

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Aplikace testů estrogenní a androgenní aktivity při biodegradacích
endokrinních disruptorů**

**The Application of the Tests of Oestrogenic and Androgenic Activity in
Biodegradations of Endocrine Disruptors**

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233148850

Praha 2009

Veronika Novotná

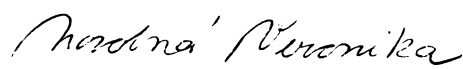
Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a grantem MŠMT č. 2B06156.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 30. května 2009


Veronika Novotná

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli panu RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Kateřině Svobodové, Ph.D. za jejich ochotu vést mě při vypracovávání této práce a za jich cenné rady. Dále bych ráda poděkovala garantce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., že mi tuto práci zprostředkovala.

Použité zkratky:

ED	endokrinní disruptor / endokrinně disruptivní
mRNA	informační ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MCF-7	nádorové buňky
E-Screen	metody založené na množení nádorových MCF-7 buněk
GFP	fluorescenční protein
MEG	malt extrakt-glukosové medium
ME	malt extrakt
SD	syntetické minimal medium
ER	<i>S. cerevisiae</i> BMAEREluc/ER α
AR	<i>S. cerevisiae</i> BMAEREluc/AR
hER	lidský estrogenní / lidský gen pro estrogenní receptor
hAR	lidský androgenní / lidský gen pro androgenní receptor
luc	kontrolní kmen pro testování toxicity vzorku
AV ČR	Akademie věd České republiky
ČOV	čistírna odpadních vod
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CIBk	chlorbenzoové kyseliny
PCB	polychlorované bifenyly
DMSO	dimethylsulfoxid
CPRG	chlorofenol red- β -D-galactopyranoside
dH ₂ O	destilovaná voda
EC ₅₀	koncentrace látky, odpovídající poloviční odezvě testu
ln	přirozený logaritmus
rpm	počet otáček za 1 min.
v/v	objemová procenta
w/v	poměr hmotnosti ku objemu
β -gal test	β -galaktosidasový test
A_{kor}	korigovaná hodnota absorbance
A_{540nm}	změřená absorbance při 540 nm
$A_{bl,540nm}$	změřená absorbance blanku při 540 nm
A_{620nm}	změřená absorbance při 620 nm
$A_{bl,620nm}$	změřená absorbance blanku při 620 nm
RLU	relativní jednotky světelné emise
F_i	indukce světelné emise
$F_{i,kor}$	korigovaná hodnota F_i
CF	korekční faktor
BK	biotická kontrolní kultura bez přidání CIBk
HK	abiotická kontrolní kultura usmrcená autoklávováním
ppm	$\mu\text{g/ml}$

Klíčová slova:

estrogenní aktivita, androgenní aktivita, endokrinně disruptivní látky, chlorbenzoové kyseliny, irgasan, nonylfenol, bisfenol A, 17 α -ethinylestradiol, degradace endokrinních disruptorů

Předmětová hesla:

environmentální toxikologie, analýza environmentálního znečištění, mikrobiologie

Obsah	
1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Zástupci ED látek	9
3.2 Způsoby měření ED aktivity	10
3.3 Biodegradace ED látek	12
3.3.1. Degradace v čistírnách odpadních vod	12
3.3.2. Bakteriální zpracování ED látek	13
3.3.3 Degradace pomocí hub	13
4. Metodická část	15
4.1. Používané mikroorganismy	15
4.2. Chemikálie	15
4.3. β -galaktosidasový test	15
4.3.1. Kultivační medium	16
4.3.2. Příprava kultury	17
4.3.3. Provedení testu	17
4.3.4. Výpočty	18
4.4. Bioluminiscentní kvasinkový test	18
4.4.1. Kultivační media	18
4.4.2. Zásobní roztok luciferinu	19
4.4.3. Provedení testu	19
4.4.4. Výpočty	20
4.5. Vzorky z degradace chlorbenzoových kyselin pomocí <i>Panus tigrinus</i>	20
5. Výsledky a diskuse	22
5.1. β -galaktosidasový test	22
5.2. Bioluminiscentní kvasinkový test	26
5.3. Vzorky z degradačních pokusů	32
6. Závěr	35
7. Seznam literatury	36
8. Příloha	40

1. Úvod

V posledních čtyřiceti letech se objevují důkazy o výskytu látek v životním prostředí, tzv. endokrinních disruptorů (ED), které mohou negativně ovlivňovat hormonální systém živočichů i lidí. Ve vodě jsou po celém světě nalézána stopová množství léčiv, lidských hormonů a látek napodobujících aktivitu hormonů, což přímo souvisí s nedostatečným zpracováním odpadních vod (Halling-Sorensen a kol., 1998; Routledge a kol., 1998; Snyder a kol., 2003; Hignite a Azarnoff, 1977).

Americká organizace pro ochranu životního prostředí US Environmental Protection Agency zřídila tzv. Endocrine Disruptor Screening Program pro vytvoření screeningových metod a strategie testů toxicity k vymezení endokrinních disruptorů. Endokrinní disruptory jsou velkou skupinou látek antropogenního původu (pesticidy, produkty spalování, průmyslové chemikálie, některá farmaka), ale i přírodního (fytoestrogeny, hormony) (Tanaka a Taniguchi, 2003; Kang a kol., 2006; Colborn a kol., 1996). Tyto látky působí na hormonální systém v několika úrovních: napodobování účinku endogenních hormonů, působení proti jejich účinku, narušování transportu, syntézy a metabolismu endogenních hormonů a narušování syntézy a metabolismu hormonálních receptorů (Guenther a kol., 2006).

Takovým příkladem, kdy dojde vlivem ED látky k vyvolání nesprávných hormonálních signálů, je vazba alkylfenolů nebo bisfenolu A na estrogení receptory (struktury viz příloha 1). Tyto receptory regulují transkripci cílových genů po vazbě s estrogenem (17 β -estradiol, estron). Estrogení receptor váže 17 β -estradiol fenolickou částí, avšak vazebné místo receptoru je dvakrát větší než hydrofobní část 17 β -estradiolu a tato velká prohlubeň umožňuje alkylfenolům a bisfenolu A vazbu na receptor (Tanaka a Taniguchi, 2003).

Tato práce shrnuje literární data o dosud existujících testech pro měření endokrinní aktivity látek. Jejím dalším cílem je aplikace vybraných testů na hodnocení účinnosti biodegradačních pokusů.

2. Cíle práce

Cílem této práce je :

- shrnout doposud známé poznatky z literatury o výskytu endokrinních disruptorů v životním prostředí a o metodách jejich měření
- zavedení dvou testů ke stanovení endokrinní aktivity těchto látek pro rutinní použití v laboratoři
- porovnání zvolených testů pro stanovení endokrinní aktivity standardních endokrinně aktivních látek (17 β -estradiol, bisfenol A, irgasan) a reálných vzorků chlorovaných látek z biodegradačních pokusů využívajících houbu *Panus tigrinus* pro degradaci chlorovaných organopolutantů

3. Literární rešerše

3.1 Zástupci ED látek

Mezi ED látky patří například alkylfenoly, bisfenol A a estery kyseliny ftalové (Sommenschein a Soto, 1998).

Alkylfenoly (např. nonylfenol a oktylfenol) se používají při průmyslové výrobě alkylfenol-polyethoxylátů, které slouží jako antioxidanty a neiontové detergenty. Ačkoliv samotné detergenty nejsou estrogenní, jejich zpracování aktivovaným kalem v čistírnách odpadních vod vede ke vzniku metabolitů s estrogenní aktivitou (Ejlertsson a kol., 1999; Maki a kol. 1994).

Nejproblématictější z alkylfenolů je nonylfenol, který napodobuje přirozený hormon 17β -estradiol a způsobuje feminizaci vodních organismů, pokles rybí plodnosti a snížení množství přežívajících jedinců (Ahel a kol., 1994; White a kol., 1994; Lavado a kol., 2004).

Silně hydrofilní bisfenol A se používá jako hlavní surovina při chemických syntézách průmyslových polymerů jako jsou polykarbonáty, epoxypryskyřice, fenolpryskyřice, polyestery a polyakryláty. Může se uvolňovat z konzerv s vnitřním nátěrem epoxypryskyřic (Perez a kol., 1998) a z polykarbonátových plastových obalů (Tanaka a kol., 2001) a kontaminovat tak potraviny nebo se také může uvolnit z materiálů používaných ve stomatologii (Brotons a kol., 1995).

Během posledních let je věnována pozornost přírodním (17β -estradiol, estron) a syntetickým antikoncepčním steroidům, a to pro jejich potencionální negativní efekt na vývoj a reprodukci ryb, zvířat a lidí (Quinn a kol., 2004; Larsson a kol., 1999; Pelley, 2003; Tyler a kol., 1998). Syntetické estrogeny, užívané jako hormonální antikoncepce, se v těle metabolizují na konjugáty s kyselinou glukuronovou a jsou vylučovány močí. Při zpracování odpadní vody aktivovaným kalem jsou tyto konjugáty následně hydrolyzovány glukuronidasou, produkovanou mikroorganismy (např. *Escherichia coli*), zpět na formy syntetických estrogenů a kyselinu glukuronovou (Pelley, 2003; Temes a kol., 1999).

V současné době byla endokrinní aktivita stanovena i u některých dalších látek. Folmar a kol. (2002) studovali vedle výše zmíněných látek estrogenní potenciál

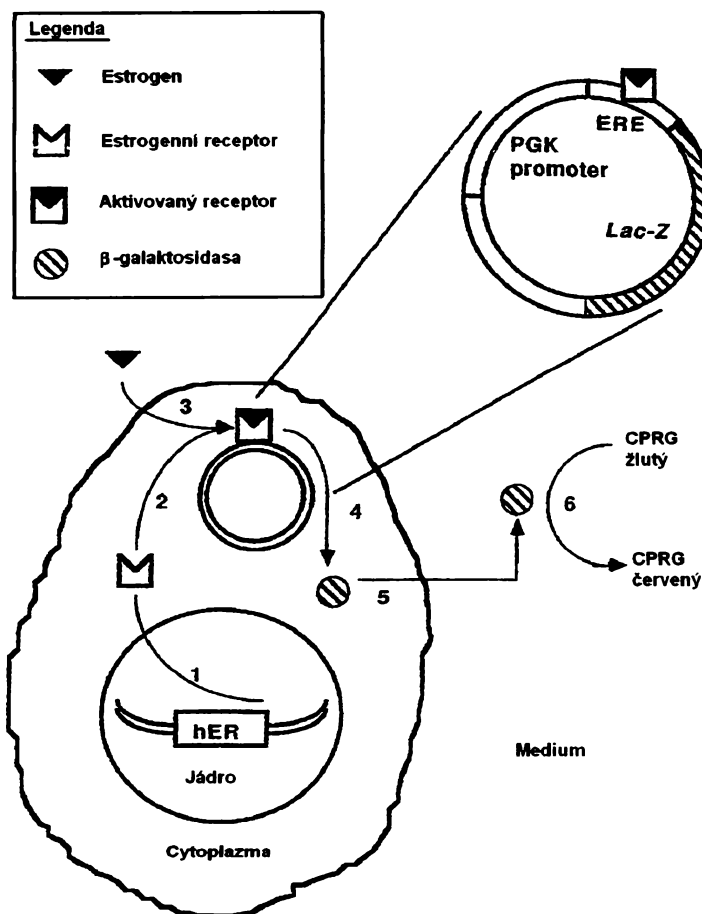
diethylstilbestrolu a methoxychloru. Lee a kol. (2004) měřili estrogení aktivitu dibutylftalátu a jeho degradačních produktů vznikajících během degradace této látky pomocí dřevokazných hub. Obdobně byla stanovena mírná estrogení a thyroidní aktivita i u hydroxylovaných polychlorovaných bifenyly (Shiraishi a kol., 2003).

