

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Téma:

**VYUŽITÍ NIŽŠÍCH ORGANISMŮ PRO TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ
AKTIVITY**

Podtéma: Testování endokrinní aktivity pomocí nižších organismů

Diplomová práce



Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2007

Hana Váňová

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci použila jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Hana Váňová

Chtěla bych poděkovat Mgr. Jitce Vytlačilové za pomoc při vypracování této diplomové práce, za veškeré rady a připomínky.

Hana Váňová

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 1.1. Cíl práce..... | 2 |
| 2. METODY TESTOVÁNÍ | 3 |
| 2.1. Alternativní metody testování..... | 4 |
| 2.1.1. Testování na nižších organizmech dle mezinárodních norem | 5 |
| 2.1.1.1. Bakterie..... | 6 |
| 2.1.1.2. Rostliny | 7 |
| 2.1.1.3. Bezobratlí..... | 8 |
| 2.1.2. Odhad toxicity chemických látek výpočtem - metoda QSAR..... | 10 |
| 3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA | 12 |
| 3.1. Endokrinní aktivita hormonů..... | 13 |
| 3.2. Endokrinní systém bezobratlých | 15 |
| 3.2.1. Kmen: CNIDARIA (ŽAHAVCI)..... | 16 |
| 3.2.2. Kmen: ANNELIDA (KROUŽKOVCI)..... | 16 |
| 3.2.3. Kmen: ARTHROPODA (ČLENOVCI)..... | 17 |
| 3.2.4. Kmen: MOLLUSCA (MĚKKÝŠI)..... | 19 |
| 3.2.5. Kmen: ECHINODERMATA (OSTNOKOŽCI) | 20 |
| 3.3. Endokrinně aktivní látky | 21 |
| 3.3.1. Humánní a veterinární léky | 23 |
| 3.3.2. Halogenované uhlovodíky | 25 |
| 3.3.3. Organocíny | 27 |
| 3.3.4. Polycyklické aromatické uhlovodíky, PAH | 28 |
| 3.3.5. Pesticidy, insekticidy | 29 |
| 3.3.6. Průmyslové chemikálie..... | 33 |
| 4. TESTOVÁNÍ ENDOKRINNĚ AKTIVNÍCH LÁTEK NA NIŽŠÍCH ORGANIZMECH | 35 |
| 4.1. Testování na bezobratlých | 37 |
| 4.1.1. Kmen: PORIFERA (HOUBOVCI)..... | 38 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2. Kmen: CNIDARIA (ŽAHAVCI)..... | 38 |
| 4.1.3. Kmen: ANNELIDA (KROUŽKOVCI)..... | 39 |
| 4.1.4. Kmen: ARTHROPODA (ČLENOVCI)..... | 40 |
| 4.1.5. Kmen: MOLLUSCA (MĚKKÝŠI)..... | 49 |
| 4.1.6. Kmen: ECHINODERMATA (OSTNOKOŽCI)..... | 53 |
| 4.2. Rostliny použité pro testování..... | 54 |
| 4.2.1. Oddělení: CHLOROPHYTA (ZELENÉ ROSTLINY) | 54 |
| 4.2.2. Oddělení: CHROMOPHYTA (CHROMOFYTA) | 54 |
| 5. VYUŽITÍ NIŽŠÍCH ORGANIZMŮ PRO TESTOVÁNÍ LÉČIV..... | 55 |
| 5.1. Chronické testy toxicity..... | 59 |
| 6. DISKUZE A ZÁVĚR..... | 82 |
| 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 88 |
| 8. REJSTŘÍK ZKRATEK..... | 98 |
| 9. ABSTRAKT A SUMMARY..... | 101 |

1. ÚVOD

Bezobratlí jsou využíváni jak v potravinářském průmyslu a v zemědělství, tak i pro testování. Reprezentují přes 95% všech živočichů a vyskytují se všude (www.epa.gov).

Testování bezobratlých je důležité hned z několika důvodů. Jsou potravou celé řady dalších zvířat a sami přenášejí a metabolizují energii z trofických systémů rostlinné a živočišné říše. Jejich výskyt se rapidně snižuje a to souvisí hlavně s nepříznivým ovlivňováním různými chemikáliemi, kterými je prostředí kontaminováno. Byla identifikována celá řada nepříznivých vlivů, k nimž patří: mutagenita, teratogenita, kancerogenita, vliv na růst, genotoxicita, cytotoxicita, nefrotoxicita, vliv na reprodukci, endokrinní systém a mnohé další (Knight, D. J., 2003), (Thompson, C., 2005). Jsou užitečná pro předvídání a ukazování potenciálních rizik chemikálií, které narušují endokrinní systém obratlovců, neboli endokrinních disruptorů (EDC). Účinek chemikálií narušujících tuto soustavu obratlovců je podobný nebo shodný jako u bezobratlých druhů. Navíc jsou bezobratlí na tyto látky více citliví a dříve se u nich projeví nepříznivý účinek než u obratlovců (DeFour, P., 2004).

U EDC je základní otázkou zda a do jaké míry mohou působit na člověka a na zvířata žijící volně v přírodě. Není pochyb o tom, že tyto látky zasahují do endokrinního systému a vedou k abnormálnímu vývoji, poruchám při reprodukci a působí kancerogenně. Byla provedena celá řada testů, které měly ohodnotit efekty EDC. Tyto účinky byly potvrzeny v různých životních stupních, ale skutečné důsledky pro přirozenou populaci jsou stále diskutovány a testovány. Nejčastěji se sledují efekty na volně žijících zvířatech v přírodě, včetně reprodukčních a imunologických efektů u mořských savců, které jsou vystavené EDC, především organochlorinům DDE a PCB. Nejlépe byly prostudovány a zhodnoceny účinky estrogenů a xenoestrogenních látek na rybách a imposex u mořských měkkýšů vystavených trojaninům. Stále ale není jasné jaké mají tyto a jiné endokrinně podezřelé látky vliv na další organizmy (Daston, G. P. et al., 2003).

U bezobratlých druhů komerčně využívaných je navíc toto testování důležité i z ekologického a ekonomického hlediska. Svůj význam mají i při screeningovém testování (DeFour, P., 2004). Výhoda při testování spočívá především v tom, že jsou snadno přizpůsobitelní laboratorním podmínkám (www.epa.gov). To zahrnuje jednoduchou manipulaci, snadnou a krátkou dobu kultivace, snadnou a rychlou reprodukci nových jedinců a nevztahují se na ně žádná regulační ani legislativní opatření (DeFour, P., 2004).

1.1. Cíl práce

Cílem mojí práce bylo nashromáždit co nejvíce informací k zadanému tématu, které se týká využití nižších organismů používaných pro alternativní testování chemických a jiných látek a sledovat jejich vzájemný vztah mezi testovanou látkou a odpovědí organismu na tuto substanci (neboli biologickou aktivitu). Při hlubším ponoření se do dané problematiky a při vyhledávání podkladů pro sestavování této práce jsem zjistila, že by bylo velmi těžké obsáhnout celou tuto oblast a dobře jí porozumět, a proto jsem se souhlasem mojí školitelky zaměřit jen na jednu část. Vybrala jsem si sledování účinků chemických látek na endokrinní systém nižších organismů. Je to velmi aktuální otázka v dnešní době a byla prokázána celá řada nepříznivých účinků nejen na lidský organizmus, ale i na celé životní prostředí. Kromě chemických látek mohou mít na životní prostředí nepříznivý vliv i léky. Biologická aktivita těchto preparátů vyplývá již z jejich účinků na lidský organizmus a proto se předpokládá, že budou působit i na prostředí. Krátce jsem se o nich zmínila v páté kapitole.

2. METODY TESTOVÁNÍ

Existuje celá řada přístupů pro ohodnocení rizik chemikálií na životní prostředí a na lidský organizmus. Pro otestování endokrinně aktivních látek jsou zahrnuty tyto metody testování:

- Metody *in vivo* (testování na rybách, krysách, žábách a dalších laboratorních zvířatech)
Tyto metody se setkávají s konfliktem potřeby snižovat testování na zvířatech
- Metody *in silico* (QSAR)
Počítačové modely jsou užitečné pro urychlení screeningu a napomáhají snížit potřebu zvířat pro testování chemických látek
- Metody *in vitro* (buněčné kultury, tkáňové kultury, testy na nižších organizmech)

Podle OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) je testování rozděleno do pěti úrovní od jednoduchých metod jako je QSAR až k testům zahrnujícím vývojové, reprodukční a multigenerační testy. Testování bezobratlých organismů patří do úrovně 5 a zahrnuje data o účincích chemikálií na endokrinní a další systémy v živém organismu. Hlavním úkolem není zjištění mechanismů účinku, ale vyšetřování nepříznivých vlivů chemických substancí na biotu.

Úroveň 1: třídění a upřednostňování založené na dostupných informacích (fyzikálně-chemické vlastnosti: molární hmotnost, reaktivita, těkavost, biodegradace, expozice chemické látky lidem a přírodě: objem produkce chemikálií, únik chemikálie do prostředí, vzorkování, riziko: dostupná toxikologická data)

Úroveň 2: zkoušky in vitro poskytující mechanická data (transkripční aktivita, vazebná aktivita ER, AR, TR receptorů, vznik aromatáz a steroidů in vitro, QSAR,...)

Úroveň 3: zkoušky in vivo poskytující data o jednoduchých mechanismech týkajících se biologické aktivity (zkoušky na rybách, zkoušky týkající se uvolnění estrogenů a androgenů, ovlivnění hormonálního systému jinou cestou než přes receptory)

Úroveň 4: zkoušky in vivo poskytující data o složitějších mechanismech týkající se biologické aktivity (testy na nedospělých samcích a samicích, testy na dospělých, rybí histopatologický test gonád, testy na metamorfózách žab)

Úroveň 5: zkoušky in vivo poskytující data o nepříznivých účincích z endokrinních a jiných mechanismů pro (testy probíhající v jedné generaci, testy probíhající ve dvou generacích, reprodukční screeningový test, kombinovaný 28-denní reprodukční screeningový test, vývoj a reprodukce části či celého životního cyklu ryb, ptáků, obojživelníků a bezobratlých) (Gourmelon, A., 2007)

2.1. Alternativní metody testování

Technika, která nahradí použití zvířat, redukuje potřebu zvířat zvláštním testováním nebo obměňuje existující techniky tak, aby bylo redukováno množství a trápení laboratorních zvířat. V toxikologickém testování tento pojem znamená nahrazení jednoho či více zvířecích druhů patřících k obratlovcům druhy bezobratlými (Lagadic, L., 1998).

Těmito alternativními metodami a jejich realizací se zabývá nová právní norma EU REACH, která vychází z koncepce 3R. Tuto koncepci poprvé vyslovili Russell a Burch a jejím hlavním cílem je redukovat potřebu obratlovců pro testování použitím jiných kvalitních pracovních postupů. Tato koncepce zahrnuje tři odlišné kategorie alternativních testů, které jsou označeny třemi termíny:

- Alternativa zmírnění (refinement)

Tyto metody mají zajistit při testování laboratorních zvířat, aby byly vystaveny co nejmenší bolesti a stresu a aby výsledek těchto testů poskytl co nejvíce informací.

- Alternativa snížení počtu (reduction)

Tento okruh testů se týká použití co nejmenšího počtu zvířat a zároveň získání co možná nejvíce důležitých výsledků. Látka by měla být otestována jednou a zaregistrována a nezkoušena několikrát.

- Alternativa náhrady (replacement)

U těchto metod je snaha nahradit celé organizmy jen jejich určitou významnou částí. Příkladem jsou tkáňové a buněčné kultury či orgány pro *in vitro* studie, které ale vyžadují zabití zvířete.

Alternativní metody jsou upřednostňovány i z etického a morálního hlediska. Hlavním cílem testování na zvířatech je ochránit lidské zdraví a zároveň chránit i zvířata žijící volně v přírodě (Knight, D., 2003). Zjistilo se navíc, že tato náhrada je mnohem lepší alternativou testování. Řadí se k nim v dnešní době především metody *in vitro*, kam patří testy na mikroorganismech, kultivovaných buňkách či tkáních. Dále se k nim řadí testy, které pro stanovení využívají nižší organizmy a matematické modelování (QSAR modely). Použití bezobratlých pro testování obvykle znamená menší společenský zájem než užití savců, ptáků či ryb a proto dostali zvláštní pozornost (Lagadic, L., 1998).

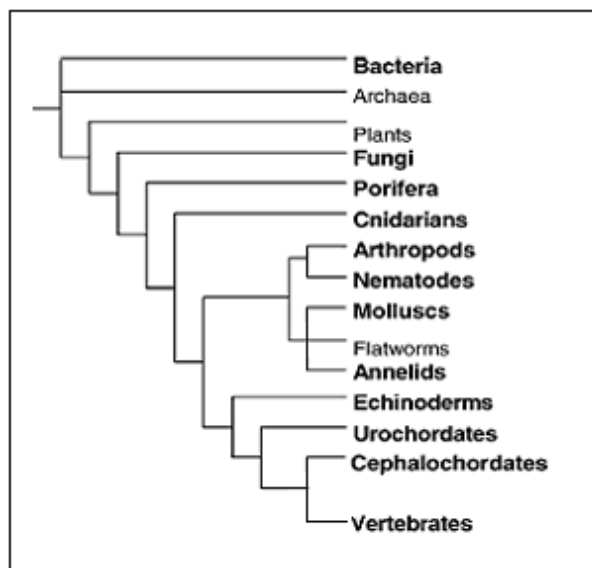
Rozlišujeme dva druhy testování: screeningové a vlastní testování. **Screeningové testy** se užívají u těch chemikálií, o kterých nemáme žádné informace, hodnotí se jejich dávkové a odezвовé vztahy, především jejich vliv na vývoj a reprodukci. Cílem **vlastního testování látek**, které jsou dobře charakterizovány, je určit zda chemická látka či směs je příčinou porušení endokrinní soustavy a odhalit důsledky jaké tyto látky mají na vnímavé organizmy (to je podrobněji popsáno v kapitole 4) (www.epa.gov).

Obecně se pro stanovování endokrinně aktivních látek používají **chronické testy**, protože porušení hormonální rovnováhy v organizmech a jejich negativní důsledky vznikají dlouhodobým procesem. Navíc vhodné koncové parametry, kterými jsou ohodnoceny účinky endokrinně aktivních látek a jejich rizika nelze u většiny z nich pozorovat v testech akutní toxicity. Nicméně při testování neznámé látky nebo při neznalosti vztahu koncentrace/účinek se jako první krok používají **akutní testy toxicity**. Provede se s několika různými koncentracemi testované látky, z výsledků se vytvoří křivka koncentrace/odpověď a teprve podle ní se vyberou vhodné koncentrace pro chronické testy (Čížková, M., 2005).

2.1.1. Testování na nižších organizmech dle mezinárodních norem

Pro testování je využívána celá řada nižších organismů (to ukazuje obr. 1), ale jen malá část testů je již validována a standardizována. Aktuální rozsah OECD směrnic pro testování nižších organismů je zaměřen na toxikologické testy. U bezobratlých je důraz kladen především na vývoj a reprodukci, které slouží jako endpointy (Gourmelon, A., 2007).

Obr.1.: Systematické rozdělení nižších organismů, které se používají pro testování (Fox, J., 2005)



2.1.1.1. Bakterie

Jako ekologické indikátory se užívají v testech:

OECD/ISO testy transformace uhlíku/mineralizace (C-min) a látek vyvolávající dýchání (SIR)

V tomto testu se sledují efekty jednotlivých chemikálií na funkce půdních mikroorganismů.

Zkoušejí se na nich fungicidy, uhlovodíky a trinitrotoluen.

OECD/ISO testy mineralizace dusíku (N-min)

Normální funkcí bakterií je i nitrifikace, tato schopnost může být ovlivněna látkami kontaminujícími půdu. Zkouší se na nich splašky z kanalizačních odpadů, které mohou být kontaminovány těžkými kovy a polychlorovanými bifenoly.

Jako biosenzory jsou využívány:

OECD Amesův test

Využívá se pro testování mutagenních a kancerogenních látek. Testovaný organismus je *Salmonella typhimurium*, která má v sobě zabudovaný mutagenní gen pro syntézu histidinu. Díky této modifikaci není salmonela schopná vlastní syntézy histidinu. Aby mohla žít musí jí být tato aminokyselina dodávána v živném médiu. Toho se s výhodou využívá

při testování mutagenních a kancerogenních látek, které jsou schopny tento zmutovaný gen opět pozměnit a salmonela je schopná si histidin syntetizovat opět sama.

ISO návrh microtox testu toxicity

Tento test využívá *Vibrio fischeri* a další podobné luminiscenční bakterie, které se používají pro odhad toxicity odebraných vzorků z prostředí (Thompson, C., 2005).

2.1.1.2. Rostliny

Akutní testy toxicity:

OECD testování růstu řas

Tyto testy využívají dva sladkovodní *Scenedesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata* a jeden mořský druh *Skeletonem costatum* (Knight, D., 2003). Jsou na nich testovány vody kontaminované polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH), těžkými kovy a pesticidy (Thompson, C., 2005). Chemikálie jsou v odstupňovaných koncentracích smíchány s řasovou kulturou a sleduje se vliv na jejich růst. Délka testu je podle testovaného druhu 72 nebo 96 hodin.

Chronické testy toxicity:

OECD testování růstu řas

Testování probíhá se stejnými druhy jak bylo již uvedeno u akutních testů, ale zde se sleduje vliv chemikálií na dělení řasových buněk (reprodukce) (Knight, D., 2003).

Navrhovaný inhibiční růstový test OECD a ISO používající Lemma sp.

Je využívána vodní rostlina *Lemma sp.* pro otestování půdních roztoků a extraktů (Thompson, C., 2005). Testování probíhá 7-14 dní (Knight, D., 2003).

Ani k jedné kategorii nelze začlenit test na pozemských rostlinách:

OECD/ISO testování vzházení semínek, růstu a vegetativního rozmnožování

Díky jejich vlastnostem (interagují úzce se složkami půdy, mají bohatý kořenový systém, který je v symbióze s nitrifikačními bakteriemi, rostou i v místech kontaminovaných chemikáliemi a jsou statické) jsou dobrými kandidáty pro testování. Jsou využívány jednoděložné i dvouděložné rostliny a jsou na nich zkoušeny chemické látky obsahující uhlovodíky (Thompson, C., 2005).

2.1.1.3. Bezobratlí

Akutní testy toxicity:

OECD imobilizační test s Dafnií a mořským druhem Acartia tonsa

Pro sledování inhibice růstu je využívána sladkovodní *Daphnia magna* (mořským ekvivalentem je *Acartia tonsa*). Jsou to 24 hodin staré dafni získané z partenogenetické kultury, které jsou nejvíce citlivé k vystavení chemickým látkám. V každé nádobě je jiná koncentrace chemické látky a v ní obsaženo 10 dafnií. Podmínky testu jsou 8 hodin světlo, 8 hodin tma a průtokové podmínky. Test trvá 48 hod a hodnotí se vliv různých koncentrací na jejich růst (EC₅₀) (Knight, D., 2003).

Chronické testy toxicity:

OECD 202 reprodukční test na Dafnií

Pro dafnie již existuje zkušební směrnice reprodukčního testu (TG 211). Pro testovaný organismus *Daphnia magna* je navrženo třítydenní (21 dní) vystavení chemické látky v průtokových podmínkách. Konečné výsledky zahrnují časový úsek od generace samic F0 až po narození prvního potomstva (generaci F1). V celkovém hodnocení jsou obsaženy údaje o délce samic generace F0, celkové množství vyprodukovaného potomstva těmito samicemi, včetně jejich délky a celková úmrtnost. Jedná se o alternativní způsob testování odhadu chronických účinků na porušení endokrinní funkce v pohlavní reprodukci, využívající populace dafnií skládající se z partenogenetických samic (Hutchinson, T., 2000a).

Uvažuje se o přidání dvou nových endpointů k již existující směrnici:

- poměr pohlaví v potomstvu (vlivem porušení endokrinního systému je převaha samců)
Pohlaví se určuje podle délky a morfologie prvních tykadel.
- inhibice svlékání pokožky působením chemikálií na ekdysteroidní systém

Testy toxicity v sedimentu:

OECD TG 218 – 219 navržený rozšířený pakomáří test.

Rozšířený test na pakomárovi *Chironomus riparius* zahrnuje i reprodukční fázi a délka trvání testu je 45 dní. Hodnotí se počet nakladených vajíček, fertilita a životaschopnost potomstva (Gourmelon, A., 2007). Pakomár *Chironomus riparius* byl ve vývojovém a reprodukčním testu vystaven **ftalátům** a dalším důležitým látkám z třídy průmyslových chemikálií, které

mají endokrinní aktivitu a byla u něj prokázán vliv na endokrinní systém (Hutchinson, T., 2000a). Jako dva základní koncové body (endpointy) jsou brány deformace úst a vliv na životní reprodukční cyklus .

OECD a ISO navržený reprodukční test na žížalách

Žížaly jsou vhodné organizmy pro testování díky jejich citlivosti na antropogenní zásah do půdy. Jsou na nich sledovány letální i subletální koncentrace chemikálií a hodnotí se vliv na reprodukci, růst, vývoj a chování. Jsou na zkoušeny především půdy kontaminované těžkými kovy. Druhy doporučené pro testování jsou *Eisenia fetida*, *Lumbriculus rubellus*, *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbriculus terrestris* a *Eudrilus eugeniae* (Thompson, C., 2005).

Další navrhované testy

Zkušební protokol bezobratlého druhu *Americamysis bahia* zahrnuje 6-ti týdenní vystavení chemické látky v průtokových podmínkách. Jsou sledovány účinky na první potomstvo, u nich se určuje pohlaví a jejich poměr, délka těl samců a samic a celkové množství mladých, které se narodilo jedné samici. Výsledky tohoto testu zahrnují také účinky na F1 generaci, zde se hodnotí množství, délka těla a celková úmrtnost samců a samic (Hutchinson, T., 2000a).

2.1.2. Odhad toxicity chemických látek výpočtem - metoda QSAR

Vedle laboratorního testování existuje ještě jedna velmi důležitá metoda, kterou lze určit, které chemické substance budou mít pravděpodobně efekt na endokrinní systém. Jedná se o metodu QSAR (Daston, G., 2003). Tato metoda je dobrým pomocníkem pro prioritizaci sloučenin s největšími riziky pro životní prostředí a může ohodnotit další sloučeniny, které budou mít tento efekt také (www.soci.org). Její použití má význam u látek, u kterých jsou dobře známy fyzikálně-chemické parametry, chemická identita a základní chemické vlastnosti. Substance zařazené do modelování jsou odebrány ze vzduchu, vody a půdy (www.epa.gov).

QSAR spojuje dohromady *objemnost chemické struktury a její aktivitu*, tzn., že biologická aktivita molekuly je závislá na její objemnosti, na přítomnosti funkčních skupin, na skeletu molekuly, na molekulové hmotnosti a na mnoha dalších parametrech. Biologická aktivita může být vyjádřena i čísly a tvořit matematický vztah.

Kvantita molekuly ve vztahu k její biologické aktivitě je vyjádřena číselně-matematickým vzorcem takto:

$$\text{Aktivita} = f(\text{fyzikálně-chemické vlastnosti a/nebo vlastnosti struktury molekuly})$$

Tento matematický vztah může být použit i pro další chemické struktury a odvodit od nich jejich biologickou aktivitu. Základní předpoklad pro realizaci této metody je, že podobné molekuly mají podobnou biologickou aktivitu. Tento princip se také nazývá *Structure-Activity Relationship (SAR)*. Problém je ale v tom, že existuje celá řada druhů aktivit, které molekuly mohou mít. Dále existuje celá řada různých parametrů, kterými se od sebe jednotlivé molekuly mohou lišit jako je reaktivita, biotransformace, rozpustnost, cílová aktivita a mnohé další (Richon, A., 1997). Tyto malé rozdíly a odchylky v aktivitě nemůžeme však číselně vyjádřit, proto je nezbytně nutné vycházet z co možná nejvíce informací a dat o chemické látce a teprve potom se snažit vytvořit hypotézu. Z toho vyplývá, že nemůžeme hodnotit jen chemickou strukturu ve vztahu k biologické aktivitě, ale musíme zohlednit celou řadu dalších vlastností substance (en.wikipedia.org).

Statistické vyhodnocení

V chemických výpočtech jsou jednotlivé molekulové struktury vyjádřeny jako číselné modely a ty mají utvářet jejich chování s hmotou a zároveň být v souladu s klasickou fyzikou. Dostupné počítačové programy umožní vědcům jednoduše získat a prezentovat data

o molekule, které zahrnují geometrické, energetické a přidružené vlastnosti (elektrický stav molekuly, spektrofotometrické vlastnosti a hmotnost). Pro zobrazení těchto dat a pro jejich lepší práci s nimi byla vytvořena tabulka, ve které sloučeniny jsou v jednotlivých řadách a vlastnosti molekul jsou definovány v přidružených sloupcích.

Metoda QSAR se snaží najít shodné vztahy mezi změnou v hodnotách molekulových vlastností a biologickou aktivitou pro sérii sloučenin tak, že tyto pravidla mohou být použity pro posouzení aktivity nových chemických entit.

Obecně pro výpočet biologické aktivity je definována rovnice 1.řádu, která má tvar:

$$\text{Biologická aktivita} = \text{Konst.} + (C_1 \bullet P_1) + (C_2 \bullet P_2) + (C_3 \bullet P_3) + \dots$$

kde parametry P_1 až P_n jsou vypočítány pro každou molekulu v sérii a koeficienty C_1 až C_n podávají informaci o každé změně v parametrech a v biologické aktivitě (Richon, A., 1997).

