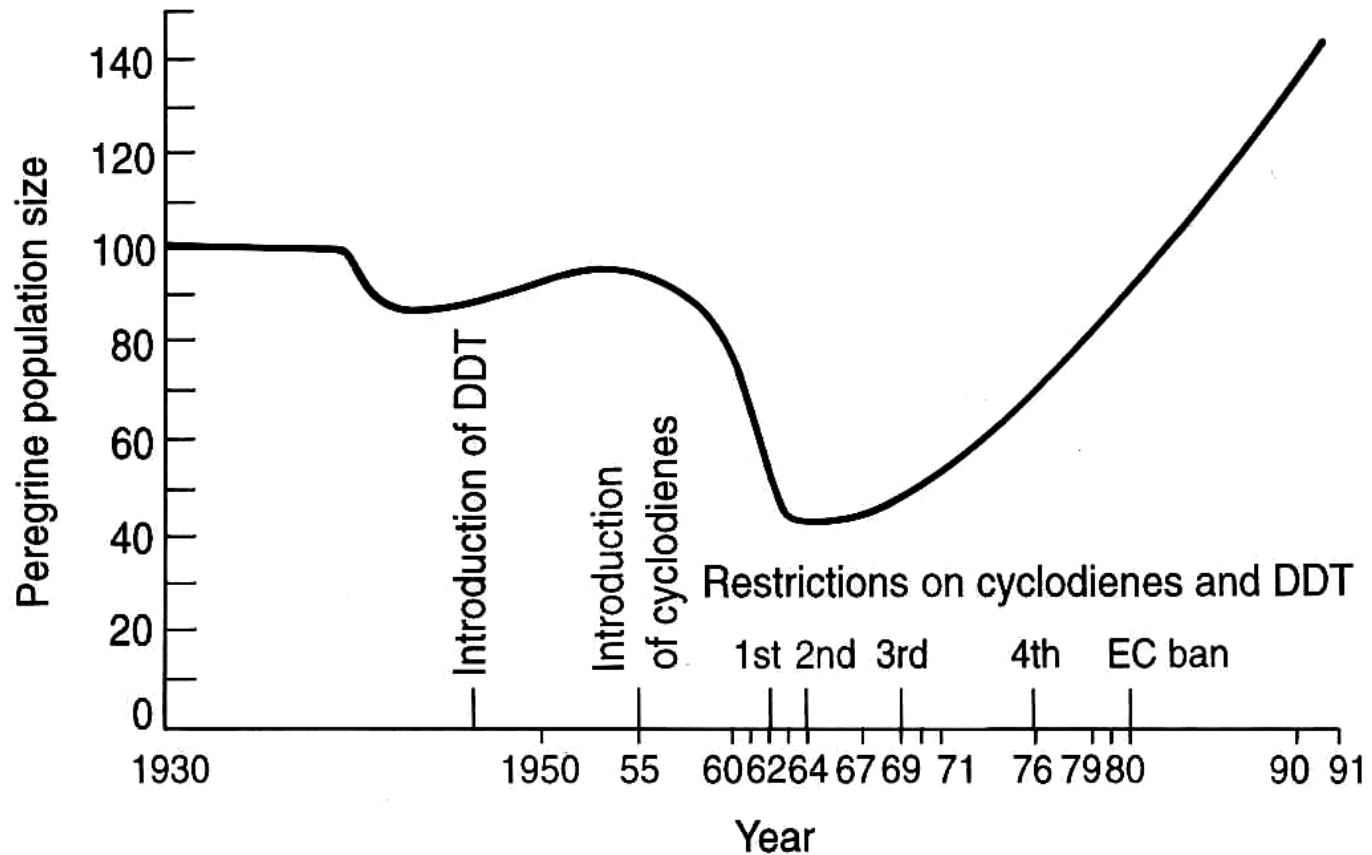
hypotéza: ovlivnění prostaglandinu → transportu Ca a Na_2CO_3

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**.