3.2 Způsoby měření ED aktivity

Díky své schopnosti interagovat s hormonálním systémem mohou ED látky také například stimulovat růst lidských nádorových buněk (Soto a kol., 1991) nebo indukovat produkci vitellogeninu u ryb, která je řízena estrogeními receptory (Kwak a kol., 2001). Oba tyto jevy se staly základem metod pro měření estrogení aktivity látek.

Pro stanovení estrogení aktivity bylo doposud vytvořeno několik testů. U ryb je nejčastěji používáno *in vivo* stanovení exprese vitellogeninu v reakci na vystavení estrogenu, a to pomocí ELISA testu nebo přímou kvantifikací vitellogeninové mRNA produkované v rybích játrech (Jobling a Sumpter 1993; Folmar a kol. 2000; Tanaka a kol. 2003).

S cílem vytvořit vhodný *in vitro* nástroj pro hodnocení estrogení aktivity surfaktantů Routledge a Sumpter (1996) zkonstruovali estrogen-inducibilní, β -galaktosidasu exprimující systém v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Vložili sekvence DNA kódující lidský estrogení receptor do genomu kvasinek, které obsahovaly také prepisovatelný plasmid se sekvencí kontrolovanou estrogením receptorem a odpovědnou za prepis reportérového genu Lac-Z. Ten kóduje enzym β -galaktosidasu jako odpověď na přítomnost estrogenů. Tímto testem bylo zjištěno, že alkylyfenoly obsahující 6-9 uhlíků v alkylových skupinách mají 10^{-3} až 10^{-5} nižší estrogení aktivity oproti 17β -estradiolu (Laws a kol., 2000; Brzozowski a kol., 1997).



Obr.1 Schéma estrogen-inducibilního β -galaktosidasu exprimujícího systému v *S. cerevisiae* (Routledge a Sumpter, 1996).

hER- lidský gen pro estrogenní receptor, ERE- estrogenem řízená regulační oblast v promotoru Lac-Z genu, Lac-Z - gen kódující β -galaktosidasu

Dalším možným testem je tzv. dvojhybridní kvasinkový test využívající na ligandu závislé interakce s estrogenním receptorem, který umožnil měřit například estrogenní aktivitu nonylfenolu a bisfenolu A (Nishikawa a kol., 1999).

Další *in vitro* metody byly založeny na množení nádorových MCF-7 buněk (E-Screen), či analýze exprese pS2 mRNA v těchto buňkách. Ve studii o estrogenitě bisfenolu A Lee a kol. (2005) prokázal, že tyto testy poskytují srovnatelné výsledky. Jako další případnou alternativu k těmto testům Leskinen a kpl. (2005) připravili bioluminescentní kmeny *S. cerevisiae* pro detekci estrogenních a androgenních aktivit látek. Výhoda těchto testů spočívá v tom, že

mohou být provedeny během jediného dne a nevyžadují žádné centrifugační kroky, či lyzi buněk nebo specifickou úpravu vzorků. Folmar a kol. (2002) pak porovnali tyto testy s pěti studovanými látkami a ukázali, že β -galaktosidasový test byl o řád méně citlivý než E-screen a oba *in vitro* testy byly méně citlivé než *in vivo* vitellogenin test.

Nejnovější studie pak ještě rozšířily baterii existujících testů pro screening hormonálně aktivních látek v životním prostředí (Eldridge a kol., 2007; Jiao a kol., 2008; Xu a kol., 2008). Eldridge a kol. (2007) vytvořili rekombinantní kmen *S. cerevisiae* BLYAS schopný bioluminiscence v odpověď na androgenní látky. Tento kmen se ukázal jako vhodný pro environmentální monitoring androgenních látek. Jiao a kol. (2008) popsali anti-estrogenní aktivitu malachitové zeleně pomocí β -galaktosidasového expresního systému v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*. Dále testovali 40 potenciálně estrogenních látek, jako např. různé fytoestrogeny, pesticidy, herbicidy a průmyslová barviva. Xu a kol. (2008) vytvořili na základě lidských nádorových buněk MCF-7 duální buněčnou linii schopnou exprimovat flourescenční protein GFP jako odpověď na přítomnost estrogenů. Tento test je navíc současně vhodný na paralelní přímé hodnocení ekotoxicity estrogenů.

3.3 Biodegradace ED látek

3.3.1 Degradace v čistírnách odpadních vod

V současné době je věnována značná pozornost studiu metod aplikovatelných pro odstranění ED látek ze životního prostředí. Procesy používané běžně ve vodárenské úpravě, jako je koagulace a precipitace, se ukázaly být pro odstranění těchto látek neúčinnými (Chen a kol., 2006; Nghiem a kol., 2004). Naopak procesy aktivace, biofiltrace a půdní filtrace, taktéž používanými v ČOV, se koncentrace ED látek značně redukovala. Studie uvádí odstranění více než 90 % bisfenolu A v ČOV, při srovnání jeho koncentrace v přítoku a v odtoku (Westerhoff a kol., 2005; Zwiener a Frimmel, 2000). Rovněž byla popsána schopnost aktivovaného kalu odstranit nonylfenol (Pinkston a Sedlák, 2004; Furhacker a kol., 2000). Pokles jeho koncentrace byl však způsoben především sorpcí na aktivovaný kal (Staples a kol., 1998). Dochází tedy pouze k jeho přemístění do další environmentální matrice.

Nonylfenol může být pak eliminován sorpcí na částičky, sedimenty nebo akumulací v tkáních vodních organismů (Tanghe a kol., 1998; Banat a kol., 2000; Alcock a kol., 1999).

3.3.2 Bakteriální zpracování ED látek

Některé izolované bakteriální druhy byly definovány jako mikroorganismy schopné degradace nonylfenolu. Patří mezi ně druhy *Sphingomonas xenophanga*, *Sphingomonas cloacae* a *Sphingomonas amiense* (Gabriel a kol., 2005; Tanghe a kol., 1999; Ushiba a kol., 2003). Tyto bakterie metabolizují aromatickou část nonylfenolu na odpovídající C9 alkoholy.

Některé druhy gramnegativních bakterií degradují za aerobních podmínek bisfenol A metabolickou cestou na 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 4-hydroxy-acetofenon (Ike a kol., 2000; Spivack a kol., 1994; Lobos a kol., 1992). Zhang a kol. (2007) studovali degradaci bisfenolu A bakterií *Achromobacter xylosoxidans*, izolovanou z kompostováním zpracovaného městského odpadu, na p-hydroxy-benzaldehyd, p-hydroxybenzoovou kyselinu a p-hydrochinon. Oproti tomu v anaerobních podmínkách probíhá degradace bisfenolu A velmi obtížně (Voordeckers a kol., 2002).

3.3.3 Degradace pomocí hub

Také řada hub je schopna degradace ED látek, avšak jen některé mají dostatečně vysoký degradační potenciál (Yim a kol., 2003). Mezi zvláště degradačně aktivní patří zástupci tzv. hub bílé hniloby, které produkují nescifické extracelulární ligninolytické enzymy. Díky těmto enzymům degradují ED látky jako např. nonylfenol (Soares a kol., 2005; Fukuda a kol., 2001; Lee a kol., 2004). Mnoho studií zabývajících se biodegradací pomocí těchto hub je zaměřeno především na aplikaci purifikovaných enzymů (Tanaka a kol., 2001a; Saito a kol., 2004; Kimura a kol., 2004; Tsutsumi a kol., 2001).

Soares a kol. (2005) studovali degradaci nonylfenolu čtyřmi zástupci ligninolytických hub (*Bjerkandera sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor*). Z počáteční koncentrace 100 ppm nonylfenolu

odstranily kultury *Bjerkandera sp.* a *T. versicolor* přibližně 96 % nonylfenolu během patnácti dnů.

Lee a kol. (2004) publikovali odstranění 99 % styrenu během 24 h ligninolytickými houbami *P. chrysosporium*, *T. versicolor* a *Daldinia concentrica*. Hlavními metabolity po degradaci *P. chrysosporium* byly 2-fenylethanol, kyselina benzoová, cyklohexadien-1,4-dion, butanol a kyselina jantarová. Tyto metabolity již nevykazovaly estrogenní aktivitu.

Hirano a kol. (2000) prokázali, že bisfenol A degraduje kultura houby *Pleurotus ostreatus* a její enzym mangan-dependetní peroxidasa. Také mangan-dependetní peroxidasa *P. chrysosporium* má schopnost degradovat nonylfenol a bisfenol A (Tsutsumi a kol., 2001). Enzym snížil estrogenní aktivitu příslušných vzorků, sledovanou dvouhybridním kvasinkovým testem, ačkoli této aktivity přetrvalo 40 % v čase, kdy bisfenol A byl zcela zdegradován, což ukazuje na přítomnost potenciálně estrogenních metabolitů (Tsutsumi a kol., 2001).

Studována byla také oxidace bisfenolu A lakasou kultury *Trametes villosa* (Fukuda a kol., 2001). Reakce probíhala za vzniku dvou produktů, z nichž je hlavním vysokomolekulární dimer bisfenolu A. Během této oxidace bisfenolu A mohou také vznikat oligomery obsahující až 3-6 jednotek bisfenolu a 0-3 jednotek fenolu (Fukuda a kol., 2001; Uchida a kol., 2001).

Pro zvýšení účinnosti bioremediačních procesů, které využívají purifikovaných enzymů, byl vyvinut rotační reaktor pracující s kontaminovanou půdou (Tanaka a kol., 2001a). Lakasa kultury *Trametes sp.* byla takto použita k degradaci nonylfenolu, oktylfenolu, bisfenolu A a 17 α -ethinylestradiolu (Furhacker a kol., 2000). Dalším možným řešením zvýšení účinnosti těchto procesů by mohla být fixace enzymů na vhodný nosič.

