



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Endokrinní disruptory – monitorování a jejich působení na lidské zdraví

Endocrine disruptors – Monitoring and Their Effect on Human Health

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Kim Khanh Nguyen

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Hana Kalábová

Kladno 2022



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Nguyen** Jméno: **Khanh Kim** Osobní číslo: **491679**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Endokrinní disruptory - monitorování a jejich působení na lidské zdraví

Název bakalářské práce anglicky:

Endocrine Disruptors - Monitoring and Their Effect on Human Health

Pokyny pro vypracování:

Endokrinní disruptory jsou exogenní látky, které účinkují jako hormony a narušují fyziologické funkce endogenních hormonů člověka. Mohou poškozovat neurologické, rozmnožovací a imunitní funkce organismu. V obecné části práce bude vypracována literární rešerše problému endokrinních disruptorů a vypracován přehled laboratorních metod monitorování endokrinních disruptorů, které působí na lidské zdraví. Rešerše se bude věnovat diskutování možných fyziologických účinků těchto znečišťujících látek na lidský organismus, především na pohlavní systém. Na základě rešerše problematiky bude vybrána konkrétní látka, u které bude popsán mechanismus působení, výskyt, účinky a bude využita v praktické části k testování na buněčných liniích. Na základě měření proliferace buněk bude vyhodnocen vliv této látky.

Seznam doporučené literatury:

- [1] ENCARNACÃO, Telma, Alberto ACC PAIS, Maria G CAMPOS a Hugh D BURROWS, Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment, online, Science Progress, ed. 2019, ročník 102, číslo 1, Přístupné z: doi:10.1177/0036850419826802
- [2] LYMPERI, Stefanja a Aleksander GIWERCMAN, Endocrine disruptors and testicular function, online, Metabolism, ed. 2018, ročník 86, Přístupné z: doi:10.1016/j.metabol.2018.03.022
- [3] YILMAZ, Bayram, Hakan TEREKECI, Suleyman SANDAL a Fahrettin KELESTIMUR, Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention, online, Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, ed. 2020, ročník 21, číslo 1, Přístupné z: doi:10.1007/s11154-019-09521-z

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Hana Kalábová

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Mgr. Romana Šíroková, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Endokrinní disruptory – monitorování a jejich působení na lidské zdraví vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Choose an item. dne Click or tap to enter a date.

.....
Kim Khanh Nguyen

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Haně Kalábové, pod jejímž vedením jsem psala tuto bakalářskou práci. Děkuji za ochotu, trpělivost a cenné rady.

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o endokrinních disruptorech. Teoretická část se věnuje definici, klasifikaci a výskytu. Dále popisuje mechanismy působení endokrinních disruptorů na lidské zdraví, především na pohlavní soustavu muže a ženy a současně poskytuje základní informace o možných následcích expozice. Uvedeny jsou i diagnostické metody monitorování těchto látek.

Experimentální část byla realizována v laboratoři buněčných kultur a byla zaměřena na zvládnutí technik nutných pro laboratorní práci s buněčnými kulturami (sterilní práce v laminárním boxu, příprava růstových médií, zajištění růstových podmínek, následně příprava preparátů a počítání buněk v Bürkerově komůrce). Následně byly testovány účinky parfémované vody, jakožto endokrinního disruptoru, na buněčnou kulturu a sledovala se mikroskopicky jejich aktivita v časových intervalech po 24 hodinách, 3 dnech a 7 dnech. Ke stanovení vlivu této látky na lidské buňky v laboratorních podmínkách byl proveden MTT test. Buněčná linie SNU475 byla vystavena působení 1%, 0,1% a 0,01% koncentraci testované parfémované vody. Působení látky bylo monitorováno také v závislosti na době působení. V metodické části byl popsán princip a postup této analytické metody.

Během laboratorních testů ke zjištění působení endokrinního disruptoru byla zaznamenána postupná redukce buněčné kultury.

Klíčová slova

Endokrinní disruptory; estrogenní receptory; androgenní receptory; inhibice buněčné proliferace; MTT test; SNU475

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with endocrine disruptors. The theoretical part is devoted to definition, classification and occurrence. It also describes the mechanisms of action of endocrine disruptors on human health, especially on the male and female reproductive system, and at the same time provides basic information on possible consequences of exposure. Diagnostic methods for monitoring these substances are also presented.

The experimental part was carried out in the cell culture laboratory and focused on mastering the techniques necessary for laboratory work with cell cultures (sterile work in a laminar box, preparation of growth media, ensuring growth conditions, subsequent preparation of slides and cell counting in a Bürker chamber). Subsequently, the effects of perfumed water, as an endocrine disruptor, on the cell culture were tested and their activity was monitored microscopically at time intervals of 24 hours, 3 days and 7 days after application of perfumed water under the microscope. To determine the effect of this substance on human cells under laboratory conditions, an MTT assay was performed. The hepatocyte cell line SNU475 was exposed to 1%, 0.1% and 0.01% concentration of the tested perfumed water. The effect of the substance was also monitored as a function of exposure time. The principle and procedure of this analytical method was described in the method section. At the end of the experiment, the activity of the cells was measured at different concentrations of the endocrine disruptor using the MTT assay on the Elisa Reader Synergy HT instrument.

During the laboratory tests to detect the action of the endocrine disruptor, a gradual reduction in cell culture concentration was observed. An MTT assay was performed to evaluate the effect of perfumed water on the SNU475 cell line.

Keywords

Endocrine disruptors; estrogen receptors; androgen receptors; inhibition of cell proliferation; MTT assay; SNU475

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 9 |
| 2 | cíle práce..... | 10 |
| 3 | přehled současného stavu..... | 11 |
| 3.1 | Definice endokrinních disruptorů..... | 11 |
| 3.2 | Historie EDs | 11 |
| 3.3 | Klasifikace EDs dle původu | 12 |
| 3.3.1 | Přírodní EDs..... | 12 |
| 3.3.2 | Syntetické EDs | 13 |
| 3.3.3 | Neperzistentní polulanty | 16 |
| 3.4 | Expozice člověka endokrinním disruptorům..... | 20 |
| 3.5 | Mechanismus působení EDs..... | 21 |
| 3.5.1 | Působení EDs na reprodukci | 23 |
| 3.6 | Důsledky působení EDs na lidské zdraví | 27 |
| 3.6.1 | Následky expozice EDs na mužský pohlavní systém | 27 |
| 3.6.2 | Následky expozice EDs na ženský pohlavní systém..... | 29 |
| 3.6.3 | Epigenetické následky..... | 31 |
| 3.7 | Metody monitorování EDs..... | 32 |
| 3.7.1 | In silico metody..... | 33 |
| 3.7.2 | In vitro metody | 34 |
| 3.7.3 | In vivo metody | 37 |
| 4 | Metodika..... | 39 |
| 4.1 | Příprava buněk..... | 39 |
| 4.2 | Příprava vzorků na měření..... | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.1 | MTT test..... | 43 |
| 4.2.2 | Postup..... | 44 |
| 4.3 | Postup měření vzorků na přístroj..... | 45 |
| 4.3.1 | Přístroj Elisa Reader Biotek Synergy HT | 46 |
| 5 | Výsledky | 49 |
| 5.1 | Buněčná kultura SNU475 | 49 |
| 5.2 | Zkouška působení zvolené látky na kulturu | 49 |
| 5.3 | Získané výsledky MTT testu | 51 |
| 6 | Diskuze | 56 |
| 7 | Závěr | 58 |
| 8 | Seznam použitých zkratk..... | 59 |
| 9 | Seznam použité literatury | 60 |
| 10 | Seznam použitých obrázků | 67 |
| 11 | Seznam použitých tabulek..... | 68 |
| 12 | Seznam Příloh..... | 69 |

1 ÚVOD

Endokrinní disruptory (EDs) se definují jako látky, jež jsou schopné narušovat působení hormonů a tyto hormony hrají důležitou roli v našem životě, podílejí se na fungování procesů a také zajišťují správný vývoj jedince i jeho reprodukce. EDs lze dělit na dvě skupiny látek a to na látky přírodního a syntetického původu. Mezi přírodní se řadí, např. fytoestrogeny, které obsahuje, např. sója a její produkty. Převážná většina kontaminantů, jež působí jako EDs, tvoří uměle vytvořené sloučeniny. Všechny tyto látky jsou kosmopolitně šířeny, nalzáme je ve vodě, půdě, plastech, kosmetice i v potravinách, proto expozice těmto sloučeninám je nevyhnutelná.

S přibývajícím zájmem o problematiku EDs, rozvíjí se nové moderní metody k efektivní delecí EDs ze životního prostředí, ke snižování expozice člověka či prevence nežádoucích účinků na lidský organismus nebo k včasnému záchytu markerů. Jak je škála EDs různorodá, tak se jejich stupeň toxicity, doba působení či rozsah účinků liší.

Tato bakalářská práce podává přehled o endokrinních disruptorech, dále uvádí možné následky expozice těmto látkám a uvádí přehled metod monitorování EDs. Sledován byl účinek zvolené chemické látky – parfémované vody na buněčnou linii SNU475, lidské hepatocyty.

Experimentální část je zaměřena na testování působení zvolené parfémované vody na buněčných kulturách SNU475. Zaznamenaly se průběžně výsledky působení po časových intervalech: 24 hodin, 3 dnů a 7 dnů. Následně byl proveden MTT test k vyhodnocení vlivu parfémované vody na buněčnou linii SNU475.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce je vypracovat literární rešerši problému endokrinních disruptorů a přehled metod jejich monitorování. Dále se teoretická část věnuje možným účinkům těchto znečišťujících látek na lidský organismus, především na pohlavní soustavu.

Cílem praktické části je výzkum působení zvolené chemické látky na buněčnou linii SNU475. Dílčím cílem je tedy i seznámení se s prací s buněčnými kulturami, což znamená naučit se postupy pro udržování buněk, např. pasážování. Na základě vypracované rešerše byla vybrána parfémovaná voda, jako potenciální ED pro testování účinků v různých koncentracích proliferace buněčné linie SNU475 v závislosti na době působení. Na základě měření buněk pomocí MTT testu se vyhodnotí vliv této chemické látky na lidské zdraví.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Definice endokrinních disruptorů

Endokrinní disruptory (EDs) tvoří skupinu exogenních látek, které jsou velmi heterogenní a mají nepříznivý, v některých případech až toxický vliv na organismus. Díky schopnosti se vázat na receptory pro hormony mohou tak narušovat endokrinní systém, tedy i homeostázu. Odpovídá také za metabolické procesy, chování, růst a vývoj jedince. Podobně jako endogenní hormony působí již v malém množství. Nacházejí se ve vodě, v ovzduší, půdě, plastech i potravinách. Mohou vznikat jako produkty syntetických reakcí nebo mohou být přírodního původu – fytoestrogeny. Některé EDs se mohou kumulovat v organismu a takto mohou působit na vývoj dalších generací, přičemž nejcitlivější období bývá prenatální fáze a částečná postnatální fáze, kdy organismus prochází rychlými strukturálními změnami a nemá dostatečně vyvinuté reparační mechanismy. (Endocrine disruptors, 2022)

3.2 Historie EDs

V 30. letech 20. století objevil švýcarský chemik Paul Hermann Miller insekticidní účinky DDT, který byl objeven již v 19. století. Během druhé světové války byla tato látka hojně používána. V roce 1962 vydala americká bioložka Rachel Carsonová knihu „Silent Spring“, v níž varovala lidstvo o hrozbě necíleného používání chemických látek a popisovala nebezpečí perzistenci DDT a jeho bioakumulaci v živočišných tkáních. Za toto dílo sklidila vlnu kritik, ale její závěry následně přijali jako správné. V některých studiích se uvádělo, že jeden z produktů DDT blokuje funkci samčích pohlavních hormonů, což může vést k dysfunkcím nebo k poklesu počtu spermií u samců. Došlo k omezení používání pesticidů. (Cajthaml, 2018)

V 30. letech se začaly vyrábět polychlorované bifenyly (PCB), jež našly využití v mnoha odvětvích díky své chemické stálosti. PCB zapříčinily zdravotní problémy pracovníků provozu, kde se PCB vyráběly, např. kožní vyrážka, chlorakné nebo narušení imunitního a endokrinního systému. (Cajthaml, 2018)

Ve 40. letech se vyvinulo a podávalo léčivo diethylstilbestrol (DES), které původně mělo sloužit jako antikoncepční přípravek a také jako lék proti spontánním potratům.

Po několika letech se prokázaly abnormality a raritní druhy rakoviny vagíny způsobené touto látkou. U žen z druhé generace se dalo zpozorovat snížení schopnosti donošení plodu nebo snížení plodnosti u mužů a zvýšení pravděpodobnosti kryptorchismu. Ukázalo se, že DES vyvolává signální dráhu vedoucí k epigenetické deformaci genetické informace, jež se projevuje až na další generaci. (Wuttke, 2010)

3.3 Klasifikace EDs dle původu

3.3.1 Přírodní EDs

Mezi endokrinní disruptory se řadí také látky, které mají rostlinný původ. Typickým příkladem jsou fytoestrogeny s hormonální aktivitou. Fytoestrogeny se mohou chovat jako samičí pohlavní hormony. Patří mezi ně: genistein, daidzein, matairesol, biochanin A, enterodiol, enterolacton. Tyto látky mají charakter steroidních hormonů a vyskytují se v sójových bobech a jejich produktech. (Preda, 2012)

Při zvýšeném úsilí o zavádění zdravějšího stravování vedlo ke zvýšené spotřebě sójových výrobků, což následně způsobilo významnou expozici fytoestrogenům. Sója je oblíbenou potravinářskou přísadou, protože obsahuje rostlinnou bílkovinu s vysokým obsahem vlákniny, nenasycených tuků a neobsahuje laktózu a cholesterol. Bývá součástí součástí energetických tyčinek, cereálií, sportovních nápojů a kojeneckých výživ. V moči kojenců krmených výživami na sójové bázi byly nalezeny 500krát vyšší koncentrace daidzeinu a genisteinu než ve srovnání s dětmi krmenými kravským mlékem. (Cajthaml, 2018)

Jako další zástupce se uvádí mykoestrogeny zearalenon produkované houbou rodu *Fusarium*.

Steroidní pohlavní hormony vylučované živočichy a zejména lidmi se mohou nacházet v odpadních vodách a následně pocházet i z čistíren odpadních vod. Ovlivňují především vodní faunu, kteří žijí v prostředí vody odcházející z čistíren. (Cajthaml, 2018)

3.3.2 Syntetické EDs

3.3.2.1 Perzistentní organické polulanty

Perzistentní organické polulanty (POP) představují třídu chemikálií, které se vyznačují podobnými vlastnostmi, jako je perzistence v životním prostředí, vysoká toxicita a dlouhý poločas rozpadu, kterým se rozumí roky nebo dokonce desetiletí před jejich degradací na méně toxické formy. Mají schopnost bioakumulace, ukládají se do tukových tkání a tak představují hrozbu pro lidské zdraví. Bioakumulace vede k biomagnifikaci, protože POP jsou absorbovány nižšími organismy, např. fytoplankton, které jsou následně konzumovány zooplanktonem, a hromadí se v tukových tkáních těchto organismů, které jsou pak požírány vyššími organismy. To možná zvyšuje účinek POP v potravním řetězci. Tento účinek koncentrace dosahuje maximální úrovně u špičkových druhů predátorů, jako jsou lidé a další savci. POP mají mírnou těkavost a jsou chemicky a ekologicky stabilní. Díky těmto vlastnostem se mohou šířit po celém světě a lze je nalézt všude, včetně Arktidy, Antarktidy a dokonce i vzdálených tichomořských ostrovů. POP se také hromadí v půdě a vodě. Mohou se vypařovat nebo sublimovat do atmosféry a cestovat do vzdálených míst, aby znovu kondenzovaly. Prostřednictvím tohoto cyklu mohou tyto znečišťující látky vstupovat do potravní sítě vdechováním a tím kontaminovat původní obyvatele v odlehlých oblastech. Domorodí obyvatelé proto často mají nejvyšší úroveň kontaminace POP, i když tyto produkty nevyráběli ani přímo nekonzumovali. (Alharbi, 2018)

POP zahrnují polyhalogenované průmyslové chemikálie, jako jsou PCB, polybromované bifenyly (PBB), OCP, jako je dichlordifenyltrichlorethan (DDT), aldrin a heptachlor, a průmyslové vedlejší produkty, jako jsou polyaromatické uhlovodíky (PAH). Stockholmská úmluva, která se v roce 2004 stala mezinárodním právem, vypracovala seznam původních dvanácti látek POP určené k odstranění z výroby, použití, dovozu a vývozu za účelem odstranění nebo snížení jejich úniků. Některým znečišťujícím látkám jsou uděleny výjimky pro použití, jako je DDT v některých zemích, kde malárie představuje velkou zdravotní hrozbu. Komáři, kteří způsobují malárii, jsou zodpovědní za významnou nemocnost a úmrtí jednoho milionu lidí ročně, většinou dětí, a řešení tohoto problému stále není zcela jasné. DDT, jakožto účinná látka při zabíjení a odpuzování komárů přenášejících malárii, se stále používá, i přestože je DDT vysoce

toxický pro zdraví a životní prostředí. V některých zemích, zejména v Africe, může přínos použití této znečišťující látky k boji proti malárii kompenzovat riziko. (Jones, 1999)

