



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Endokrinní disruptory a další málo studované kontaminanty ve vodách: hladiny, účinky, detekce

Luděk Bláha

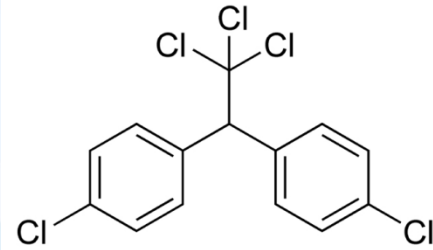
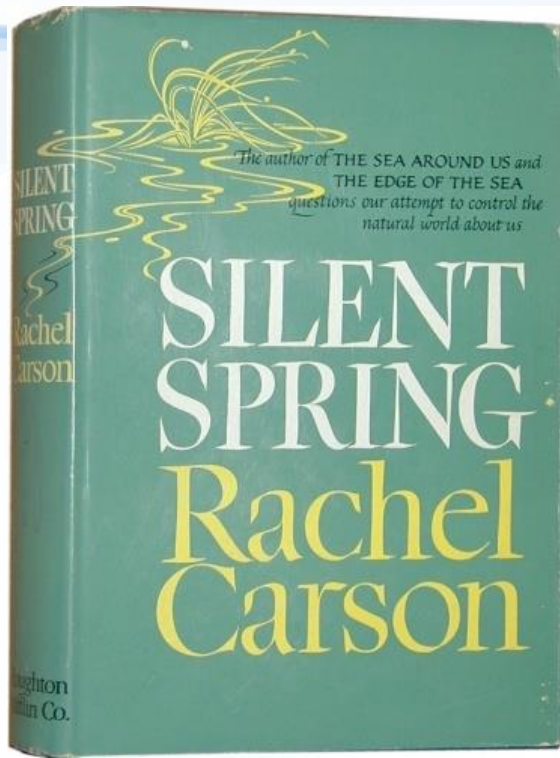
blaha@recetox.muni.cz

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1962



"DDT is good for me-e-e!"

The great expectations held for DDT have been realized. During 1946, exhaustive scientific tests have shown that, when properly used, DDT kills a host of destructive insect pests, and is a benefactor of all humanity.

Pennsalt produces DDT and its products in all standard forms and is now one of the country's largest producers of this amazing insecticide. Today, everyone can enjoy added comfort, health and safety through the insect-killing powers of Pennsalt DDT products . . . and DDT is only one of Pennsalt's many chemical products which benefit industry, farm and home.

GOOD FOR STEERS—Beef grows sooner nowadays . . . for it's a scientific fact that—compared to untreated cattle—beef-steers gain up to 50 pounds extra when protected from horn flies and many other pests with DDT insecticides.

LOOK FOR THE HOME—helps you to make healthier, more comfortable homes . . . protect your family from dangerous insect pests. Use Knox-Out DDT Powders and Sprays as directed . . . then watch the bugs "bite the dust"!

GOOD FOR FRUITS—Bigger apples, juicier fruits that are free from unsightly worms . . . all benefits resulting from DDT dusts and sprays.

GOOD FOR DAIRIES—Up to 20% more milk . . . more butter . . . more cheese . . . tests prove greater milk production when dairy cows are protected from the annoyance of many insects with DDT insecticides like Knox-Out Stock and Barn Sprays.

GOOD FOR ROW CROPS—25 more barrels of potatoes per acre . . . actual DDT tests have shown crop increases like that! DDT dusts and sprays help truck farmers pass those gains along to you.

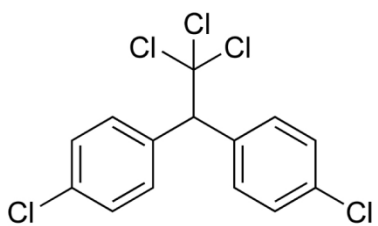
LOOK FOR INDUSTRY—Food processing plants, laundries, dry cleaning plants, hotels . . . dozens of industries gain effective bug control, more pleasant work conditions with Pennsalt DDT products.

PENN SALT
CHEMICALS
87 Years' Service to Industry • Farm • Home
PENNSYLVANIA SALT MANUFACTURING COMPANY
WIDENER BUILDING, PHILADELPHIA 7, PA.

Bitman et al. *Science* 1970, 168(3931): 594

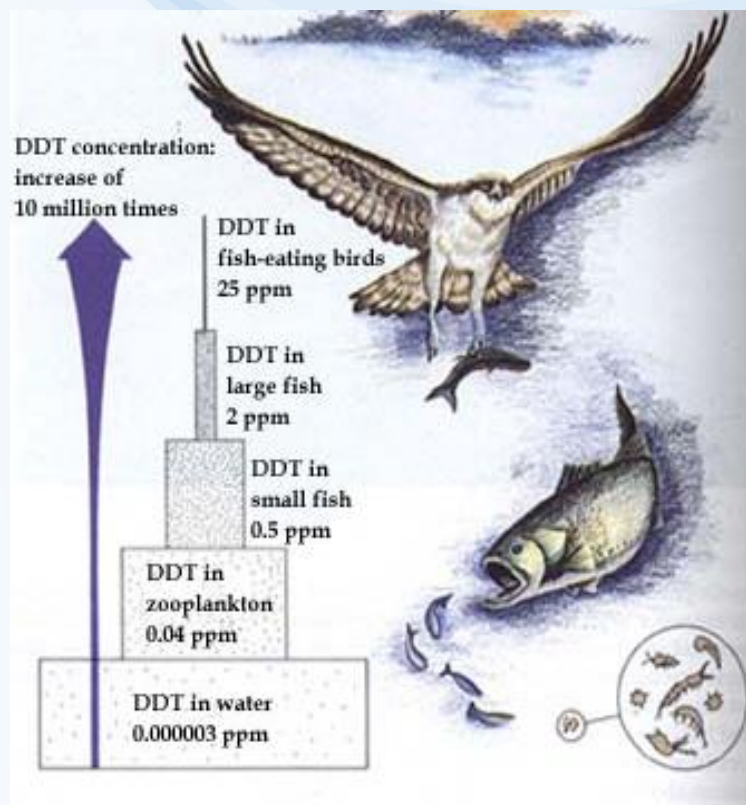


Biochemie: ptačí karbonátdehydratáza



In situ: bioakumulace
→ úbytek populací ptáků

In vivo: měknutí vajíček



Úvodem:

Ochrana přírody („environment“) před toxickými látkami je nezbytná pro zajištění “ekosystémových služeb” i zdraví a přežití samotného člověka



Příklad – VODNÍ EKOSYSTÉMY a antropogenní stres

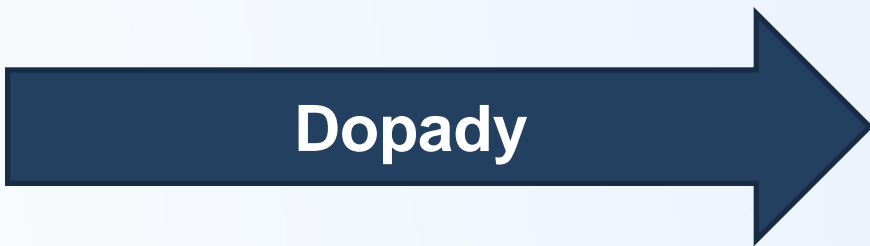
Přímé



Nepřímé
Globální změna



Pozn: chemické látky jsou pouze jedním, a doposud málo kvantifikovaným faktorem !



- **Ztráty biodiversity**
 - ? *K čemu je rozmanitost dobrá ?*



Příklad - změny v biodiverzitě



Příklad - změny v biodiverzitě

NATURE (2012)
482: 20



ATTACK OF THE BLOBS

Blooms of giant Nomura's jellyfish (*Nemopilema nomura*) have troubled Japanese fishing crews.

increase in the global population of jellyfish — a catch-all term that covers some 2,000 species of true cnidarian jellyfish, ctenophores (or comb jellies) and other floating creatures called tunicates. But many marine biologists are now questioning the idea that jellyfish have started to overrun the oceans.

This week, a group of researchers published preliminary results from what will be the most comprehensive review of jellyfish population data¹. They say that there is not yet enough evi-

RYUICHI NISHIOKA



Ztráty biodiverzity



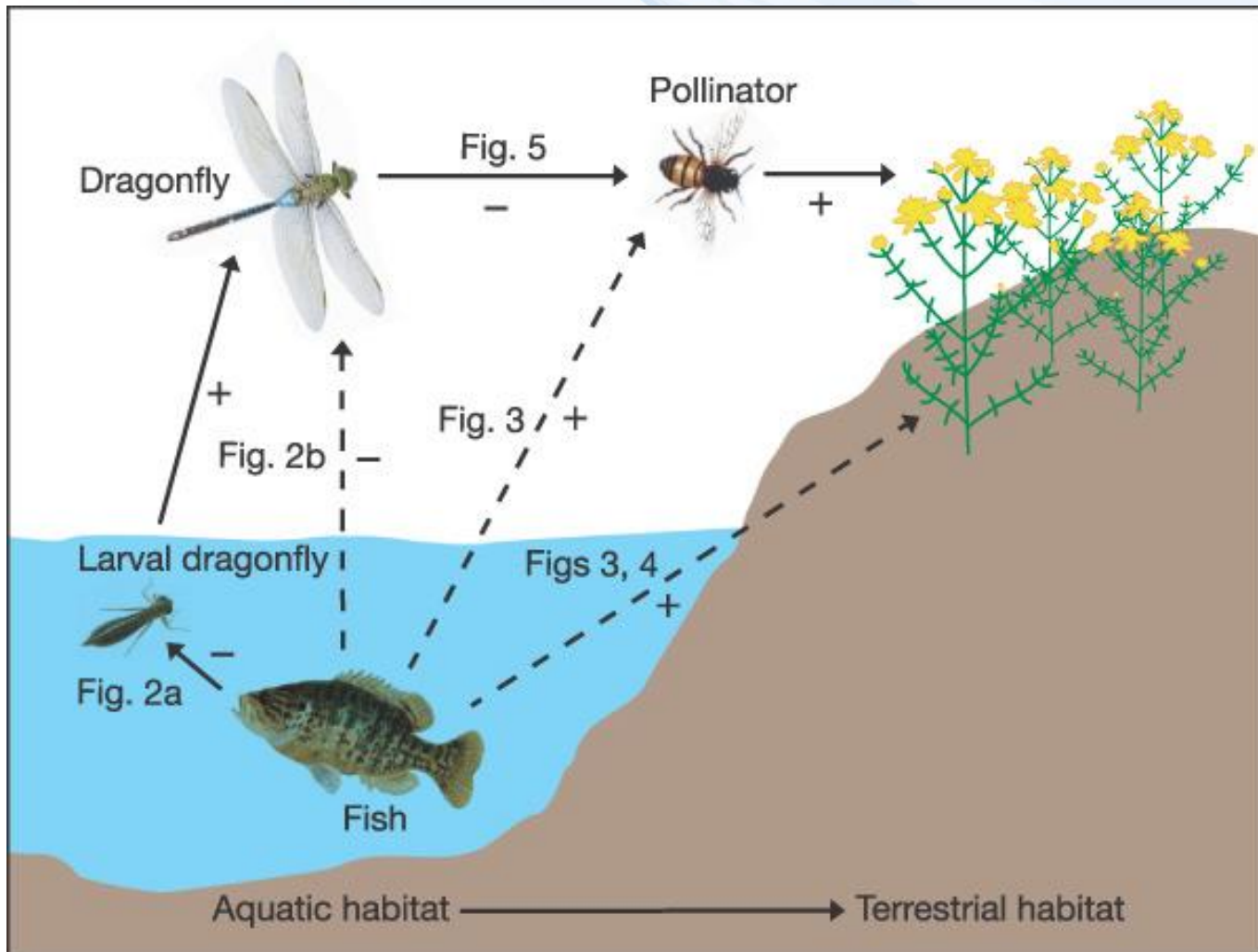
• Narušení ekosystémových služeb

- Nevyrovnané vodní cykly
 - Nedostatek vody
 - Sucha / Záplavy
- **Narušení kvality vody**
 - **Pitná voda**
 - **Koupací vody**
 - **Toxické látky v potravních řetězcích**
- Nedostatek potravy
 - Přímé → ryby (EDCs, overfishing)
 - Nepřímé → výnosy na polích
- Ekonomické dopady



Vliv na vodu (ryby) → snížení úrody na polích

NATURE (2005) 437: 880



Účinky na biotu → globální dopady

Míchání oceánů

→ Ochlazování atmosféry

[Nature 447, p.522, May 31, 2007]



Mořský život přispívá až 50% k mechanické energii potřebné k promíchání teplých vod z povrchu do hlubších vrstev oceánů

[Dewar, Marine Res 64:541 (2006)]

[Katija a Dabiri, Nature 460:624 (2009)]

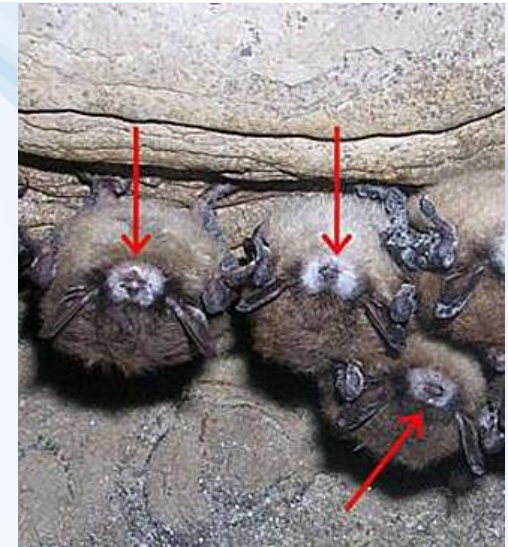
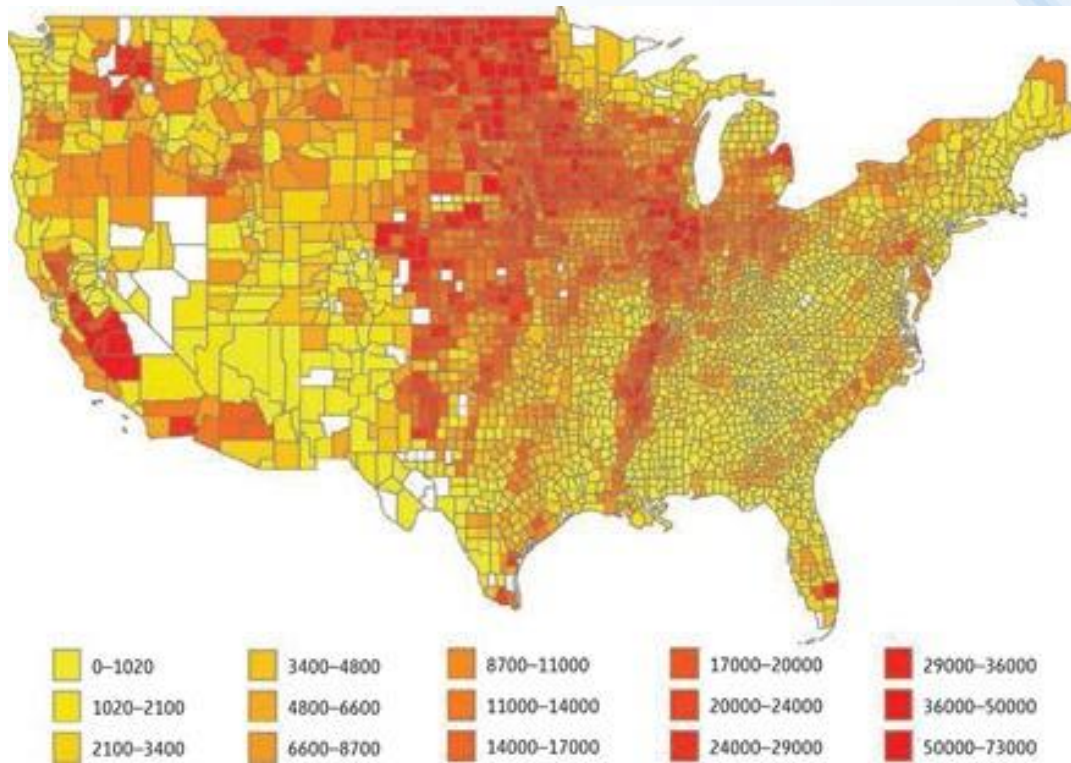


CONSERVATION

Economic Importance of Bats in Agriculture

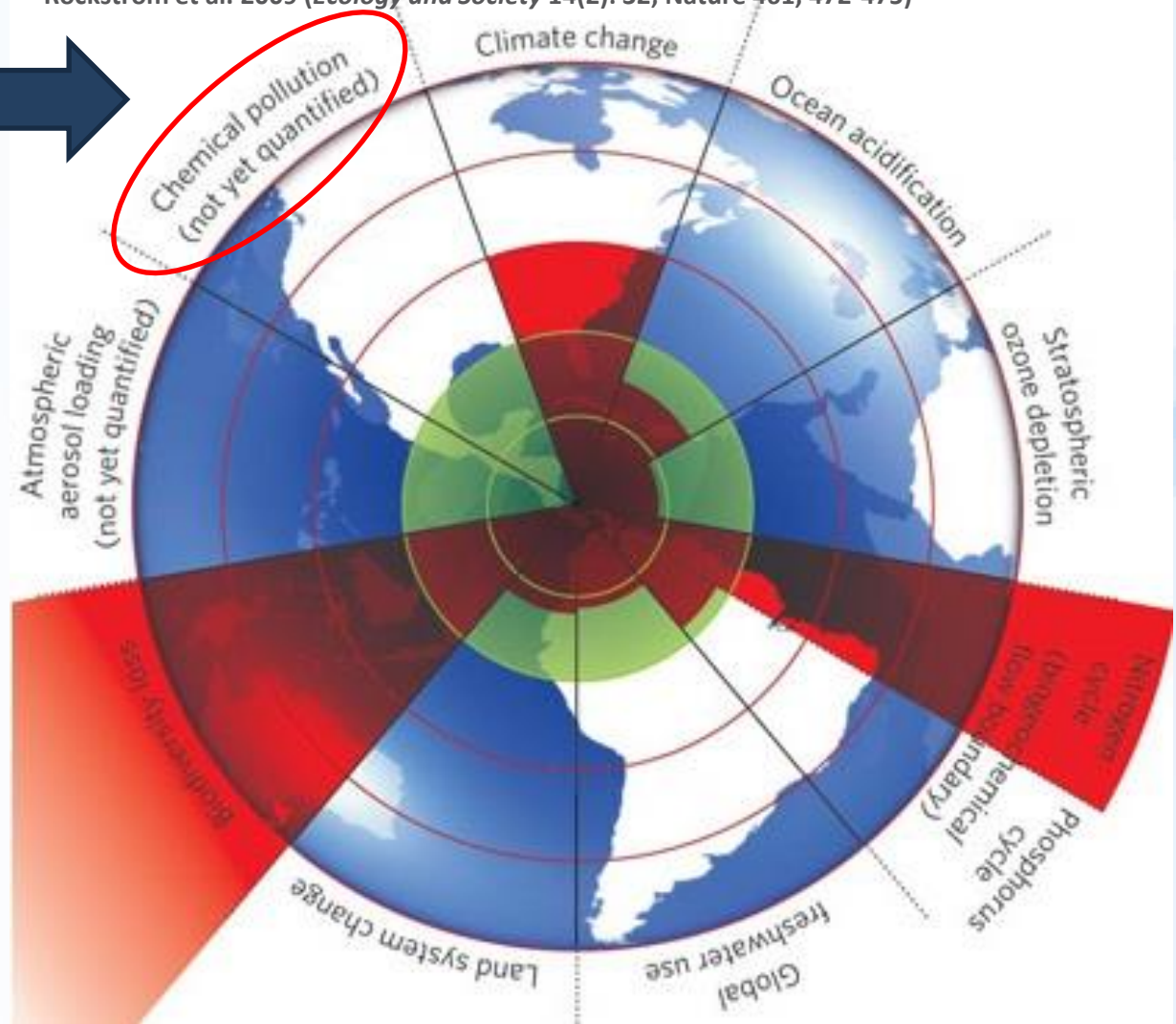
Justin G. Boyles,^{1*} Paul M. Cryan,² Gary F. McCracken,³ Thomas H. Kunz⁴

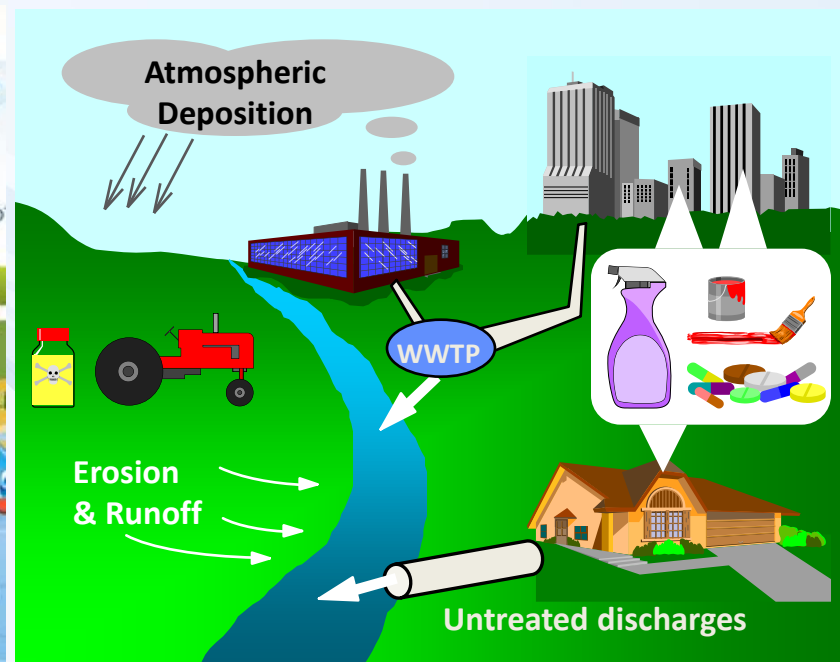
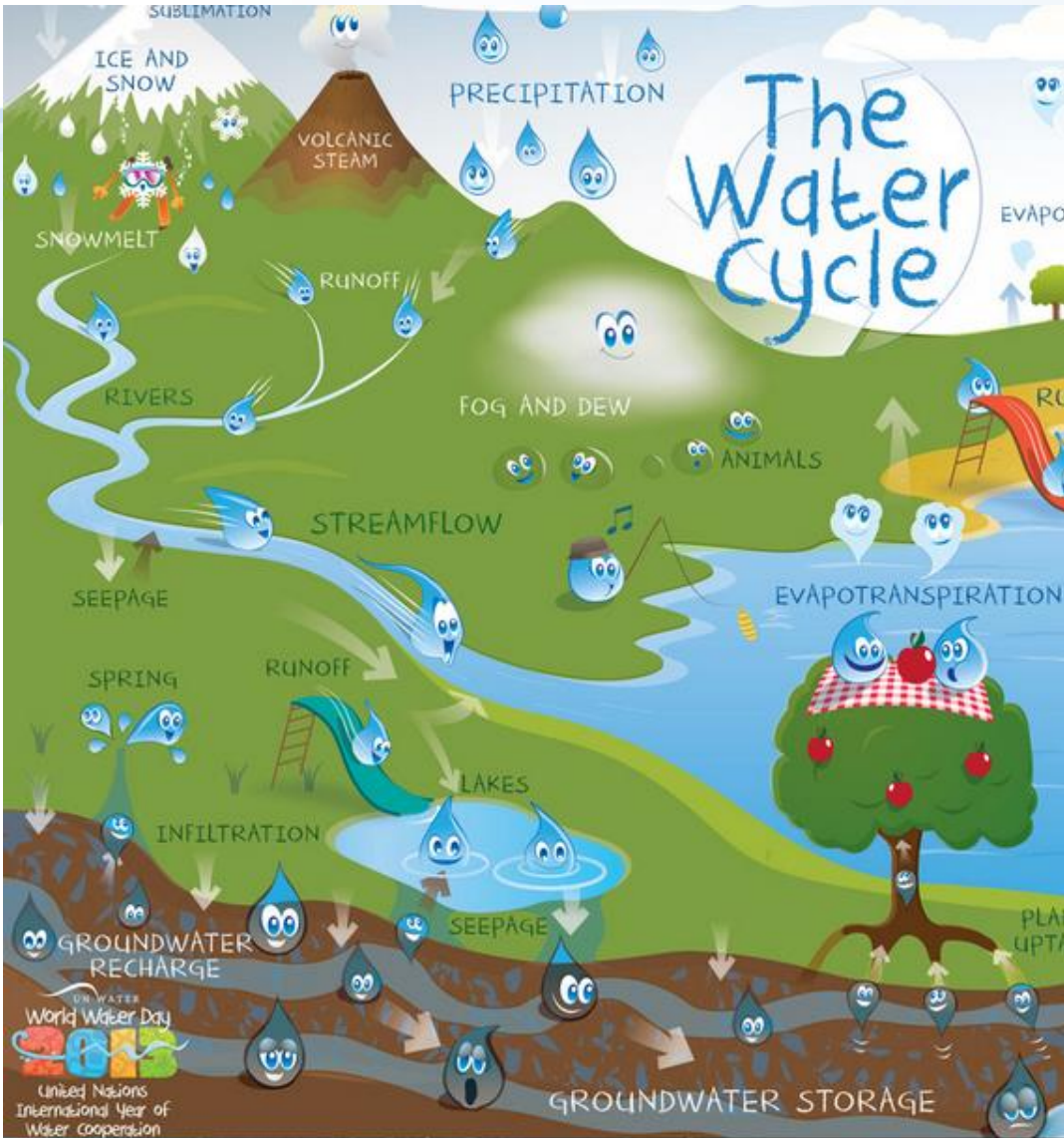
Insectivorous bat populations, adversely impacted by white-nose syndrome and wind turbines, may be worth billions of dollars to North American agriculture.



A safe operating space for humanity & the nine planetary boundaries

Rockstrom et al. 2009 (*Ecology and Society* 14(2): 32; *Nature* 461, 472-475)





- * Studium chemického znečištění vod
→ zaměření na zdroje
(vyšší koncentrace → stanovitelnost)
- * Propojenost vodních systémů
→ vliv na různé elementy povodí
včetně nádrží

<http://ga.water.usgs.gov/edu/watercycle-kids.html>



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Endokrinní disrupce a její důsledky



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 (1998):
Exogenní látky, které negativně ovlivňují zdraví organismů a jejich potomstva narušením jejich endokrinních funkcí
- Environmentální látky, které přímo nebo nepřímo ovlivňují hormonální systém a mohou působit na nízkých koncentracích

Mezi endokrinní disruptory patří

Pesticidy (herbicidy, insecticidy, ...)

Změkčovače plastů

Rostlinné metabolity

Farmaceutika (antikoncepce, léky,...)