Účinná schopnost ligninolytických hub odstraňovat ED látky z životního prostředí byla demonstrována i v nejnovější srovnávací studii Cajthaml a kol. (2009), kde autoři hodnotili degradaci irgasanu, nonylfenolů, bisfenolu A a 17 α -ethinyl-estradiolu pomocí osmi kmenů dřevokazných hub. Současně byl měřen i pokles endokrinní aktivity v kulturách a efekt ED látek, případně jejich metabolitů, na produkci houbových oxidativních enzymů. Ligninolytické houby se tak ukazují být efektivním bioremediačním agens aplikovatelným pro biodegradaci ED látek.

4. Metodická část

4.1 Používané mikroorganismy

Při práci byly používány následující rekombinantní kmeny *Saccharomyces cerevisiae*:

- *S. cerevisiae* hER α , popsáný v práci Routledge a Sumpter (1996)
- *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α , popsáný v práci Leskinen a kol. (2005)
- *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR, popsáný v práci Leskinen a kol. (2005)
- *S. cerevisiae* BMA64luc, popsáný v práci Leskinen a kol. (2005)

Kmeny byly v laboratoři uchovávány na agarových plotnách při 4 °C.

4.2 Chemikálie

Testované chemikálie 17 β -estradiol (98%), 17 α -ethinylestradiol (98%, HPLC), irgasan (\geq 97%, HPLC), nonylfenol (techn., 85%) bisfenol A (99%), testosteron (98%), a chlorbenzoové kyseliny (ClBk)- 2-ClBk, 3-ClBk, 4-ClBk, 2,3-ClBk, 2,4-ClBk, 2,5-ClBk, 2,6-ClBk, 3,4-ClBk, 3,5-ClBk, 2,3,5-ClBk, 2,3,6-ClBk, 2,4,6-ClBk byly zakoupeny od firmy Sigma (Německo). Struktury látek jsou uvedeny v příloze 1. Pro testování hormonální aktivity byly látky rozpouštěny v 30% v/v DMSO. Chlorofenol red- β -D-galactopyranoside (\geq 90%, HPLC) byl zakoupen od firmy Fluka (Německo). D-luciferin (syntetický) byl získán od firmy Sigma (Německo). Ostatní používané chemikálie byly o standardní p.a. čistotě.

4.3 β -galaktosidasový test

V tomto testu byl používán kmen *Saccharomyces cerevisiae* hER α . Kultury byly kultivovány a test byl prováděn podle práce Routledge a Sumpter (1996).

4.3.1 Kultivační medium

Složení media:

a) Minimal medium (sterilizuje se při 121 °C po dobu 10 min. a skladuje při pokojové teplotě)

KH ₂ PO ₄	13,61 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
KOH	4,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (40mg/50ml)	1 ml
Leucin	50 mg
Histidin	50 mg
Adenin	50 mg
Argin·HCl	20 mg
Methionin	20 mg
Tyrozín	30 mg
Isoleucin	30 mg
Lysin·HCl	30 mg
Fenylalanin	25 mg
Glutamová kyselina	100 mg
Valin	150 mg
Serin	375 mg
dH ₂ O	1 l

b) Vitamínový roztok (roztok se sterilizuje filtrací přes filtr 0,2 µm a uchovává při 4 °C v 10 ml alikvotech)

Thiamin	8 mg
Pyridoxin	8 mg
Panhotenová kyselina	8 mg
Inositol	40 mg
Biotin (2 mg/100 ml)	20 ml
dH ₂ O	180 ml

c) 200 g/l glukosa - autoklávováno 10 min. a skladováno při pokojové teplotě

4 mg/ml L-asparágová kyselina – autoklávováno 10 min. a skladováno

při pokojové teplotě

24 mg/ml L-threonin - 5 ml zásobní roztok autoklávován 10 min. a skladován při 4 °C

20 mmol/l CuSO₄ – sterilizováno filtrací přes filtr 0,2 µm a uchováváno při pokojové teplotě

10 mg/ml chlorofenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) – rozpuštěno ve sterilní dH₂O a uchováváno při 4 °C

Příprava media:

Kultivační medium bylo připraveno smícháním 5 ml roztoku glukosy, 1,25 ml asparágové kyseliny, 0,5 ml vitaminového roztoku, 0,4 ml threoninu, 0,125 ml CuSO_4 a 45 ml minimal media. Při navýšení objemu musí být zachován poměr jednotlivých komponent.

4.3.2 Příprava kultury

Kultivační medium bylo zaočkováno z agarové plotny na optickou denzitu $A_{640\text{nm}}$ přibližně 0,08. Poté byl roztok inkubován při teplotě 28 °C a při 180 rpm, dokud nebylo dosaženo $A_{640\text{nm}}$ 1,0. Poté se 50,5 ml čerstvého media inokulovalo 2 ml této kultury. Dále byl přidán roztok CPRG v poměru 0,5 ml na 50 ml kultivačního media.

4.3.3 Provedení testu

Příprava testu byla prováděna ve sterilním očkovacím boxu.

Postupným ředěním v 30% DMSO byly připraveny koncentrační řady testovaných látek.

Do jamek plastové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 10 μl vlastní testované látky o různé koncentraci a 190 μl kvasinkové kultury s CPRG (viz kap. 4.2.2.). Jamky destičky byly zvrchu zalepeny páskou a destička byla protřepána (2 min., 650 rpm). Poté byla destička inkubována při 32 °C na třepačce (65 rpm) po dobu dvou dnů. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru při dvou vlnových délkách 540 nm a 620 nm. Jako blank bylo použito 10 μl DMSO kultivovaného se 190 μl kvasinkové kultury a společně se vzorky. Všechna měření probíhala v tripletech. Spektrofotometrické měření probíhalo na spektrofotometru SPECTRAMaxPLUS³⁸⁴ (Molecular Devices, USA).

4.3.4 Výpočty

Naměřené absorbance vzorků byly zkorigovány podle vzorce:

$$A_{kor} = (A_{540nm} - A_{bl,540nm}) - (A_{620nm} - A_{bl,620nm}) \quad (4.1)$$

A_{kor} korigovaná hodnota absorbance

A_{540nm} změřená absorbance při 540 nm

$A_{bl,540nm}$ změřená absorbance blanku při 540 nm

A_{620nm} změřená absorbance při 620 nm

$A_{bl,620nm}$ změřená absorbance blanku při 620 nm

Hodnota A_{kor} byla vynesena do grafu proti logaritmu koncentrace testované látky. U látek vykazujících estrogení aktivitu měla tato závislost sigmoidální průběh. Pro tyto látky byla spočítána z lineární části křivky hodnota EC_{50} jako koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu.

4.4 Bioluminiscentní kvasinkový test

V tomto testu byly používány kmeny *S. cerevisiae* BMAERE α (ER, estrogení test), *S. cerevisiae* BMAARE α (AR, androgení test) a kontrolní kmen *S. cerevisiae* BMA64 α (luc). Kultury byly kultivovány a test byl prováděn podle práce Leskinen a kol. (2005).

4.4.1 Kultivační media

Příprava syntetického minimal media (SD) pro test:

6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin bylo rozpuštěno v 910 ml vody. Po autoklávování bylo medium doplněno zdrojem uhlíku a aminokyselinami podle Tab.1.

Příprava syntetického komplexního media pro uchování kultur:

K navážce 6,7 g kvasinkové dusíkaté báze bez aminokyselin bylo přidáno vždy ve stejném poměru 1,4 g syntetické směsi aminokyselin leucinu, histidinu, tryptofanu a uracilu. Po přidání 910 ml vody byla upravena hodnota pH roztoku

na 5,6 a po autoklávování se medium opět doplnilo nezbytným zdrojem uhlíku a aminokyselinami podle Tab.1.

Tab.1 Doplnky media

látka	objem přidáný do 1 l media (ml)	konzentrace (g/l)	kmen
glukosa	50	400	ER,AR,luc
histidin	10	2	ER,AR,luc
adenin hemisulfát	10	5	ER,AR,luc
leucin	10	10	ER,AR,luc
tryptofan	10	2	luc

Roztok glukosy byl sterilizován autoklávováním a zásobní roztoky aminokyselin byly sterilizovány filtrací přes filtr 0,2 μm . Všechny komponenty media byly uchovávány při pokojové teplotě, pouze tryptofan při 4 °C. Poměr jednotlivých komponent musí být zachován.

4.4.2 Zásobní roztok D-luciferinu

2 mmol/l roztok D-luciferinu byl připraven v 0,2 mol/l sodíko-citrátovém pufru o pH=5,0 (pufr byl připraven smíšením 35 ml 0,2 mol/l kyseliny citronové a 65 ml 0,2 mol/l citrátu trisodného). Během práce musí být luciferin chráněn před světlem. Roztok byl skladován při -20 °C. Před použitím byl roztok luciferinu naředěn destilovanou vodou do výsledné koncentrace 1 mmol/l.

4.4.3 Provedení testu

3 ml kompletně doplněného media ve sterilních zkumavkách byly naočkovány kmeny kvasinek z agarových ploten. Tyto kultury byly inkubovány přes noc při 30 °C na třepačce při 190 rpm. Druhý den byly tyto kultury použity jako inokulum přidané do 15 ml SD media. Kultury byly dále inkubovány cca dvě hodiny při 30 °C a třepání 190 rpm. Poté, co kultury dosáhly exponenciální růstové fáze ($OD_{640\text{nm}}=0,6-0,7$), bylo do zkumavek vhodných pro měření na luminometru napipetováno vždy 250 μl kvasinkové kultury a 25 μl vlastní testované látky (pro kmeny ER a AR). Pro kontrolní kmen luc bylo pipetováno 125 μl kvasinkové kultury a 12,5 μl testované látky. Zkumavky byly zalepeny parafilmem, roztřepány

pomocí vortexu a 2,5 h inkubovány při 30 °C. Po uplynutí této doby byly zkumavky opět roztřepány. Před každým měřením bylo do zkumavky připipetováno 250 µl luciferinu pro kmeny ER a AR a 125 µl luciferinu pro kmen luc. Poté byly kultury měřeny na luminometru Lumino-M90a (ZD Dolní Újezd, ČR) s použitím integračního času 60 s. Jako blank bylo použito 30% DMSO kultivované s kvasinkovými kulturami stejným způsobem jako testované látky.

Každá látka byla testována s použitím sensorového kmene (ER nebo AR) a paralelně k tomu ještě s kontrolním kmenem luc pro stanovení případné toxicity vzorku vůči kvasinkové kultuře. Všechna měření probíhala v tripletech.