3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA

Biologicky aktivní látky zasahují do životních funkcí organismů. Podle Paracelsa je s výjimkou vody a vzduchu svým způsobem biologicky aktivní každá látka, závisí jen na dávkování. Nejdůležitější biologicky aktivní látky lze rozdělit do několika skupin:

- léčiva
- pesticidy
- bojové chemické látky
- jedy
- drogy

Nejčastější příčinou biologické aktivity chemických látek je zásah do biochemických pochodů živých organismů, který je zprostředkován interakcemi chemických látek s některými biomakromolekulami. Tato interakce může spočívat např. v inhibici nebo aktivaci některých enzymů. Jiným velmi významným dějem je interakce mezi receptory. Setkáváme se i s látkami, jejichž toxický účinek spočívá v ovlivnění průniků látek do buněk. Jsou to buď látky přímo integrující s iontovými kanály buněk (zvláště u významných jedů), nebo látky ohrožující iontové hospodaření buněk tvorbou falešných iontových kanálů (např. u některých peptidových antibiotik a antimykoticky aktivních sloučenin).

Biologicky aktivní látky mohou zasahovat i do koordinačních funkcí uvnitř vyšších organismů (např. u herbicidů). Dalšími cílovými makromolekulami chemických látek mohou být nukleové kyseliny, proteiny tvořící cytoskelet buňky, membránové proteiny, buněčné organely apod., které mohou být chemickými zásahy poškozovány (Waisser, K., 2004).

Měření biologické aktivity je reprezentováno výzkumem, který je jediným informačním pramenem o interakci léků s biosystémem. Kvalita informací je závislá na složitosti biosystému a na vzdálenosti cesty mezi modifikací příjemce (organismus) a měřeným signálem. Prvořadá odpověď se uskutečňuje v blízkosti receptoru a je přímo spojená s modifikací příjemce. Všechny další efekty jsou zprostředkované a jejich vztahy k vazbě na receptory mohou být komplikovanější. Záleží také na tom, zda upravené receptory jsou receptory endogenních bioaktivních činitelů jako jsou hormony či ne. Vzájemné ovlivňování léků s receptory často spustí široký proces, který může mít za následek komplikovaný vztah mezi modifikací příjemce a biologickou odezvou (Baláž, Š., 1990).

3.1. Endokrinní aktivita hormonů

Endokrinní soustava spolu s nervovým a imunitním systémem tvoří hlavní regulační mechanismus, který ovládá různé rozhodující funkce v lidském či zvířecím organismu. Poslové v endokrinní soustavě jsou hormony, které jsou syntetizované a vylučované ve velmi nízkých koncentracích ze specializovaných žláz a přepravované k cílovým orgánům krví (Lintelmann, J., 2003).

Pocházejí buď z endokrinních žláz (glandulární hormony, jako kortizon nebo tyroxin), nebo z nervových buněk (neurosekretorické hormony, jako adiuretin nebo hypotalamické liberiny). V širším slova smyslu mezi hormony patří i tzv. poslové (messengery) – endogenní látky, které ovlivňují buňky v okolí svého vzniku (parakrinní účinek) a k cílovému místu svého účinku se dostávají s extracelulární tekutinou (tkáňové hormony a mediátory, např. prostaglandiny, leukotrieny) (Lüllmann, H., 2004). Hormony ovlivňují několik základních regulačních, růstových, vývojových a homeostatických mechanismů jakými jsou reprodukce, udržení normální hladiny cukru nebo iontů v krvi, krevní tlak, výměnu látek a další svalové a nervové funkce systému. Jako příklad můžeme uvést adrenalin, který pomáhá stimulovat tělesnou činnost nebo mužské a ženské hormony, testosteron a estrogen, které tvoří základ reprodukčním funkcím jakými jsou sexuální vývoj, růst a způsob chování (Lintelmann, J., 2003).

Můžeme je klasifikovat podle umístění jejich receptorů a podle povahy signálu nebo druhého posla, který působí při zprostředkování účinku hormonu uvnitř buňky do dvou skupin:

I. skupina: Hormony, které se vážou na intracelulární receptory

androgeny, kalcitriol, estrogeny, glukokortikoidy, mineralkortikoidy, gestageny (progestiny), hormony štítné žlázy (T_3 a T_4)

II. skupina: Hormony, které se vážou na receptory na povrchu buněk

- A. Druhým poslem je cAMP: adrenokortikotropní hormon, angiotensin, kalcitonin, folikuly-stimulující hormon, glukagon, parathormon, somatostatin,.....
- B. Druhým poslem je cGMP: atriový natriuretický faktor
- C. Druhým poslem je vápník nebo fosfatidylinositidy nebo obojí:
cholecystokinin, gastrin, gonadotropiny uvolňující hormon, oxytocin, vasopressin,...
- D. Intracelulární posel je neznámý: růstový hormon (GH, STH), insulin, prolaktin

Hormony I. skupiny jsou lipofilní a s výjimkou T_3 a T_4 jsou odvozeny z cholesterolu. Po sekreci se tyto hormony vážou na transportní proteiny. Tím se obchází problém jejich rozpustnosti v krvi a prodlužuje se jejich plasmatický poločas. Volný hormon snadno prochází plasmatickou membránou všech buněk a setká se se svými receptory v cytosolu nebo v jádře cílových buněk. Komplex ligand – receptor je patrně intracelulárním poslem v této skupině. II. hlavní skupina zahrnuje hormony rozpustné ve vodě, které se vážou na plasmatickou membránu cílové buňky. Hormony, jež se vážou na povrchu, komunikují s intracelulárními metabolickými procesy prostřednictvím intermediárních molekul, tzv. druhých poslů (hormon sám je přitom prvním poslem). Druzí poslové vznikají jako následek interakce ligand – receptor. Všechny receptory - ať pro polypeptidy nebo steroidy – mají nejméně dvě funkční domény. Rozpoznávací doména váže hormon a druhá oblast produkuje signál, který spojuje rozpoznávání hormonu s nějakou intracelulární funkcí. Spojení (převod signálu) se obecně děje dvěma cestami. Polypeptidové a proteinové hormony a katecholaminy se vážou na receptory umístěné v plasmatické membráně, a tak dají vznik signálu regulujícímu různé intracelulární funkce, často se to děje změnou aktivity nějakého enzymu. Interakce peptidových hormonů s jejich receptory vede k rozmanitým účinkům a navíc k regulaci exprese specifických genů. K těmto účinkům patří regulace iontové aktivity a aktivity iontových kanálů, aktivita intracelulárních proteinů a sekrece různých molekul. Tyto účinky jsou zprostředkovány druhými posly jako je cAMP, cGMP, Ca^{2+} a různé fosfatidylinositoly. Steroidní hormony a hormony štítné žlázy interagují s intracelulárními receptory a komplex hormon – receptor dává vznik signálu. Obecně platí, že komplex hormon – receptor se váže na specifické oblasti DNA, zvané hormonresponsivní elementy (HRE). Každý hormonální účinek, který zasahuje do regulace transkripce specifických genů, je zprostředkován specifickým HRE (Murray, R., 2002).

Rovnováha hormonů v organismu je základním předpokladem pro předejití funkčním poruchám. Ta je řízena centrálním nervovým systémem – hypofýza – cílové orgány, které umožní tělu reagovat velmi flexibilně na vnitřní či vnější hormonální změny. Tento komplexní systém je ale velmi citlivý na rušivé vlivy z vnějšího prostředí, které mohou porušit normální vývoj organismu (Lintelmann, J., 2003).

3.2. Endokrinní systém bezobratlých

Hormonální soustava vyšších živočichů je zpravidla složitá a složitě řízená, ale její složky lze v podstatě odvodit od základních typů, které se mohou vyskytovat i u živočichů s jednoduchou funkční organizací těla (Kubišta, V., 1979).

Nejnámější kmeny patřících k bezobratlým jsou **měkkýši, kroužkovci a členovci** (př. hmyz, korýši). Pro bezobratlé je charakteristické cyklické množení. Tyto cykly jsou upravené sexuálními hormony (steroidy, peptidy či terpenoidy) nebo mohou být řízeny různými činiteli prostředí, ke kterým patří: teplota, intenzita světla, vlhkost a potrava. Endokrinní soustava bezobratlých má také za úkol regulovat vývoj, růst, zrání, reprodukci a udržovat iontovou rovnováhu. Tímto systémem je regulováno i svlékání, produkce feromónů, pigment a změna zbarvení a metamorfózy (Lintelmann, J., 2003).

Náznamy endokrinní soustavy můžeme pozorovat již u žahavců, kde je tato soustava reprezentována sítí neuronů, u kroužkovců je zastoupena přítomností endokrinních buněk, měkkýši mají systém vnitřních žláz a endokrinní systém členovců je evolučně na nejvyšší úrovni. Složitost tohoto systému se odráží od centrálního nervového systému (CNS), který je zodpovědný za odezvy v cílovém orgánu. Podněty jsou zprostředkovány neurotransmitery nebo neurohormony, které produkuje a vysílá CNS. Obě tyto složky mohou pak působit přes endokrinní systém na cílové orgány či přímo v nich. Rozlišujeme dva hlavní druhy chemických posílů:

Neurotransmitery: mohou být rychlé či pomalé v závislosti na tom, zda spojení s iontovým kanálem je přímé nebo nepřímé (acetylcholin, glutamát), mají malou molekulovou hmotnost a u bezobratlých nejsou příliš rozmanité

Neurohormony: zahrnují bílkovinné a lipidové molekuly, které jsou seskupené do podobných struktur (steroidy, peptidy, terpenoidy), tyto posílů se během evoluce pozměňují a jsou buď specifické pro bezobratlé či mají souvislost s obratlovci.

Byla vyslovena hypotéza, že u bezobratlých je skupina hormonů, které jsou podobné funkčně k těm nalezeným u obratlovců a nebo jsou specificky pozměněné př. ekdysteroid, druhou skupinou hormonů jsou ty, které jsou strukturně podobné obratlovcům, ale mají odlišné funkce v organismu bezobratlých (Lafont, R., 2000a).

Vlastnosti endokrinní soustavy jednotlivých živočichů lze odvodit ze dvou hlavních evolučních základů: **protostomes** a **deuterostomes**. Houby a žahavci nelze přiřadit ani k jedné skupině, jsou evolučně nejstarší a jejich charakter endokrinní soustavy lze nalézt

u obou skupin. Významnější protostomes skupiny zahrnují: členovce, kroužkovce a měkkýše. K deuterostomes se řadí ostnokožci, ryby a obecně obratlovci. Toto rozdělení do dvou skupin souvisí i s hlavními rozdíly v endokrinních soustavách těchto organismů. Zatímco u protostomes skupin jsou fyziologické funkce řízeny neuropeptidy a u vývojově pokročilejších skupin mají důležitou roli i ekdysteroidy a terpenoidy, jsou u deuterostomes hlavními regulátory steroidní hormony (estrogeny, androgeny, progesterony) a terpenoidy. Ekdysteroidy zde nehrají žádnou roli (LeBlanc, G., 1999).

3.2.1. Kmen: CNIDARIA (ŽAHAVCI)

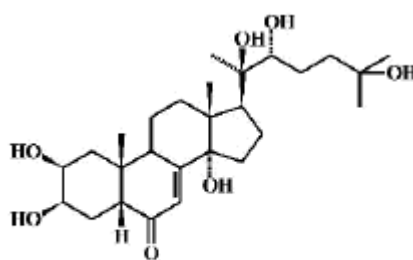
Žahavci nemají definované žlázy s vnitřní sekrecí, ale významným zdrojem signálů jsou **neurony** (Leitz, T., 2001). Jejich nervová soustava je ektodermálního původu a je rozptýlená po celém těle. Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně (Tarrant, A., 2005). Bylo identifikováno několik významnějších skupin, které se účastní regulačních funkcí: **katecholaminy a jejich prekurzory** (dopamin, adrenalin, norepinefrin), **serotoniny** a **γ -aminomáselná kyselina (GABA)** (Leitz, T., 2001), **organické sloučeniny s jódem, neuropeptidy** a **indolaminy** (Tarrant, A., 2005). Přestože jejich funkce nebyly zřetelně popsány, je možné, že serotonin ovlivňuje metamorfózu a GABA může ovlivňovat příjem potravy. Většina regulačních peptidů má funkci neuropeptidů a inhibují či stimulují svalové stažení polypovců a korálnatců (Leitz, T., 2001). Neuropeptidy mají zřejmě vliv na morfologické změny (posun hlavy či nožní formace). Byly zde objeveny i **steroidní hormony** - estrogeny (17- β estradiol), které se zdají být bioregulátory reprodukce (Tarrant, A., 2005).

3.2.2. Kmen: ANNELIDA (KROUŽKOVCI)

Všechny hormony identifikované u těchto organismů jsou **neuropeptidy**. Jsou vylučovány neurosekretorickými buňkami lokalizovanými v hlavové části (LeBlanc, G., 1999). U Parazitních druhů na zvířatech a lidech **červů** a **hlístic** jsou zastoupeny jak **steroidní** tak i **peptidové** a **terpenoidní hormony**. Tyto hormony řídí růst, vývoj, látkovou výměnu a další fyziologické funkce stejným způsobem jako u obratlovců. Jejich endokrinní soustava se skládá z neurokrinní soustavy, ale chybí u nich žlázy s vnitřním vyměšováním (DeFour, P., 2004).

3.2.3. Kmen: ARTHROPODA (ČLENOVCI)

K nejdůležitějším endokrinním regulátorům u členovců patří **ekdysonové** a **ekdysteroidní hormony**. Tyto hormony jsou zapojeny do embryoálního vývoje, svlékání, metamorfózy, reprodukce a tvorby pigmentu (Lintelmann, J., 2003). Ekdyson je steroidní hormon, funkčně i strukturálně podobný estrogeneru, který řídí růst a svlékání členovců. Jeho aktivní formou je 20-hydroxyekdyson (Mu, X., 2002):



20-Hydroxyekdyson

I když má svlékání klíčovou úlohu při vývoji korýšů a hmyzu je to stresující a zranitelná fáze, při které mohou být snáze napadeni predátorem, poškozeni či infikováni (Walker, A., 2005). Kromě ekdysteroidů sem patří i **juvenilní hormony hmyzu** a **metylfarnesoát korýšů**. Jsou to terpenoidy a jsou dalšími hlavními hormony, které zprostředkovávají různé regulační funkce (Lintelmann, J., 2003). Tyto organizmy mají soustavu žláz s vnitřním vyměšováním, od které je odvozena i endokrinní soustava u obratlovců (DeFour, P., 2004).

Endokrinní soustava hmyzu byla nejlépe popsána. Zahrnuje tři části: **neurosekretorické buňky**, **žlázy s vnitřní sekrecí** rozdělené do několika oddílů a **reprodukční orgány**. Jejich dva klíčové hormony jsou **ekdysteroidní** a **juvenilní hormony (JH)**.

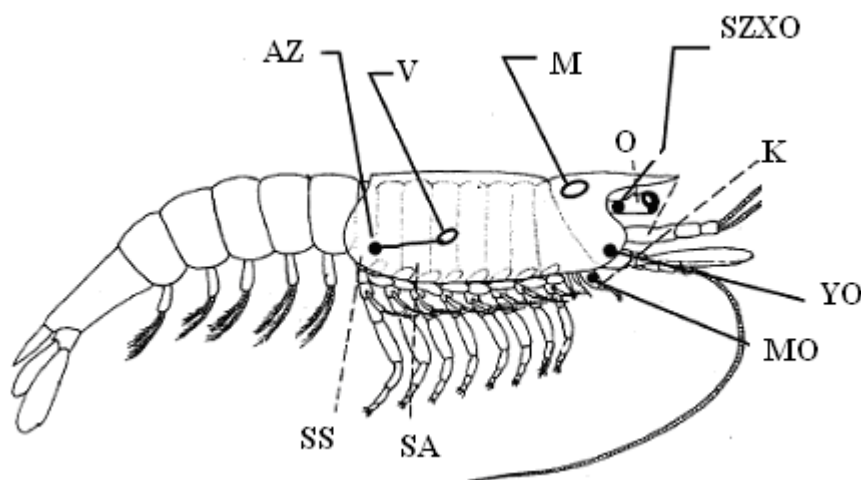
Ekdysteroidy jsou vylučovány žlázami s vnitřní sekrecí a jsou zapojeny do regulace růstu, vývoje a reprodukce.

Juvenilní hormony mají terpenoidní strukturu, jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí a řídí metamorfózu a reprodukci. Přítomnost či nepřítomnost těchto hormonů závisí na tom, v jaké fázi vývoje se hmyz nachází. Přítomnost JH a zároveň počáteční vzestup ekdysteroidů v larválním stádiu navodí svlékání a přestup do dalšího vývojového stádia (LeBlanc, G., 1999). Během finálního larválního vývoje úplně JH vymizí a naopak jsou produkovány ekdysony. Tento hormonální stav navodí metamorfózu. U hmyzu s proměnou

nedokonalou je tento vývojový proces konečným stádiem. U hmyzu s proměnou dokonalou se opět objeví JH a z larvy se stává kukla. U primitivnějšího hmyzu byly objeveny methylfarnesoát, JH I a JH II. U vývojově nejpokročilejšího hmyzu lze najít JH III a JH III bis epoxid (Lafont, 2000b).

Endokrinní soustava korýšů

Obr.2: Rozložení endokrinní soustavy korýšů, upraveno dle (Wollenberger, L., 2005)



AZ - androgenní žláza, K – kusadla, M – mozek, MO – mandibulární orgán, O – oči, SA – samičí segment, SS – samčí segment, SZXO – sinusová žláza X-orgán, V – varlata, YO – Y-orgán

U korýšů jsou čtyři různá místa, kde jsou produkovány hormony (jejich umístění je vidět na obr.2):

Sinusová žláza X-orgán je umístěn v oční stopce a je v blízkém spojení s vnějším prostředím. Reaguje na fotoperiodickou a světelnou intenzitu. Jsou zde přítomny hormony ve formě peptidů (hormon inhibující svlékání, MIH, inhibiční hormon gonád, GIH, hypoglykemický hormon korýšů, CHH a pigmentové hormony).

Y-orgán je párový orgán lokalizovaný v mandibulární části. Tento orgán je zdrojem hormonů pro svlékání-ekdysteroidy. Je zde produkován ekdyson, který po uvolnění do hemocoel dutiny se změní na aktivní formu 20-hydroxyekdyson (Wollenberger, L., 2005). Tyto hormony mají klíčovou úlohu při vývoji a svlékání. Mají kontrolu nad genem ekdysteroidního receptoru (EcR), který odpovídá RXR, což je receptorový gen pro syntézu

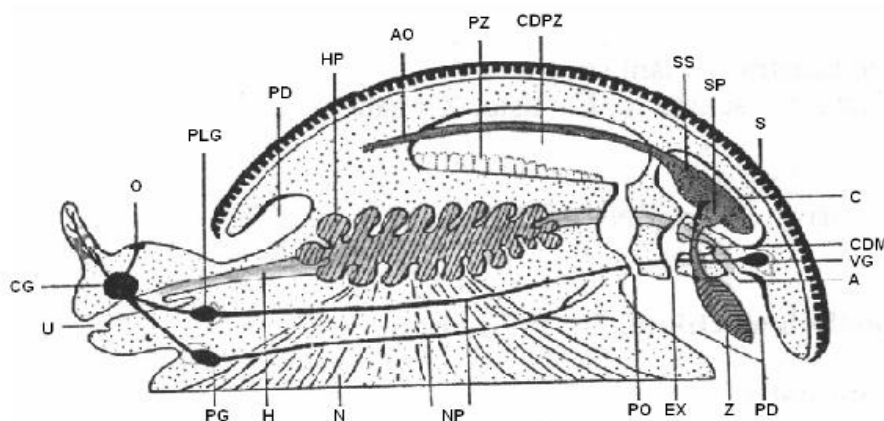
steroidních hormonů u obratlovců (Tuberty, S., 2005).

Androgenní žláza produkuje androgenní žláзовý hormon (AGH), který je odpovědný za vývoj pohlavních orgánů samců a má vliv i na jejich sekundární pohlavní charakteristické rysy. Tato žláza u samic není, místo toho mají žlázu, která produkuje vaječnickový hormon mající vliv na sekundární samičí pohlavní znaky.

Mandibulární orgán obsahuje methylfarnesoát, který se účastní vývoje Y-orgánu a má vliv na zárodečnou syntézu (vitelogenezi) (Wollenberger, L., 2005). Methylfarnesoát je neepoxidová forma JH III a ovládá metamorfózu, ovlivňuje uvolnění ekdysteroidů a tím i svlékání, působí při vývoji pohlaví, reprodukčních orgánů a morfortypu (Tuberty, S., 2005). Spouštěcí mechanismus pro uvolnění hormonů není ještě zcela prozkoumán, ale má se zato, že vnější podněty z prostředí splynou s CNS a tím jsou přes neurotransmitery a neuromodulátory uvolněny neuropeptidy (Wollenberger, L., 2005).

3.2.4. Kmen: MOLLUSCA (MĚKKÝŠI)

Obr.3.: Stavba těla měkkýšů a jejich rozmístění endokrinních žláz (Čížková, M., 2005)



A - anus, AO – aorta, CG – cerebrální ganglion, CDM – coelom dutiny metanefridií, CP – coelom perikardia, CDPZ – coelom dutiny pohlavních žláz, EX – exkreční otvor, H – hltn, HP – hepatopankreas, N- noha, NP – nervový provazec, O – oko, PD – plášťová dutina, PG – pedální ganglion, PLG – pleurální ganglion, PO – pohlavní otvor, PZ – pohlavní žlázy, S – schránka, SP – srdeční předsíň, SS – srdeční síň, U – ústní otvor, VG – viscerální ganglion, Z - žábra

Kromě hmyzu je nejvíce různorodý kmen měkkýšů s třídami: škeble (škeble, ústřice),

plži (šnek, slimák) nebo hlavonožci (chobotnice). U tohoto bezobratlého druhu existuje různorodý neuroendokrinní systém, který se moc neliší od obratlovců (Lintelmann, J., 2003). Ten je soustředěn v neurosekretorických centrech, která produkují **neuropeptidy**. Tato centra se nacházejí v hlavových (cerebrálních), pohrudničních (pleurálních), nožních (pedálních) a abdominálních (viscerálních) gangliích CNS.

Neuropeptidy jsou odpovědné za řízení několika fyziologických procesů. Neuropeptidy produkované v abdominální oblasti (ELH, hormon řídící kladení vajíček) jsou zapojeny do zrání gonád a produkce vajíček, neuropeptidy z hlavových oblastí ovlivňují vývoj samičích sekundárních pohlavních znaků, zrání gonád a ovulaci. Růst, vývoj a metabolismus jsou řízeny peptidy strukturálně podobnými inzulínu (MIP) (LeBlanc, G., 1999). U těchto bezobratlých hrají **ekdysteroidy** jen nepatrnou roli.

Byla u nich ale prokázána přítomnost pohlavních **steroidních hormonů** – testosteron, estron, estradiol-17 β . Steroidní hormony u měkkýšů hrají důležitou roli v jejich sexuálním vývoji (Lintelmann, J., 2003). Díky novějším metodám testování těchto organismů byla podrobněji studována jejich pohlavní soustava (vývoj zárodků-vitellogenese a morfologická stavba), struktura a aktivita některých enzymů (glutathion S transferasa) a proteinů a dále role estrogenů v reprodukčním systému. Imunoanalytickými metodami bylo odhaleno velké množství protilátek estrogenu ve vaječnicích samic. Zárodky (vitellogeniny) jsou syntetizovány uvnitř gonád přes heterosyntetický mechanismus. Měkkýši mají tento systém odlišný od ostatních bezobratlých, zárodky jsou syntetizovány vně vaječníku a přepravovány přes hemocoel (Won, S., 2005). Syntéza zárodku a jeho regulace není zcela známa, ale byl prokázán stimulační vliv estradiolu-17 β a dalších xenobiotik na tento systém. Obecně může být estradiol významnějším regulačním faktorem při zárodečné syntéze a hraje důležitou roli i v reprodukci měkkýšů (Gagne, F, 2001a,b).

3.2.5. Kmen: ECHINODERMATA (OSTNOKOŽCI)

Patří do skupiny deuterostomes a jsou relativně blízce příbuzní k obratlovcům. Proto jejich endokrinní soustavy mohou mít podobné rysy a zároveň endokrinně aktivní látky mohou mít na ně podobné efekty. Nejsou zde známy žádné ekdysteroidní ani juvenilní hormony (ostnokožci se nesvlékají). Naproti tomu mají vyvinuté **endokrinní** a **neurohormonální mechanismy**, které mají kontrolu nad růstem a tvorbou gamet a kopulací. Reprodukce je ovlivněná **steroidy** a **neuropeptidy** (LeBlanc, G., 1999).