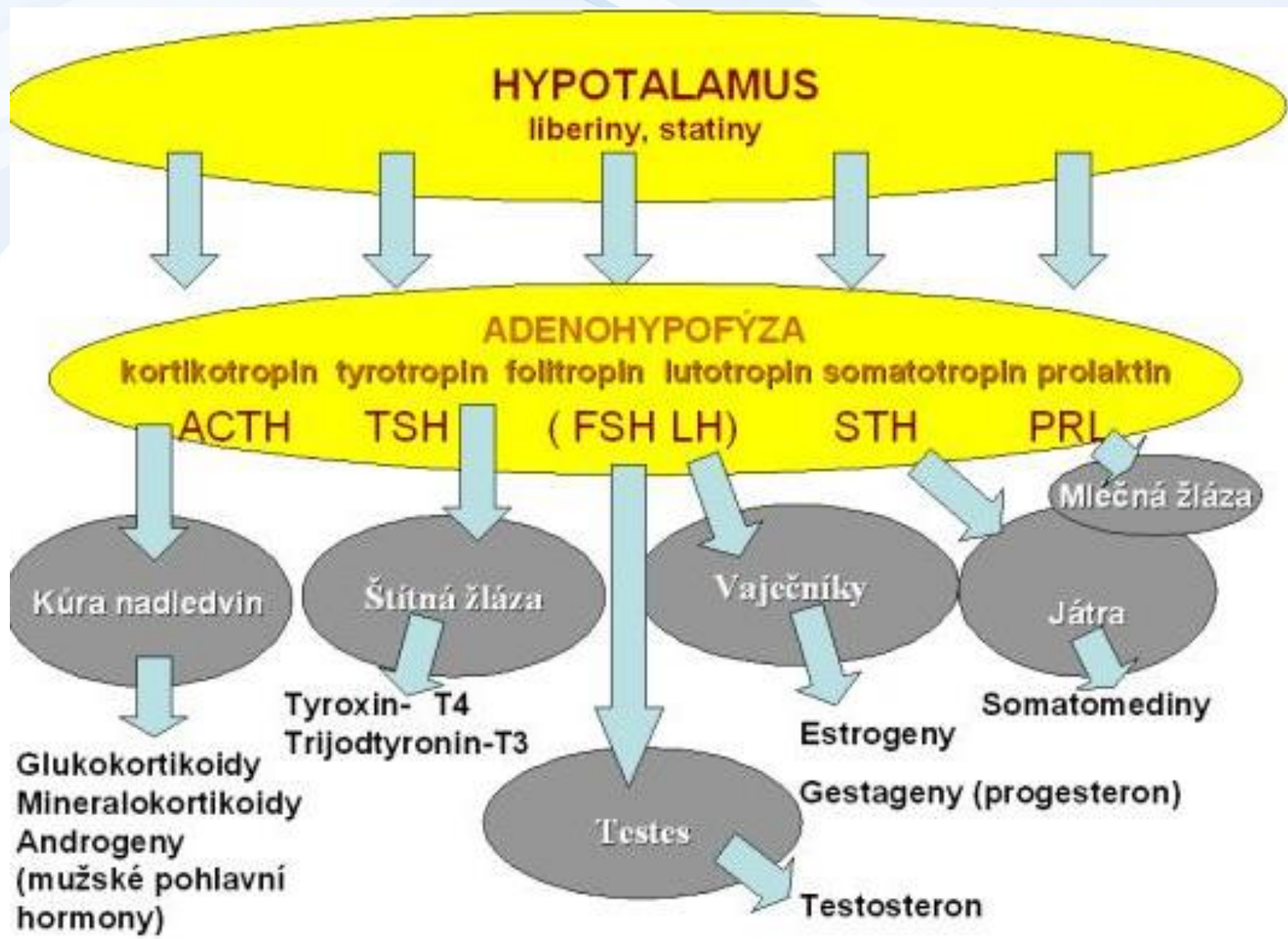
Detergenty

Chemikálie z vaření & hoření

Antibiotika

Kovy

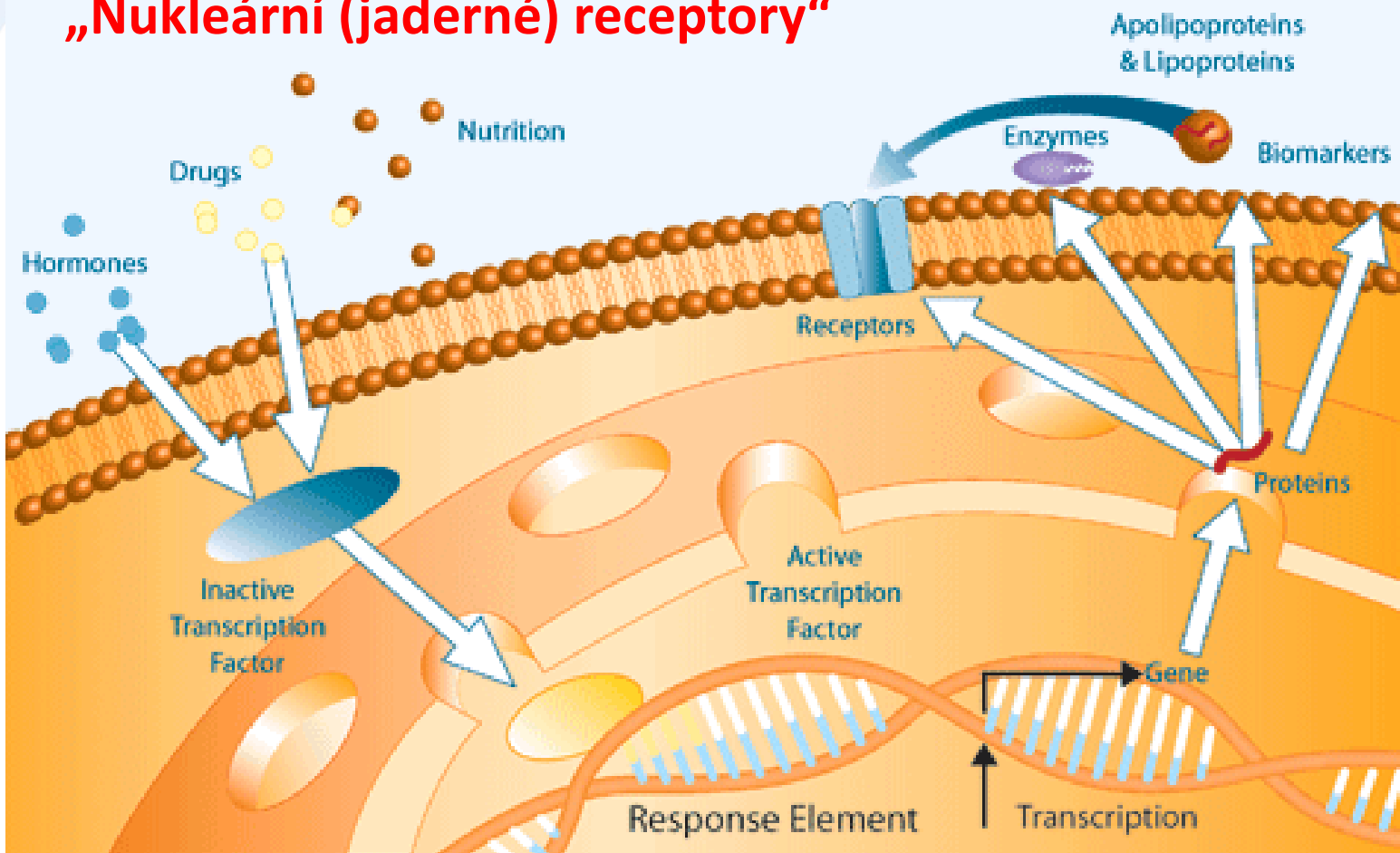
Schéma hormonálních regulací v organismu



Jak EDC fungují ?

Mechanismů EDC je mnoho (některé zůstávají neznámé)

Co známe ? ZEJMÉNA působení na
„Nukleární (jaderné) receptory“



„Přirozené“ ligandy nukleárních receptorů

➤ STEROIDNÍ HORMONY (ER, AR, GR..)

➤ **Estrogeny**, androgeny

➤ Glukokortikoidy, mineralokortikoidy

➤ THYROIDNÍ HORMONY (ThR)

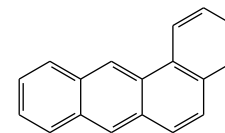
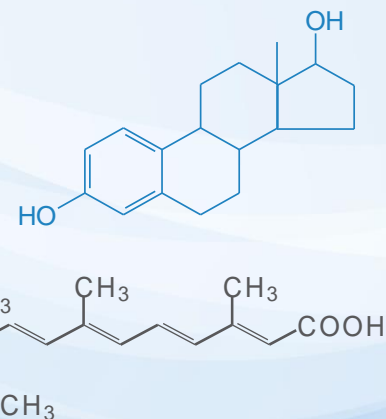
➤ Řízení růstu

➤ RETINOIDY (RAR/RXR)

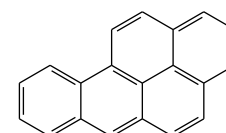
➤ Vývoj, embryogeneze, vidění ...

➤ AhR

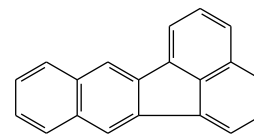
➤ dioxiny



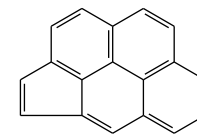
Benz[a]anthracen



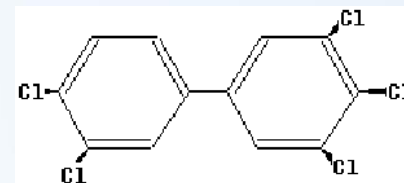
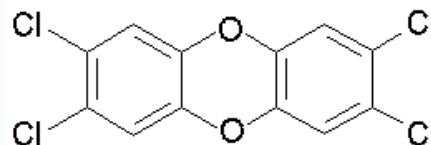
Benzo[a]pyren



Benzo[k]fluoranthen



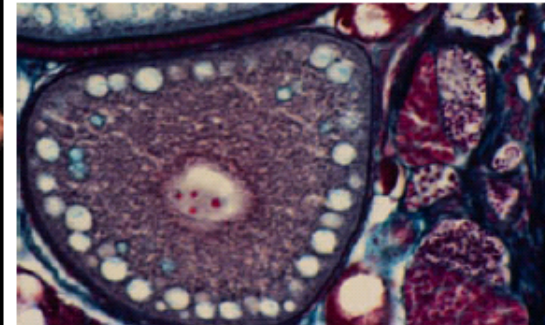
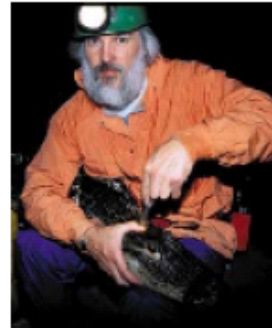
Cyclopenta[cd]pyren



Projevy u vodních obratlovců

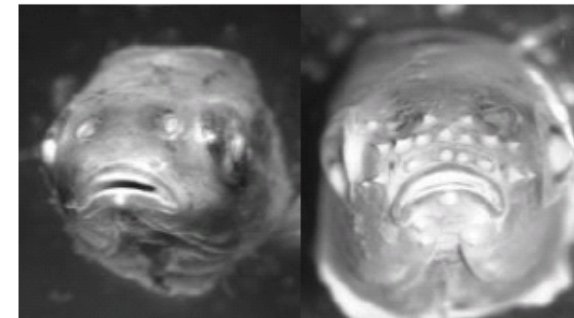
Malformace-změny v pohlavních orgánech. Příklady:

- **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**



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

Projevy ED u bezobratlých (mlži)

První průkaz ED v historii

- imposex u mořských plžů

- * vývoj samčích pohl. orgánů u samic
- * působení alkyl-sloučenin cínu (tributyl-cín)
- * nátěry na lodích proti růstu bioty („antifouling agent“)

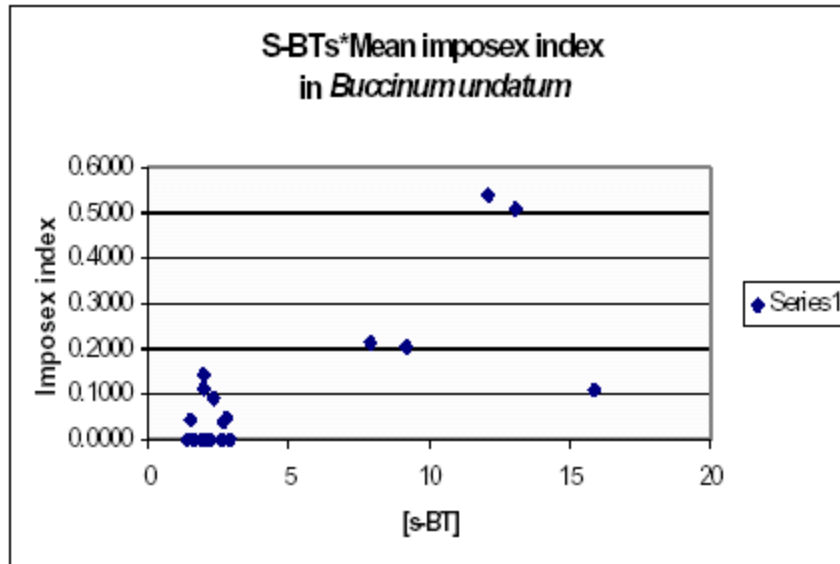
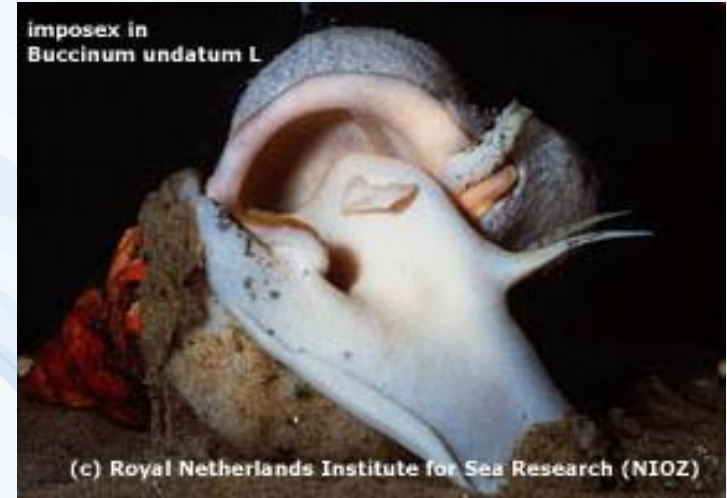


Figure 5. Relationship of Imposex index and total organotins in *Buccinum undatum*.



Projevy intersexu u korýšů

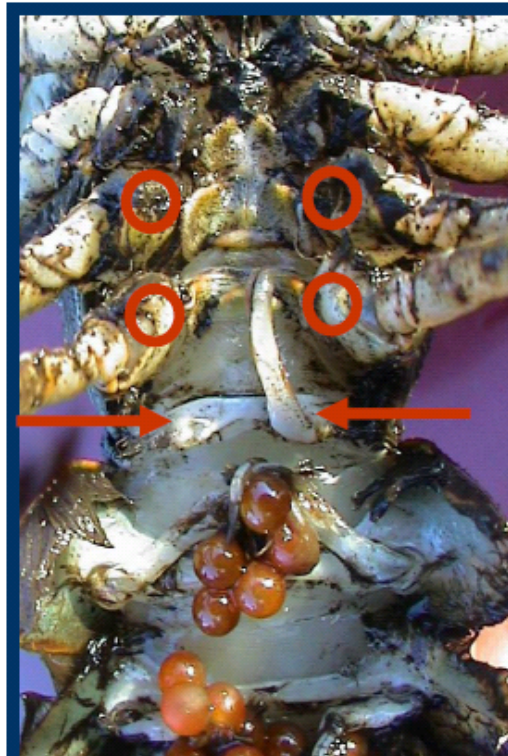
Blešivec potoční
(*Gammarus fossarum*)



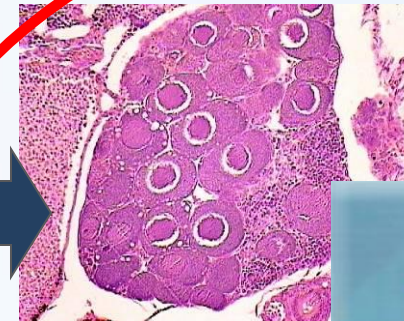
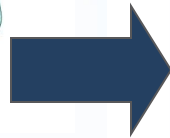
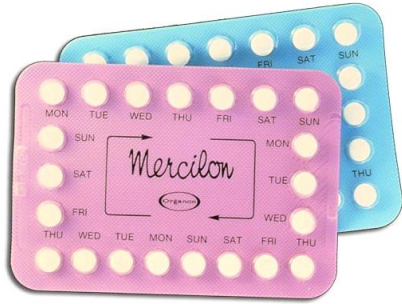
Intersex u přírodní populace
raka bahenního (*Pontastacus
leptodactylus*)

Ostrava-Karviná

- Zatopené poklesové plochy
- Replotace
- **Chráněný druh**



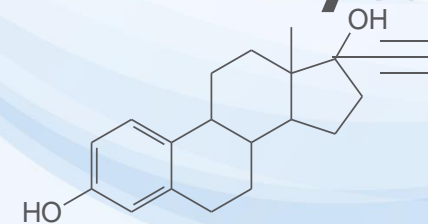
Lidské hormony: estrogeny v antikoncepčních přípravcích



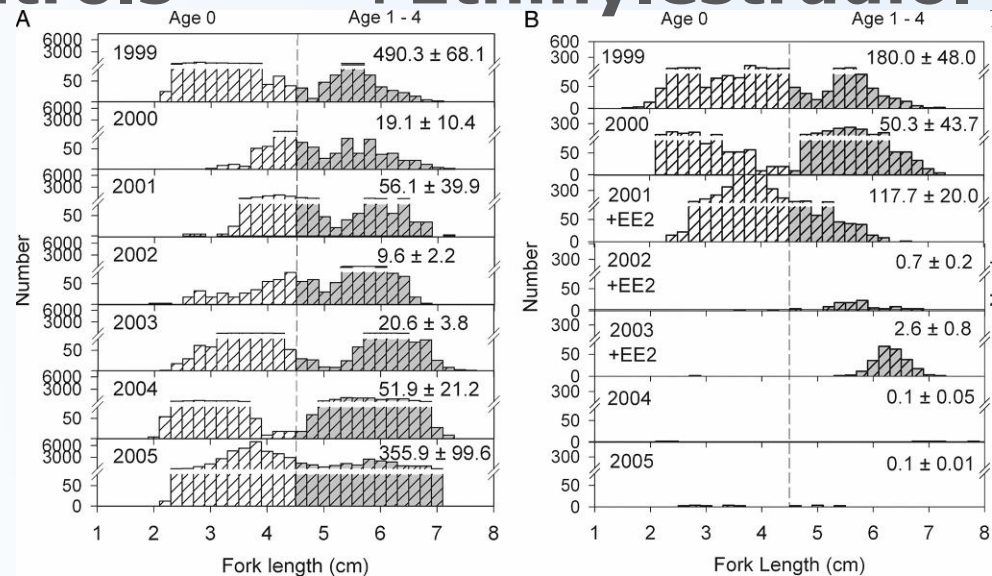
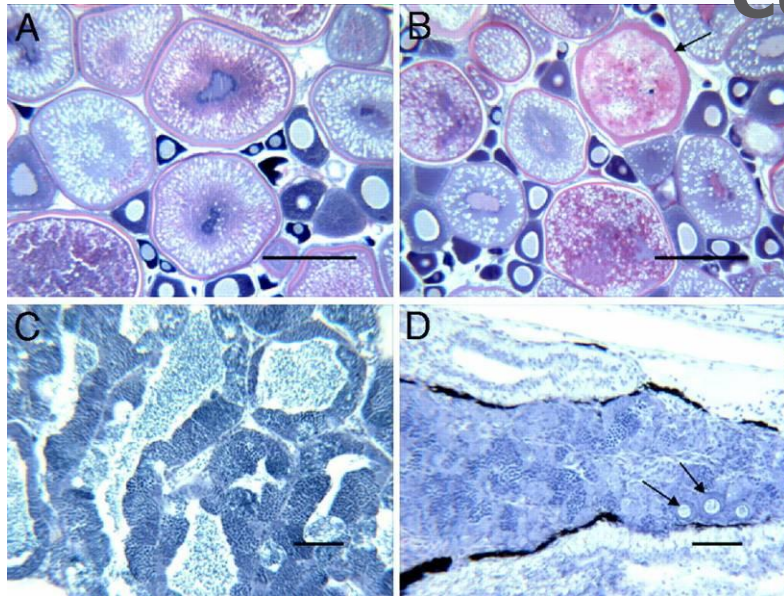
Kidd, K.A. et al. 2007. **Collapse of a fish population** following exposure to **a synthetic estrogen**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(21):8897-8901



5 ng/L (!)
7 years



Controls **+Ethinylestradiol**



Důsledky endokrinní disrupce

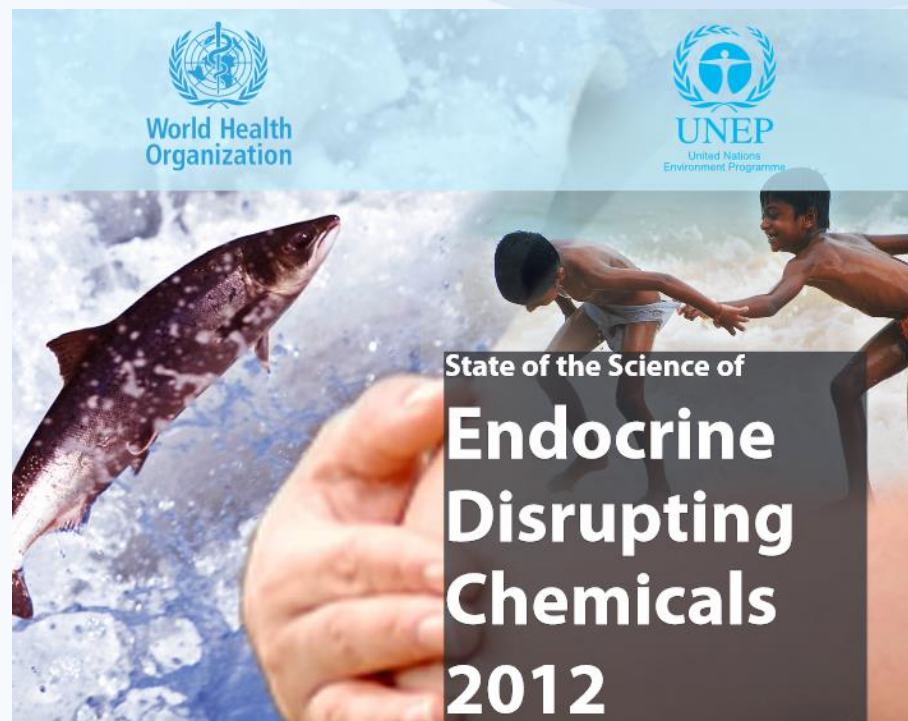
Důsledky porušení procesů řízených hormony

- Narušení vývoje a sexuální diferenciacce (estrogeny, androgeny)
- Poruchy rozmnožování (estrogeny, androgeny)
- Teratogenita (estrogeny, androgeny, thyridy)
- Poruchy v metabolismu (kortikoidy, thyridy)
- Immunotoxicita (estrogeny, thyridy, dioxinové látky)
- Alergizace



Rizika EDC pro lidi ?

- Poruchy vývoje pohl. orgánů a kvality gamet - zejména u mužů
- Asistovaná reprodukce IVF
- Vyšší incidence hormonálně závislých nádorů (CA prsu, prostaty)
- Neurologické poruchy (ADHD) u dětí
- Autoimunitní choroby (Crohnova choroba apod.)



Které koncentrace jsou bezpečné ?

PNEC – Predicted NO EFFECT concentration

→ využití: základ pro odvození limitů (EQS)

In vivo derived PNECs^{1;2;3}

PNEC_{E1}	6 ng/L
PNEC_{E2}	2 ng/L
PNEC_{E3}	60 ng/L
PNEC_{EE2}	0.1 ng/L



¹ Caldwell et al. 2012 Environ. Toxicol. Chem. 31(6):1396-406

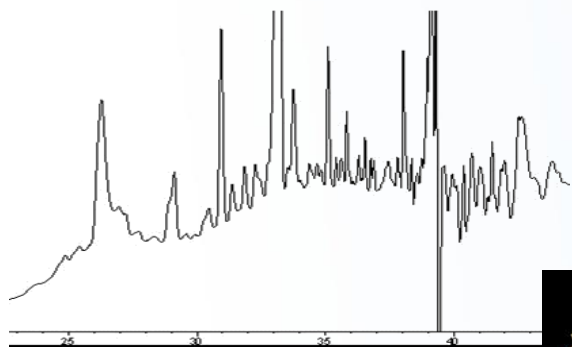
² UK Environment Agency, Technical Report, Young et al. 2004

³ Holbech et al. 2006 Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 144(1):57-66



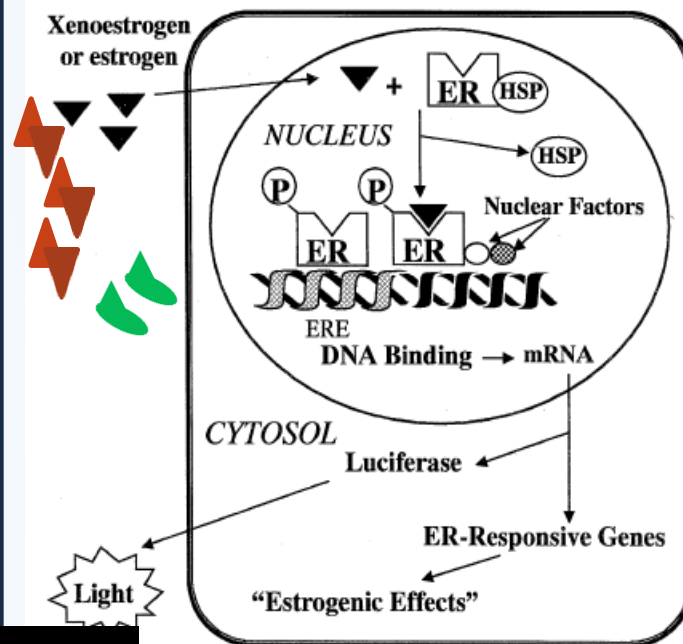
Možnosti analýzy „koktejlů“ chemikálií

Cílená analýza vybraných „prioritních“ látek

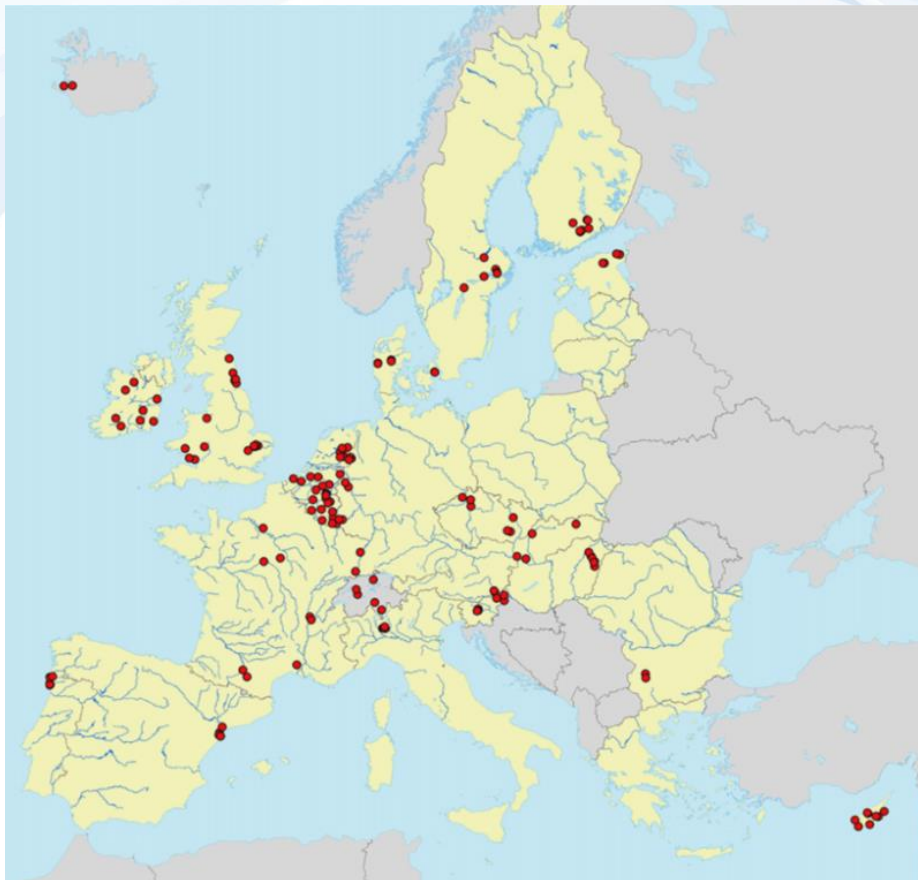


Analýza účinků („estrogenita“)

Biodetekční nástroje



Pan-Evropské kampaně – 2009-2012



- 1) Koordinace JRC Ispra, IT
- 2) “Snap-shot” vzorkování, standardizované postupy, QA/QC
- 3) Distribuce do laboratoří (IT, AT, DE, NL, SE, CZ)
- 4) Analýzy
 - Chemické látky (> 200)
 - Biologické účinky – RECETOX (estrogenita, dioxinová aktivita)

VZORKY - přehled

- Podzemní vody: 164 vzorků/24 zemí
- Odpadní vody: 90 vzorků/18 zemí
- Kaly ČOV: 106 vzorků/30 zemí



Podzemní vody (N=164) – nejčtenější látky

DEET (84%; 454 ng/L),
Caffeine (83%; 189 ng/L),
PFOA (66%; 39 ng/L),
Atrazine (56%; 253 ng/L),
Desethylatrazine (55%; 487 ng/L),
1H-Benzotriazole (53%; 1032 ng/L),
Methylbenzotriazole (52%; 516 ng/L),
Desethylterbutylazine (49%; 266 ng/L),
PFOS (48%, 135 ng/L),
Simazine (43%; 127 ng/L),
Carbamazepine (42%; 390 ng/L),
Nonylphenoxy acetic acid (NPE1C)
(42%; 11 ug/L),

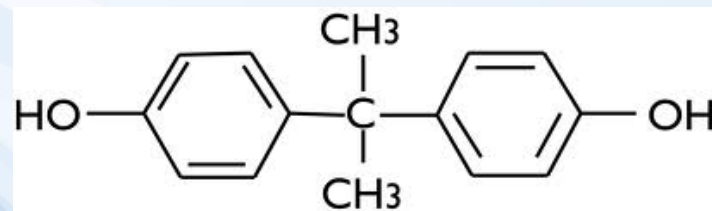
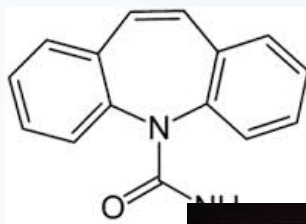
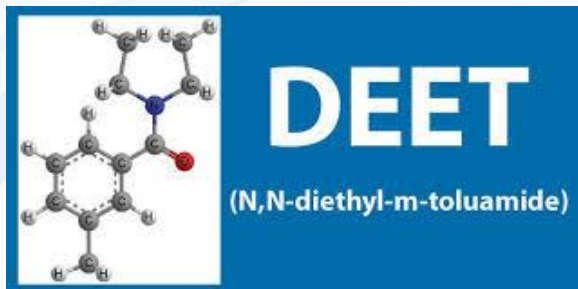
Bisphenol A (40%; 2.3 ug/L),
PFHxS (35%; 19 ng/L),
Terbutylazine (34%; 716 ng/L),
Bentazone (32%; 11 ug/L),
Propazine (32%; 25 ng/L),
PFHpA (30%; 21 ng/L),
2,4-Dinitrophenol (29%; 122 ng/L),
Diuron (29%; 279 ng/L),
Sulfamethoxazole (24%; 38 ng/L).