4.4.4 Výpočty

Naměřené hodnoty relativní světelné emise (*RLU*) pro jednotlivé koncentrace látek byly normalizovány podle následujících výpočtů:

$$Fi = RLU_{(ER \text{ s chemikálií})} / RLU_{(ER \text{ blank})} \quad (4.2)$$

$$CF = RLU_{(luc \text{ blank})} / RLU_{(luc \text{ s chemikálií})} \quad (4.3)$$

Jestliže platí: $CF = 0,5-2,0$ pak: $Fi_{kor} = Fi \cdot CF$

$CF > 2,0$ pak je vzorek toxický

Fi indukce světelné emise

Fi_{kor} korigovaná hodnota *Fi*

CF korekční faktor

Hodnota *Fi_{kor}* byla vynesena do grafu proti logaritmu koncentrace testované látky. U látek vykazujících estrogení aktivitu měla tato závislost sigmoidální průběh. Pro tyto látky byla spočítána z lineární části křivky hodnota *EC₅₀* jako koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu.

4.5 Vzorky z degradace chlorbenzoových kyselin pomocí *Panus tigrinus*

K analýze byly použity dodané vzorky pocházející z degradačního pokusu probíhajícího v laboratoři Environmentální biotechnologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR.

V tomto pokusu byl *P. tigrinus* kultivován staticky v 20 ml MEG media (5 g/l ME, 10 g/l glukosa) a inokulován pomocí 5% suspenze 7 dní starého

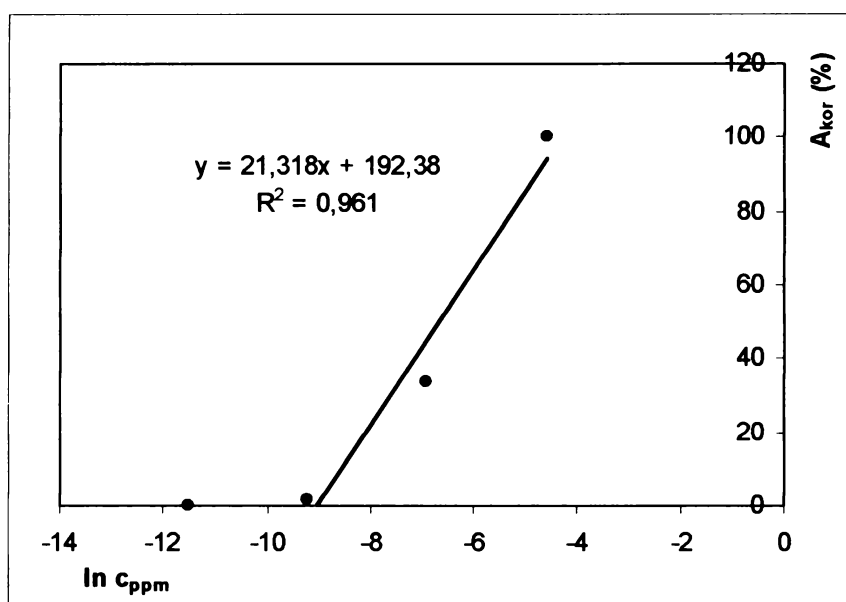
homogenizovaného mycelia. Ke kulturám byla přidána směs 12-ti chlorbenzoových kyselin o počáteční koncentraci v kultuře 10 ppm a kultury byly inkubovány při 28 °C 4 a 6 týdnů. Jako kontroly sloužily 7 dní staré kultury usmrcené autoklávováním. Ethylacetátový extrakt kultur (medium+mycelium) byl stokrát naředěn v 30% DMSO a použit jako vzorek pro stanovení estrogenní aktivity.

5. Výsledky a diskuse

5.1 β -galaktosidasový test

DMSO použité k rozpuštění testovaných látek negativně ovlivňovalo sensorové kvasinkové kmeny pokud jeho koncentrace v kultuře přesáhla 5 % v/v (data neprezentována). Proto bylo namísto čistého rozpouštědla použít směs 30% v/v DMSO s vodou.

Odpověď β -galaktosidasového testu na standard 17β -estradiol byla lineární v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-3}$ ppm (Obr. 2) a po proložení odpovídající regresní závislosti byla zjištěna hodnota EC_{50} $6,28 \cdot 10^{-5}$ ppm. Naměřená data odpovídají předchozím studiím (Routledge a Sumpter, 1996; Shiraishi a kol., 2003).



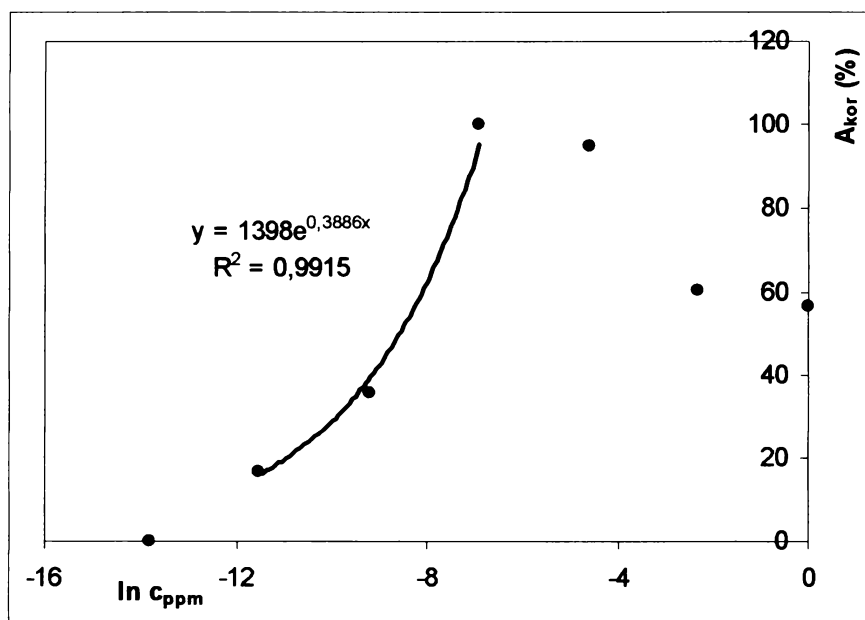
Obr.2 Závislost estrogenní aktivity 17β -estradiolu na ln koncentrace látky měřená β -galaktosidasovým testem. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC_{50} .

Hodnoty EC_{50} získané pro další testované látky (17α -ethinylestradiol, bisfenol A, nonylfenol, irgasan, chlorbenzoové kyseliny) jsou shrnuty v Tab 2. Závislost odpovědi testu na koncentraci studovaných látek je ukázána na Obr. 3-7. Naměřená data byla proložena odpovídajícími regresními závislostmi. Grafy uvádějí rovnice použité pro výpočet hodnot EC_{50} .

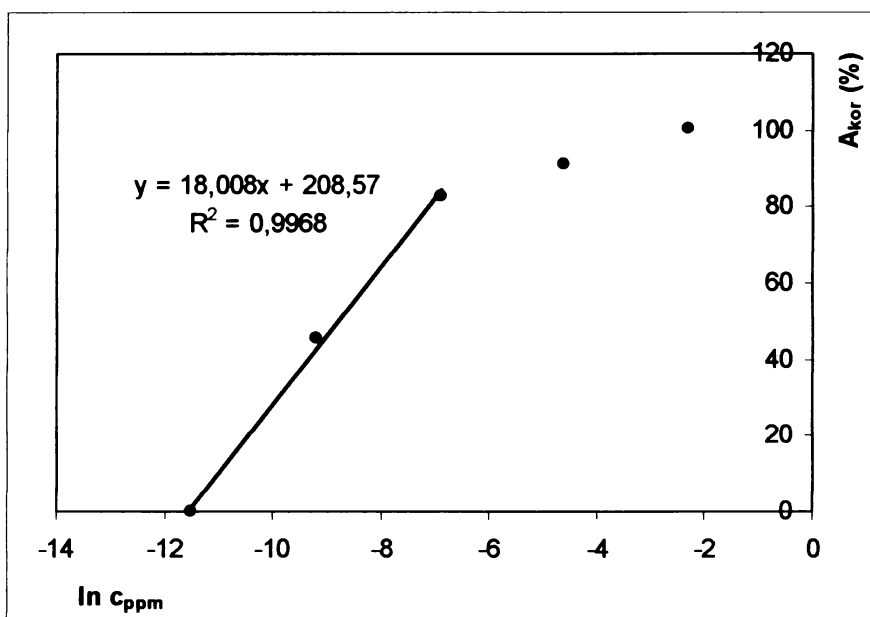
Tab.2 Výsledné hodnoty EC₅₀ (ppm) vypočtené z dat měřených β-galaktosidasovým a bioluminiscentním testem

látka	EC ₅₀		
	β-gal test hER	bioluminiscentní test hER	hAR
17β-estradiol	6,28·10 ⁻⁵	4,69·10 ⁻⁴	n
17α-ethinylestradiol	1,89·10 ⁻⁵	9,15·10 ⁻⁴	n
bisfenol A	7,50·10 ⁻⁶	3,45·10 ⁻⁵	n
nonylfenol	7,71·10 ⁻²	0,136	n
irgasan	4,24·10 ⁻³	nd	nd
testosteron	n	n	7,85·10 ⁻⁴
směs CIBk	1,45·10 ⁻⁴	1,02·10 ⁻⁴	nd

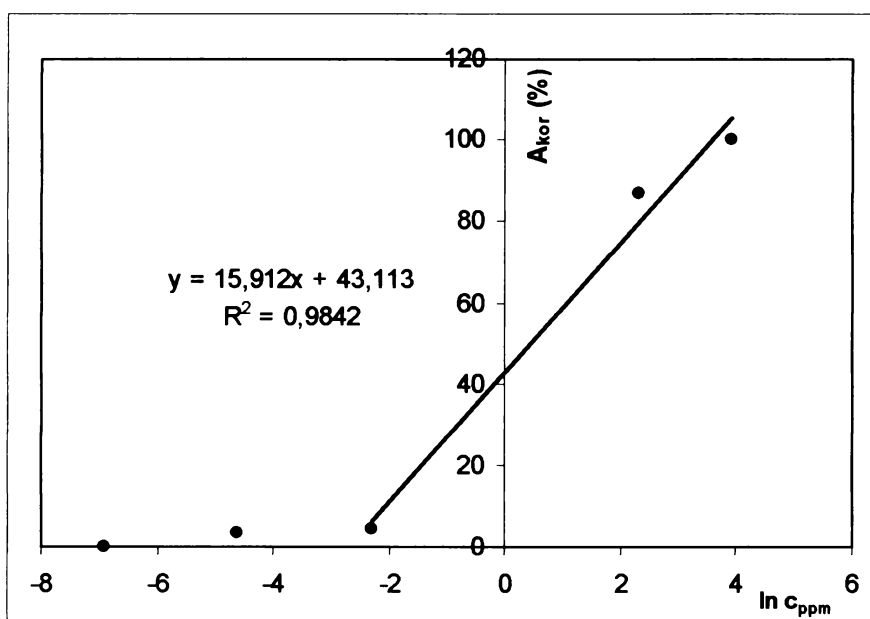
n – neměřeno *nd – neměřena žádná aktivita*



