

ESTROGENY V POVRCHOVÝCH VODÁCH – ZDROJE, KONCENTRACE, DETEKCE

**Blahoslav Maršálek^{1,2}, Klára Hilsherová², Jan Sadílek^{1,2}, Eliška Maršálková¹,
Valentina Endo¹ a Paula Godoy¹**

¹*Botanický ústav AVČR, Lidická 25, 60200 Brno marsalek@sinice.cz*

²*RECETOX, Př.F.MU Brno, Kamenice 5, Pavilon. A 29, Brno*



Co je endokrinní disrupce (ED)?

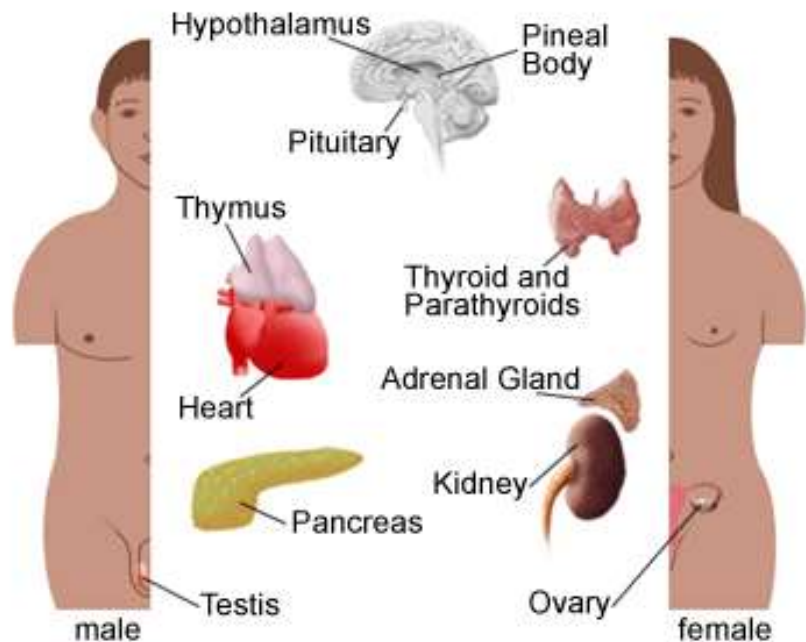
narušení hormonální rovnováhy organismů s potenciálními negativními následky pro celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové a behaviorálních funkce

Co jsou endokrinní disruptory(EDCs)?

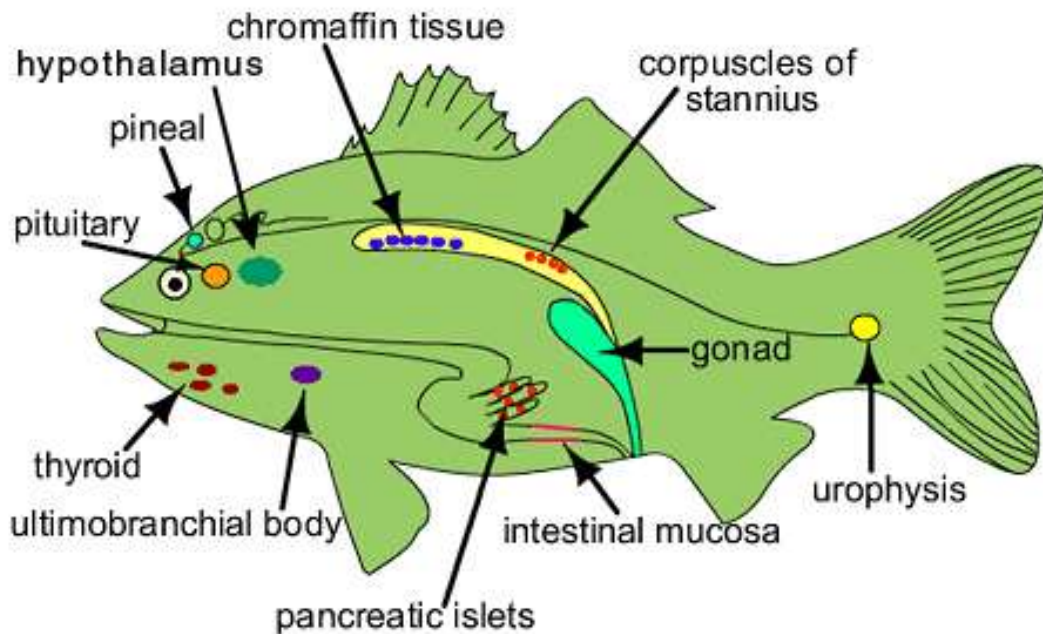
- Definice Evropské komise (1999):
Exogenní látky nebo směsi, které mají potenciální schopnost způsobit endokrinní disrupci u zasaženého organismu, jeho potomků nebo (sub)populací
- Antropogenní i přírodní látky, které přímo nebo nepřímo ovlivňují hormonální systém a mohou působit na velmi nízkých koncentracích

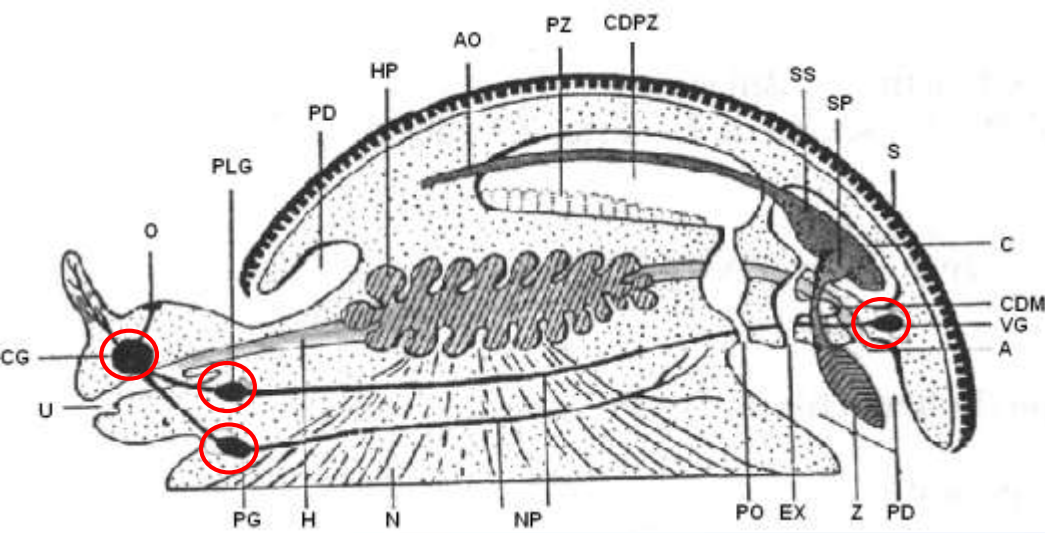


Endocrine System



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

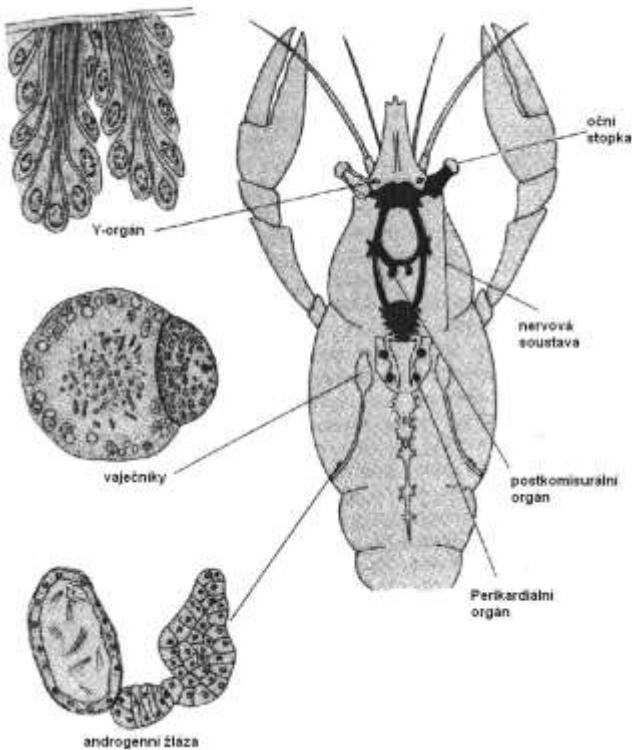




- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)

- ecdysteroidy ???

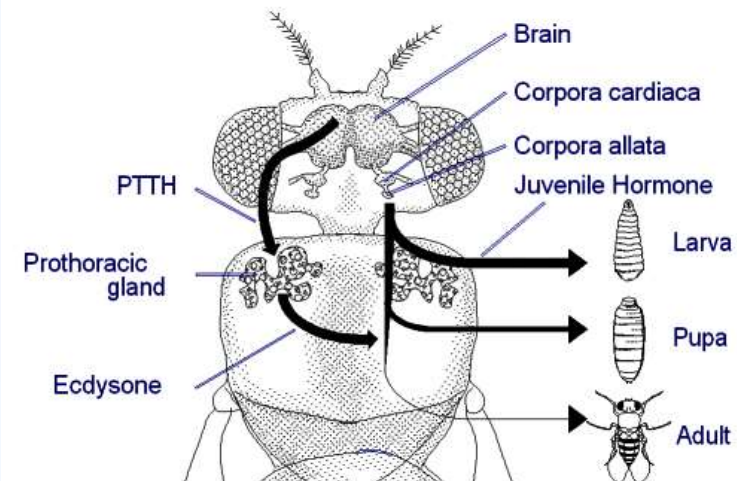
- pohlavní hormony (progesteron, testosteron, estradiol) ???



- neuropeptidy (kladení vajíček, tep, vývoj, růst, metabolismus)

- ecdysteroidy (svlékání, vývoj, diferenciace buněk sinic)

-Maršálek a kol. 1993 Bioscience 76



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



DĚLENÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ

- Estrogenní
- Antiestrogenní

- Androgenní
- Antiandrogenní

- Další hormonální receptory



Následky disrupce

Neschopnost udržet životní funkce

Narušení růstu & vývoje

Narušení odpovědi na vnější impulsy

Změny chování

Potlačená gametogeneze

Embryonální malformace

Zvýšená karcinogeneze



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



Imposex

- Zkratka pro „superimposed sex“:
dodatečná tvorba samčích pohlavních znaků v samicích gonochoristických předožábřých 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



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



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.



Projevy intersexu u korýšů

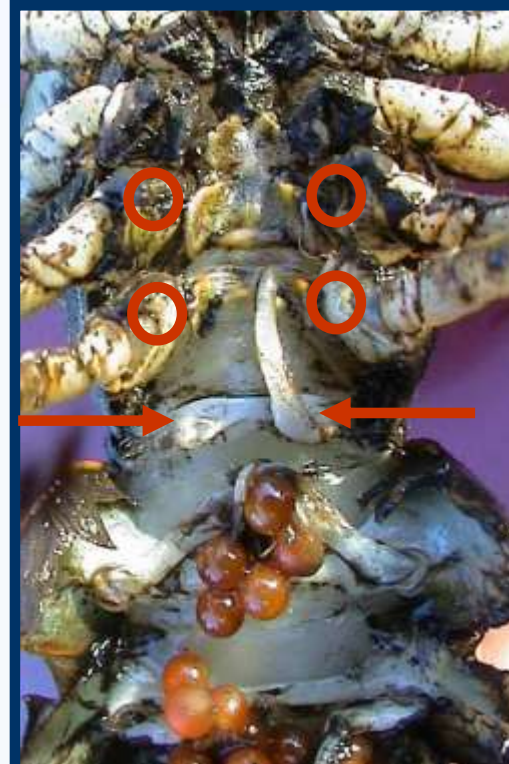
Blešivec potoční (*Gammarus fossarum*)



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

- Ostrava-Karviná
- zatopené poklesové plochy
- reflatce

- **Chráněný druh**



Zdroje estrogenů v povrchové vodě

- **Přírodní estrogeny:**
- produkované **živočichy**
 - Hmyzem (ekdysteron)
 - Samice obratlovců (**desítky miligramů/den**)
- produkované **rostlinami**
 - Tzv. fytoestrogeny (izoflavony, kumestany, nebo lignany) obilniny, luštěniny..
- **Mykoestrogeny**- mykotoxin F-2 produkovaný plísněmi rodu Fusarium.- z půdy a kompostů do vody
- **Fykoestrogeny** – řasy a sinice - vodní květy sinic!!!



Xenoestrogeny-

- Nejznámější jsou EE2, alfa E2.....
- Chystaná substituce EE2 za 17-betaE2
- Farmaka
- Pesticidy
- Ftaláty
- Produkty hoření a vaření
- Některé kovy, PCB, TCDD... .. .



Látky s předpokládanou estrogenní potencií

Insecticides

Carbaryl
Chlordan
DDT and DDE
Dicofol
Dieldrin
Endosulfan
Lindan
Methoxychlor
Mirex
Oxychlordan
Parathion
Toxaphen
Pyrethroide

Herbicides

Alachlor
Amitrol
Atrazin
2,4-Dichlorphenoxy-acetic acid
Metribuzin
Nitrofen
2,4,5-Trichlorphenoxy-acetic acid

Nematicides

Aldicarb
DBCP (1,2-Dibrom-3-chlorpropan)

Fungicides

Benomyl
Fenarimol
Mancozeb
Maneb
Tributyltin compounds (TBT)
Triphenyltin compounds (TPT)
Vinclozolin
Zineb

Industrial chemicals

Alkylphenols
Bisphenol A
Dioxine (2,3,7,8-TCDD)
Pentachlorophenol
Phthalate
Polybromated Biphenyls (PBB)
Polychlorinated Biphenyls (PCB)

(Oehlmann & Markert, 1997)



Detekce a kvantifikace estrogenů

Chemická - instrumentální analýza

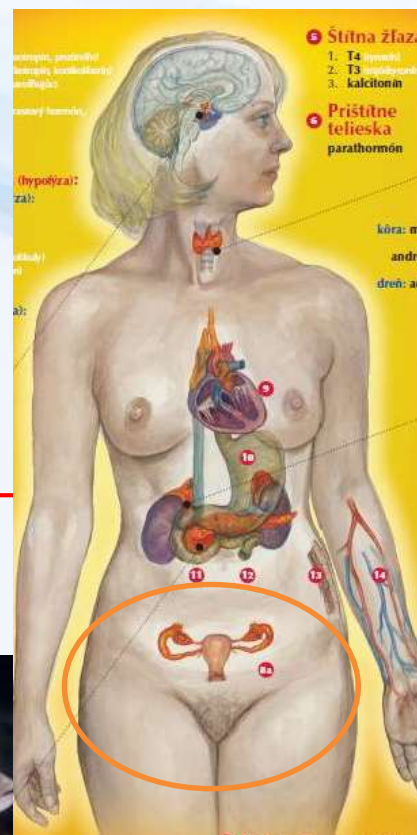
- 😊 Koncentrace látky (návaznost na legislativu)
- ☹️ Nákladnost, někdy příliš nízké koncentrace v příliš komplexních maticích
- ☹️ Jen vybrané látky
- ☹️ Žádná informace o možných interakcích

In vivo and *in situ* studie

- 😊 Environmentální relevance
- ☹️ Etické otázky (snaha snížit počty zvířat a míru utrpení)
- ☹️ Časově a finančně nákladné

In vitro testy

- 😊 Senzitivní, relativně rychlé a nenákladné (screening)
- 😊 ☹️ Celková aktivita směsi
- 😊 ☹️ Jeden mechanismus reakce



Standardní testy OECD

- **Androgenised Female Stickleback Screening Assay** - anti-androgenní aktivita u koljušky
- **21-day Fish Endocrine Screening Assay** – ED u střeve 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



Instrumentální detekce a **limity detekce**

Závislost na analytu, složení matrice a předúpravě vzorku

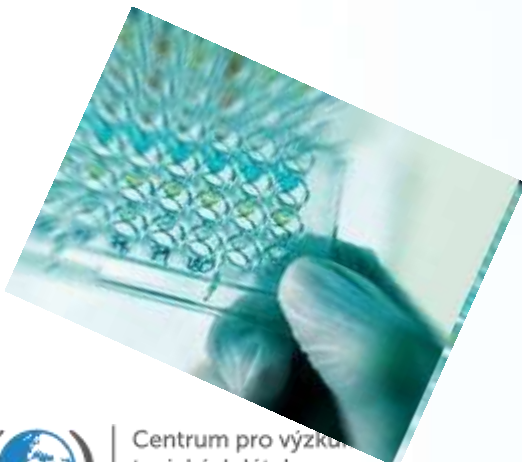
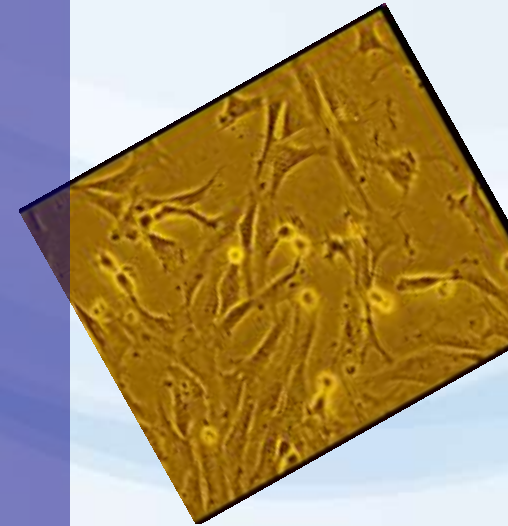
- Imunochemické metody:
 - **ELISA** (jednotky ng/L – bez zakoncentrování)
 - srovnatelné s instrumentálními technikami
- Instrumentální metody:
 - **HPLC-DAD** (až desítky ng/L - zakoncentrování)
 - **LC-MS/MS** (až setiny ng/L - zakoncentrování)
 - **GC-MS** (až setiny ng/L - zakoncentrování)



In vitro metody

zjednodušený „organismus“

- + rychlé, levné, citlivé
- + dobrá interpretovatelnost výsledků
- + etické hledisko
- nedokážou plně nahradit metody *in vivo*
nezahrnují např. bioakumulaci, biotransformaci, homeostatickou kontrolu, ...



Užití:

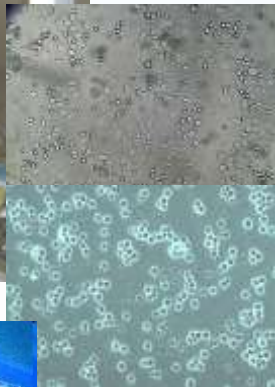
Screeningové a mechanistické studie

Před vyvozením konečných závěrů
nutno získané poznatky potvrdit
in vivo

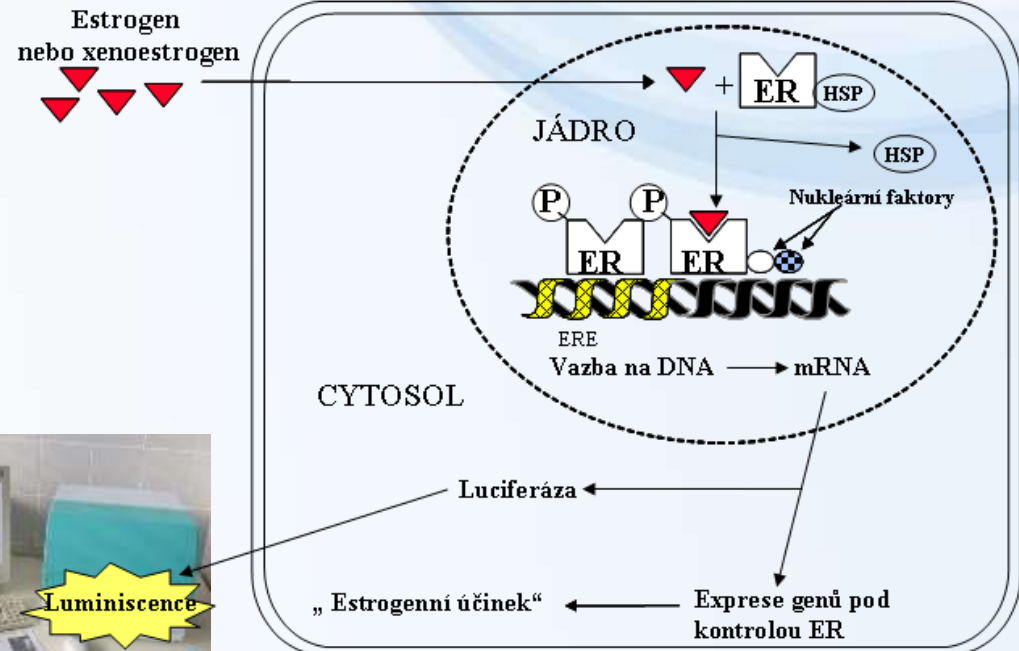


Princip *in vitro* testů

Mechanismus aktivace/inhibice reportérového genu



- sledují účinky na nukleární receptory a následnou aktivaci genů
- důležité mechanismy toxicity, velmi citlivý, i chronická toxicita
- celkový účinek směsí látek
- **estrogenní potenciál**



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

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



Hodnocení estrogenního potenciálu environmentálních vzorků

Chemická analýza:

- analýza širokého spektra potenciálních endokrinních disruptorů
- metody pro kvantifikaci jen u některých látek
- náročné na vybavení, čas
- neposkytuje informace o biologických efektech komplexních směsí
- nezohledňuje možné interakce mezi jednotlivými látkami



Specifické biotesty:

- celková biologická aktivita látek ve směsi se specifickými mechanismy působení
- mohou indikovat přítomnost toxikologicky významných látek, které nebyly analyticky stanoveny
- zohledňují možné interakce látek ve směsích
- screening většího množství vzorků, rychlé, citlivé, relativně levné



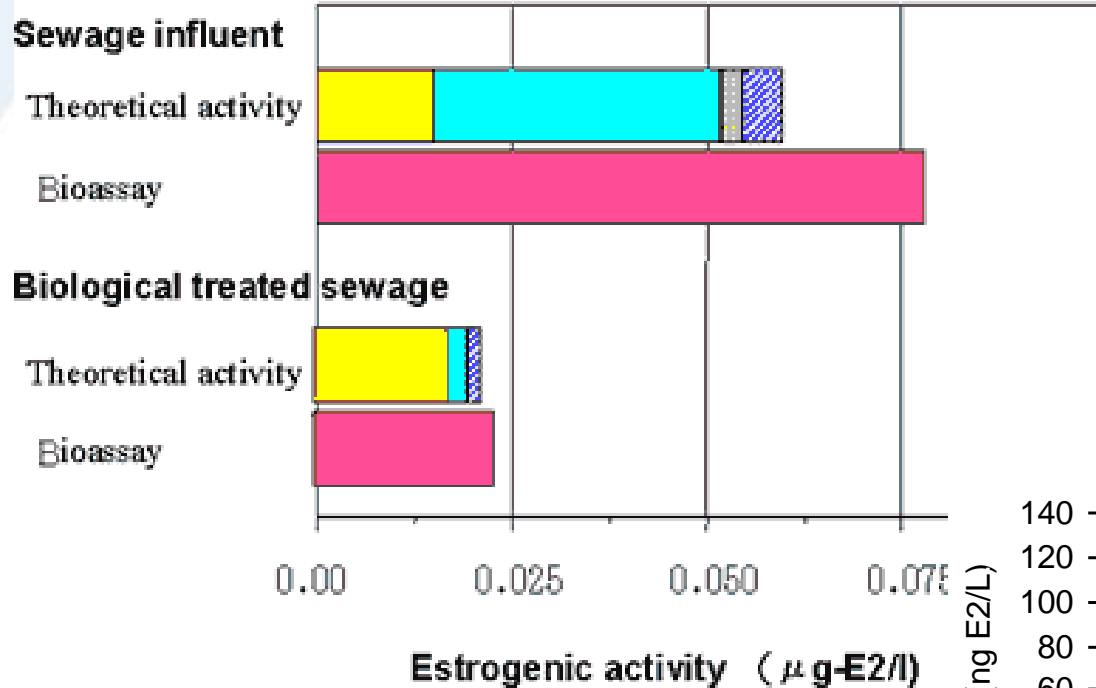
Problémy testování ED

- 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

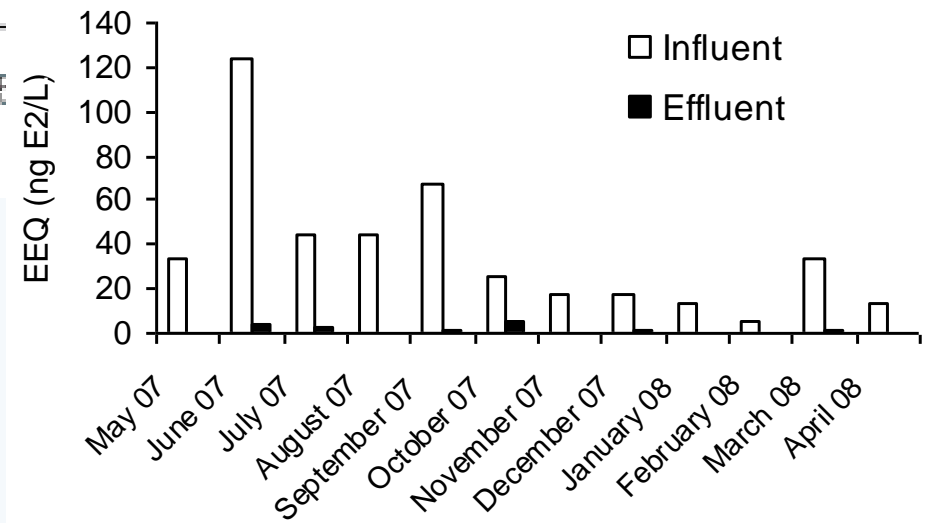


Estrogenní aktivita v ČOV

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



Odbourávání estrogenní aktivity v ČOV Brno



Širší souvislosti kontaminace estrogeny ve vodním prostředí

*Kolaps populací, omezená reprodukce,
malformace (měkkýšů, zoobentosu, ryb)*



Změna struktury a abundance řas a makrofyt



*Velký rozvoj populací vodních rostlin, zarůstání
vodních toků*



Pokles populací ryb

**Takto je dramaticky ovlivněn celý akvatický
ekosystém**



Shrnutí

- ED představují širokou skupinu látek, **estrogeny jsou jen jedna skupina ED**
- **Estrogeny ve vodách nejsou zdaleka pouze z hormonální antikoncepce**, 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, růst a vývoj
- **Ideální detekce je kombinace in vitro biotestů** pro charakterizaci potenciálního vlivu estrogenů v kombinaci s **LC-MS/MS** a to jak pro hodnocení povrchových, tak odpadních vod.



DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

...i za to, že vám není lhostejné, kolik estrogenů použítte do vodních ekosystémů..;-))

Výzkum je podporován z projektů MPO
Biostream a Nanoradi.





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí