



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:  
*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?

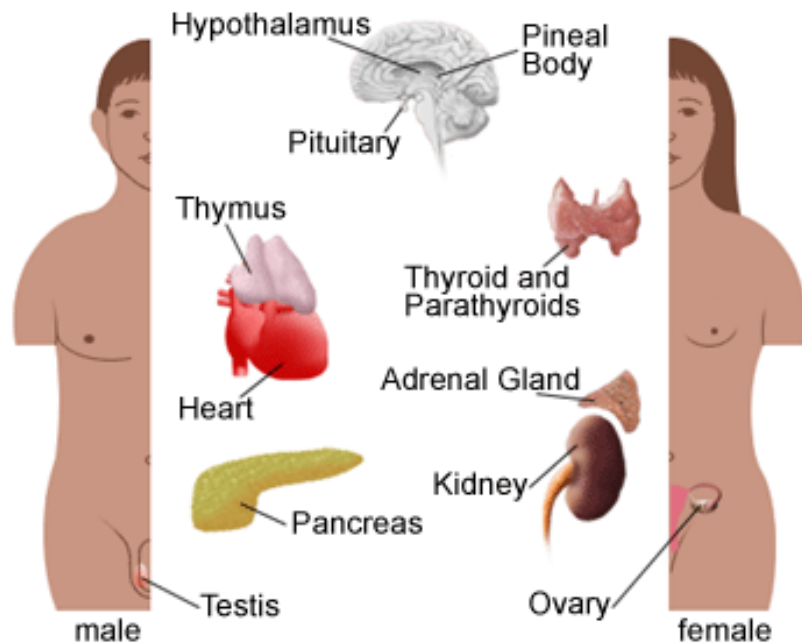
## Endokrinní Funkce

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

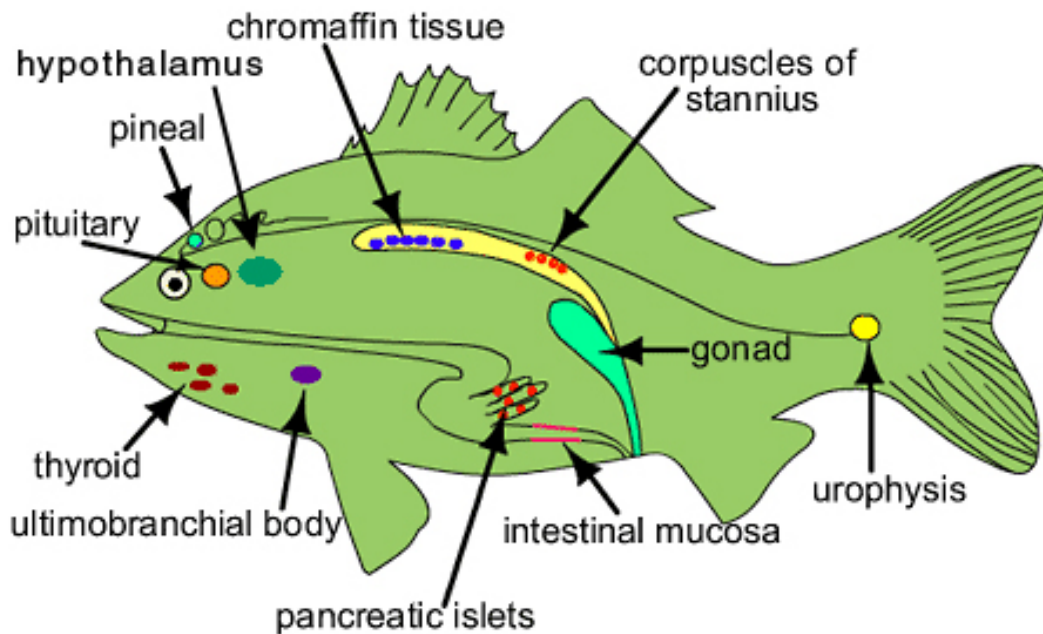
**ES je spolu s CNS hlavní řídicí systém organismu**

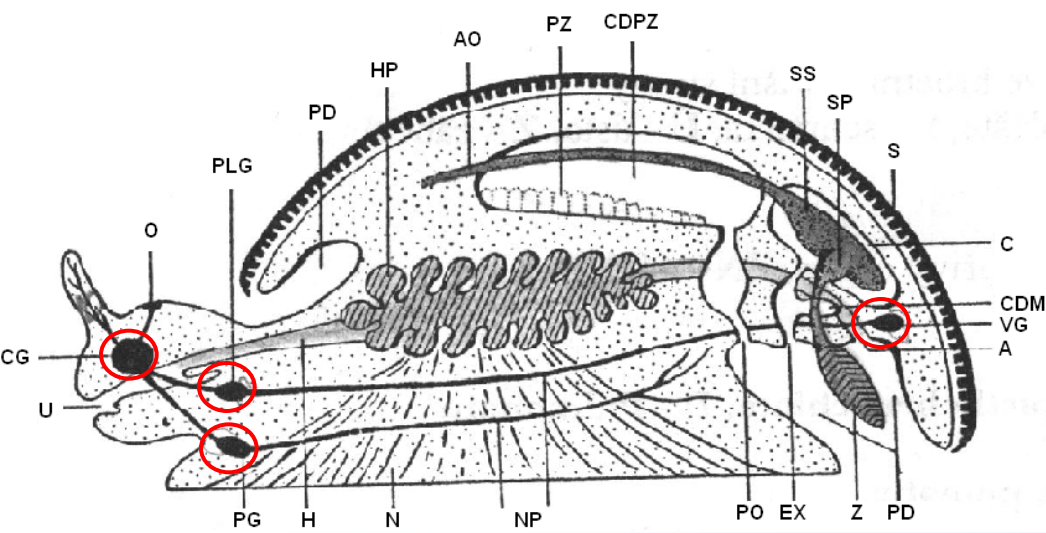


# Endocrine System

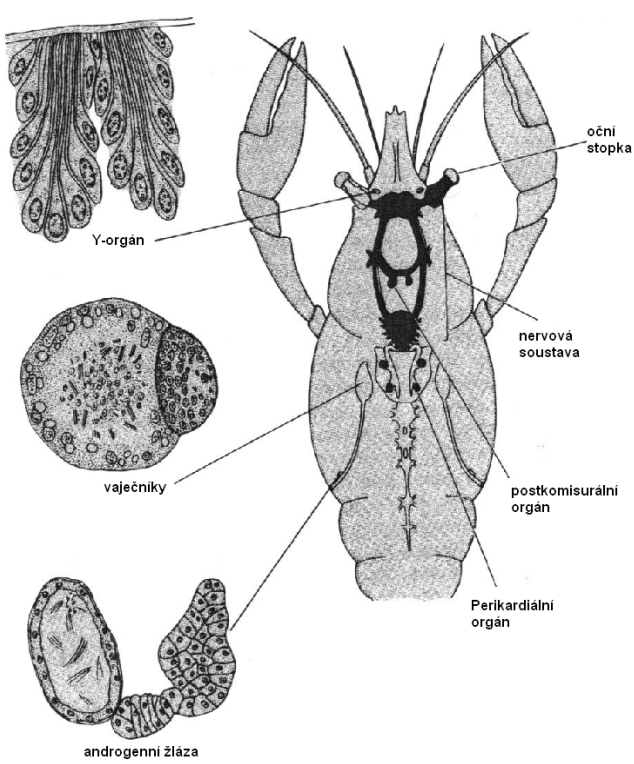


- gonadotropin, růstový h.
- estradiol, testosteron
- glukokortikoidy, mineralokortikoidy, thyroidy
- melatonin, kalcitonin, insulin, „oxytocin“...