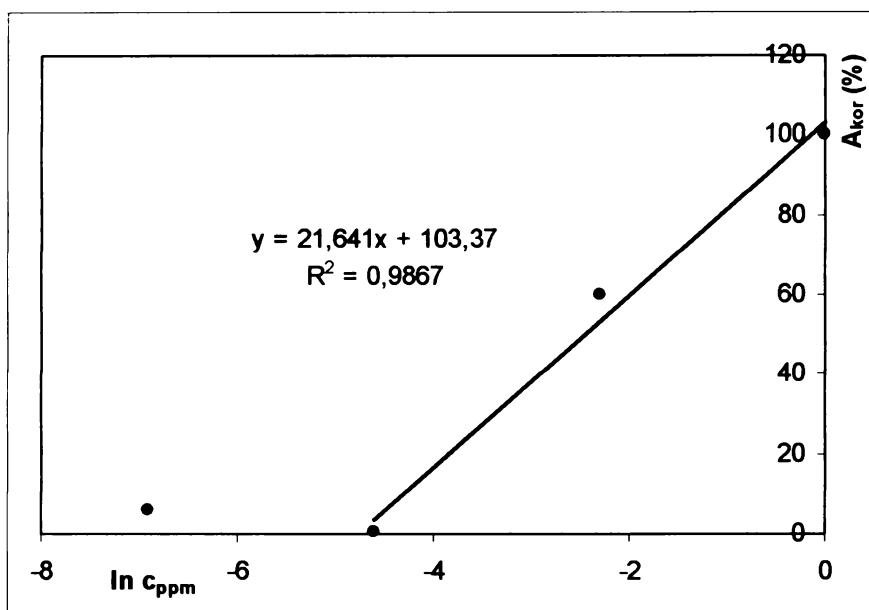
Obr.3 Závislost estrogenní aktivity 17α-ethinylestradiolu na ln koncentrace látky měřená β-galaktosidasovým testem. Exponenciála proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.



Obr.4 Závislost estrogenní aktivity bisfenolu A na \ln koncentrace látky měřená β -galaktosidasovým testem. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC_{50} .



Obr.5 Závislost estrogenní aktivity nonylfenolu na \ln koncentrace látky měřená β -galaktosidasovým testem. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC_{50} .

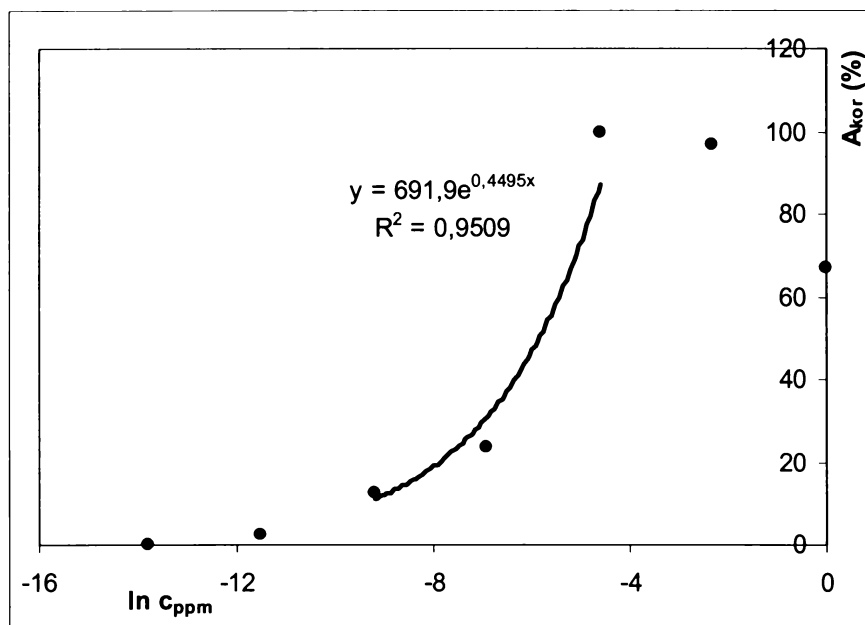


Obr.6 Závislost estrogenní aktivity irgasanu na ln koncentrace látky měřená β -galaktosidasovým testem. Příмка proložená daty byla použita pro výpočet EC_{50} .

Na základě vypočítané hodnoty EC_{50} bylo zjištěno, že test využívající β -galaktosidasu produkující kvasinkový kmen má nejvyšší citlivost pro stanovení estrogeny bisfenolu A. Toto stanovení vykazuje o čtyři řády nižší EC_{50} oproti nonylfenolu, který v tomto testu vykazuje nejvyšší EC_{50} (Tab. 2). Hodnoty EC_{50} ostatních testovaných látek se pohybují v rozmezí řádově 10^{-6} až 10^{-2} ppm, přičemž 17β -estradiol a 17α -ethinylestradiol s použitím tohoto testu vykazují přibližně stejnou estrogenní aktivitu. Fungicid irgasan byl o 2 řády méně estrogenní než 17β -estradiol. V této studii byla tak potvrzena mírná estrogenní aktivita irgasanu popsaná ve studii Cajthaml a kol. (2009), i když v jiné práci byl irgasan potvrzen jako neestrogenní (Foran a kol. 2000).

Dále byla studována estrogenní aktivita směsi 12-ti chlorbenzoových kyselin (viz kap. chemikálie), které představují časté konečné produkty mikrobiální degradace PCB látek (Pieper a Seeger, 2008). Směs těchto látek vykazovala estrogenní aktivitu s hodnotou EC_{50} $1,45 \cdot 10^{-4}$ ppm (Tab. 2). Citlivost testu vůči této směsi látek byla srovnatelná s citlivostí ke standardu 17β -estradiolu (viz Obr. 2 a 7). Doposud byla v literatuře popsána jen estrogenní, antiestrogenní a thyroïdní aktivita

hydroxylovaných PCB (Layton a kol., 2002; Shiraishi a kol., 2003; Korach a kol., 1988). Tyto výsledky ukazují, že mikrobiální degradací PCB látek mohou vznikat další potenciálně estrogenní látky.

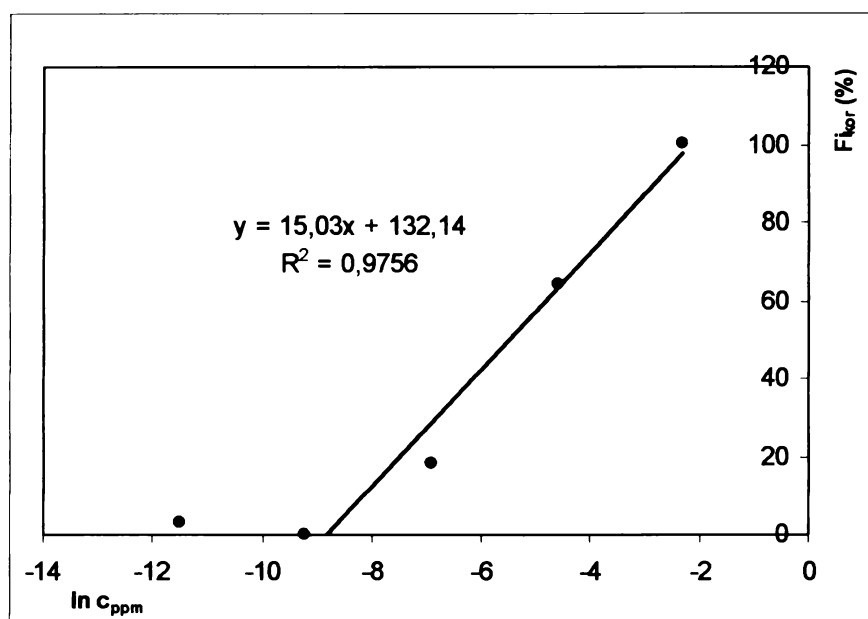


Obr.7 Závislost estrogenní aktivity směsi chlorbenzoových kyselin na ln koncentrace měřená β -galaktosidasovým testem. Exponenciela proložená daty byla použita pro výpočet EC_{50} .

5.2 Bioluminiscentní kvasinkový test

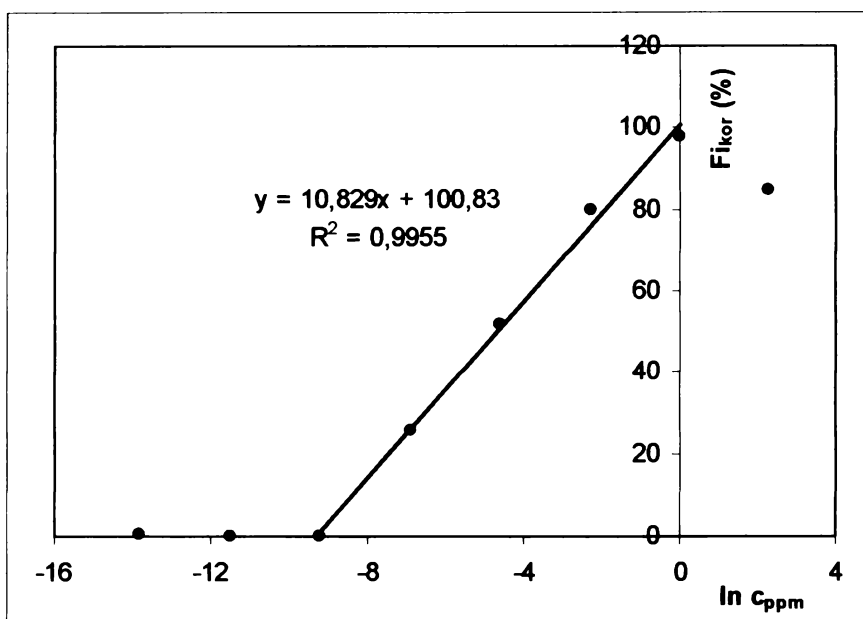
Obdobně jako u β -galaktosidasového testu i v těchto vzorcích byla namísto čistého rozpouštědla použita k ředění testovaných látek směs 30% v/v DMSO s vodou z důvodu negativního efektu rozpouštědla na sensorové kmeny.

Pro sledování estrogenní aktivity byl v tomto testu použit jako standard 17β -estradiol. Odpověď bioluminiscentního testu na standard byla lineární v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ až 0,1 ppm a hodnota EC_{50} pro tuto látku ($4,69 \cdot 10^{-4}$ ppm) byla o řád vyšší než hodnota stanovená β -galaktosidasovým testem (Tab. 2). Závislost estrogenity látky na její koncentraci je vynesena v Obr. 8.

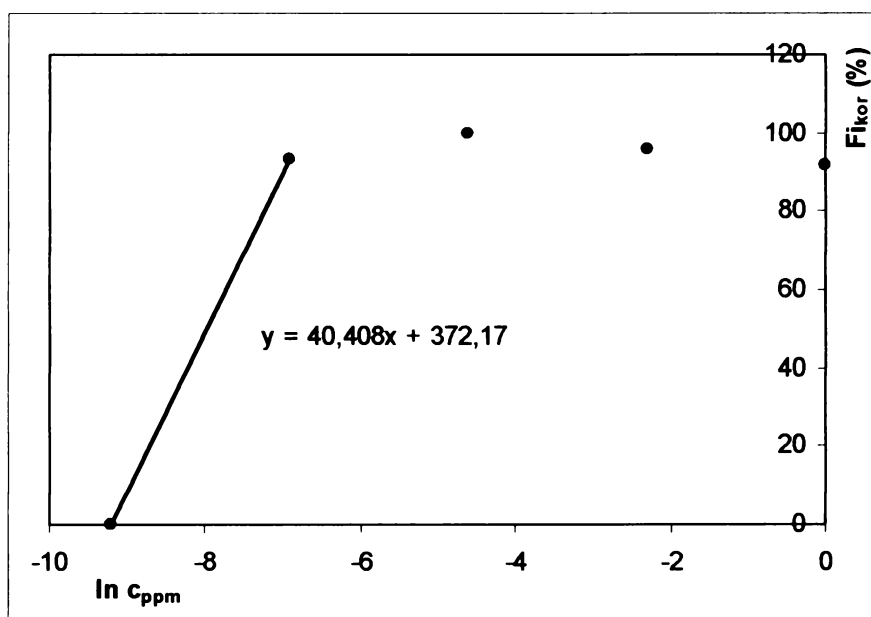


Obr.8 Závislost estrogenní aktivity 17β-estradiolu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ERα. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.

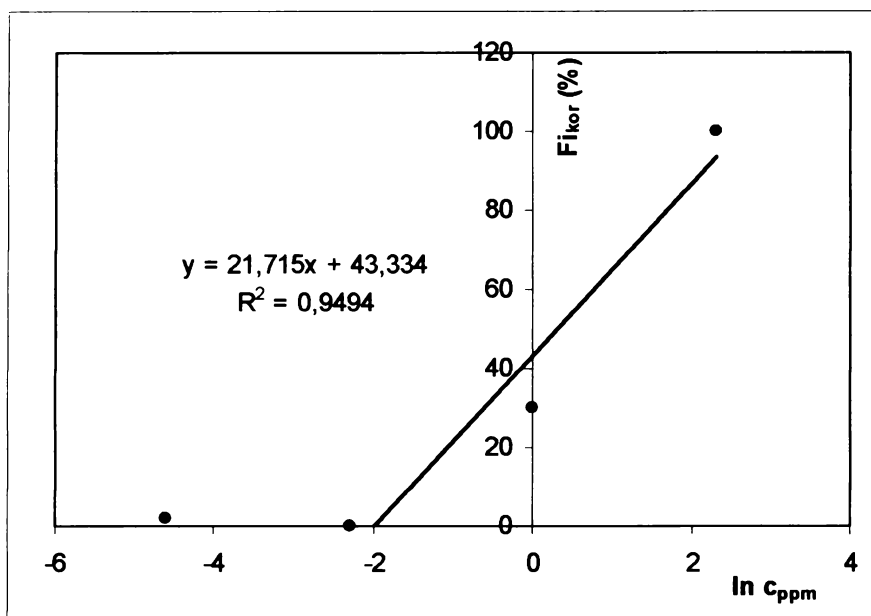
Hodnoty EC₅₀ pro srovnání estrogenicity dalších látek (17α-ethinylestradiol, bisfenol A, nonylfenol, irgasan, chlorbenzoové kyseliny) jsou rovněž shrnuty v Tab 2. Získaná data estrogenní aktivity naměřená pro různé koncentrace látek jsou zobrazena na Obr. 9-13. Naměřená data byla opět proložena odpovídajícími regresními závislostmi a grafy uvádějí rovnice použité pro výpočet hodnot EC₅₀.



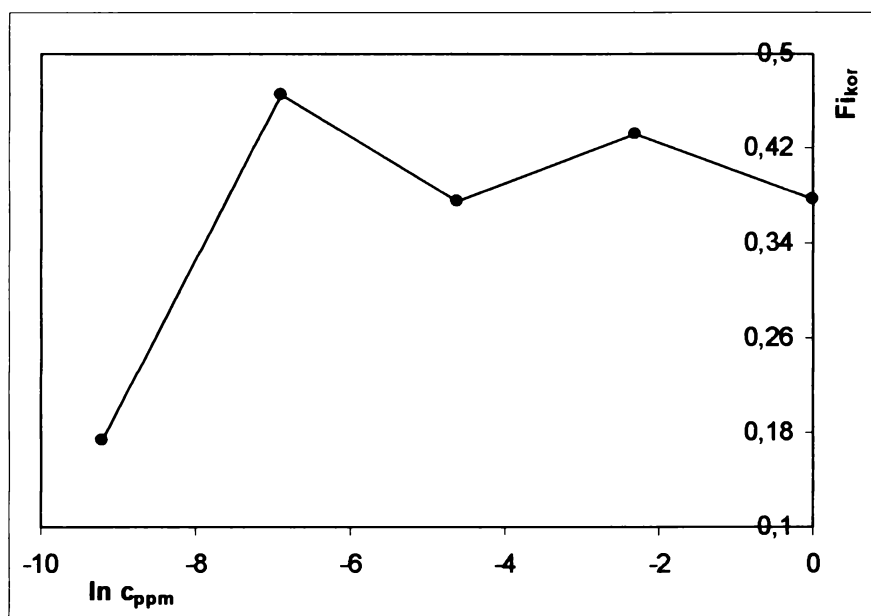
Obr.9 Závislost estrogenní aktivity 17α-ethinylestradiolu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ERα. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.



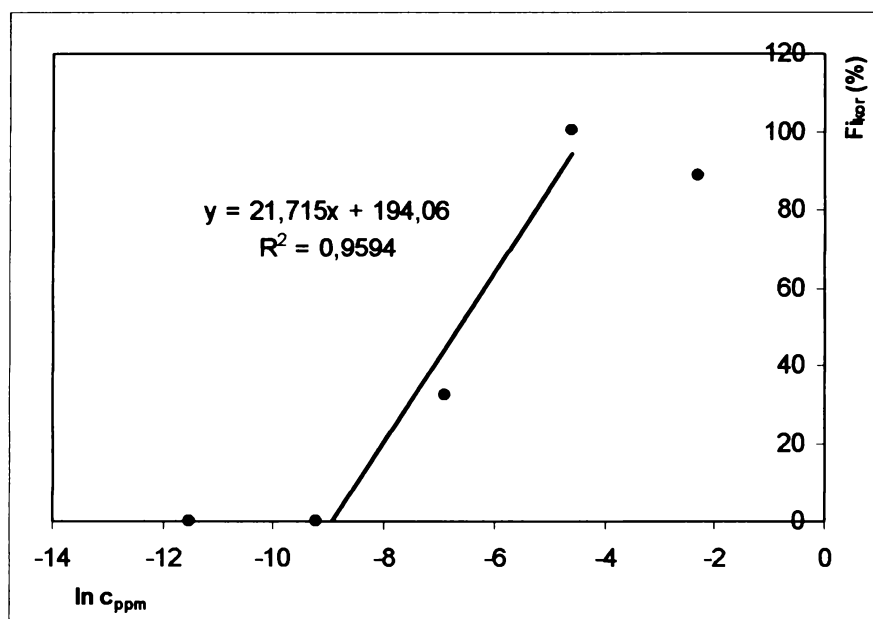
Obr.10 Závislost estrogenní aktivity bisfenolu A na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ERα. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.



Obr.11 Závislost estrogenní aktivity nonylfenolu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α . Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.



Obr.12 Závislost estrogenní aktivity irgasanu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α , kdy nebyla naměřena žádná estrogenní aktivita.

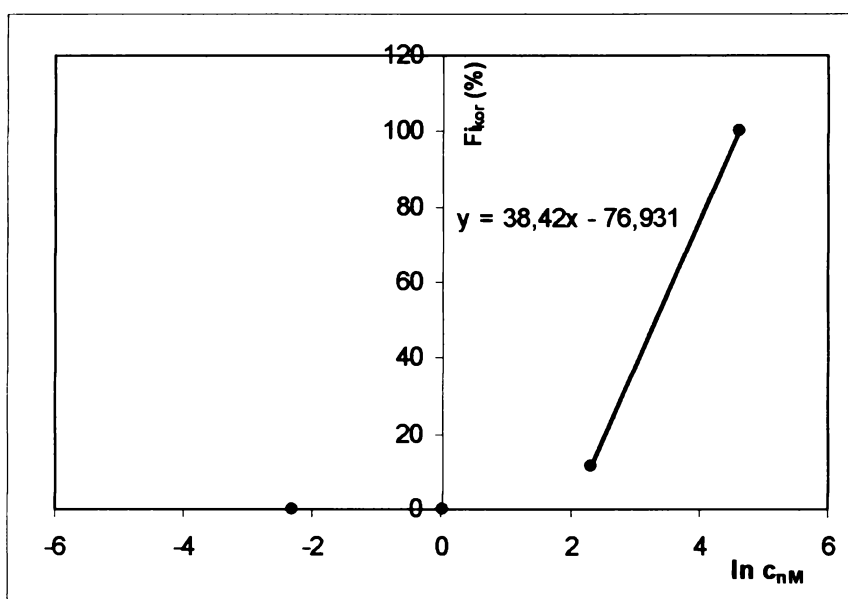


Obr.13 Závislost estrogenní aktivity směsi chlorbenzoových kyselin na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α . Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.

Bioluminiscentní kmen *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α pro stanovení estrogenity měl nejvyšší citlivost pro bisfenol A stejně jako β -galaktosidasový test (Tab. 2). Nonylfenol vykazoval o tři řády nižší estrogenní aktivitu než standard 17 β -estradiol stejně jako při sledování estrogenicity β -galaktosidasovým testem. U irgasanu měřeným bioluminiscentním testem však na rozdíl od β -galaktosidasového testu nebyla naměřena žádná aktivita (závislost měřených hodnot F_{ikor} nevykazovala sigmoidální charakter a látka byla proto označena jako neestrogenní, viz Obr. 12). Výsledky tedy ukazují rozlišnou citlivost dvou sensorových kmenů k irgasanu, což by i osvětlovalo důvod, proč byl irgasan v práci Forana a kol. (2000) označen jako neestrogenní a ve studii Cajthaml a kol. (2009) jako estrogenní. Estrogenní aktivitu 17 β -estradiolu, 17 α -ethinylestradiolu a směsi chlorbenzoových kyselin lze tímto testem (*S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α) změřit řádově s obdobnou hodnotou EC₅₀ (Tab. 2). Směs 12-ti studovaných chlorbenzoových kyselin vykazovala srovnatelnou estrogenní aktivitu jak v β -galaktosidasovém testu s hodnotou EC₅₀ 1,45·10⁻⁴ ppm, tak v bioluminiscentním testu s hodnotou a 1,02·10⁻² ppm (Tab. 2).