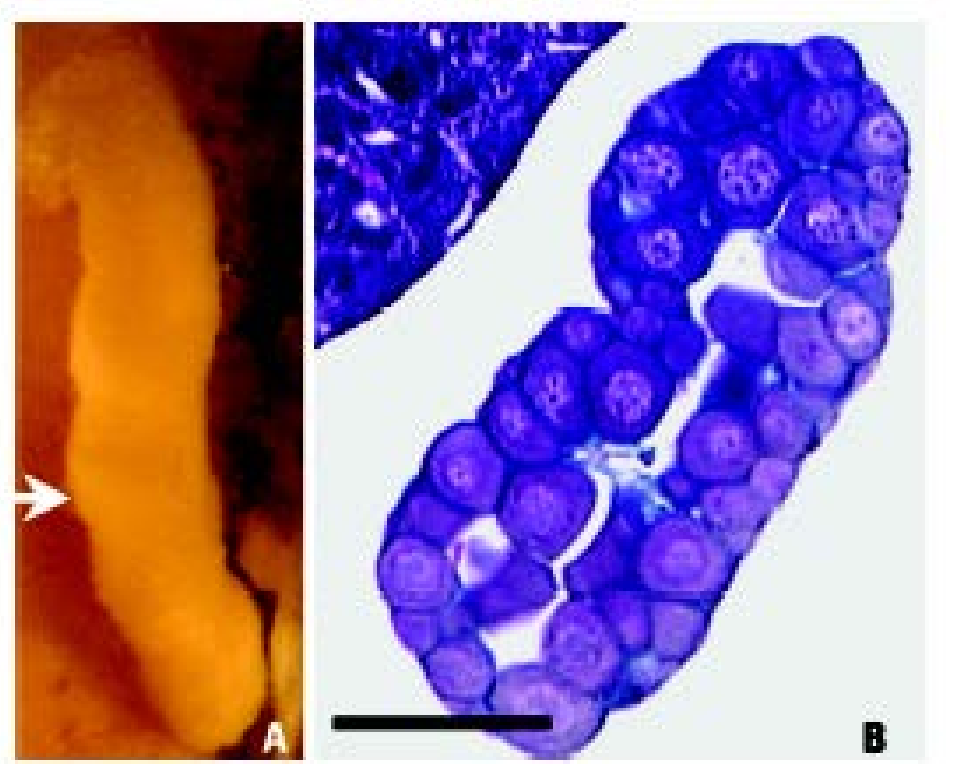
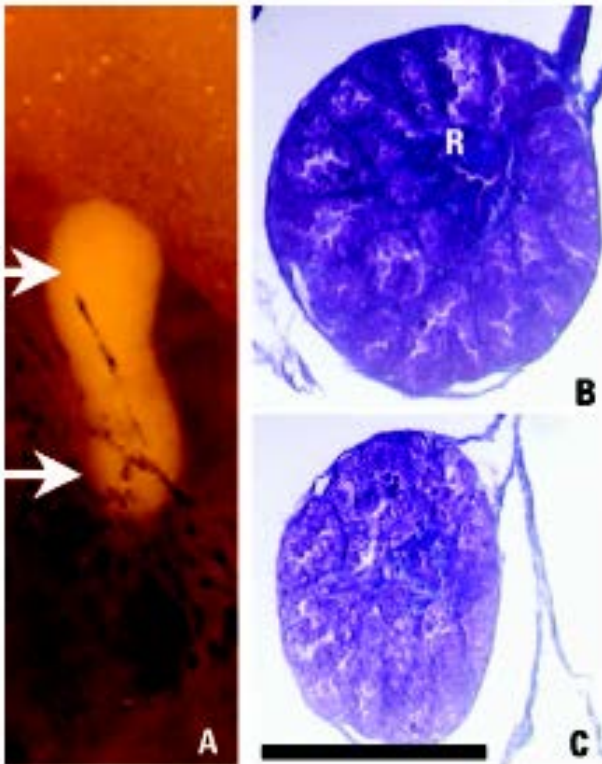
Ovlivnění druhotných pohlavních znaků - velikost svalů *m. dilatator laryngis*. U samců je tento sval vyvinut mohutněji. Při působení xenoandrogenů se sval zvětšuje.