MAXIMA

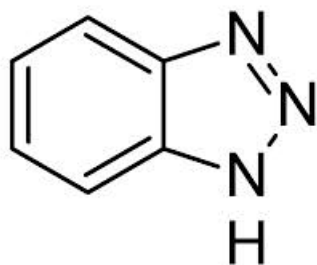
N,N0-Dimethylsulfamid (DMS) (52 ug/L),
Chloridazon-desphenyl (13 ug/L),
NPE1C a Bentazone (11 ug/L),
Nonylphenol (3.8 ug/L),
Bisphenol A (2.3 ug/L)



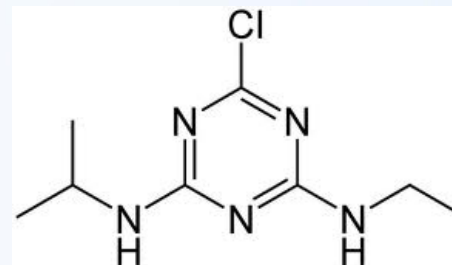
Podzemní vody (N=164) – nejčastější látky



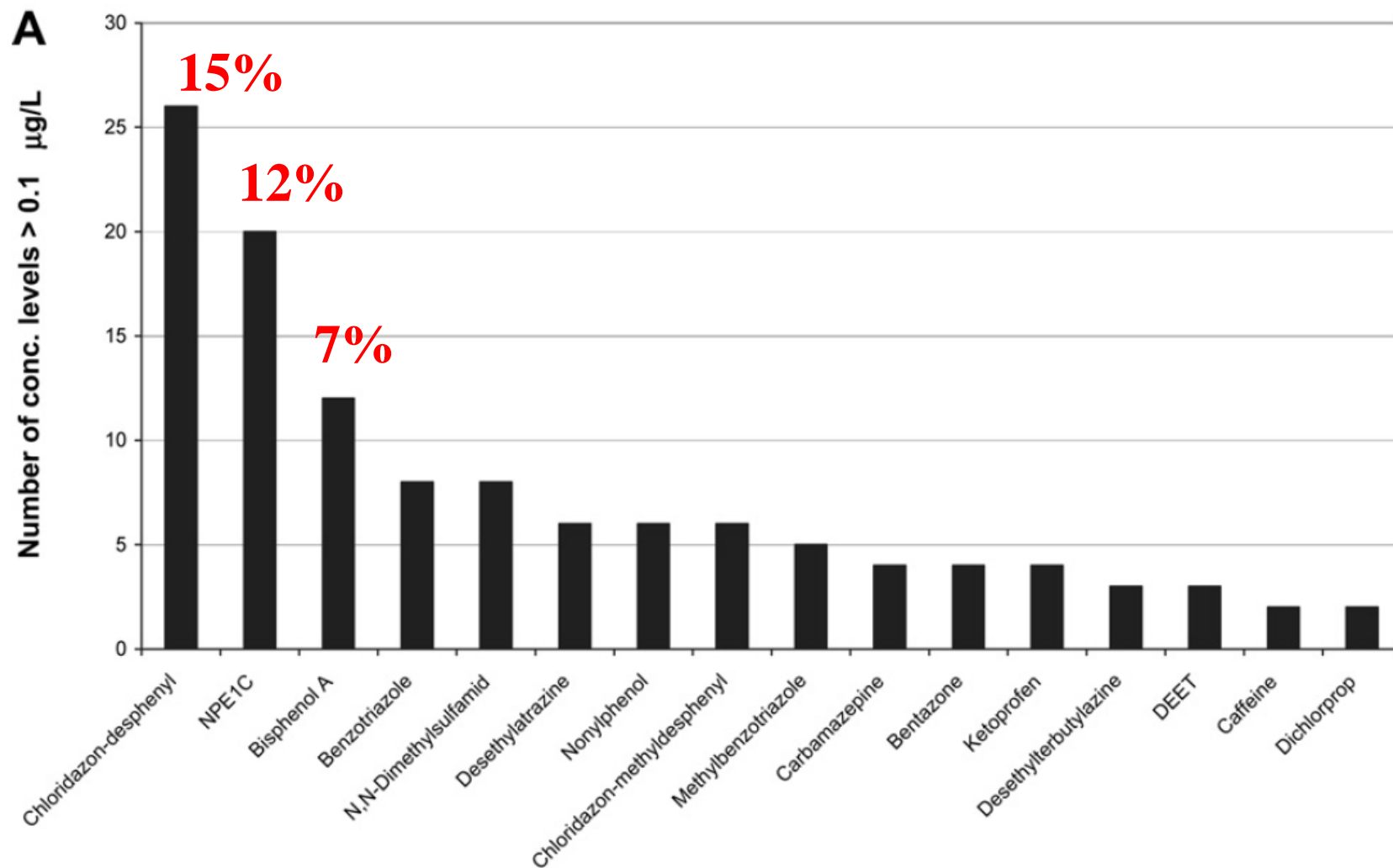
BPA



Benzotriazol
(antikoroziivum)

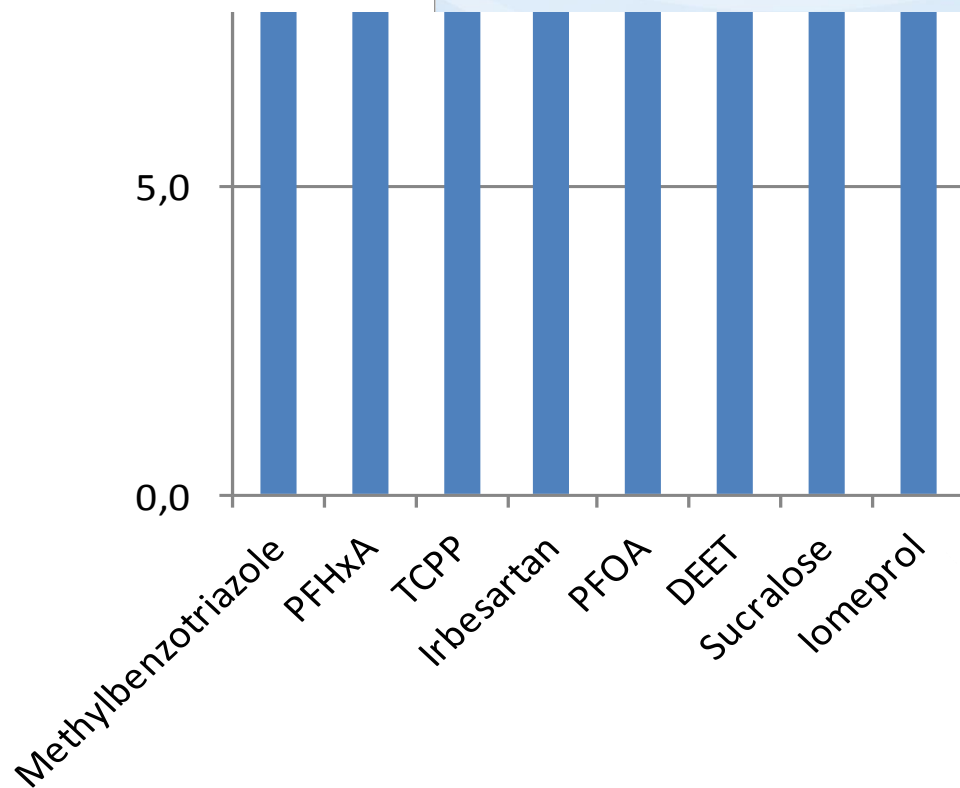
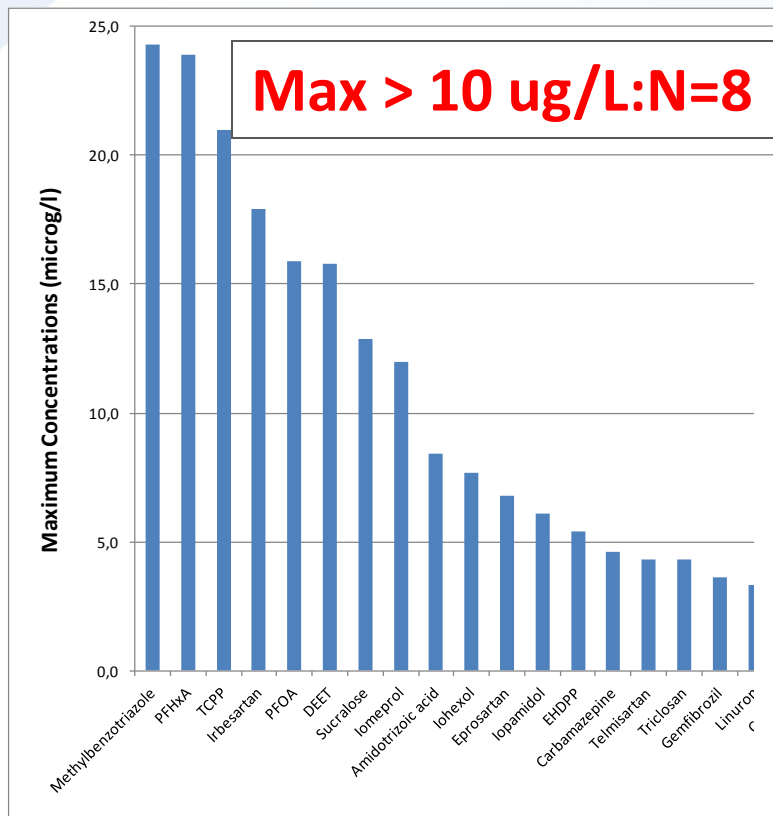


Podzemní vody (koncentrace > 0.1 ug/L), N=164



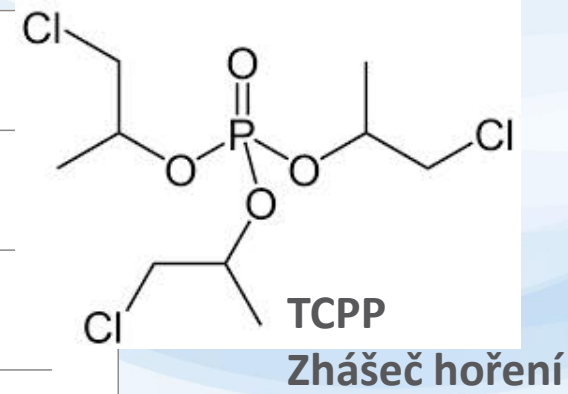
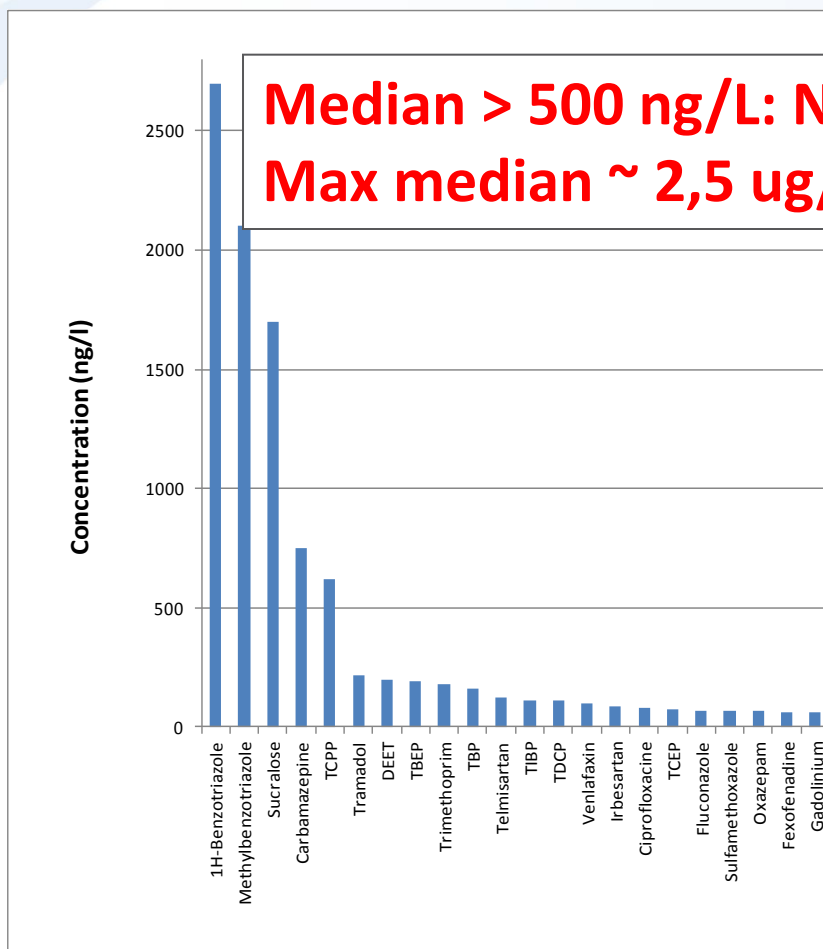
Odpadní vody – chemické analýzy (N=90, 18 zemí)

FULL REPORT: Loos, R., et al. (2012) EU Wide Monitoring Survey on Waste Water Treatment Plant Effluents. European Commission - Joint Research Centre, 138 pp. JRC Scientific and Policy Reports (EUR 25563 EN / ISBN 978-92-79-26784-0 / doi:10.2788/60663).

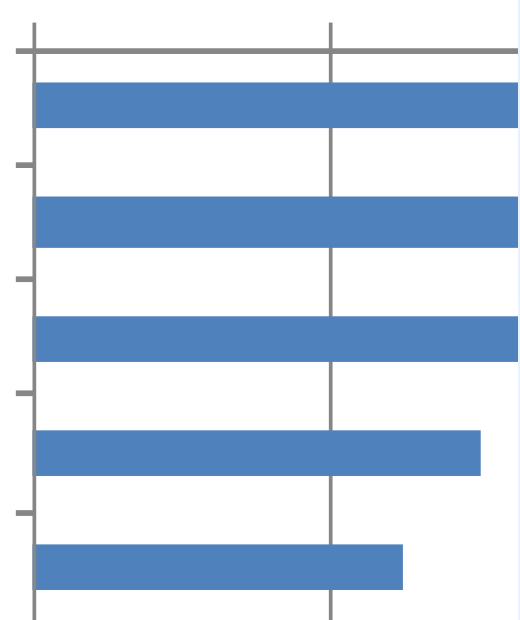


Odpadní vody – chemické analýzy (N=90, 18 zemí)

FULL REPORT: Loos, R., et al. (2012) EU Wide Monitoring Survey on Waste Water Treatment Plant Effluents. European Commission - Joint Research Centre, 138 pp. JRC Scientific and Policy Reports (EUR 25563 EN / ISBN 978-92-79-26784-0 / doi:10.2788/60663).



1H-Benzotriazole
Methylbenzotriazole
Sucralose
Carbamazepine
TCPP



Odpadní vody – antibiotika (N=30, 12 zemí, analýza 18 ATBs)

Sarvaes et al., Water Research, under review

	Penicillin V	Clindamycin	Lincomycin	Tiamuline	Sulfamethoxazole	Trimethoprim	Ciprofloxacin	Levamisole
Spain	97	10	< 15	< 20	200	75	96	77
Spain	86	79	< 15	29	< 20	47	270	150
Spain	120	190	29	< 20	1200	800	190	< 15
Slovenia	100	19	< 15	< 20	630	720	240	92
Czech Republic	95	53	< 15	< 20	300	440	55	< 15
Czech Republic	100	130	< 15	< 20	170	310	58	< 15
Czech Republic	59	130	53	< 20	340	380	95	< 15
Czech Republic	79	89	21	< 20	430	240	60	110
Czech Republic	< 50	53	320	< 20	1700	230	74	< 15
Czech Republic	< 50	130	200	< 20	47	25	96	< 15
Czech Republic	< 50	210	< 15	< 20	620	550	61	< 15
Austria	< 50	130	100	< 20	110	180	100	< 15
Austria	< 50	280	< 15	< 20	60	180	120	< 15
Austria	< 50	150	22	< 20	31	210	120	< 15
The Netherlands	< 50	91	< 15	< 20	560	210	71	200
The Netherlands	< 50	110	18	< 20	200	200	77	340
Ireland	< 50	37	< 15	< 20	96	560	120	19
Ireland	< 50	39	< 15	< 20	81	440	220	57
Lithuania	< 50	17	17	< 20	390	150	91	< 15
Lithuania	< 50	26	130	< 20	230	140	87	< 15
Lithuania	< 50	< 10	< 15	< 20	160	120	49	42
Italy	59	17	28	24	100	76	59	< 15
Cyprus	< 50	< 10	< 15	44	< 20	< 10	62	24
Cyprus	< 50	< 10	< 15	< 20	160	37	52	< 15
Switzerland	62	130	< 15	< 20	450	310	200	110
France	< 50	< 15	< 50	--	< 20	11	< 15	< 15
France	< 50	< 15	< 50	--	< 20	< 10	< 15	< 15
France	< 50	< 15	< 50	--	32	24	< 15	< 15
Portugal	< 50	< 15	< 50	--	120	100	120	< 15
Portugal	< 50	< 15	< 50	--	< 20	99	66	< 15
Freq. (%)	33	73	37	10	83	93	90	37
Average (ng/L)	29	70	31	3.3	280	229	96	41
Median (ng/L)	0.0	46	0.0	0.0	164	178	82	0.0

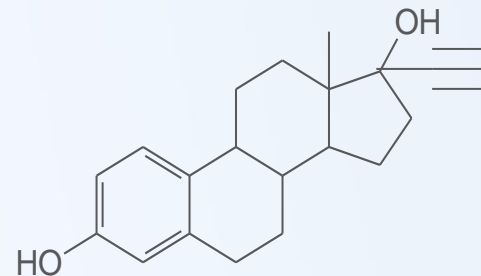
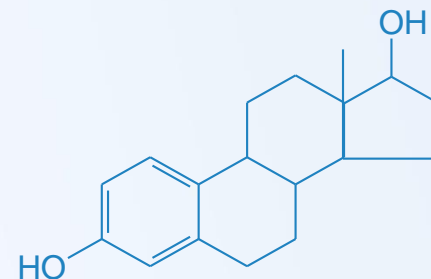
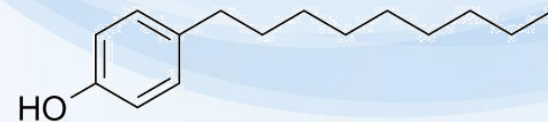
--: not determined



Které EDC látky se pravidelně měří ?



- Vědecké studie ... „curiosity driven“
 - Mnoho látek, koktejly ... kdo-co-umí
- Legislativa – Evropská rámcová směrnice o vodě (WFD)
 - Prioritní látky (30) a jejich limity (EQS – Environmental Quality Standards)
 - **Zahrnují 3x endokrinní disruptory (estrogeny)**
 - nonylfenol = 0.3 $\mu\text{g/L}$ (Annual Average)
 - estradiol = 0.4 ng/L (Annual Average)
 - ethinylestradiol = 0.035 ng/L (Annual Average)





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

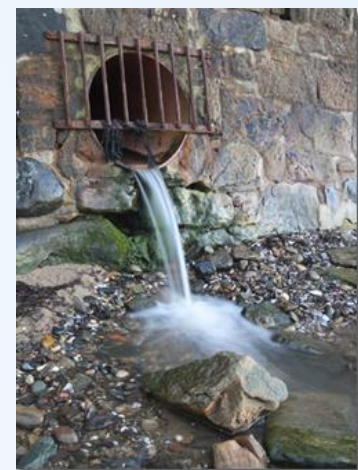
Využití biodetekčních systémů (buněčných/tkáňových kultur) při sledování EDC

Úvod I

Xenobiotika – např. farmaka, pesticidy, látky denní potřeby (kosmetika, detergenty...), různá aditiva v průmyslu

ČOV – dosud většina xenobiotik nemusí být odstraněna, ale ukazují se jejich negativní dopady na vodní organismy

Prioritní polutanty – seznam EU (WFD), je doplňován o nové látky, povinnost snižovat hladiny xenobiotik v řekách



Úvod II

Různá účinnost degradace xenobiotik jak mezi jednotlivými metodami, tak pro tutéž metodu ale různé látky.

Příklad: Tabulka účinnosti degradace vybraných xenobiotik ze skupiny farmak:

	akrivní uhlí	Biol. stupeň, aktivní uhlí	O ₃ /AOPs	UV	Cl ₂ /ClO ₂	Koagulace / flokulace	Změkčování / oxidy kovů	NF	RO
Antibiotika	40 - 90%	nad 90%	20 - nad 90%	40 - 90%	méně než 20% - 90%	méně než 20% - 40%	méně než 20% - 40%	nad 90%	nad 90%
Antidepresiva	70 - nad 90%	70 - nad 90%	20 - nad 90%	40 - 90%	méně než 20% - 70%	méně než 20% - 40%	méně než 20% - 40%	70 - nad 90%	nad 90%
Protizánětlivé látky	nad 90%	70 - nad 90%	nad 90%	nad 90%	méně než 20% - 70%	méně než 20%	méně než 20% - 40%	70 - nad 90%	nad 90%
Regulátory tuků	nad 90%	nad 90%	nad 90%	40 - 90%	méně než 20% - 70%	méně než 20%	méně než 20% - 40%	70 - nad 90%	nad 90%
Psychiatrická léčiva	70 - nad 90%	70 - nad 90%	20 - nad 90%	40 - 90%	méně než 20% - 70%	méně než 20% - 40%	méně než 20% - 40%	70 - nad 90%	nad 90%

Převzato z: Snyder, S.A., *et al.*, *Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry*. Environmental Engineering Science, 2003. 20(5): p. 449-469.



Úvod III

- Velké množství xenobiotik !
 - Zvolit a chemickými metodami monitorovat vybrané zástupce je náročné a nákladné (i nízké koncentrace (ng/l) jsou někdy účinné)
 - Látky působí ve směsích (např. aditivní účinky estrogenů a PAHs)
- Proto biologické a biochemické testy
- 😊 Celkový účinek směsí
 - 😊 Nižší náklady
 - 😞 Každý test jen některé účinky (např. úmrtnost buněk nebo genotoxicita)
 - 😊 Možnost uplatnit baterii testů
 - 😞 Obtížná standardizovatelnost pro rutinní využití
 - 😞 Nutnost zkušeného personálu, pracnost



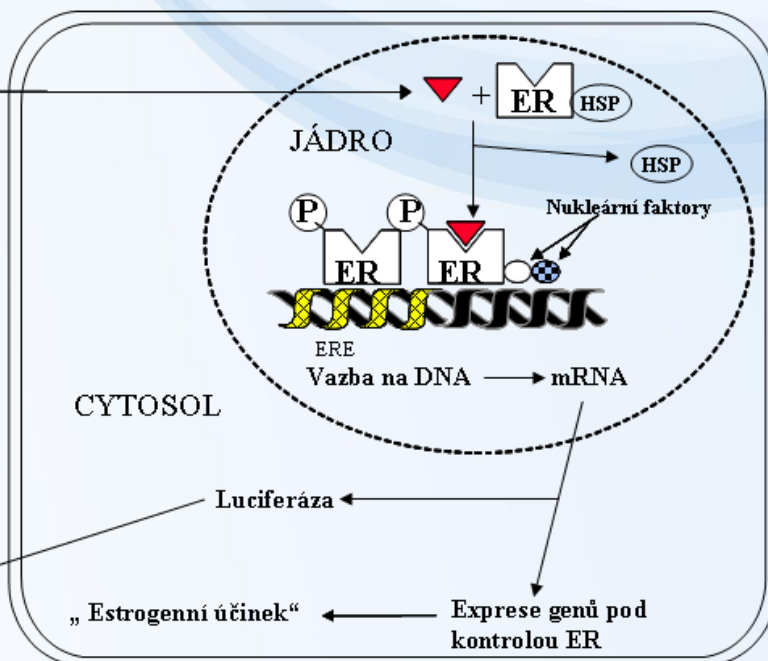
Hodnocení EDCs – in vitro tkáňové kultury

Metody – Test s tkáňovou kulturou MVLN

- Geneticky upravené buňky lidského karcinom prsu



Estrogen
nebo xenoestrogen



Výsledek – EEQ: Ekvivalent Estradiolu (ng/L)



PŘÍKLAD VYUŽITÍ BIOTESTŮ – Případová studie: Estrogeny v odpadních vodách na 7 ČOV

Metody – Lokality a odběr vzorků

- Všech 7 ČOV mechanicko-biologické s aktivačními nádržemi a nitrifikací (některé i denitrifikací)
- Různá velikost ČOV a různý původ odpadních vod:
 - 2 ČOV méně než 5000 EO, jen splašky
 - 2 ČOV 10 000 – 100 000 EO, splašky + dešťové vody
 - 3 ČOV nad 100 000 EO, splašky + dešťové + průmyslové vody
- 24h směsné vzorky na přítoku a odtoku (bez ohledu k průtoku)
- Fiktrace, Extrakce tuhou fází

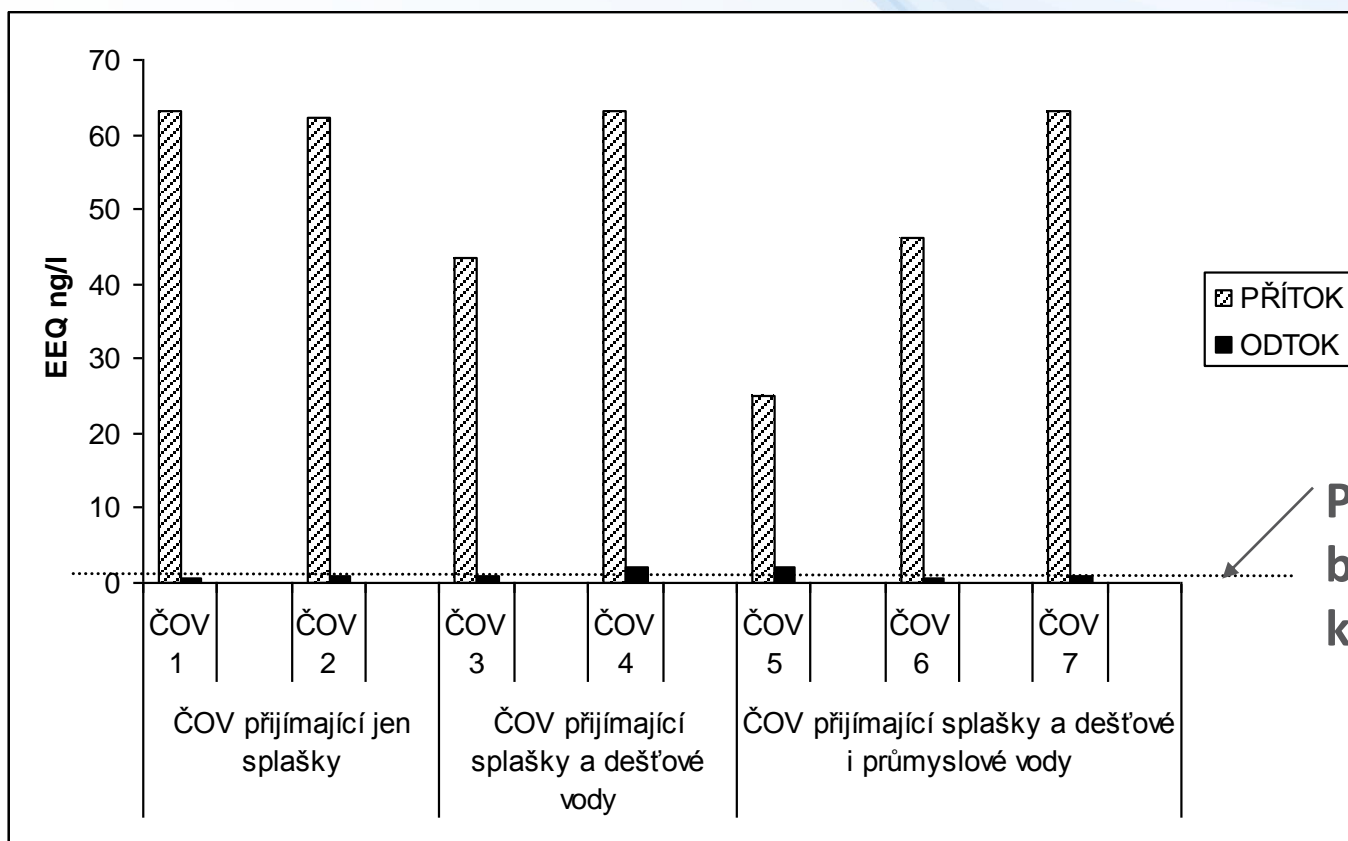


PŘÍKLAD VYUŽITÍ BIOTESTŮ – Případová studie: Estrogeny v odpadních vodách na 7 ČOV

Výsledky: Přítok 25,14 až 63,27 EEQ ng/l

Odtok: <0,5 do 2,02 ng/l

Odstranění 92 – více než 98 %



Předikovaná
bezpečná
koncentrace



PŘÍKLAD VYUŽITÍ BIOTESTŮ – Případová studie: Estrogeny v odpadních vodách na 7 ČOV

Závěr studie: („Tyhle ČOV to nebyly“)

Které zdroje mohou být zodpovědné za negativní účinky na rybách ?

- Nedostatek ČOV ?

- Nedostatečná kapacita ČOV ?

- Kolikrát bývá odpadní voda naředěná, když při dešťových událostech protéká do řek bez čištění ?

- Kolik jí asi může protéct ?

- Jaká je účinnost odstranění estrogenů na jiných typech ČOV ?



Příkladová studie – ČOV Brno

Čistírna odpadních vod Brno - Modřice

- roční studie (vstup/výstup; May 2007 – April 2008)
- kompozitní vzorky (24h), každý měsíc - 12 období
- příprava pro testování (SPE a analýza účinků)

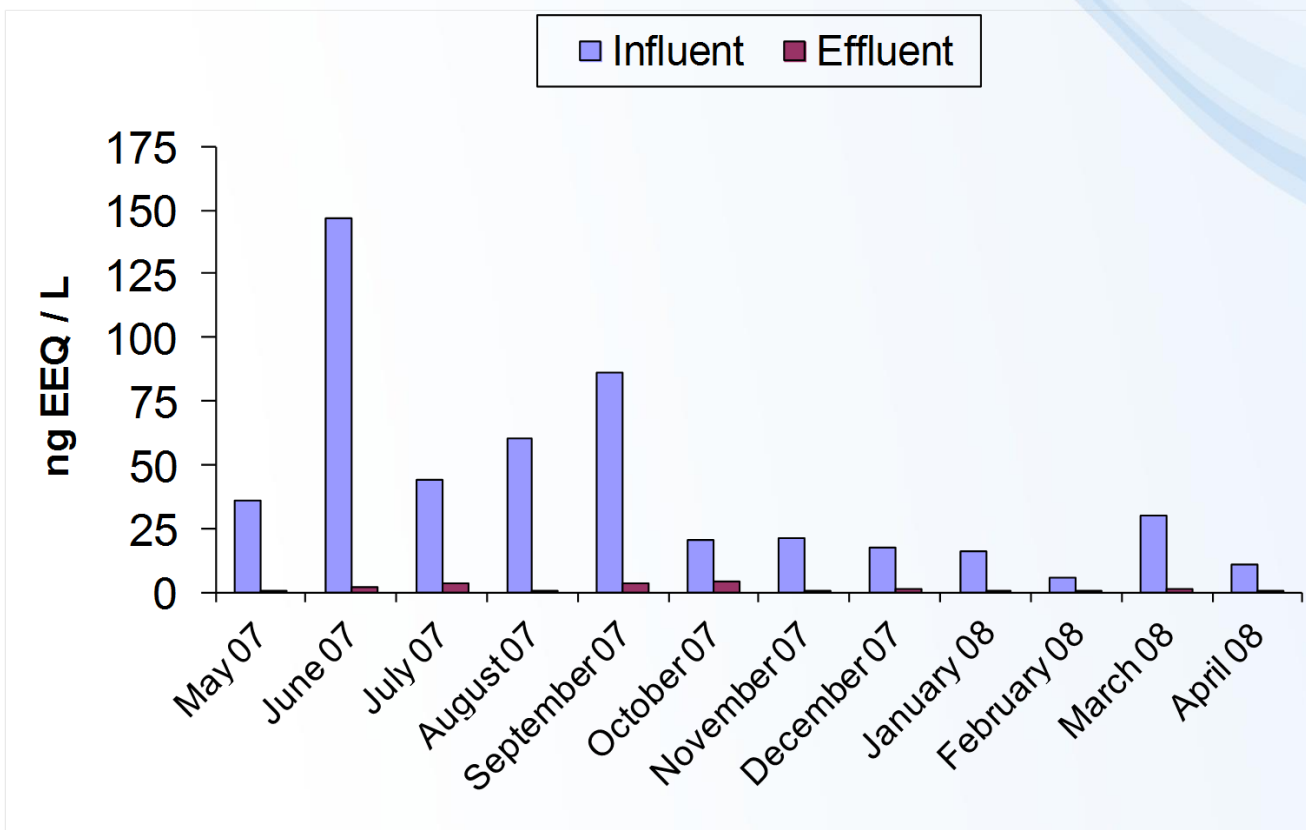


Estrogenita na ČOV Brno Modřice (2007-8)

➤ Vtok na ČOV 5 - 147 ng EEQ/L (rozmezí 30x)

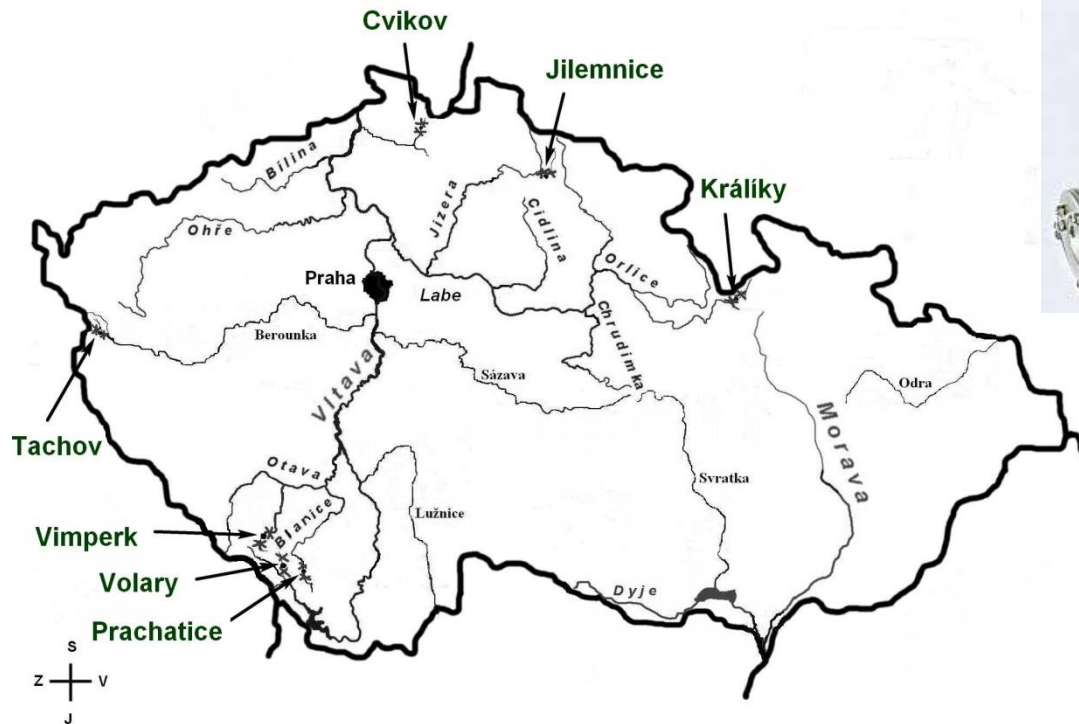
Odtok ČOV: **0.1 - 4 ng EEQ/L (rozmezí 40x)**

➤ Účinnost čištění 81 až >98% ale uvolňovány jsou stále „účinné“ koncentrace



Příkladová studie 2 – Malá sídla / ČOV

- Říční voda nad a pod ČOV (obce 4000 až 13000 obyvatel)
- Menší vodní toky nezatížené dalšími většími zdroji znečištění
- Vzorkování – pasivní vzorkovače POCIS (21 dní)



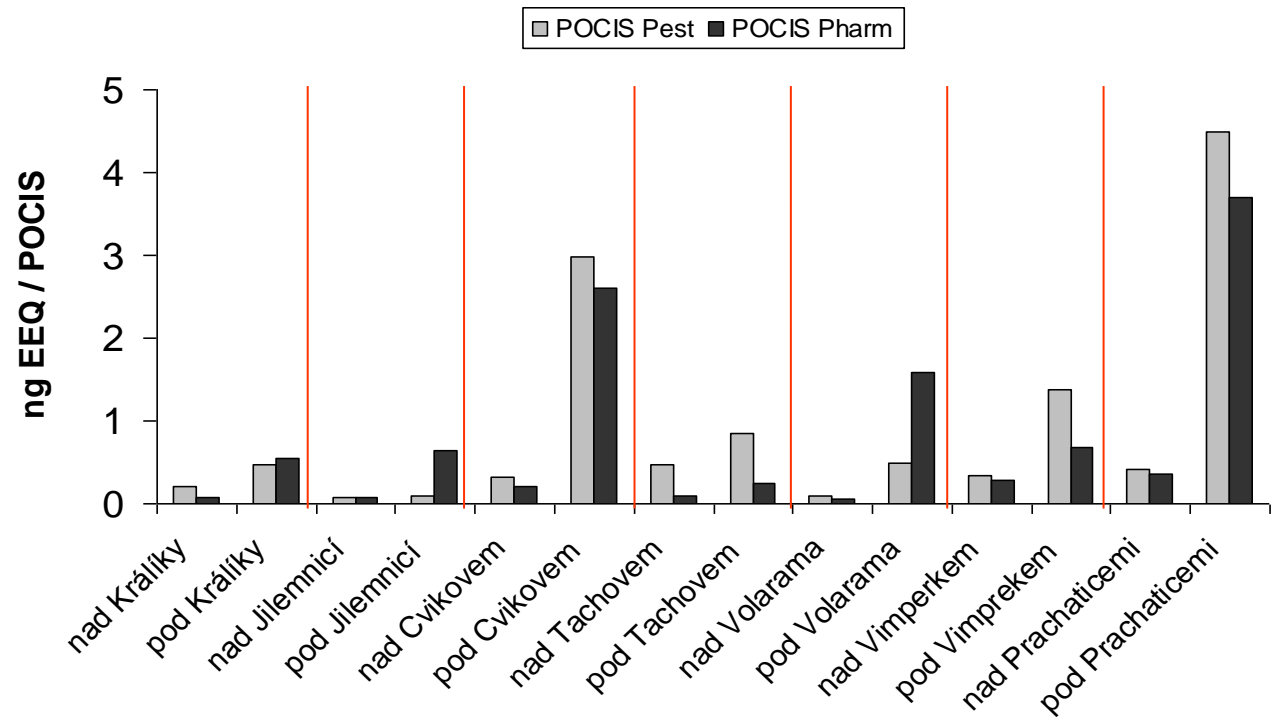
Příkladová studie 2 – Malá sídla / ČOV

ESTROGENITA

➤ Detekce estrogenity 0,06 ng až 4,50 ng EEQ/POCIS

➤ V řekách pod ČOV více estrogenní vzorky ve všech případech

➤ Cvikov a Prachatice nejvyšší estrogenní potenciál



**Xenoestrogenní aktivita
POCIS Pest a POCIS Pharm**

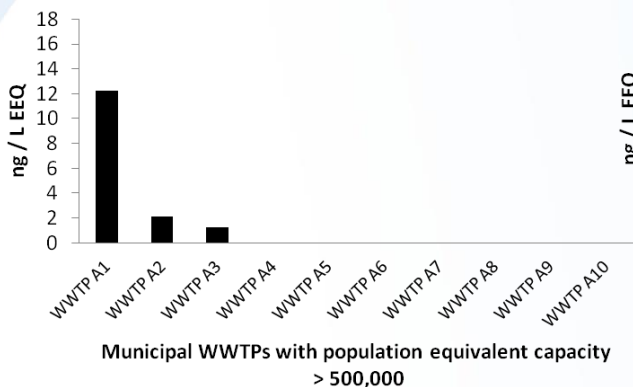
Odpadní vody – estrogenní aktivita (N=75, 18 zemí)

Jarošová et al. Environ Science Pollut Res 2014

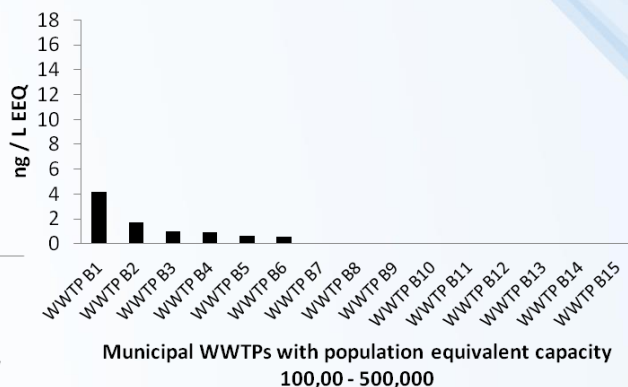
EEQ: N=27 > LOD (0,5 ng /L), **Median - 1,2 ng EEQ /L, Max - 18 ng EEQ /L**

Dioxinové efekty N=21 / 25 > 0.1 ng TEQ /L – méně významné hladiny: max 0.44 ng/L, median 0.15 ng/L

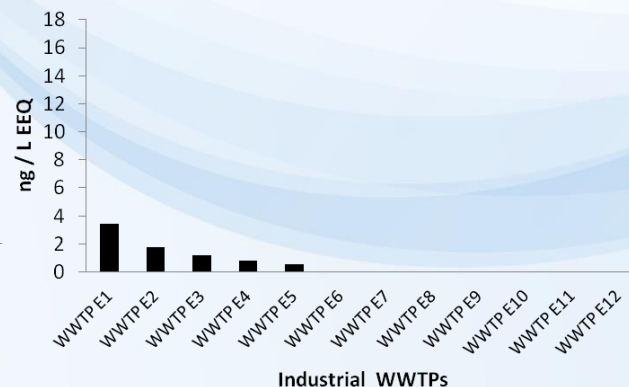
A



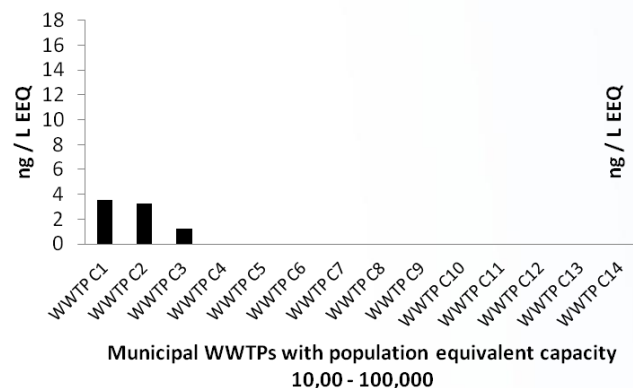
B



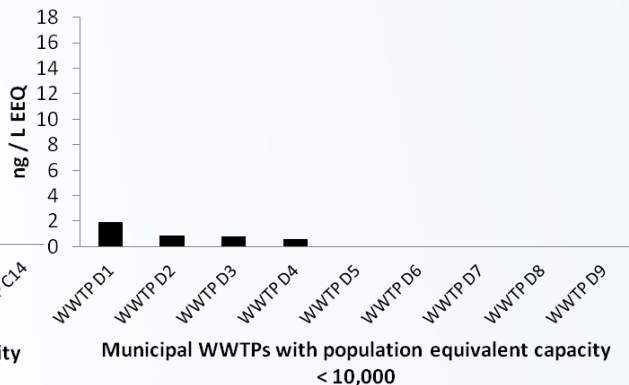
E



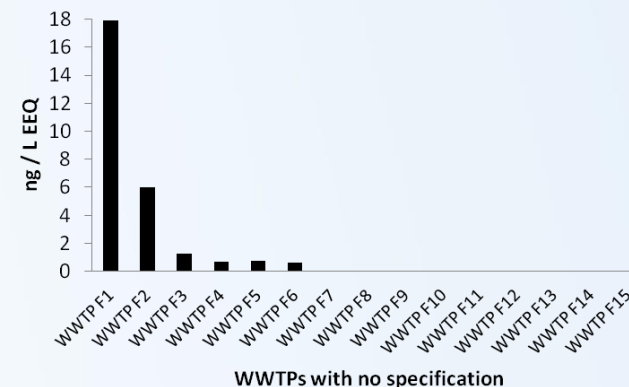
C



D



F



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

EQS=0,035-0,4 ng/L (bezpečné limity)

Estrogenní (EEQ) a Androgenní (AEQ) látky v ČOV

Vzorek	EEQ (ng/l)	AEQ (ng/l)	Stát	Reference
Přítok ČOV	0,6-153		Holandsko	[10]
	8,2-75		Holandsko	[11]
		20-310	Švédsko	[12]
	17,3-81		Nový Zéland	[7]
	0,6-5,2		Japonsko	[13]
		<NSM-169	Holandsko	[14]
Odtok ČOV	0,05-2,6		Holandsko	[10]
	1,7-3,4		Holandsko	[11]
		<NSM-160	Švédsko	[12]
		<NSM	Holandsko	[14]
	<NSM		Nový Zéland	[7]
		34-635	Velká Británie	[15]
	0,6-5,2		Japonsko	[13]

NSM - nejnížší stanovitelné množství látek

Příkladová studie 3 – Specifické efekty vzduchu

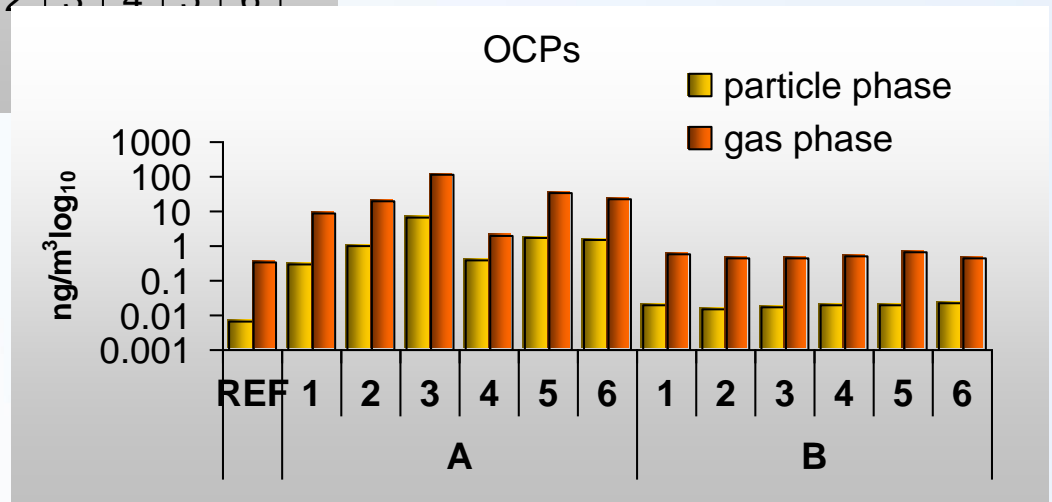
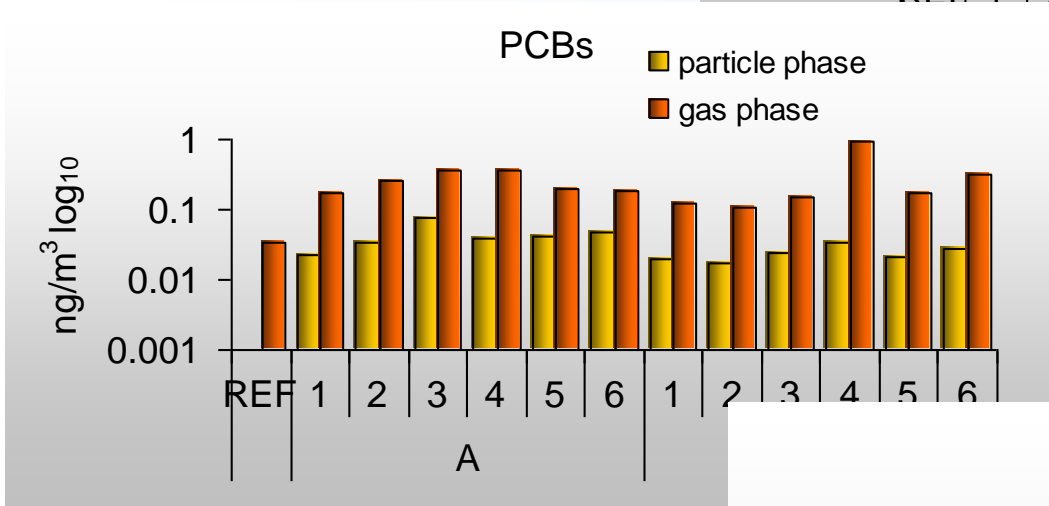
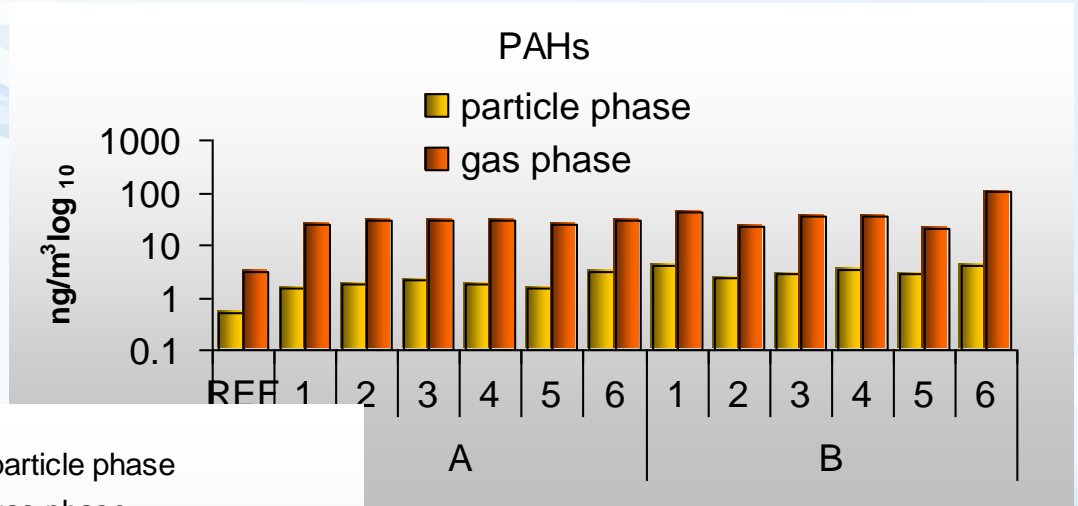
Aktivní vzorkování (léto) částice vs. plynná fáze

- **Referenční lokalita** – zemědělská oblast (observatoř Košetice)
- **Region A** – chemický průmysl (OCPs, Středočeský kraj)
- **Region B** – výroba barev, zemědělství, doprava (Uherskohradištsko)

Novák et al. (2009) Environment International

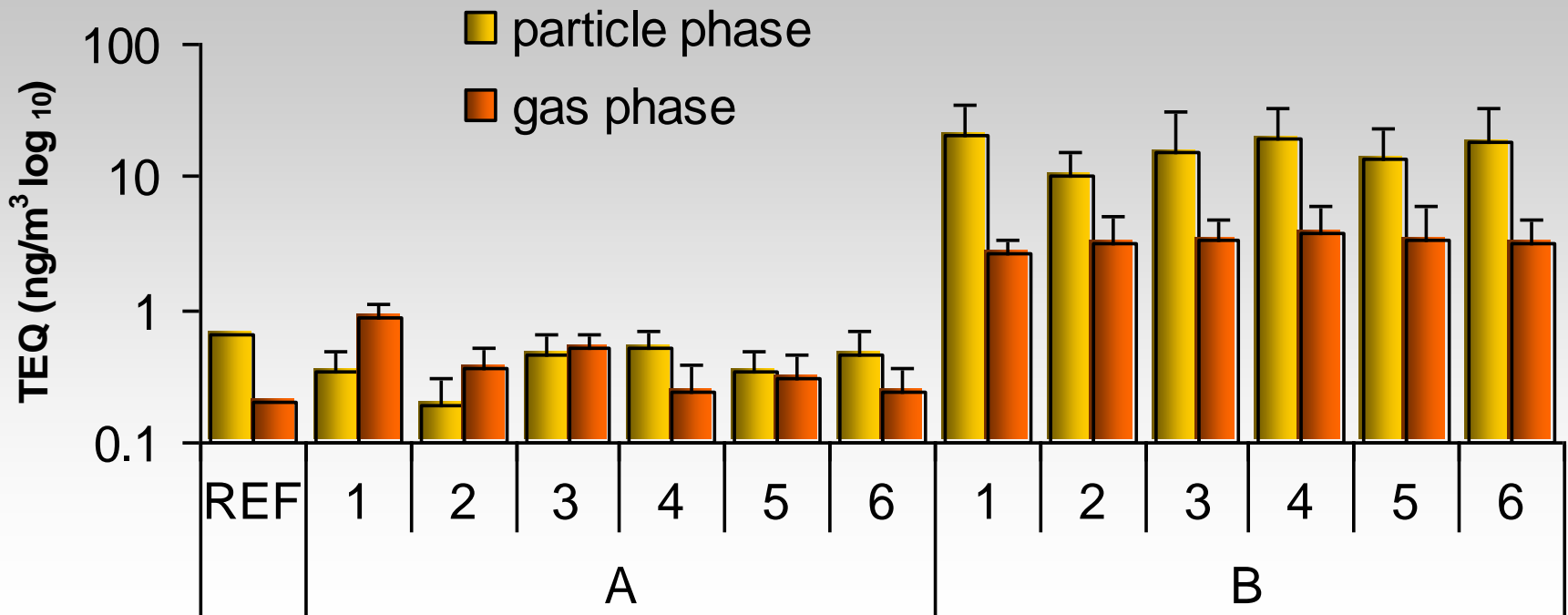


Chemické analýzy



Dioxinová toxicita vzduchu

dioxin-like toxicity



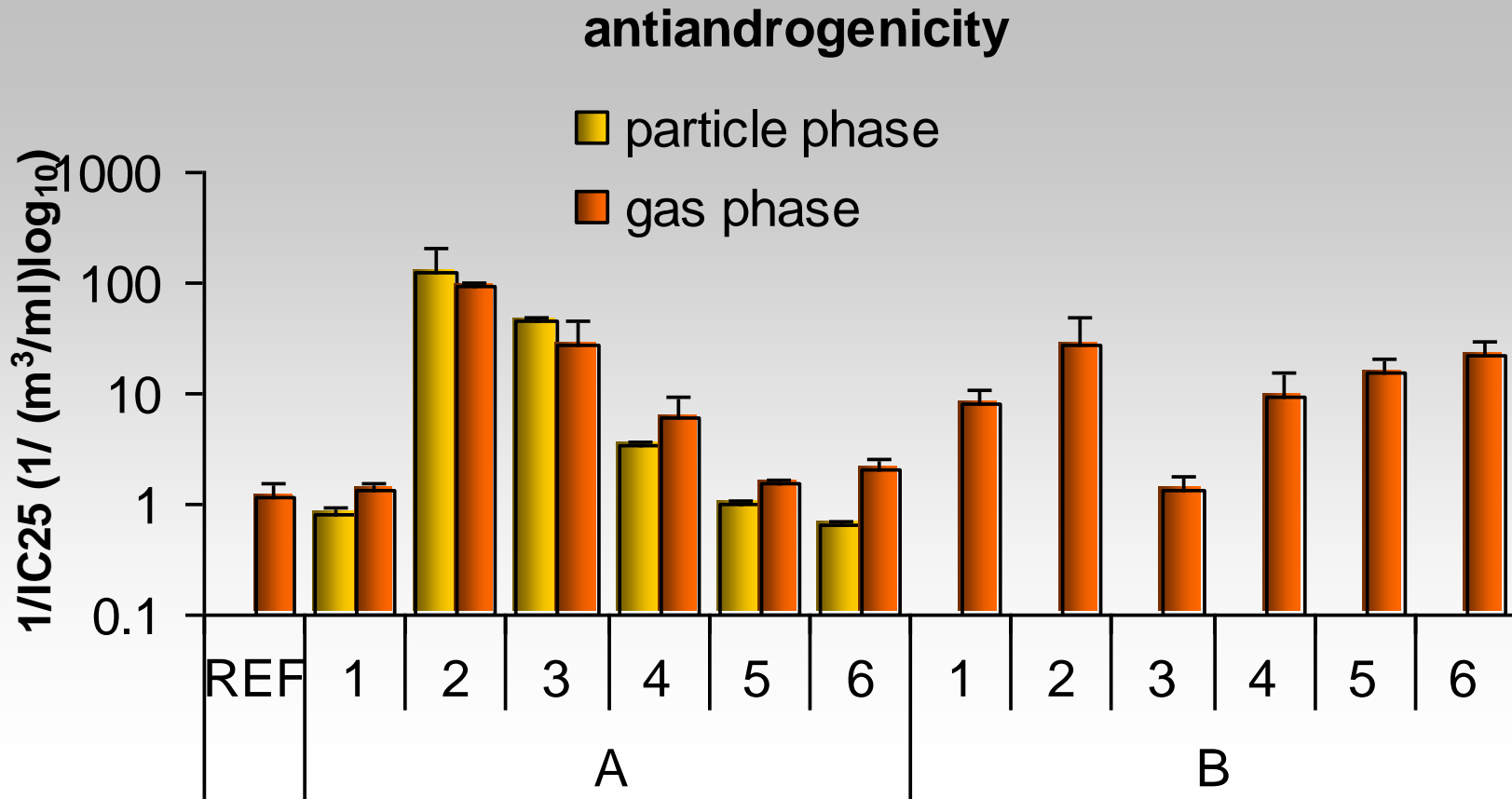
Částice (vyšší aktivity) i plynná fáze

B > A



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Antiandrogenita vzduchu



**Podobné kvantitativní efekty ALE rozdíly mezi regiony
A – také na částicích / B – jen plynná fáze**



Závěr

Biologické a biochemické metody představují alternativu k chemickým analýzám.

Mohou být podstatně méně nákladné a mnohdy mají lepší výpovědní hodnotu z hlediska účinků na vodní organismy, protože zohledňují interakce látek ve směsích.



Využití biologických nástrojů – příklady



Reálný problém EDCs v ČR

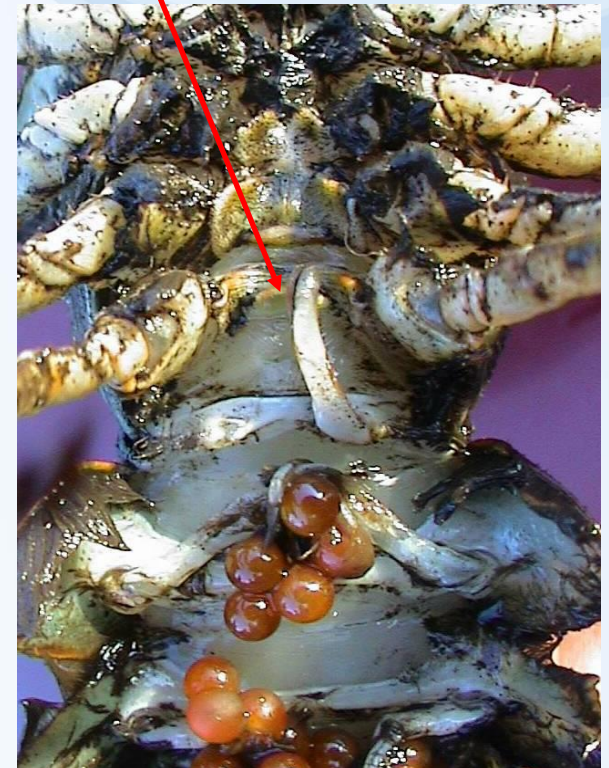
Nádrž Pilňok

- Region Ostrava-Karviná



Rak bahenní
Pontastacus leptodactylus

INTERSEX
Samice s mužskými gonopody?
Samec s vajíčky?



Integrované hodnocení



Sedimenty

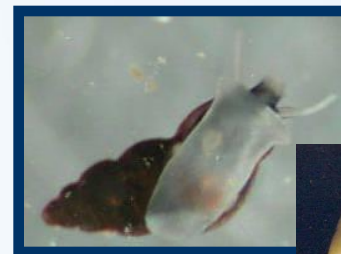
- **Pilňok**
- **Referenční lokality**
Karviná, Steinlach (Německo)

Extrakce

**Chemické
analýzy**

***In vitro*
účinky**

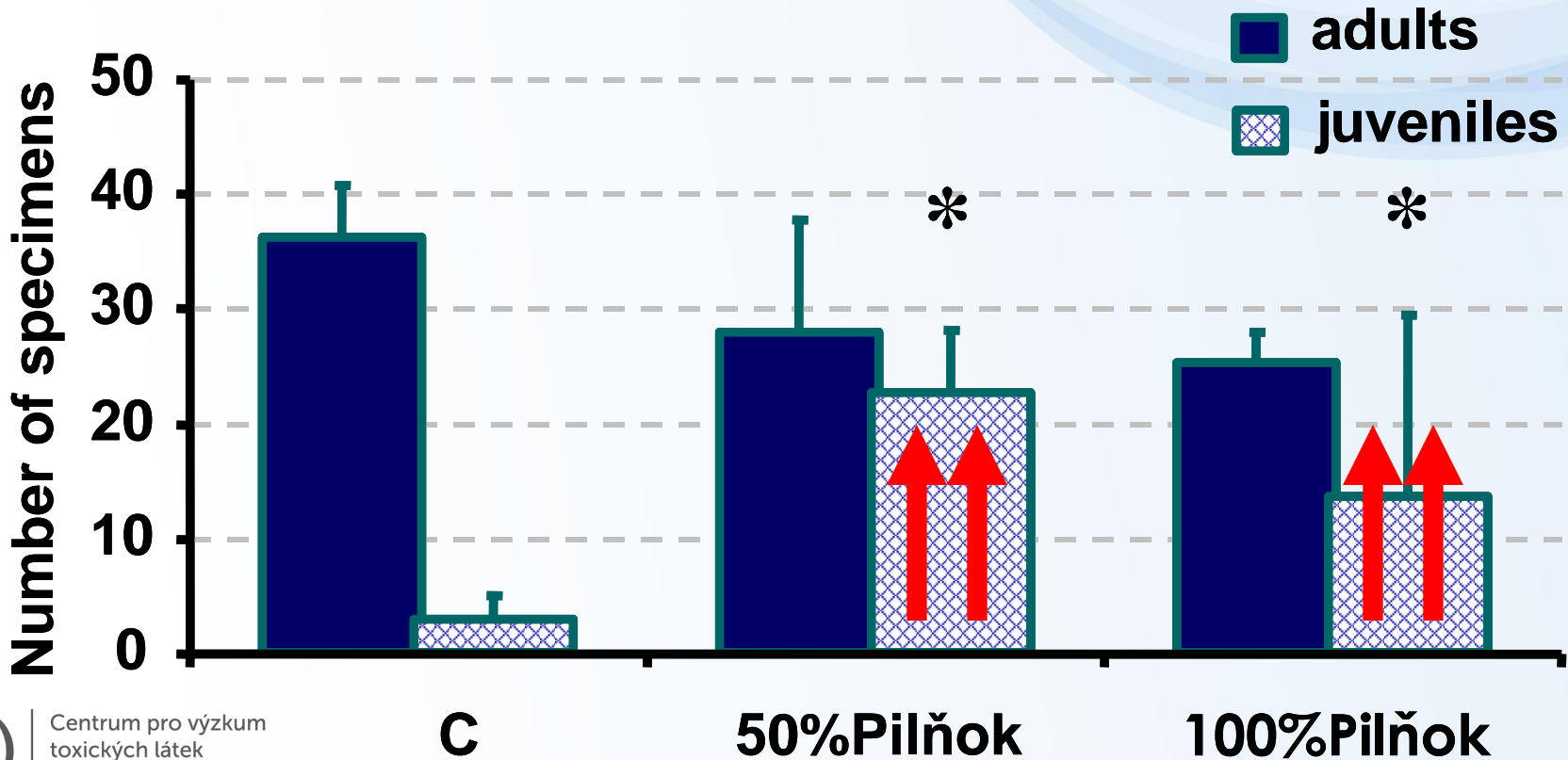
***In vivo* účinky**

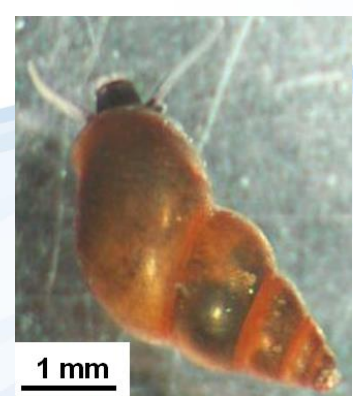




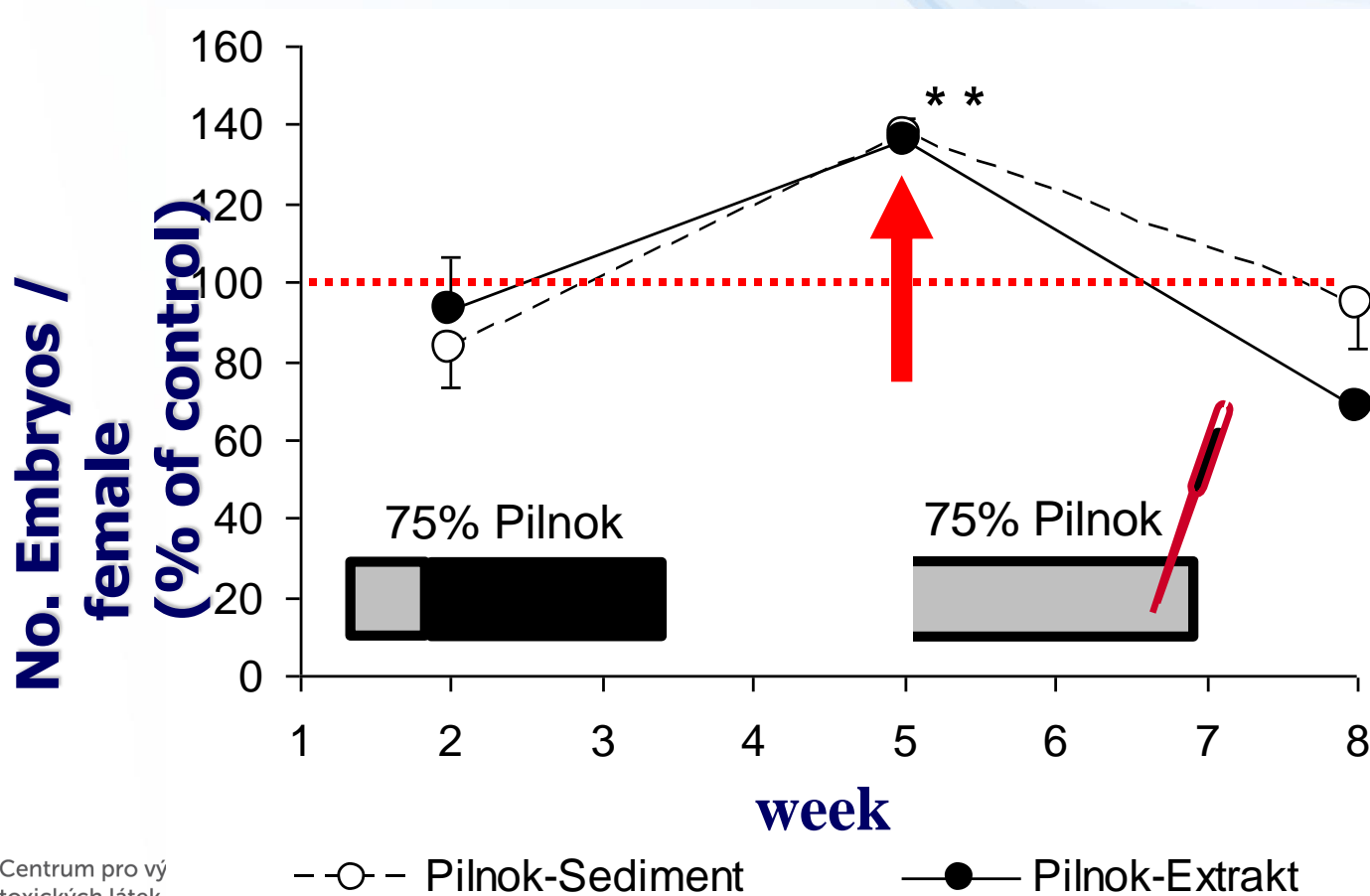
1 mm

Pilňok zvyšuje počty a veľkosť F1 juvenilů

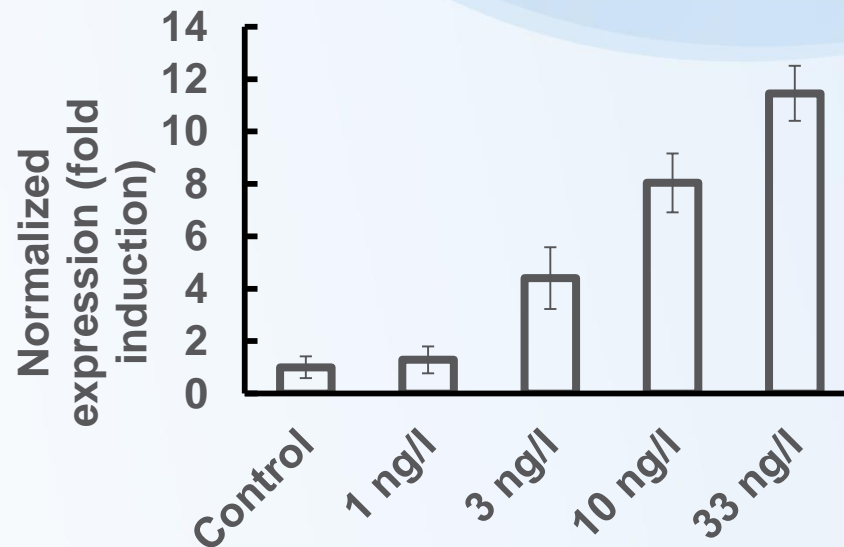
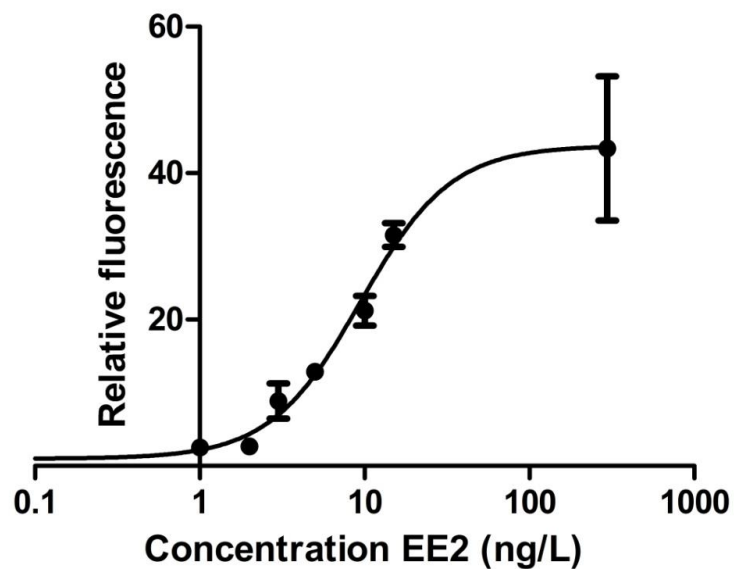
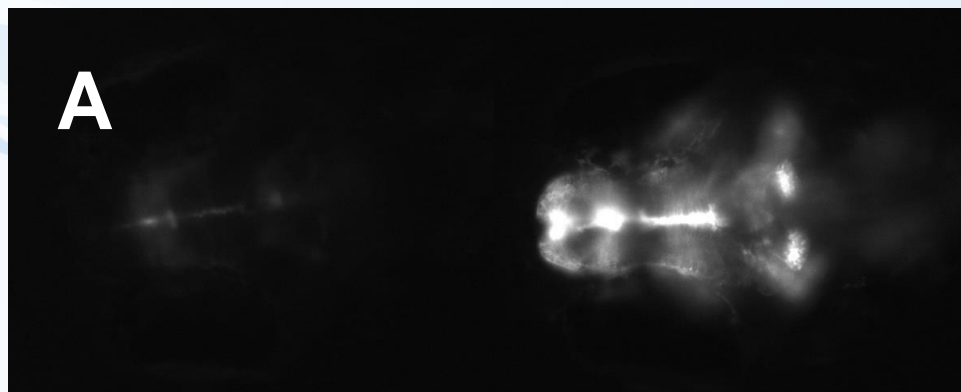




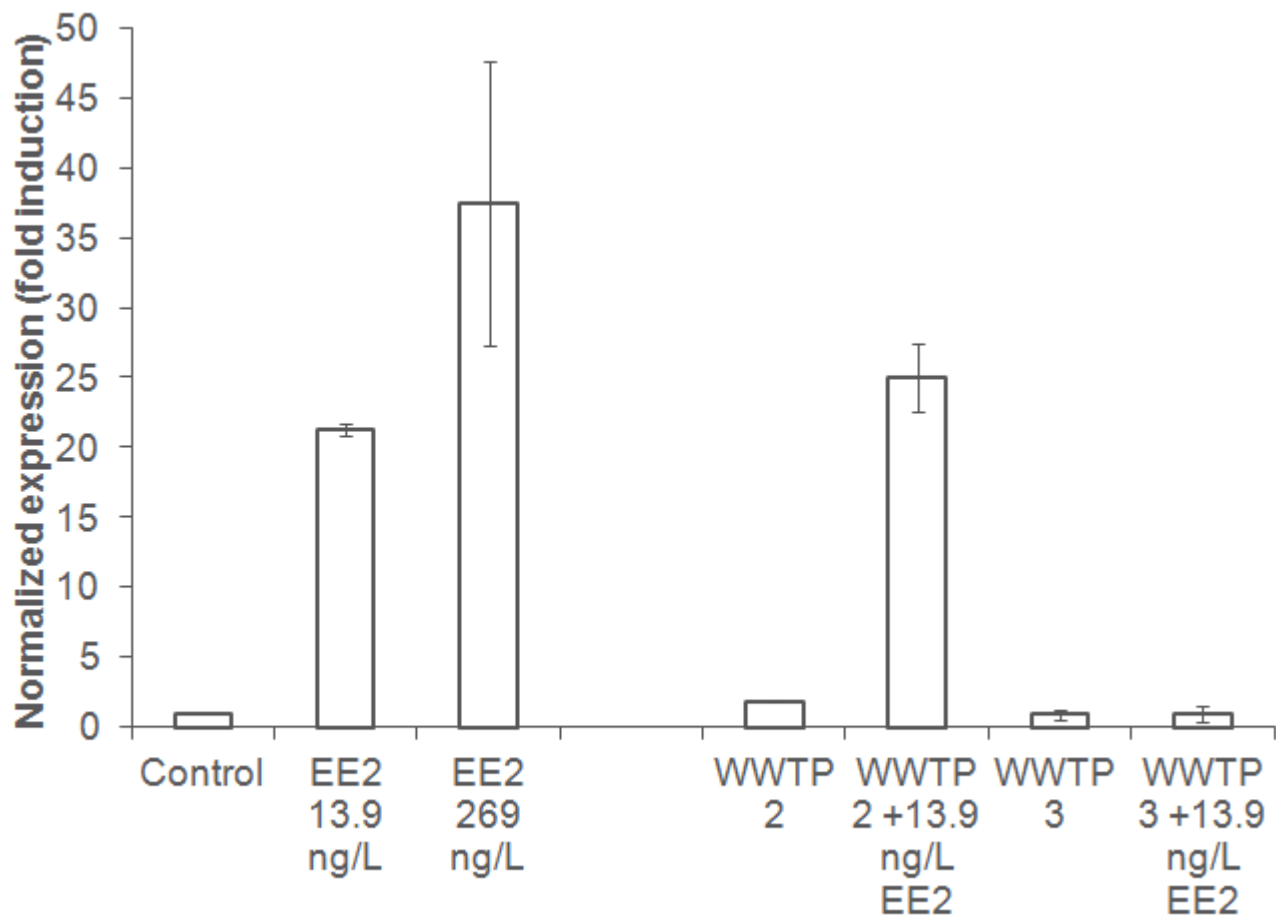
Pilňok (sedimenty i extrakty)
stimulují produkci embryí



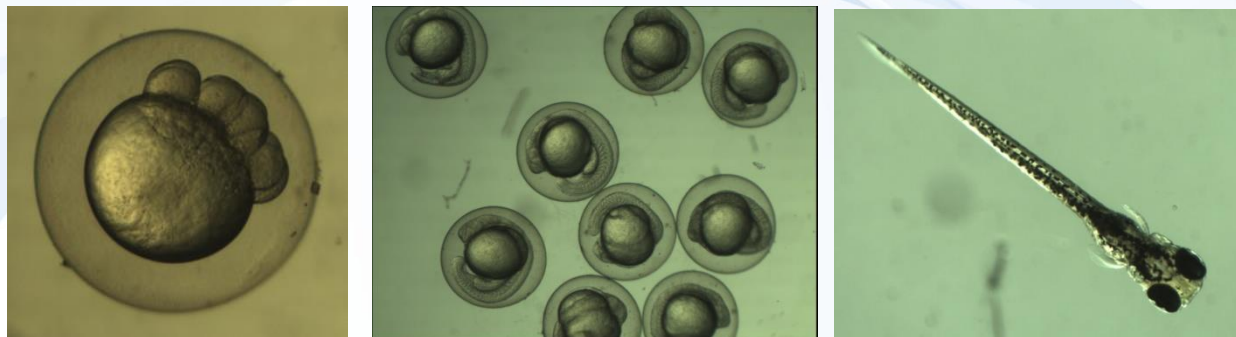
Sledování estrogenů v odpadních vodách s využitím transgenních zebřiček *D. rerio* (GFP Green Fluorescein Protein pod kontrolou estrogenních promotorů v mozku)



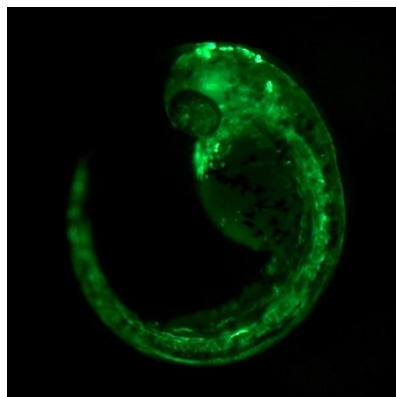
Induction of *cyp19* in zebrafish embryos determined by quantitative PCR in two effluents (WWTP No. 2 and No. 3) **with and without external additions of ethinylestradiol (EE2; 13.9 ng/L)**. Comparison with the effects induced by two concentrations of EE2 alone is provided.



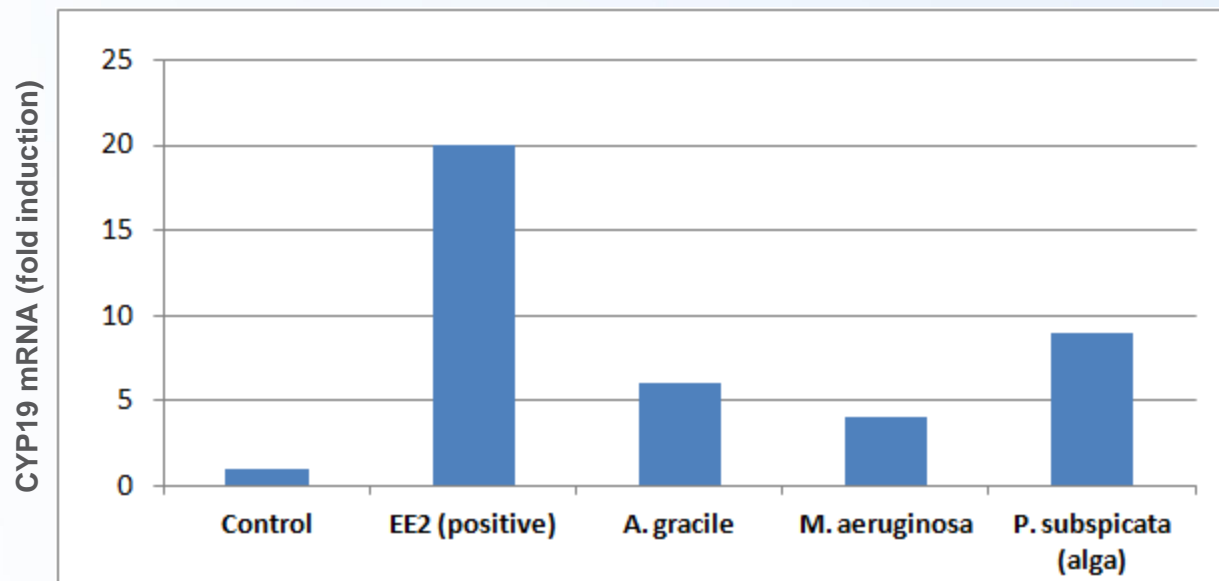
Indukce estrogenity po působení vzorků sinic



Current experiments
(cooperation UFZ Leipzig)
CYP19-gfp ZF



CYP19 (ER-responsive) gene expression in zebrafish embryos



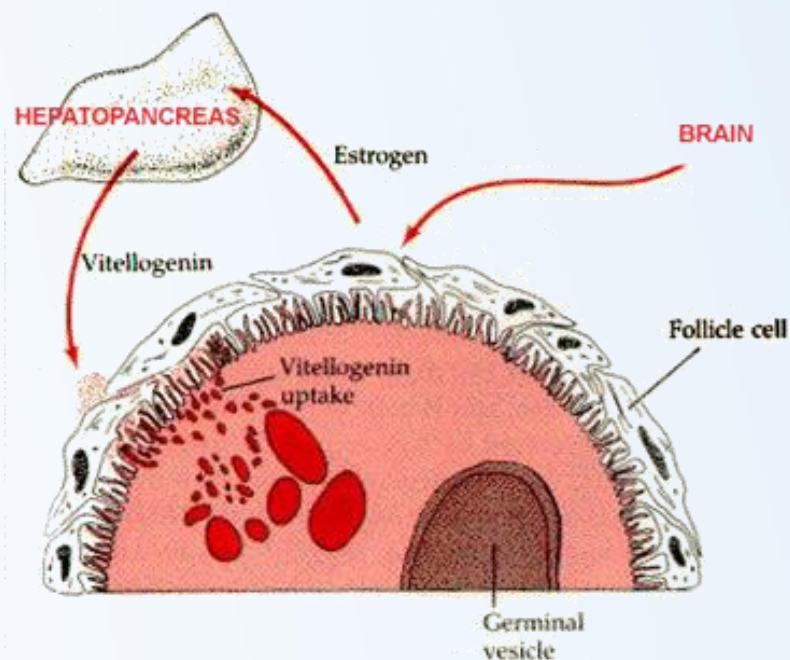
Identifikace endokrinní disrupce *in vivo* - biomarkery

Nejlépe prozkoumaný biomarker estrogenity u vejcorodých obratlovců (zejména ryby)

VITELOGENIN (Vtg)

- prekurzor vaječného žloutku,
- syntéza v játrech je indukována přítomností estrogenů (*aktivace estrogenního receptoru*)
- normální produkce u samic před pářením

! U samců přítomnost estrogenních receptorů
→ průkaz Vtg u samců (!)
= feminizace





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

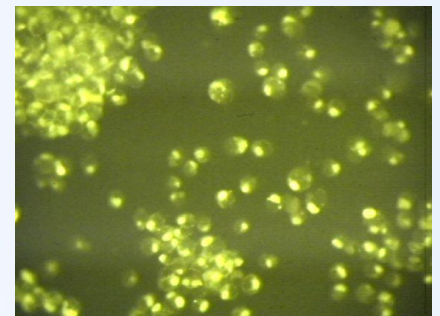
Aktualní a nové přístupy

- Moderní přístupy experimentální ekotoxikologie
 - In vitro modely
 - Biomarkery a „MOA“ (mode-of-action / omics) techniky
- Modely v ekotoxikologii
 - AOP / PBPK / TOXCAST
- „Nové“ problémy v ekotoxikologii
 - Nanočástice
- Novinky a zajímavosti



Výzkum mechanismů toxicity in vitro modely a biotesty

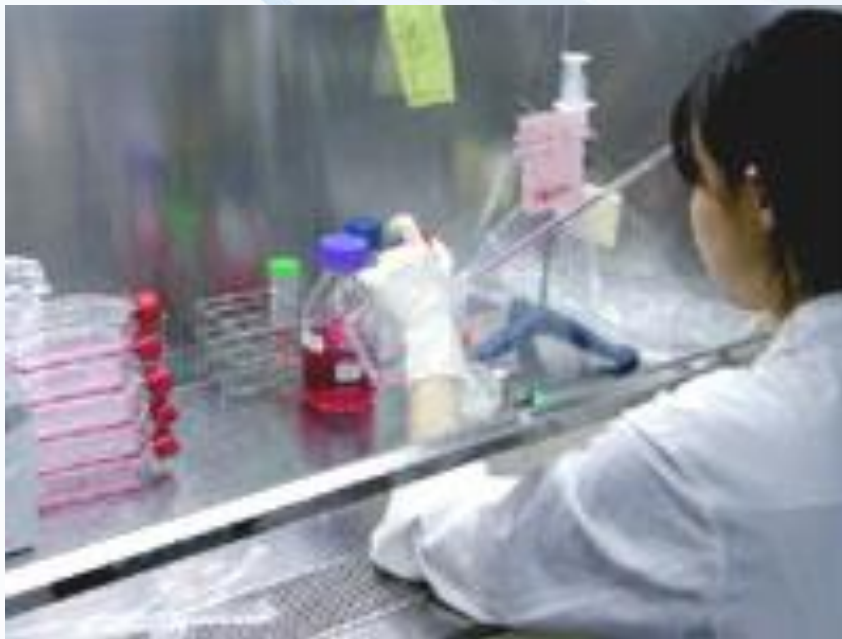
- Zjišťování účinků (Biologie, Toxikologie a Ekotoxikologie) - existuje velké množství modelů
- Účinky na celých organismech
 - Standardní biotesty in vivo: legislativa
 - „Nestandardní“ biotesty in vivo: experimentální výzkumná práce
- Pochopení a identifikace **specifických mechanismů** působení
 - In vitro modely: Orgánové / Tkáňové / Buněčné
 - Výhody
 - Mechanistické porozumění
 - Šetření experimentálních zvířat (etické principy „3R“)
 - Nevýhody
 - „Jen“ in vitro, chybí komplex a interakce v organismu



Výzkumy mechanismů toxicity in vitro modely a biotesty



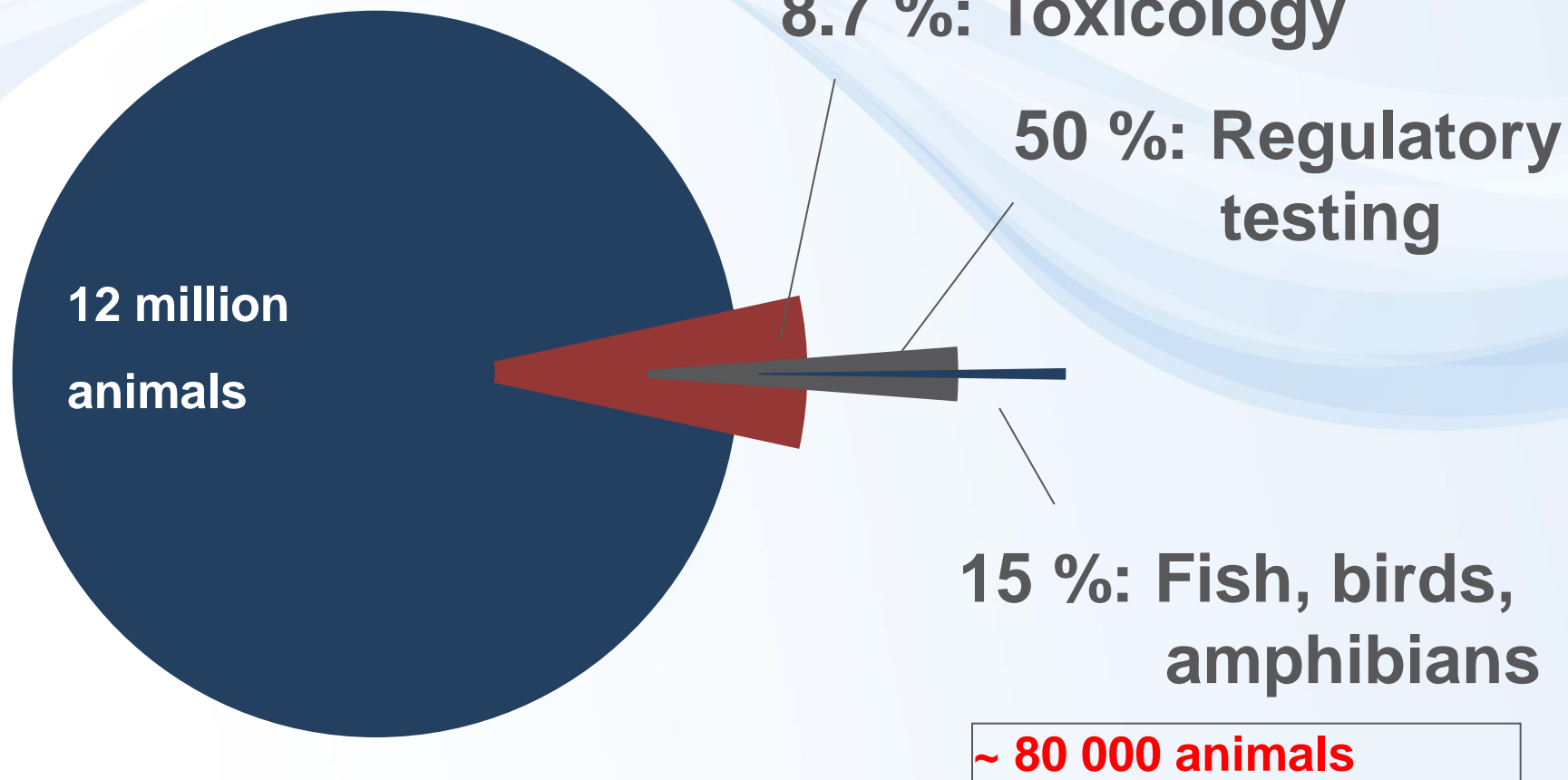
**Práce s in vitro
kulturami
(kultivační / expoziční
nádoby a média)**



**Sterilní práce s
modely in vitro**



Počty obratlovců používaných pro hodnocení chemických látek v Evropě

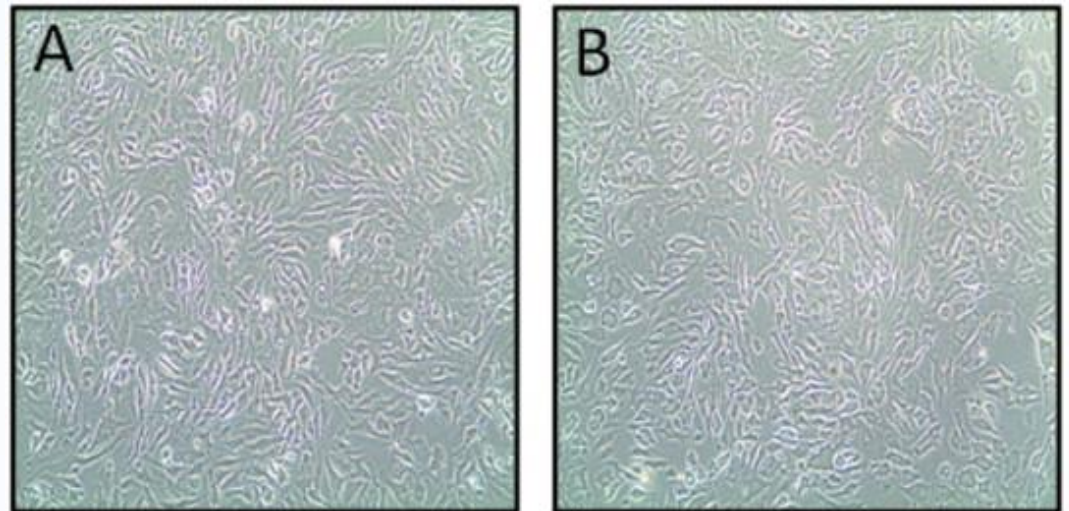
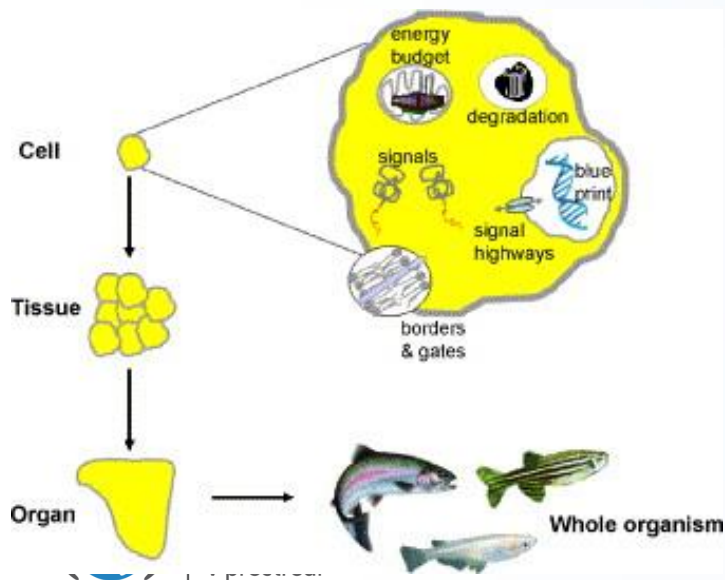


Commission of the European Communities, 2010



In vitro models v ekotoxikologii 1 – rybí buňky

- Rybí buňky in vitro
 - Relativně snadná izolace buněk a udržování v kultuře (na rozdíl od savčích primárních linií se rybí buňky in vitro chovají jako immortalizované)
 - Příklady linií
 - **RTL-W1 (Rainbow Trout Liver - W1)**
 - RTgill (Rainbow Trout Gill)
 - Využití např. pro testování akutní toxicity (snaha o nahrazení testů in vivo)
 - podobná citlivost s in vivo modely → *validace / standardizace*



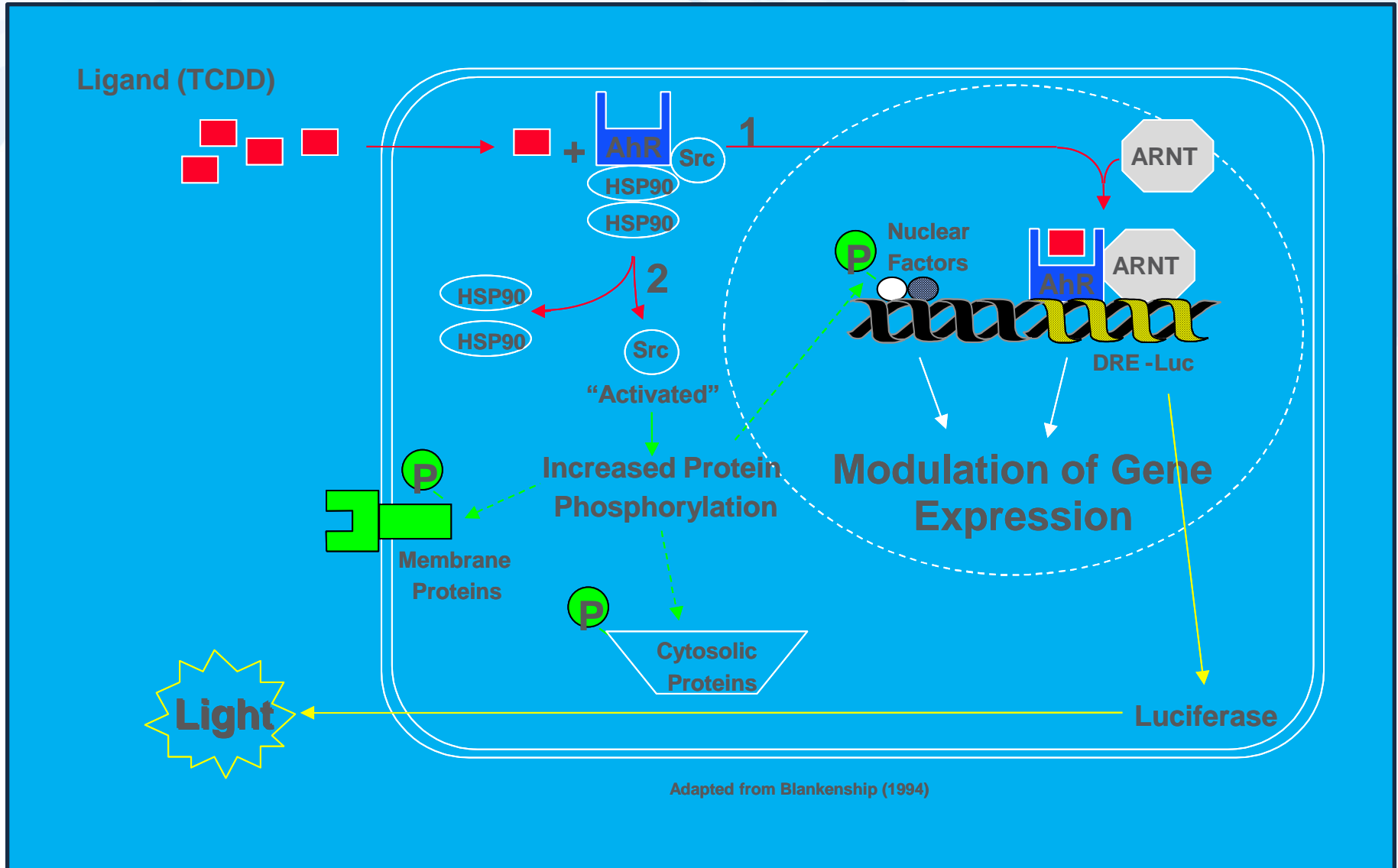
Reporterové testy

analýza účinků závislých na jaderných receptorech

- Specificky vytvořené buněčné linie
- Původně odvozené z lidských, potkaních, rybích či jiných tkání
- Následná úprava („GMO“)
 - stabilní transfekce specifickými geny, které se v buňkách normálně nevyskytují
 - **Luciferáza (ze světlušky)**, Beta-galaktosidáza
 - Vložení do DNA v místech, která jsou kontrolována příslušným receptorem (AhR, ER...)
- Princip – viz obrázek
 - Měření světla z luciferázy ~ množství dioxinově aktivních látek
- Někdy označované „**CALUX**“ (**Chemical Assisted Luciferase Expression**)
 - jde o komerční název některých buněk, ale v mnoha laboratořích (včetně RECETOX) se užívají principiálně stejné „nekomerční“ buňky (např. H4IIE.luc / MVLD / MDAkb2)



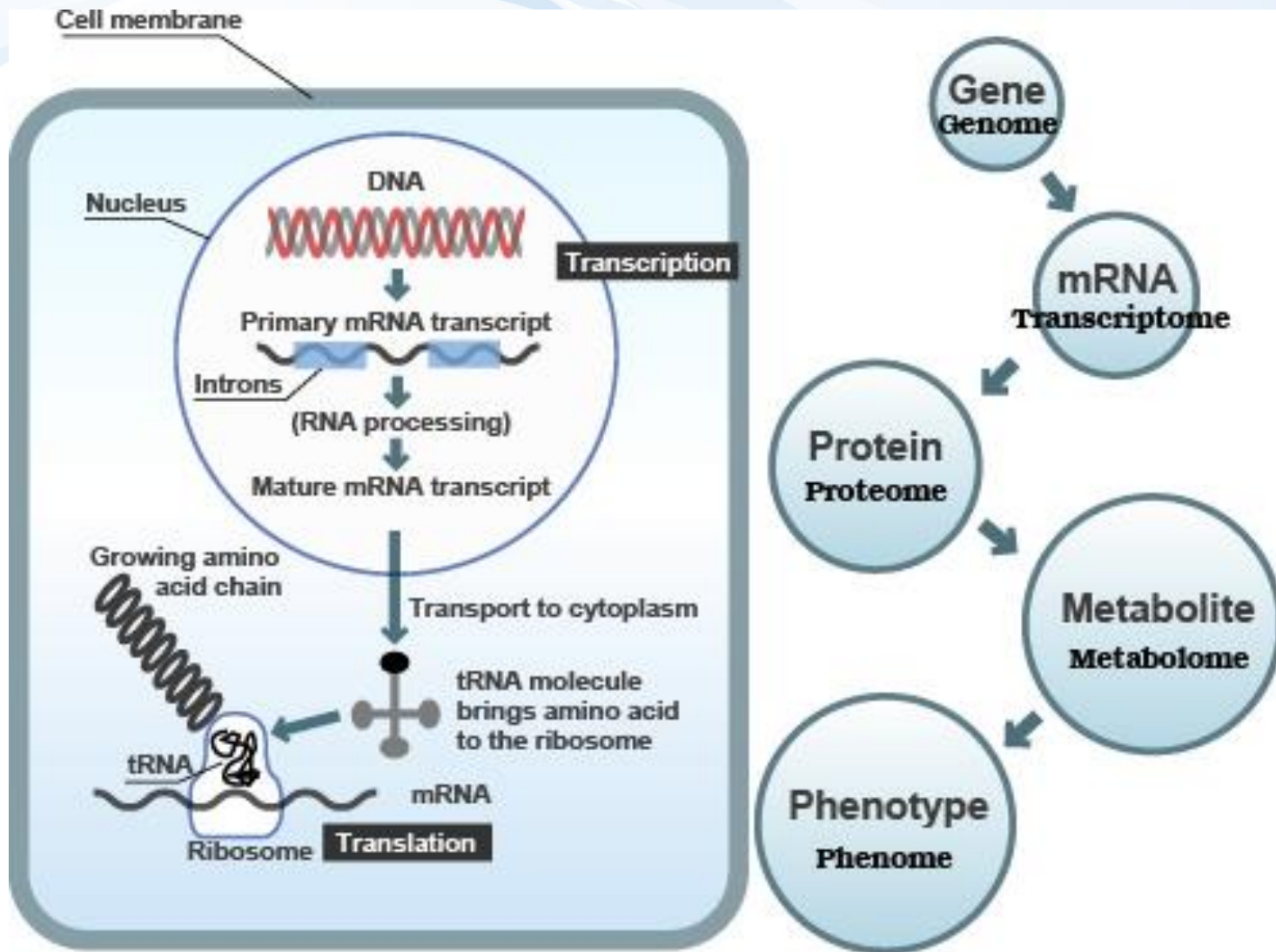
Stanovení toxicit závislých na intracelulárních receptorech



Techniky „OMICS“

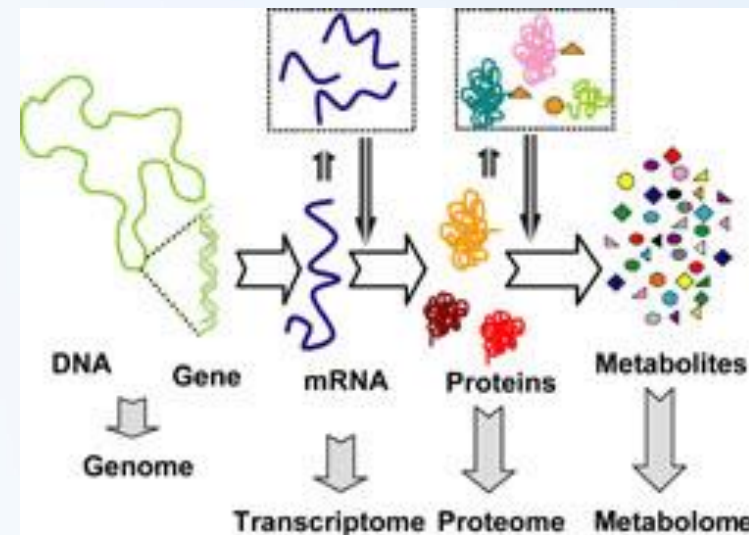


Úrovně působení látek v buňce / organismu



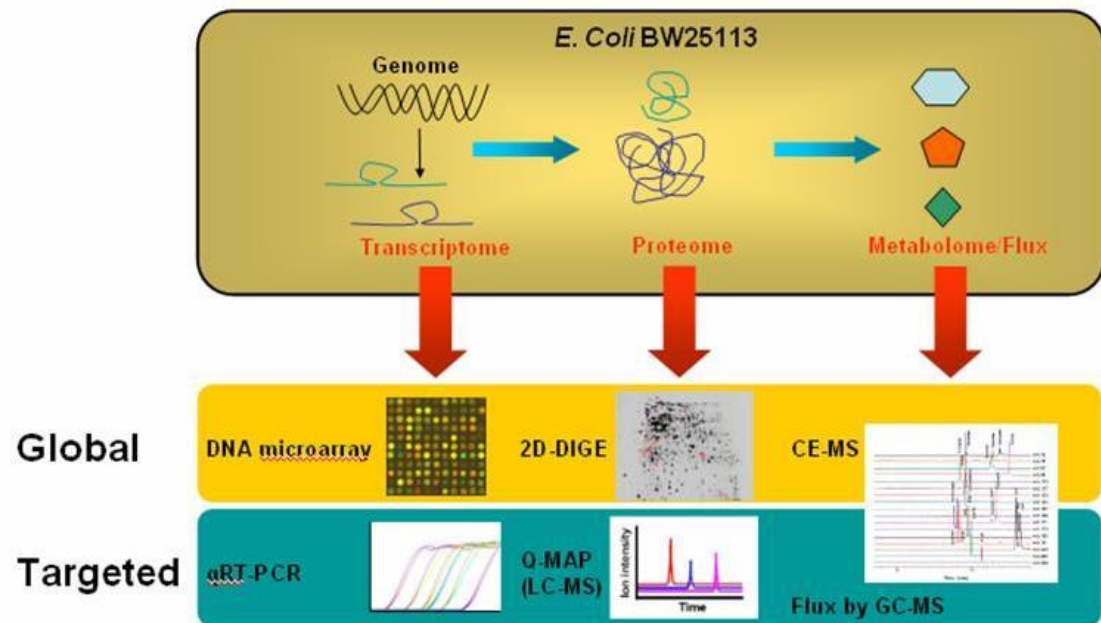
„Omiky“ –mechanistické změny

- Měření na jednotlivých úrovních
 - Geny – genomika: variabilita mezi jednotlivci, populacemi, druhy / vznik mutací atd.
 - mRNA – transkripce / transkriptomika – úroveň exprese jednotlivých genů
 - Proteiny – proteomika - hladiny jednotlivých proteinů
 - Produkty proteinů / metabolity – metabolomika
- Výsledný fenotyp (viditelný projev / změna)
 - Např. porucha rozmnožování / smrt



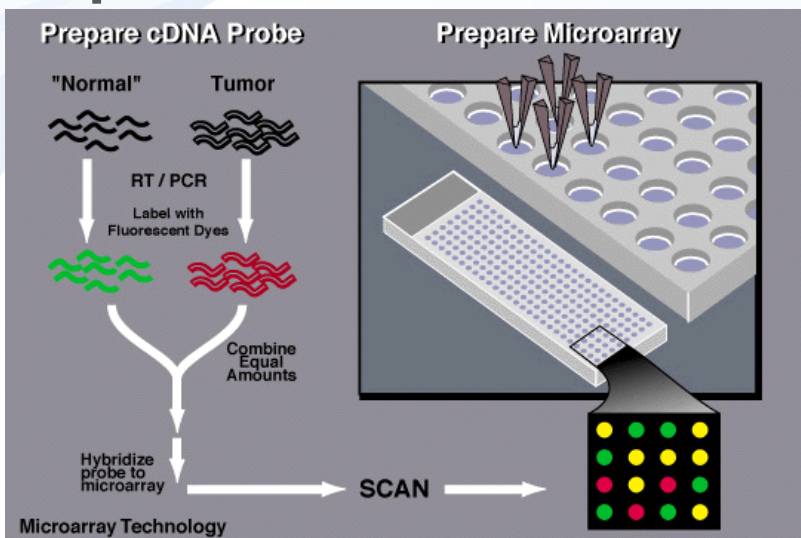
MOA (mode of action) techniky

- Generování velkých množství údajů (dat) z jednotlivých experimentů
- Současné sledování:
 - Hladiny mRNA - exprese až desítek-tisíc genů
 - Proteiny – sledování tisíců proteinů
 - Metabolity – tisíce metabolitů
- Moderní techniky molekulární biologie a hmotnostní spektrometrie
 - Velký rozvoj v posledních 10 letech
 - Postupné „zlevňování“ → větší dostupnost