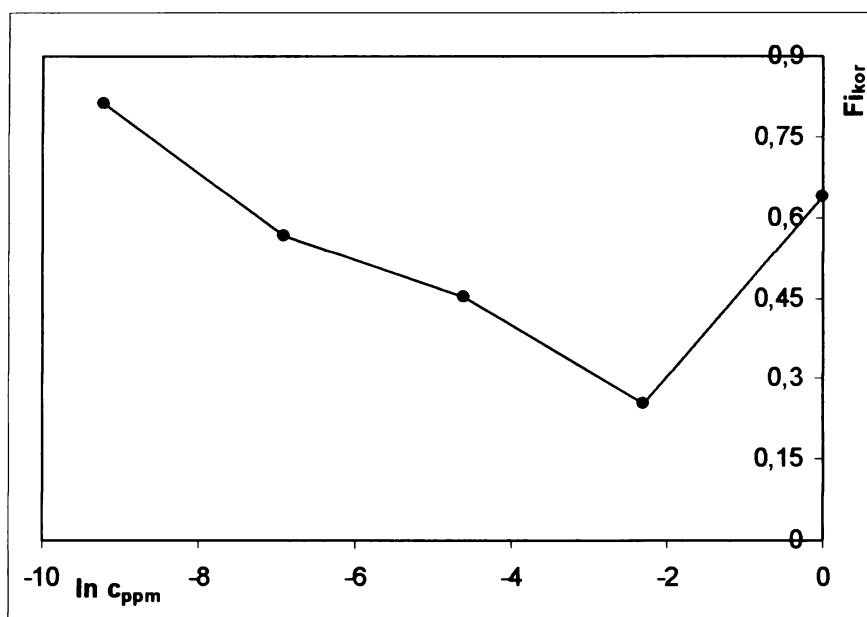
Test založený na bioluminiscentních kmenech *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α a *S. cerevisiae* BMA64luc vykázal nižší citlivost k 17 β -estradiolu, irgasanu i nonylfenolu, zatímco Leskinen a kol. (2005) uvádí obdobnou citlivost obou testů k bisfenolu A, propylparabenu a genisteinu.

Bioluminiscentním kvasinkovým testem za použití *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR kmenu byl testován pouze testosteron (standard), irgasan a směs chlorbenzoových kyselin. Odpověď bioluminiscentního testu na standard testosteron byla lineární v rozmezí koncentrací 10 až 100 ppm (Obr.14) a hodnota EC₅₀ 7,85·10⁻⁴ (Tab. 2).



Obr.14 Závislost androgenní aktivity testosteronu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR. Přímka proložená daty byla použita pro výpočet EC₅₀.

Hodnoty EC₅₀ pro irgasan a směs chlorbenzoových kyselin jsou uvedeny v Tab 2. Získaná data androgenní aktivity naměřená pro různé koncentrace irgasanu jsou zobrazena na Obr. 15, kde byla tato data rovněž proložena odpovídající regresní závislostí.



Obr.15 Závislost androgenní aktivity irgasanu na ln koncentrace měřená bioluminiscentním testem s použitím *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR, kdy nebyla naměřena žádná androgenní aktivita.

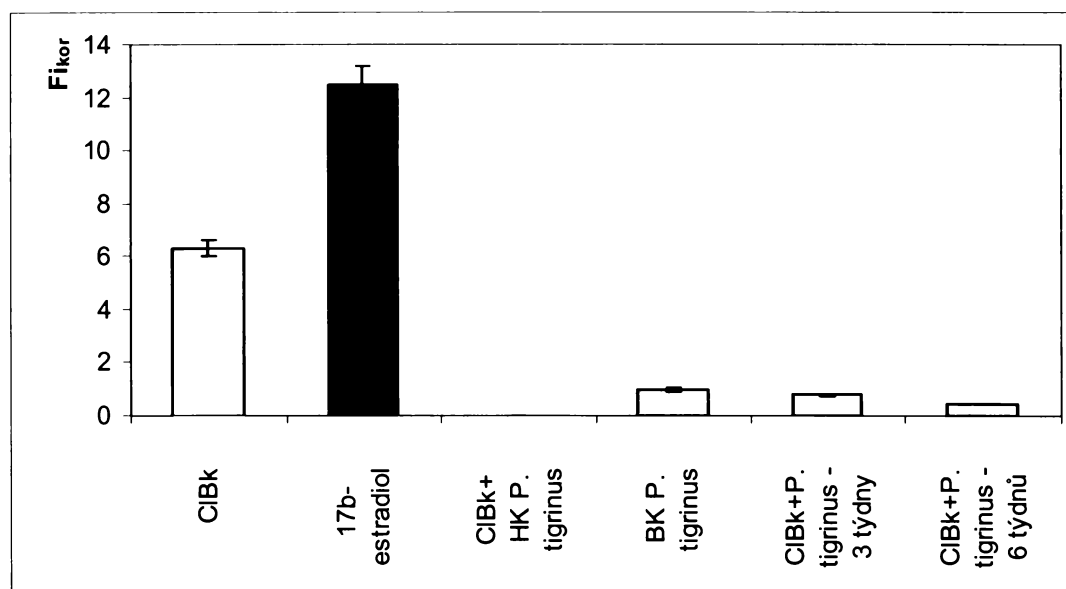
Irgasan stejně jako s hER kmenem neposkytoval žádnou aktivitu, byl tedy označen jako neandrogenní. Oproti tomu u směsi chlorbenzoových kyselin za použití hER kmenu lze stanovit estrogenicitu s hodnotou $EC_{50} 1,02 \cdot 10^{-4}$ (viz Tab.2), avšak při použití kmenu hAR nebyla naměřena žádná androgenní aktivita.

V průběhu všech měření byla ověřována toxicita vzorků vůči sensorovým kmenům pomocí kontrolního kmene *S. cerevisiae* BMA64luc a byla vyjádřena faktorem CF (Tab. 3). Látka byla považována za toxickou, jestliže CF faktor přesáhl hodnotu 2,0 (viz kap. 4.4.4.). Ze všech testovaných látek pouze nonylfenol v koncentraci 100 ppm vykázal toxicitu, a proto tento vzorek nebyl zahrnut do výpočtu hodnoty EC_{50} .

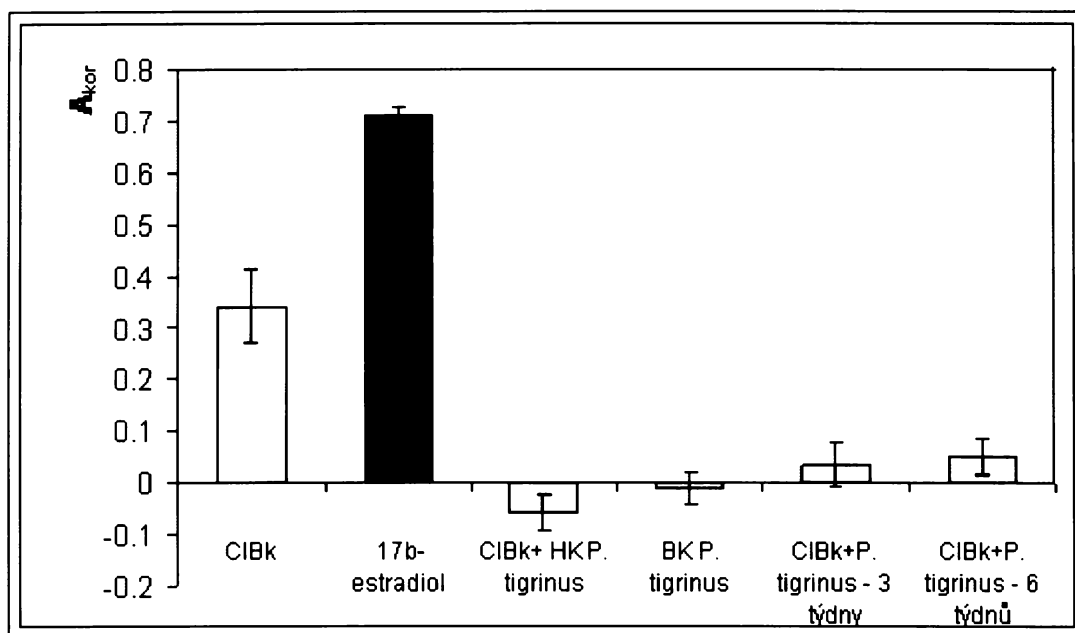
5.3 Vzorky z degračních pokusů

Ligninolytická houba *Panus tigrinus* prokázala účinnou schopnost degradovat chlorbenzoové kyseliny (data neprezentována). Ačkoliv u směsi chlorbenzoových

kyselin byla bioluminiscentním testem detekována estrogenní aktivita (Tab. 2., Obr. 13), tento test nebyl vhodný pro stanovení estrogeny látek pocházejících z degradace chlorbenzoátů ligninolytickou houbou. U vzorků z abiotických kontrol, kde neprobíhala degradace, byl bioluminiscentní signál testu inhibován (viz Obr. 16), to i přestože vzorky nevykazovaly žádnou toxicitu vůči sensorovému kmeni *S. cerevisiae* BMA64luc. CF faktor měřený pro všechny vzorky se pohyboval v rozmezí 1 - 1,2. Proto nebylo možné interpretovat data naměřená pro ostatní vzorky. Obdobný výsledek byl získán i s β -galaktosidasovým testem viz Obr. 17. Han a kol. (2002) uvádějí, že reakce estrogenního receptoru s environmentálními estrogeny může být blokována například některými flavonoidy.



Obr.16 Porovnání estrogenní aktivity vzorků z degradačních pokusů měřených bioluminiscentním kvasinkovým testem ve srovnání se standardem 17 β -estradiolem a směsí chlorbenzoových kyselin sledovaných stejným testem. HK – abiotická kontrolní kultura usmrcená autoklávováním; BK – biotická kontrolní kultura bez přidání CIBk



Obr.17 Porovnání estrogenní aktivity vzorků z degračních pokusů měřených β -galaktosidasovým testem ve srovnání se standardem 17 β -estradiolem a směsí chlorbenzoových kyselin sledovaných stejným testem. HK – abiotická kontrolní kultura usmrcená autoklávováním; BK – biotická kontrolní kultura bez přidání CIBk.

Tab.3 Vypočtené hodnoty korekčních faktorů pro zjištění toxicity látky vůči senzorovému kmenu *S. cerevisiae* BMA64luc

kmen	látká	koncentrace (ppm)	CF
Luc	17 β -estradiol	$1,0 \cdot 10^{-5}$	1,194
		1,0	1,019
	17 α -ethinylestradiol	$1,0 \cdot 10^{-6}$	0,930
		1,0	0,920
bisfenol A		$1 \cdot 10^{-6}$	0,422
		1,0	0,445
nonylfenol		$1,0 \cdot 10^{-3}$	1,213
		$1,0 \cdot 10^2$	3,319
irgasan		$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,688
		1,0	0,350
testosteron		0,01	0,980
		$1 \cdot 10^2$	1,008
	směs CIBk	0,1	1,046

6. Závěr

- Literární část práce shrnuje dosud známé poznatky z literatury o výskytu endokrinních disruptorů v životním prostředí a o metodách jejich měření se zaměřením na *in vitro* biotesty. V současné době existuje řada těchto testů, avšak jejich citlivost je dosud nedostatečně porovnána.
- Byly zavedeny dva testy ke stanovení endokrinní aktivity endokrinních disruptorů pro rutinní použití v laboratoři. Jejich spolehlivost byla ověřena pomocí standardních látek (17 β -estradiol, testosteron).
- β -galaktosidasovým testem byla stanovena o řád vyšší estrogenní aktivita 17 β -estradiolu než bioluminiscentním kvasinkovým testem. Pro tuto standardní estrogenní látku tedy bioluminiscentní test vykázal nižší citlivost. Stejně tak i u dalších látek testovaných na estrogenní aktivitu (17 α -ethinylestradiol, bisfenol A a nonylfenol) byla β -galaktosidasovým testem zjištěna o řád vyšší aktivita než testem bioluminiscentním. Tyto látky navíc vykazují o 2 až 3 řády nižší estrogenitu než standard 17 β -estradiol.
- Estrogen-senzorové kmeny vykazovaly odlišnou citlivost vůči fungicidu irgasanu. β -galaktosidasovým testem byla naměřena estrogenní aktivita irgasanu, avšak bioluminiscentním testem nebyla změřena žádná estrogenní ani androgenní aktivita. Tato látka nevykazovala pro senzorové kmeny žádný toxický účinek (Tab.3).
- Byla zjištěna estrogenní aktivita směsi chlorbenzoových kyselin, která vykazovala oběma testy řádově stejnou estrogenní aktivitu. Tyto látky nevykazovaly žádnou androgenní aktivitu.
- Ani jeden z testů nebylo možné použít k hodnocení estrogenity vzorků z biodegradačního pokusu. Odpověď testů byla zřejmě inhibována jinými biodegradací vznikajícími látkami.

7. Seznam literatury

- Ahel, M., Giger, W., Schaffner, C. (1994): *Water Research* 28, 1143.
- Alcock, R. E., Sweetman, A., Jones, K. C. (1999): *Chemosphere* 38, 2247.
- Banat, F. A., Prechtel, S. B., Bischof, F. (2000): *Chemosphere* 41, 297.
- Brotons, J. A., Olea-serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. (1995): *Environmental Health Perspectives* 103, 608.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., Carlquist, M. (1997): *Nature* 389, 753.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Moeder, M., (2009): *Chemosphere* 75(6), 745.
- Chen, P. J., Linden, K. G., Hinton, D. E., Kashiwada, S., Rosenfeldt, E. J., Kullman, S. W. (2006): *Chemosphere* 65, 1094.
- Colborn, T., Myers, J. P., Dumanoski, D. (1996): *Natural History* 105, 42.
- Ejlertsson, J., Nilsson, M. L., Kylin, H., Bergman, A., Karlson, L., Oquist, M., Svensson, B. H. (1999): *Environmental Science & Technology* 33, 301.
- Eldridge, M. L., Sanseverino, J., Layton, A. C., Easter, J. P., Schultz, T. W., Sayler, G. S. (2007): *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6012.
- Folmar, L. C., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K., Denslow N. D. (2000): *Aquatic Toxicology* 49 (1-2), 77
- Folmar, L. C., Hemmer, M. J. Denslow, N. D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H., Grau, E. G. (2002): *Aquatic Toxicology*, 60 (1-2), 101.
- Foran, C. M., Bennett, E. R., Benson, W. H. (2000): *Marine Environmental Research* 50, 135.
- Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M. (2001): *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284 (3), 704.
- Furhacker, M., Scharf, S., Weber, H. (2000): *Chemosphere* 41, 751.
- Gabriel, F. L. P., Heidlberger, A., Rentsch, D., Giger, W., Guenther, K., Kohler, H. P. E. (2005): *Journal of Biological Chemistry* 280, 15526.
- Guenther, K., Kleist, E., Thiele, B. (2006): *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 542.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H. C. H., Jorgensen, S. E. (1998): *Chemosphere* 36, 357.

- Han, D. H., Denison, M. S., Tachibana, H., Yamada, K., (2002): *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66(7), 1479.
- Hignite, C., Azarnoff, D. L. (1977): *Life Sciences* 20, 337.
- Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M. (2000): *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 1958.
- Ike, M., Jin, C. S., Fujita, M. (2000): *Water Science and Technology* 42, 31.
- Jiao, B., Yeung, E. K. C., Chan, Ch. B., Cheng, Ch. H. K. (2008): *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (6), 1399.
- Jobling, S., Sumpter, J. P. (1993): *Aquatic Toxicology* 27 (3-4), 361
- Kang, J. H., Katayama, Y., Kondo, F. (2006): *Toxicology* 217, 81.
- Kimura, M., Michizoe, J., Oakazaki, S., Furusaki, S., Goto, M., Tanaka, H., Wariishi, H. (2004): *Biotechnology and Bioengineering* 88, 495.
- Korach, K. S., Sarver, P., Chae, K., McLachlan, J. A., McKinney, J. D. (1988): *Molecular Pharmacology* 33 (1), 120.
- Kwak, H. I., Bae, M. O., Lee, M. H., Lee, Y. S., Lee, B. J., Kang, K. S., Chae, C. H., Sung, H. J., Shin, J. S., Kim, J. H., Mar, W. C., Sheen, Y. Y., Cho, M. H. (2001): *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 787.
- Larsson, D. G. J., Dolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E., Forlin, L. (1999): *Aquatic Toxicology* 45, 91.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., Porte, C. (2004): *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 247.
- Laws, S. C., Carey, S. A., Ferrell, J. M., Bodman, G. J., Cooper, R. L. (2000): *Toxicological Sciences* 54, 154.
- Layton, A.C., Sanseverino, J., Gregory, B. W., Easter, J. P., Sayler, G. S., Schultz, T. W. (2002): *Toxicology and Applied Pharmacology* 180 (3), 157.
- Lee, S. M., Koo, B. W., Lee, S. S., Kim, M. K., Choi, D. H., Hong, E. J., Jeung, E. B., Choi, I. G. (2004): *Enzyme and Microbial Technology* 35 (5), 417.
- Lee, S. M., Koo, B. W., Choi, J. W., Choi, D. L., An, B. S., Jeung, E. B., Choi, I. G. (2005): *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28 (2), 201.
- Leskinen, P., Michelini, E., Picard, D., Karb, M., Virta, M. (2005): *Chemosphere* 61 (2), 259.

- Lobos, J. H., Leib, T. K., Su, T. M. (1992): *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1823.
- Maki, H., Masuda, N., Fujiwara, Y., Ike, M., Fujita, M. (1994): *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2265.
- Nghiem, L. D., Manis, A., Soldenhoff, K., Schafer, A. I. (2004): *Journal of Membrane Science* 242, 37.
- Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., Nishihara, T. (1999): *Toxicology and Applied Pharmacology* 154, 76.
- Pelley, J. (2003): *Environmental Science & Technology* 37, 313.
- Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, M. F., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Olea, N. (1998): *Journal of Dental Research* 77, 1209.
- Pieper, D.H., Seeger, M. (2008): *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15 (2-3), 121.
- Pinkston, K. E., Sedlák, D. L. (2004): *Environmental Science & Technology* 38, 4019.
- Quinn, B., Gagne, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C. (2004): *Aquatic Toxicology* 66, 279.
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., Sumpter, J. P. (1998): *Environmental Science & Technology* 32, 1559.
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. (1996): *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (3), 241.
- Saito, T., Kato, K., Yokogawa, Y., Nishida, M., Yamashita, N. (2004): *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 64.
- Shiraishi, F., Okumura, T., Nomachi, M., Serizawa, S., Nishikawa, J., Edmonds, J. S., Shiraishi, H., Morita, M. (2003): *Chemosphere* 52 (1), 33.
- Snyder, S. A., Westerhoff, P., Yoon, Y., Sedlák, D. L. (2003): *Environmental Engineering Science* 20, 449.
- Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B., Mattiasson, B. (2005): *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 719.
- Sonnenschein, C., Soto, A. M. (1998): *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65, 143.
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., Sonnenschein, C. (1991): *Environmental Health Perspectives* 92, 167.
- Spivack, J., Leib, T. K., Lobos, J. H. (1994): *Journal of Biological Chemistry* 269, 7323.

- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klečka, G. M., O'Block, S. T., Harris, L. R. (1998): *Chemosphere* 36, 2149.
- Tanaka, H., Yakou, Y., Takahashi, A., Higashitani, T., Komori, K. (2001): *Water Science and Technology* 43, 125.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T., Taniguchi, M. (2001a): *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 312.
- Tanaka, T., Taniguchi, M. (2003): *Wastewater treatment using enzymes*, 125, ISBN: 81-7736-172-4.
- Tanghe, T., Devriese, G., Verstraete, W. (1998): *Water Research* 32, 2889.
- Tanghe, T., Dhooge, V., Verstraete, W. (1999): *Applied and Environmental Microbiology* 65, 746.
- Temes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M. (1999): *Science of the Total Environment* 225, 81.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T. (2001): *Chemosphere* 42, 271.
- Tyler, C. R., Jobling, S., Sumpter, J. P. (1998): *Critical Reviews in Toxicology* 28, 319.
- Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T. (2001): *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 355.
- Ushiba, Y., Takahara, Y., Ohta, H. (2003): *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2045.
- Voordeckers, J. W., Fennell, D. E., Jones, K., Haggblom, M. M. (2002): *Environmental Science & Technology* 36, 696.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E. (2005): *Environmental Science & Technology* 39, 6649.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G. (1994): *Endocrinology* 135, 175.
- Xu, H., Kraus, W. L., Shuler, M. L. (2008): *Biotechnology and Bioengineering* 101 (6), 1276.
- Yim, S. H., Kim, H. J., Lee, I. S. (2003): *Archives of Pharmacal Research* 26, 805.
- Zhang, C., Zeng, G. M., Yuan, L., Yu, J., Li, J. B., Huang, G. H., Xi, B. D., Liu, H. L. (2007): *Chemosphere* 65, 181.
- Zwiener, C., Frimmel, F. H. (2000): *Water Research* 34, 1881.

8. Příloha

Příloha 1 Struktury zástupců endokrinních disruptorů používaných v této práci.