Michel Cusson

Rana pipiens (skokan levhartí)

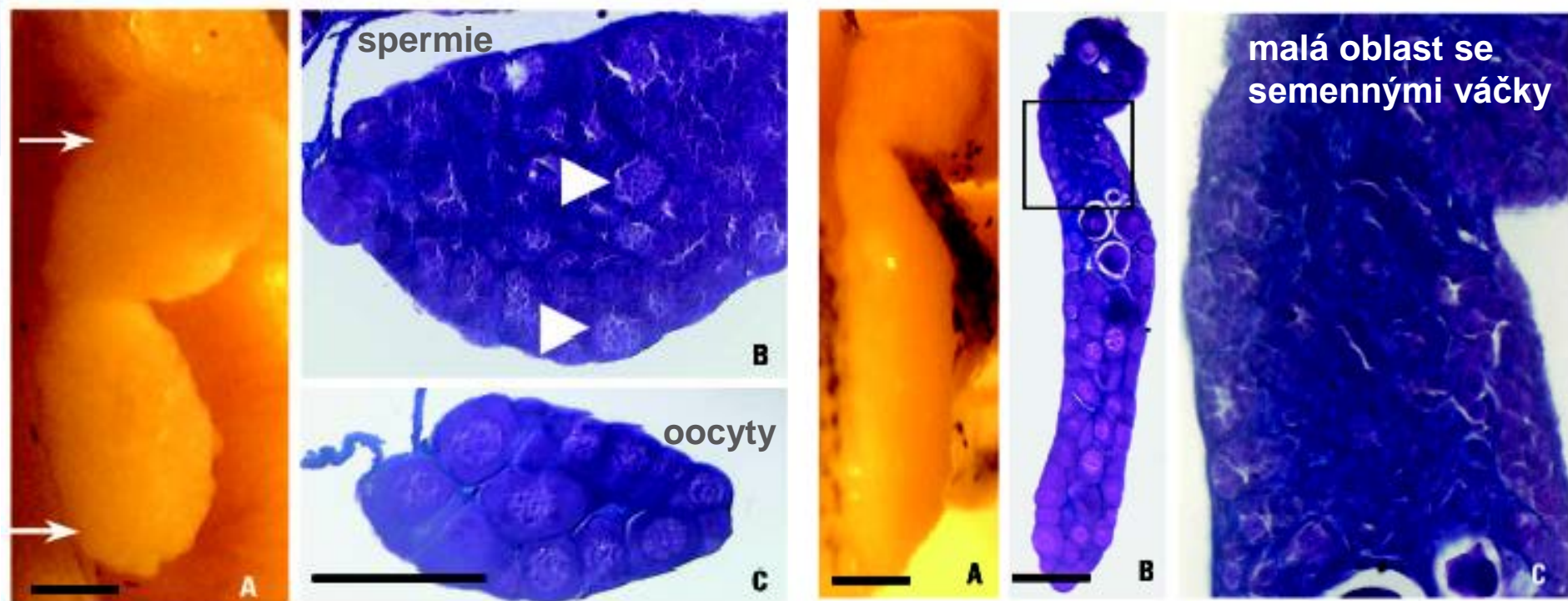


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Kontrolní samec - testes

Kontrolní samice - ovaria

Expozice atrazinem způsobuje hermafroditismus u samců žab