Příklad - microarrays

Exponované vs. Kontrolní



- 1) Izolace mRNA
reverzní transkripce (RT) do cDNA
- 2) „Obarvení“
(různé barvy Kontrola vs. Exponovaná)
- 3) Smíchání Exp + Kontrola
(stejně celkové koncentrace)
- 4) Hybridizace na „microarray“
(párování nukleotidů - tisíce předpřipravených cílových DNA na jednom array)
- 5) Scanování → výsledná barva:
analýza relativní exprese (? Které je více ?)
Zelená = více „normal“
→ snížení exprese u exponovaných
Červená = více „exponovaná“
Žlutá = žádná změna



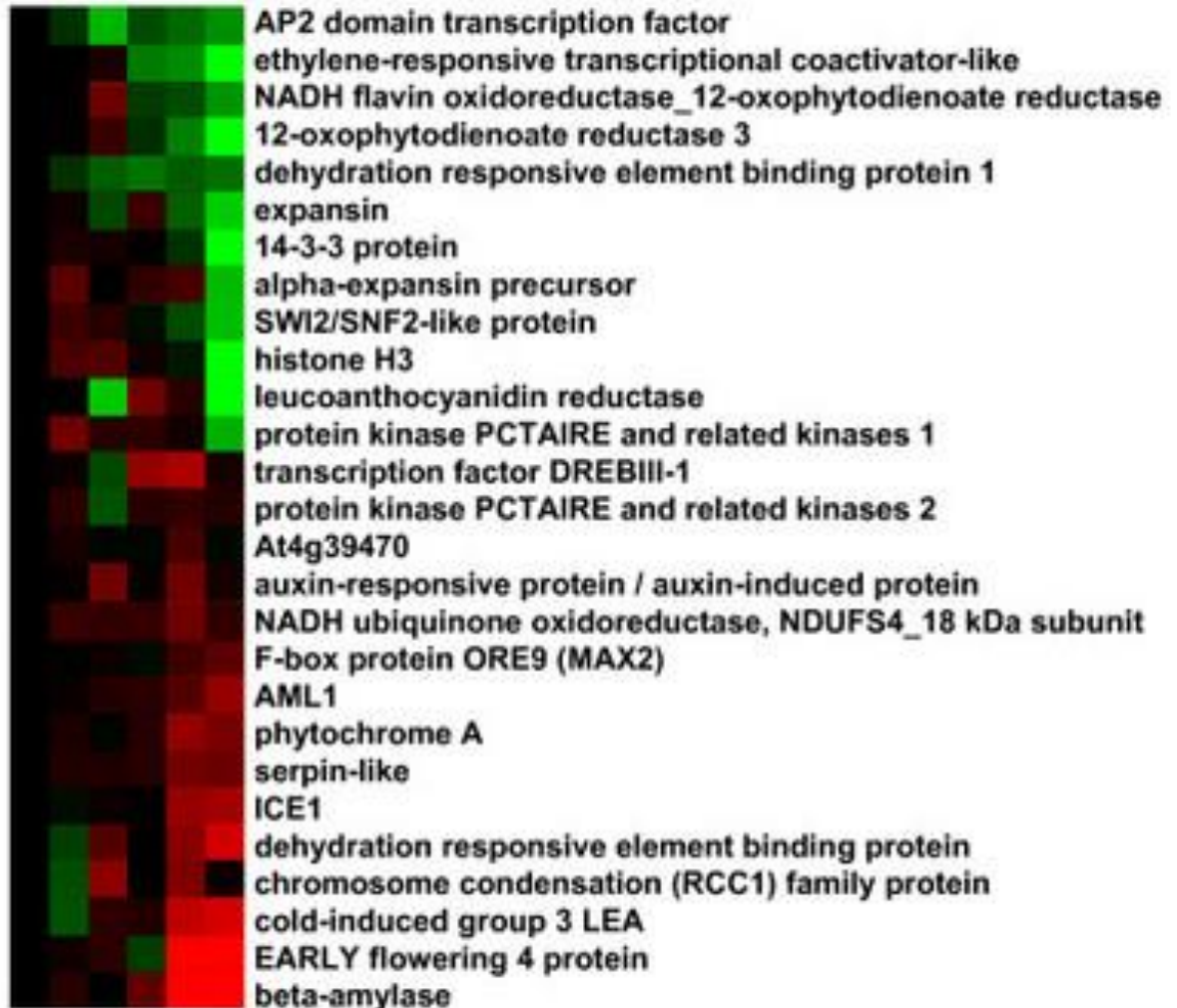
Výsledek – microarrays

Výsledek
„Heat map“
Změny exprese
Různých genů

→ Náročné
statistické
zpracování

Experimentální varianty

K c1 c2 c3 c4 c5



Moderní výpočetní toxikologie



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

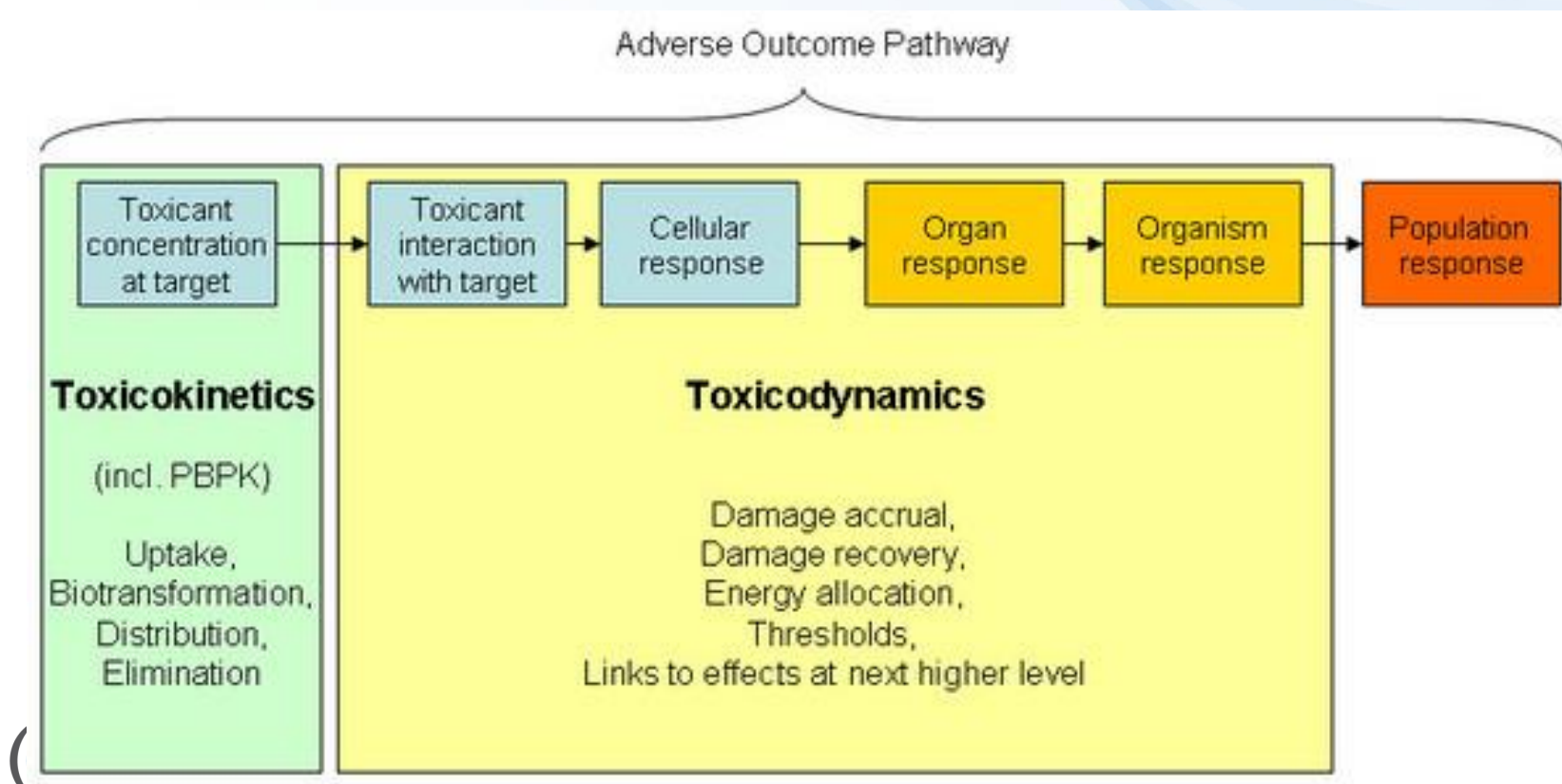
Adverse outcome pathways

Viz také dříve v přednáškách:

Dokážeme z koncentrace látky v prostředí předpovědět (matematicky) účinky ?

Základem je dokonalé porozumění

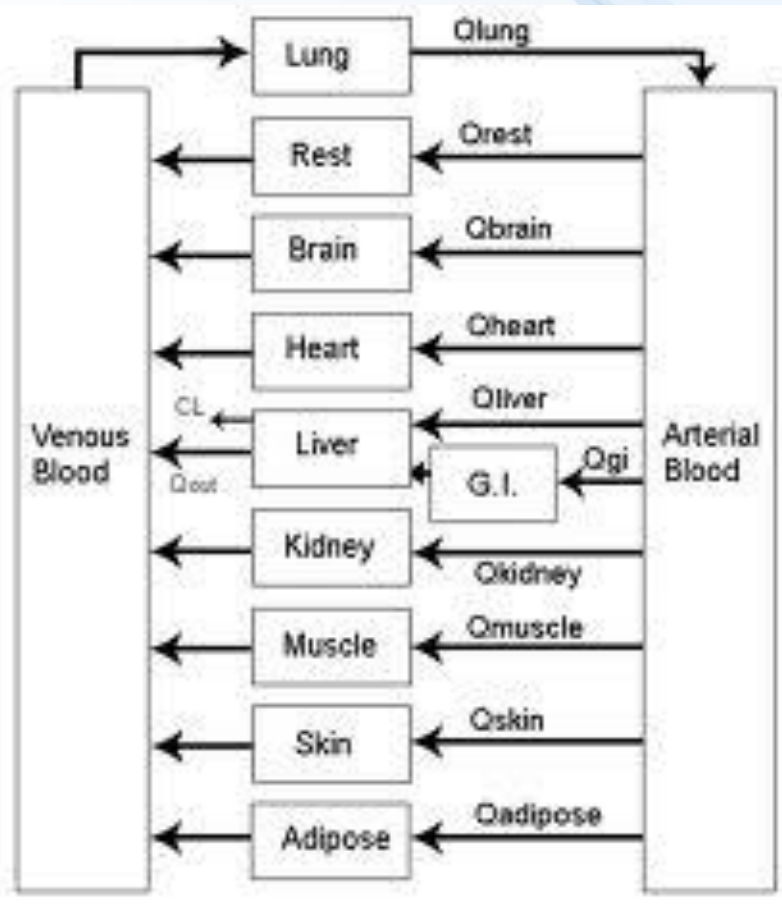
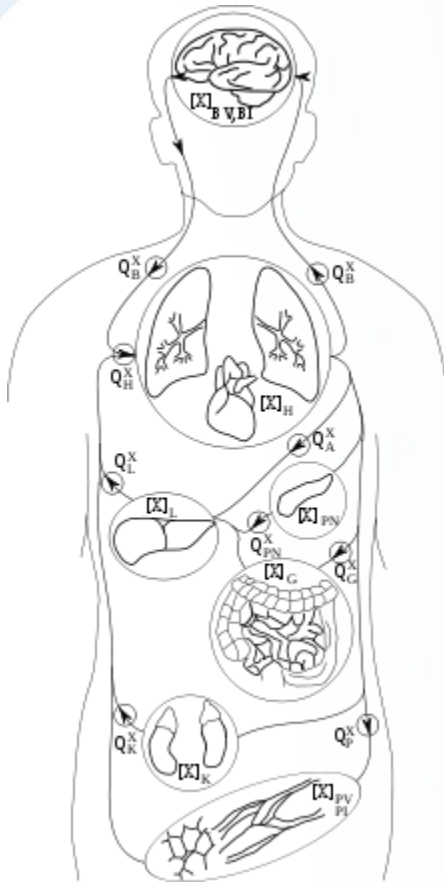
1) toxikokinetice (modely PBPK – viz dále) a 2) následně mechanismům (dynamika)



PBPK modely

PBPK (PBTK)

Physiologically based pharmacokinetic (toxicokinetic) models



Vnitřní
„rozdělení“ organismu
a parametrizace
běžících procesů

→ Složitý model
: Predikce koncentrací
v jednotlivých tkáních



Výpočetní model → toxicita

Li et al. *BMC Systems Biology* 2011, 5:63
<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/5/63>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

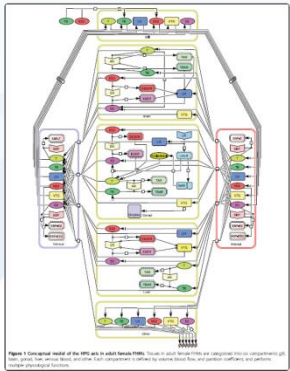
A computational model of the hypothalamic - pituitary - gonadal axis in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17α -ethynylestradiol and 17β -trenbolone

Zhenhong Li¹, Kevin J Kroll², Kathleen M Jensen³, Daniel L Villeneuve³, Gerald T Ankley³, Jayne V Brian⁴, María S Sepúlveda⁵, Edward F Orlando⁶, James M Lazorchak⁷, Mitchell Kostich⁷, Brandon Armstrong⁸, Nancy D Denslow² and Karen H Watanabe^{1*}

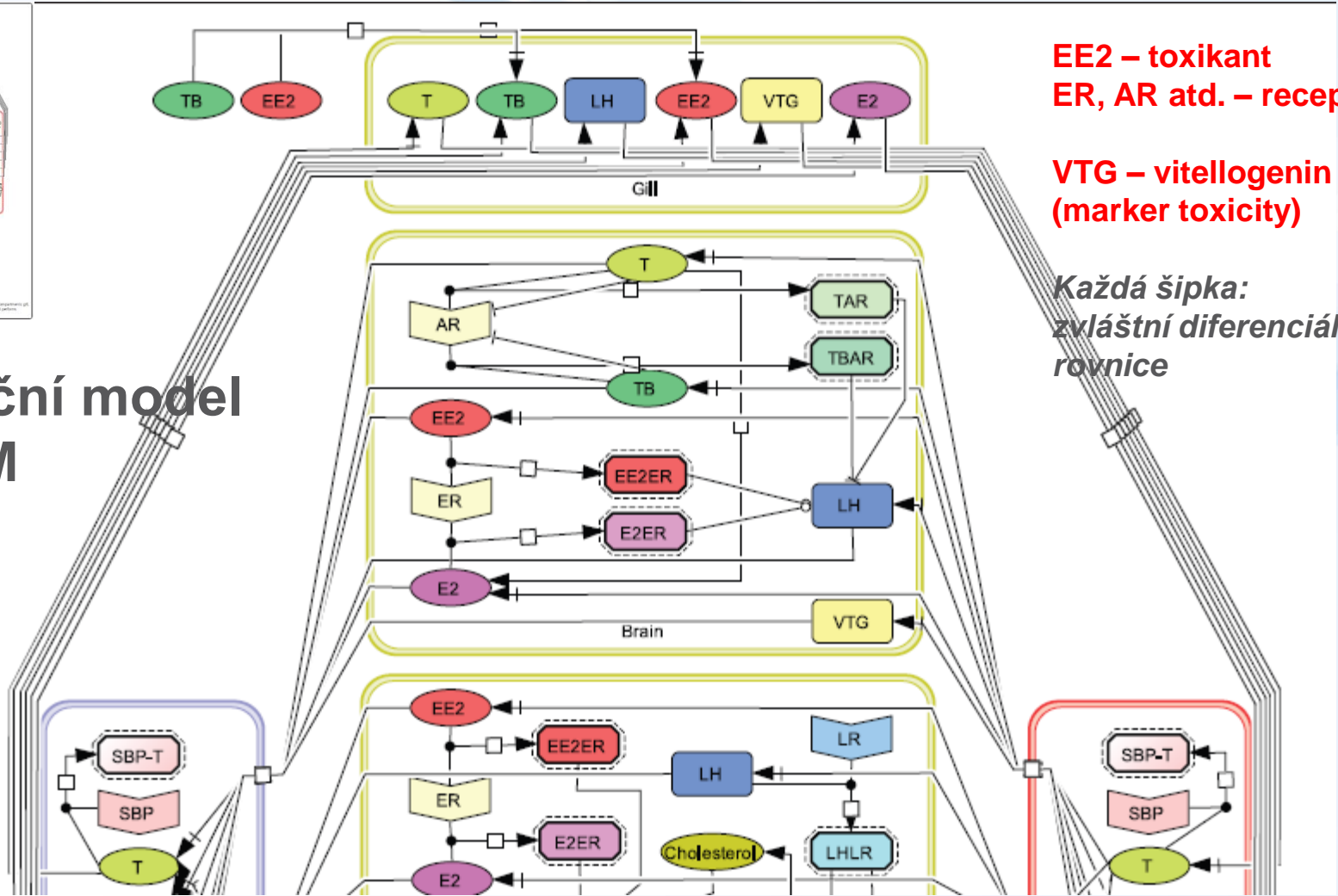


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Li (2011) BMC Systems Biology



Konceptní model
→ ZOOM



EE2 – toxikant
ER, AR atd. – receptory

VTG – vitellogenin
(marker toxicity)

Každá šipka:
zvláštní diferenciální
rovnice



Li (2011) BMC Systems Biology

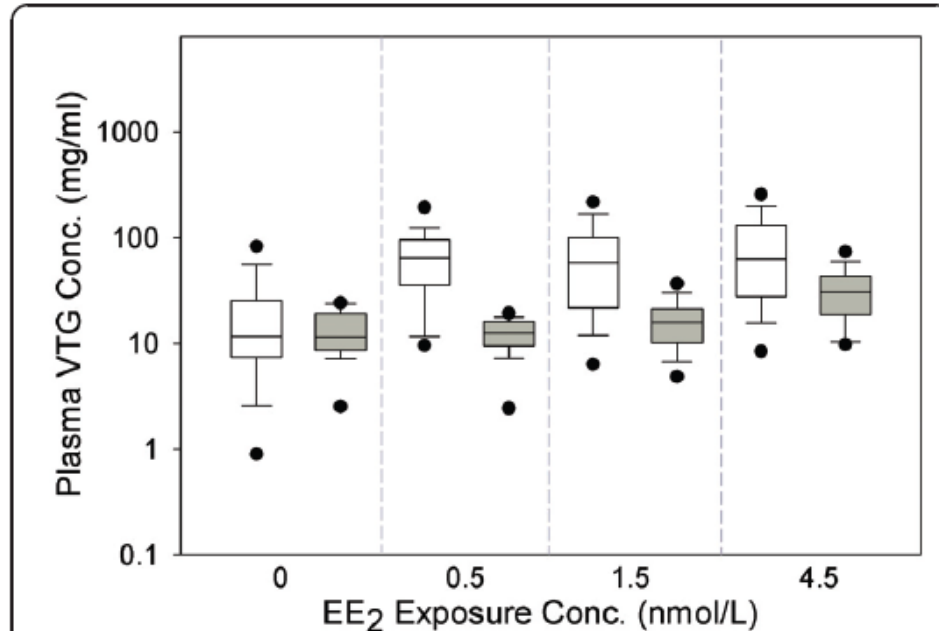


Figure 6 Comparison of model predictions with measured data in female FHM_s exposed to EE₂. $n = 28$ at each sampling time.

White boxes represent model predictions, and grey boxes represent measured data [42]. The x-axis represents EE₂ concentrations in ng/L. The solid line within the box marks the median; the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile; the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile; the whisker (error bar) farthest from zero marks the 90th percentile; whisker (error bar) closest to zero marks the 10th percentile; the circle farthest from zero marks the 95th percentile; and the circle closest to zero marks the 5th percentile.

Výsledek:

**Srovnání
MODEL vs. MĚŘENÍ**



Programy US EPA – „Výpočetní toxikologie“ – např. „ToxCast“



United States Environmental Protection Agency

LEARN THE ISSUES | SCIENCE & TECHNOLOGY | LAWS & REGULATIONS | ABOUT EPA

ALL EPA THIS AREA Advanced Search

SEARCH

Computational Toxicology Research

Contact Us

You are here: [EPA Home](#) » [Research & Development](#) » [CompTox](#) » [ToxCast™](#)

Key Links

[CompTox Home](#)
[Basic Information](#)
[Organization](#)

[Research Projects](#)
[Chemical Databases](#)
[CompTox Events](#)

[Research Publications](#)
[Scientific Reviews](#)
[Communities of Practice](#)

[Staff Profiles](#)
[CompTox Partners](#)
[Jobs and Opportunities](#)

ToxCast™

Screening Chemicals to Predict Toxicity Faster and Better

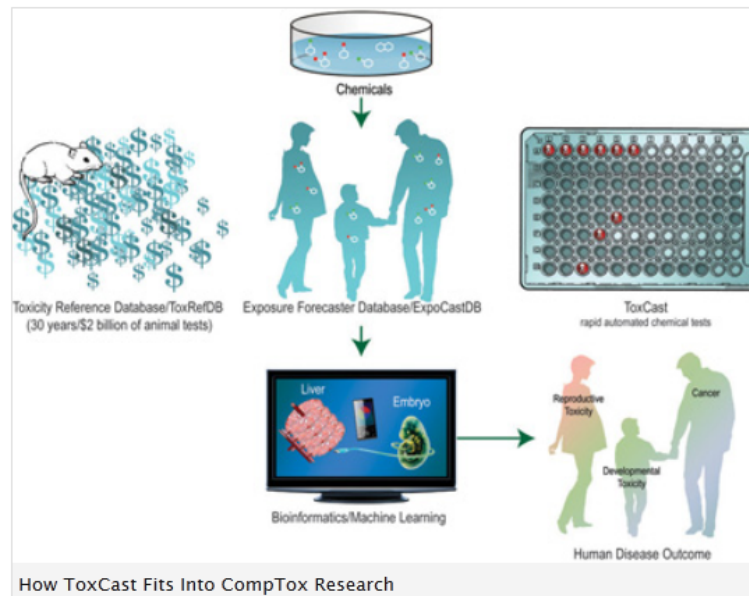
EPA launched ToxCast™ in 2007 to develop ways to predict potential toxicity of chemicals and to develop a cost-effective approach for prioritizing the thousands of chemicals that need toxicity testing. ToxCast™ uses advanced science tools to help understand how human body processes are impacted by exposures to chemicals and helps determine which exposures are most likely to lead to adverse health effects.

Using ToxCast to Prioritize Chemicals

Helping to prioritize chemicals for:

- EPA's [Endocrine Disruption Screening Program](#) by prioritizing chemicals for the Tier 1 screening battery queue. 880 chemicals are being evaluated in approximately 50 endocrine related HTS assays. Long term goal is for ToxCast to eventually replace part or all of the current EDSP Tier 1 Screening Battery.
- Chemicals EPA regulates under the [Toxic Substance Control Act \(TSCA\)](#) by working towards using ToxCast to inform requests for further testing data on High Production Volume industrial chemicals.
- EPA's future drinking water contaminant lists, ([Candidate Contaminant List or CCL](#)) by helping prioritize which chemicals on existing contaminant lists should be tested first, will recommend what types of toxicity testing should

v prostředí



How ToxCast Fits Into CompTox Research

ToxCast Resources



Nano-eko-toxikologie



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

NANOČÁSTICE

- „NANO“ – relativně nová oblast, řada praktických využití
- **ALE: unikátní vlastnosti**
 - Vlastnosti nanočástic (včetně toxicity) nelze odvodit z vlastností částic z téhož materiálu o větších rozměrech a ani z vlastností chemikálie, ze které je materiál tvořen
- Definice
 - **Nanočástice** (nanoparticles): alespoň jeden rozměr <100 nm
 - **Nanočástice přírodního původu** - „ultrafine particles“ přítomné v přírodních aerosolech nebo jako vedlejší produkt lidské činnosti (prach, dým, kouř apod.)
 - **Vyráběné nanomateriály** (manufactured, engineered NM)
 - **Nanoaerosoly**: aerosoly jednotlivých volných nanočástic nebo nanostrukturních částic (= aglomerátů nanočástic nebo nanovláken) – přírodního původu nebo vyráběných



- tvar a struktura částic
 - Kulovité nebo nepravidelné částice, trubičky, vlákna, destičky
 - Homogenní částice (chemická individua)
 - Kompozitní nanomateriály (jádro a obal)
 - Nanočástice 3. a 4. generace (budoucnost: různé komponenty se specializovanými funkcemi („nanodevices“))



Základní charakteristiky vyráběných NM

Kovy

- stříbro
- zlato
- železo
- *další*

Oxidy kovů

- TiO_2
- Al_2O_3
- SiO_2
- ZnO
- ZrO_2
- *další*

Uhlíkové NM

- nanotrubičky
- fullereny
- saze
- nanodiamanty

Další anorganické NM

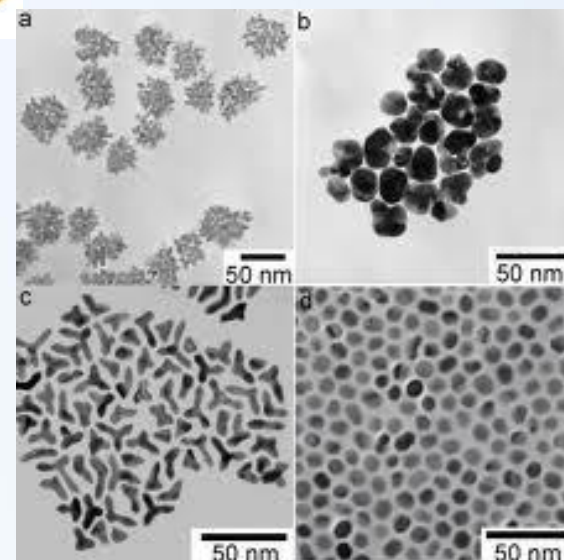
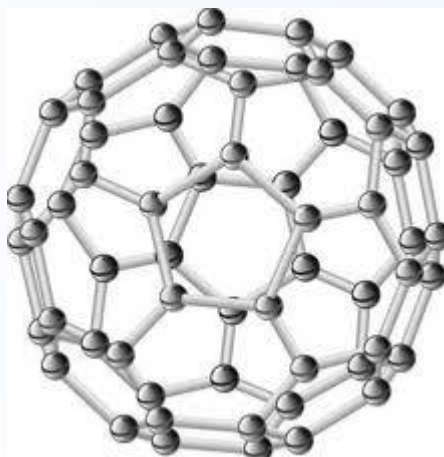
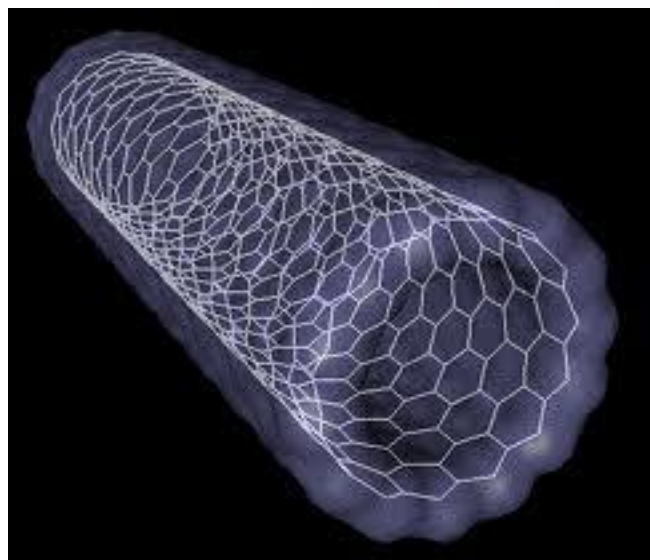
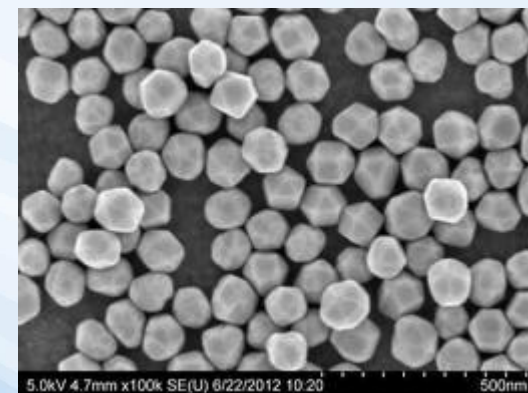
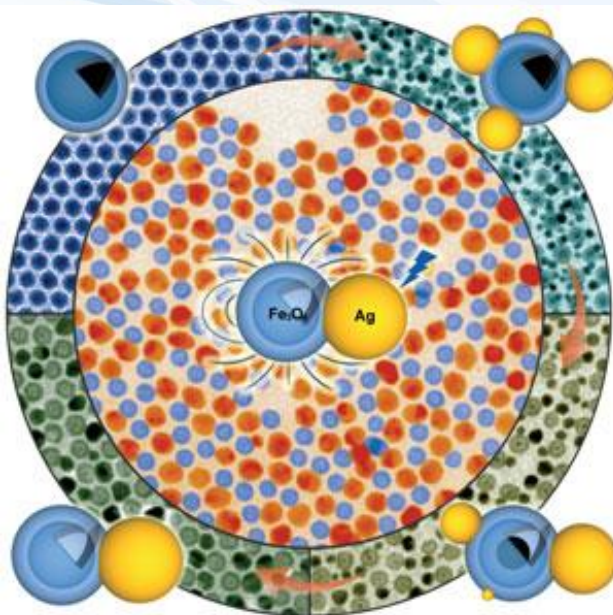
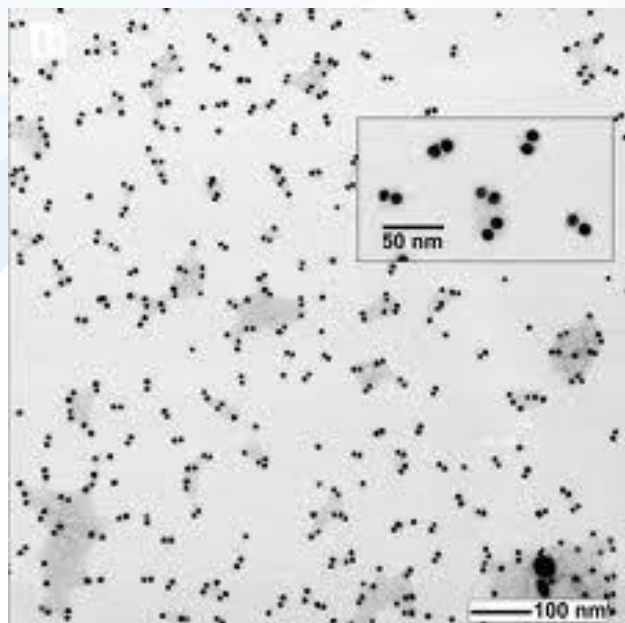
- magnetické materiály
- kompozitní nanomateriály
- kvantové tečky
- silikáty, zeolity, jíly
- anorganická nanovlákná

Organické NM

- nanovlákná polymerů
- dendrimery
- polystyren



Příklady - nanočástice



Nanoparticle movement through the environment

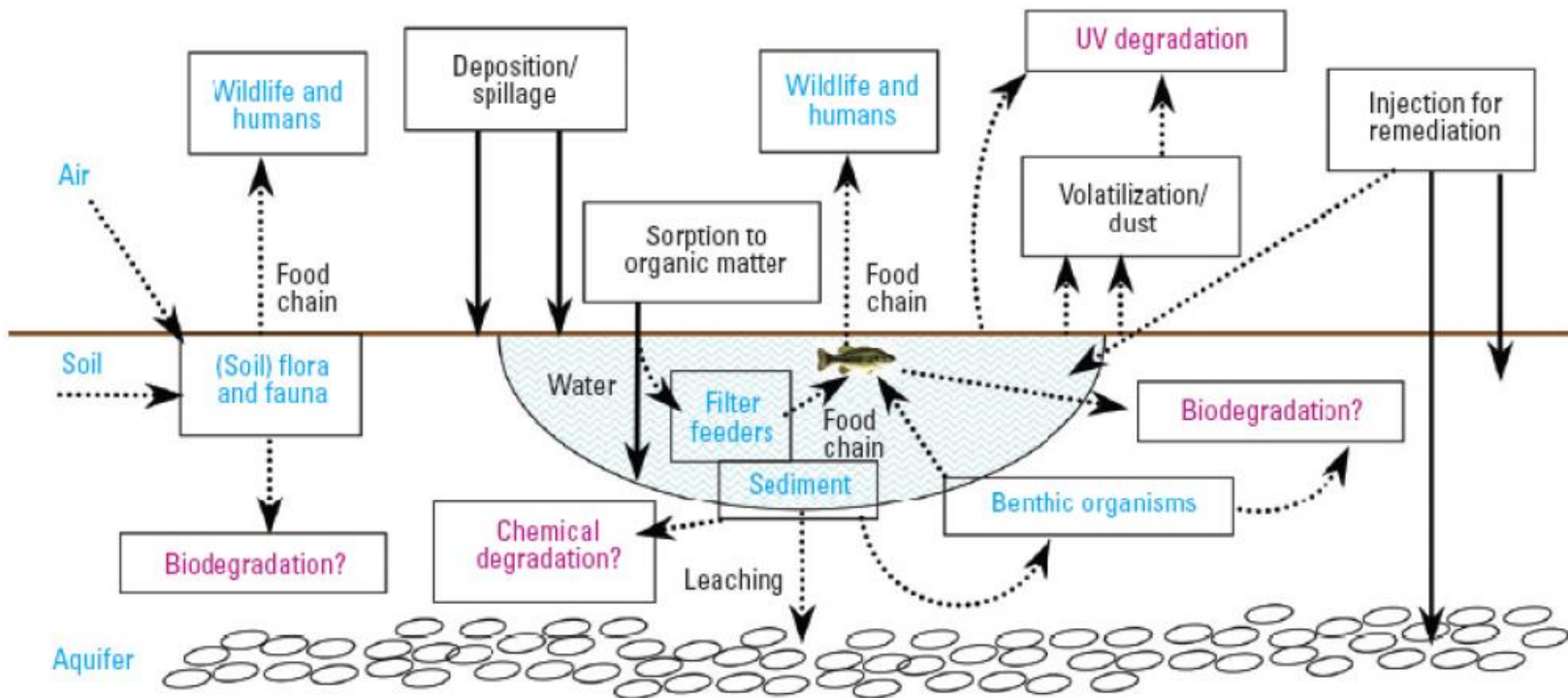
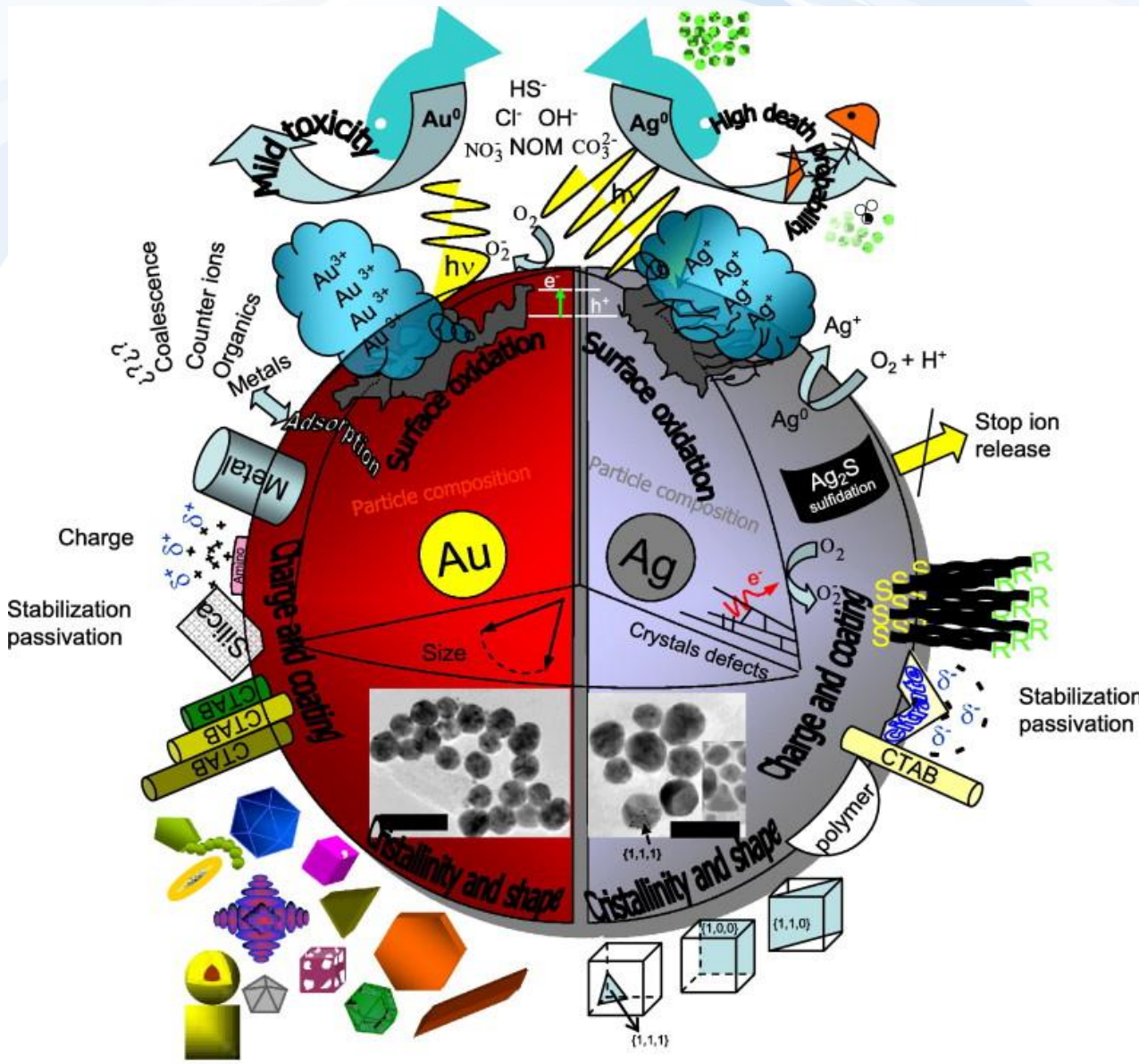


Figure 5. Routes of exposure, uptake, distribution, and degradation of NSPs in the environment. Solid lines indicate routes that have been demonstrated in the laboratory or field or that are currently in use (remediation). Magenta lettering indicates possible degradation routes, and blue lettering indicates possible sinks and sources of NSPs.

(Eko)toxicita nanočástic – specifické vlastnosti



(Neznámé) parametry částic, které mohou mít vliv na toxicitu

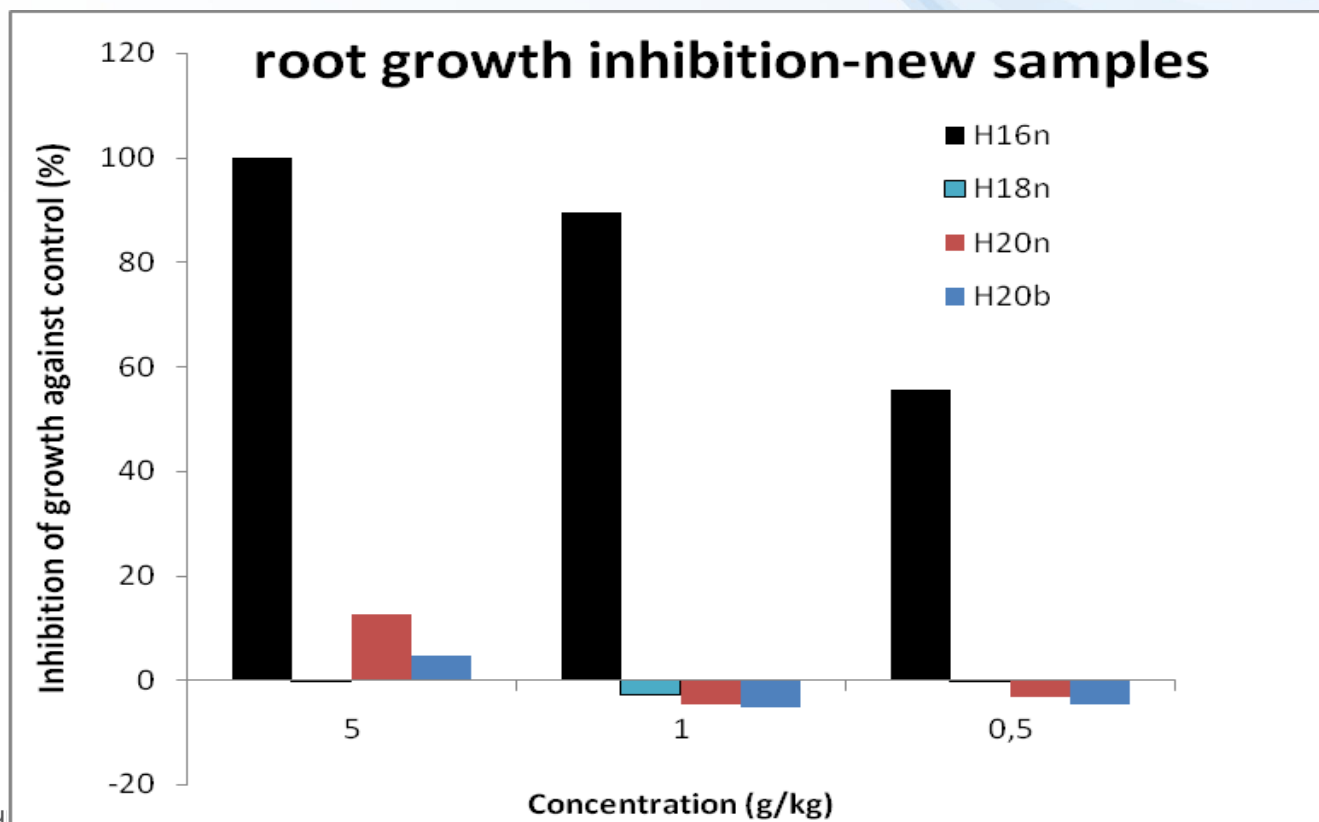
Složení (chemické)
Povrch (velikost, tvar)
Náboj
Stabilita
Agregace částic
Interakce s chemikáliemi
Interakce s ionty

Vliv na osud látek
Přímá toxicita

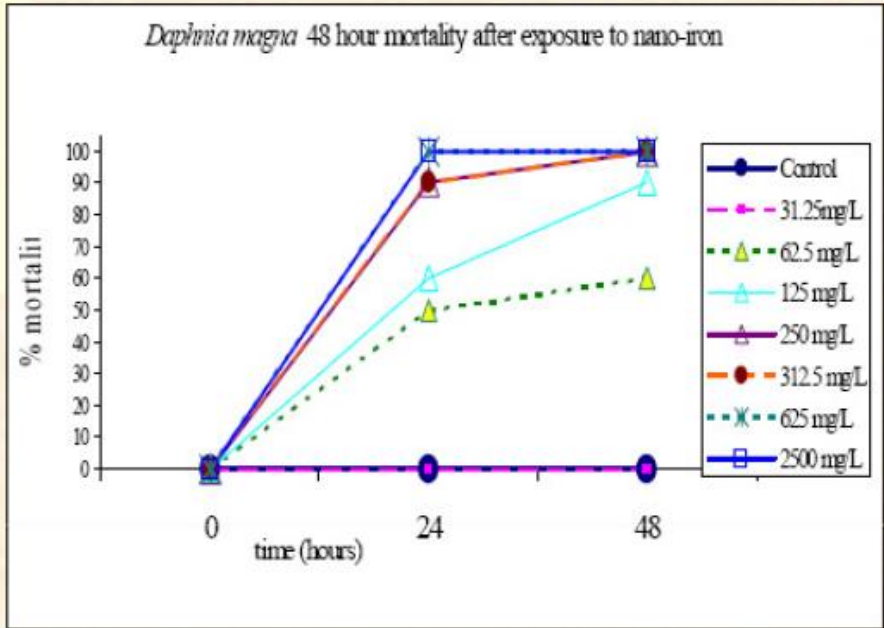
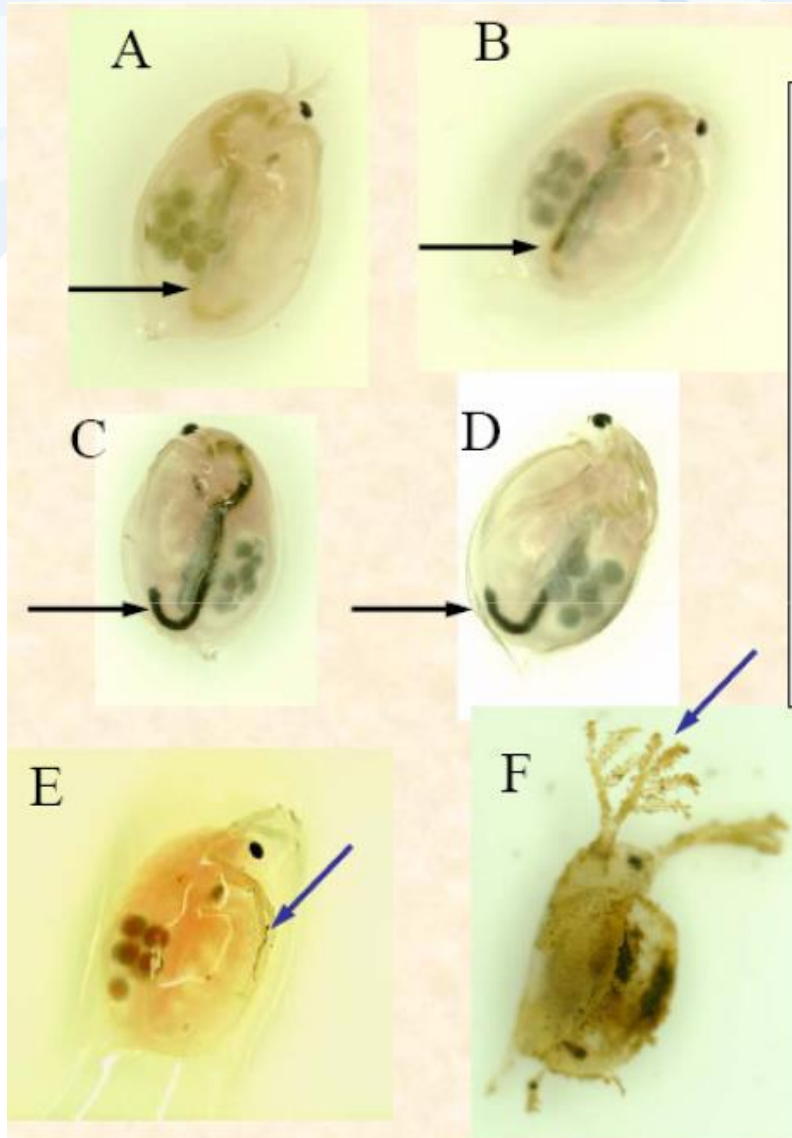
(Eko)toxicita nanočástic – příklad RECETOX

Toxicita – srovnání - 4 „stejné“ částice (jeden výrobce – 4 různé šarže)
(zerovalent iron – ZVI – Fe⁰)

Opakovaně pozorována toxicita u částic H16 – příčina neznámá (žádné změny pH, rozpouštění železa či dalších příměsí ...)



Nanočástice → mechanické vlivy = toxicita



Daphnia exposed to various concentrations of nano-iron used in remediation. A = control; B = 3 mg/L; C = 7.5 mg/L; D = 15 mg/L; E = 30 mg/L; F = 125 mg/L (dead daphnid). All daphnids shown are 21 days old and eggs are visible in their brood pouches (green circles). Note the darkening of the digestive tract from A (normal greenish color) to D with increased ingestion of nano-iron particles (black arrows). Antennae become clogged with nano-iron in E and F (blue arrows). The 24 and 48 hour mortality curve is shown on the right.

Novinky ... stresová biologie



Maternal predator-exposure has lifelong consequences for offspring learning in threespined sticklebacks



Daniel P. Roche, Katie E. McGhee*
and Alison M. Bell

*School of Integrative Biology, University of Illinois, Urbana,
IL 61801, USA*

**Author for correspondence (kemcghee@illinois.edu).*

Koljušky (ryby), které byly
v době kladení vajíček ve stresu (predátor)

→ Snížená schopnost učení u potomků

! Transgenerační přenos

Table 1. Behaviours (mean \pm s.e.) of the offspring from the maternal treatments.

	offspring of predator-exposed mothers (s)	offspring of unexposed mothers (s)
initial exploratory behaviour (day 1: 09.00):		
latency to first begin moving	49 \pm 30	56 \pm 20
latency to enter either chamber for the first time	330 \pm 70	326 \pm 78
learning the colour association:		
day 1 (09.00): latency to find food reward	426 \pm 65	427 \pm 61
day 3 (09.00): latency to find food reward	533 \pm 48	304 \pm 74
day 5 (09.00): latency to find food reward	337 \pm 61	158 \pm 68



LETTER

Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress

Abstract

Sperm cells are highly vulnerable to free radicals, and sperm quality and male fertility are critically affected by oxidative stress. Recently, sexual ornaments, particularly carotenoid-based colourful traits, have been proposed to depend on a male's capacity to resist oxidative stress, and thus to signal sperm quality. We conducted an experimental test of this hypothesis on great tits *Parus major*, in which adults are sexually dichromatic in carotenoid-based breast plumage. We report the first evidence that ornaments and sperm quality may be linked through oxidative stress. When experimentally subjected to oxidative stress resulting from increased workload, less colourful males suffered a greater reduction in sperm motility and swimming ability, and increased levels of sperm lipid peroxidation compared to more colourful males. Moreover, the level of sperm lipid peroxidation was negatively correlated with sperm quality. Finally, carotenoid supplementation increased sperm quality of less colourful males, suggesting that pale males are deficient in carotenoid antioxidants.

Fabrice Helfenstein,^{1*} Sylvain Losdat,¹ Anders Pape Møller,^{2,3} Jonathan D. Blount⁴ and Heinz Richner¹

¹Evolutionary Ecology Group, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, Baltzerstrasse 6, CH-3012 Bern, Switzerland

²Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, Bâtiment 362, F-91405 Orsay Cedex, France

³Center for Advanced Study, Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA



Barevnější samci sýkor

→Atraktivnější pro samice ...

→Lepší kvalita spermatu (karotenoidy brání proti oxidativnímu poškození)

- Pesticidy – registrace před použitím
- Povinné testy účinků na včely
 - Odvození bezpečného dávkování pro použití
- Nově zjištěné problémy
 - Jak se projeví „bezpečné koncentrace“ více pesticidů, pokud budou působit současně ?
 - Jak se projeví u jiných druhů opylovačů než u včel ?



Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees

Richard J. Gill, Oscar Ramos-Rodriguez & Nigel E. Raine

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding authors](#)

Nature 000 (2012) | doi:10.1038/nature11585

Received 19 April 2012 | Accepted 13 September 2012 | Published online 21 October 2012

- **Čmeláci a pesticidy**
 - Velice významní opylovači
 - Specifická biologie oproti včelám
 - kolonie s velmi malým počtem jedinců
 - Současné aplikace různých pesticidů na sousedních polích
 - V praxi není koordinace mezi farmáři: koexpozice





Figure 1 | A complex exposure landscape. In a typical agricultural setting, different crops may be sprayed with different pesticides at different times and doses. Bees will obtain food both from these crops and from wild plants, which makes it difficult to estimate their overall exposure to chemicals. Furthermore, bees returning to the colony after foraging may pass on the pesticides as they feed larvae. In an attempt to partially mimic this exposure complexity, Gill *et al.*¹⁰ placed pesticide-laden feeders and filter paper (not shown) at the entrance to boxed colonies of bumblebees, which could also access flowers on crops and wild plants in the wider landscape. The researchers measured the effect of these added pesticides at both the individual-bee and colony level.

Vliv pesticidů na čmeláky – polní studie: aplikovány povolené dávky

- 2 individuální látky „I“ a „LC“
- současná expozice „M“ (mixed)

**Celkové ztráty
dělnic
V průběhu
experimentu**

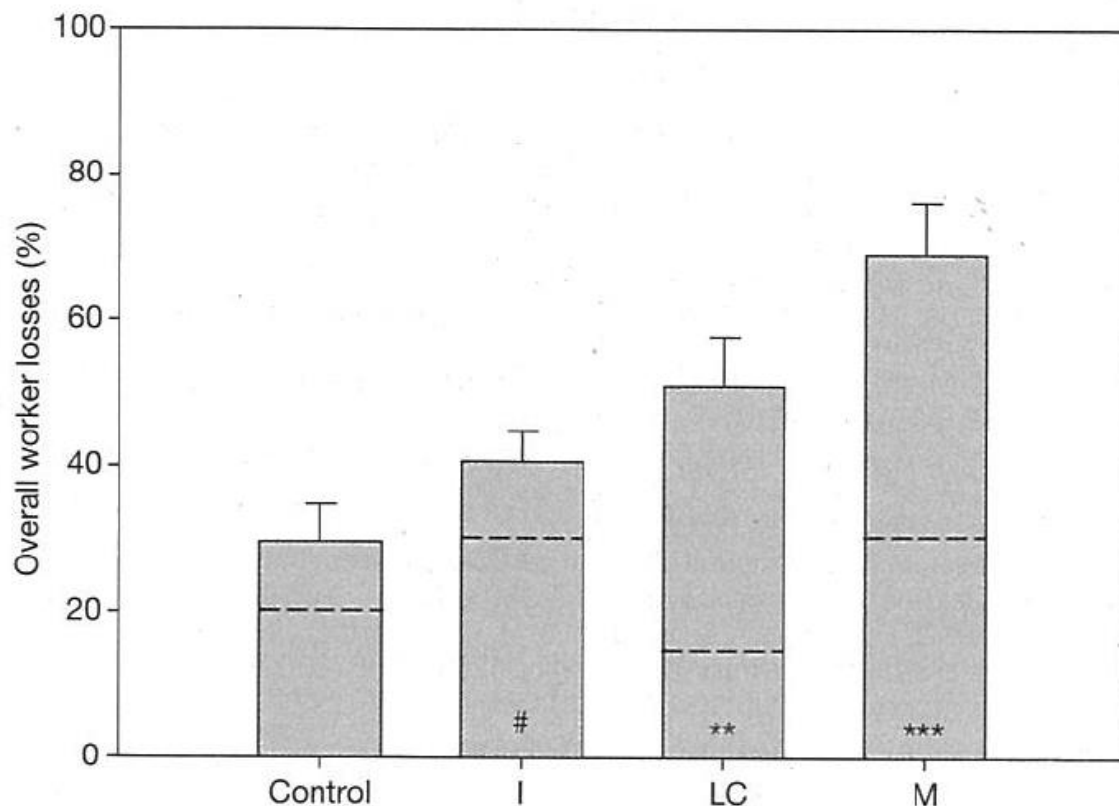


Figure 3 | Overall worker losses. Mean (\pm s.e.m.) overall percentage of workers lost per colony, including workers lost outside (below the dashed line) and worker mortality (dead workers found in nest box; above the dashed line), during the 4-week experiment. $n = 40$ colonies. # $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (comparison with control).



- Vliv pesticidů na čmeláky – polní studie: aplikovány povolené dávky**
- 2 individuální látky „I“ a „LC“
 - současná expozice „M“ (mixed)

Table 1 | Summary of observed pesticide effects for each treatment group (I, LC or M) in comparison to the control group

Effect level	Effect type	I	LC	M
Effects on individual behaviour	Number of foragers	+	ND	+
	Foraging bout frequency	ND	ND	–
	Amount of pollen collected	–	ND	–
	Duration of pollen foraging bouts	+	ND	+
Effects at colony level	Worker production	–	ND	–
	Brood number	–	ND	–
	Nest structure mass	ND	ND	ND
	Worker mortality	ND	+	+
	Worker loss	+	–	+
	Worker mortality & loss	ND	+	+
	Colony failure (<i>n</i> failed/ <i>n</i> survived)	0/10	0/10	2/8

Significant decrease (–), significant increase (+) and no detected effect (ND) at the 5% significance level.