Dále některé PCB používané ve starých elektrických transformátorech a kondenzátorech v rozvojových zemích, kde jsou alternativy příliš drahé nebo příliš složité na výrobu. (Cajthaml, 2018)

3.3.2.2 PCB

PCB tvoří třídu chemicky stabilních aromatických sloučenin, ve kterých je 1 až 10 atomů chloru navázáno na bifenylovou kostru. PCB byly v posledních desetiletích široce používány v zemědělství a v průmyslu. Jejich aplikace zahrnovala dielektrické kapaliny v kondenzátorech a transformátorech, hydraulické kapaliny, jejich použití ve stavebních materiálech, jako jsou přísady a změkčovadla do barev, plastů a pryžových tmelů, kopírovací papír, lepidla, pesticidy. Díky jejich širokému používání a neopatrné likvidaci během několika desetiletí se PCB široce rozšířily v životním prostředí; ačkoli na ně existují zákazy a omezení na celosvětové úrovni, stále se vyskytují v atmosféře, řekách, rybách, divoké zvěři, lidském mateřském mléce a dalších biologických vzorcích a v ekosystémech. Toxický dopad PCB na lidské zdraví a na životní prostředí byl poprvé rozpoznán v 60. letech 20. století, zejména při incidentu Yusho v Japonsku a později při havárii Yu-Cheng na Tchaj-wanu. (Encarnação, 2019)

PCB vykazují endokrinní narušující účinky, jako je transkripční aktivita estrogenních receptorů (ERs) a proliferace buněčné linie rakoviny prsu, a ovlivňují enzymy zprostředkované hormonem štítné žlázy. Kromě bioakumulačních a biomagnifikačních charakteristik PCB byly tyto chemikálie také předány budoucím generacím prostřednictvím těhotenství a kojení, čímž se odhalují nejzranitelnější osoby v děloze a kojeneckém věku během kritických fází vývoje, kde může mít narušení dramatický účinek později v životě. Vzhledem k důkazům, že způsobují rakovinu u lidí a zvířat, byly PCB v roce 2013 klasifikovány Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako karcinogenní pro člověka. (Alharbi, 2018)

3.3.2.3 PBDE

Polyhalogenované aromatické sloučeniny (PBDE) tvoří třídu polyhalogenovaných aromatických sloučenin se základní strukturou sestávající ze dvou fenylových kruhů spojených atomem kyslíku, s proměnným počtem 1 až 10 atomů bromidu. Pouze několik sloučenin různých kombinací je komerčně dostupných a jejich toxicita závisí na specifické substituci bromu, např. kongener deka-BDE je špatně absorbován a rychle eliminován. Naproti tomu kongenery tri- až hexa-BDE jsou silně absorbovány, pomalu eliminovány a silně bioakumulativní. (Encarnação, 2019)

PBDE jsou široce používány jako bromované zpomalovače hoření a jsou přítomny v řadě spotřebního zboží, plastů, elektroniky, nábytku a textilu. Přestože byly PBDE celosvětově postupně vyřazovány (v EU byly zakázány v letech 2004 a 2008), studie biomonitoringu naznačují, že jsou stále celosvětově všudypřítomné v lidské krvi a mateřském mléce. Řada starších produktů, zejména e-odpad, jako jsou zastaralé elektronické a elektrické položky, obsahují značné množství těchto znečišťujících látek, které se stále uvolňují do životního prostředí, což vede ke kontaminaci ekosystémů. PBDE byly nalezeny v rybách, vejcích, lidském mateřském mléce a u kojenců a batolat. Nejvyšší koncentrace se nacházejí na vrcholu potravního řetězce, což poukazuje na biomagnifikaci. Způsoby expozice zahrnují požití, vdechování prachu v interiéru a dermální kontakt. (Alhabri, 2018)

Bylo prokázáno, že některé PBDE a jejich směsi narušují hormon štítné žlázy tyroxin a jsou spojovány s deficitem nervového vývoje u potkanů a lidí. Směsi PBDE mají zvýšenou buněčnou proliferaci v lidských buněčných liniích rakoviny prsu a také karcinogenní účinky u lidí. (Jones, 1999)

3.3.2.4 Organochlorové pesticidy

Organochlorové pesticidy (OCP) se používají jako insekticidy, herbicidy, fungicidy a rodenticidy. Na základě jejich chemické struktury, existuje pět hlavních tříd pesticidů; organochlory (jako je DDT, endosulfan, lindan, mirex, dieldrin, chlordan), organofosfáty (jako malathion, parathion), karbamáty (jako karbaryl, karbofuran, aminokarb), fyretroidy (jako je cypermethrin, permethrin) a triaziny (atrazin je nejvíce studovaným triazinovým herbicidem). I když všechny třídy pesticidů mohou mít nepříznivé účinky

na zdraví člověka, OCP představují největší riziko jako EDs díky jejich lipofilním vlastnostem a tím i bioakumulačnímu potenciálu. Pracovní a obytné expozice pesticidům je závažným problémem a předmětem několika epidemiologických studií. Dochází k primární expozici populací pesticidům prostřednictvím příjmu potravy a požití těchto chemikálií. Nicméně inhalace a dermální absorpce OCP (např. jako DDT) mohou být důležitými cestami expozice. (Jones, 1999)

Byl zaznamenán vliv OCP na mužskou a ženskou plodnost jako důsledky estrogenních, antiestrogenních, androgenních a antiandrogenních účinků. Některé OCP strukturně připomínají E2, a tak se mohou vázat na estrogenový receptor (ER) a napodobovat účinky endogenního ligandu.

Některé xenohormony mohou vykazovat antiestrogenní účinky vazbou na acylový uhlovodíkový receptor (AHR) a zahájení transkripce cytochromu enzymy p450, které metabolizují E2. Zbytky OCP byly nalezeny v lidských tkáních po celém světě. Existují četné epidemiologické studie uvádějící hladiny OCP v biologických vzorcích (jako je sérum, tuková tkáň, mateřské mléko) a zkoumání vztahů k různým nemocem a poruchám u lidí. Jejich zbytky byly také zjištěny v pupečnickové krvi. (Encarnação, 2019)

3.3.3 Neperzistentní polulanty

Existují chemické látky s kratším poločasem rozpadu a nižší liposolubilitou, které se nazývají nepersistentní EDs (npEDs). Příkladem npEDs jsou bisfenol A (BPA), ftaláty, parabeny a triklosany (TCS). BPA je dobře známou složkou EDC v kojeneckých lahvích, dětských hračkách, zubních tmelech, nátěrech stvrzenek a epoxidových pryskyřicích používaných k potahování vnitřku potravinových konzerv. Di-2-ethylhexylftalát (DEHP) se používá jako změkčovadlo a je obsažen v celé řadě výrobků, jako jsou plasty, kosmetika a zdravotnické prostředky. Parabeny (alkylestery kyseliny 4-hydroxybenzoové) se používají jako konzervační látky ve výrobcích osobní péče, jako je kosmetika a farmaceutické výrobky. (Yilmaz, 2020)

3.3.3.1 BPA

BPA, chemicky zvaný 4-(2-(4-hydroxyfenyl)propan-2-yl)fenol, je důležitý monomer používaný pro výrobu polykarbonátů, epoxidových pryskyřic, polyesterů, polysulfonů a polyetherketonů a také jako polymerní přísada do změkčovadel a halogenovaných zpomalovačů hoření. Je přítomen v široké škále běžně používaných předmětů, včetně kojeneckých lahví a vložek pro kovové plechovky od potravin a nápojů, oční čočky, lékařské vybavení, spotřební elektroniku a elektrická zařízení. (Yilmaz, 2020)

BPA byl poprvé syntetizován ruským chemikem Aleksandrem P. Dianinem v roce 1891, který nechal reagovat fenol s acetonem v přítomnosti kyselého katalyzátoru. V roce 1905 Theodor Zincke také oznámil jeho syntézu. Ve 30. letech 20. století bylo zjištěno, že BPA má estrogenní aktivitu, ale kvůli vývoji silnějšího syntetického estrogenu v roce 1938, diethylstilbestrolu (DES), který je silnější než přirozený estrogen, BPA byl pro tuto aplikaci ignorován. V roce 1953 syntetizoval chemik Bayer Hermann Schnell polykarbonáty reakcí BPA s fosgenem. Nově vyrobený materiál byl čirý, pevný a stabilní a mohl být ohříván v mikrovlnných troubách bez deformace. Výroba nových polykarbonátů dosáhla průmyslové úrovně v 60. letech 20. století a výroba BPA od té doby značně vzrostla. V roce 2015 se produkce BPA odhadovala na více než 4,5 milionu tun. Každý rok se více než 100 t uvolní do atmosféry a nachází se ve vzduchu, pitné vodě, domácím prachu, potravinách, jezerech, moři a půdě, díky tomu je BPA všudypřítomný. K expozici člověka dochází prostřednictvím potravin, pitné vody, výrobků pro domácnost, kosmetiky, lékařského vybavení, dentálních materiálů a pracovních zdrojů. Polymerace polykarbonátových plastů není 100% úplná a v důsledku toho může nenavázaný monomer nebo přísady snadno vyluhovat z produktů do životního prostředí. Několik studií prokázalo pokračující vystavení běžné populace této chemické látce. (Encarnação, 2019)

Přestože je estrogenní aktivita BPA nižší než u přirozených estrogenů, jeho prevalence ve vysokých koncentracích v životním prostředí, včetně povrchových, podzemních a pitných vod, představuje potenciální riziko pro lidské zdraví.

U lidí se po expozici téměř 100 % BPA vylučuje močí, vylučuje se převážně jako BPA-glukuronid. Na rozdíl od PCB, které mohou v lidském těle přetrvávat desítky let, má BPA

průměrný poločas přibližně 6 hodin u lidí. Navzdory tomuto krátkému poločasu lze BPA považovat za perzistentní kvůli jeho rozšířenému výskytu a neustálé expozici, které je populace vystavena. Několik studií uvádí přítomnost BPA ve vzorcích moči dětí a dospělých. V biomonitringové studii 100% z 81 vyšetřených dětí odhalilo přítomnost BPA ve vzorcích moči. BPA se nachází v plodové vodě, což poskytuje důkaz o jeho průchodu placentou. Jeho přítomnost byla nalezena v mateřském a fetálním séru a plodové vody, což ukazuje na významnou expozici během prenatálního stádia. (Encarnação, 2019)

Bylo popsáno mnoho studií lidského biologického monitorování expozice BPA v celosvětové populaci. Tyto studie odhalují expozici více než 90 % světové populace a ukazují, že neexistují žádné rozdíly v hladinách BPA mezi zeměmi nebo kontinenty a hladiny v moči u nejmladších skupin mají tendenci být vyšší než u starších. (Encarnação, 2019)

Na základě omezení uvalených na používání BPA v mnoha zemích byly syntetizovány analogy BPA, jako jsou nejběžnější náhražky bisfenolů F a S, které nahradily BPA v mnoha spotřebitelských produktech. Bylo zdokumentováno a používáno šestnáct analogů bisfenolu, komerčně v termopapírech, nádobách na potraviny, lacích na hračky, dentálních těsnicích prostředcích, výrobcích pro osobní péči a v mnoha dalších aplikacích. Tyto analogy jsou nyní často detekovány v biomonitringových studiích a v životním prostředí a také vykazují aktivitu narušující endokrinní systém, cytotoxicitu, genotoxicitu a reprodukční toxicitu a neurotoxicitu. (Endocrine disruptors, 2022)

3.3.3.2 Ftaláty

Ftaláty jsou skupinou multifunkčních průmyslových chemikálií a používají se v široké řadě spotřebních výrobků. Používají se jako změkčovadla, pro zlepšení pružnosti plastů, jako je polyvinylchlorid (PVC), nebo jako přísady v textilním průmyslu a jako nosiče v pesticidních přípravcích. Přidávají se do léčiv jako povlaky v léčivech s časovaným uvolňováním a používají se také jako průmyslová rozpouštědla a lubrikanty. Ftaláty se často přidávají do spotřebních výrobků a výrobků pro osobní péči, jako je kosmetika, parfémy, deodoranty, spreje na vlasy, přípravky na čištění pokožky, aby si zachovaly barvu nebo vůni, a používají se v lékařských zařízeních, hračkách a palivech pro zvýšení

výkonu. Jsou to diestery kyseliny ftalové (kyselina 1,2-benzendikarboxylová) a alkoholového zbytku. Ftalátové produkty vykazují různé vlastnosti, které závisí na délce a stupni rozvětvení postranního řetězce. Di-(2-ethylhexyl)-ftalát s rozvětveným řetězcem (DEHP) s osmi atomy uhlíku v alkylovém postranním řetězci je celosvětově jedním z nejběžněji používaných ftalátů. (Darbre, 2022)

Ftaláty nejsou kovalentně vázány na polymerní matici a jako takové se mohou během svého životního cyklu snadno a nepřetržitě uvolňovat z polymerních řetězců do okolního prostředí. V důsledku toho je expozice člověka velmi rozšířená. K expozici dochází především požitím, vdechováním a kontaktem s kůží. Stejně jako u BPA jsou ftaláty všudypřítomné a neustálá expozice běžné populace jim byla prokázána v různých studiích biomonitoringu. Ftalátový syndrom je rozmanitost účinků pozorovaných při pokusech na potkanech a je charakterizována malformacemi jejich reprodukčních orgánů, zmenšenými anogenitálními vzdálenostmi a zadržováním bradavek. Přestože expozice jedinému ftalátu pod určitou prahovou hodnotou nevyvolává žádný zjevný účinek, směs několika ftalátů může u exponovaného jedince vykazovat toxicitu. (Yilmaz, 2020)

První zprávy o nepříznivých účincích ftalátů na zvířata pocházejí z roku 1945. V posledních letech byly hlášeny důkazy o lidském analogu „ftalátového syndromu“ prokázané narušením androgenních signálních drah. Ftaláty se podílejí na různých mužských malformacích zevních genitálií, jako je kryptorchismus a hypospadiie. Zprávy o účincích prenatální expozice ftalátům u lidí ukázaly, že výsledky porodu a zkrácení anogenitální vzdálenosti byly spojeny s vysokými hladinami ftalátových esterů, zejména DEHP, v moči matek během těhotenství. Výskyt těchto genitálních malformací se zvyšuje novorozenci mužského pohlaví. V nedávné studii byly měřeny hladiny ftalátů v moči u 1170 peripubertálních dívek. Koncentrace ftalátů se pohybovaly od 1 do 10 000 µg/l a byly odhadnuty souvislosti mezi expozicí ftalátům a věkem puberty. (Encarnação, 2019)

3.3.3.3 Těžké kovy

Populace jsou vystaveny těžkými kovy různými cestami, jako např. doplňky stravy, cigarety, alkoholické nápoje a kontaminovaný vzduch, voda a jídlo. Lidé jsou obecně vystaveni arsenu prostřednictvím požití kontaminovaných potravin a vody. K expozici

olovu dochází při vdechování spálených ropných produktů, požití pitné vody kontaminované olovem používaným v potrubí a vdechování částic barev na bázi olova.

Rtuť je další těžký kov, který může kontaminovat vodu, půda a vzduch. Nejběžnější způsob expozice rtuti dochází při požití kontaminovaných ryb. Ve studii provedené na Aljašce byly ve vzorcích potravin bohatých na lipidy nalezeny rtuť a arsen. Tato zjištění tomu nasvědčují to, že organokovy mohou vykazovat endokrinní disruptivní účinky, zejména na reprodukční funkce. Těžké kovy údajně způsobují poškození varlat. V tomto ohledu je toxicita kadmia jako kontaminant životního prostředí již dlouho známá. (Yilmaz, 2020)

Tabulka 1: Přehled látek a jejich možné účinky (Yilmaz, 2020)

| LÁTKA | ZDROJ | ÚČINKY |
|------------|--|--|
| PCB | Příspěvky a změkčovadla do plastů, lepidla, kopírovací papír | Proliferace buněčné linie rakoviny prsu |
| PBDE | Bromované zpomalovače hoření, plasty | Narušení hormonů štítné žlázy, proliferace buněčné linie rakoviny prsu |
| OCP | Insekticidy, herbicidy, fungicidy, rodenticidy | Sterilita |
| BPA | Kojenecké lahve, oční čočky, halogenové zpomalovače hoření, obaly na potraviny | Neplodnost, rakovina prsu a prostaty, obezita, diabetes |
| Ftaláty | PVC, průmyslová rozpouštědla, kosmetika | Kryptorchismus, hypospadie, malformace pohlavních orgánů |
| Těžké kovy | Kontaminovaná voda, jídlo, cigarety, doplňky stravy | Poškození varlat |

3.4 Expozice člověka endokrinním disruptorům

V dnešní době jsou lidé vystaveni širokému spektru chemikálií různými cestami expozice. K přenosu polutantů z okolního prostředí do lidského organismu dochází

obvykle nevědomým způsobem během každodenního života. K expozici člověka EDs dochází především požitím a do určité míry inhalací a dermálním vychytáváním. (Yilmaz, 2020)

Požítí je hlavní vstupní cestou POP a dalších EDs do lidského těla a představuje více než 90 % celkové chemické expozice. POP se mohou ukládat v tukové tkáni těla po dlouhou dobu a způsobit tak delší expozici. Plastifikátory, jako je bisfenol A, se v těle hromadí s odhadovaným poločasem asi 6 hodin. Poté se vylučují močí. Plastifikátory jsou v populacích velmi často detekovány. Přestože změkčovadla nejsou uložena v tukové tkáni, dochází k neustálému každodennímu vystavení těmto chemikáliím, což vyvolává obavy z jejich endokrinně disruptivních účinků. (Encarnação, 2019)

Některé chemické látky v životním prostředí mohou být těkavé a přenášeny na člověka inhalační cestou. Inhalace může být velmi důležitou cestou expozice, zejména u těkavých chemikálií a polotěkavých sloučenin. Látky znečišťující životní prostředí jsou často detekovány u zvířat, jako jsou lední medvědi žijící v arktických oblastech. Přítomnost EDs v tkáních savců v odlehlých oblastech naznačuje, že tyto chemikálie jsou na velké vzdálenosti rozptýleny vzduchem i oceánskými proudy. (Yilmaz, 2020)

Vnitřní prostor je důležitým prostředím pro potenciální expozici chemikáliím a částicím přenášeným vzduchem. Pracovní expozice EDs je také významnou cestou kontaminace pro lidi pracující v rizikovém prostředí.

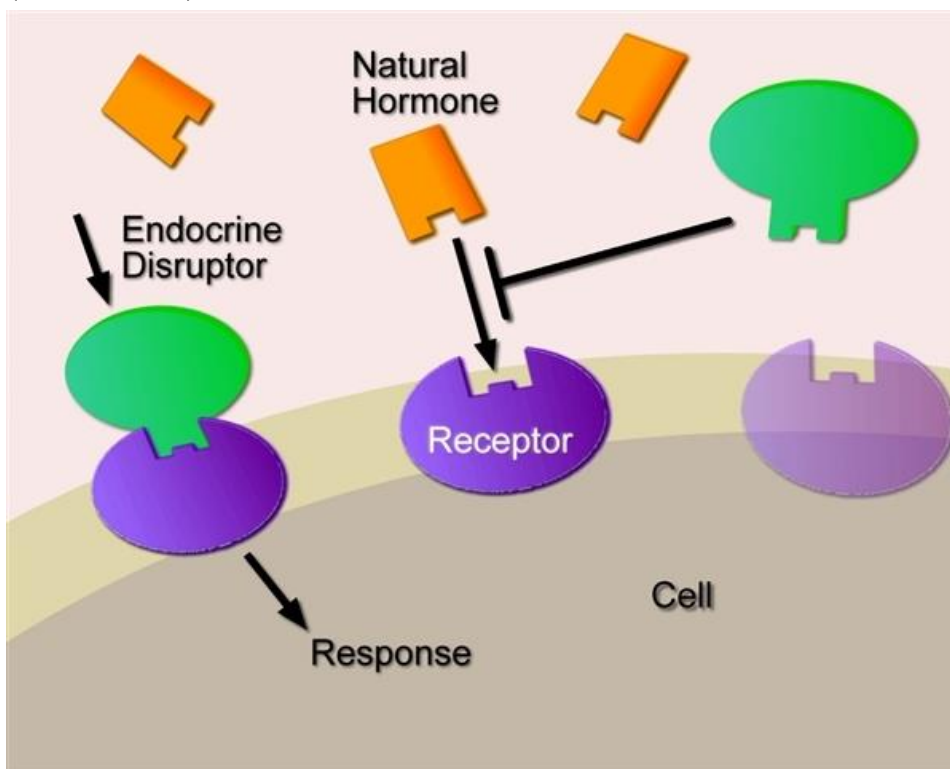
Jak již bylo zmíněno, POP jsou látky rozpustné v tucích, a proto mohou být do lidského těla přeneseny dermální absorpcí. Expozice vnitřním organickým chemikáliím dermální cestou představuje pouze malé procento celkové expozice, ale může být významné. Riziko transdermální expozice POP může být podstatně vyšší v případech, jako je manipulace s kontaminovanými materiály nebo plavání ve znečištěných vodách. (Yilmaz, 2020)

3.5 Mechanismus působení EDs

Endokrinní žlázy, umístěné na různých místech v těle, uvolňují specifické hormony, které ovlivňují určité buňky, cílové buňky a receptory. Ale existují i chemikálie, které

mohou interferovat s hormonální interakcí. Když EDs vstoupí do těla, mohou napodobit přirozené hormony, interagují s hormonálními receptory a mohou potenciálně narušit normální funkce těla. (Dvořáková, 2019)

Prostřednictvím tzv. poslů mohou hormony předávat signál cílovým buňkám. Lipofilní hormony prostupují membránou ke svým receptorům uvnitř membrány. Po navázání se vytvoří komplex. Tento komplex vstupuje do jádra, kde zahajuje iniciaci transkripce a následně proteosyntézy proteinů, jež vyvolají buněčnou odpověď. Touto cestou se dostávají hormony k buňkám jako tzv. první poslové. Hydrofilní hormony nemohou prostoupit membránou, vážou se proto na receptory na vnějším povrchu membrány a dochází tak k aktivaci; aktivovaný membránový receptor vede signál pomocí membránových enzymů na vnitřní stranu membrány, kde je spuštěna produkce tzv. druhého posla. Ten pak aktivuje další enzymy a spouští tak buněčnou odpověď. (Darbre, 2022)



Obrázek 1: mechanismus působení jednotlivých disruptorů (Goidescu, 2016)

Při studiu endokrinní disrupce se většina studií zaměřuje na steroidní hormony, které jsou lipofilní a jejich mechanismus účinku tedy probíhá pomocí jaderných receptorů. Receptorový mechanismus zahrnuje jaderné receptory, které jsou přítomny v jádře nebo v cytosolu buňky. Tyto receptory po navázání ligandu mění svou strukturní konformaci, často dimerizují a receptory z cytosolu jsou poté přeneseny do jádra, kde se váží

na specifické úseky DNA, jejichž aktivace má za následek zvýšení exprese cílového genu a tedy vyvolání buněčné odpovědi. Látka působící stejně jako přirozený ligand se nazývá agonista. Na druhé straně, antagonistá brání vazbě agonistů a jeho aktivaci tím, že se naváže na receptor. Dalšími důležitými mechanismy endokrinní disrupce je vzájemné ovlivňování receptorů a také interakce xenobiotik s proteiny, na které se váží hormony. To způsobuje poruchy v transportu hormonů a také mění množství volných hormonů v krvi. Většina in vitro studií o endokrinní disrupci se věnuje estrogennímu a androgennímu receptoru. Při absenci ligandů jsou steroidní receptory inaktivní a často součástí multiproteinového komplexu v buňce. (Dvořáková, 2019)

3.5.1 Působení EDs na reprodukci

Většina EDs může interagovat s účinky lipidů (steroidní) nebo aminokyselinových derivátů (štítná žláza) hormonů, zatímco některé interagují se syntézou nebo signalizací hormonů. Další méně prozkoumané mechanismy účinku EDs jsou přímé účinky na geny. Estrogeny a EDs s estrogenním působením byly například navrženy jako způsobující poškození DNA, čímž podporuje maligní diferenciaci postižených buněk. (Solomon, 2000)

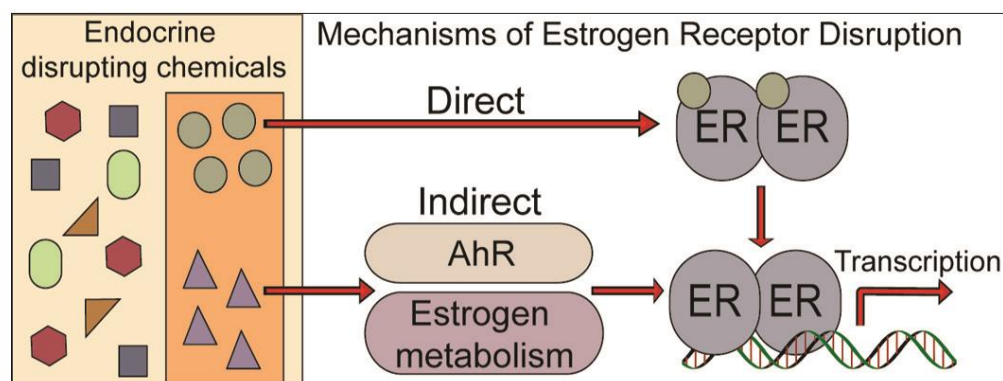
Znepokojujícím novým aspektem je jejich epigenetický dopad; část genů, u které dochází k methylaci již v raném věku života, může způsobit účinky po letech a může dokonce být transgeneračně zděděno. Většina EDs narušující reprodukci jednájí buď jako agonisté nebo antagonisté steroidních pohlavních hormonů, estrogenů nebo androgenů. Jen velmi málo EDs má životaohrožující dopad prostřednictvím interference s hormony nezbytné pro udržení základních životních mechanismů. Nicméně účinky některých EDs mohou ohrozit životaschopnost organismu, protože mohou rušit normální funkci orgánů nebo způsobit malignity těchto orgánů. (Darbre, 2022)

Hlavní roli pro reprodukci hraje správná funkce reprodukčního systému, tj. hypotalamo-hypofýza-gonadální osa (HPG), stejně jako správné fungování jiných orgánů regulovaných gonadálními steroidy, jako je děloha a některé stupně prsní žlázy. Většina EDs, která narušuje reprodukci, zasahuje do steroidní signalizace, tj. se správným

působením estrogenů nebo androgenů. Některé EDs buď inhibují syntézu nebo zasahují do metabolismu pohlavních steroidů. Většina EDs s nepříznivými účinky na reprodukci se váže buď na estrogenní receptory (ERs) nebo androgenní receptory (ARs) a tím, že to může být buď stimulovat nebo inhibovat transkripční nebo posttranskripční mechanismy; navíc steroidní receptory umístěné v membráně, ovlivňující buď iontové kanály nebo sekundární mediátory, mohou zprostředkovávat efekty EDs. Prostřednictvím těchto mechanismů mohou zasahovat do fundamentálních steroidních účinků v mozku, hypofýzární žlázy, gonády a pohlavní znaky, jako je děloha a prsní žlázy u žen a prostaty a semenných váčků u mužů. (Dvořáková, 2019)

3.5.1.1 Estrogenové receptory

Estrogenové receptory (ERs) se charakterizují jako jaderné receptory, které se aktivují estrogenními agonisty jako např. estradiol, estriol, estron apod. v cytosolu. K tvorbě ERs dochází u žen v prsní žláze, děloze, endometriu a vejcovodech, u obou pohlaví v buňkách hladkého svalstva. Nachází se převážně v jádře a v podobě inaktivních ERs s asociovanými stresovými proteiny (HSP), jež zabraňují změnám tvaru receptoru, vytváří komplex. HSP se při reakci vazby estrogení látky na ERs oddělí a zůstane po HSP místo, kam se naváže ligand. Receptor následně s ligandem tvoří homodimerní komplex, jenž se váže na specifické úseky DNA zvané EREs (estrogen response elements) v regulační části genů a dojde k vyvolání estrogení odpovědi buňky. Připojením dalších transkripčních faktorů vede k transkripci genů a k syntéze potřebných protein pro projev estrogeního děje. (Macíková, 2007)



Obrázek 2: Mechanismus působení estrogenních receptorů (Shanle, 2011)

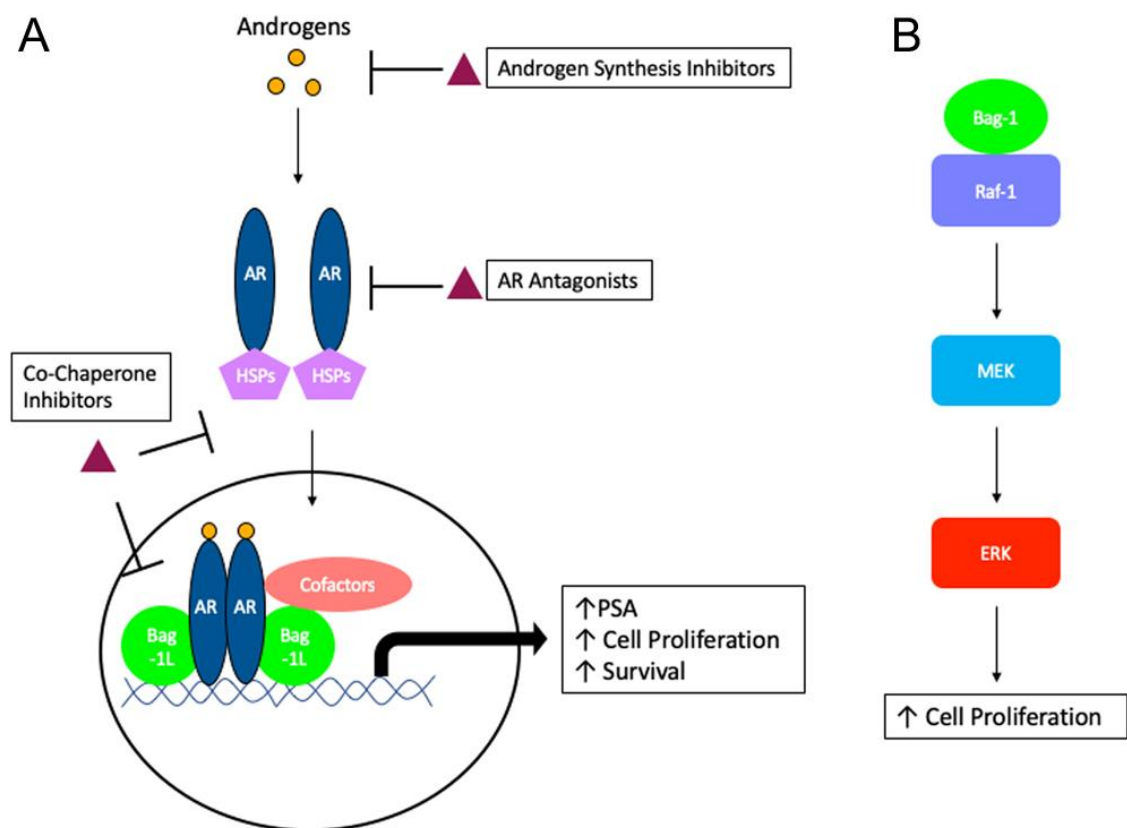
Estrogenní receptory se tak mohou podílet na procesech reprodukce a vývoje jedince, signalizace v kardiovaskulárním a centrálním nervovém systému, metabolismu, udržování homeostázy vody a iontů, remodelace kostí, imunomodulačních procesech atd. U lidí byla zjištěna přítomnost dvou základních subtypů $ER\alpha$, $ER\beta$ s dalšími číselně označenými isoformami. Byly rovněž identifikovány receptory ERR (estrogen related receptors) s isoformami α , β , γ , schopnými vázat fytoestrogeny nebo syntetické látky. (Dvořáková, 2019)

Pro sledování působení EDs vyžaduje propojení několika oborů preventivní medicíny do vědeckého výzkumu za pomoci pokročilých analytických metod. Výsledky se využijí k prevenci a časnému zachycení nemocí, s jejichž výskytem je spojena expozice EDs. (Dvořáková, 2019)

Endokrinní disruptory se podílejí na narušení reprodukce a mohou negativně působit na sexuální diferenciaci. Dobrým důkazem narušení sexuálního rozvoje zvířat v oblastech znečištěných EDs je, že spotřeba perorálních antikoncepce obsahující ethinylestradiol kontaminuje odpadní vodu. Tento silný estrogen je vylučován prostřednictvím moči a není úplně metabolizován. Ethinylestradiol je tedy přítomen v odpadních vodách, které následně ústí do řek a tak to ovlivní vodní život v těchto oblastech. (Darbre, 2022)

3.5.1.2 Androgenové receptory

Androgenové receptory (ARs) je typ receptoru nacházející se v jádře, který se aktivuje vazbou na androgenní hormony (testosteron a jeho deriváty). Zprostředkovává účinek androgenů na cílové tkáni. Vyskytuje se v cytoplazmě a v jádře, společně s HSP vytváří komplex. Navázání ligandu na receptorový komplex vede k odloučení HSP i ke změně konformace receptoru, která je schopna se navázat na DNA v místech zvaných androgenové responzivní elementy (ARE). Tento proces vede k aktivaci genů ovlivňovaných androgeny. (Darbre, 2022)