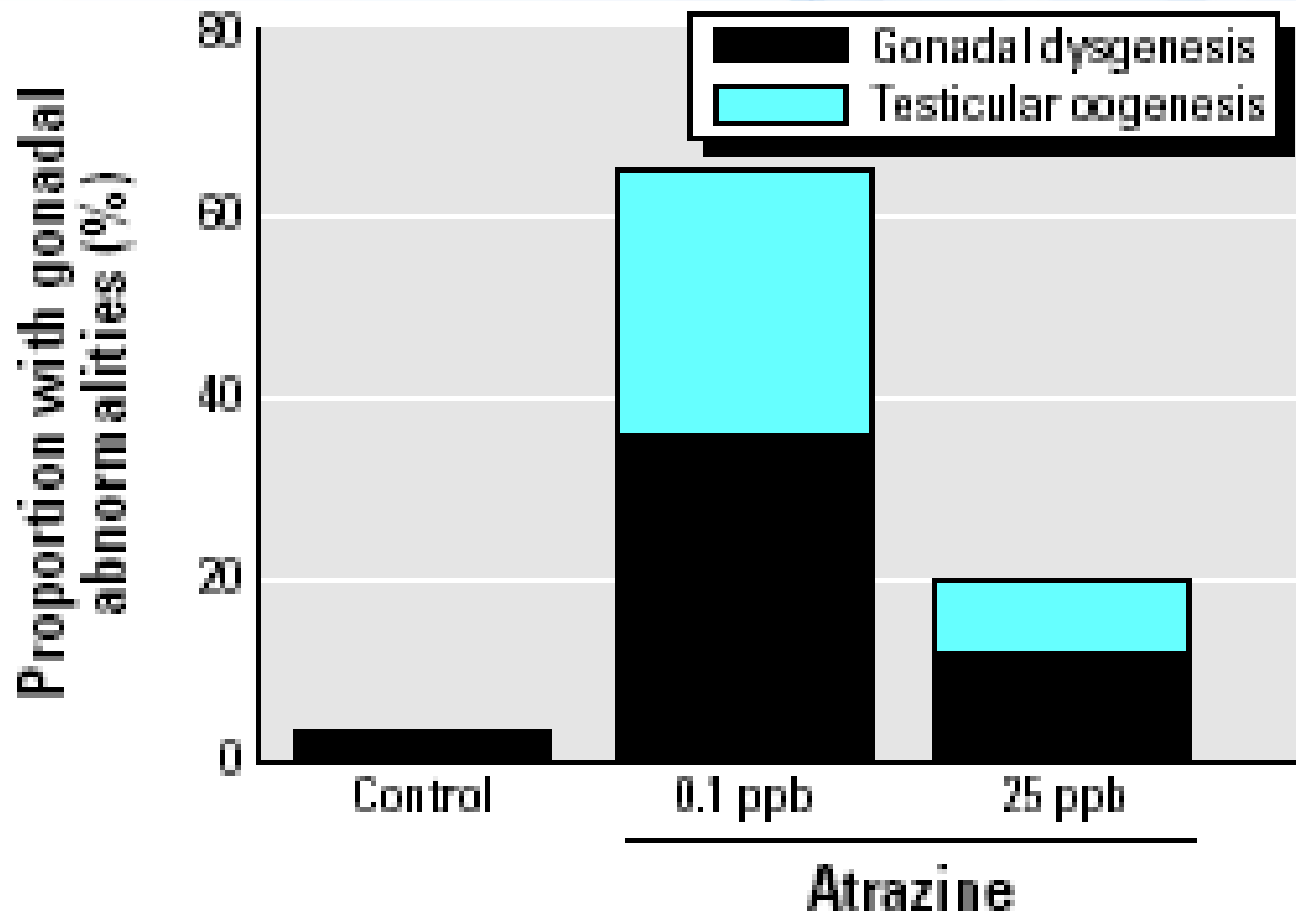
Samec – testes → oocyty v testes

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

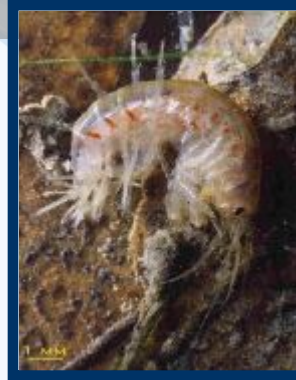
Superfemale

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