3.3. Endokrinně aktivní látky

Endokrinně aktivní látky, či chemikálie porušující endokrinní systém neboli endokrinní disruptory (EDC) lze popsat jako látky mající nepřímý vliv na endokrinní systém (Vogel, J., 2004). Tyto látky jsou dle Weybridga z roku 1996 definovány jako „exogenní substance, která způsobuje nepříznivé účinky v organismu, či v jeho potomstvu odpovědné za změny v endokrinním systému“ (Hutchinson, T., 2000a). **Chemické imise** jsou syntetické chemikálie, které jsou uvolněny lidmi popřípadě zvířaty do prostředí, které kontaminují a mají na něj negativní dopad. **Toxické chemické látky** jsou chemické imise s přímým akutním či chronickým účinkem na člověka a další organizmy (Vogel, J., 2004). **Xenoestrogeny** jsou chemické látky, které mají mající estrogenní účinky a zasahují do normální funkce endokrinní soustavy lidí a zvířat (Lintelmann, J., 2003).

Mechanismus účinku

Většina látek narušujících endokrinní systém se vyznačují stálostí a **biomagnificentními vlastnostmi** (Olsson, P.,1998). Látky mající tento charakter můžeme též nazvat jako perzistující organické látky (POP), které jsou rezistentní k degračním mechanismům v organismu (Vogel, J., 2004). Některé mohou být částečně metabolizovány. Jsou buď rozpustné ve vodě (ty jsou snadno vylučovány z těla pryč), nebo jsou lipofilní a zůstávají v organismu. Většina substancí je složena ze strukturních jednotek obsahujících fenolickou skupinu. Svoji strukturou jsou podobné přirozeným estrogenům a hormonům štítné žlázy (tyroxin), které jsou přítomny i v živých organizmech. Jejich funkcí je udržovat homeostázu a další důležité funkce. Proto, aby byly aktivní a mohly ovlivňovat tyto funkce, musí se z místa, kde jsou vylučovány dostat k cílovým orgánům. To je zprostředkováno vazbou k transportním proteinům přes jejich fenolickou skupinu (Olsson, P.,1998).

Rozlišujeme dva typy působení: **přímé** a **nepřímé**. Přímé působení je charakterizováno jako spojení chemikálií s receptory v organizmech a zde mají buď agonistický (odpovídají přirozeným hormonům-nonylfenol, ethinylestradiol) či antagonistický efekt (blokují receptory pro vazbu přírodních hormonů-tamoxifen, DDE). Nepřímo zasahují tyto látky do biosyntézy, metabolismu, eliminace či dostupnosti hormonů (inhibitory aromatáz) (Duft, M., www.bio.uni-frankfurt.de/ee). Obdobně jako přirozené hormony tělu vlastní se naváží i endokrinně aktivní látky a způsobují tak hormonovou nerovnováhu a s ní spojené nepříznivé účinky (Olsson, P.,1998). Mají vliv asi na 200 druhů zvířat v Evropě, USA, Japonsku a Australii (www.soci.org, 2005). Z významnějších lze jmenovat malformace

pohlavních orgánů aligátorů, feminizace a maskulinizace ryb, u bezobratlých všeobecně známý imposex měkkýšů a mnohé další (Duft, M., www.bio.uni-frankfurt.de/ee). Negativní vliv z těchto látek se nevyhýbá ani lidskému organismu. Endokrinně aktivní látky mohou mít tyto negativní účinky: vliv na redukci kvalitního spermatu, akceleraci a zpoždění sexuálního vývoje, vysoká frekvence vývojových poruch, může být příčinou vzniku nádorového onemocnění prostaty (www.soci.org, 2005).

EDC můžeme rozdělit takto:

- přírodní a syntetické steroidy z exkrece lidí a zvířat
- syntetické alkylfenoly, zahrnující různé typy surfaktantů pro čištění, speciální ftaláty, bisfenoly používané při výrobě plastů
- přírodní fytoestrogeny, fenolické deriváty získané z rostlinného materiálu
- přírodní a syntetické polycyklické aromatické uhlovodíky
- syntetické organohalogeny, pesticidy a triorganotiny (TBT, TPT...)
- kovy
- veterinární a lidské léky
- kyselá deště a acidifikace životního prostředí (www.soci.org, 2005), (Thompson, C., 2005)

Zdrojů endokrinně aktivních látek a chemikálií, které narušují endokrinní systém je celá řada. Tyto látky jsou přírodního i syntetického původu. Mohou to být i chemikálie z lidí a zvířat, které se dostanou do prostředí různými cestami. Tyto látky jsou obsaženy i v pitné vodě a jídle. V roce 2000 identifikovala Evropská komise 553 látek, které mají potenciální efekt na lidský a zvířecí endokrinní systém. 118 z těchto látek nepodléhalo žádnému testování ani regulaci jejich použití. V roce 2001-2003 bylo vybráno 147 látek, které jsou považované za podezřelé a 129 z nich je již předmětem pro regulaci jejich použití (www.soci.org, 2005). Seznam endokrinně aktivních látek lze nalézt na Evropské komisi, která pracuje na dokumentu zahrnující strategii jak se nejlépe vypořádat s endokrinně aktivními látkami. Jejich práce zahrnuje ohodnocení rizik, omezení, regulaci či úplný zákaz používání látek, která mají velká rizika pro lidský organismus a životní prostředí. Důležitou roli při výběru a hodnocení látek má testování. Každý stát EU má svůj vlastní program pro testování, který je sdružen do OECD. V USA se touto problematikou zabývá US EPA, která má screeningový testovací program zahrnující 70 000 chemikálií pro ohodnocení účinku

na endokrinní systém. Sledují se pesticidy a jiné chemické látky ze skupin estrogenů, androgenů a látek mající účinek na štítnou žlázu (www.soci.org, 2005).

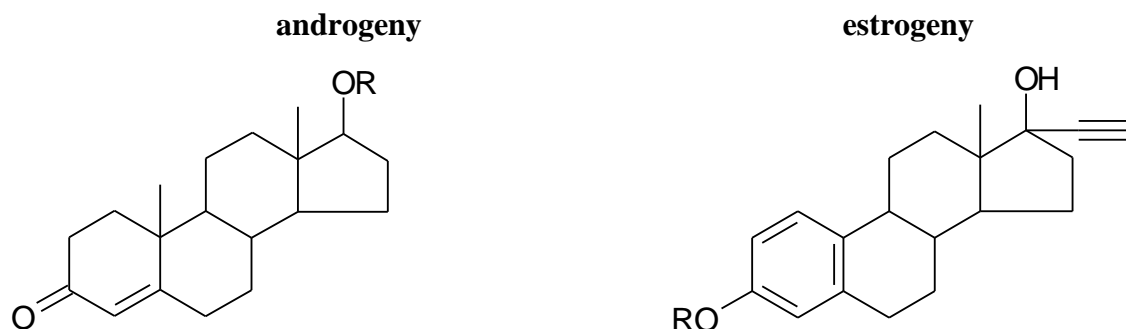
3.3.1. Humánní a veterinární léky

V posledních letech se této skupině látek a jejím rizikům na životní prostředí začala věnovat velká pozornost. Tato skupina zahrnuje obrovské množství různých látek s celou řadou mechanismů účinku a různorodou biologickou aktivitou. Jsou to medikamenty, které se skládají z farmakologicky aktivních látek a dalších pomocných látek (barviva, plniva, konzervační látky...). Léky, které mají nepříznivý vliv na životní prostředí jsou: syntetické pohlavní steroidní hormony, látky ovlivňující funkci štítné žlázy, antibiotika, cytostatika, léky snižující hladinu krevních lipidů, antikonvulziva, β -blokátory a deriváty fluoxetinu. (Thompson, C. , 2005).

Z farmakoterapeutického hlediska hormony lze využívat několika způsoby:

- k substituční terapii při nedostatečné tvorbě endogenního hormonu
- podávání hormonu s cílem utlumit činnost žlázy s vnitřní sekrecí (zpětně vazebná regulace) např. podávání tyroxinu u eutyroidní strumy pro zmenšení štítné žlázy
- využití účinků nefyziologicky vysokých koncentrací hormonů, např. účinek glukokortikoidů jako antiflogistik
- ovlivnění sekrece nebo účinků hormonů léčivy, např. povzbuzení sekrece inzulinu perorálními antidiabetiky nebo potlačení účinků testosteronu antagonisty androgenních receptorů (Lüllmann, H., 2004)
- terapie nádorů, jejichž buňky obsahují receptory pro steroidní hormony (hormonálně závislé nádory jako jsou některé karcinomy prsu, prostaty a endometria) (Hartl, J., 1991)
- kontraceptiva (Thompson, C., 2005)

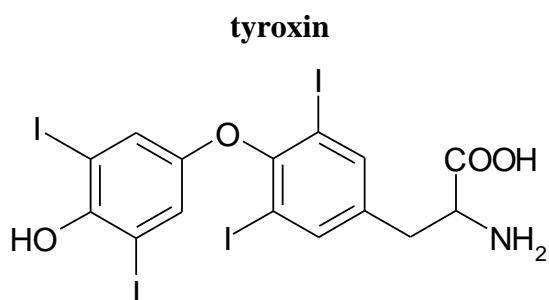
Steroidní hormony



Syntetické pohlavní steroidní hormony jsou látky působící na endokrinní systém a zahrnují androgeny, antiandrogeny, estrogeny, antiestrogeny a progesterony. Představují důležitý faktor regulačních pochodů, které probíhají v živých soustavách. Zpětnovazebným mechanismem ovlivňují metabolismus organismu jako celku a nebo mohou působit jen v určité části popř. orgány (Hartl, J., 1991).

Významným polutantem a hrozbou pro životní prostředí jsou estrogeny a především ethinylestradiol. Ethinylestradiol je velmi perzistentní látka, která se do životního prostředí dostává v nezměněné, ale konjugované formě. V čistíčkách se tyto konjugované vazby porušují a volné se dostávají do prostředí, kde působí na živé organismy. U ryb způsobují endokrinní porušení a feminizaci samců ryb (Thompson, C., 2005).

Hormony štítné žlázy



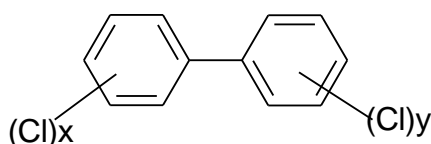
Tyto hormony jsou produkovány štítnou žlázou a jsou potřebné pro normální růst, vývoj, tkáňový metabolismus, normální funkci centrálního nervového systému (CNS)

a pro mechanismy dlouhodobé adaptace na stres a vlivy zevního prostředí (Lincová, D., 2002).

3.3.2. Halogenované uhlovodíky

Tato skupina zahrnuje průmyslové a technologické látky. Tyto látky mohou být alifatické, cyklické, aromatické či kombinované formy. Halogen může být chlor, brom či fluor. Hydrokarbonová část je lipofilní a je charakteristická dobrou absorpcí. Halogen má perzistentní, bioakumulativní a biomagnifcentní vlastnosti.

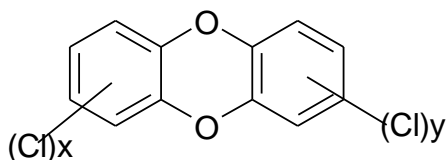
Polychlorované bifenyly, PCB



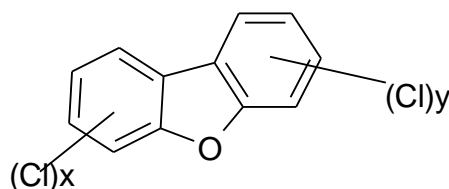
Vysoce lipofilní, stabilní, nereaktivní viskózní kapaliny, jejichž fyzikální vlastnosti jsou závislé na počtu chloridů v molekule. Používají se do hydraulických roztoků, k izolaci dielektrika v transformátorech a kondenzátorech a jako změkčovadla plastů (Thompson, C., 2005). Tyto látky jsou v organismu metabolizovány na OH-PCB, které jsou strukturálně podobné thyroxinu (Olsson, P., 1998). Mají vytěšňující efekt na thyroidální hormon thyroxin a vitamin A. Díky tomu je porušena syntéza vitamínu A a na thyroxinu závislý metabolismus. Mají anti-estrogenní či estrogenní účinky. (Thompson, C., 2005).

Polychlorované dibenzodioxiny, PCDD a dibenzofurany, PCDF

Dibenzodioxin



Dibenzofuran

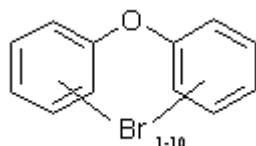


Jsou to lipofilní a stálé látky, které vznikají během spalování (např. městského odpadu), při výrobě kovů, při výrobě a recyklaci papíru, dále při výrobě fungicidních

chlorofenolů a chlorovaných fenoxxyherbicidů. PCDD navíc vznikají při enzymatických reakcích v kompostech a splaškovém kalu. Existuje až 75 různých druhů PCDD a 135 PCDF (Olsson, P., 1998). PCDD, speciálně tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) je extrémě toxický. Je to také velmi lipofilní látka, která má vysokou afinitu k cytoplazmatickému aryluhlovodíkovému receptoru a je zabudován do genu DNA. To způsobuje blokaci estrogenních receptorů, způsobující antiestrogenní účinky (Thompson, C., 2005).

Polybromované samozhášecí přísady, PBFR

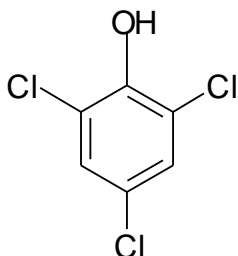
Polybromiddifenyleter



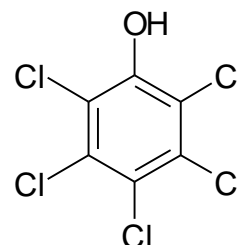
Jsou to lipofilní látky, které se používají jako samozhášecí přísady do počítačů, elektronických spotřebičů, aut, konstrukčních materiálů, textilií, plastů a dalších produktů. Díky jejich vysoké lipofilitě jsou akumulovány v organismu a jejich metabolity ovlivňují podobně jako PCB hormony štítné žlázy (Olsson, P., 2004). Byl pozorován inhibiční či naopak stimulační efekt na růst pohlavních orgánů *Maris cornuarietis* a *Nucella lapillus* (Oehlmann, J., 2000) .

Chlorofenoly

Trichlorfenol



Pentachlorfenol

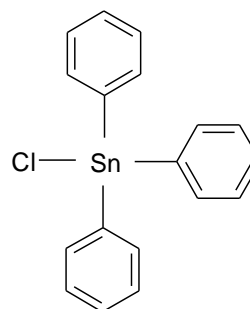
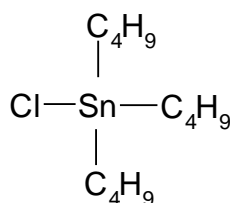


Jsou to pesticidní a fungicidní látky, které se používají pro ošetření dřeva. V dnešní době se od jejich používání upouští. Jsou to opět velmi lipofilní látky, které se snadno

dostanou do krve, brání oxidativní fosforylaci a tím urychluje metabolismus a snižuje tak energetické zásoby pro imunitní systém, játra, ledviny a způsobuje reprodukční poruchy (Thompson, C., 2005).

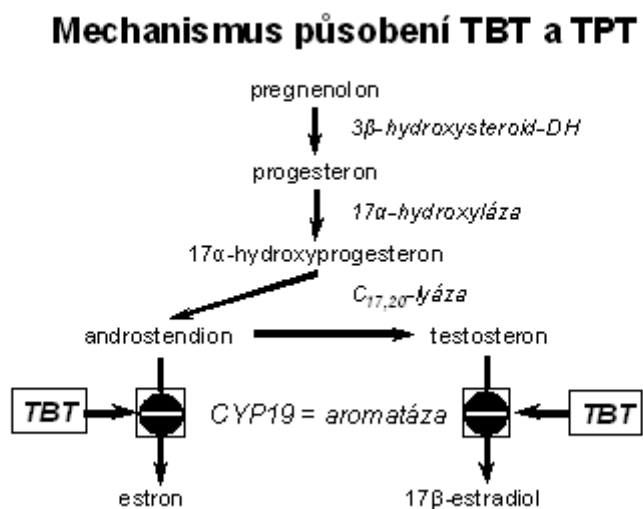
3.3.3. Organocíny

Tributylcín ,TBT a Trifenylcín, TPT



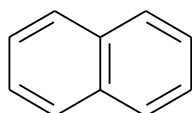
Jsou to jedny z nejlépe popsaných endokrinně aktivních látek, které se v minulosti běžně používaly jako antifungální přísady do nátěrových barev lodí. TBT byl studován celou řadou autorů. Jsou to látky, které v mořských měkkýších způsobují imposex. (mechanismus negativního působení těchto substancí lze vidět na obr.4) Zasahují do normální aktivity testosteronu, stimulují růst penisu a chámovodu u samic. Tento jev se nazývá imposex a vede u samic ke sterilitě. Dalším závažným důsledkem s tímto souvisejícím je celkový pokles populace mořských plžů (DeFour, P., 2004). TPT není tak hojně využíván jako TBT a obecně se v přírodě vyskytuje v menší míře, byl užíván jako přídavek k nátěrovým barvám lodí jako látka zvyšující účinnost proti houbám. Navíc se hojně používal i v zemědělství do postřiků proti houbovým nákazám. Tyto látky nejsou metabolizovány a navíc mají kumulativní charakter. Jejich negativní účinky byly objeveny u celé populace (Gual, G., 2005)

Obr.4: Mechanismus působení organocínů na mikrosom, kde se syntetizují hormony (Duft, M., www.bio.uni-frankfurt.de/ee)

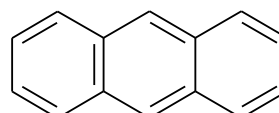


3.3.4. Polycyklické aromatické uhlovodíky, PAH

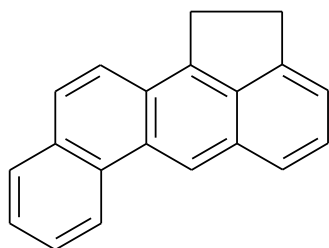
Naftalen



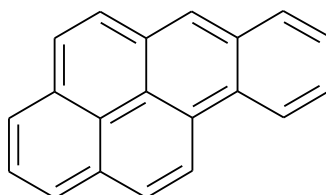
Antracen



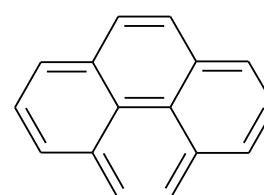
Chlorantren



Benzo[a]pyren



Pyren



Tyto látky vznikají při nedokonalém spalování petroleje a uhlí ve spojení se získáním energie, při průmyslové výrobě či při transportu. Dále z grafitových elektrod při výrobě kamenouhelného dehtu a při výrobě pneumatik. Dále vznikají samovolně v přírodě při lesních požárech, vulkanizační činnosti a jsou obsaženy v ropě a v uhlí. Ty které jsou nebezpečné pro životní prostředí jsou výhradně antropogenního původu. Tyto látky se skládají z uhlíků

a vodíků. Jsou snadno dostupné a vyznačují se bioakumulativními vlastnostmi. U vyšších organismů jsou metabolizovány a vylučovány z těla ven. V nižších organizmech se však tyto látky kumulují. Mají opět nepříznivý efekt (kompetitivní či antagonistický) na štítnou žlázu stejně jak bylo již popsáno u PCB a PCDD. Mají i estrogení a antiestrogení aktivitu. Jako antiestrogeny působí na zárodečnou syntézu v játrech ryb, to způsobuje menší plodnost ryb. Naopak u samců působí estrogení aktivitou a to má za následek zvýšenou zárodečnou syntézu samců ryb a to má za následek stimulaci estrogeních receptorů a tím je způsobena feminizace samců (Thompson, C., 2005).

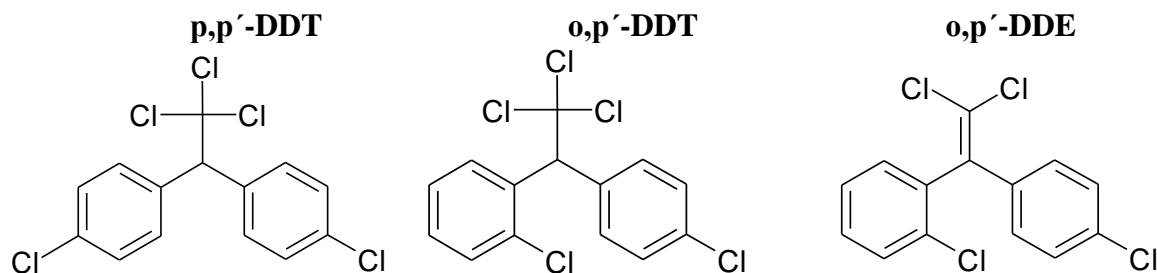
3.3.5. Pesticidy, insekticidy

U mnoho pesticidů byl zjištěn negativní vliv na endokrinní systém, především na štítnou žlázu. Nicméně jsou tyto látky používány pro ošetření zemědělských plodin a jejich koncentrace pro požadovaný účinek několikanásobně převyšují přijatelnou denní dávku. I když je většina těch, které porušují endokrinní systém zakázané používat, stále zůstávají v prostředí. To je způsobeno jejich vlastnostmi, jsou stálé a perzistentní. V minulosti byly hojně používány. V dnešní době jsou moderní skupinou látek insekticidy hormonálního typu. Působí agonisticky či antagonisticky na růstové homony hmyzu (Olsson, P., 2004).

Chlorované pesticidy, insekticidy

Tato skupina byla hojně používána mezi lety 1940-1960. Skládá se z mnoha odlišných a rozmanitých sloučenin, které byly plošně používány jako pesticidní a insekticidní látky. Významný a hodně komerčně využíván byl dichlorodifenyltrichloroethan (DDT), dále také aldrin, dieldrin, lindan, chlordan a toxafen. Byly využívány v zemědělství a lesnictví (Thompson, C., 2005). V šedesátých letech byl zaznamenán populační pokles v přírodě a proto se tyto látky začaly testovat. Testováním se zjistilo, že jsou velmi toxické pro ryby, delfíny, raky, vydry, mořské savce, aligátory a další organizmy včetně člověka (Vogel, J., 2004). Ve většině zemí je používání těchto látek již zakázáno, ale přesto jsou i dnes využívány například v tropických oblastech jako účinní pomocníci při boji s malárií (insekticidní přípravky pro hubení komárů, kteří přenášejí malárii). (Thompson, C., 2005).

DDT a příbuzné látky



Jsou to lipofilní látky, které jsou snadno dostupné a distribuované v živých organizmech. Vyskytují se ve dvou isomerech p,p'-DDT a o,p'-DDT. Isomer p,p'-DDT má hlavně neurotoxický účinek oproti tomu neurotoxicita o,p'-DDT je jen velmi malá (Thompson, C., 2005). V organismu jsou tyto látky biotransformovány či metabolizovány na dichlorobischlorofenylethan, p,p'-DDE, o,p'-DDE a dále na dichlorofenyl kyseliny octové, DDA. Metabolit p,p'-DDE je velmi stabilní a persistentní a zůstává v životním prostředí dlouhou dobu (Olsson, P., 2004). Účinky DDT jsou jen nepatrně toxické pro savce a ptáky, ale jejich toxicita je vysoká pro ryby, bezobratlé a hmyz. Působí neurotoxicky, interaguje se sodíkovými kanály neuronů. Jako hlavní endokrinně aktivní látka se ukázala být o,p'-DDT a její metabolit o,p'-DDE, které jsou známy jako xenoestrogenní látky způsobující poruchy v diferenciaci pohlavních orgánů a rozmnožování (Thompson, C., 2005).

Methoxychlor, dicofol, chlordecon

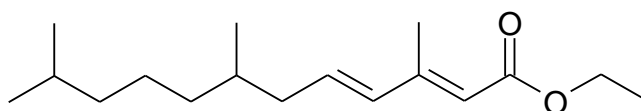
Tyto dvě látky nahradily DDT. Strukturálně se však mnoho nelišily. Jejich používání je ve většině zemí již také zakázané. Dicofol je získán z DDT a konečný výrobek může obsahovat stopy DDT. Methoxychlor se v organismu metabolizuje na metabolity obdobné DDE (Olsson, P., 2004). Chlordecon, prodáváný pod názvem Kepon, je organochloridový pesticid, u kterého byly objeveny xenoestrogenní účinky. Tato látka zasahuje do formace skořápky kraba a do svlékání hmyzu (DeFour, 2004).

Hexachlorocyclohexan, HCH, lindan

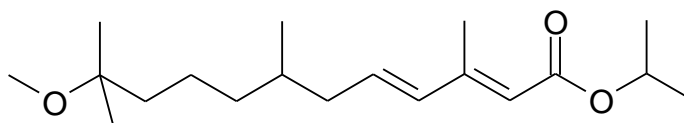
Jsou to lipofilní, stálé, kumulativní a nejvíce účinné insekticidy (Olsson, P., 2004). Lindan je navíc využíván i jako složka krémů, mýdel a šampónů proti vším a hnidám. Je absorbován z plic, zažívacího traktu, nebo kůží a ukládá se v tukové tkáni. Jeho negativní účinky na pohlavní orgány samců i samic byly popsány na kryších a dalších obratlovcích (Gual, G., 2005).