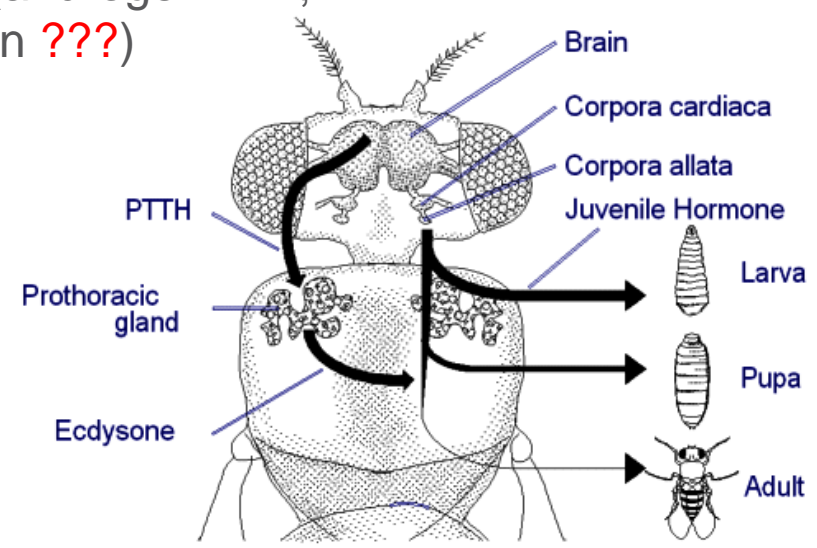


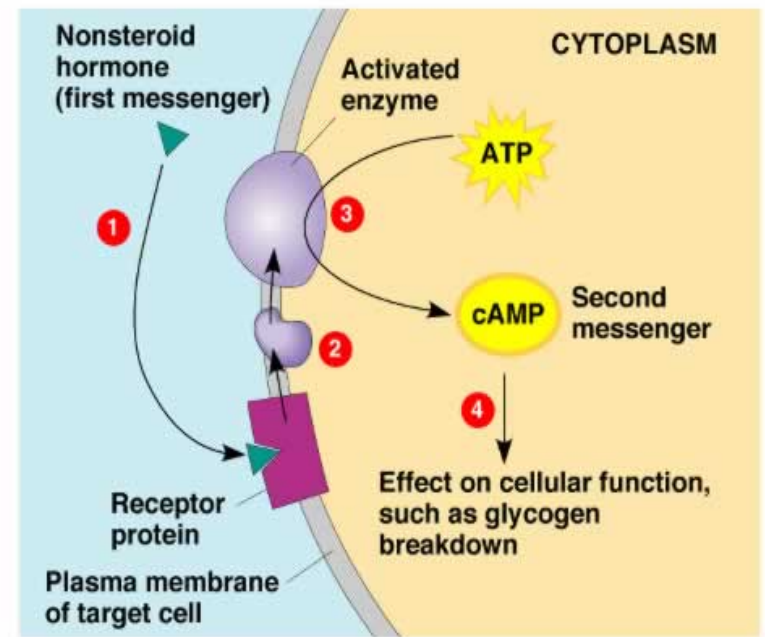
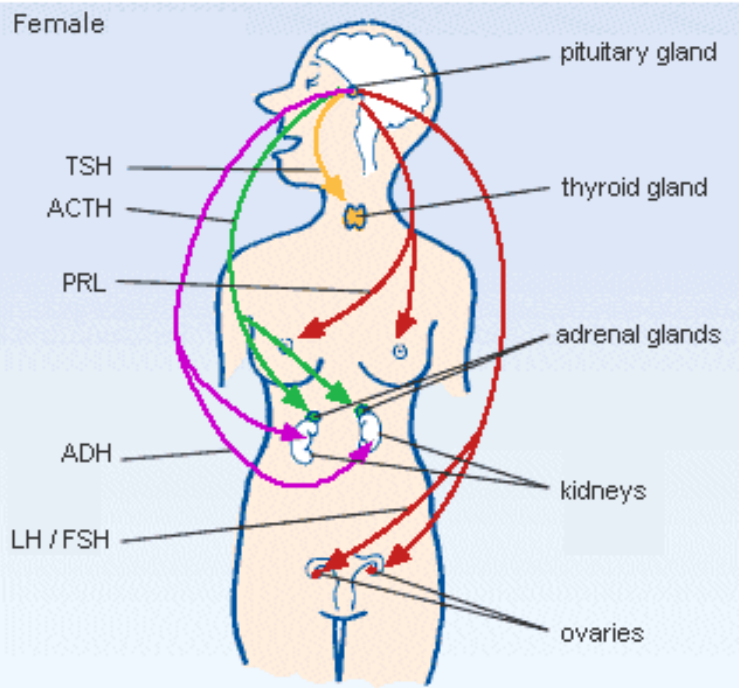


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy ???
- pohlavní hormony (progesteron, testosteron, estradiol) ???

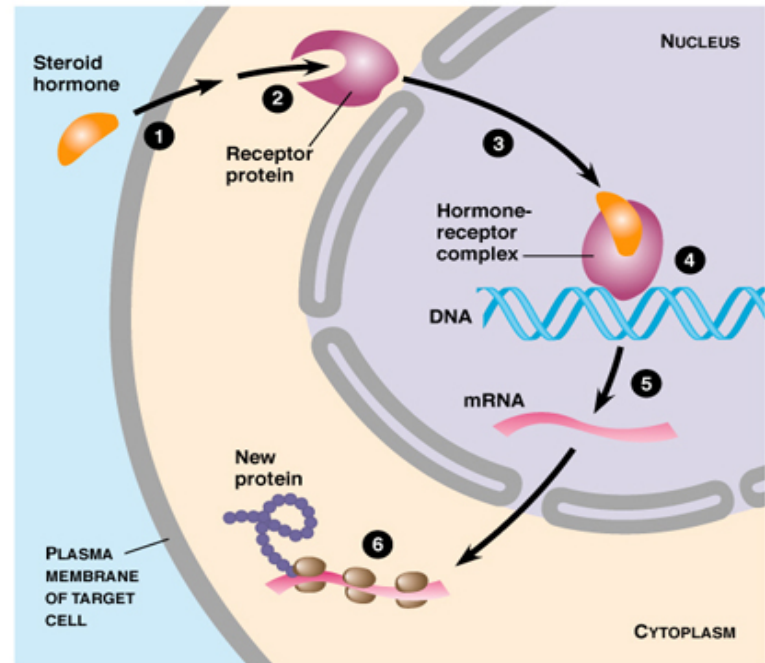
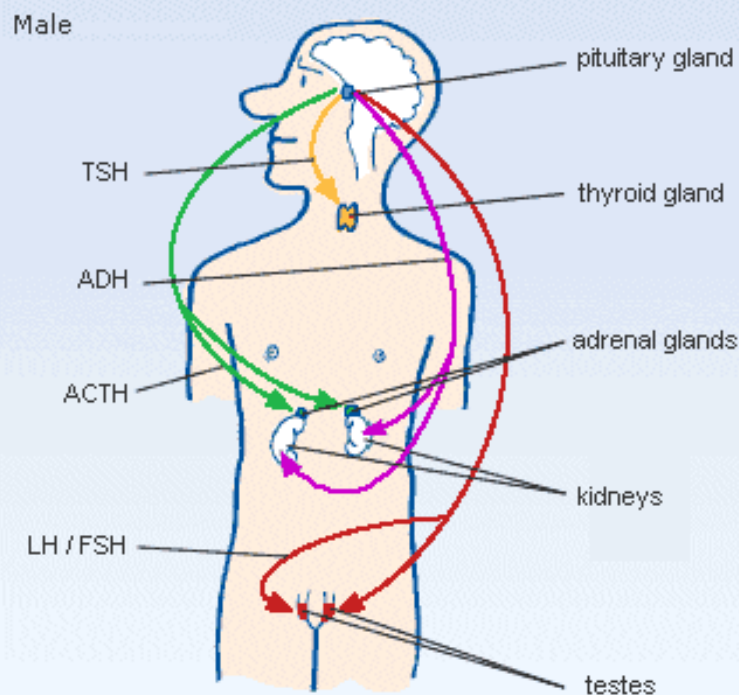


- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)
- ecdysteroidy (svlékání, vývoj)
- pohlavní hormony (androgenní h.; estradiol, progesteron ???)





©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**

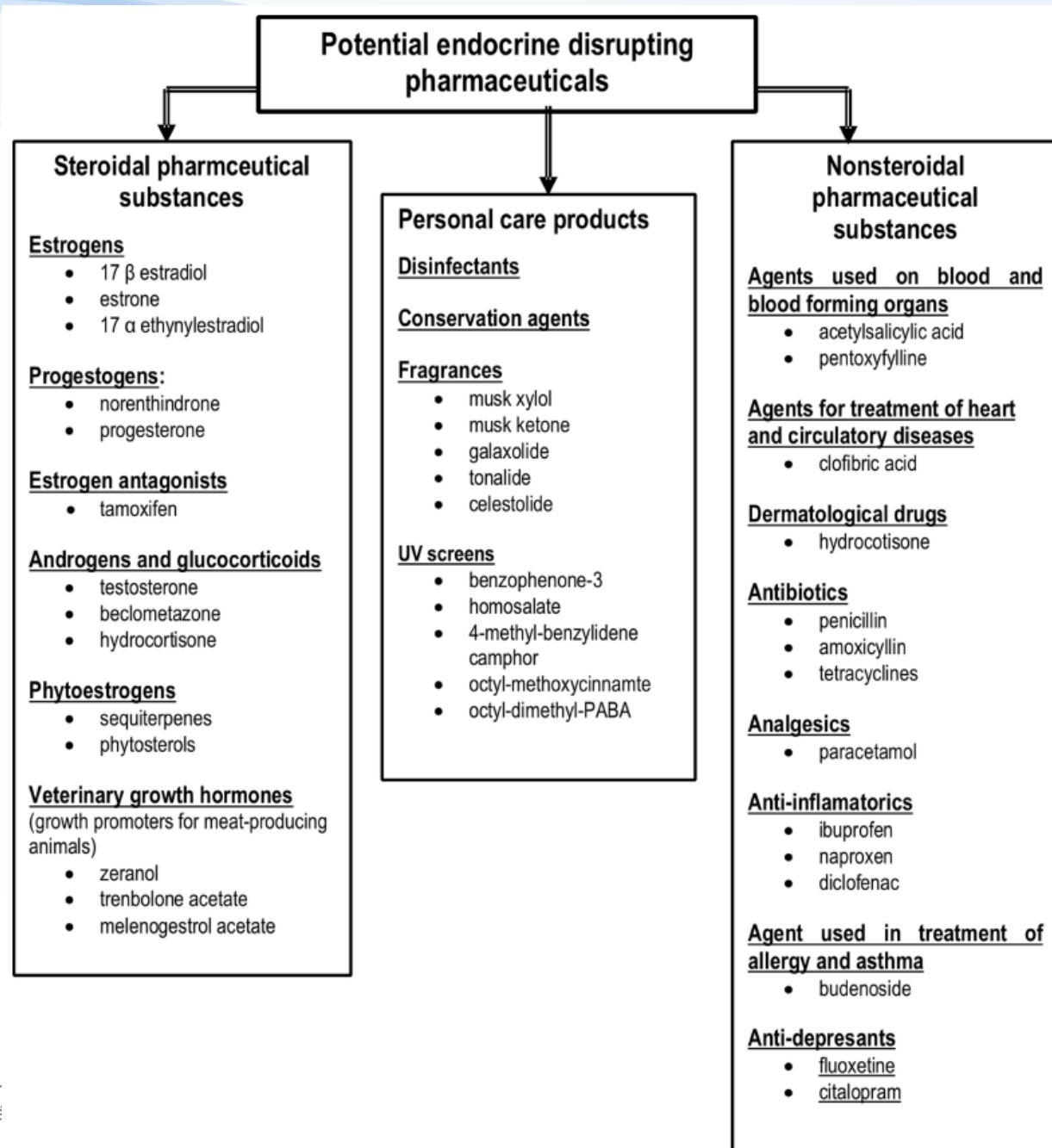
**Chemikálie z vaření & hoření**

**Antibiotika**

**Kovy**



# PPCPs – endokrinní disrupce



# 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

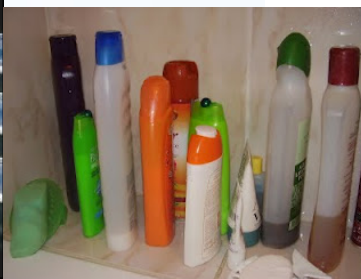
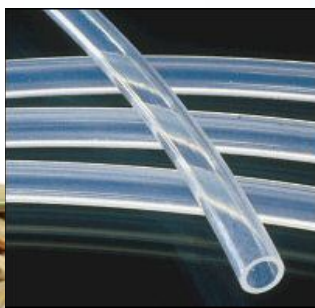
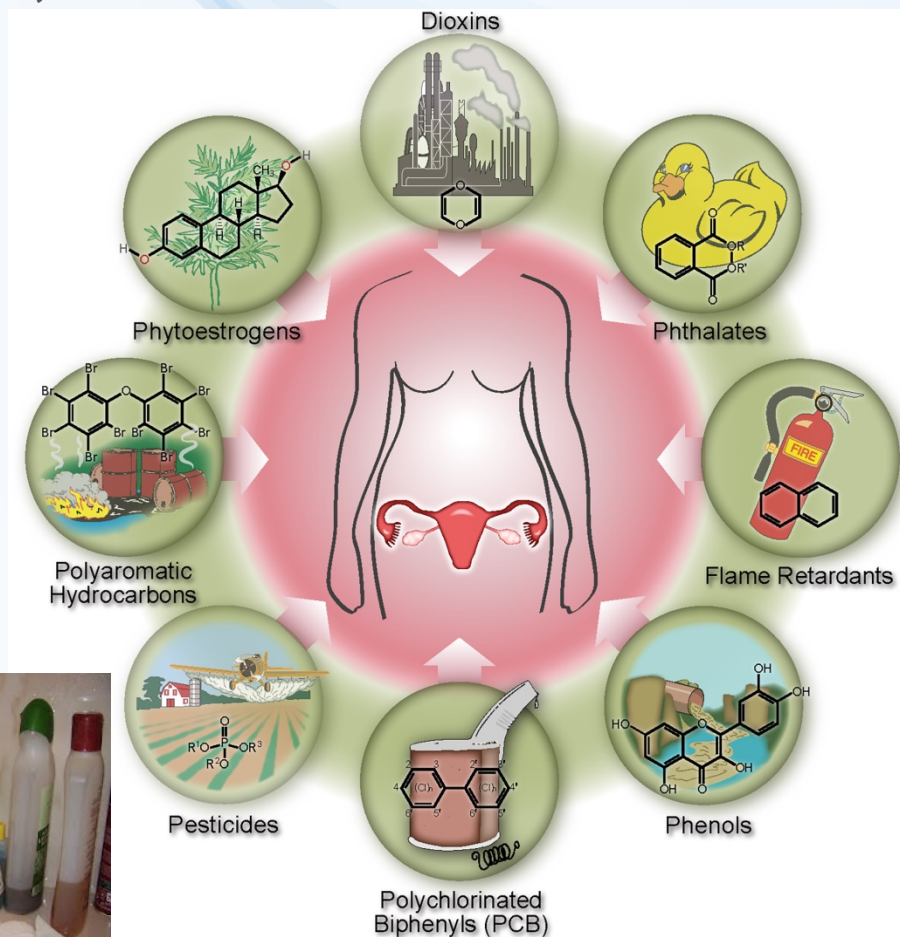
# International Panel on Chemical Pollution (IPCP) - July 2016

## A Compilation of Lists of Chemicals Recognised as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) or Suggested as Potential EDCs

24 lists and databases considered, thousands of chemicals on the lists

### BENZOPHENONES, BISPHENOLS, PARABENS, PFOS AND ITS SALTS, PHTHALATES, PESTICIDES / FUNGICIDES, ORGANOTINS

triclosan, triphenyl phosphate, perchloroethylene, tetrachloroethylene, perfluorooctanoic acid, butylated hydroxytoluene, carbon disulphide, chlorinated paraffins, deca-BDE, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate, galaxolide, tonalide, tert-butyl methyl ether, MTBE, 2-methoxy-2-methylpropane, 4-tert-butylphenol, tert-butylhydroxyanisole, tert-butyl-4-methoxyphenol, pentachlorophenol, 4-nitrophenol, 2,4,6-tribromophenol, siloxanes, resorcinol



# Relativní potence látek

## Estrogenní potenciál

- 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!**

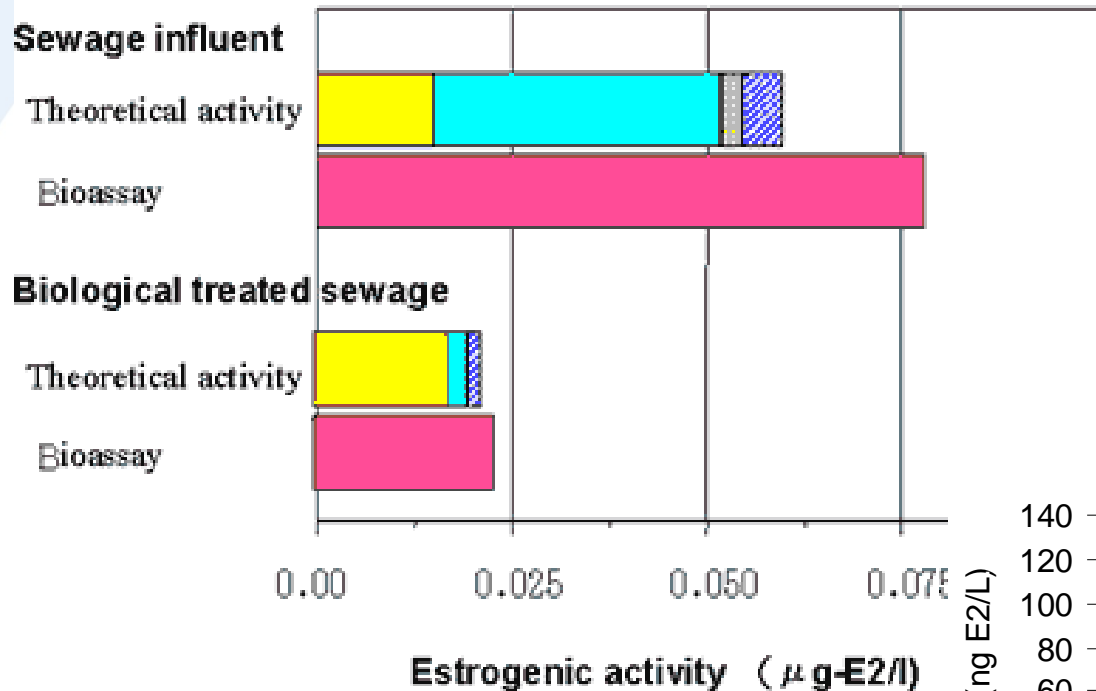
17β-Estradiol	1
Ethynyl-estradiol	1.2
Estrone	1.6x10 <sup>-2</sup>
Estriol	1.0
Genistin	2.6x10 <sup>-4</sup>
Diadzein	1.3x10 <sup>-4</sup>
o,p'-DDT	9.1x10 <sup>-6</sup>
Dieldrin	2.4x10 <sup>-7</sup>
4-nonylphenol (NP)	2.3x10 <sup>-5</sup>
4-octylphenol (OP)	1.4x10 <sup>-6</sup>
bisphenol A	7.8x10 <sup>-6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

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

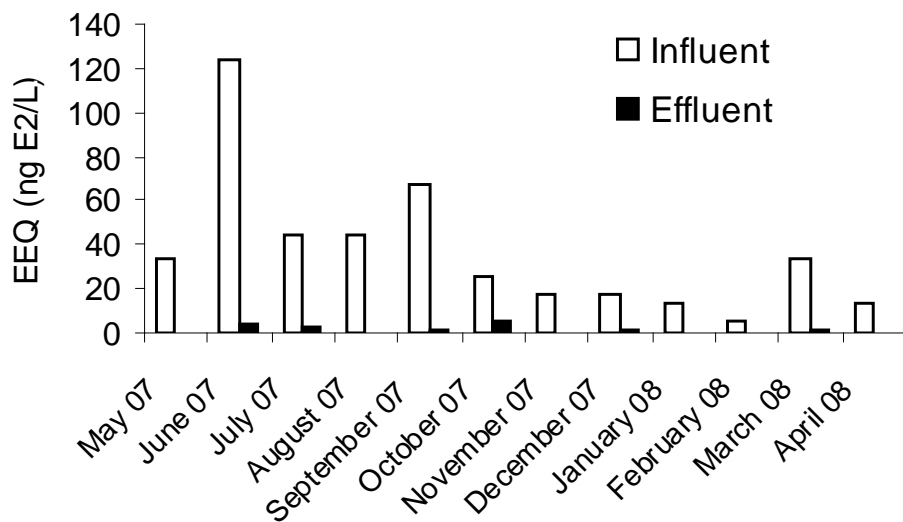


# Estrogenní aktivita v ČOV

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)
  - okna senzitivity
- Účinky často opožděné
  - ke kompletním projevům nemusí dojít až do dospělosti

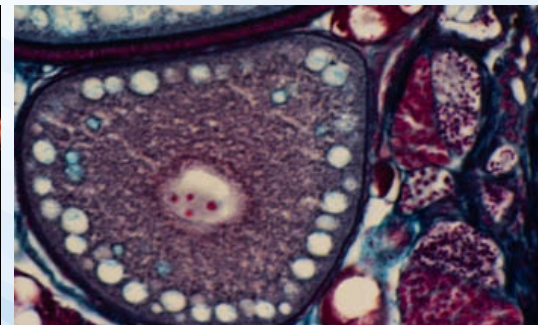
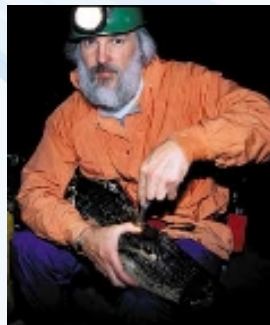




# Projevy u vodních obratlovců

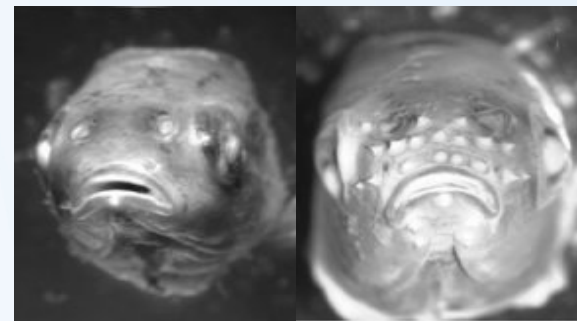
Malformace-změny v pohlavních orgánech. Příklady:

- **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 líhivost 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

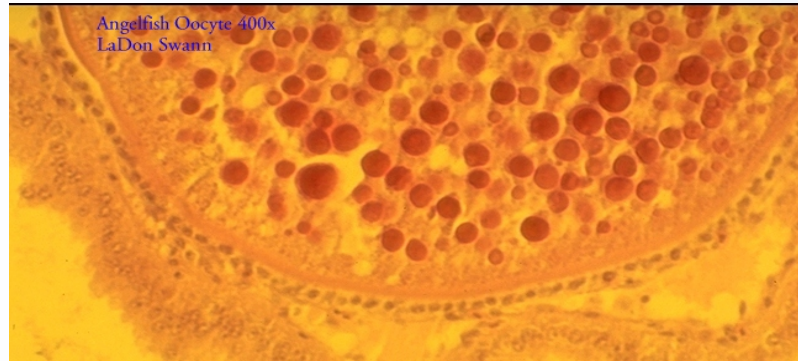


# Důvod intersexuality v rybách?

- 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.



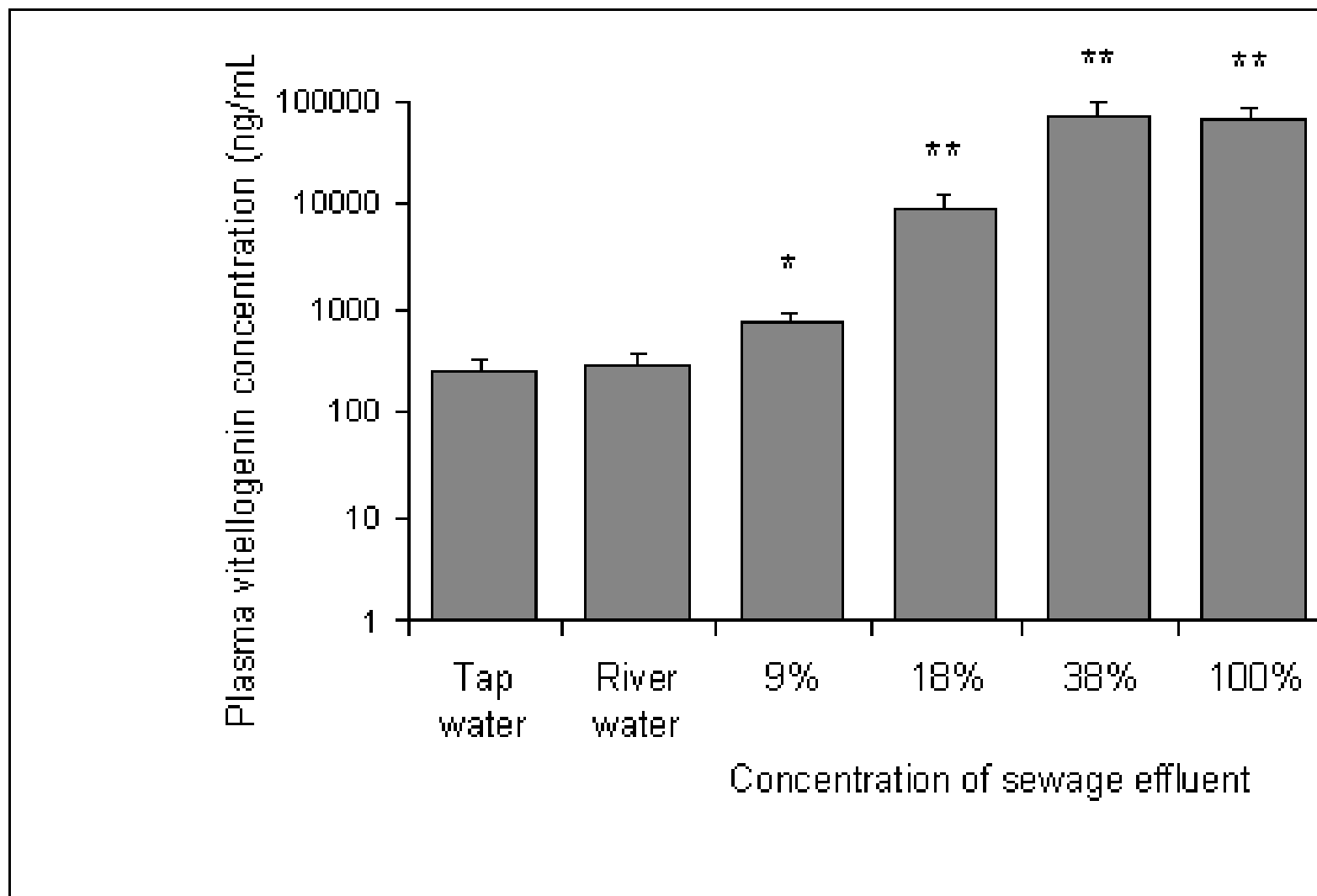
- Řada důkazů ED a narušení reprodukce v rybách v tocích pod výpustěmi ČOV:
  - Poměr pohlaví: velká převaha samic
  - Intersex: zvýšený výskyt
  - Neobvyklý vývoj ovárií
  - Zvýšené hladiny vitellogeninu (proteinu vaječného žloutku) v dospívajících samcích



[https://www.youtube.com/watch?v=25zr\\_mseZOM](https://www.youtube.com/watch?v=25zr_mseZOM)  
(Příroda s hormony)

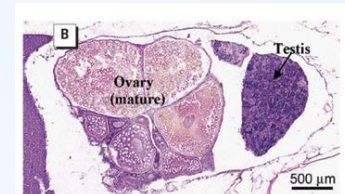
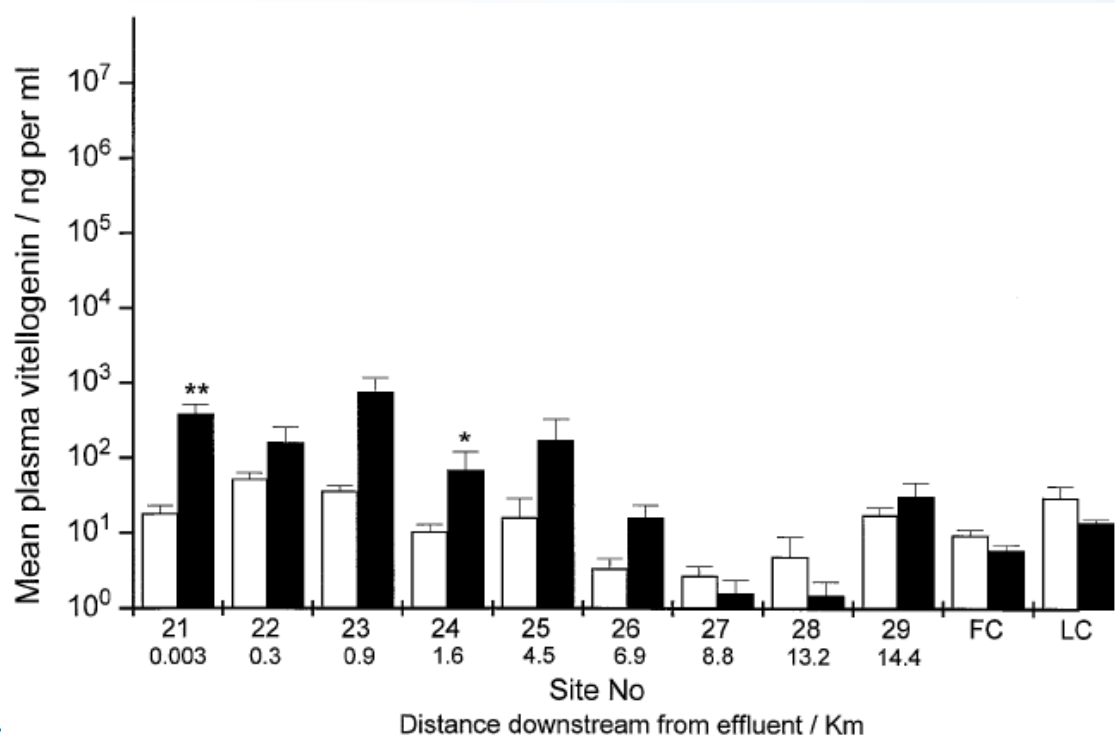


# Produkce vitellogeninu v samcích ryb exponovaných látkami z výpustí ČOV v prostředí



# ČOV a endokrinní disrupce

- klece s pstruhy umístěny v řece pod výpustí ČOV a dále po toku (do vzdálenosti 14 km)
- sledována hladina vitelogeninu u samců
- koncentrace VTG významně zvýšena ještě ve vzdálenosti 4,5 km za výpustí ČOV

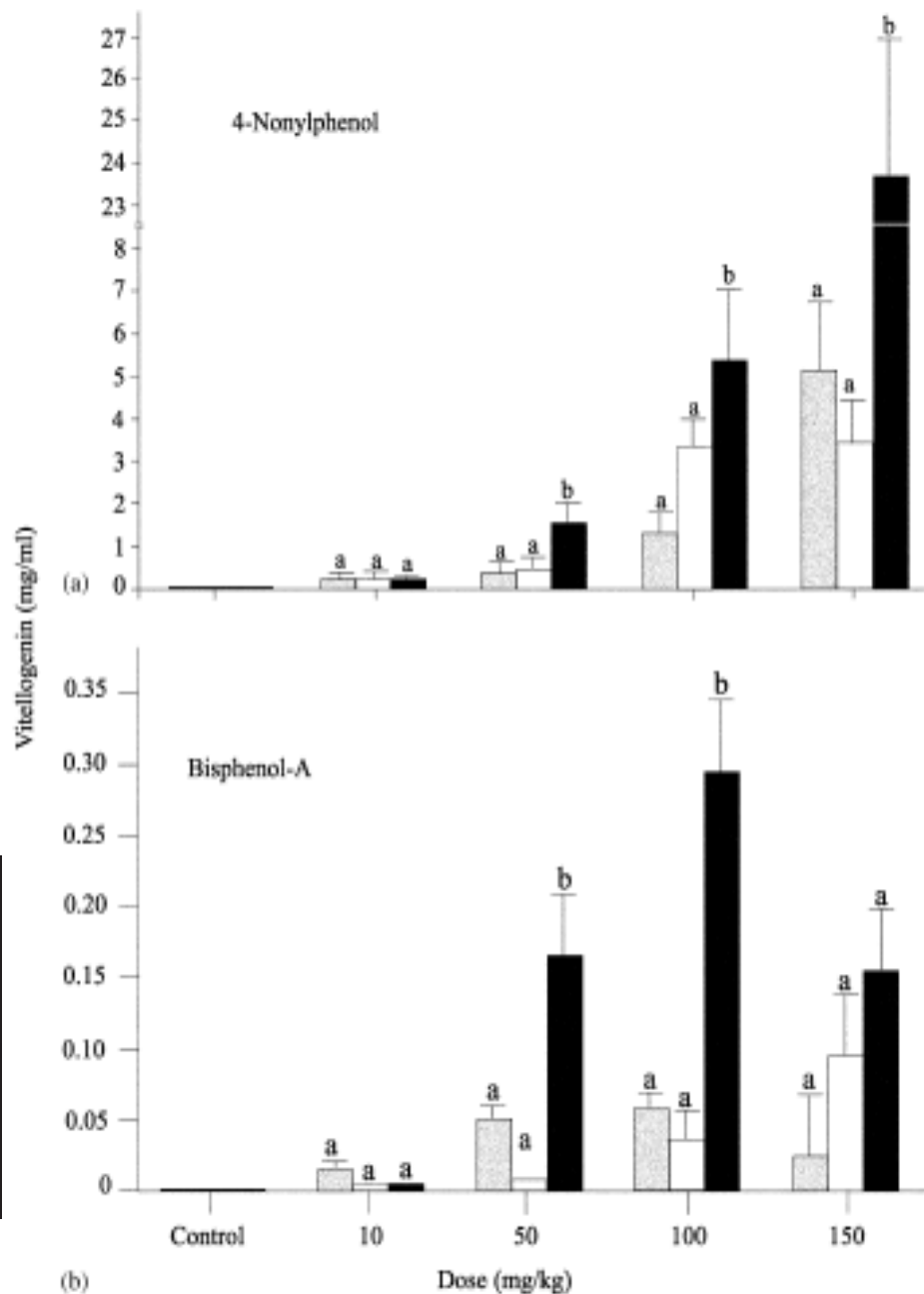


# Expozice dospělých ryb estrogenními látkami vede k feminizaci samců

Halančík

(*Fundulus heteroclitus*)

- 3 populace
- 2 estrogenní látky
  - NP, BPA





# Ekosystémová studie – Kanada

2000-2005

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

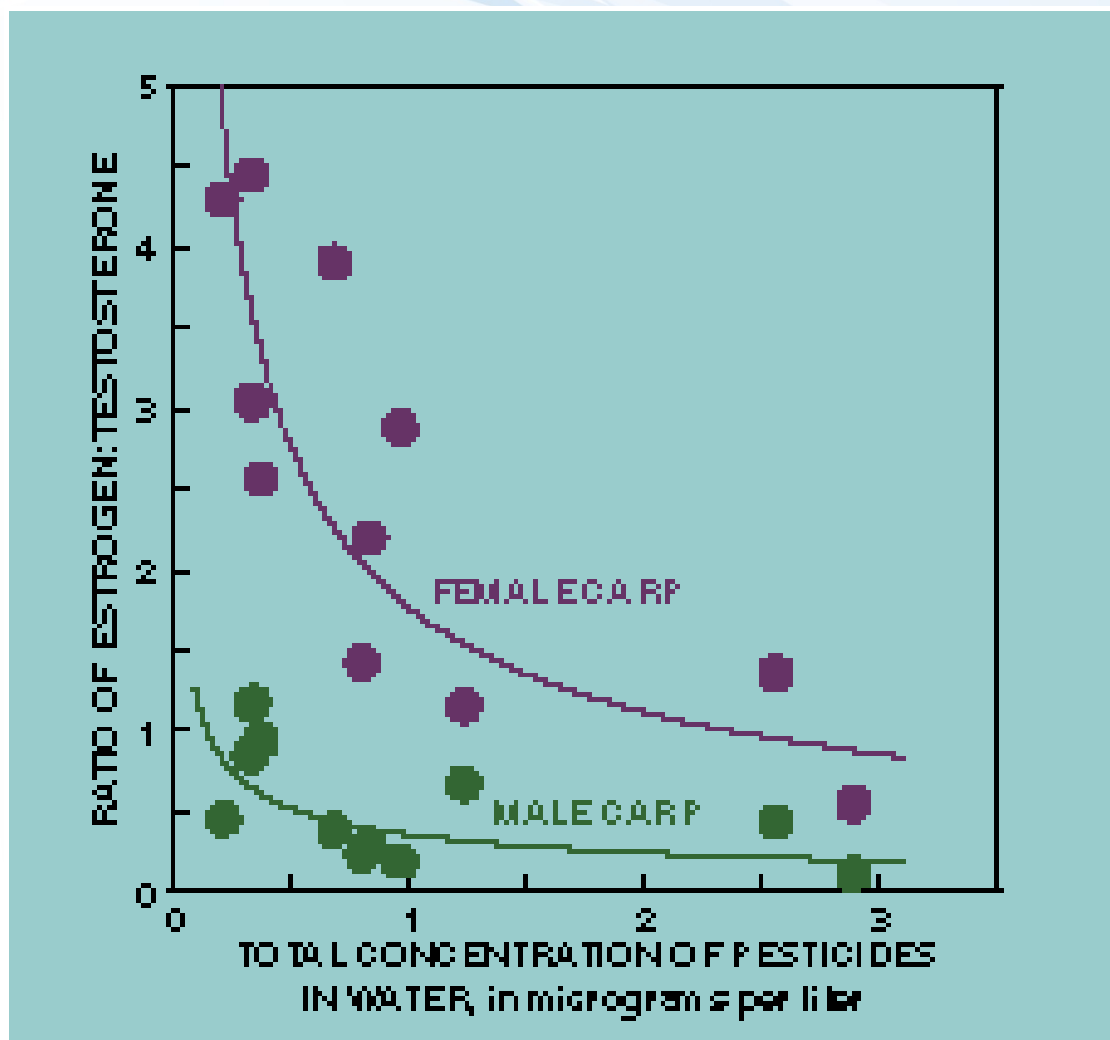
(v povrchových vodách v Evropě 0–23ng/L)

- 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

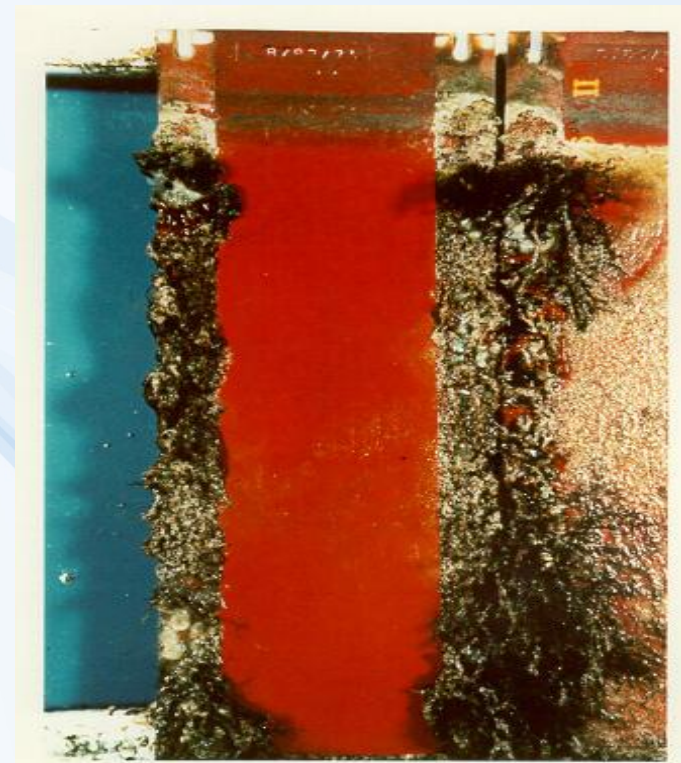
Biocidy: Fungicidy  
Insekticidy  
Bactericidy

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

**TBT = tributylcín**



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



Pomalá biodegradace

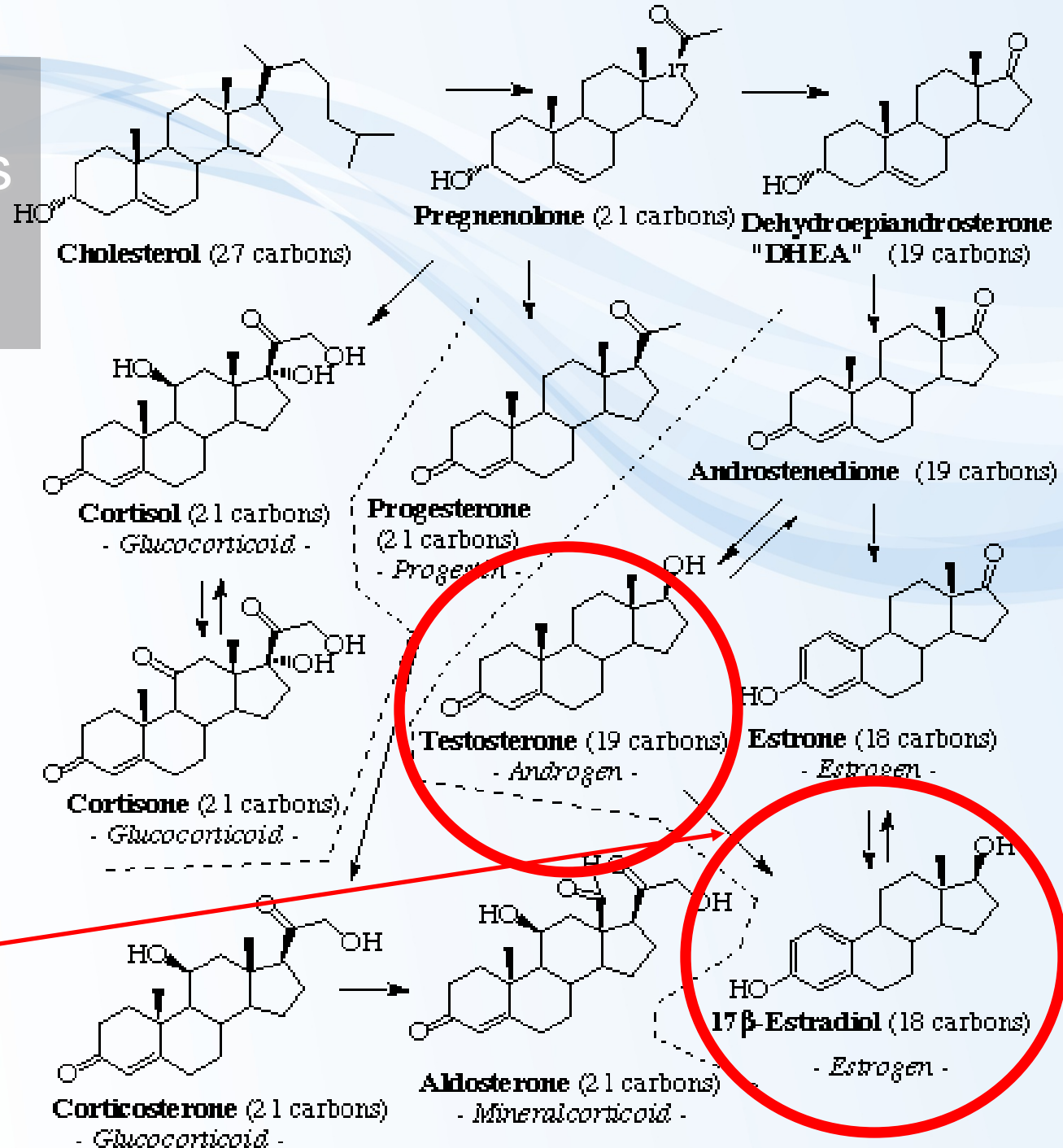
Akumulace ve vodě a sedimentu

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



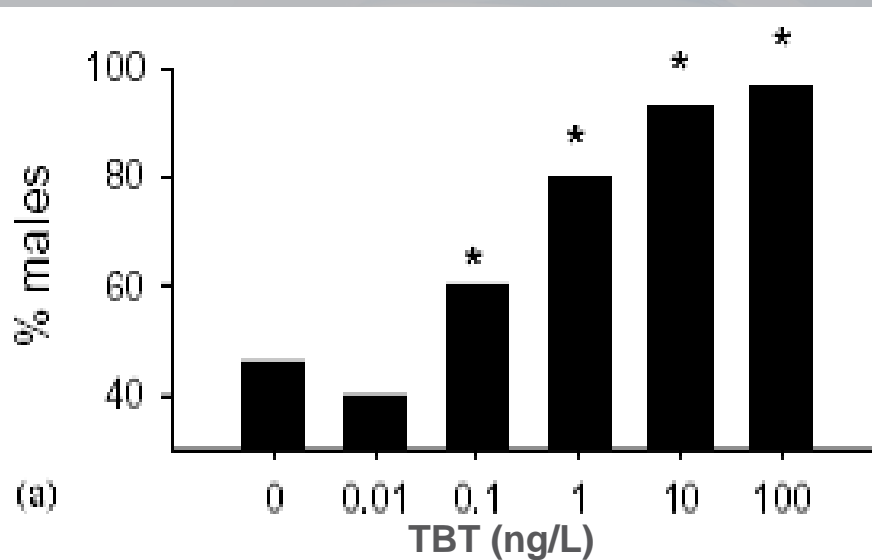
**TBT**



**P450 aromatase**

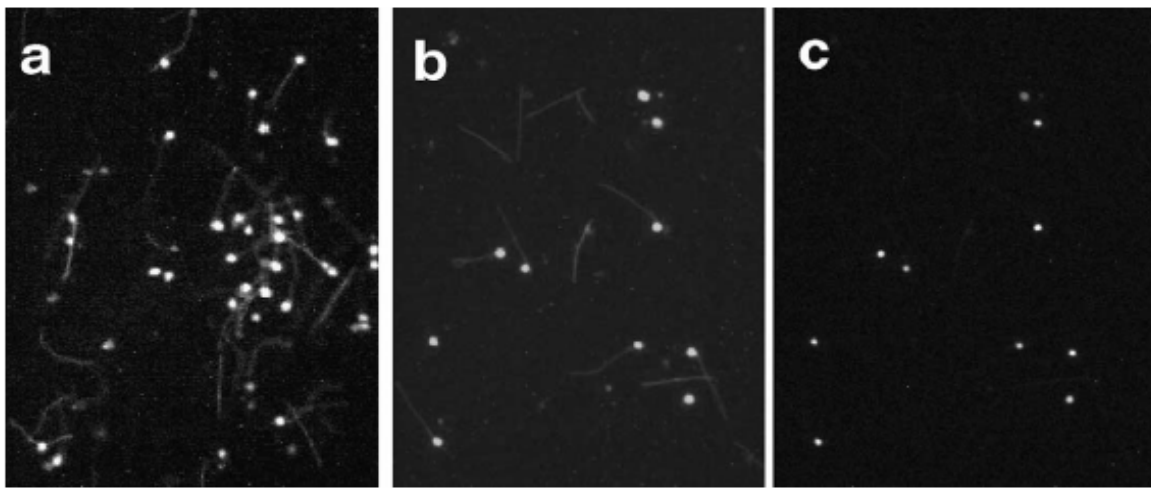


# TBT způsobuje maskulinizaci ryb



Danio pruhované  
(*Danio rerio*)

Ryby exponované TBT od vykolení po 70 dní



# 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

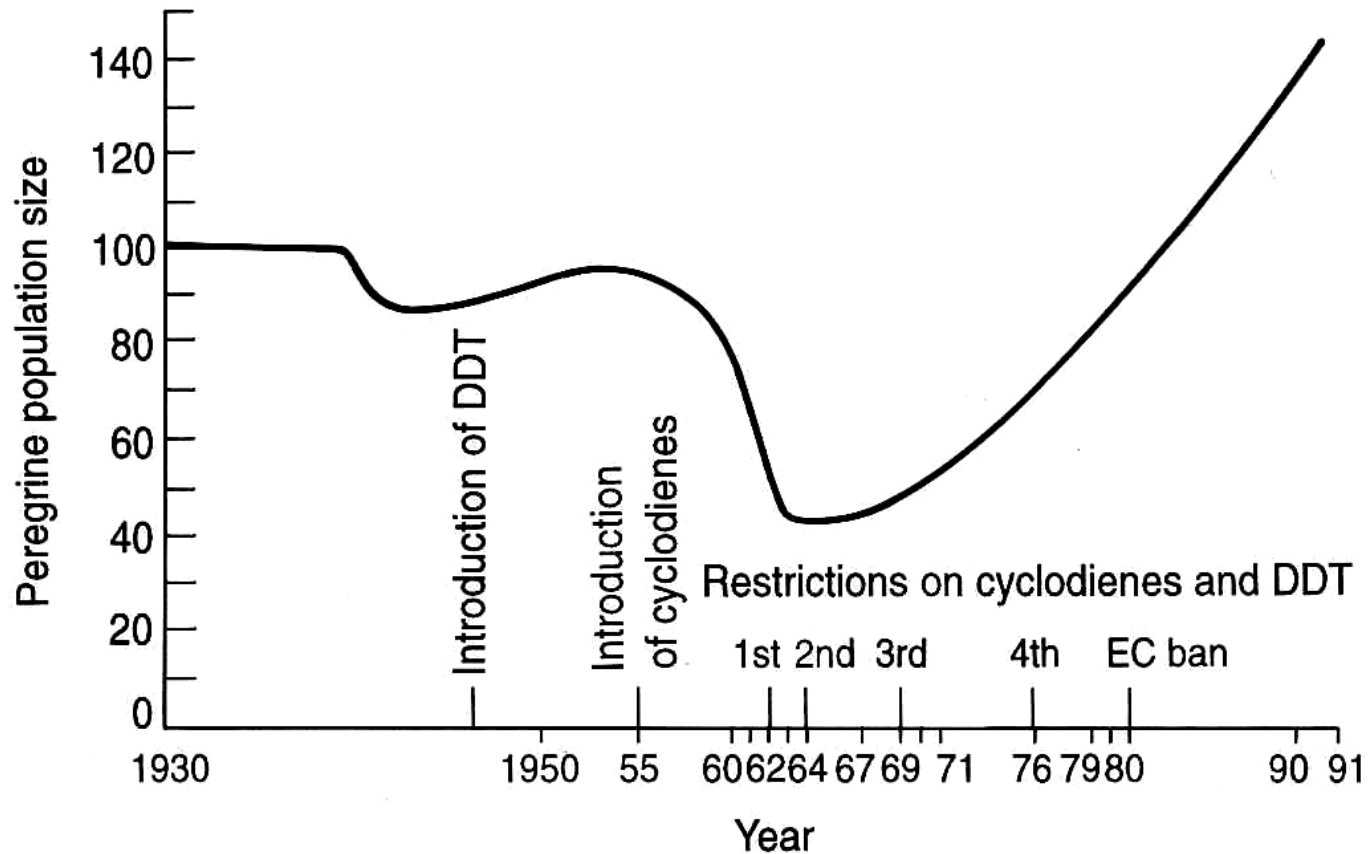
hypotéza: ovlivnění prostaglandinu → transportu Ca a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

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**.

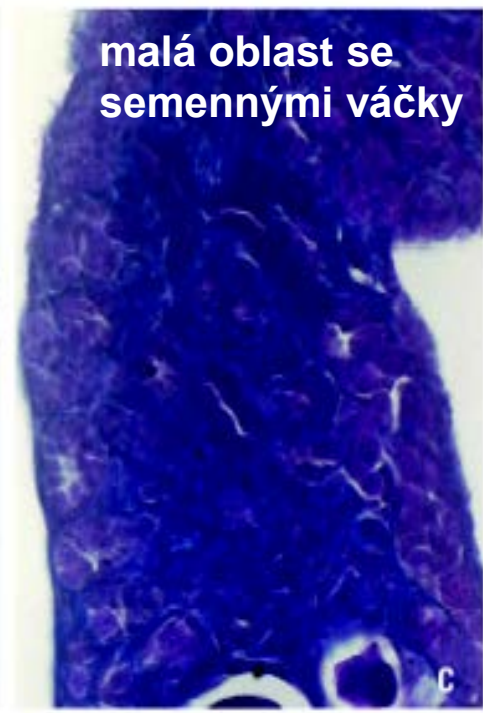
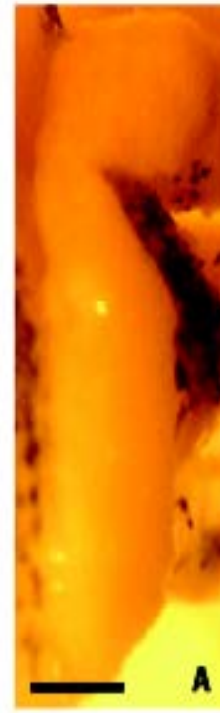
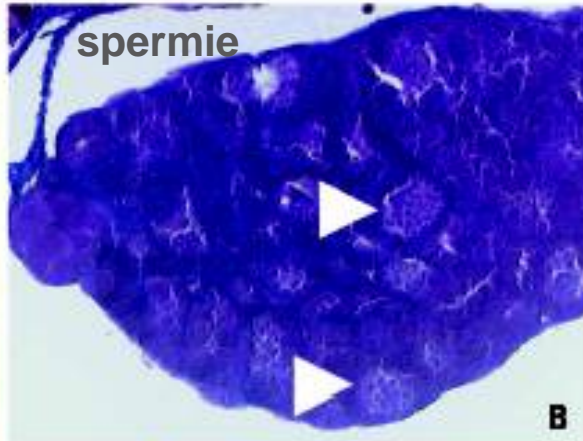
Ovlivnění druhotných pohlavních znaků - velikost svalů *m. dilatator laryngis*. U samců je tento sval vyvinut mohutněji. Při působení xenoandrogenů se sval zvětšuje.



# Expozice atrazinem způsobuje hermafroditismus u samců žab



Michel Cusson



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)



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

*Rana pipiens*  
(skokan levhartí)

# 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

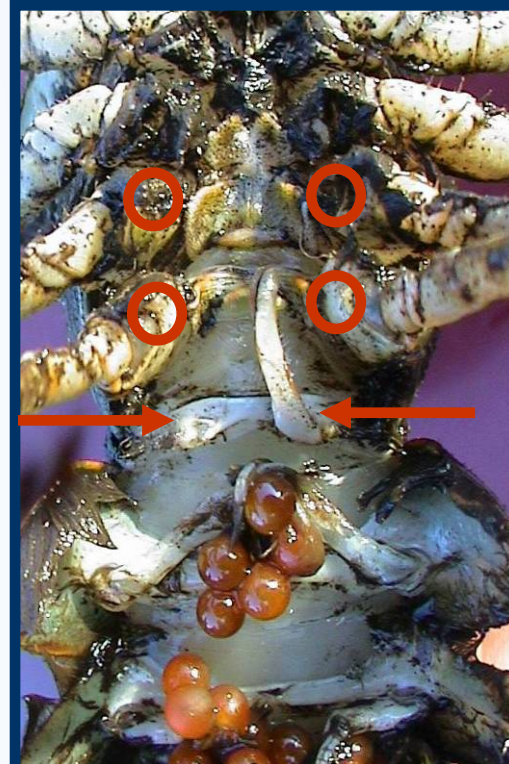
## Blešivec potoční (*Gammarus fossarum*)



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

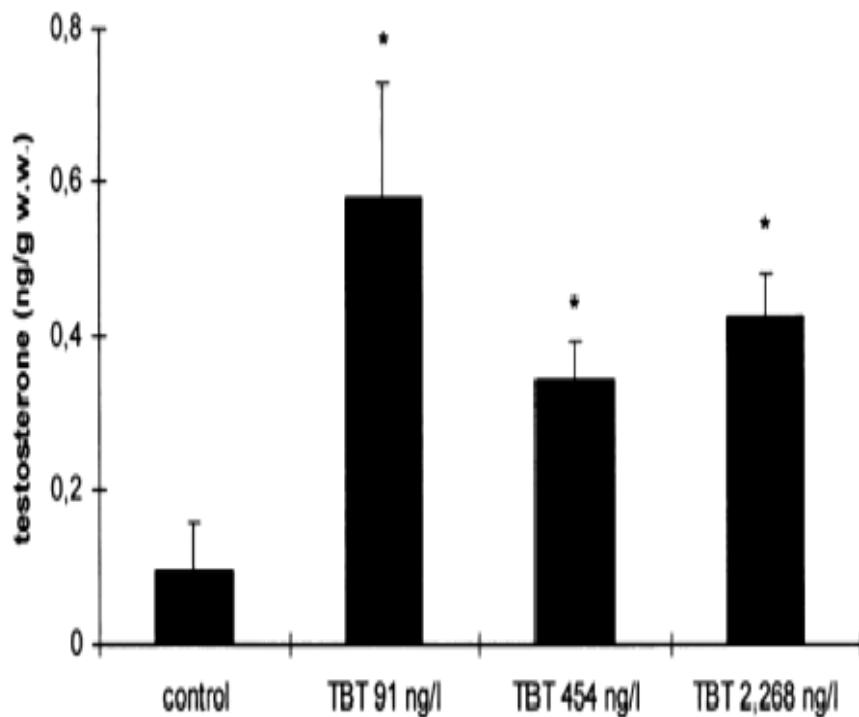
- Ostrava-Karviná
- zatopené poklesové plochy
- reflatce

- **Chráněný druh**

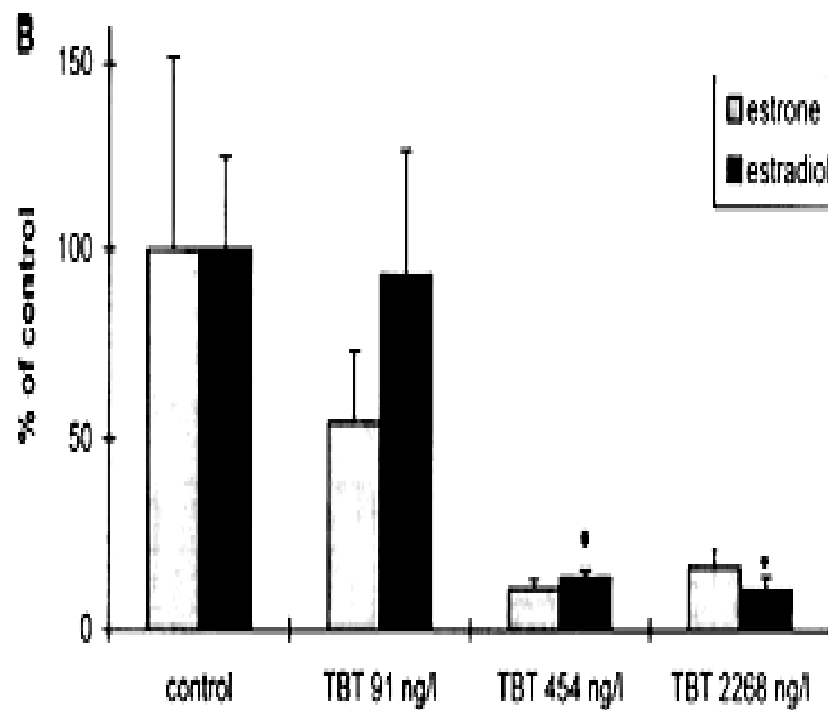


# TBT narušuje hormonální rovnováhu u měkkýšů

Velká kobercová škeble (*Ruditapes decussatus*)



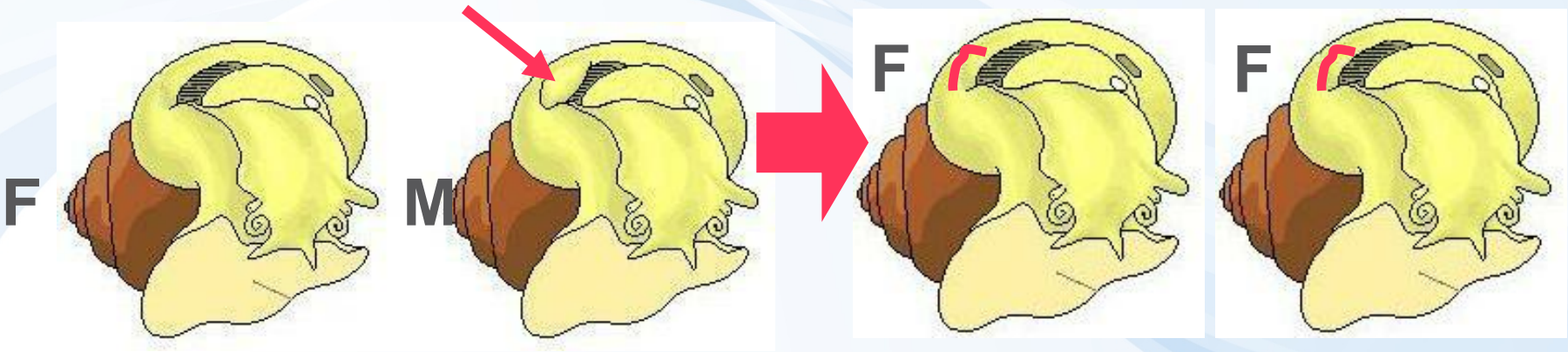
Hladina testosteronu



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 $\mu$ g TPhT/kg u *P. antipodarum*)

**Důsledek: lokální vymizení populací měkkýšů**



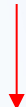


# Širší souvislosti kontaminace organocíny ve vodním prostředí

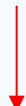
*Kolaps populace měkkýšů*



*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 $\alpha$ -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