Obrázek 3: Mechanismus působení androgenových receptorů (Lee, 2019)

Na ARs mají schopnost se vázat tzv. antiandrogeny, látky schopné blokovat funkce ARs. Díky této vlastnosti se využívají antiandrogeny při léčbě karcinomu prostaty. (Dvořáková, 2019)

3.6 Důsledky působení EDs na lidské zdraví

Stále více důkazů naznačuje, že antropogenní kontaminanty jsou všudypřítomné po celém světě a že mohou mít negativní účinky na zdraví zvířat a lidí. Tyto environmentální toxické látky mohou přímo nebo nepřímo působit na reprodukční systém a narušovat vývoj a plodnost. Dopady endokrinních disruptorů na endokrinní dráhu jsou komplexní a často se vyskytují prostřednictvím více přímých a nepřímých mechanismů, což ztěžuje předvídání jejich koncových účinků u zvířat a lidí. (Rahman, 2015) Kromě toho expozice může vést k různým účinkům u různých typů zvířat, v různých tkáních, v různých životních stádiích, proto k prozkoumání dlouhodobých důsledků expozice kontaminujícím látkám a jejich účinků na reprodukci jsou zapotřebí další studie u nejrůznějších populací a druhů. Přestože se účinky chemických látek u různých druhů mohou lišit, slouží modely na zvířatech jiných než člověk jako základ pro vědecké experimenty, protože poskytují toxikologické informace o EDs. Kromě toho je nutné zvážit účinky směsí kontaminujících látek z různých kategorií, aby se napodobila běžná expozice prostředí u domácích zvířat, volně žijících živočichů a lidí. Je třeba provést další studie na různých populacích, aby se zjistilo, zda se dopady chemických látek v životním prostředí na reprodukci liší podle populací v různých lokalitách světa. (Gonsioroski, 2020)

3.6.1 Následky expozice EDs na mužský pohlavní systém

V posledních desetiletích se stále častěji upozorňuje na nepříznivé účinky EDs na mužský reprodukční systém. Ačkoli několik studií z počátku 40. let 20. století navrhlo jako hlavní nepříznivý účinek způsobený EDs na mužský reprodukční systém zhoršení kvality spermatu, rozdílné výsledky z různých studií nebyly schopny navrhnout definitivní závěr ohledně dávky, velikosti expozice a typu chemické látky, která přispěla k výskytu nepříznivých účinků. Byly zaznamenány podobné trendy nežádoucích účinků na mužský reprodukční systém, jako je výskyt kryptorchismu a rakoviny varlat, které mohou souviset s expozicí EDs. Posledně jmenované nepříznivé účinky spolu se snížením kvality spermatu sdílejí podobné patofyziologické známky a jsou důležitými rizikovými faktory pro rozvoj poruch mužské plodnosti. (Sharma, 2020)

3.6.1.1 Kvalita spermií

Expozice BPA in utero může způsobit sníženou kvalitu spermií, přičemž exponované myši produkovaly spermie s výrazně sníženou integritou membrány spermií, pohyblivostí a rychlostí penetrace in vitro. K narušení semenných kanálků a snížení počtu zárodečných buněk v kanálcích došlo bez závislosti na dávce. Elektronová mikroskopie prokázala změny v endoplazmatickém retikulu (ER) Sertoliho a Leydigových buněk a úplnou absenci Sertoliho buněk při kombinaci BPA s diethylstilbestrolem, další endokrinně disruptivní chemickou látkou. (Rodprasert, 2019)

3.6.1.2 Rakovina varlat

Bylo prokázáno, že hladiny organochlorových pesticidů u matek korelují se zvýšeným rizikem rakoviny zárodečných buněk varlat ve srovnání s kontrolami. Hladiny organochlorových pesticidů však byly měřeny retrospektivně, takže není jasné, zda jejich synové byli vystaveni zvýšené expozici in utero. Mohou mít patofyziologickou roli v testikulární dysgenezi a vzniku rakoviny varlat, ale přesné mechanismy zůstávají nejasné. (Lymperi, 2018)

3.6.1.3 Kryptorchismus a hypospadie

Kryptorchismus patří mezi vrozené vady mužů, znamená nepřítomnost varlete v šourku u jedinců starších 4 měsíců. Hypospadie je genitální porucha u mužů, při níž ústí močové trubice se nachází na spodní straně penisu. Pesticidy, PCB, BPA, ftaláty a fungicidy vinklozin a procymidon bývají spojovány se zvýšeným výskytem malformací urogenitálního traktu. Zpozorovala se u potkanů vystavených působení DBP in utero snížená anogenitální vzdálenost a v dospělosti se objevila hypospadie a aberantní vývoj samčího reprodukčního ústrojí. Matkám, které braly lék DES během těhotenství, se narodili chlapeci s hypospadií nebo kryptorchismem či sníženým počtem spermií. Ve studii provedené u korejských novorozenců byly nalezeny vysoké hladiny BPA a kyseliny ftalové v moči a plazmě v souvislosti s hypospadií. Dále se zjistilo, že expozice p,p-DDE souvisela se zvýšeným rizikem kryptorchismu, hypospadie, nízkého počtu spermií a rakoviny varlat. (Stukenborg, 2021)

3.6.1.4 Anogenitální vzdálenost (AGD)

Anogenitální vzdálenost (AGD) je vzdálenost mezi konečníkem a genitáliemi. Několik studií prokázalo, že kratší AGD je spojena se sníženou plodností, kvalitou spermatu a nižší hladinou testosteronu. AGD byla pozorována u dětí s hypospadií a kryptorchismem. Anogenitální vzdálenost souvisí s abnormalitami varlat a může naznačovat mechanismus, kterým EDs ovlivňují reprodukční zdraví, protože je citlivým biomarkerem prenatálního působení androgenů. Podobně jiná studie naznačila, že expozice ftalátům v prvním trimestru vede ke zkrácení AGD, ale některé studie nezjistily žádnou souvislost. Zejména expozice dibutylftalátu vedla k narušení mužské diferenciaci a zkrácení AGD. (Kolátorová, 2018)

3.6.2 Následky expozice EDs na ženský pohlavní systém

Reprodukční zdraví žen závisí na estrogenech, důležité hormony, které svým zvýšením indikuje začínající reprodukční život, následně i pubertu a svým poklesem naznačují přicházející menopauzu. Lze tedy očekávat, že chemické látky v životním prostředí, které napodobují nebo blokuje estrogeny, budou hrát roli v urychlování puberty nebo alespoň vývoje sekundárních pohlavních orgánů, např. prsou a možná i v oddalování menopauzy. Většina informací o účincích endokrinních poruch na ženy pochází ze studií na laboratorních zvířatech. (McLachlan, 2006)

3.6.2.1 Syndrom polycystických vaječnic PCOS

Syndrom polycystických vaječnic (PCOS) je endokrinní porucha, která zahrnuje mnoho klinických stavů. Kontrolní studie (71 žen s PCOS a 100 žen bez PCOS) zjistila, že BPA v séru je významně vyšší u žen s PCOS a že existuje významný pozitivní vztah mezi BPA, koncentrací androgenů a inzulínovou rezistencí. Ženy s PCOS s vyšší koncentrací BPA v séru měly navíc závažnější inzulínovou rezistenci, zvýšený index volných androgenů a zvýšené markery chronického zánětu. (Gonsioroski, 2020)

3.6.2.2 Endometrióza

Endometrióza je záhadné onemocnění závislé na estrogenech, na jehož ektopickou endometriální tkáň působí řada endokrinních disruptorů a existuje celá řada etiologických faktorů. EDs, jako je TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) a PCB

(polychlorované bifenyly podobné dioxinům), mohou u samic opic rodu Rhesus vyvolat vznik peritoneální endometriózy, přičemž rozsah účinku závisí na míře kontaminace. EDs jsou obzvláště zajímavé jako potenciální přispěvatelé k endometrióze, protože mohou měnit steroidogenezi, imunologickou funkci a jsou epigenetickými kauzálními faktory, které se podílejí na progresi tohoto onemocnění. (Rumph, 2020)

Ftaláty mohou mít proliferační účinek na endometriální tkáň. Prospektivní studie případů a kontrol ukázala, že ženy s pokročilou pánevní endometriózou měly zvýšené plazmatické hladiny DEHP (di-(2-ethylhexyl) ftalátu) a MEHP (mono-(2-ethylhexyl) ftalátu) ve srovnání s kontrolami bez endometriózy. Další studie případů a kontrol zjistila, že ženy s endometriózou měly významně vyšší koncentrace mono-n-butyl-ftalátů v moči než kontroly. (Yilmaz, 2020)

Nicméně další epidemiologické studie tato zjištění nepotvrdily. Ve studii zahrnující ženy ze severovýchodu USA prokázali inverzní vztah mezi rizikem vzniku endometriózy a hladinami MEHP. Mechanismus spouštění vzniku endometriózy ftaláty zůstává nejasný. (Rumph, 2020)

3.6.2.3 Děložní myom (Uterine fibroid – UF)

UF je jedním z nejčastějších gynekologických nádorů u žen v reprodukčním věku a způsobuje příznaky, jako je abnormální děložní krvácení, menorigie a pánevní bolesti. Je znám jako estrogen-dependentní onemocnění a předpokládá se možná účast EDs. Většina studií in vitro ukázala, že BPA zvyšuje proliferaci lidských UF buněk, což pravděpodobně přispívá k růstu UF. U žen s UF byly zjištěny významně vyšší hladiny celkového MEHP v moči než u zdravých kontrol. V jedné populační studii provedené v Koreji byla porovnávána koncentrace 16 metabolitů ftalátů v moči u žen s UF a bez UF. Pomocí vícenásobné logistické regresní analýzy byla zjištěna významná souvislost mezi hladinami celkových metabolitů DEHP v moči a UF. V USA byla provedena průřezová studie na premenopauzálních ženách vyhledávajících chirurgickou péči pro UF, která prokázala zvýšené koncentrace několika ftalátů v moči, které pozitivně souvisely s objemem dělohy. (McLachlan, 2006)

3.6.2.4 Ženská neplodnost nebo subfertilita

Ženská neplodnost je komplexní porucha, která může být způsobena anatomickými, genetickými, environmentálními a endokrinními faktory. Pochopení mechanismů účinku npECD, jakož i předpokládaných rizik vyplývajících z expozice těmto sloučeninám, může mít zásadní význam pro zlepšení plodnosti žen. (Ratan, 2019)

Vliv BPA na neplodnost žen zkoumala řada studií. BPA je spojován s neplodností žen tím, že ovlivňuje morfologii a funkce vejcovodů, dělohy a vaječnicků. Kromě toho BPA ovlivňuje funkci hypotalamu, hypofýzy a vaječnicků tím, že mění sekreci hormonů uvolňujících gonadotropin v hypotalamu a podporuje proliferaci hypofýzy. V poslední době kvůli potenciálním škodlivým účinkům BPA mnoho zemí nahradilo BPA analogy bisfenolu S (BPS) a bisfenolu F (BPF). Výrobky obsahující tyto analogy jsou známy jako "výrobky bez BPA". Několik studií in vitro a in vivo však prokázalo, že BPS a BPF mají rovněž stejné endokrinně disruptivní účinky jako BPA. Pokud jde o zrání oocytů, BPA i BPS způsobovaly významné abnormality vřetenka a chybné uspořádání chromozomů, a to i při velmi nízkých dávkách. Epidemiologické i experimentální důkazy ukazují, že všechny bisfenoly ovlivňují neplodnost anebo subfertilitu žen. (Darbre, 2020; McLachlan, 2006)

3.6.3 Epigenetické následky

Existují důkazy, že některé EDs mohou mít nejen účinky na osoby, které jsou jim vystaveny, ale také účinky, které přetrvávají po celé generace. Může to být prostřednictvím epigenetických změn, které se mohou projevit až v generacích F2-F4. EDs mohou také způsobovat zvýšenou fragmentaci DNA a aneuploidii, což může vést k potratům a genetickým abnormalitám u potomků. (Ratan, 2019)

U myších samců narozených matkám vystaveným denně perorálnímu působení BPA od 12. gestačního dne do 21. postnatálního dne byla snížena plodnost při páření s neexponovanými samicemi. Tento účinek přetrvával po 3 generace. Jiná studie ukázala, že BPA vede k obéznímu fenotypu v generaci F3, ale ne v generaci F1 a F2. Bylo zjištěno, že geny spojené s obezitou mají změněnou metylaci ve spermiích generace F3, což však nebylo hodnoceno u generací F1 a F2. (Brehm, 2019)

Cypermethrin, insekticid, byl studován ve dvou generacích a nejenže ovlivnil parametry spermií u myších samců narozených exponovaným matkám, ale u generace F2 byla pozorována snížená plodnost a snížená hmotnost plodu a u některých myší byly zjištěny malformace, jako je nedostatečně vyvinuté tělo a deformované končetiny. (Brehm, 2019)

3.7 Metody monitorování EDs

S přibývajícím zájmem o problematiku EDs, rozvíjí se nové moderní metody k efektivní delecí EDs ze životního prostředí, ke snižování expozice člověka či prevence nežádoucích účinků na lidský organismus nebo k včasnému záchytu markerů. Jak je škála EDs různorodá, tak se jejich stupeň toxicity, doba působení či rozsah účinků liší. Existuje proto dokument zvaný Guidance Document 150 (GD 150) podle OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), který zahrnuje pokyny pro testování chemikálií na endokrinní disrupci. Metody vyvíjené OECD a nakonec přijaté regulačními orgány po celém světě, poskytují základ pro identifikaci a hodnocení možných chemických látek narušujících endokrinní systém. Proto se tyto činnosti musí řídit velmi přísnými pravidly, která OECD stanovila na začátku tohoto programu (6): vedoucí laboratoř by měla fungovat jako kontaktní místo, kdykoli bylo třeba řešit specifické otázky v rámci celého procesu; vývoj zkušební metody probíhá postupně, počínaje fází prevalidace, a končí validací; po specifikaci protokolu (ve fázi validace) musely všechny zúčastněné laboratoře striktně dodržovat protokoly a postupy testů stanovené během prevalidace; pro každou zkušební metodu byl skupinou odborníků pod vedením vedoucí laboratoře pečlivě vybrán soubor chemických látek s dobře definovaným mechanismem účinku; všechny zúčastněné laboratoře používají stejné šarže zkoušených chemických látek, aby se předešlo možnému ovlivnění různými nečistotami; zúčastněné laboratoře musely být schopny zvládnout tento program, zejména paralelně zpracovávat velký počet zvířat a údajů a používat různé techniky, např. histopatologii, přesnou nekropsii a pitvu tkání, klinickou chemii a klinické vyšetření. (Gelbke, 2004; (Scognamiglio, 2016)

Tento dokument uváděné metody člení na 5 úrovní dle koncepčního rámce (Conceptual Framework, CF). V úrovni 1 by se mohly uplatňovat metody *in silico*, prováděných pomocí různých databázových a počítačových programů k určení struktury látky, dále fyzikálních a chemických vlastností. Na základě zjištěných informací

predikuje možné účinky. Informaci na úrovni 2 sdělují *in vitro* metody, jež vypovídá o konkrétním mechanismu či signalizační dráze. Mezi úrovně 3-5 patří *in vivo* metody, ve kterých se využívají různé modelové organismy (hmyz, hlodavci, ptáci a další). (Gelbke, 2004)

3.7.1 In silico metody

Pro předpověď vlastnosti endokrinních disruptorů se dnes používají *in silico* metody podporované technologií, které dokážou na základě struktury materiálu předpovídat aktivitu EDs a hodnotit jejich environmentální rizika. Existují dva nejnámější způsoby podporované počítačem, které využívají vlastnosti ligandů a cílů ke stanovení aktivit EDs. (Schneider, 2019)

3.7.1.1 Metody založené na ligandech

Byly vyvinuty kvantitativní modely předpovědi vztahu mezi strukturou a aktivitou nebo vlastností (QSAR) pro předpověď konkrétní aktivity nebo vlastnosti dané molekuly, nejjednodušší fungují na principu výpočtu molekulárních deskriptorů, jež označují molekulu za celek a vypočítají jednu hodnotu pro celou molekulu. Nejméně nákladné modely tvoří modely na principu molekulových otiscích, různé typy otisků reprezentují různé vlastnosti molekul, proto je důležité vybrat vhodný typ pro modelování požadované aktivity. (Schneider, 2019)

3.7.1.2 Metody založené na struktuře

Metody založené na struktuře nebo také metody založené na cíli využívají informace z 3D struktury proteinového cíle. Díky rostoucím znalostem funkčních a strukturních údajů se dá vyhodnotit a předpovědět potenciální interakce EDs s různými cíli pomocí dokování a náročnějších postupů, např. molekulární dynamika. Nejčastěji se používají dokovací postupy, které zvládnou až tisíce ligandů. Jsou založeny na vzorkování konformačního prostoru daného ligandu ve vazebné kapse cílové molekuly a následném vyhodnocení pózy provedeném pomocí skórovacích funkcí. (Schneider, 2019)

Sice poptávka po takovýchto alternativních metodách roste, zejména po výpočetních přístrojích, které snižují náklady na hodnocení a na životy zvířat. Existují stále určitá

omezení pro výše uvedené metody. Jeden z hlavních problémů metod predikce založených na ligandech je jejich závislost na experimentálních datech. Přítomnost chyb vyskytnutých během procesu může vést ke zkresleným a nepřesným odpovědím. Co se týče metod založených na struktuře, jejich závislost je více omezená a navíc hrozí problém potenciálně neznámých strukturálních změn. (Schneider, 2019)

3.7.2 In vitro metody

Biologické zkoušky in vitro mohou doplnit chemickou analýzu pro účely screeningu a umožnit měření biologických koncových bodů ve vzorku, které pomůže k odhalení přítomnosti aktivních sloučenin, které nejsou zjistitelné analýzou složení, a identifikovat nová kontaminovaná místa.