Analoga juvenilních hormonů, JH, ecdysteroidů a methylfarnesoátu

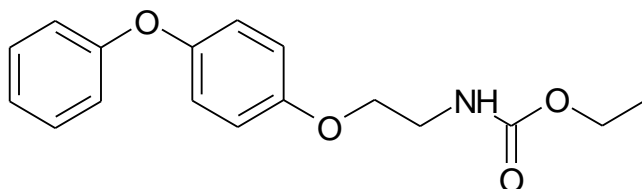
Hydropren



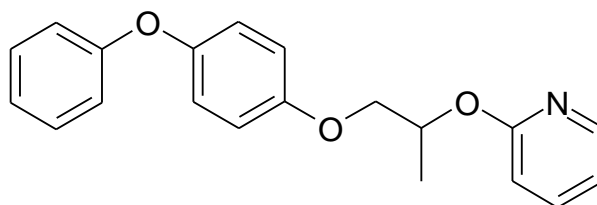
Metopren



Fenoxykarb



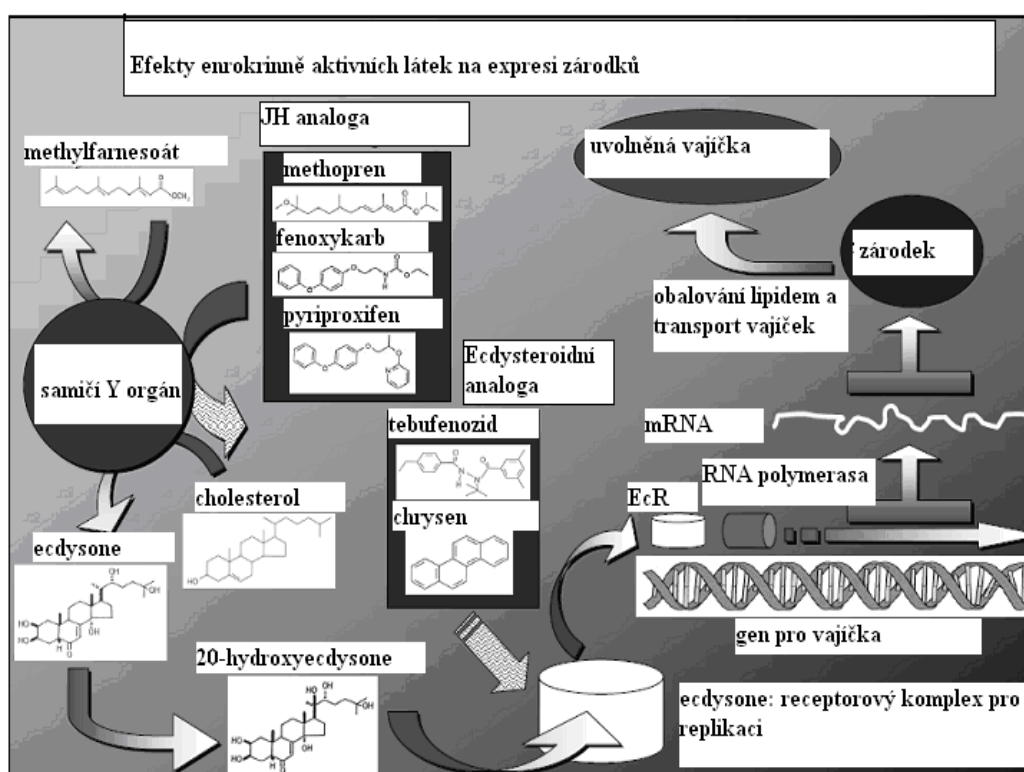
Pyriproxifen



Juvenilní hormony obecně řídí dospívání a vývoj u hmyzu. Ovlivňují jejich svlékání a mají vliv i na jejich metamorfózu. Analoga juvenilních hormonů využívají tohoto účinku a u hmyzu tyto látky působí jako agonisté či antagonisté. Zasahují tak do jejich endokrinního systému a tím způsobují smrt, letální deformace či sterilitu. Endosulfan je používán jako pesticid, který se vyskytuje ve třech formách α , β a ve formě soli. Byla u něj objevena

estrogenní aktivita. Tato látka je vysoce toxická k sladkovodním i mořským bezobratlým živočichům. Zasahuje do jejich vývoje a svlékání (lze vidět na obr.5). Fipronil se používá proti nepříjemnému hmyzu a působí na jeho endokrinní systém, pro obratlovce je netoxický. Metopren, agonista JH , insekticid, který hubí larvální stádia hmyzu. Je to analog methalfarnesoátu a díky tomu má vliv na endokrinní systém korýšů (lze vidět na obr.5) (DeFour, P., 2004).

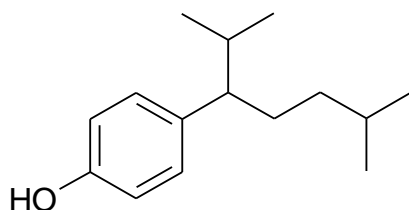
Obr.5: Zásah pesticidních a insekticidních látek do zárodečné syntézy korýšů (Ferguson, P., 2006)



3.3.6. Průmyslové chemikálie

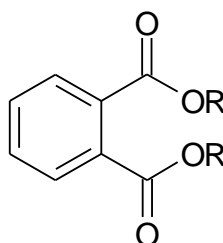
Alkylfenoly

p-nonylfenol (NP)



Jsou to neionogenní tenzidy, které se používají jako saponáty, emulgátory, dispergační prostředky v barvách. Jsou používány jako přísady do mazacích olejů, dále jsou složkou antikoncepčních prostředků jako jsou lubrikanty či pěny, dále se užívají jako antioxidanty v PVC, PS plastech. Alkylfenoly jsou produkovány alkylací fenolu s alkenem. Pro technické produkty je alkylový řetězec rozvětvený a jeho délka a stupeň větvení jsou určeny použitým alkenem. Reakcí s etoxydem a 2-40 ethoxy skupinami se navážou na fenol a vzniknou alkylfenoethoxyláty. Hydrofilita je určena počtem ethoxylových skupin a délkou alkylového řetězce. Tyto látky jsou postupně degradovány na jednoduché alkylfenoly (Olsson, P., 2004). Byly objeveny v relativně hojně míře ve vodním prostředí, proto jsou testovány a sledovány jejich nepříznivé vlivy na vodní organizmy. Jejich vlivem je snížena produkce spermií, zasahuje do embryonálního vývoje a indukuje zárodečnou syntézu u nedospělých stádií (Gual, G., 2005).

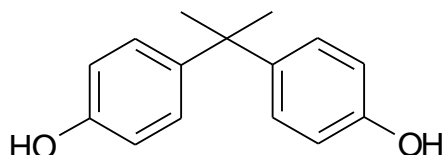
Ftaláty



Skládají se z kyseliny ftalové, která je esterifikována různými alkoholy jako butylalkohol, benzylalkohol a 2-ethylhexanol. Používají se jako plastifikátory. Ftalandibutylát, DBP a butylbenzylftalát, BBP jsou potenciálními disruptory. Ani jedna z těchto látek nejsou akumulovány v organismu, jsou degradovatelné. Mohou

se biokoncentrovat v nižších organizmech (slávkách), ale u dalších vyšších živočichů jako jsou ptáci, ryby, savci jsou tyto látky rozloženy a vyloučeny z těla pryč (Olsson, P., 2004). Neinteragují s androgenním receptorem, ale zasahují do transkripce klíčových genů, která zahrnuje transport cholesterol a syntézu testosteronu (Gual, G., 2005).

Bisfenol A



Je to chemický meziprodukt, který se používá při výrobě nádob na potraviny a nápoje a kompaktních disků. Dále jsou používány jako antioxidanty a stabilizátory při výrobě plastů. Tato látka byla do testování zařazena, protože byla nalezena v povrchových vodách. Při výzkumu jsou sledovány potenciální účinky na vodní organizmy (Staples, Ch., 2002). Při studiu této látky bylo zjištěno, že má estrogení účinky, působí jako aginosta (Olsson, P., 2004).

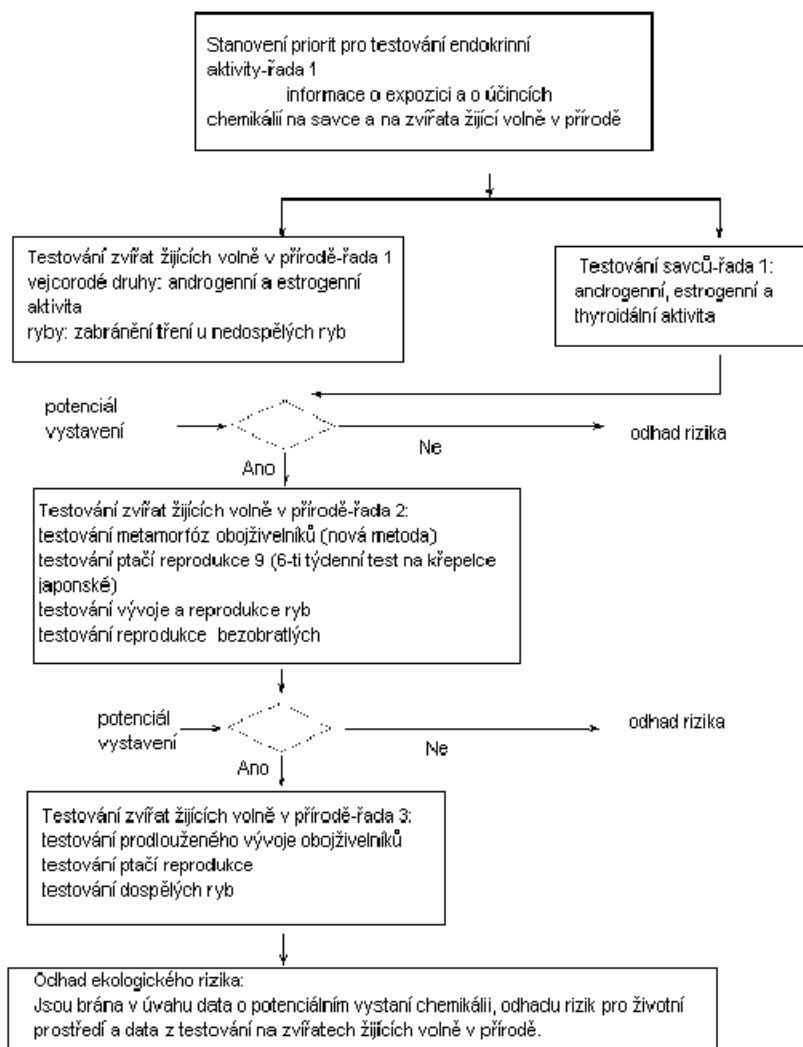
4. TESTOVÁNÍ ENDOKRINNĚ AKTIVNÍCH LÁTEK NA NIŽŠÍCH ORGANIZMECH

Zájem o sledování endokrinní aktivity má dva důvody. Tím prvním je dopad na lidské zdraví a tím druhým dopad na obratlovce žijící volně v přírodě. Testování endokrinní aktivity se zaměřuje na látky patřící k estrogenům, androgenům a těm, které mají vliv na hormony štítné žlázy (www.epa.gov).

Existuje celá řada chemikálií podezřelých z působení na endokrinní systém. Odhaduje se množství kolem padesáti tisíc těchto látek, které by měly být otestovány a měla by být u nich zjištěna možná rizika. Toxicita látek majících endokrinní aktivitu je způsobena tím, že se v organismu naváží na estrogen jako ligand. Tímto mechanismem působí většina endokrinně aktivních látek (Hutchinson, T., 2000b).

V posledních letech se objevila celá řada zpráv o tom, že se v přírodě vyskytují chemické látky a léky mající dopad na reprodukci a správný vývoj zvířat žijících volně v přírodě. To způsobuje porušení normální funkce endokrinního systému (Hutchinson, T., 2000a). K dalším nepříznivým efektům patří i kancerogenita (Lintelmann, J., 2003). Proto byly vyvinuty ekotoxikologické zkušební směrnice pro odhad rizika při porušení normální funkce endokrinního systému. Na přípravě těchto směrnic se podílí celá řada organizací k nimž patří i Výbor pro prověřování narušení endokrinního systému a ověřovací informační zprávy (EDSTAC) a U.S. agentura pro ochranu životního prostředí (U.S.EPA). Realizací těchto testů se zabývá Evropské centrum pro ekotoxikologii a toxikologii chemikálií (ECETOC) (Hutchinson, T., 2000a). Další organizací, která se zabývá touto problematikou je Organizace pro hospodářskou spolupráci a vývoj (OECD). Tato organizace se snaží o mezinárodní sjednocení a ověření platnosti testování a vypracovává metody pro ohodnocení efektů z chemikálií, včetně endokrinně aktivních látek (Gourmelon, A., 2007).

Obr.6: Schéma ECETOC strategie pro odhad ekologického rizika u látek s endokrinní aktivitou (Hutchinson, T., 2000a)



Dle schématu (obr.6) je účelem řady 1 otestovat a identifikovat u živých organismů citlivost endokrinního systému na androgenní, estrogenní či jiné látky, které mají dopad na hormonální aktivitu štítné žlázy a poskytnout výstrahu pro používání endokrinně aktivních látek (Hutchinson, T., 2000a).

Testy řady 2 by měly poskytnout konečné informace o **identifikaci rizik**, potvrdit či vyvrátit endokrinní aktivitu chemikálií, která byla odhalena v řadě 1, dále by měla být stanovena závislost dávky na účinku, který bude mít v organismu **pro odhad rizika** (Hutchinson, T., 2000b).

Ve všech případech protokoly užívané pro testování prošly před jejich použitím mezinárodním ověřením platnosti. Dále bylo požadováno, aby efekt testů na savcích a testů na bezobratlých byl rovnocenný.

Cílem těchto testů je definovat ekologické účinky, určit zdroje a charakterizovat rizika pro ekologii u vybraných endokrinně aktivních látek. Hlavním požadavkem je zachovat rozmanitost volně žijících zvířat v přírodě a zároveň použít takové metody, aby bylo efektivně ohodnoceno riziko pro prostředí.

Organizmy vhodné pro otestování odhadu rizik jsou vybírány podle potenciálu pro jejich vystavení chemické látce. Působení chemikálie na organismus souvisí mimo jiné i s cestou, kterou se dostane do prostředí. Jakmile je určen potenciál pro vystavení, jsou vybrány vhodné efektivní testy a zhodnoceno riziko. Dále by mělo být zhodnoceno riziko bioakumulace, biomagnificence a možnost ohrožení u organismů, ke kterým se chemikálie dostane potravou. Jinými slovy jsou to organizmy, jejichž potravou jsou bezobratlí, ryby, ptáci a savci, kteří byli přímo vystaveni chemické látce. Pro tento účel byl vypracován metodologický postup jak odstranit toto riziko. Potenciální dopady ze syntetických substancí mohou být považované za přirozené zátěžové faktory, které nám pomohou definovat, jaký účinek je ještě ekologicky přijatelný a který již nikoli. U.S.EPA charakterizuje nepřijatelný účinek jako rozšířenou a opakovanou úmrtnost ve vztahu k menší ekonomické výhodnosti pro společnost.

Ačkoli je vypracován program pro testování odhadu rizik, je snaha o to, aby bylo poskytnuto co nejvíce ekologicky významných informací a zároveň omezeno množství zvířat pro testování. Z hlediska účinnosti a efektivnosti chronických testů je nejdůležitější výběr vhodných organismů (Hutchinson, T., 2000a).

4.1. Testování na bezobratlých

Tato část zahrnuje výčet celé řady bezobratlých organismů, které jsou systematicky zařazeny a vychází z těchto citací (Macek, J., 2001, Motyčka, V., 2001, Papáček, M., 1997, Sedlák, E., 2000).

Říše: ANIMALIA (ŽIVOČICHOVÉ)

4.1.1. Kmen: PORIFERA (HOUBOVCI)

Na dvou druzích *Heteromyenia* sp. a *Eunapius fragilis* byly otestovány tyto látky: **ethylbenzen**, **nonylfenol** a **bisfenol-A**. Studie byla zahájena s malými pupeny a byl testován vliv chemikálií na růst (sledování morfologických znaků a vliv na pučení). U vyšších koncentrací těchto chemikálií byly zjištěny morfologické abnormality vyskytující se u obou druhů. Rychlost pučení byla v porovnání s druhy, které nebyly vystaveny žádné chemikálii, relativně nízká. V nejvyšších koncentracích bylo pučení úplně potlačeno. Nelze ale jasně říci, zda tyto nepříznivé účinky souvisí s porušením endokrinních funkcí, nebo jestli tyto účinky souvisí s akutní toxicitou pro tyto organizmy (Hill, M., 2002).

4.1.2. Kmen: CNIDARIA (ŽAHAVCI)

| | |
|-----------|---------------------------------|
| Třída: | ANTHOZOA (KORÁLNATCI) |
| Podtřída: | HEXACORALIA (ŠESTIČETNÍ) |
| Řád: | SCLERACTINIA (VĚTEVNÍCI) |

U této skupiny organismů byl ohodnocen účinek exogenních estrogenů: **17 β -estradiol** a **estron**. Sledoval se vliv na reprodukci větevníků. Byl zjištěn efekt na uvolnění vaječných svazků kolonie *Montipora capitata*, kdy při vystavení **estradiolu** se snížil počet uvolněných vaječných svazků o 29%. Počet vajíček v jednotlivých svazcích zůstal zachován. Na základě tohoto poznatku se estrogény zdají být přirozenými bioregulátory korálnatců.

Dále byl zjištěn vliv na růst *Porites compressa*, který byl v přítomnosti **estronu** významně redukován. Mechanismy působení nejsou ještě zcela známy, ale Tarrant poukazuje na to, že nepříznivé účinky na reprodukci z těchto látek se netýkají pouze obratlovců, ale jsou i hrozbou pro bezobratlé druhy (Tarrant, A., 2004, 2005).

Třída: **HYDROZOA (POLYPOVCI)**
Řád: **HYDROIDA**
Podřád: **HYDRINA (NEZMAŘI)**

Na organismu *Hydra vulgaris* byly testovány dvě chemické látky: syntetický estrogen **17-ethinylestradiol** a **bisfenol A**. Délka testu byla 96 dní. Byly hodnoceny tyto účinky: přežívání, struktura a pučení polypového stádia. U 17-ethinylestradiolu byla sledována i pohlavní reprodukce. Při vystavení vysokým koncentracím těchto látek se brala do úvahy i LC₅₀. Struktura a fyziologie těchto organismů byla ovlivněna až ve vysokých koncentracích obou látek, to se projevilo inhibicí pučení. Navíc byl u vysokých koncentrací estrogenu 17-ethinylestradiolu pozorován vliv na sexuální reprodukci. V této studii bylo zhodnoceno, že látky ovlivňující endokrinní soustavu nemají v environmentálních koncentracích na tyto organismy žádný vliv (Pascoe, D., 2002).

4.1.3. Kmen: ANNELIDA (KROUŽKOVCI)

Tato skupina organismů nebyla podrobně studována. Nicméně byly studovány účinky **juvenilních hormonů** a **analogů juvenilních hormonů** na mořský druh *Capitella*. Byl zjištěn stimulační vliv na larvální stádia a jejich metamorfózy (LeBlanc, G., 1999).

Třída: **POLYCHAETA (MNOHOŠTĚTINATCI)**

Nespecifikovaný druh byl podroben vystavení **4-n-nonylfenolu**. Délka vystavení byla 78 dní. Působením této látky se projevil rychlejší nárůst tělesného objemu a větší velikost těla. To se však neprojevilo v celé populaci. Nejvyšší koncentrace nonylphenylu ovlivnila negativně reprodukci, velikost těla, fertilitu, čas první reprodukce dospělců a jejich růst (Hansen, F., 1999). *Dinophilus girociliatus* byl vystaven **4-n-nonylfenolu** a byl u něj objeven vliv na produkci vajíček, ta byla oproti kontrole zvětšená (Gual, G., 2005).

4.1.4. Kmen: ARTHROPODA (ČLENOVCI)

Byla vypracována detailní recenze, která zahrnuje toxikologické testy. U těchto testů je kladen důraz na vývoj a reprodukci organismů ve vztahu k endokrinně aktivním látkám. Vývoj a reprodukce organismů je sledována i v další generaci (F1). Některé testy vycházejí z navrhovaných směrnic OECD, jiné jsou založeny na národních normách nebo na publikovaném výzkumu (Gourmelon, A., 2007).

Podkmen: **CRUSTACEA (KORÝŠI)**
Třída: **BRANCHIOPODA (ŽÁBRONOŽCI)**
Řád: **CLADOCERA (PERLOOČKY)**

Daphnia magna byla použita v akutním testu toxicity pro otestování chemických látek: **estradiol -17 β** , **ponasteron A**, **ekdyson α a β** , **bisfenol A**, **nonylfenol**, **metopren a tebufenozid**. Byl využit toxkit Daphtoxkit F magna a bylo postupováno dle směrnice OECD 202. Délka testu byla 48 hod a hodnotila se LC₅₀. Byla prokázána vysoká toxicita nonylphenolu, methopren měl vliv na svlékání a reprodukci a u estradiolu -17 β a bisfenolu A byl zjištěn vliv na vývoj, růst a reprodukci. Celková úrodnost dafnií byla vlivem těchto látek snížena (Hirano, M., 2004).

Jiní autoři (Staples, Ch et al.) testovali účinek **bisfenolu A** na členovce *Daphnia magna*. Experiment probíhal v průtokových podmínkách po dobu 21 dní. Byl sledován vliv na růst a reprodukci a nebyly prokázány žádné negativní účinky ani na růst ani na reprodukci (Staples, Ch., 2002). Baldwin, W. et al. testovali na dafniích **20-hydroxyekdyson** (hormon ovlivňující svlékání u korýšů) a **ponasteron A** (endogenní separace, která má 20x vyšší afinitu k ekdysonovému receptoru). Doba vystavení byla 21 dní a byl sledován vliv na reprodukci. Nebyly zjištěny žádné významné odchylky od normální reprodukce kromě nejvyšších koncentrací, kde byla významně zvýšená úmrtnost dafnií a velikost jejich potomstva byla redukována nebo potomstvo nebylo produkováno vůbec. Druhá generace dafnií vystavená 20-hydroxyekdysonu nebyla ovlivněna. Naproti tomu měl ponasteron A nepatrný vliv na reprodukci i u potomstva druhé generace. Účinky těchto látek je možno posoudit i z chemického hlediska. Ponasteron A má méně hydroxylových skupin a proto je obtížněji metabolizován. Díky této vlastnosti a díky větší podobnosti k ekdysonovému receptoru má účinky i na druhou generaci (Baldwin, W., 2001).

Na dafnii byly otestovány i dvě látky obsažené v kontracepčních pilulkách: **17 α -ethinylestradiol** a **norethindron**. U 17 α -ethinylestradiolu byl zaznamenán snížený počet potomstva. U norethindronu nebyly pozorovány žádné odchylky (Goto, T., 2003). Olmstead, A. et al. díky novým poznatkům z endokrinologie dafnií vyslovili hypotézu, že **methylfarnesoát** je pravděpodobný endokrinní faktor, který reguluje vývoj samců a analog juvenilního hormonu **pyriproxyfen** stimuluje produkci samců a to se opravdu potvrdilo (Olmstead, A., 2002, 2003).

Další autoři (Tatarazako, N. et al) sledovali účinky na *Daphnia magna* otestováním **methylfarnesoátu** a **pyriproxyfenu**. Ukázalo se, že tyto látky mají stimulační vliv na produkci. Ke stejným závěrům došli i u dalších látek: **fenoxycarb**, **metopren**, a **JHIII**. Těchto pět látek mělo za následek sníženou úrodnost a větší produkci samců, tato odpověď byla podobně dávkově závislá kromě fenoxycarbu a pyriproxyfenu, na které byly dafnie více citlivé oproti ostatním testovaným látkám (Tatarazako, N., 2003). Dále na nich byli otestováni ekdyteroidní antagonisté **testosteron** a **fenarimol**. Bylo zjištěno, že ekdyteroidní látky jsou velmi důležité při regulaci vývoje dafnií. Testosteron měl vliv na ranná a pozdní vývojová stádia, kde působil jako antagonist, zatímco fenarimol ovlivnil pozdní vývojová stádia, kde působil inhibičně při syntéze hormonů (Mu, X., 2002a,b).

V další studii se Mu, X. et al. pokusili ohodnotit účinek na vývoj dafnií ze směsi **testosteron-fenarimol**. Při použití předchozích výsledků bylo usuzováno, že díky inhibici ekdyteroidního hormonu fenarimolu a současným zvětšeným antagonistickým účinkem testosteronu bude toxicita vysoká. To se také potvrdilo. Navíc byla vyslovena potřeba zvažovat i účinky na bezobratlé při současném vystavení většímu počtu látek s odlišným mechanismem působení. Tyto látky mohou společně působit toxičtěji než když jsou podány jednotlivě. To bylo dáno do vztahu s životním prostředím, kde se látky většinou nevyskytují samostatně (Mu, X., 2004).

Dále byly otestovány tyto steroidní látky: **progesteron**, **testosteron**, **gonadotropin** a **diethylstilbesterol**. Dafnie byly vystaveny steroidům 26 dní a sledoval se vliv na pohlaví a vývoj u prvních dvou generacích. Progesteron měl vliv na poměr pohlaví. V druhé generaci významně převyšoval poměr samců nad samicemi, u dalších generací tato odchylka nebyla tak markantní. Testosteron měl vliv na plodnost, která byla značně snížena. Diethylstilbesterol měl vliv na růst, ten byl značně redukován. Naopak účinkem gonadotropinu byl růst významně pozitivně ovlivněn. Svlékání ani produkce vajíček nebyla ovlivněna (Kashian, D., 2004). Dle Baldwin et al. bylo zjištěno, že vysoké dávky **diethylstilbestrolu** ovlivnily reprodukci a růst dafnie, zatímco Kopfem byla objevena snížená reprodukce po vystavení

dafnie **17a-ethynylestradiolu** v rozsahu několika mikrogramů na litr, dle Schweinfurtha et al. nebyl nalezen žádný účinek na dafnii vystavené **17a- ethynylestradiolu** v dávce několika set mikrogramů na litr (Hutchinson, T., 2000a).

Na korýši druhu *Ceriodaphnia dubia* byly testovány **dimery** a **trimery styrenu**. U tohoto druhu byla vlivem chemikálií snižená plodnost (Tatarazako, N., 2002).

Třída: **CIRRIPEDIA (SVIJONOŽCI)**

Řád: **THORACICA (VILEJŠI)**

Na larvách *Balanus amphitrite* byly otestovány dvě estrogenní látky: **4-n-nonylfenol** a **17β-estradiol**. Sledoval se vliv na produkci larválního proteinu (CMP). Tento protein je produkován během larválního a ranného postlarválního vývoje a je strukturálně podobný proteinům, které jsou syntetizovány v zárodku. Tento protein může být proto využit jako biomarker estrogenů. Očekávalo, že estrogenní látky budou mít stimulační vliv na syntézu CMP proteinu. V první studii z roku 1998 byl zjištěn opačný vliv těchto látek na CMP syntézu tj. redukce syntézy CMP a tento účinek nebyl připisován narušení endokrinní soustavy. V druhé studii z roku 2000 bylo sledováno množství proteinu CMP v larvách. Hodnotil se vliv nízkých koncentrací estrogenů na jeho syntézu. Množství proteinu CMP bylo větší než u kontrolních larev, takže se nakonec stimulační vliv prokázal (Billinghurst, Z., 1998, 2000).

Třída: **MALACOSTRACA (RAKOVCI)**

Nadřád: **PERACARIDA (VÁČKOVNÍCI)**

Řád: **MYSIDACEA (VIDLONOŽCI)**

Druhy užívané pro testování jsou *Americamysis bahia* a *Neomysis integer* (DeFour, P., 2004). Testování těchto organismů probíhá ve dvou generacích. Testovaným organismem je *Americamysis bahia*. Dříve na něm byla testována látka **methopren** (Gourmelon, A., 2007). Metopren je analog juvenilních hormonů a používá se jako insekticid, který působí neurotoxicky na larvy komárů. Toto testování je blíže popisované například u McKenney, C., který chtěl zjistit, zda tato látka má nějaký negativní vliv i na další bezobratlé druhy. Při testování se zjistilo, že tato látka má vliv na růst, reprodukci a fertilitu. Velikost vidlonožců byla oproti kontrolním organismům menší, reprodukční cyklus byl delší a samice vyprodukovala nižší počet potomstva (McKenney, C., 1996).

Dnes se využívá pro testování chemických látek jako jsou **fipronil**, **fenoxycarb** a **3,5 dichlorfenol**. Je plánováno na nich ohodnotit i endokrinní aktivitu: **flutamid**, **prochlorazin**, **ketokonazol** a **4-tert- pentylfenol**. U těchto látek byla jejich endokrinní aktivita ověřena již na obratlovcích (Gourmelon, A., 2007).

V akutním testu toxicity byly použity 24 hodin staré larvy *Americamysis bahia* pro otestování **estradiolu -17 β** , **ponasteronu A**, **ekdysonu - α a - β** , **bisfenol A**, **nonylfenol**, **methoprenu a tebufenozidu**. Hodnotila se LC₅₀ po 48 a 96 hodinách. Navíc byl zjištěn efekt na vývoj, růst a reprodukci u estradiolu -17 β . U bisfenolu A byl tento účinek desetkrát větší než u akutního testu na dafniích (Hirano, M., 2004).

Řád: **AMPHIPODA (RŮZNONOŽCI)**

Sladkovodní druh *Hyaella azteca* byl využit pro otestování subletální dávky **17 α -ethinylestradiolu** (syntetického estrogenu). Test probíhal ve více generacích a sledoval se vliv na pohlavní vývoj. Hodnotila se velikost druhých tykadel a histologie pohlavních orgánů samců. V F1 generaci samců vystavených nízkým koncentracím estrogenu byla zjištěna významně menší velikost druhých tykadel oproti kontrolním organismům, ale u vyšších koncentrací estrogenu tato abnormalita byla skryta. Ve všech koncentracích byly pozorovány odchylky v buněčné stavbě samců – zárodečné buňky větší a více kulovité, dutá buněčná struktura a řidší hustota cytoplazmy. Takto popsané odchylky odpovídají morfologické stavbě samičích gonád. Na základě těchto pozorovaných odchylek, byl stanoven hermafroditismus u samců. Zároveň je třeba ale dodat, že koncentrace estrogenu, u nichž byly pozorovány tyto změny byly vyšší než ty, které způsobují nepříznivé účinky u obratlovců a navíc vyšší než ty, které lze najít v prostředí (Vandenbergh, G., 2003).

Na mořském druhu *Corophium volutator* byl testován **4-nonylfenol**. Tato látka měla vliv na růst, který byl inhibován. Tento účinek však nebyl připisován zásahu do endokrinního systému, ale byl ohodnocen jako odpověď na toxickou látku (Brown, R., 1999).

Na blešivci *Gammarus pulex* byly testovány chemické látky **17 α -ethinylestradiol** a **bisfenol A**. Sledoval se vliv na změny v chování před kopulací. Z výsledků testů byla zjištěna větší toxicita 17 α -ethinylestradiolu oproti bisfenolu A. Nebyly však zjištěny žádné významnější odchylky v prekopulačním chování s výjimkou vysokých koncentrací, které se přibližovaly akutně toxickým dávkám. Tato studie neprokázala žádné účinky na endokrinní systém (Watts, M. et al, 2001a). Blešivec byl otestován znovu a tentokrát se Watts, M. et al. zaměřili na změny v populaci *Gammarus pulex*. Ve všech koncentracích bylo oproti

kontrolním organismům množství populace větší. Byl zjištěn vliv i na poměr pohlaví - samičí pohlaví bylo v převaze. Nárůst populace je přisuzován zrychlenému pohlavnímu vývoji samic, jejich převaze a větší produkci nových jedinců. Závěr této studie ohlašuje potřebu otestovat tuto látku i v chronické studii a zjistit vliv na tyto organizmy (Watts, M., 2002).

Nadřád: **EUCARIDA (VELKOKRUNÝŘOVCI)**

Řád: **DECAPODA (DESETINOŽCI)**

U sladkovodního japonského kraba *Geothelphusa dehaani* byla udělaná studie, aby se zjistil vliv kontaminujících látek v řekách na endokrinní systém tohoto živočicha. Mezi významné kontaminující látky patří **tributylcín** a další **látky z průmyslových hnojiv a chemikálií ze spalovacích motorů aut** (hlavně z nafty). Experiment probíhal na deseti řekách kde se odebralo dvanáct vzorků a pozorovaly se pohlavně zralí samci a samice. Pod mikroskopem se hodnotily abnormality pohlavních orgánů. Pohlavní ústrojí u 8-32% samčí populace měla kromě plně vyvinutých samčích orgánů i samičí. U samic se žádné odchylky od normálu neobjevily. Tento fenomén není typický znak, ale příčinný faktor. Četnost abnormalit se s věkem (velikostí) tohoto kraba zvyšovala. To může být dáno i tím, že v dospělosti je krunyř těchto zvířat silnější (10,9mm), kdežto u nedospělých krabů je slabší. Vývoj tohoto druhu trvá tři roky a proto se zde usuzuje na kumulaci škodlivin (Ayaku, T., 2005).

Tento organismus byl zkoumán i Takahashi, T. et al. Zde byla tato abnormalita nalezena také. Vzorky byly odebrány ze čtyřech horských říček. Kvalita vody byla ohodnocena spektrofotometricky, ale nebyly v ní nalezeny žádné významné endokrinně aktivní látky. Četnost této abnormality se mezi jednotlivými říčkami lišila (někde významněji jinde byl nález podobný). Sledování pohlavního ústrojí bylo prováděno pod mikroskopem. Tento autor objevil imposex jak u samců, tak i u samic s proměnlivou četností. Vědci si to nedokázali vysvětlit, protože tady by se teoreticky žádné škodlivé látky neměly dostat a ani nebyly ve vodě nalezeny. Závěr u této studie není jednoznačně vysvětlen (Takahashi, T., 2000). O tomto nalezeném fenoménu se zmínil i vědci Ayaku, T. et al., kteří se domnívají, že tato abnormalita může být způsobena vlivem proudů z jiných řek k těmto čistým říčkám a navíc díky dlouhému životnímu cyklu mohl být tento krab kontaminován již dříve (Ayaku, T., 2005).

Na krevetách *Palaemonetes pugio* a bahenních krabech *Rhithropanopeus harrisi* byl otestován **fenoxykarb, pyriproxifen a metopren**. Do testu byly použity 12 hodin staré larvy.

Postupně byly odebírány vzorky z každého vývojového stádia, ty pak byly usmrceny. Nejprve se sledovalo pod mikroskopem, zda byly svléknuty. Lyofilizací a homogenizací byly extrahovány ekdysteroidní hormony a pomocí ELISA testu byly kvantifikovány. Fenoxycab, pyriproxifen a metopren jsou agonisté JH a měly anti-ekdysteroidní působení na tyto organizmy, což se projevilo redukováním růstem a většina larev krevet i krabů nebyla svléknuta nebo tento proces byl opožděn. U larev krabů byla navíc redukována formace schořápky. Pomocí ELISA testu byly objeveny významné změny ve struktuře volných i konjugovaných ekdysteroidů obou druhů. Úkolem této studie bylo zjistit, jaké mají insekticidní látky vliv na další organizmy, byli zvoleni právě korýši, protože jejich fyziologie je dobře prozkoumána a v minulosti byli hojně užívaní do testů (Tuberty, S., 2005).

Na *Palaemonetes pugio* byl testován i **endosulfan a metopren** a byla u nich zjištěna akutní mortalita a zpožděný zárodečný vývoj (Wirth, E., 2001). Leight, A. et al. udělali dlouhodobou studii s *Palaemonetes spp.*, aby zjistili vliv podezřelých chemikálií z endokrinní aktivity na tyto organizmy. Tento druh je velmi důležitou obživou mnoha dalších korýšů a ryb a byl pozorován jeho úbytek, proto byla tato studie prováděna.

Chemické látky nalezené v regionech, kde sídlí byly: **pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky a kovy**. Byly vybrány čtyři pobřežní oblasti v Jižní Karolině, ze kterých se jednou měsíčně odebíraly po dobu deseti let (1991-2000) vzorky krevet. V laboratoři se určil jejich druh, velikost, poměr pohlaví a počet gravidních samic. Místa vybraná pro studie byla tato: místo obklopeno lesy, urbanizovaná a průmyslová oblast, zemědělská oblast a oblast s golfovými hřišti. Z odebraných vzorků byly zjištěny druhy: *P. pugio* 99,5%, *P. vulgaris* 0,5%. Byl hodnocen dopad z chemikálií na růst, velikost, reprodukční kapacitu a přežití. V zalesněných zátokách byly populace krevet hustší, větší a měly více gravidních samic než v urbanizovaných oblastech. V oblastech, kde se nacházelo golfové hřiště byla hustota krevet snižena, menší velikost a méně gravidních samic. To mělo souvislost s odtokem kovových imisí (převážně Hg) z golfového hřiště do moře. V zemědělských oblastech vlivem pesticidů (endosulfan, azinphosmethyl) je snižené množství samců, gravidních samic a méně vajíček. To bylo dáno především tím, že samci jsou dvakrát více citlivější k působení pesticidních látek než samice. V urbanizovaných oblastech, kde byla pobřeží kontaminována polychlorovanými aromatickými uhlovodíky bylo pozorováno redukované množství gravidních samic a snížený počet samců, navíc zde bylo pozorováno i opožděné svlékání samců (Leight, A., 2005).

Na dospělci a larválním stádiu humra *Homarus americanus* byl testován agonista JH **metopren**. Larvální stádia byla v průtokových podmínkách v mořské vodě vystavena

po sedm dní chemikálii a poté byla ponechána sedm dní v mořské vodě bez metoprenu. Usmrcení humří byli hystopatologicky zkoumáni a pomocí plynové chromatografie bylo analyzováno množství metoprenu pro ohodnocení bioakumulace. Dále byla jejich tkáňová kultura (3HD-glukosamin) využita i do *in vitro* zkoušky a radioaktivně změřeno množství metoprenu. Svlékání bylo nejvíce ovlivněno v druhém larválním stádiu. U dospělců byla pozměněna syntéza chiroproteinu. To se děje přes trávicí trakt, kudy je metopren přijat a zároveň vychytán hepatopankreasem. Účinkem v hepatopankreasu brzdí bílkovinnou syntézu. Tento test byl realizován proto, že v oblastech, kde se sezónně vyskytuje byl zaznamenán jeho rapidní pokles. Hlavním úkolem tohoto testu bylo zjistit do jaké míry úbytek humrů a používání insekticidní látky metopren spolu souvisí (Walker, A.,2005).

Třída: **COPEPODA (KLANONOŽCI)**
Řád: **CALANOIDA (VZNÁŠIVKY)**

Acartia tonsa byla použita pro otestování čtrnácti potenciálních endokrinně aktivních látek zahrnující hormony obratlovců (**17 β -estradiol, estron, testosteron, progesteron**), hormony bezobratlých (**20-hydroxyekdyson, juvenilní hormon-III**), antagonisty hormonů (**flutamid, tamoxifen, hydroxyflutamid**), xenoestrogeny (**17 α -ethinylestradiol, 4-octylphenol, bisfenol A**) a v přírodě se vyskytující polutanty (**nonylfenoethoxylat, diethylftalat**), které mají vliv na metamorfózu larev (vývoj v dospělce). Důležitým bodem této studie byl fakt, že jednotlivé látky měly různorodý účinek na přežití a larvální vývoj. U některých se projevil vliv na sledované koncové body (přiměřené přežívání organismů, jejich rozvoj a reprodukce) již v nízkých koncentracích u jiných byla tato koncentrace v blízkosti letální dávky. Navíc se zjistilo, že látky mající podobný toxický charakter a rozdělovací vodní koeficient nemají stejné účinky na organizmy. Příkladem je flutamid a testosteron, kde flutamid působí velmi výrazně na inhibici růstu oproti testosteronu, který nemá prakticky žádný účinek na růst (Andersen, H., 2001).

Na *Acartia tonsa* byl testován **bisfenol A**. Testování probíhalo pro ohodnocení vlivu na růst 5 dní a pro hodnocení vlivu na reprodukci 12 dní. Při hodnocení vlivu na reprodukci se brala v úvahu produkce vajíček, poměr pohlaví, počet spermií, jejich pohyblivost a délka. Při hodnocení růstu nebyly zjištěny významné odchylky. U reprodukce byla pozorována větší produkce vajíček. (Staples, Ch., 2002).

Na vznášivce *Acartia tonsa* byly v 48-ti hodinovém akutním testu toxicity otestovány **nonylfenol, bisfenol A** a dvě referenční sloučeniny **3,5 dichlorfenolu a dichroman draselný**.

Vznášivky byly vystaveny světelnému režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Důležité bylo, aby teplota byla stále stejná, jakákoli teplotní změna by totiž mohla významně ovlivnit výsledky. Hodnotilo se procento larválního vývoje, poměr pohlaví a produkce vajíček. (Wollenberger, L., 2005).

Řád: **HARPACTICOIDA (PLAZIVKY)**

Na organismu *Amphiascus tenuiremis* byl otestován **fipronil** a byla u něj zjištěna sterilita samců. Příčinou bylo přerušení dozrávání v dospělce schopného reprodukce. Plazivky byly již při vystavení nízkým koncentracím až o 62% menšího vzrůstu (Chander, G., 2004). Dále na něm byl otestován herbicid **atrazin**. Jednalo se o multigenerační chronický test, na kterém byl sledován vliv na reprodukci a vývoj. Byla negativně ovlivněna plodnost životaschopných jedinců a počet nových potomků byl značně redukován. V generaci F0 byl redukován růst samic (s vyšší koncentrací byl vzrůst menší). V generaci F1 byly bez ohledu na dávku všechny samice menšího vzrůstu (Bejarano, A., 2003).

Mořský druh *Nitocra spinipes* byl vystaven estrogením látkám **17 α -estradiolu**, **17 α -ethinylestradiolu**, a **diethylstilbestrolu**. Výsledek testování však neprokázal žádné negativní vlivy na tyto organizmy (Breitholtz, M., 2001).

U mořského klanonožce s životním cyklem 21 dní *Tisbe battagliai* byla objevena inhibice vývoje a reprodukce, který byl vystaven látce **20-hydroxyekdysonu** a **diethylstilbestrolu**. Tento organizmus na rozdíl od testování na jiných bezobratlých neměl žádné významné účinky z vystavení látce **17 α -estradiolu**, **estronu** nebo **17 α -ethinylestradiolu** (Hutchinson, T., 2000a). Plazivka byla užita i v další studii. Testovala se na ní chemická látka **nonylfenol**. Hodnotilo se přežití, poměr pohlaví a plodnost. Ve vysokých koncentracích byla tato látka akutně toxická, naopak při vystavení nízkým dávkám nebyl pozorován účinek žádný (Bechman, R., 1999).

Podkmen: **TRACHEATA (VZDUŠNICOVCI)**
Nadtřída: **HEXAPODA (ŠESTINOŽCI)**
Podtřída: **PTERYGOTA (KŘÍDLATÍ)**
Řád: **DIPTERA (DVOUKŘÍDLÍ)**
Čeleď: **CHIRONOMIDAE (PAKOMÁŘI)**

Sladkovodní druh *Chironomus riparius* byl testoven **bisfenolu A**. Test probíhal na celém životním cyklu. Chemické látky byly vystaveny larvální stádia a hodnotil se vliv na reprodukci, která zahrnuje produkci vajíček, poměr pohlaví a množství životaschopných jedinců. Tato studie však nezahrnovala hodnocení vodního sedimentu, kde se pakomáři líhnou a proto nemůže být použita pro ohodnocení rizika (Staples, Ch., 2002). Na životním cyklu pakomára byl také testován **4-nonylfenol**. Nebyly však zjištěny žádné účinky na produkci vajíček, jejich životaschopnost, čas líhnutí ani na poměr pohlaví. Pouze ve vysokých koncentracích nonylphenylu byla některá vajíčka deformována (Kahl, M., 1997). Dalším autory (Meregalli, G. et al.) byla otestována tato látka na larvách a sledoval se vliv na deformaci úst. U subletálních koncentrací nonylfenolu byla deformace úst pakomárů běžnou záležitostí. U larev však nebyl pozorován žádný významnější vliv na deformaci čelistí a kutikulárních lišt (Meregalli, G., 2001).

Watts, M. et al. otestovali **17 α -ethinylestradiol** a **bisfenol A** na dvou generacích životního cyklu pakomára. V druhé generaci byl ve vyšších koncentracích obou testovaných látek zjištěn opožděný vývoj životního cyklu. Nebyly pozorovány žádné změny v produkci vajíček či jejich životaschopnosti. Jediným zajímavým účinkem byl vliv na poměr pohlaví u druhé generace. Poměr samců a samic byl 2:1. Toto se projevilo s výjimkou nejvyšší koncentrace jen u 17 α -ethinylestradiolu (Watts, M., 2001b). Watts, M. et al. sledovali efekt subletálních dávek **17 α -ethinylestradiolu** a **bisfenolu A** na svlékání a deformaci úst pakomářích larev. U nejvyšších koncentrací obou látek byla pozorována významná redukce hmotnosti larev a opožděné svlékání. Je třeba ale říci, že tato koncentrace byla mnohem vyšší než reálná environmentální a mnohem vyšší než koncentrace, která by způsobila nepříznivý vliv na rybách. Nízké koncentrace způsobily deformaci úst larev, přičemž 17 α -ethinylestradiol měl silnější vliv na deformaci úst než bisphenol A. U vysokých koncentrací vliv na deformaci úst nebyl pozorován (Watts, M., 2003).

Byla na něm testována i pesticidní látka **tebufenozid**. Tebufenozid je analog ekdyteroidního hormonu, který působí na svlékání jako agonista. Byl sledován vliv na vývoj a zárodečnou syntézu. Hahn, T. et al očekávali, že tento agonista urychlí vývoj. Účinek

se projevil až při posledním svlékání, kdy se kukla mění v dospělé. Efekty na tyto organizmy při chronickém testování byly mnohem slabší než se očekávalo z výsledků akutních testů (Hahn, T., 2001).

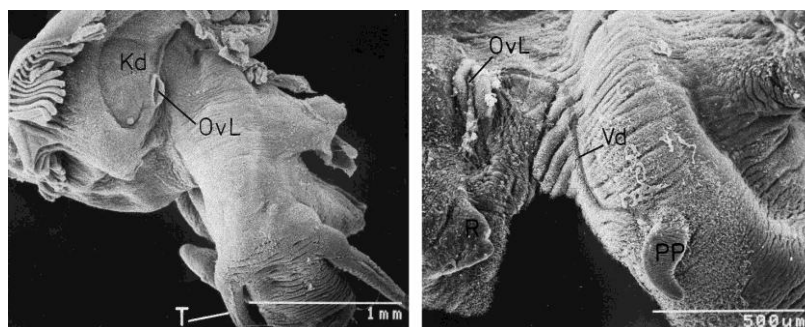
Dále využili pakomáří larvy pro otestování **bisfenolu A** a **4-nonylfenolu** a hodnotili vliv na zárodečnou syntézu a jeho vývoj. Hodnocení bylo založeno na imunoreakci zárodků. Samci vystavení vysokým koncentracím měli redukovanou imunitní reakci na zárodek. Samice s výjimkou nejvyšší koncentrace bisphenolu A nebyly ovlivněny. Tyto výsledky nebyly očekávané, protože obě látky jsou známy tím, že působí na zárodečnou syntézu obratlovců i některých bezobratlých stimulačním mechanismem. Navíc tato reakce nebyla dávkově závislá, protože redukce imunitní reakce zárodku byla ve všech koncentracích stejná (Hahn, T., 2002a).

Relativně krátkodobé vystavení nízké dávce **tributylcínu** redukovalo ekdyteroidní syntézu samičích larev, zatímco u samců byla při vysokých dávkách biosyntéza zvětšená (Hahn, T., 2002b).

4.1.5. Kmen: MOLLUSCA (MĚKKÝŠI)

V reprodukčním hlemýždím testu byl objeven imposex fenomén a jeho vliv na reprodukční schopnosti. Tyto účinky se objevily při podání **tributylcínu** (Gourmelon, A., 2007). Imposex je charakterizován jako nefunkční samčí pohlavní orgán u samic. Je vyvinut penis i chámovody stejně jako samičí pohlavní orgány (obr.7). Závažným problémem tohoto jevu je sterilita samic (Olsson, P., 1998). To může být způsobeno inhibicí aromatázy nebo dalších steroidních prekursorů či přímým dopadem na neurohormony (Rotchell, J., 2003). Při testování bylo navíc objeveno, že počet potomstva může být pozitivně či negativně ovlivňován i estrogenními a androgenními látkami (Gourmelon, A., 2007).

Obr.7: Zdravá samice měkkýše a samice postižená imposexem (Duft, M., www.bio.uni-frankfurt.de/ee)



OvL - samičí pohlavní orgán, PP-penis, Vd-chámovod

Třída: **GASTROPODA (PLŽI)**

Podtřída: **PROSOBRANCHIA (PŘEDOŽÁBŘÍ)**

Na plžích *Maris cornuarietis* (sladkovodní druh) a *Nucella lapillus* (mořský druh) byly otestovány xenoestrogenní látky **bisfenol A** a **oktylfenol**. Délka testu pro *Maris cornuarietis* byla 5 měsíců u dospělé formy a 12 měsíců pro celý vývojový cyklus. Pro *Nucella lapillus* délka testu byla 3 měsíce. Byly pozorovány změny v reprodukčních orgánech obou plžů. Samice *Maris cornuarietis* měly tyto orgány zvětšené a nefunkční a v důsledku toho byla zaznamenána jejich větší úmrtnost. Na samce neměly tyto látky žádné nepříznivé účinky. U druhu *Nucella lapillus* byl pozorován nepříznivý efekt nejen u samic (popsán již výše), ale i na samce (samčí pohlavní orgány byly redukovány) (Oehlmann, J., 2000).

O chemikálii **bisfenol A** se zmiňují i Staples, Ch et al i oni došli ke shodným výsledkům (Staples, Ch., 2002). Shulte-Oehlmann, U. et al otestovali xenoandrogenní látku **trifenylecín** na *Marisa cornuarietis* a na dvou mořských druzích *Nucella lapillus*, *Hinia reticulata*. Experiment trval 4 měsíce. Došlo se k těmto výsledkům: u samic *Marisa cornuarietis* se objevil imposex, samci *Marisa cornuarietis* a *Hinia reticulata* měli redukováné pohlavní orgány a sníženou produkci spermií, u *Nucella lapillus* byl zjištěn kancerogenní efekt na žábry a další orgány v plášťové dutině (Shulte-Oehlmann, U., 2000). Testovaný organizmus *Maris cornuarietis* se díky jeho citlivosti a hojnému rozšíření ukázal být velmi dobrý pro screeningové testy (Oehlmann, J., 2000).

Dále byl otestován sladkovodní šnek *Potamopyrgus antipodarum*. Testovali se na něm **17 α -ethinylestradiol**, **4 tert-octylfenol**, **bisfenol A** a **odpad z kanalizací (změkčovadla, pesticidy)**. Studie trvala 9 týdnů a voda se obměňovala po čtyřech dnech. U těchto estrogenních a xenoestrogenních látek byl objeven vliv na zárodečnou syntézu. Zárodečná syntéza byla díky těmto látkám byla urychlena a v nejvyšších koncentracích byl tento účinek opačný (chemikálie měly inhibiční vliv). Šneci byli pomocí anestezie usmrceni a jejich embrya byla sledována pod stereomikroskopem. Výsledky byly porovnány s testy na rybách. Účinky xenoestrogenních látek na tyto plže se od těch pozorovaných u obratlovců téměř nelišily, a proto je tento šnek navržen pro jejich testování (Jobling, S., 2003).

U ušní *Halotis gigantea* byl pozorován vliv **tributylcínu a tripentylcínu**. Jejich úlovky se rapidně snižovaly a to se stalo podnětem pro jejich sledování. Ušně byly sebrány ze znečištěných lokalit triorganotiny. Pod mikroskopem se sledovaly jejich pohlavní orgány. U samic byla pozorována maskulinizace, neboli imposex. (Horiguchi, T., 2002). *Halotis gigantea* se neukázal být vhodný pro testování (díky jeho velikosti a řídkému výskytu), a proto byl nahrazen ušní *Halotis madaka*. Byly sbírány ve třech lokalitách, test probíhal sedm měsíců a hodnotil se u nich nepříznivý vliv triorganocínů na jejich pohlavní soustavu. Jedna z lokalit byla znečištěna jen nepatrně, to je přisuzováno dvěma faktům: pohlavní dozrávání ušní probíhalo ve stejnou dobu a imposex byl nalezen jen zřídka. Pro úspěšné oplodnění těchto organismů je důležité, aby jejich pohlavní dozrávání probíhalo ve stejnou dobu, k oplodnění vajíčka totiž dochází ve vodě. V dalších dvou oblastech byl výskyt imposexu četnější a pohlavní dozrávání obou pohlaví probíhalo v odlišnou dobu, nebo bylo úplně potlačeno. Závěr této studie je takový, že triorganocíny negativně ovlivňují správný vývoj ušní a to má za následek jejich úbytek a menší úlovky (Cho, H., 2000).

Třída: **BIVALVIA (MLŽI)**

Na sladkovodní slávce *Elliptio complanata* byla udělána rozsáhlá studie a pozoroval se vliv xenoestrogenů: **17 β -estradiol (estradiol)**, **17 β -hydroxyl-4-androsten-3-on (testosteron)**, **3-pregmen-3,20-dion**, **5 α -androsten-3b**, **17b-diol (progesterony)** a **5b-cholestan-3b-ol (coprostanol)**. Slávky byly odebrány v předjaří ze dvou rybníků v blízkosti vojenské základny v Massachusetts. Udržovaly se v klimatických laboratorních podmínkách (dvanáctihodinové intervaly světla a tmy, definované teplotní podmínky). Xenoestrogeny byly aplikovány injekčně do nohy či přitahovače svalů a jejich

aplikace se opakovala v týdenních intervalech, experiment trval 30 dní. V této studii byly použity i kontrolní organizmy. Poté byly tyto mlži usmrceni a pod světelným mikroskopem se hodnotily změny v pohlavních orgánech. U části živočichů byl zjištěn hermafroditismus (vajíčka obalena testikulární tekutinou se spermatem). Dále byla provedena histologická zkouška a elektroforeticky se zjišťovala přítomnost proteinů v ovocytech, spermatu a zárodcích. Molekulová hmotnost jednotlivých nalezených proteinů sloužila jako bioindikátor a na tomto základě se hodnotily změny ve vývoji zárodku. Vzorky odebrané z vojenské základny byly podrobeny i emisní spektrofotometri spojenou s indukcí přítomnosti kovů (Cd, Cr, Cu, Zn, Ni). U organizmů kontaminovaných kovy bylo nalezeno významnější množství Cd a větší glutathion S transferázová aktivita. Při této studii však nebyly objeveny žádné významnější změny v zárodečné syntéze (Won, S., 2005).

Gagne, F et al. provedli svůj obdobný experiment s podobnými podmínkami, jak bylo již popsáno výše, ale výsledky se lišily. *Elliptio complanata* byla vystavena relativně nízkým koncentracím **estradiolu-17b a coprostenolu**. Délka testu byla 72 hodin. Elektroforeticky se hodnotil efekt těchto xenoestrogenů na vývoj a syntézu zárodků. Sledoval se alkalicky labilní fosfoprotein, který v přítomnosti xenoestrogenů byl významně ve vyšší koncentraci a syntéza a regulace zárodků byla díky tomuto proteinu více stimulována (Gagne, F., 2001a, b).

Sedmidenní larvy ústřic *Crassostrea giga* byly vystaveny po 48 hodin **nonylfenolu** a hodnotil se vliv na endokrinní systém. Již v environmentálně významných koncentracích měl nonylfenyl vliv na poměr pohlaví, kde byl oproti kontrolním organizmům větší poměr samic, zvýšený výskyt hermafroditismu a vliv na vývoj životaschopných gamet, embryonální a larvální druhé generace (Nice, H., 2003). Byl na něm otestován i **estradiol** a bylo zjištěno, že má vliv na zárodečnou syntézu. Tento proces je díky estradiolu urychlen (Won, S., 2005), (Li, Q., 1998).

Tento experiment je popsán i v jiné studii spolu s *Thais clavigera*, kde vlivem **tributylcínů** a dalších kontaminujících látek jakými jsou **průmyslová hnojiva a chemikálie ze spalovacích motorů** vznikl a byl pozorován imposex u samic (Ayaki, T., 2005). V Brazílii byla udělána studie s *Thais rustica* a sledoval se vliv **organocínů** na jejich reprodukční systém. Z osmi míst, kde se vzorky plžů odebíraly byla v laboratořích změřena jejich délka. Následně byly usmrceny a zkoumány pod mikroskopem. Pohlaví se určovalo z přítomnosti spermatu a sledovala přítomnost imposexu u samic. Hodnocení imposexu bylo rozděleno do sedmi oddílů, od zdravé samice až po plně vyvinuté pohlavní orgány samců u samic s prokázanou sterilitou. Nejvíce postižené oblasti byly ty, které se nacházely v blízkosti

městských částí. Vody v těchto lokalitách byly organocíny nejvíce znečištěny. Díky tomu byl *Thais rustica* přijat jako dobrý bioindikátor pro sledování znečištění (DeCastro, I., 2004).

4.1.6. Kmen: ECHINODERMATA (OSTNOKOŽCI)

Hrají klíčovou roli v mořském ekosystému a navíc jsou přímo vystaveny antropogenním látkám a ty mají vliv na jejich fyziologické funkce - reprodukci a vývoj (Gual, J., 2005).

Třída: **CRINOIDEA (LILJICE)**

Na *Antedon mediterranea* byly testovány **polychlorované bifenyly (PCB), nonylfenol a organocíny**. Sledovaly se účinky z vystavení po sedmi dnech a po dvou týdnech. Výsledky se hodnotily na celém organismu, tkáních a buněčné úrovni. Byly použity mikroskopické a makroskopické metody (chemický rozbor, bioanalýza s využitím klasické metody světla LM, elektromikroskopie, imunocytochemie). Hodnotily se anomálie v regeneračních časech, vliv na celkový růst a hlavní morfologické, histologické a buněčné znaky. Bylo objeveno, že tyto látky mají primárně vliv na růst. Tempo růstu bylo rapidně zrychlené. Navíc při regeneraci je sekundárním důsledkem těchto látek přeskupená stavba tkáně a buněk. Tyto studie byly uzavřeny tak, že chemikálie se v ostnokožcích kumulují a mají pseudoendokrinní účinky (způsobí steroidní dysfunkci, vliv na výměnu látek, účinek na vývoj, růst a reprodukci) (Carnevali, M., 2005).

Třída: **ECHINOIDEA (JEŽOVKY)**

Paracentrotus lividus je využíván komerčně v Atlantickém a Středozezemním oceánu, hlavně v první fázi vývoje je velmi citlivý k mnoha polutantům - **PCB, nonylfenol, organocíny**.... a toho se s výhodou využívá pro testy embryotoxicity (Gual, J., 2005).

4.2. Rostliny použité pro testování

Testované organizmy jsem zařadila do systému podle Rozsypala (Rozsypal, S., 2003).

Říše: **PLANTAE (ROSTLINY)**

4.2.1. Oddělení: CHLOROPHYTA (ZELENÉ ROSTLINY)

Třída: **CHLOROPHYCEAE (ZELENIVKY)**

Sladkovodní řasa *Selenastrum capricornutum* byla vystavená chemické látce **bisfenol A**. Doba experimentu trvala 96 dní. Hodnotilo se množství buněk a celkový objem buněk a růst. Nebyl prokázán žádný vliv (Staples, Ch., 2002).

Říše: **CHROMISTA**

4.2.2. Oddělení: CHROMOPHYTA (CHROMOFYTA)

Třída: **BACILLARIOPHYCEAE (ROZSIVKY)**

Pro test byl použit mořský druh *Skeletonema costatum* a byl na něm testován **bisfenol A**. Doba vystavení byla také 96 dní. Hodnotilo se množství buněk, celková koncentrace chlorofylu a růst. Ani u této rostliny nebyl prokázán žádný vliv na růst (Staples, Ch., 2002).

5. VYUŽITÍ NIŽŠÍCH ORGANISMŮ PRO TESTOVÁNÍ LÉČIV



Léky mají nezbytnou roli pro lidi i zvířata v léčbě a prevenci různých onemocnění (Boxall, A., 2004). Podávání léků zvířatům je nezbytné pro ochranu zdraví zvířat, pro předcházení hospodářským ztrátám a pro zabezpečení nezávadnosti potravin pro lidi (Capleton, A., 2006). Problém je ale ten, že s těmito žádoucími účinky mohou působit i negativně. Mohou ovlivňovat životní prostředí, mikroorganismy i ostatní zvířata. Tato jejich vlastnost se jinými slovy nazývá **biologická aktivita**. Nežádoucí účinky pro člověka jsou vždy sledovány a zkoušeny, ale na odběr vzorků a otestování těchto látek v přírodě a v životním prostředí není kladen takový důraz, jaký by měl být (Boxall, A., 2004).

Potenciál rizika přidružený s průnikem léků do životního prostředí se stává důležitou záležitostí. Touto problematikou se zabývají orgány se zaměřením na životní prostředí, ale i samotný farmaceutický průmysl. Zájem byl podpořen i rozšířeným objevem léků ve vzorcích odebraných z přírody. Tomu přispělo i zlepšení analytických metod a rozšíření činností ve výzkumné oblasti (odběry vzorků vody ve Velké Británii, kontinentální Evropě a Severní Americe). Díky kapalinové chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC MS- MS) je možné lépe porozumět tomu, jak se léky chovají v prostředí a určit koncentrace v čističkách odpadních vod, v půdě, v povrchové vodě a podzemní vodě (Boxall, A., 2004). Všechny tyto průzkumy ukázaly přítomnost mnoha různých skupin léků, z nichž některé jsou známy tím, že v prostředí zůstanou trvale. Je to hlavně díky vysoké polaritě a nízké těkavosti většiny léků (Crane, M., 2006). Z prováděných výzkumů povrchových a podzemních vod byla zjištěna přítomnost antibiotických zbytků z přípustných veterinárních přípravků (sarafloxacin a sulfametazin). Tyto zbytky pocházely z umělého hnojení, získaného

z drůbeží a prasečí farmy. Tímto zjištěním bylo demonstrováno, že hnůj užívaný jako umělé hnojivo pro plodiny by mohl sloužit jako zdroj biologicky aktivních látek z veterinárních léků v prostředí (Capleton, A., 2006). Nedávné studie objevily přítomnost širokého okruhu léků v půdách, povrchových vodách a podzemních vodách, které jsou biologicky aktivní. Velikým problémem se stalo užívání hormonální antikoncepce, která je známá svým negativním vlivem na endokrinní systém, jak již bylo zmíněno výše. Dále je třeba zmínit i antibiotika a cytostatika. Nedávným průzkumem bylo zjištěno, že nejvíce používané léky jsou acetylamínofen, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, naproxen a karbamazepin. Z veterinárních léků to jsou antibiotika, antifungicidní látky a antiprotozoika, která jsou užívána v akvakultuře i v zemědělství (Boxall, A., 2004). Mezi další užívané léky patří kokcidostatika ekto- a endo-antiparazitika, hormony a imunologické produkty (Capleton, A., 2006). Číselné odhady antibiotik užívaných v zemědělství se v USA vyšplhají na 8.5 až 11.2 milionů kilogramů ročně (Boxall, A., 2004).

Ve Velké Británii, kde jsou antibiotika přípustná pro použití jako veterinární léky bylo

- 456 tun bakteristatik biologicky aktivních z 87–93% použité do krmných směsí
- 241 tun biologicky aktivních kokcidostatik
- 36 tun biologicky aktivních antimikrobiálních růstových hormonů
- 2 tuny biologicky aktivních antiprotozoik

Z antibiotik bylo nejvíce užíváno tetracyklinů 46% (212 tun), trimetoprim/sulfonamidy 20% (89 tun), laktamy 14% (62 tun), aminoglikosidy 4.6% (21 tun) a makrolidy 13% (60 tun) (Capleton, A., 2006).

Cesty léku do prostředí jsou různé

Léky se do prostředí dostávají ve formě aktivních farmaceutických přísad, buď jako originální lék nebo jeho metabolity, mohou být uvolněny do prostředí a být přítomny ve velmi nízkých, ale zjištěných koncentracích (Cunningham, V., 2006). Mohou se do prostředí dostat těmito cestami:

- Zbytky léků uvolněné během výrobního procesu mohou prostoupit povrchovými vodami
- Humánní léky se metabolizují a poté vylučují do kanalizace

- Antibakteriální látky použité v akvakultuře se dostávají do povrchových vod přímo
- Veterinární léky pro pastvinová zvířata jsou vyloučeny do půdy či povrchové vody
- Emise z nepoužitých léků a nádob
- Výkaly ošetřených zvířat, z nich se léky dostanou do zemědělské půdy přímo či přes hnůj a jílovou kaši

Vstup veterinárních a humáních medikamentů do životního prostředí je odlišný. U veterinárních léků jsou tyto cesty různorodé, jak přímé a nepřímé, tak bodové i rozptýlené zdroje. Na rozdíl od veterinárních léků se léky humánní dostanou do vodního prostředí z čištěné odpadní vody jako bodový zdroj propuštění a toto vystavení může proto být v nepřetržitých nízkých koncentracích (Crane, M., 2006). Humánní léky projdou nejprve čističkou odpadních vod. Veterinární léky se dostanou na rozdíl od humánních hned do půdy a povrchových vod (Boxall, A., 2004).

Osud léků v prostředí a ohodnocení rizika

Jedna ze studií popisuje výskyt biologicky aktivních látek v přírodě, jejich užití a toxikologický profil. Léky podané v akvakultuře či ve stádě značí vyšší potenciál rizika než léky podané jednotlivým zvířatům individuálně. I způsob podání léku hraje důležitou roli pro únik do prostředí. Dalším faktorem, který ovlivní potenciál rizika, je i metabolizace léku v organismu. V jakém množství jsou léčiva užívána se odrazí i na potenciálu znečištění prostředí těmito léky. Ty, která jsou používána nejvíce, mají nejvyšší potenciál znečištění. Toxikologické vlastnosti veterinárních biologicky aktivních léků byly definovány řadou parametrů, které zahrnují: přijatelná denní dávka, řada koncových bodů považované za zvlášť významné: potenciál pro bioakumulaci a přítomnost biologicky aktivních metabolitů. Tato kritéria byla vybrána s ohledem na možnost vystavení lidskému organismu. Při vystavení přes potravní řetězec či skrz vodu by byla jen velmi nízká chronická expozice. Zvláštní důraz byl dán na přijatelnou denní dávku, obecně populaci vystavené opětovně bez rizika ublížení. Největším rizikem pro prostředí a také zpětně pro člověka jsou léky, kde není známa přijatelná denní dávka a další parametry. Bylo vybráno osm koncových bodů z veterinárních léků a byla zhodnocena jejich biologická aktivita, které mohou způsobit přímé škodlivé účinky na člověka. Větší důraz byl dán na vážnější koncové body jako jsou mutagenita a kancerogenita (Capleton, A., 2006). Byla vybrána skupina látek, která

je považována za nejvíce rizikovou a zároveň nejvíce používanou. Jsou roztříděny do čtyř skupin podle závažnosti – látky s vysokým rizikem, středním, nízkým a neznámým. Biologicky aktivní látky spadají do kategorie s vysokým rizikem. U těchto látek se předpokládá, že bude nejvyšší potenciál pro dopad na lidské zdraví. To je způsobeno nepřímým vystavením těchto látek celé populaci a z tohoto důvodu představují nejvyšší prioritu pro detailní odhad rizik. Bylo vybráno celkem 83 veterinárních biologicky aktivních látek, z toho je 12 léčebných indikací a 26 chemických látek. Z toho 13 biologicky aktivních látek bylo zařazeno do kategorie vysoká priorita pro detailní odhad rizika, 19 jako střední, 5 nízká a 46 jako velmi nízká (Capleton, A., 2006). U jednotlivých biologicky aktivních látek byly sečteny toxikologické účinky a číselně ohodnoceno celkové toxikologické skóre. Podle získaných čísel dělíme toxikologický potenciál:

| Toxicita | Stupeň toxicity |
|----------|-----------------|
| <19 | Nízký |
| 19–23 | Střední |
| ≥24 | Vysoký |

Osud a chování biologicky aktivních léků v prostředí je ovlivněno fyzikálně chemickými vlastnostmi látek obsažených v půdě a dále na povaze prostředí. Příkladem mohou být tetracykliny, které mají silnou vazbu k půdě a proto je téměř nenajdeme v povrchové či podzemní vodě. Na rozdíl od toho jsou sulfonamidy rychle dopravovány k povrchovým vodám. Tento proces je závislý na půdním druhu. Sulfonamidy se velmi rychle dostávají k povrchovým vodám z jílovitých půd, ale ne z písčitých. Lépe se do povrchových vod také dostávají z pohnojených pastvin než z pohnojeného orného pole (Boxall, A., 2004). Do testování se také bere v úvahu možnost zpětné kontaminace těmito látkami z prostředí, ale nebyly zjištěny žádné významné údaje. Nepřímé riziko pro člověka může ale být dáno konzumací:

- **podzemní a povrchové vody** kontaminované biologicky aktivními veterinárními látkami
- **plodin** k nimž se tyto látky dostaly z půdy
- **ryb** ošetřených v akvakultuře
- **zvířat**, u kterých se tyto látky nahromadily přes potravní řetězec (Boxall, A., 2004)

Vyhodnocení a odhad rizika pro prostředí:

Podle Cunningham, V. L. et al do odhadu rizika pro prostředí je třeba zahrnout jak potenciální vystavení, tj. rozsah vodních organismů, ke kterým se dostane aktivní látka a potenciální efekt, tj. zda jsou aktivní látky přítomny a na jaké úrovni mohou ovlivnit vodní organismy. V praxi odpověď přírody na přítomné separace léčiv zahrnují předpovězenou environmentální koncentraci (PEC) a předpovězenou koncentraci s nulovým efektem (PNEC). PEC je založená na fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech látek, stejně jako hydrologické informace o odpadních vodách a povrchových vodách. PNEC odhaduje koncentrace léků, ve kterých by se mohli vyskytovat potenciální účinky na vodní organismy a ekosystém. Obecně platí, jestli PEC je méně než PNEC ($PEC/PNEC < 1$), environmentální riziko je považované za přijatelné (Cunningham, V., 2006).

Na základě těchto faktů byly vyvinuty a realizovány chronické toxikologické testy na vodních organizmech. Evropská léková agentura EMEA díky těmto novým poznatkům vypracovala návody k postupům pro testování lidských léků chronickými vodními testy toxicity (Crane, M., 2006).

5.1. Chronické testy toxicity

Chronické testy toxicity jsou studovány na organizmech, které jsou vystavené různým koncentracím chemických látek a pozorované dlouhodobě či značnou část jejich střední délky života. Na rozdíl od akutních testů toxicity, kde se sleduje letalita, se u chronických testů toxicity sleduje kromě letality ještě reprodukční schopnost a růst. Nejjasnější důkaz pro potenciální nepříznivé účinky z lidských léků, které se dostávají do vodního prostředí je pro přirozené a syntetické steroidy, zvláště perorální antikoncepce 17a-ethinylestradiol. Údaje o chronické toxicitě jednotlivých skupin léků, zkoumaných na řasách, bezobratlých a rybách, jsou shrnuty v následující tabulce. Jsou seskupeny dle mechanismu účinku, terapeutické skupiny, substance a systematické skupiny (Crane, M., 2006).

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|------------------------------------|-------------------|---|----------------------|----------------------------|---|---------------------------------|
| Androgen (steroid) | Methyltestosteron | Transkripční aktivita androgenu v cílovém místě v různých cílových genech | Ryby | <i>Carassius carassius</i> | 0.00001 | |
| | | | | <i>Oryzias latipes</i> | < 10.0 ng/l | > 1,000,000 |
| | | | | <i>Pimephales promelas</i> | 0.01 | |
| | | | Bezobratlí (plž) | <i>Lymnaea stagnalis</i> | 1.0 ng/l | |
| | | | | <i>Marisa cornuarietis</i> | < 100 ng/l | |
| Anti-androgen (nesteroidní hormon) | Bicalutamid | Blokace a ochrana testosteronu před vazbou na receptor na povrchu rakovinové buňky prostaty | Řasy (sinice) | Nespecifikované | 1 | |
| | | | Řasy (zelené) | | 1 | |
| Anti-androgen (nesteroidní hormon) | Flutamid | Inhibice androgenu indukující genovou aktivitu | Ryby | <i>Oryzias latipes</i> | 1.0 | 3.6 |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|-----------------------------|--------------|---|----------------------|--------------------|---|---------------------------------|
| Antibiotika | Trimethoprim | Zásah do syntézy kyseliny listové v bakterii a reversibilní inhibice enzymu dihydrofolát reduktázy | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| Antibiotika (aminoglykosid) | Neomycin | Ireversibilní vazba na 30S ribozom, vytvoření komplexu (30S-mRNA-tRNA) takto není možná žádná další syntéza; dojde ke zpomalení syntézy bílkovin, která zahájí a navodí chybné čtení mRNA | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Streptomycin | | | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|------------------------------|---------------|--|----------------------|--------------------|---|---------------------------------|
| Antibiotika (cefalosporin) | Cefalexin | Zásah do syntézy peptidoglykanu z bakteriální buněčné stěny, která brání vzniku finálnímu transpeptidoglykanu nutného pro příčné vazby | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Loracarbef | | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 13 | |
| Antibiotika (fluorochinolon) | Ciprofloxacin | Inhibice DNA gyrázy | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.106 (EC10) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|------------------------------|--------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Antibiotika (fluorochinolon) | Levofloxacin | Inhibice DNA gyrázy | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.013 (EC10) | |
| | Lomefloxacin | | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 2.0 | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.008 (EC10) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.206 (EC10) | |
| | Norfloxacin | | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 0.005 | |
| | Ofloxacin | | Řasy (rozsivka) | <i>Cyclotella meneghiniana</i> | 0.0312 | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 2.5 | |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 12.5 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 10.0 | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.121 (EC10) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|---------------------------|---------------|--|----------------------|-----------------------|---|---------------------------------|
| Antibiotika (makrolidová) | Erythromycin | Inhibice bílkovinné syntézy vazbou na 23S rRNA molekulu (v50S podjednotce) bakteriálního ribozomu, blokádu výstupu rostoucího peptidového řetězce citlivého mikroorganismu | Rostlina (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Lincomycin | | | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Roxithromycin | | | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Tylosin | | | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| Antibiotika (penicilin) | Amoxicillin | Inhibice příčné vazby mezi lineárním polymerním řetězcem peptidoglykanu, který tvoří hlavní složku buněčné stěny G ⁺ bakterie | Bezobratlí (žahavec) | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|--------------------------|---------------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Antibiotika (sulfonamid) | Sulfadimethoxin | Inhibitor syntézy kyseliny listové | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.044 (EC10) | |
| | Sulfamethazin | | | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Sulfamethoxazol | | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 0.0059 | |
| | | | Řasy (rozsivka) | <i>Cyclotella meneghiniana</i> | 1.25 | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 0.09 | |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 25.0 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.25 | |
| | Sulfochlorpyridazin | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.011 (EC10) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|---------------------------|------------------|---|----------------------|---------------------------|---|---------------------------------|
| Antibiotika (tetracyklin) | Chlortetracyklin | Inhibice syntézy bakteriální proteinu, zabránění aminoacyl-tRNA s bakteriálním ribozomem | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.036 (EC10) | |
| | Doxycyklin | | | <i>Lemna gibba</i> | 0.055 (EC10) | |
| | Oxytetracyklin | | | <i>Lemna gibba</i> | 0.788 (EC10) | |
| | | | | <i>Lemna minor</i> | 4.92 (EC50) | |
| | Tetracyklin | | | <i>Lemna gibba</i> | 0.23 (EC10) | |
| Antidepressiva (SSRI) | Citalopram | Selektivní účinek na zpětné vychytávání serotoninu, to způsobí počáteční zvýšení serotoninu v těle buněk a dendritech, ne v nervových výběžcích | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.8 | 4.9 |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|-----------------------|------------|---|----------------------|---------------------------|---|---------------------------------|
| Antidepressiva (SSRI) | Fluoxetin | Selektivní účinek na zpětné vychytávání serotoninu, to způsobí počáteční zvýšení serotoninu v těle buněk a dendritech, ne v nervových výběžcích | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 0.001 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Hyalella azteca</i> | > 43 mg/kg | |
| | | | | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.056 | |
| | | | | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.089 | 5.7 |
| | Fluvoxamin | | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 31 | |
| | Paroxetin | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.366 | 2.3 |
| | | | | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.22 | 2.8 |
| | | | | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.009 | 13.3 |
| | Sertralin | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Sertralin | | | | | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|-------------------------------------|--------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Perorální antidiabetika (biguanidy) | Metformin | Mohou aktivovat AMP-kináza (AMPK) v jaterních buňkách, vedoucí k zvýšené oxidaci mastných kyselin a absorpci glukózy do buněk a snížení lipogeneze a produkce glukózy játry | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | >320.0 (EC50) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 110.0 (EC50) | |
| Antiepileptika | Karbamazepin | Blokáda napětově řízených sodíkových kanálů | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 17.0 | |
| | | | Řasy (rozsivky) | <i>Cyclotella meneghiniana</i> | 10.0 | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 74.0 (EC50) | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | > 100.0 | |
| | | | Ryby | <i>Danio rerio</i> | 25 | |
| | | | Bezobratlí (hmyz) | <i>Chironomus riparius</i> | 0.625 mg/kg | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|--|--------------|--|-------------------------|--|---|---------------------------------|
| Antiepileptika | Karbamazepin | Blokáda napěťově řízených sodíkových kanálů | Bezobratlí (kroužkovci) | <i>Lumbriculus variegatus</i> | > 10 mg/kg | |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 0.377 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.025 | 3108 |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| <i>Lemna minor</i> | 25.5 (EC50) | | | | | |
| Antihyperlipidemika (inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáza) | Atorvastatin | Kompetitivní inhibitor HMG-CoA reduktázy | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | 0.085 (EC10) | |
| Anti-hyperlipoproteiny | Klofibrát | Induktor lipolýzy lipoproteinů a jaterní mastné kyseliny a snížení produkce jaterních triglyceridů | Řasy | Nespecifikované | 5.4 (EC10) | |
| | | | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 23.5 | |
| | | | Řasy (rozsivky) | <i>Cyclotella meneghiniana</i> | > 100.0 | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 115.0 (EC50) | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 75.0 | |
| | | | Ryby | <i>Danio rerio</i> | 70 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|--------------------------|------------|--|-------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Anti-hyperlipoproteiny | Klofibrát | Induktor lipolýzy lipoproteinů a jaterní mastné kyseliny a snížení produkce jaterních triglyceridů | Bezobratlí (hmyz) | <i>Chironomus riparius</i> | > 8 mg/kg | |
| | | | Bezobratlí (kroužkovci) | <i>Lumbriculus variegatus</i> | > 8 mg/kg | |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 0.246 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.64 | > 312 |
| | | | | <i>Daphnia magna</i> | 0.01 | 1428 |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 12.5 (EC50) | |
| Anti-hypertenziva | Losartan K | Antagonista angiotensinu II | Řasy (sinice) | Nespecifikované | 556 | |
| | | | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 143 | |
| Anti-hypertenziva (ACEI) | Kaptopril | Inhibice obíhajícího i tkáňového angiotensin konvertujícího enzymu | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 168.0 (EC50) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 25.0 (EC50) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|---|--------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Protizánětlivý (kortikosteroid) | Budesonid | Snížení počtu eozinofilů inhibicí jejich odvodu, podporují uvolnění a odpadnutí strupu | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 10 | |
| Antiprotozoika | Metronidazol | Přerušení DNA šroubovice, tím brání syntéze bakteriální nukleové kyseliny | | <i>Chlorella sp.</i> | 2.03 (EC10) | |
| | | | | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 19.9 (EC10) | |
| Antipsychotika | Risperidon | Vazba na dopamin D2, 5-HT2 a α2 adrenergní hormony v mozku | Řasy (sinice) | Nespecifikované | < 100.0 | |
| | | | Řasy (zelené) | Nespecifikované | < 10.0 | |
| Anxyolytikum, myorelaxans (benzodiazepin) | Diazepam | Vazba na benzodiazepinový receptor, zesilující GABA efekt, zvláště v limbickém systému, talamu a hypotalamu | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | < 0.01 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|--|------------|--|----------------------|----------------------------|---|---------------------------------|
| Inhibitor aromatázy | Fadrozol | Inhibice P450 aromatázy | Ryby | <i>Pimephales promelas</i> | 0.002 | |
| Lék benigní hypertrofie prostaty (inhibitor 5 α -reductázy) | Finasterid | Blokace enzymu 5 α -reductázy konvertující testosteron na DHT | Řasy (zelené) | Nespecifikované | ≥ 49 | |
| Inhibitor resorpce kostní tkáně | Alendronat | Preferuje vazbu pod osteoklasty, který přijme alendronát, alendronát pak uvolní inaktivované osteoklasty | | Nespecifikované | 0.5 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|---------------------------------|----------------|--|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Inhibitor resorpce kostní tkáně | Kys.etidronová | Inhibice aktivity alkalické fosfatázy;brání intramembranóznímu transportu Ca ²⁺ ; je aktivní jako surfaktant pro matrix vezikul; inhibice syntézy kolagenu nebo glykosaminoglykanu a potlačení rozkladu proteoglykanu | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 1.3–13.2 | 43.9 |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Daphnia magna</i> | > 12.0 | |
| Inhibitor resorpce kostní tkáně | Tiludronat | Inh.osteoklastů:porušení cytoskeletární kruhové struktury, možná inh. protein-tyrosin fosfatázy, to vede k oddělení osteoklastů od kostního surfaktantu a inh. osteoklastové protonové pumpy | Řasy (sinice) | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 13.3 (EC50) | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 36.6 (EC50) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|------------------------------------|-----------|--|----------------------|-----------------------|---|---------------------------------|
| Blokátor kalciového kanálu | Amlodipin | Inhibitor influxu vápníkových iontů (pomalý blokátor kanálu nebo antagonist Ca ²⁺ iontů), který inhib. transmembránový influx vápníkových iontů do srdečního a hladkého svalu | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | < 0.01 | |
| Kardiotonikum (náprstník lékařský) | Digoxin | Inhibice sodíko-draslíkové ATPasy, která reguluje množství sodíku a draslíku uvnitř buněk | | | < 0.01 | |
| Stimulancia CNS | Kofein | Vazba a blokace adenosinových receptorů | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| Cholinergní agonista | Nikotin | Vazba na nikotin.receptoryusnadňující uvolnění Ach, dopamin, glutamát | Bezobratlí (korýš) | <i>Daphnia pulex</i> | < 0.07 | 42.9 |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|----------------------------|--|---|----------------------|----------------------------------|---|---------------------------------|
| Diuretika | Bendroflumethiazid | Zásah do renálního tubulárního mechanismu reabsorpce elektrolytů | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| Diuretika (kličková) | Furosemid | Inhibice Na ⁺ /K ⁺ -Cl kotransportního systému umístěného v ascendentní části Henleovy kličky | | | > 0.01 | |
| Metabolit nikotinu | Kotinin | Možný podobný mechanismus působení jako nikotin | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| Nesteroidní antiflogistika | Acetaminofen (paracetamol) | Inhibice syntézy prostaglandinů | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | Acetylsalicylicilová kyselina(aspirin) | | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| | | | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| | Diklofenak | | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 10.0 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|----------------------------|------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Nesteroidní antiflogistika | Diklofenac | Inhibice syntézy prostaglandinů | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 72.0 (EC50) | |
| | | | | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 10.0 | |
| | | | Ryby | <i>Danio rerio</i> | 4 | |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 12.5 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 1.0 | 22.7 |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 7.5 (EC50) | |
| | Ibuprofen | | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 315.0 (EC50) | |
| | | | | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| | | | Bezobratlí (plži) | <i>Planorbis carinatus</i> | 1.02 | 1.68 |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna gibba</i> | > 1.0 (EC10) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 22.0 (EC50) | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|---|---------------------------|---|----------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Nesteroidní antiflogistika | Naproxen | Inhibice syntézy prostaglandinů | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | >320.0 (EC50) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 24.2 (EC50) | |
| Nesteroidní antiflogistika (metabolit aspirinu) | Kyselina gentisová | | Bezobratlí (korýš) | <i>Daphnia longispina</i> | 0.32 | 1070 |
| | | | | <i>Daphnia magna</i> | 0.32 | 1258 |
| | <i>Daphnia longispina</i> | | | 84.5 | > 21 | |
| | <i>Daphnia magna</i> | | | 186.0 | > 9.7 | |
| | Salicylová kyselina | | | <i>Daphnia longispina</i> | 5.6 | 205 |
| <i>Daphnia magna</i> | | | | > 10.0 | < 195 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|----------------------|---|--|----------------------|-----------------------------|---|---------------------------------|
| Estrogeny | 17β-oestradiol | Vazba na estrog. receptor, inhib. ovulace, potlačení střední cyklické vlny luteinizačního hormonu, zhuštění cervik. hlenu vytváří bariéru pro sperma, a mění charakter děložní sliznice, která není způsobilá k oplození | Ryby | <i>Oryzias latipes</i> | 10 ng/l | 390,000 |
| | Diethylstilbestrol (nesteroidní) | | Ryby | <i>Oryzias latipes</i> | 10 ng/l | 140,000 |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Nitocra spinepes</i> | 0.003 | 97 |
| | | | | <i>Tisbe battagliai</i> | 0.01 | < 10 |
| | | | | <i>Daphnia magna</i> | 0.062 | 17.6 |
| | Ethinylestradiol | | Řasy | Nespecifikované | 0.054 (EC10) | |
| | | | Ryby | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | < 0.1 ng/l | |
| | | | | <i>Oryzias latipes</i> | < 0.3 ng/l | |
| | | | | <i>Pimephales promelas</i> | 1 ng/l | 150,000 |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Hyaella azteca</i> | 0.0001 | |
| | | | | <i>Nitocra spinepes</i> | 0.05 | 10.2 |
| | | | Bezobratlí (plži) | <i>Bithynia tentaculata</i> | < 0.125 ng/l | |
| | | | | <i>Lymnaea stagnalis</i> | < 1.25 ng/l | |
| | | | Bezobratlí (plži) | <i>Marisa cornuarietis</i> | < 1.0 ng/l | |
| | Bezobratlí (korýš) | | <i>Daphnia magna</i> | 0.01 | 570 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|--------------------------|------------------|--|----------------------|-------------------------|---|---------------------------------|
| Estrogeny | Estradiol | Vazba na estrog. receptor, inhib. ovulace, potlačením střední cyklické vlny luteinizačního hormonu, zhuštění cervik. hlenu vytváří bariéru pro sperma a mění charakter děložní sliznice, která není způsobilá k oplození | Bezobratlí (korýš) | <i>Nitocra spinepes</i> | 0.16 | 10 |
| Stimulancia peristaltiky | Cisaprid | Zesílení uvolňování acetylcholinu v myenteric plexus ve střevě | Řasy (zelené) | Nespecifikované | 320 | |
| | | | Sinice | | 100 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|-----------------------------------|---------------------|--|----------------------|----------------------------------|---|---------------------------------|
| Keratolytika | Kyselina salicylová | Solubilizace intercellulárního cementu, tím je snížena soudržnost corneocytů | Bezobratlí (korýš) | <i>Daphnia magna</i> | < 20.0 | 5.9 |
| Rentgen kontrastní látka | Iopromid | Brání průchodu rentgenových paprsků skrz tělo, tím je možné získat obraz těla, kde jsou v kontrastu místa obsahující jód s místy bez obsahu jódu | Řasy (sinice) | Nespecifikované | 68 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Daphnia magna</i> | >1000.0 | 1 |
| Blokátor β-adrenergního receptoru | Atenolol | Kompetitivní blokátor beta-adrenergických receptorů v srdci a juxtoglomerulárním aparátu, ale jsou slabšími β2-antagonisty než propranolol | Bezobratlí (žahavci) | <i>Hydra vulgaris</i> | > 0.01 | |
| | Metoprolol | | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 7.3 (EC50) | |
| | | | Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | >320.0 (EC50) | |
| | Propranolol | Prototyp β; antagonist a β1 a β2 | Řasy (sinice) | <i>Synechococcus leopolensis</i> | 0.35 | |

Tabulka 1 : Chronická toxicita léků sledovaná na nižších organizmech (Crane, M., 2006)

| Terapeutická skupina | Látka | Mechanismus působení v lidských/cílových patogenech | Systematické skupiny | Druhy | Výsledek dlouhodobého vystavení (mg l ⁻¹) | Poměr akutní/chronická toxicita |
|-----------------------------------|--------------------|---|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Blokátor β-adrenergního receptoru | Propranolol | Prototyp β; antagonist β1 a β2 | Řasy (rozsivky) | <i>Cyclotella meneghiniana</i> | 0.094 | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 5.8 (EC50) | |
| | | | Řasy (zelené) | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 5.0 | |
| | | | Ryby | <i>Oryzias latipes</i> | < 0.0005 | > 48,600 |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Hyaella azteca</i> | 0.001 | 29,800 |
| | | | Bezobratlí (vířník) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | 0.18 | |
| | | | Bezobratlí (korýš) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 0.009 | |
| | | | | | 0.125 | 6.8 |
| Rostliny (vodní) | <i>Lemna minor</i> | 114.0 (EC50) | | | | |

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Svoji práci jsem rozdělila do čtyř hlavních oddílů. Jako základní část jsem zařadila metody testování, kde jsem popsala přístupy k využití nižších organismů do experimentů, jejich důležitost a postavení v porovnání s dalšími testy, které se věnují ohodnocení rizik endokrinně aktivních látek, jejich nepříznivý dopad na lidský organizmus a životní prostředí jako celek. Velmi stručně jsem popsala i metodu QSAR, která je dnes velmi populární a výhodná, protože pro ohodnocení rizika není třeba použít žádný organismus, ale riziko se vypočítá matematicky. V kapitole biologická aktivita jsem se věnovala popisu endokrinních soustav jednotlivých testovaných bezobratlých druhů a do druhé části jsem zahrнула endokrinně aktivní látky. Popsala jsem jejich mechanismus účinku a rozdělila je do jednotlivých skupin, u kterých jsem nastínila základní charakteristiku, výskyt a potenciální rizika. Další kapitola Testování EDC na nižších organismech je stěžejní částí této práce a zahrнула jsem zde organismy, testované látky, princip a získané výsledky. Využití nižších organismů pro testování léčiv je kapitola, kterou jsem zaměřila především na popis rizik léků, jejich vstup do prostředí a případné efekty na ekosystém či zpětně na člověka. Součástí této kapitoly je i rozsáhlá tabulka, ve které jsou vypsány jednotlivé skupiny, druhy a mechanismy účinků léčiv, nižší organismy a ryby, na kterých byly tyto látky testovány, a získané výsledky.

Celkové zhodnocení:

Alternativní metody k metodám in vivo se ukazují jako dobré, ale kvůli nedostatku vědeckých dat nemohou být plně realizované. Také je třeba ještě doplnit data pro modelování (www.soci.org, 2005).

Metoda QSAR

Tato metoda je výhodná hlavně proto, že pro její realizaci není pro zhodnocení rizika potřeba zvířat, což je ve shodě s vyslovenou koncepcí 3R. Tato metoda je finančně i prostorově nenáročná.

Její velkou nevýhodou však je, že může být využita jen u látek se známou chemickou strukturou a dalšími parametry (fyzikálně chemické vlastnosti, reaktivita a další). Další nevýhodou je i fakt, že nelze hodnotit směsi látek a právě ve směsích se většinou

chemikálie v přírodě vyskytují. Látky se známou strukturou se využívají pro první zhodnocení, zda substance může působit jako EDC.

Zhodnocení účinků EDC a vhodnost nižších organismů pro testování:

Názory na to, jak dalece se účinky chemikálií, které poškozující endokrinní systém obratlovců odlišují od bezobratlých jsou různorodé. Podle výboru EDSTA bylo prohlášeno, že estrogenní, androgenní hormony i xenoestrogenní látky do specifických systému bezobratlých zasahují (Hutchinson, T., 2000a). Důvodem pro testování je potřeba zjistit nežádoucí účinky EDC na nižší organismy, snaha ohodnotit rizika, citlivost, vyhodnotit, které z nich by mohly figurovat jako alternativní organismy pro testování a nahradit tak obratlovce. Dále je potřeba objasnit proč se jejich počet v přírodě rapidně snižuje.

Houbovci

U otestovaných látek etylbenzen, nonylfenol a bisfenol A byl zaznamenán vliv na růst, který byl u vysokých koncentrací redukován. Není ale jasné, zda tento efekt souvisí s vlivem na endokrinní systém těchto organismů či s toxicitou.

Žahavci

U korálnatců byl zjištěn vliv exogenních estrogenních látek na reprodukci - snížený počet vaječných kolonií a redukce růstu, z toho se usuzuje, že jsou steroidní hormony přirozenými regulátory a jejich environmentální výskyt může mít za následek jejich úbytek. Nezmaři nebyly významně ovlivněni.

Kroužkovci

Juvenilní hormony a jejich analoga mají stimulační vliv na larvální stádia a jejich metamorfózu. Nonylfenol urychluje růst a jeho vlivem jsou jejich těla větší. U vysokých koncentrací negativně ovlivnil reprodukci.

Členovci

Tento kmen je nejvíce prozkoumán, to je dáno především jejich dobře prozkoumanou fyziologií.

U **perlooček** EDC zasahují do svlékání a reprodukce (metopren, nonylfenol), mají vliv na snížený počet potomstva (17 α -ethinylestradiol, testosteron, dimer, trimetr stirenu), stimulační vliv na reprodukci (metylfarnesoát, pyriproxifen), snížená úrodnost větší produkce samců (fenoxykarb, metopren, JH III, progesteron), stimulace růstu (gonadotropin). Pro testování využívána nejčastěji *Daphnia magna* a byla již přijata OECD pro testování.

U **rakovců** byla zaznamenána redukována velikost těla, prodloužený reprodukční cyklus reprodukční a nižší počet potomstva (metopren). Testované druhy jsou *Americamysis bahia* a *Neomysis integer*. Tyto organizmy se užívají pro chronické testování účinků na endokrinní soustavu. Výhodou je, že vidlonožci byli již v minulosti široce používáni pro regulační ecotoxikologii a díky tomu jsou již dobře prozkoumáni. Vyznačují se pohlavním dimorfismem a pro jejich reprodukční jedovatost je vytvořena rozsáhlá databáze. Chronický test ale zahrnuje i několik technických nevýhod: rozsáhlejší mezera ve znalostech týkající se základní endokrinologie garnátů, technicky nesnadná identifikace pohlaví a rodičovský kanibalismus na svém potomstvu. I přesto jsou v porovnání s mořskými druhy díky jejich snadné kultivaci dobrou alternativou k testům na obratlovcích (Hutchinson, T., 2000a).

U **klanonožců** odhalen vliv na pohlaví samců –s timulační vliv a samice v převaze (17 α -ethinylestradiol, bisfenol A). To je považováno za významný efekt, ale je třeba otestovat tyto účinky ještě v chronické studii. Nonylfenol inhiboval růst, ale to se přisuzuje spíše toxicitě. Testovaným druhem je *Hyalella azteca*, je významná jak z ekonomického tak i z ekologického hlediska a v studiích s bezobratlými je hojně užívána, její význam spočívá především v tom, že je potravou ptáků, ryb, žab a dalších zvířat, které jsou důležitými články potravního řetězce. Její uplatnění je i při ohodnocení toxických látek v sedimentu a k EDC je velmi citlivá.

U **velkokrunýřovců** objeveny samičí pohlavní orgány u samců (TBT), redukovány růst a zásah do svlékání (fenoxykarb, metopren, pyriproxifen), akutní mortalita, zpožděný zárodečný vývoj (endosulfan, metopren), menší velikost (kovy), méně gravidních samic (kovy, pesticidy, PAH) snížená produkce vajíček a redukovány počet samců (pesticidy). Jsou dobrými bioindikátory v prostředí pro ohodnocení znečištění prostředí EDC.

U **plazivek** objevena sterilita samců (fipronyl) a negativní vliv na plodnost a počet nových jedinců (atrazin).

Pakomáři jsou obecně méně citliví k analogům JH a celé řady dalších látek, pozorována však byla především deformace vajíček (nonylfenol), opožděný vývoj, deformace úst (bisfenol A, 17 α -ethinylestradiol), vliv na svlékání (tebufenozid), snížená ekdysteridní syntéza samic naopak u samců zvýšená (TBT). Je třeba ale říci, že tato koncentrace byla mnohem vyšší než reálná environmentální a mnohem vyšší než koncentrace, která by způsobila nepříznivý vliv na rybách. Testovaný druh pakomára je *Chironomus riparius*.

Měkkýši

Dobře prostudované účinky TBT a TPT, které způsobují imposex samic, jako nejlepší druhy pro monitorování je z **plžů** *Marisa cornuarietis*, díky citlivosti a hojnému rozšíření a *Potamopyrgus antipodarum*, díky citlivosti a velmi podobným výsledkům při testování s obratlovcem (na rybách).

Z **mlžů** byl přijat *Thais rustica* jako dobrý bioindikátor pro sledování znečištění, díky citlivosti a dobré průkaznosti při testování. *Crassostrea giga* a *Elliptio complanata* jsou díky jejich výhodným vlastnostem (žijí v sedlině, kam se dostanou všechna xenobiotika, jsou to relativně hojné druhy a svojí potravu filtrují) vhodné jak pro laboratorní tak i pro polní studie. Jsou využívány jako biomarkry a zároveň mohou sloužit i jako bioindikátory xenoestrogenů. Například jsou využívány při kontrole vodních toků průmyslově znečištěných rtutí a dalšími látkami, které ovlivňují jejich endokrinní systém (Won, S., 2005).

Ostnokožci

Mají vývojově nejbliže k obratlovcům, proto je velký zájem je využívat pro testování. Jako dobře citlivý druh se pro testování ukázal být *Paracentrotus lividus*. Je využíván v testech embryotoxicity.

Rostliny

Neukázaly se vhodné ani citlivé pro hodnocení endokrinně aktivních látek.

Zhodnocení účinků léků a vhodnost nižších organismů pro testování:

Ačkoli většina léků díky velmi nízké koncentraci v kombinaci s nízkou jedovatostí neznamenaají budoucí riziko pro vodní prostředí, další léky jako jsou přirozené a syntetické pohlavní hormony jsou nyní známé značným rizikem pro prostředí.

Pro otestování léků byly použity tyto organismy:

Mikroorganismy

Byly objeveny závažné důsledky několika antibiotik na reprodukci mikroba *Vibrio harveyi*, ale malý důkaz pro účinky na krátkodobou bioluminiscenci. Podobné časově závislé efekty byly nalezeny u *Vibrio fischeri* vystavené antibiotikům. Byly změřeny změny v mikrobiálním osídlení po vystavení antibiotikům v koncentracích podobných těm, které jsou v nemocničních odpadních vodách. Byla nalezena rezistence k **imipenemu** a **beta-laktamovému ampicilinu, cefotaximu a ceftazidinu** v bakteriálních kulturách vodních vzorků odebraných z amerických toků. Díky veterinární aplikaci bakteriostatik obsahuje dno chovných rybníků redukované množství mikroorganismů. Závažným důsledkem je díky výskytu lidských léků v prostředí rostoucí antimikrobiální rezistence. Rezistence byla objevena v přirozeném vodním prostředí. Je ale pravděpodobné, že některé rezistentní druhy mohly být do přírody zavlečeny a došlo k přenosu genů, než vznik rezistence přímým účinkem antibakteriálních léků na přirozeně se vyskytující mikroby. Důsledky této rezistence na strukturu ekosystému je neznámý, ale lidské zdravotní důsledky jsou zcela zřejmé.

Řasy a vyšší rostliny

Jsou to nejvíce využívané testované organismy pro svou nízkou finanční náročnost. Z tabulky č.1 vyplývá, že řasy byly citlivé k **fluorochinolonu, sulfonamidům, antidepressivům se zpětným vychytáváním serotoninu, β -adrenergním blokátorům receptoru a estrogenům**. Mnohem vnímavější a citlivější k těmto lékům je sinice *Microcystis aeruginosa* na rozdíl od standardního druhu pro testování řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*. Řasy a vyšší rostliny nejsou stejně citlivé k lidským lékům, ale zdá se, že vyšší rostliny jsou citlivější. I přesto není jejich testování tak rozšířené.

Bezobratlí

Z tabulky č.1 vyplývá, že bezobratlí jsou nejvíce citliví k ethinylestradiolu již ve velmi nízkých koncentracích $\sim 1 \text{ ng l}^{-1}$ nebo méně. Maximální koncentrace 3.4 ng l^{-1} ethinylestradiolu byla naměřena v britských potocích. To znamená, že biologické účinky ethinylestradiolu na bezobratlé jsou enviromentálně významné. Další estrogény a androgenmethyltestosterony způsobují také účinky ve velmi nízkých koncentracích, široký okruh dalších léků způsobí efekty v koncentracích $< 1 \text{ mg l}^{-1}$. N a rozdíl od řas nejsou bezobratlí ovlivněni léky v takovém rozsahu jako například řasy vystavené antibiotikům. Nejvíce léků se nachází v usazeninách, které jsou chronickým zdrojem těchto sedlinových organismů zahrnující i bezobratlé.

Obojživelníci a ryby

Je nyní všeobecně známé, že vodní obratlovci jsou velmi citliví k endokrinní modulaci skrz **steroidní estrogény**, vyloučené ženami buď přirozeně či přes ústní antikoncepci. Ryby jsou dále citlivé k ostatním pohlavním hormonům jako je **methyltestosteron**, **β -adrenergní blokátor receptoru**. Citlivost je již sama o sobě prokázána díky redukované úrodnosti ryb. Špatně rozpustné látky mají sklon k bioakumulaci a díky tomuto vystavení platí hrozba skrz potravní řetězec spíše pro vyšší organizmy. Bylo zjištěno, že léky se známou endokrinní aktivitou (nap., **indomethaciny**, **naproxen**, **salicylany**, **klofibrát**, **karbamazepin** a **jod kontrastní látky**) mohou být přítomny v povrchových vodách a měly by být vyšetřovány pro jejich schopnost změnit stav štítné žlázy ryb v přirozených podmínkách prostředí. Na tuto skupinu organismů je ale vyvíjen značný tlak regulačních orgánů, které požadují redukci množství obratlovců pro testy (Crane, M.,2006).

Výhodou používání těchto organismů pro testování je především jejich nenáročnost, nejsou u nich žádná regulační opatření, jejich testování je celkem rychlé, nejsou ani ekonomickou ani ekologickou zátěží.

K nevýhodám patří především jejich nejasné účinky při testování. To plyne hlavně z špatně prozkoumaných fyziologických a morfologických mechanismů. Jejich soustavy jsou navíc značně odlišné od obratlovců a citlivost a vliv na endokrinní systém není vždy stejná, proto je třeba vždy brát i toto do úvahy.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Appendix N:Endocrine Disruption and Invertebrates, Chapter Five Appendices April 3, <http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/pubs/edstac/chap5v14.pdf>, 1998

Andersen, H.R., Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O.: Development of Copepod Nauplii to Copepodites: a Parameter for Chronic Toxicity Including Endocrine Disruption, *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2001, 2821-2829

Ayaki,T., Kawauchino,Y., Nishimura, Ch., Ashi, H., Arizono, K.: Sexual Disruption in the Freshwater Crab (*Geothelphusa dehaani*), *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005, 39-42

Baláž, Š.: Modelling Kinetic of Biological Activity in Xenobiotics, VEDA, 1990, s.134

Baldwin, W.S., Bailey, R., Long, K.E., Klaine, S.: Incomplete Ecdysis is an Indicator of Ecdysteroid Exposure in *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2001, 1564-1569

Bechmann, R.K.: Effect of the Endocrine Disrupter Nonylphenol on the Marine Copepod *Tisbe battaglia*, *Sci.Total Environ.*, 233, 1999, 33-46

Bejarano, A. C. , Chandler, G. T.: Reproductive and Developmental Effects of Atrazine on the Estuarine Meiobenthic Copepod *Amphiascus tenuiremis*, *Environ.Toxicol.Chem.*, 22, 2003, 3009-3016

Billinghurst, Z., Clare, A.S., Fileman, T., McEvoy, M., Readman, J., Depledge, M.: Inhibition of Barnacle Settlement by the Environmental Oestrogen 4-Nonylphenol and the Natural Oestrogen 17 β -Oestradiol, *Marine Poll.Bullet.*, 36, 1998, 833-839

Billinghurst, Z., Clare, A.S., Matsumura, K., Depledge, M.H.: Induction of Cypris Major Protein in Barnacle Larvae by Exposure to 4-N-Nonylphenol and 17 β -Oestradiol, *Aquat. Toxicol.*, 47, 2000, 203-212

Boxall, A. B. A.: The environmental side effects of medication: How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health?, *EMBO reports*, 5, 2004, 1110–1116

Breitholtz, M., Bengtsson, B.E.: Oestrogens Have No Hormonal Effect on the Development and Reproduction of the Harpacticoid Copepod *Nitocra spinipes*, *Marine Poll. Bullet.*, 42, 2001, 879-886

Brown, R.J., Conradi, M., Depledge, M.H.: Long-Term Exposure to 4-Nonylphenol Affects Sexual Differentiation and Growth of the Amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766), *Sci. Total Environ.*, 233, 1999, 77-88

Carnevali, M. D. C.: Regenerative response and Endocrine Disruptors in Crinoid Echinoderms an Old experimental Model, a New Ecotoxicological Test, *Progr. Mol. subcel. Biol.*, 2005, 167-200

Capleton, A. C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P., Stutt, E. et al.: Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile, *Toxicol. Lett.*, 163, 2006, 213-23

Crane, M., Watts, Ch., Boucard, T.: Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals, *Sci. Total. Environ.*, 367, 2006, 23-41

Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., Roden, N.: Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps How do human pharmaceuticals get into the environment, and what are their effects?, http://pubs.acs.org/subscribe/journals/esthg/40/i11/html/060106viewpoint_cunningham.html, 2006

Čížková, M.: Hodnocení endokrinní disrupce u vodních živočichů, Bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Brno, 2005, s.38

Daston, G. P., Cook, J. C., Kavlock, R. J.: Uncertainties for Endocrine Disrupters: Our View on Progress, *Toxicol. Sci.*, 74, 2003, 245–252

DeCastro, I. B., Meirelles, C. A. O., Matthews-Cascon, H., Fernandez, M. A.: *Thais (stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaidae), a potential bioindicator of contamination by organotin Northeast Brazil, *Brazilian J. Oceanography*, 52, 2004, 135-139

DeFour, P.L.: Use and Role of Invertebrate Models in Endocrine Disruptor Research and Testing, *ILAR J.*, 45, 2004, 484-493

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Weltje, L., Oehlmann, J.: Marine pollution of organotin compounds and their biological impact, J.W. Goethe University Frankfurt Department of Ecology and Evolution, www.bio.uni-frankfurt.de/ee

Ferguson, P., Chander, T.: Development of Receptor- to Population-Level Analytical Tools for Assessing Endocrine Disruptor Exposure in Wastewater-Impacted Estuarine Systems, <http://es.epa.gov/ncer/science/endocrine/pdf/workshop06/ferguson.pdf>, 2006

Fox, J.E.: Non-Traditional Targets of Endocrine Disrupting Chemicals: The Roots of Hormone Signaling, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005, 179–188

Gagne, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G., Sabik, H.: Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*, *Environ. Poll.*, 115, 2001a, 97-106

Gagne, F., Marcogliese, D., Blaise, C., Gendron, A.: Occurrence of compounds estrogenic to freshwater mussels in surface waters in an urban area, *Environ. Toxicol.*, 16, 2001b, 260–268

Goto, T., Hiromi, J.: Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and Norethindrone, Constituents of an Oral Contraceptive Pill to the Swimming and Reproduction of Cladoceran *Daphnia magna*, With Special Reference to Their Synergetic Effect, *Marine Poll. Bullet.*, 47, 2003, 139-142

Gourmelon, A., Ahtiainen, J.: Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances—The OECD perspective, *Ecotoxicology*, 16, 2007, 161-167

Gual, J. G.: Steroid levels, Steroid metabolic Pathways and Their modulation by endocrine Disruptors in invertebrates, Doktorantská práce, Univerzita v Barceloně, 2005, s.129

Hahn, T., Liess, M., Schulz, R.: Effects of the Hormone Mimetic Insekticide Tebufenozide on *Chironomus riparius* Larvae in Two Different Exposure Setups, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 49, 2001, 171-178

Hahn, T., Schenk, K., Schulz, R.. Environmental Chemicals With Known Endocrine Potential Affect Yolk Protein Content in the Aquatic Insect *Chironomus riparius*, *Environ. Poll.*, 120, 2002a, 525-528

Hahn, T., Schulz, R.: Ecdysteroid Synthesis and Imaginal Disc Development in the Miste *Chironomus riparius* as Biomarkers for Endocrine Effects of Tributyltin, *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 2002b, 1052-1057

Hansen, F.T., Forbes, V.E., Forbes, T.L.: Effects of 4-*n*-Nonylphenol on Life-History Traits and Population Dynamics of a Polychaete, *Ecol. Appl.*, 9, 1999, 482-495

Hartl, J., Palát, K.: Farmaceutická chemie IV, Univerzita Karlova, Praha, 1991, s.238

Hill, M., Stabile, C., Steffen, L.K., Hill, A.: Toxic Effects of Endocrine Disrupters on Freshwater Sponges: Common Developmental Abnormalities, *Environ. Poll.*, 117, 2002, 295-300

Hirano, M., Ishibashi, H., Matsumura, N., Nagao, Y., Watanabe, N. et al.: Acute Toxicity Response of Two Crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to Endocrine Disrupters, *J. Helth Sci.*, 50, 2004, 97-100

Horiguchi, T., Kojima, M., Kaya, M., Matsuo, T., Shiraishi, H. et al.: Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*, *Marine Environ. Res.*, 54, 2002, 679-684

Hutchinson, T.H., Brown, R., Kristin, E., Campbell, P.M., Holt et al.: Ecological Risk Assessment of Endocrine Disruptors, *Environ. Health Perspect.*, 108, 2000a, 1007-1014

Hutchinson, T., Kanno, J., Yokota, H., Foster, P.: Ecotoxicology Test Methods for Endocrine Disrupters and Ecological Risk Assessment, International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters, December 2000, Testing Methodology, http://www.env.go.jp/chemi/end/2000report/contents_e.pdf, 2000b

Chander, G.T., Cary, T.L., Volz, D.C., Waise, S.S., Ferry, J.L.: The phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. Environ. Sci. Technol., 38, 2004, 522-528

Chapter Five: Screening and Testing, EDSTAC Final Report, <http://www.epa.gov/oscpmont/ospendo/pubs/edstac/app-rv14.pdf>, 1998

Cho, H., Horiguchi, T.: Endocrine Disruption in Mollusks: Case Studies on the Rock Shell, the Ivory Shell and the Giant Abalone, Linkong with Organotin Contamination in Korea and Japan, Interanational Symposium on Environmental Endocrine Disruptors, Effects on Wildlife, http://www.env.go.jp/chemi/end/2000report/report/special_e.pdf, 2000

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U. et al.: Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent, Aquat. Toxicol., 65, 2003, 205-220

Kahl, M.D., Makynen, E.A., Kosian, P.A., Ankley, G.T.: Toxicity of 4-Nonylphenol in a Life-Cycle Test With the Midge *Chironomus tentans*, Ecotoxicol. Environ. Safety, 38, 1997, 155-160

Kashian, D.R., Dodson, S.I.: Effects of Vertebrate Hormones on Development and Sex Determination in *Daphnia magna*, Environ. Toxicol. Chem., 23, 2004, 1282-1288

Knigh, D. J., Thomas, M. B.: Practical Guide to Chemical Safety Testing, Rapra Technology Limited, 2003, s.448

Kubišta, V.: Fyziologie živočichů, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1979, s.144

Lafont, R.: The Endocrinology of Invertebrates, Ecotoxicology, 9, 2000, 41-57

Lagadic, L., Caquet, T.: Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives?, *Environ. Health Perspect. Suppl.*, 106, 1998, 593-611

LeBlanc, G.A., Campbell, P.M., Brown, R.P., Chang, E.S., Coats, J.R. et al.: The Endocrinology of Invertebrates. In: *Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment*, DeFur P.L., Crane, M., Ingersoll, C., Tetterfield, L. eds., Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press. Pensacola, Florida, 1999, 23-106

Leight, A., Scott, G., Fulton, M., Daugomah, J.: Long Term Monitoring of Grass Shrimp *Palaemonetes* spp. Population Metrics at Sites with Agricultural Runoff Influences, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005, 143–150

Leitz, T.: Endocrinology of the Cnidaria: State of the Art, *Zoology-Analysis of Complex Systeme*, 103, 2001, 202-221

Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Mori, K.: Changes in vitelin during oogenesis and effect of estradiol-17beta on vitellogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea giga*, *Invertebr. Repr. Dev.*, 33, 1998, 87–93

Lincová, D., Farghali, H., Čepelík, J., Dědina, M., Doležal, T. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha, 2002, s.601

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A.: Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 75, 2003, 631-681

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*, Grada, 2004, s.725

Macek, J.: *Svět zvířat XI. Bezobratlí (2)*, Albatros, 2001, s.170

Matthiessen, P., Gibbs, P.E.: Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs, *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 1998, 37- 43

McKenney, C.L.: The Combined Effects of Salinity and Temperature on Various Aspects of the Reproductive Biology of the Estuarine Mysid, *Mysidopsis bahia*, Invertebr. Repr. Dev., 29, 1996, 9-18

Meregalli, G., Pluymers, L., Ollevier, F.: Induction of Mouthpart Deformities in *Chironomus riparius* Larvae Exposed to 4-n-Nonylphenol, Environ. Poll., 111, 2001, 241-246

Motyčka, V., Roller, Z.: Svět zvířat X. Bezobratlí (1), Albatros, 2001, s.171

Mu, X.Y., LeBlanc, G.A.: Developmental Toxicity of Testosterone in the Crustacean *Daphnia magna* Involves Anti-Ecdysteroidal Activity, Gen. Comp. Endocrinol., 129, 2002a, 127-133

Mu, X.Y., LeBlanc, G.A.: Environmental Antiecdysteroids Alter Embryo Development in the Crustacean *Daphnia magna*, J. Exp. Zool., 292, 2002b, 287-292

Mu, X.Y., LeBlanc, G.A.: Synergistic Interaction of Endocrine-Disrupting Chemicals: Model Development using an Ecdysone Receptor Antagonist and a Hormone Synthesis Inhibitor, Environ. Toxicol. Chem., 23, 2004, 1085-1091

Murray, K.R., Granner K.D., Mayes A.P., Rodwell W.V.: Harperova biochemie, H & H, 2002, s.872

Nice, H.E., Morritt, D., Crane, M., Thorndyke, M.: Long-term and transgenerational effects of nonyl phenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*: Possible endocrine disruption?, Marine Ecol. Progr. Ser., 256, 2003, 293-300

Oehlman, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillman, M., Markert, B.: Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (*Mollusca: Gastropoda*) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens, Ecotoxicology, 9, 2000, 383-397

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A.: Juvenoid Hormone Methyl Farnesoate is a Sex Determinant in the Crustacean *Daphnia magna*, J. Exp. Zool., 293, 2002, 736-739

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A.: Insecticidal Juvenile Hormone Analogs Stimulate the Production of Male Offspring in the Crustacean *Daphnia magna*, Environ. Health Perspect., 111, 2003, 919-924

Olsson, P. E., Borg, B., Brunström, B., Håkansson, H., Klasson-Wehler, E.: Endocrine disrupting substances – Impairment of reproduction and development, Swedish Environmental Protection Agency, 1998, s.150

Papáček, M., Matěnová, V., Matěna, J., Soldán, T.: Zoologie, Scientia, 1997, s.286

Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W., Watts, M.M.: Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol and Bisphenol A to the Freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 43, 2002, 56-63

Richon, A. B.: An Introduction to QSAR Metodology, <http://www.netsci.org/Science/Compreh/feature19.html>, 1997

Rotchell, J.M., Ostrander, G.K.: Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms, J. Toxicol. Environ. Health-Part B-Critical Reviews, 6, 2003, 453-495

Rozsypal, S.: Nový přehled biologie, Scientia Praha, 2003, s.796

Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých, Masarykova Univerzita v Brně, 2003, s.337

Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J.: Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (*mollusca: gastropoda*) in the laboratory. Part II: triphenyltin as a xeno-androgen, Ecotoxicology, 9, 2000, 399-412

Society of chemical industry :Endocrine aktive substance in the environment, Inscight, 1, <http://www.soci.org/sci/publications/2005/pdf/pb155.pdf>, 2005

Staples, C.A., Woodburn, K., Caspers, N., Hall, T., Klečka, G.M.: A Weight of Evidence Approach to the Aquatic Hazard Assessment of Bisphenol A , Human and Ecological Risk Assessment, 8, 2002, 1083-1105

- Takahashi, T., Araki, A., Nomura, Y., Koga, M., Arizono, K.: The Occurrence of Dual-gender Imposex in Japanese Freshwater Crab, *J. Health Sci.*, 46, 2000, 376–379
- Tarrant, A. M., Atkinson, M. J., Atkinson, S.: Effects of Steroidal Estrogens on Coral Growth and Reproduction, *Marine Ecol. Progr. Ser.*, 269, 2004, 121-129
- Tarrant, A. M.: Endocrine-like Signaling in Cnidarians: Current Understanding and Implications for Ecophysiology, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005, 201–214
- Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T.: Juvenile Hormone Agonists Affect the Occurrence of Male *Daphnia*, *Chemosphere*, 53, 2003, 827-833
- Thompson, C., Wadhia, K., Loibner, A.: *Environmental Toxicity Testing*, Blackwell Publishing, Canada, 2005, s.388
- Tuberty, S., Mckenney, Ch.: Ecdysteroid Responses of Estuarine Crustaceans Exposed Through Complete Larval Development to Juvenile Hormone Agonist Insecticides, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005,106–117
- Vandenbergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T., Janssen, C.R.: Effects of 17 α - ethinylestradiol on Sexual Development of the Amphipod *Hyaella azteca*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 52, 2003, 216-222
- Vogel, J.: Tunnel vision: The regulation of EDC, *Pol. Sci.*, 37, 2004, 277-303
- Waisser, K.: Úvod do biologické aktivity organických sloučenin, GAUDEAMUS Univerzita Hradec Králové, 2004, s.122
- Walker, A., Bush, P., Puritz, J., Chang, E., Miller, T. et al.: Bioaccumulation and Metabolic Effects of the Endocrine Disruptor Methoprene in the Lobster, *Homarus americanus*, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005,118–126
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K.: Survival and Precopulatory Behaviour of *Gammarus pulex* Exposed to Two Xenoestrogens, *Water Res.*, 35, 2001a, 2347-2352

Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K.: Chronic Exposure to 17 α -ethinylestradiol and Bisphenol A-Effects on Development and Reproduction in the Freshwater Invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera : Chironomidae), *Aquat. Toxicol.*, 55, 2001b, 113-124

Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K.: Population Responses of the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an Environmental Oestrogen 17 α -ethinyloestradiol, *Environ.Toxicol. Chem.*, 21, 2002, 445-450

Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K.: Exposure to 17 α -ethinylestradiol and Bisphenol A Effect on Larval Moulting and Mouthpart Structure of *Chironomus riparius*, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 54, 2003, 207-215

Wikipedia, Quantitative structure-activity relationship, <http://en.wikipedia.org/wiki/QSAR>

Wirth, E., Lund, S., Fulton, M., Scott, G.: Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure, *Aquat. Toxicol.*, 53, 2001, 9-18

Wollenberger, L.: Toxicity Tests with Crustaceans for Detecting Sublethal Effects of Potential Endocrine Disrupting Chemicals, Doktorantská práce, Environment & Resources, Technical University of Denmark, www.er.dtu.dk, 2005

Won, S.-J., Novillo, A., Custodia, N., Rie, M., Fitzgerald, K. et al.: The Freshwater Mussel (*Elliptio complanata*) as a Sentinel Species: Vitellogenin and Steroid Receptors, *Integr. Comp. Biol.*, 45, 2005, 72–80

8. REJSTŘÍK ZKRATEK

| | |
|------------------|--|
| ACEI | Inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu |
| AGH | Androgenní žlázo­vý hormon, který je produkován androgenní žlázou měkkýšů |
| ACh | Acetylcholin |
| AMPK | Adenosinmonofosfát kináza |
| AR | Androgenní receptor |
| ATP | Adosintrifosfát |
| BBP | Butylbenzylftalát |
| BPA | Bisfenol A |
| cAMP | Cyklický adenosinmonofosfát |
| cGMP | Cyklický guanosinmonofosfát |
| CHH | Hyperglykemický hormon produkovaný X-orgánem korýšů (crustacean hyperglycemic hormone) |
| CMP | Larvální protein svijonožců |
| CYP | Cytochrom |
| DBP | Ftalandibutylnatý |
| DDA | Dichlorofenyl kyseliny octové |
| DDE | Dichlorobischlorofenylethan |
| DDT | Dichlordifenyltrichlorethan |
| DHT | Dihydrogentestosteron |
| EC ₅₀ | Koncentrace způsobující padesátiprocentní efekt (median effective concentration) |
| EcR | Ekdysonový receptor (ecdysone receptor) |
| ECETOC | Evropské centrum pro ekotoxikologii a toxikologii chemikálií (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) |
| EDC | Endokrinní disruptor (endocrine disrupting chemical) |
| EDSTAC | Výbor pro prověřování narušení endokrinního systému a ověřovací informační zprávy (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) |
| ELH | Hormon řídící kladení vajíček (egg-laying hormone) |
| ELISA | Enzymaticko-imunologická sorbční metoda (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| EMEA | Evropská léková agentura |

| | |
|------------------|---|
| ER | Estrogenní receptor |
| EU | Evropská unie |
| GABA | Kyselina γ -aminomáselná |
| GH | Gonadotropní hormon |
| GIH | Inhibiční hormon gonád produkovaný X-orgánem korýšů (gonad-inhibiting hormone) |
| HCH | Hexachlorocyklohexan |
| HMG-CoA | Hydroxymetylglutaryl koenzym A |
| HRE | Hormon responsivní elementy |
| 5-HT2 | Serotoninový receptor |
| ISO | Mezinárodní organizace pro standardizaci (International Organization for Standardization) |
| JH | Juvenilní hormon hmyzu (juvenile hormone) |
| LC ₅₀ | Koncentrace způsobující padesátiprocentní letalitu (median letal concentration) |
| LC MS-MS | Kapalinové chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií |
| LM | Bioanalýza s využitím klasické metody světla |
| MF | Juvenilní hormon korýšů (methyl farnesoate hormone) |
| MIH | Hormon inhibující svlékání (molt-inhibiting hormone) |
| MIP | Peptidy strukturně blízké insulinu (molluscan insulin-like peptides) |
| mRNA | Mediátorová RNA |
| NP | Nonylfenol |
| OECD | Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organization for Economic Cooperation and Development) |
| OP | Oktylfenol |
| PAH | Polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PBFR | Polybromované samozhášecí přísady |
| PCB | Polychlorované bifenyly |
| PCDD | Polychlorované dibenzodioxiny |
| PCDF | Dibenzofurany |
| PEC | Předpovězenou environmentální koncentraci |
| PNEC | Předpovězenou koncentraci s nulovým efektem |
| POP | Perzistující organické látky |

| | |
|----------------|--|
| PS | Polystyren |
| PVC | Polvinylchlorid |
| QSAR | Metoda, která dává do vztahu objemnost molekuly s jejím biologickým účinkem (quantitative structure-activity relationships) |
| REACH | Koncepce nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| rRNA | Ribozomální RNA |
| RXR | Receptorový gen pro syntézu steroidních hormonů u obratlovců |
| SIR | Látky vyvolávající dýchání (substance induced respiration) |
| SSRI | Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu |
| STH | Somatotropní hormon |
| T ₃ | Trijodthyronin |
| T ₄ | Thyroxin |
| TBT | Tributylcín |
| TCDD | Tetrachlorodibenzo-p-dioxin |
| TG | Směrnice testu OECD (guideline test) |
| TPT | Tripentylcín |
| TR | Thyroidální receptor |
| tRNA | Transferová RNA |
| USA | Spojené státy americké |
| US.EPA | Americká agentura ochrany životního prostředí (United States Environmental Protection Agency) |

9. ABSTRAKT A SUMMARY

ABSTRAKT

Velikým problémem v dnešní době se stal fakt, že celá řada látek vyprodukovaných průmyslem, metabolizovaných a vyloučených zvířaty a lidmi se dostávají do životního prostředí, kde mohou negativně působit na celou řadu zvířat v různých úrovních a zpětně i na člověka. Do popředí se dostaly především látky porušující endokrinní systém (EDC), které mají řadu nežádoucích účinků. Narušují reprodukci a správný vývoj živočichů, zasahují do endokrinního systému lidí (působí kancerogenně a snižují kvalitu spermatu). Proto je třeba tyto látky testovat. Testování na nižších organizmech je důležité ze dvou důvodů. Jednak vlivem tlaku legislativy a regulačních orgánů se jim při testování dává přednost (tzv. alternativní metody testování) a dále z důvodu výskytu v životním prostředí (protože se jejich výskyt v přírodě snižuje což má důsledky na celý ekosystém). Mojí snahou bylo objasnit jak EDC zasahují do nižších organismů, najít jejich praktické použití pro testování a konkrétní druhy používané do experimentů, zařadit endokrinně aktivní látky a ohodnotit vliv léčiv na životní prostředí.

SUMMARY

The fact that many various substances produced by industry, metabolised and excreted by animals and human contaminate environment, became the major problem of present years. These substances have a negative effect on number of animals in different ecosystem levels, but retroactively also on human body. Nowadays, the most important substances are endocrine disruption chemicals (EDC) which have many negative effects. They disrupt the reproduction and regular development of animals and endocrine system of human (cancerogenic effect, lower quality of sperm). That is why it's necessary to test these substances. Testing of lower form of life is necessary for two reasons: Partly due to the regulations and legislative organs, which prefer the testing of invertebrates (so called alternative methods of testing) as well as due to the lowering occurrence of these organisms in nature, which has the implications on the whole ecosystem. My effort was to explain how EDC can interfere to invertebrates life and other lower forms of life, to find their practical use for testing and the specific species for experiments, to classify endocrine active substances and to assess the effect of pharmaceuticals on environment.