Projevy intersexu u korýšů

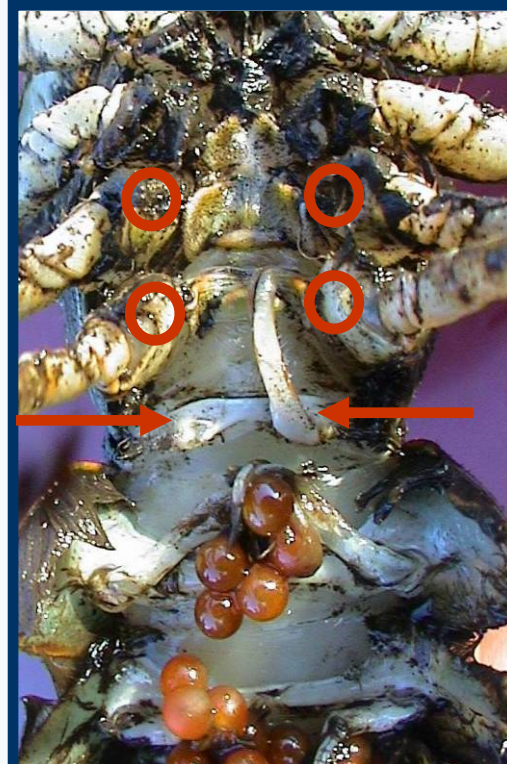
Blešivec potoční (*Gammarus fossarum*)



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

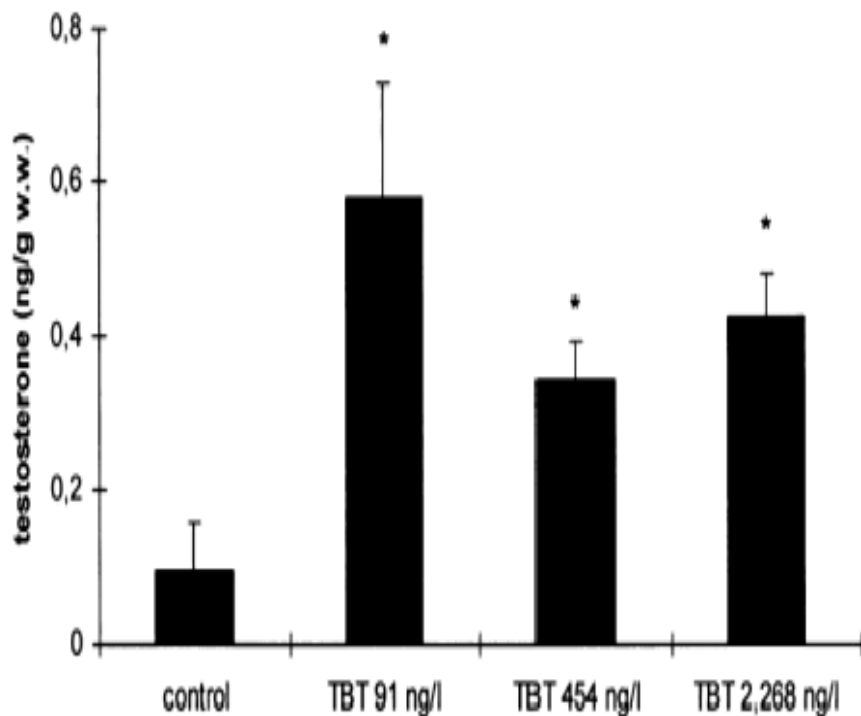
- Ostrava-Karviná
- zatopené poklesové plochy
- reflatce