V této souvislosti byla vyvinuta řada biologických testů in vitro a 6 z nich byly také standardizovány a komercializovány, které jsou vhodné k měření synergických účinků různých chemických látek ve směsi: OECD TG 493, OECD TG 455, OECD TG 458, OECD TG 456, US EPA OPPTS 890.1150, US EPA OPPTS 890.1200. (Gelbke, 2004)

3.7.2.1 OECD TG 493

In vitro test je založený na detekci látky s afinitou k lidskému estrogenovému receptoru (hrER α). Na základě toho se aplikují 2 metody OECD TG 493: Freyberger-Wilsonova metoda in vitro metoda s použitím celé délky lidské rekombinantní ER α a Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) s použitím lidského rekombinantního ligandu navázaného na doménovou bílkovinou. Testuje se schopnost dislokace ligandu chemikálií z ER a celkově pozitivní, negativní či nejednoznačná možnost se vázat na ER. (OECD, 2018)

3.7.2.2 OECD TG 455

In vitro test OECD TG 455 detekuje agonisty a antagonisty estrogenového receptoru pomocí stabilně transfekovaných buněk. Testování agonistů a antagonistů zahrnuje 2 metody OECD TG 455. První je pomocí buněčné linie (h)ER α -HeLa-9903 (derivát z lidského krčního nádoru). Druhá metoda používá buněčnou linii VM7Luc4E2, která převážně vyjadřuje hER α , ale může jej obohatit o malé množství hER β . (OECD, 2018)

Metoda OECD TG 455 poskytuje pozitivní nebo negativní výsledek pro schopnost chemikálie vyvolat indukci exprese reportérového genu – agonista. Antagonista určí, zda k redukci odezvy dochází při expozici buněk chemikálii s potentním estrogenovým antagonistou v porovnání se samotným potentním estrogenovým antagonistou. Jakákoli redukce odpovědi musí docházet v nepřítomnosti cytotoxicity. (OECD, 2018)

3.7.2.3 OECD TG 458

In vitro metoda OECD TG 458 detekuje substance, které se po napojení na androgenový receptor (AR) vyvolají aktivaci transkripce zodpovídající androgeny responsivními geny pomocí stabilně transfekované lidské buněčné linie. Po validaci roku 2016 se v této metodě uplatňuje buněčná linie AR-ECoscreen, derivát získané z ovariálních buněk křečka čínského, sledování aktivace receptorů prostřednictvím analýzy genové exprese reportérového genu (př. luciferáza), jehož aktivita se snižuje v přítomnosti cytotoxického agens. (OECD, 2018)

Tato metoda by se mohla využít při prvotním hodnocení schopnosti interakce chemikálií s endokrinními systémy in vitro. Dále je často prováděna po pozitivním výsledku v AR vazebném testu. Testy pro interakci s ostatními způsoby (ER, AR a steroidogeneze) se provádějí současně. (OECD, 2018)

3.7.2.4 OECD TG 456 – Test steroidogeneze

H295R test steroidogeneze je in vitro screening metoda k detekci látek, které postihují produkci estradiolu a testosteronu. K tomu se využívá buněčná linie NCI-H295R, která se vyznačuje charakteristikou lidských fetálních nedifenrencovaných buněk. Expres těchto buněk umožňuje detekovat ostatní hormony. (OECD, 2018)

Chemikálie mohou indukovat steroidogenezi, což může být určeno zvýšením produkce estradiolu a testosteronu. Mohou také inhibovat steroidogenezi sníženou produkcí estradiolu a testosteronu. (OECD, 2018)

Test steroidogeneze by se mohla využít při prvotním hodnocení schopnosti interakce chemikálií s endokrinními systémy in vitro. Společně s testem aromatázy, jeden z klíčových enzymů ve steroidogenezi, dává většinou shodný výsledek při pozitivním

testu. Dále podle získaných účinků, může svědčit o pozdním nástupu puberty žen. Účinky na reprodukční orgány se vyšetřuje pomocí testu steroidogeneze a kombinací AR a ER testů. (OECD, 2018)

3.7.2.5 US EPA OPPTS 890.1150 – Androgen receptor binding

Androgen receptor binding test je metoda, pomocí které lze detekovat vazbu na androgenový receptor (AR). Zde se využívá prostatický cytosol krysy jako zdroj AR. Test také určuje schopnost chemikálií přemístit ligand z AR (v homogenní tkáni prostaty krysy) a poskytne výsledek pozitivní či negativní, bez rozlišení na agonistickou nebo antagonistickou aktivitu. (OECD, 2018)

Metoda se uplatňuje při prvotním hodnocení látek pro jejich interakci s endokrinními systémy in vitro a společně s testy ARs, ERs a steroidogeneze. Další využití nalézá v následných účincích získaných z testů na vyšším stupni, např. pozdní nebo zrychlený nástup puberty u mužů, který může být indikující o účinku zprostředkovaném ARs. (Gelbke, 2004)

3.7.2.6 US EPA OPPTS 890.1200 – Aromatase assay

Aromatase assay neboli test aktivity enzymu aromatázy – cytochrom P450 (CYP 19) detekuje látky, které inhibují aromatázu. Je to enzym responzivní za konverzi androgenů a estrogenů během steroidogeneze. Inhibice aktivity aromatázy vede ke změně cirkulace estrogenů v těle muže i ženy, což by mohlo mít následky na reprodukční orgány nebo prsní žláza. (OECD, 2018)

Jak již bylo zmíněno, že test aromatázy souvisí se steroidogenezí, jakožto konečný produkt tohoto procesu, lze inhibice aromatázy prokázat testem steroidogeneze, kdy dochází k redukci produkce estradiolu, proto aromatázový test se provádí současně s testem steroidogeneze. Další využití při prvotním hodnocení látek pro jejich interakci s endokrinními systémy in vitro a společně s testy AR, ER a steroidogeneze a výsledcích získaných pro pozdní nástup puberty u dívek. (Gelbke, 2004)

3.7.3 In vivo metody

Podle koncepčního rámce OECD in vivo metody patří mezi 3 – 5 úroveň schématu. Využívají se zde modelové organismy k výzkumu, např. myši, ryby, ptáci.

Úroveň 3 obsahuje in vivo screeningové testy pro detekci specifických endokrinních aktivit, patří sem uterotrofický test, Hershbergův test, rybí vitellogenin test. V úrovni 4 jsou uvedeny testy in vivo, které umožňují detekci nežádoucích účinků v několika endokrinních systémech, např. vylepšená metoda OECD 407. Úroveň 5 obsahuje nejkompexnější testy in vivo na nežádoucí účinky, které lze použít pro definitivní posouzení rizik. (Gelbke, 2004)

3.7.3.1 Uterotrofický test

Uterotrofický test je krátkodobý in vivo screeningový test na estrogenicitu nebo antiestrogenicitu. Používají se buď nezralé intaktní, nebo dospělé ovariektomované samice potkanů nebo myši. Podání zkoušené chemické látky s estrogení aktivitou vede kromě účinků na další parametry závislé na estrogenech především ke zvýšení hmotnosti dělohy. Antiestrogenní sloučeniny toto zvýšení hmotnosti závislé na estrogenech u intaktních nezralých nebo ovariektomovaných dospělých samic snižují. Ověření bylo provedeno především na intaktních nezralých potkanech, ale v omezené míře také na myších a na dospělých ovariektomovaných zvířatech. (Yilmaz, 2020)

Velké množství získaných údajů bylo analyzováno a publikováno. Celkovým závěrem je, že uterotrofický test je vhodný pro in vivo screening (anti)estrogenicity, který lze použít v obou verzích, buď s intaktní nedospělou, nebo dospělou ovariektomizovanou samicí potkana. (Yilmaz, 2020)

3.7.3.2 Hershbergův test

V Hershbergerově testu se jako krátkodobý in vivo screeningový test (anti)androgenity používají kastrování nezralí potkaní samci. Androgení sloučeniny zvyšují hmotnost tkání závislých na androgenech, např. samčích přídatných orgánů, jako je prostata. Stejně tak (anti)androgení chemické látky snižují toto zvýšení hmotnosti u nezralých kastrováných samců potkanů, kterým byl podáván testosteron. (Yilmaz, 2020)

Analogicky k uterotrofické zkoušce byl navržen zkušební postup s použitím intaktních mladých samců potkanů. Takový zkušební postup by se z důvodu dobrých životních podmínek zvířat vyhnul kastraci. V rámci programu OECD je nyní zahájen zkrácený validační program pro tuto modifikaci Hershbergerova testu. Dosud dostupné údaje jasně ukazují, že Hershbergerův test - přinejmenším ve své původní podobě - bude cenným nástrojem pro screening (anti)androgenních látek. (Gelbke, 2004)

3.7.3.3 Vylepšený test OECD 407

28denní (subakutní) test na potkanech - jak je definován v pokynu OECD pro zkoušky 407 - je cennou metodou pro určení toxikologického profilu chemických látek po 28 dnech podávání. Vyžaduje ji mnoho regulačních orgánů pro nové chemické látky. Kromě toho je jedním ze základních kamenů programu OECD-SIDS pro hodnocení stávajících chemických látek s vysokým objemem výroby (HPV) a v budoucnu může být v rámci EU vyžadována pro stávající chemické látky podle nového nařízení o chemických látkách (REACH). S ohledem na široké regulační využití této zkušební metody přikládala pracovní skupina OECD pro EDTA (Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force) od samého počátku svých úvah vysokou prioritu vylepšení tohoto zkušebního postupu tak, aby kromě obecného toxikologického profilu odhaloval i nepříznivé účinky prostřednictvím endokrinního mechanismu. Tím by požadavky na zkoušky, které již existují zejména v Evropě a Japonsku, automaticky do značné míry zaplnily mezery v údajích o endokrinně aktivních chemických látkách. (Gelbke, 2004)

4 METODIKA

Veškeré provedené činnosti k získání výsledků proběhly v laboratoři buněčných kultur Fakulty biomedicínského inženýrství v období od února do května 2022. Metodická část zahrnuje všechny činnosti potřebné pro realizaci experimentu: od přípravy média a nasazení buněk po výměně média či pasážování buněk až k samotnému měření vzorků. Získané výsledky budou zpracovány v následující kapitole Výsledky.

4.1 Příprava buněk

Chemikálie

- DMEM (High Glucose)
- FBS (Fetální Bovinní Sérum)
- ATB
- Buňky SNU475
- Trypsin

Pomůcky

- Pipeta BIOHIT Midi Plus (pipetor pro jednorázové sterilní 10 ml pipety)
- Pipeta 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l, 2 – 20 μ l
- Špičky
- Zkumavky (15 ml, 50 ml), mikrozukavky, kádinky
- Petriho misky TC treated
- Bürkerova komůrka

Přístrojové vybavení

- Centrifuga Sigma 3-30 KS
- Hlubokomrazicí box -80°C ULT C75
- Laminární box Aura Vertical S. D. 4
- Termobox (37 °C, 5 % CO₂)
- Inverzní mikroskop s fázovým kontrastem (Optika)

- Elisa Reader Biotek Synergy HT
- Třepačka

Příprava růstového média

- Do zkumavky dát 45 ml DMEM (High Glucose), následně přidat 5 ml FBS a 0,5 ml ATB.

Nasazení buněk

- Buňky SNU-475 rozmrazit ve vodní lázni po dobu několika minut.
- Do 15 ml zkumavky napipetovat 2 ml buněk SNU-475 a po kapkách přidat 6 ml vytvořeného média.
- Zkumavku dát stočit do centrifugy na 1100 ot/min po dobu 5 minut.
- Supernatant slít rychlým a rázným pohybem tak, aby zbylo cca 0,5 ml a peletu rozpustit v 1 ml růstového média. Tuto směs pipetovat do příslušných Petriho misek a dát do termoboxu vyhřátého na 37° C v atmosféře s 5 % CO₂ a 90 % vlhkostí.
- Po několika dnech v termoboxu se na buňky dívat pod mikroskopem.

Výměna růstového média

- Kontrola buněk pod mikroskopem
- Odsát médium z Petriho misky
- Přidat 8 ml čerstvého média
- Dát do termoboxu při 37°C

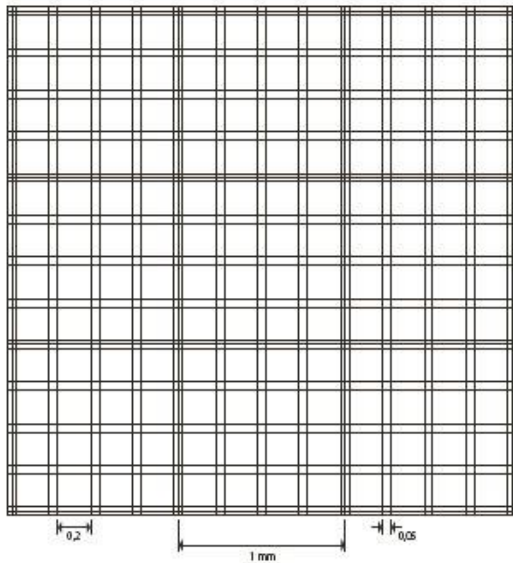
Pasážování a počítání buněk v Bürkerově komůrce

- Odsát médium z Petriho misky
- Oplach roztokem PBS 5ml
- Přidat 2 ml trypsinu
- Inkubace v termostatu při 37°C 10 min
- Kontrola buněk pod mikroskopem

- Přidat do 5 ml růstovým médiem
- Centrifugace při 1100 otáček/5 min
- Slít supernatant a následně přidat růstové médium do 1 ml
- Do mikrozkušavky napipetovat 8 µl buněčné suspenze + 8 µl trypanové modře
- Přenést 8 µl vytvořeného roztoku na Bürkerovu komůrku
- Spočítat buňky
- Napipetovat 300 µl z 1 ml z buněčné suspenze o koncentraci: $1 \cdot 10^6$ buněk/10 cm² a přenést na Petriho misku o velikosti 10 cm²
- Doplnit do 5 ml růstovým médiem
- Dát do termostatu při 37°C

Pravidlo pro počítání buněk

Do počtu počítaných částic jednoho čtverce ohraničeného trojitými hranicemi se počítají pouze buňky, které se dotýkají dvou zvolených stran.



Obrázek 4: Bürkerova komůrka (ThermoFisher Scientific)

Výpočet pro stanovení koncentrace počtu částí v 1 ml suspenze:

$$x = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

a... stanovený počet buněk

n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

V... objem počítaného útvaru

Počet buněk v daném preparátu: $a = 71$

Celkový počet buněk

$$P = a \cdot 10000 \cdot D$$

D Počet ředění

$$P = 71 \cdot 10000 \cdot 2$$

$$P = 1\,420\,000 = 1,42 \cdot 10^6 \text{ buněk/1 ml}$$

Z toho se odebralo 300 μl suspenze a poté se přidalo 5 ml média a dalo se inkubovat.

Následné pasážování a počítání v Bürkerově komůrce

- Odsát médium z Petriho misky
- Oplach roztokem PBS 5ml
- Přidat 2 ml 0,25% trypsinu a následně inkubovat v termostatu při 37°C 10 min
- Kontrola buněk pod mikroskopem
- Přidat do 5 ml médium a poté centrifugace při 1100 otáček/5 min
- Slít supernatant a následně přidat médium do 1 ml
- Do mikroskopické komůrky napipetovat 8 μl buněčné suspenze + 8 μl trypanové modře
- Přenést 8 μl vytvořeného roztoku na Bürkerovu komůrku
- Spočítat buňky
- Napipetovat 33 μl z 1 ml vytvořeného roztoku a přenést na Petriho misku, aby byla koncentrace: $c = 10^5$ buněk/6 cm^2
- Doplnit do 5 ml médiem a dát do termostatu při 37°C

Sterilizace zvolené chemické látky

Zvolená chemická látka: Parfémovaná voda Versace Dylan Blue pour Femme

Složení: Alkoholenát, parfém, voda, benzylsalicylát, limonen, citronelol, hydroxycitronelal, α -isomethylionon, ethylhexylmethoxycinnamát, linalool, benzylbenzoát, hexylcinnamal, ethylhexylsalicylát, butylmethoxydibenzoylmethan, geraniol, citral, benzylalkohol, farnesol, cinnamylalkohol

Pomůcky: buněčné sítko Millipore millex filter 0,22 μm , mikrozkušavka

Sterilizace proběhla pomocí buněčného sítka. Sterilní injekční stříkačkou se nabrala zvolená látka, která následně se zapíchlá do tzv. terčíku, přes který se vyfiltrují částice o rozměru menší než 0,22 μm a přenesou se do mikrozkušavky.

Zkouška působení zvolené látky na kulturu

1. Působení zvolené látky o koncentraci 1%

- ze zásobního roztoku se odebralo 50 μl roztoku, přidalo se 33 μl kultury a 5 ml média
- následně se dalo inkubovat do termostatu při 37°C

2. Působení zvolené látky o koncentraci 0,1 %

- ze zásobního roztoku se odebralo 5 μl roztoku, přidalo se 33 μl buněčné kultury a 5 ml média
- následně se dalo inkubovat do termostatu při 37°C

4.2 Příprava vzorků na měření

4.2.1 MTT test

MTT test je cytotoxický kolorimetrický test, který měří metabolickou buněčnou aktivitu a analyzuje jejich proliferaci, viabilitu buněk a cytotoxicitu zkoumané látky.

Princip MTT testu

Princip MTT testu spočívá v redukci tetrazoliové soli MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), pomocí mitochondriálních enzymů živých buněk. Zvolená chemická látka hraje roli cytotoxické sloučeniny, která ničí rakovinné buňky SNU475 tím, že naruší jejich dělení a růst. Zasažené buňky nakonec odumřou. Redukovaný MTT se mění na modrofialový formazanový derivát, který vyskytuje se ve formě nerozpustných krystalků. Formazanové krystalky se dají rozpustit přidáním okyseleného isopropanolu a následně se spektrofotometricky stanoví hodnota absorbance roztoku. Počet živých buněk je tedy indikován množstvím redukovaného MTT. (Köksal, 2014)



Obrázek 5: 96-jamková destička (ThermoFisher Scientific)

4.2.2 Postup

Zvolenou chemickou látku je potřeba zředit na 3 různé koncentrace: 1% (označeno 1), 0,1 % (2) a 0,01 % (3). Do sterilní kultivační jamky přeneseme 17 μl buňky ze buněčné kultury, tak aby bylo 10^4 buněk/1 ml. Přidáme 100 μl média a 10 μl chemické látky o různých koncentracích do příslušné své jamky. Do jamek negativní kontroly (NK) dáme 17 μl buněčné suspenze a 100 μl média. V místě G1 je blank, do kterého dáme 117 μl média. Poté necháme 24 hodin inkubovat při 37°C. Rozložení vzorků na destičce zobrazuje schéma:

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|---|---|----|---|---|---|----|---|---|---|
| A | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 |
| C | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 |
| E | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 | NK | 1 | 2 | 3 |
| G | BL | | | | | | | | | | | |

Po inkubaci přidáme do každé jamky se zvolenou látkou 12,7 μ l 5mg/ml MTT roztoku. Tam, kde jsou negativní kontroly přidáme pouze 11,7 μ l 5mg/ml MTT roztoku. Kultivační destičku vložíme do inkubátoru na 3-4 hodiny, během které se žlutý roztok MTT bude měnit ve fialové krystalky formazanu v přítomnosti živých buněk.

Po skončení inkubace MTT testu odsajeme médium a přidáme 117 – 127 μ l okyseleného isopropanolu (IPA – 50 ml IPA + 20 μ l koncentrované HCl). Necháme směs 10 minut na třepačce a v temné místnosti. Takto necháme plně rozpustit fialové krystaly. 100 μ l zabarveného roztoku přepipetujeme do čistých stripů a na spektrofotometru změříme absorbanci při vlnových délkách 490 nm a 630 nm.

4.3 Postup měření vzorků na přístroj

Přípravené vzorky na 96-jamkové destičce dáme do přístroje Elisa Reader Synergy HT a změříme absorbanci vzorků při vlnové délce 570 nm a 690 nm.

4.3.1 Přístroj Elisa Reader Biotek Synergy HT

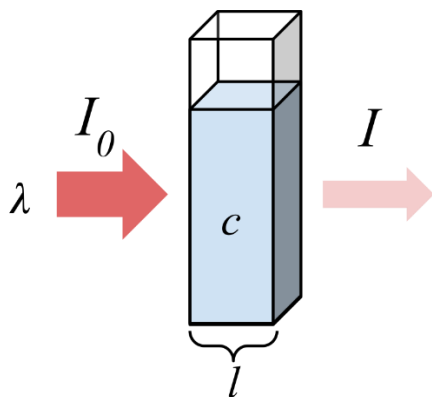


Obrázek 6: Elisa Reader Biotek Synergy HT (vlastní)

Přístroj Elisa Reader Synergy HT pracuje na principu spektrofotometrie.

Princip metody

Spektrofotometrie je metoda založená na průchodu elektromagnetického záření ve viditelném i UV spektru analyzovanou látkou a díky tomu umožňuje stanovení koncentrace většiny analytů fotometricky.



Obrázek 7: Absorpce světla (Wikiskripta, 2020)

I_0 = intenzita záření, které do vzorku vstoupilo

I = intenzita záření, po průchodu látkou

c = látková koncentrace

ε = molární absorpční koeficient, je pro každou látku charakteristický. Vyjadřuje, jaká by byla absorbance látky o koncentraci 1 mol/l při konkrétní vlnové délce.

l = tloušťka absorbující vrstvy

Intenzita záření se průchodem analyzovanou látkou snižuje. Část tohoto záření byla látkou pohlcena nebo absorbována. Při absorpci dochází k excitaci elektronů v molekulách látky a ta se nám jeví jako barevná.

Transmittance je veličina popisující poměr intenzity světla I a I_0 a vyjadřuje se (uvádí se v procentech):

$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

Nabývá proto hodnot 0 – 1 (1 – 100%), tzn. látka, která propustí veškeré záření, má transmitanci 100 % a naopak, látka, jež nepropouští žádné záření má transmitanci 0.

Transmittance závisí na koncentraci látky v roztoku, vlastnostech absorbující látky, tloušťce kyvety a vlnové délce procházejícího světla. Závislost mezi transmitancí a koncentrací látky je exponenciální.

Absorbance je odvozená veličina z transmittance. Pomocí logaritmu se převede závislost exponenciální na lineární, která je pro výpočty ve fotometrii praktičtější. Po úpravě vztah pro absorbanci bude vypadat následovně:

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

Absorbance se dá definovat jako záporný dekadický logaritmus transmittance, nebo logaritmus poměru intenzity světla vstupujícího do zkoumané látky a intenzity světla vystupujícího.

Absorbance je veličinou bezrozměrnou, může nabývat hodnot od 0 (při 100% T) – látka veškeré záření propustí do nekonečna.

Při spektrofotometrických stanoveních obvykle se s vysokými hodnotami A nepracuje. Při hodnotách nad 1,5 vznikají značné nepřesnosti. Pro stanovení analytů v biologických materiálech se obvykle hodnoty absorbance nachází v rozmezí: $A = 0,2-0,8$.

Lambert-Beerův zákon

Lambert–Beerův zákon je základním vztahem ve spektrofotometrii. Popisuje vztah mezi silou absorbující vrstvy, látkovou koncentrací a hodnotou absorbance zkoumané látky. Podle Lambert-Beerova zákona klesá intenzita světla, které prochází absorbující látkou, exponenciálně v závislosti na délce vrstvy a na koncentraci látky:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c}$$

ε představuje molární absorpční koeficient, l znamená síla vrstvy absorbujícího prostředí (tloušťka kyvety) a c je látková koncentrace. Po úpravách rovnice z vznikne:

$$**A = \varepsilon \cdot l \cdot c**$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že absorbance je přímo úměrná látkové koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy. Lambert-Beerův zákon platí pro zředěné roztoky, zpravidla pro koncentrace menší než 10^{-2} mol/l a pro monochromatické záření.

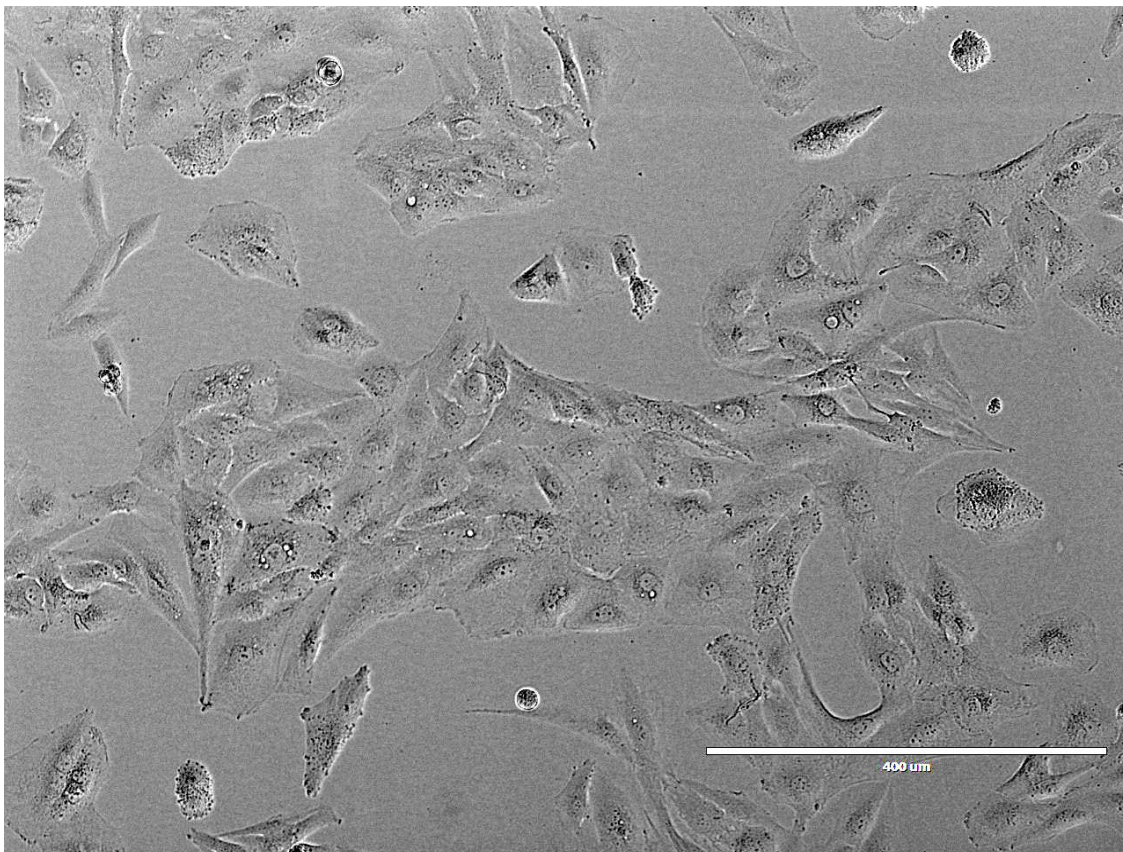
Grafickým vyjádřením je přímka, která prochází počátkem, pokud je ve vzorku přítomna pouze jedna absorbující látka. (Klouda, 2003; Kodíček, 2013)

5 VÝSLEDKY

Výsledky byly pečlivě průběžně zaznamenány.

5.1 Buněčná kultura SNU475

Živé buňky SNU475 měly tvar „lístečků“.



Obrázek 8: Buněčná linie SNU475 (Park, 1995)

5.2 Zkouška působení zvolené látky na kulturu

1. Působení zvolené látky o koncentraci 1%

- ze zásobního roztoku se odebralo 50 μ l roztoku, přidalo se 33 μ l kultury a 5 ml média
- následně se dalo inkubovat do termostatu při 37°C

2. Působení zvolené látky o koncentraci 0,1 %

- ze zásobního roztoku se odebralo 5 µl roztoku, přidalo se 33 µl buněčné kultury a 5 ml média

- následně se dalo inkubovat do termostatu při 37°C

Kontrola působení zvolené látky na buněčnou kulturu po 24 hodinách

1. Působení zvolené látky o koncentraci 1%

- nebyly nalezeny žádné živé buňky

2. Působení zvolené látky o koncentraci 0,1 %

- místem se vyskytly několik živých buněk

Kontrola působení zvolené látky na buněčnou kulturu po 3 dnech

1. Působení zvolené látky o koncentraci 1%

- nebyly nalezeny žádné živé buňky

2. Působení zvolené látky o koncentraci 0,1 %

- ojediněle několik živých buněk

- byla provedena výměna média a přidala se zvolená látka – parfémovaná voda

Kontrola působení zvolené látky na buněčnou kulturu po týdnu

1. Působení zvolené látky o koncentraci 1 %

- nebyly nalezeny žádné živé buňky

2. Působení zvolené látky o koncentraci 0,1 %

- nebyly nalezeny žádné živé buňky

Pozorování: Na kultuře s vyšší koncentrací parfémované vody nebyly zpozorovány žádné živé buňky již po 24 hodinách. Zatímco u nižší koncentrace nebyly nalezeny živé buňky až po týdnu. Z tohoto pozorování můžeme usoudit, že viabilita buněk závisí na koncentraci parfémované vody, čím je koncentrace parfémované vody vyšší, tím je nárůst buněk nižší.

Po týdnu aplikace parfémované vody se na buněčných kulturách objevily plísňe, což znamenalo, že sterilizace přes buněčné síto nebylo dostačující, z tohoto důvodu byl pokus ukončen.

5.3 Získané výsledky MTT testu

Byly zvoleny 3 koncentrace parfémované vody: 1 %; 0,1 % a 0,01 %, které budou barevně rozlišeny, 1 % – červeně; 0,1 % – žlutě; 0,01 – zeleně; negativní kontrole – bez barvy. Testy se měly opakovat v časovém rozestupu: 24 hodin, 3 dny, 5 dní, 7 dní a 14 dní, tedy celkově pětkrát. Z důvodu dopuštěných chyb během experimentu se změřily vzorky pouze dvakrát v časovém intervalu 1 a 3 dní.

Tabulka 2: Naměřené výsledky při vlnové délce 570 nm (vlastní)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1. | 0,044 | 0,052 | 0,159 | 0,046 | 0,087 | 0,113 | 0,058 | 0,13 | 0,106 | 0,2 | 0,077 | 0,062 |
| 2. | 0,054 | 0,055 | 0,056 | 0,082 | 0,048 | 0,043 | 0,042 | 0,06 | 0,047 | 0,043 | 0,046 | 0,045 |

Druhý řádek zobrazuje výsledky prvního měření po 24 hodinách působení při vlnové délce 570 nm. Na třetím řádku vidíme výsledky měření po 3 dnech po aplikaci látky.

Tabulka 3: Naměřené výsledky při vlnové délce 690 nm (vlastní)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. | 0,041 | 0,044 | 0,086 | 0,041 | 0,054 | 0,07 | 0,049 | 0,098 | 0,069 | 0,128 | 0,056 | 0,048 |
| 2. | 0,044 | 0,043 | 0,044 | 0,055 | 0,043 | 0,039 | 0,044 | 0,053 | 0,046 | 0,04 | 0,042 | 0,042 |

Na druhém řádku jsou výsledky prvního měření po 24 hodinách působení zvolené látky při vlnové délce 690 nm. Na třetím řádku jsou uvedené hodnoty z druhého měření po 3 dnech aplikace.

Tabulka 4: Zpracování výsledků při vlnové délce 570 nm (vlastní)

| | Aritmetický průměr \bar{x} | Směrodatná odchylka s |
|-----------|------------------------------|-----------------------|
| 1. 1% | 0,122 | 0,061 |
| 2. 1% | 0,047 | 0,006 |
| 1. 0,1 % | 0,098 | 0,044 |
| 2. 0,1 % | 0,048 | 0,006 |
| 1. 0,01 % | 0,079 | 0,036 |
| 2. 0,01 % | 0,062 | 0,015 |

Tabulka 5: Zpracování výsledků při vlnové délce 690 nm (vlastní)

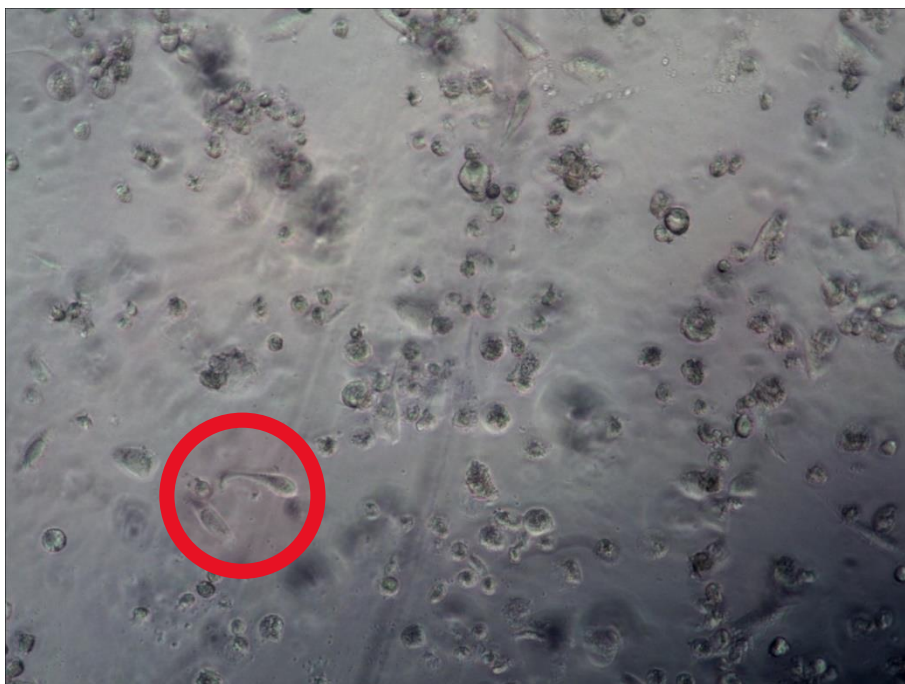
| | Aritmetický průměr \bar{x} | Směrodatná odchylka s |
|-----------|------------------------------|-----------------------|
| 1. 1% | 0,081 | 0,035 |
| 2. 1 % | 0,041 | 0,002 |
| 1. 0,1 % | 0,064 | 0,016 |
| 2. 0,1 % | 0,043 | 0,001 |
| 1. 0,01 % | 0,062 | 0,025 |
| 2. 0,01 % | 0,050 | 0,006 |

Pozorování: Naměřené hodnoty absorbance nejsou použitelné, protože nedošlo k očekávané reakci a roztok se nezbarvil očekávanou fialovou barvou, která by odpovídala metabolické aktivitě buněk. Z důvodu finančních nákladů a časové náročnosti nebylo možné test opakovat.

Vzorec pro výpočet C cytotoxicity (v %)

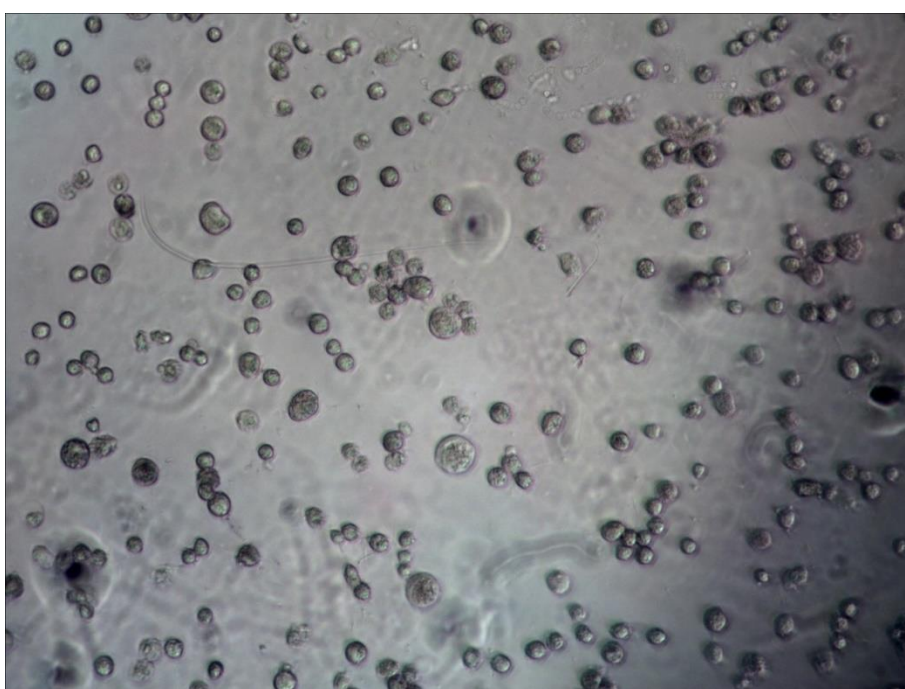
$$C = \left(1 - \left(\frac{A_{vzorku}}{A_{kontroly}} \right) \right) \cdot 100$$

A_{vzorku} = absorbance vzorku; $A_{kontroly}$ = absorbance negativní kontroly



Obrázek 9: Buňky SNU475 – negativní kontrola – 4 dní po aplikaci chemické látky (vlastní)

Červené kolečko zobrazuje živou buňku SNU475.

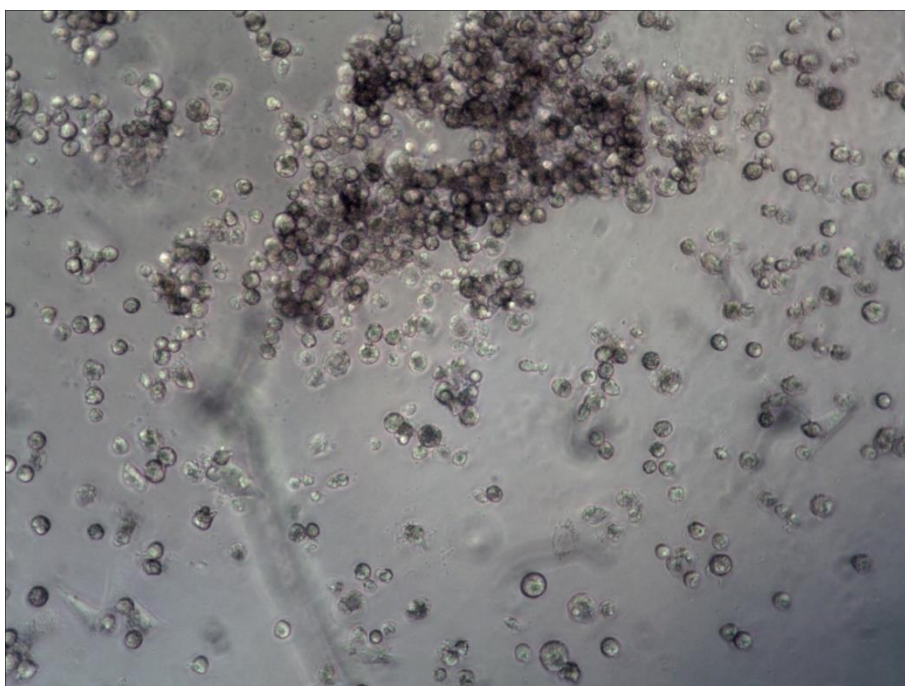


Obrázek 10 Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 0,1 % (vlastní)

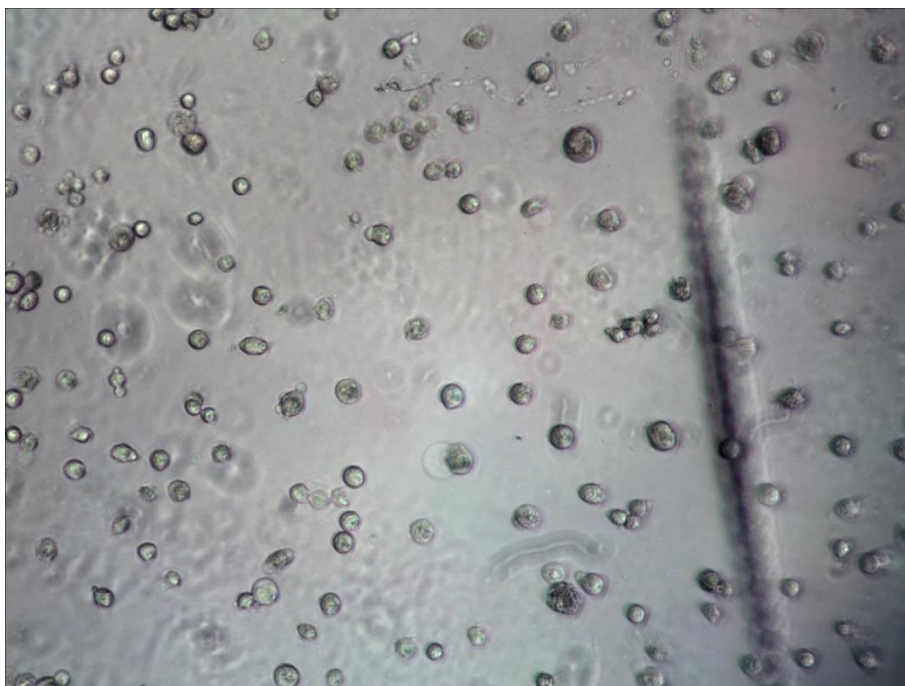


Obrázek 11: Buňky SNU475 – koncentrace 1% (vlastní)

Červené kolečko – živá buňka SNU475



Obrázek 12: Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 1% (vlastní)



Obrázek 13: Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 0,01 % (vlastní)

6 DISKUZE

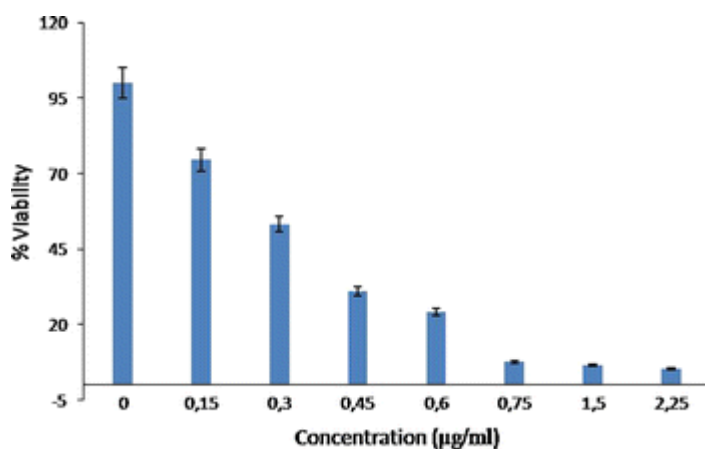
Předmětem experimentální části je výzkum působení parfémované vody, jakožto endokrinní disruptoru složeného z několika látek, na buněčnou linii SNU475. Nejprve se sledovala reakce buněčné kultury na Petriho miskách na aplikaci parfémované vody o dvou koncentracích: 1% a 0,1 % v závislosti na době působení. Pokus trval týden. Po týdnu jsem musela tento pokus ukončit z důvodu napadení buněk plísněmi. I přesto jsem zpozorovala určitý jev: u buněčné kultury s vyšší koncentrací parfémované vody byla viabilita buněk výrazně nižší a to konkrétně již po 24 hodinách aplikace endokrinního disruptoru se nenašly žádné živé buňky SNU475. V buněčné kultuře s koncentrací 0,1 % byly po 24 hodinách nalezeny živé buňky, ale bylo jich výrazně méně v porovnání s kontrolní kulturou. Po 3 dnech působení se také našly živé buňky, ale byl vidět výrazný pokles buněk.

U MTT testu se očekávalo, že se bude také postupně inhibovat proliferaci buněk tak, že při prvním měření by měly hodnoty absorbance prokazující aktivitu buněk být nejvyšší a poté by se postupně zmenšily. Avšak výsledky získané MTT testem byly ovlivněny lidskou chybou během provedení experimentu, proto naměřené hodnoty nesplnily očekávání (viz Tabulka 5.1 a Tabulka 5.2), proto je nelze kvantitativně vyhodnocovat. Před nasazením buněk do mikrotitrační destičky pro MTT test, byla připravená buněčná suspenze ponechána delší dobu při pokojové teplotě. Nevhodné stresové podmínky nejspíš zapříčinily sníženou životaschopnost po nasazení a neuchycení většiny buněk. Již 24 hodin od nasazení nebyla koncentrace životaschopných buněk a jejich metabolická aktivita dostatečná pro analytickou reakci činidla MTT testu. Dostatečnou životaschopnost nevykazovaly ani kontrolní buňky, které nebyly vystaveny působení toxické látky, což ukazuje na chybu během nasazení buněk (viz kapitola Výsledky).

I přes nezdařený experiment s MTT testem jsem potvrdila testem na Petriho miskách cytotoxicitu testované parfémované vody. Tento výsledek je ve shodě s výsledky publikovanými v literatuře.

Na podobném principu byl proveden pokus působení butylcyklohexylftalátu (BCP), látka často obsažená v přípravcích osobní péče nebo v domácnostech, na buněčnou linii L929, myší fibroblasty, který prokázal, že BCP má cytotoxické účinky na buňky L929 a

viabilita buněk závisela na koncentraci BCP. S rostoucí koncentrací BCP se snižovala viabilita buněk. (Köksal, 2014)



Obrázek 14: Cytotoxický účinek BCP na buňky L929 po 72hodinové expozici (Köksal, 2014)

Další studie, ve které MTT test dokázal, že účinek toxické látky je závislý na koncentraci dané látky, se zabývala působením andirobového oleje, získaného z amazonské rostliny a používá se v tradiční medicíně. Tato látka by testována in vivo na švýcarských myších. (Santos, 2017)

Některé éterické oleje získané ze šalvěže používané ve farmacii nebo aromaterapii, jsou mimo jiné také obsaženy v některých kosmetických přípravcích, také vykazují cytotoxickou aktivitu proti určitým buněčným liniím jako např. HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva), Caco-2 (adenokarcinom tlustého střeva) či NIH-3T3 (švýcarský myší embryofibroblast). Právě cytotoxicitu této látky se prokazuje pomocí MTT testu. (Villa, 2009)

O toxicitě silic ze šalvěže napsali také studii iránské vědci, kteří v podstatě také varovali o nebezpečí endokrinní disrupce silicemi ze šalvěže. (Khosravi Dehaghi, 2014)

MTT test se také využívá jako endpoint test v některých studiích zabývajících se fototoxickými účinky vybraných barviv na buňky NIH3T3, buněčná linie myší embryonální fibroblasty, které kromě expozice vybraným barvivům také ozářili UV zářením. MTT test potvrdil fototoxicitu vybraných barviv, kdy životaschopnost buněk po ošetření UV zářením se snížila asi o 10 % ve srovnání s kontrolou bez UV záření. (Tomankova, 2011)

7 ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se zabývala endokrinními disruptory, jejich působením na lidské zdraví a metodami jejich monitorování (viz kapitola Přehled současného stavu). Praktická část byla provedena za laboratorních podmínek Fakulty biomedicínského inženýrství. Zkoumala jsem vliv parfémované vody na buněčnou linii lidských hepatocytů SNU475. Současně jsem se naučila pracovat s buněčnými kulturami, dodržovat sterilní podmínky práce, připravovat buněčné suspenze pro měření, udržovat linii pomocí pasážování, vyměnit růstové médium a kontrolovat mikroskopicky životaschopnost kultur.

Postup laboratorních experimentů jsem uvedla v kapitole Metodika. V kapitole Výsledky jsou uvedeny naměřené hodnoty a fotografie z průběhu testování. Experiment s buněčnou kulturou potvrdil, že zvolená chemická látka (parfémovaná voda) je toxická pro lidské hepatocyty SNU475. Byl proveden MTT test, jehož výsledky nebylo možné vyhodnotit, ale seznámila jsem se s metodikou a postupem pro jeho provedení.

Výsledky získané během experimentu prokázaly, že parfémovaná voda s uvedeným složením (viz kapitola Metodika, str. 43), skutečně inhibuje proliferaci buněk. Během pozorování buněk na Petriho misce se dala zpozorovat postupná redukce koncentrace buněk s přibývajícím časem působení zvolené látky. Po jednom týdnu už se žádné buňky nepozorovaly.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| AGD | androgenitální vzdálenost |
| AHR | acylový uhlovodíkový receptor |
| ARs | androgenní receptory |
| ATB | Antibiotika |
| BPA | 4-(2-(4-hydroxyfenyl)propan-2-yl)fenol |
| DDT | dichlordifenyltrichlorethan |
| DEHP | di-2-ethylhexyl ftalát |
| DES | diethylstilbestrol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| EDs | Endokrinní disruptory |
| ERs | estrogenní receptory |
| FBS | Fetální bovinní sérum |
| MEHP | mono-2-ethylhexyl ftalát |
| MTT | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid |
| OCP | organochlorové pesticidy |
| OECD | Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development) |
| PAH | polyaromatické uhlovodíky |
| PBB | polybromované bifenyly |
| PBDE | polybromované difenylethery |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| PCOS | syndrom polycystických vaječníků |
| POP | perzistentí organické polulanty |
| SNU475 | buněčná linie hepatocelulárního karcinomu |

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

96 Well Black/Clear Bottom Plate, TC Surface, Pack of 10: 165303, 2020. *ThermoFisher Scientific* [online]. USA: ThermoFisher Scientific [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/165305?SID=srch-srp-165305>

ALHARBI, Omar M.L., Al Arsh BASHEER, Imran ALI a Rafat A. KHATTAB, 2018. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids* [online]. **2018**(Volume 263), 442-453 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0167-7322. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.029>.

AL-SALEH, Iman a Rola ELKHATIB, 2016. Screening of phthalate esters in 47 branded perfumes. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **2016**(23), 455 - 468 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5267-z>

BENDLOVÁ, Běla, 2013. Endokrinní disruptory – neviditelná hrozba – editorial. *Vnitřní lék* [online]. **2013**(59), 352-356 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <http://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2013/05/01.pdf>

BREHM, Emily a Jodi A FLAWS, 2019. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology* [online]. **2019**(Volume 160), 1421 - 1435 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/endo/article/160/6/1421/5473530?fbclid=IwAR1aI4jfRCwXQs4nMvPgWQ3r0nGL0NBh2STHPL89rYCX26VTZajrgM5DEUI&login=false>

CAJTHAML, Tomáš a Zdena KŘESINOVÁ, 2018. Endokrinní disruptory: neviditelné škodliviny všude kolem nás. *Entecho*. **2018**(2), 13 - 17. Dostupné z: doi:10.3260/ENTECHO.2018.11.003

DARBRE, Philippa D., 2022. *Endocrine Disruption and Human Health* [online]. 2022. United Kingdom: Elsevier [cit. 2022-05-05]. ISBN 978-0-12-821985-0. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=gEsiEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=endocrine+disruptors+impact+on+human+health&ots=tUYdKI6m19&sig=cwCpCzfRe>

YZ8zz4bmVaPJSL77II&redir_esc=y#v=onepage&q=endocrine%20disruptors%20impact%20on%20human%20health&f=false

DVOŘÁKOVÁ, Markéta, 2019. *Stanovení potenciálu endokrinní disrupce včasnou identifikací vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích*. Praha. Disertační práce. 3. lékařská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Dagmar Jírová, Csc.

ENCARNAÇÃO, Telma, Alberto Acc PAIS, Maria G CAMPOS a Hugh D BURROWS, 2019. Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. *Science Progress* [online]. **2019 Mar**(102(1), 3-42 [cit. 2021-10-06]. Dostupné z: doi:10.1177/0036850419826802

Endocrine disruptors, 2022. *National Institute of Environmental Health Sciences* [online]. USA: NIEHS [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm?fbclid=IwAR1zzzUH6_MSbNhGyMMWj6Go4C5CzWZuqC57bcVUTZv1MSU94lebUkQ-15k

GELBKE, H. P., A. POOLE a M. KAYSER, 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology*. **2004**(205), 17-25. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.034>

GOIDESCU, Julian a Florin STAMATIAN, 2016. Side effects of endocrine disruptors on the human reproductive function. *Obstetrica si Ginecologia* [online]. **2016**(64), 205 - 214 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/315739543_Side_effects_of_endocrine_disruptors_on_the_human_reproductive_function

GONSIOROSKI, Andressa, Vasiliki E. MOURIKES a Jodi A. FLAWS, 2020. Endocrine Disruptors in Water and Their Effects on the Reproductive System. *International journal of molecular sciences* [online]. **2020**(March 12), 6 [cit. 2022-02-11]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21061929

JONES, K.C. a P. DE VOOGT, 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution* [online]. **1999**(Volume 100), 209 - 221 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00098-6).

KAZEMI, Zahra, Ehsan ABOUTALEB, Abbas SHAHSAVANI, Majid KERMANI a Zohre KAZEMI, 2022. Evaluation of pollutants in perfumes, colognes and health effects on the consumer: a systematic review. *J Environ Health Sci Engineer* [online]. **2022**(3) [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s40201-021-00783-x>

KHOSRAVI DEHAGHI, N., S. N. OSTAD, N. MAAFI, S. PEDRAM, Y. AJANI, M. KHANA VI a A. HADJIAKHOONDI, 2014. Cytotoxic Activity Of The Essential Oil Of *Salvia Verticillata* L. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=380075> [online]. **2014**(3), 27 - 33 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=380075>

KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava. ISBN 80-86369-07-2.

KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO, 2013. *Biofyzikální chemie*. 3. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-2241-7.

KÖKSAL, Çinel, Ayse NALBANTSOY a N. Ülkü Karabay YAVAŞOĞLU, 2014. Cytotoxicity and genotoxicity of butyl cyclohexyl phthalate. *Cytotechnology* [online]. **2014**(68), 213 - 222 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s10616-014-9770-8>

KOLÁTOROVÁ, Lucie, Jana VÍTKŮ, Michaela DUŠKOVÁ a Luboslav STÁRKA, 2018. Endokrinní disruptory. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*. **21**(2), 120 - 127.

KVASNICOVÁ, Bibiana, 2021. *Experimentální analýza mechanických vlastností modelových buněčných linií hepatocelulárního karcinomu*. Kladno. Diplomová práce. ČVUT. Vedoucí práce Ing. Martin Otáhal, Ph.D.

LEE, Irene I., Nane C. KUZNIK, Jaice T. ROTTENBERG, Myles BROWN a Andrew C. B. CATO, 2019. BAGIL: a promising therapeutic target for androgen receptor-dependent prostate cancer. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. **2019**(62), 289 - 299 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1530/JME-19-0034>

LYMPERI, Stefanie a Aleksander GIWERCMAN, 2018. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism* [online]. **2018 Sep**(86), 79-90 [cit. 2021-10-05]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.metabol.2018.03.022](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.03.022).

MACÍKOVÁ, Petra, 2007. *Endokrinní disruptory detekované in vitro systémy v různých složkách prostředí*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Mgr. Klára Hilscherová, PhD.

MCLACHLAN, John A., Erica SIMPSON a Melvenia MARTIN, 2006. Endocrine disruptors and female reproductive health. *Endocrine disruptors*. **2006**(20), 63-75. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.009>

OECD, 2018. OECD Series on Testing and Assessment. *OECD* [online]. Paris: OECD Publishing [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-testing-and-assessment_20777876

PERVIER, H, ed., 2005. An Investigation of Chemicals in Perfumes. *Greenpeace International* [online]. **2005**(2), 3 - 14 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <https://www.greenpeace.org/usa/wp-content/uploads/legacy/Global/usa/report/2007/7/perfume-an-investigation-of.pdf>

PREDA, Cristina, Maria Christina UNGUREANU a Carmen VULPOI, 2012. ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE ENVIRONMENT AND THEIR IMPACT ON HUMAN HEALTH. *Environmental Engineering and Management Journal* [online]. **2012**(9), 1698 - 1706 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <https://www.umfiasi.ro/ro/academic/programe-de-studii/doctorat/Documents/Abilitare/2019/Domeniul%20Medicina/Conf.%20Univ.%20Dr.%20PREDA%20Cristina/09.pdf>

RAHMAN, Eva Kabir, Monica Sharfin RAHMAN a Imon RAHMAN, 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **2015**(July), 17 [cit. 2022-02-11]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26164742/>

RATAN, Saniya a Jodi A FLAWS, 2019. The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations. *Biology of reproduction* [online]. **2019**(September 1), 9 [cit. 2022-02-10]. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/ioz081

RODPRASERT, Wiwat, Helena E. VIRTANEN, Katharina M. MAIN a Jorma TOPPARI, 2019. Associations between male reproductive health and exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Elsevier: Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* [online]. **2019**(7), 13 [cit. 2022-02-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.05.002>

RUMPH, Jelonia T., Victoria R. STEPHENS, Anthony E. ARCHIBONG, Kevin G. OSTEEEN a Kaylon L. BRUNER-TRAN, 2020. *Environmental Endocrine Disruptors and Endometriosis*. 2020. Switzerland: Springer, Cham. ISBN 978-3-030-51855-4.

SANTOS, Alberdan Silva, Luis Alexandre MUEHLMANN, Maria Luiza FASCINELI, et al., 2017. Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet) Nanoemulsions: Development and Assessment of Cytotoxicity, Genotoxicity, and Hematotoxicity. *Journal of Nanomaterials* [online]. **2017**(2017), 11 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: doi:10.1155/2017/4362046

SCOGNAMIGLIOA, Viviana, Amina ANTONACCIA, Luisa PATROLECCO, Maya D. LAMBREVA, Simona C. LITESCU, Sandip A. GHUGE a Giuseppina REA, 2016. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2016**(80), 555-567. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.014>

SHANLE, Erin K a Wei XU, 2011. Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. *Chemical Research in Toxicology* [online]. **24**(1), 6 - 19 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: doi:[doi:doi.org/10.1021/tx100231n](https://doi.org/10.1021/tx100231n)

SHARMA, Aditi, Josephine MOLLIER, Richard W. K. BROCKLESBY, Charlotte CAVES, Chana N. JAYASENA a Suks MINHAS, 2020. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive medicine and biology* [online]. **2020**(19), 10 [cit. 2022-02-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/rmb2.12326>

SCHNEIDER, Melanie Schneider, Jean-Luc PONS, Gilles Labesse, LABESSE a William BOURGUET, 2019. In Silico Predictions of Endocrine Disruptors Properties. *Endocrinology*. **2019**(160), 2709-2716. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1210/en.2019-00382>

SOLOMON, Gina M. a Ted SCHETTLER, 2000. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association Journal* [online]. **2000**(Volume 163), 1471 - 1476 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.cmaj.ca/content/163/11/1471.short>

STUKENBORG, Jan-Bernd Stukenborg, Rod T. MITCHELL a Olle SÖDER, 2021. Endocrine disruptors and the male reproductive system. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **2021**(Volume 35) [cit. 2022-05-07]. ISSN 1521-690X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101567>.

TOMANKOVA, K., K. KEJLOVA, S. BINDER, A. DASKOVA, D. JIROVA, H. KOLAROVA, J. ZAPLETALOVA a H. BENDOVA, 2011. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicology in Vitro* [online]. **2011**(25), 1242 - 1250 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.026>.

TWARUZEK, Magdalena, Ewa ZASTEMPOVSKA, Ewelina SOSZCZYNSKA a Iwona ALTYN, 2018. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica et Oecologica* [online]. **2018**(14), 23 - 32 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://czasopisma.uni.lodz.pl/biologica/article/view/7376/6950>

VILLA, C., B. TRUCCHI, A. BERTOLI, L. PISTELLI, A. PARODI, B. RUFFONI a A. M. BASSI, 2009. *Salvia somalensis* essential oil as a potential cosmetic ingredient: solvent-free microwave extraction, hydrodistillation, GC–MS analysis, odour evaluation

and in vitro cytotoxicity assays. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. **2009**(31), 55 - 61 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1468-2494.2008.00480.x?casa_token=bvjASuRuBtMAAAAAA%3Am6DKded0UuMGw3a_I mb-3Z_14P8qcIB_t4e-n8b8YmN8CWL8YySDV4s9bIYRlInnJbOs6bOU35jE-Jhc

WUTTKE, Wolfgang, Hubertus JARRY a Dana SEIDLOVA-WUTTKE, 2010. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones* [online]. **2010**(9), 6 [cit. 2022-02-10]. Dostupné z: doi:Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals

YILMAZ, Bayram, Hakan TEREKECI, Suleyman SANDAL a Fahrettin KELESTIMUR, 2020. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [online]. **2020 Mar**(21(1), 127-147 [cit. 2021-10-06]. Dostupné z: doi:10.1007/s11154-019-09521-z

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

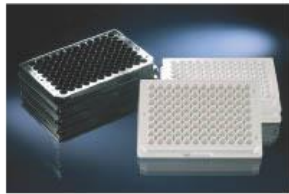
| | |
|--|----|
| Obrázek 1: mechanismus působení jednotlivých disruptorů (Goidescu, 2016) .. | 22 |
| Obrázek 2: Mechanismus působení estrogenních receptorů (Shanle, 2010) | 25 |
| Obrázek 3: Mechanismus působení androgenových receptorů (Lee, 2019) | 26 |
| Obrázek 4: Bürkerova komůrka (ThermoFisher Scientific) | 41 |
| Obrázek 5: 96-jamková destička (ThermoFisher Scientific) | 44 |
| Obrázek 6: Elisa Reader Biotek Synergy HT (vlastní) | 46 |
| Obrázek 7: Absorpce světla (Wikiskripta, 2020) | 46 |
| Obrázek 8: Buněčná linie SNU475 (Park, 1995) | 49 |
| Obrázek 9: Buňky SNU475 – negativní kontrola – 4 dní po aplikaci chemické látky (vlastní) | 53 |
| Obrázek 10 Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 0,1 % (vlastní) | 53 |
| Obrázek 11: Buňky SNU475 – koncentrace 1% (vlastní) | 54 |
| Obrázek 12: Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 1% (vlastní) | 54 |
| Obrázek 13: Mrtvé buňky SNU475 – koncentrace 0,01 % (vlastní) | 55 |
| Obrázek 14: Cytotoxický účinek BCP na buňky L929 po 72hodinové expozici (Köksal, 2014) | 57 |

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Přehled látek a jejich možné účinky (Yilmaz, 2020) | 20 |
| Tabulka 2: Naměřené výsledky při vlnové délce 570 nm (vlastní)..... | 51 |
| Tabulka 3: Naměřené výsledky při vlnové délce 690 nm (vlastní) | 51 |
| Tabulka 4: Zpracování výsledků při vlnové délce 570 nm (vlastní)..... | 52 |
| Tabulka 5: Zpracování výsledků při vlnové délce 690 nm (vlastní)..... | 52 |

12 SEZNAM PŘÍLOH

► Thermo Scientific Nunc Flat Bottom 96-well Black and White Polystyrene Plates

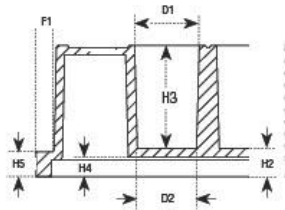


Flat-Bottom 96-well black and white polystyrene plates are optimized for robotics, plate readers and liquid handling systems.

Our plates are high quality for consistent and reliable results.

details

- Background, autofluorescence and crosstalk are reduced when you use Nunc Black or White microplates
- Black microplates are recommended for fluorescence measurements; with minimum back-scattered light and background fluorescence
- White microplates are recommended for luminescence measurements; with maximum reflection and minimal autoluminescence
- Cell Culture Treated: The Nuncion™ Delta Cell Culture treated surface is a hydrophilic surface that promotes cell attachment and growth
- Working volume range: 50 to 250 µL/well



Compliance: All Thermo Scientific microplates meet the recommendation of American National Standards Institute (ANSI) (ANSI/SBS 1-2004).

| | mm |
|---|-------------------|
| Total height of plate | 14.5 ± 0.3 |
| H2 Vertical distance from inside well bottom to resting plane | 3.6 |
| H3 Inside depth of well | 11.2 |
| H4 Vertical distance from external well bottom to resting plane | 2.1 |
| H5 Height of flange | 2.7 |
| D1 Well diameter, top | 7.05 |
| D2 Well diameter, bottom | 6.55 ± -0.1 |
| F1 Depth of flange | 2.0 |

Flat Bottom 96-well Black and White Polystyrene Plates

| Cat. No. | Surface | Well Design | Color | Total Vol., µL | Sterile | Lid | No. per Pack | No. Per Case |
|----------|---------------|-------------|-------|----------------|---------|-----|--------------|--------------|
| 136101** | Cell Culture | 96 F | White | 400 | Yes | Yes | 1 | 50 |
| 136102** | Cell Culture | 96 F | White | 400 | Yes | Yes | 10 | 160 |
| 137101** | Cell Culture | 96 F | Black | 400 | Yes | Yes | 1 | 50 |
| 137103** | Cell Culture | 96 F | Black | 400 | Yes | Yes | 10 | 160 |
| 236105 | Non-Treated | 96 F | White | 400 | Yes | Yes | 1 | 50 |
| 236107 | Non-Treated | 96 F | White | 400 | Yes | Yes | 10 | 160 |
| 236108 | Non-Treated | 96 F | White | 400 | No | No | 10 | 160 |
| 237105 | Non-Treated | 96 F | Black | 400 | Yes | Yes | 1 | 50 |
| 237107 | Non-Treated | 96 F | Black | 400 | Yes | Yes | 10 | 160 |
| 237108 | Non-Treated | 96 F | Black | 400 | No | No | 10 | 160 |
| 7418 | Microlite TCT | 96F | White | 330 | Yes | No | 1 | 50 |

**Certified

M9

www.thermoscientific.com

Příloha 1: Protokol 96-jamkové destičky od výrobce (ThermoFisher Scientific)