- **Chráněný druh**

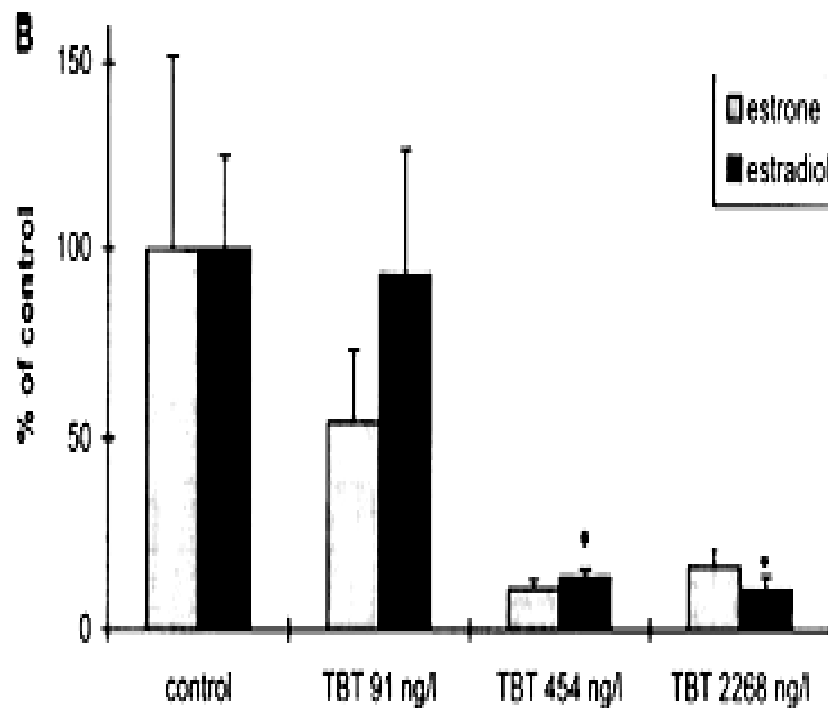


TBT narušuje hormonální rovnováhu u měkkýšů

Velká kobercová škeble (*Ruditapes decussatus*)



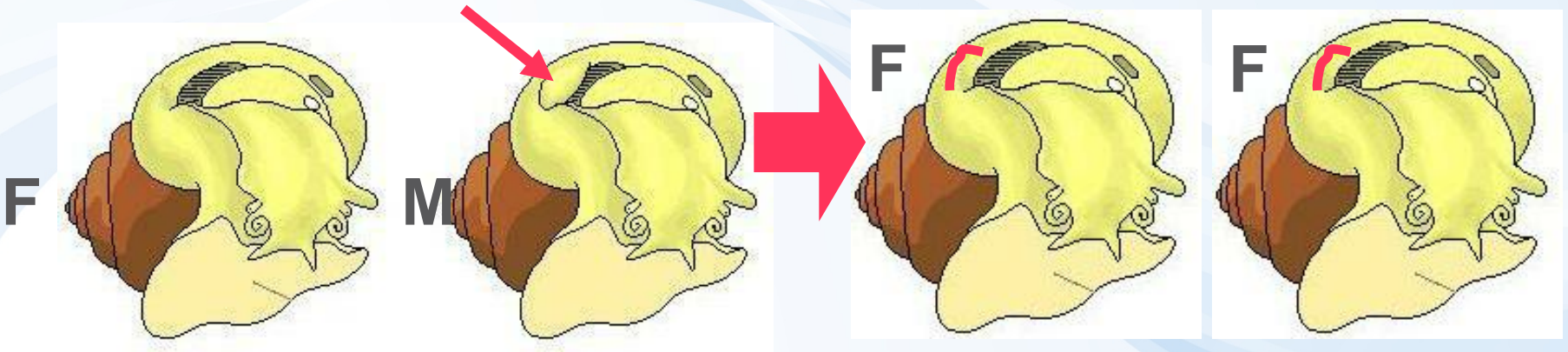
Hladina testosteronu



Hladina estrogenů



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

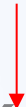
(EC50=0.72 μ g TPhT/kg u *P. antipodarum*)

Důsledek: lokální vymizení populací měkkýšů

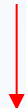


Širší souvislosti kontaminace organocíny ve vodním prostředí

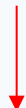
Kolaps populace měkkýšů



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 střevele 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* estrogenní aktivita na receptoru lidských rakovinných buněk
- **Uterotrophic Bioassay** – estrogenní 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





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí