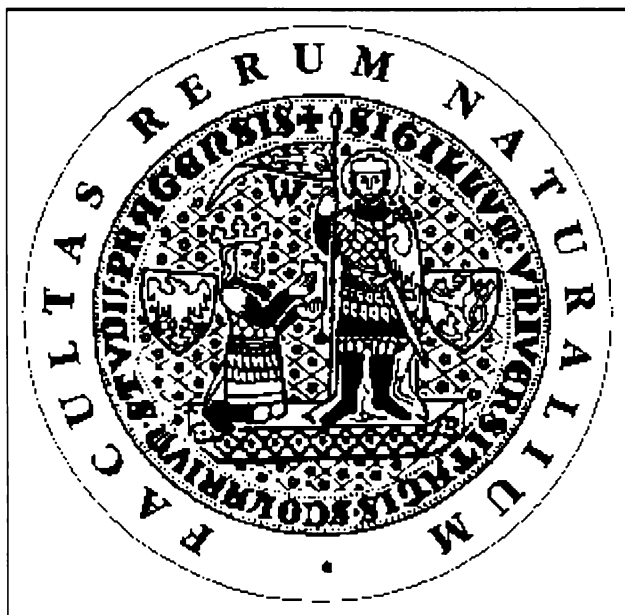


**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**



**Vliv endokrinních disruptorů na savčí
organismus *in vivo***

Bakalářská práce

Linhartová Zuzana

Vedoucí: RNDr. Jiří Liberda, PhD.

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha, 2009

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233145710

Poděkování

Na tomto místě si dovoluji poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Janě Pěknicové, CSc. za pečlivé odborné vedení mé bakalářské práce, za vstřícný přístup, neocenitelné rady a obětavou pomoc v průběhu jejího zpracování.


Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Liberdovi, PhD. za vedení mé bakalářské práce a otci prof. Ing. Otomarovi Linhartovi, DrSc. za odbornou pomoc při zpracování mé práce, za vytvoření zázemí a trpělivost.

Můj dík patří i Mgr. Sayyed Mohammad Hadi Alavi, Mgr. Azadeh Hatef za pomoc při experimentální části a Ing. Aleně Kubátové za praktické připomínky a rady v laboratoři.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Jany Pěkníkové, CSc., a že jsem všechny prameny řádně citovala.“

V Praze dne

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Pěkníková'.

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. Endokrinní disruptory	5
1.2 Rozdělení endokrinních disruptorů	10
1.2.1. Xenoestrogeny	10
1.2.2. Fytoestrogeny	12
1.2.3. Anti-estrogeny	14
1.2.4. Androgeny	14
1.2.5. Antiandrogeny	15
1.3. Působení endokrinních disruptorů	16
1.3.1. Mechanismus endokrinní disrupce	16
1.3.2. Cesty expozice endokrinních disruptorů	18
1.4. Struktura a vliv vybraných endokrinních disruptorů na savce <i>in vivo</i>	18
1.4.1. Vinklozolin	19
1.4.2. Zearalenone	22
1.4.3. Bisphenol A	26
1.4.4. Rtuť	29
2. CÍL PRÁCE	33
3. MATERIÁL A METODY	34
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5. SOUHRN	44
6. LITERATURA	45

1. ÚVOD

1.1. Endokrinní disruptory

Od 2. světové války dochází v mnoha zemích k nárůstu defektního vývoje mužských pohlavních orgánů a snížení mužské reprodukční schopnosti. Tyto změny se staly v krátkém časovém úseku, dá se tedy předpokládat, že jsou příčinou spíše nepříznivého vlivu prostředí a životního stylu, než příčinou genetických změn. Mezi tyto změny patří hlavně vzrůst výskytu nádorů varlat a prostaty, hypospadie, kryptorchismus a snížená kvalita spermatu (Sharpe and Skakkeback., 1993, Safe, 2000a). Tyto symptomy byly popsány jako „Testicular dysgenesis syndrome“ (TDS). TDS je vyvolán škodlivými látkami vyskytujícími se v životním prostředí. Důsledkem je narušení vývoje embryí a gonád během embryonálního vývoje (Skakkeback et al., 1987).

V přírodě se vyskytuje řada kontaminantů, které mají estrogenní či androgenní aktivitu a mohou negativně ovlivnit vývoj a reprodukci savců včetně člověka. Mezi tyto kontaminanty patří endokrinní disruptory (ED), (vom Saal et al., 1998; EPA, 1999), které můžeme rozdělit na látky vznikající lidskou činností – xenoestrogeny a komponenty přítomné v lidské stravě – fytoestrogeny. Oba typy těchto látek vstupují do těla živočichů z vnějšího prostředí. Některé mohou zapříčinit nebezpečné toxikologické jevy při reprodukci (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Safe, 2000a).

Mnoho buněk v těle produkuje proteiny, polypeptidy, aminy a lipidy a udržuje je v cytoplasmě ve formě sekrečních granul. Sekrece těchto granul může být exokrinní (vnější) nebo endokrinní (vnitřní vyměšování), podle jejich sekreční cesty. Látky které jsou vyměšovány endokrinními žlázami a působí na cílový orgán se nazývají hormony. Hormony přenášejí informace do cílových orgánů. Stejnou funkci mají i cytokininy, které jsou sekretovány buňkami imunitního systému. Mezi klasické endokrinní orgány u člověka patří: štítná žláza, příštítná tělíska, nadledvinky, varlata a vaječník, hypothalamus a další (www.ffcr.or.jp). Endokrinní systém je tedy složitý systém, který zahrnuje mozek a přidružené orgány. Ty zahrnují: hypofýzu, štítnou žlázu, nadledvinky, a samčí a samičí reprodukční orgány, které uvolňují hormony do krevního řečiště. Tyto žlázy a jejich hormony regulují růst, vývoj a funkci mnohých metabolických procesů. Pohlavní hormony, estrogeny u žen a androgeny u mužů, ovlivňují vývoj a správnou funkci reprodukčních orgánů.

Endokrinní systém může být narušen látkami, které jsou produkty lidské činnosti a látkami přirozeně se vyskytující v přírodě, které mohou napodobovat či soutěžit o receptorová místa endogenních hormonů a narušovat jejich funkci. V závislosti na jejich aktivitě mohou být popsány jako estrogenní nebo androgenní modulátory.

Od roku 1980 je pozornost řady zemí, vlád i vědců obrácena k řešení problému, jak zabránit úniku řady látek, které narušují normální endokrinní (hormonální) funkci u živočichů do životního prostředí. Ve většině zemí vedly tyto záležitosti k pozorování změn v reprodukční fyziologii a zdraví u celé řady živočichů (Tyler et al, 1998, Vos et al., 2000). Také lidská neplodnost je tímto problémem zasažena. Nedávné studie ukazují, že více jak 15% evropské populace trpí problémy související s neplodností. Neplodnost je u 50% párů způsobena muži. Můžeme předpokládat, že právě klesající kvalita životního prostředí je odpovědná za dané změny. Škodlivé látky biologického nebo chemického původu mohou poškodit biologickou funkci organismu a způsobit problém v reprodukci.

V nedávných letech byl obrovský zájem namířen na některé typy chemických látek (pesticidy, některé druhy plastů, detergenty), které mohou narušit endokrinní systém a mít nepříznivé účinky na lidské zdraví (Sedaka et al., 2000). Skupina se zaměřila na sérii chemikálií, u kterých se předpokládá, že jsou estrogenně aktivní. Byly to hlavně insekticidy jako DDT a pesticidy, jejichž používání je v dnešní době již zakázané. Studie potvrdila, že pesticidy potřebují striktní reprodukční toxikologickou studii a studii reprodukce u dvou generací, aby se určilo, že jsou nebo nejsou estrogenně aktivní. Projekt také objasnil, že estrogenní aktivita chemikálií nemusí být nalezena použitím obvyklých testovacích systémů.

Úloha estrogenně aktivních látek spočívá v ovlivnění vývoje reprodukčních orgánů organismů. U savců se zaklady samičích pohlavních orgánů v období diferenciaci pohlaví diferencují na samčí pohlaví a to potlačením produkce enzymu aromatázy. V průběhu a krátce po diferenciaci pohlaví, samčí embryo sekretuje velké množství testosteronu, který slouží k zahájení procesu maskulinizace (defeminizace) přídatných reprodukčních orgánů, externích genitálií a enzymového systému jiných tkáních v ledvinách, mozku a játrech. Pohlavní hormony také ovlivňují mozek a centrální nervový systém. V závislosti na stupni a délce expozice způsobují endokrinní disruptory (ED) např. tumory a další abnormality růstu buněk, nemusí se však projevovat až do adolescence nebo v dospělosti. Škodlivý účinek byl zaznamenán u těhotných žen po používání diethylstilbestrolu (DES), který způsobil např.

snížení plodnosti, poškození genitálního traktu, vznik vzácných reprodukčních rakovin a možné dopady na chování a inteligenci. ED ovlivňují člověka stejně jako jiné volně žijící živočichy. Způsobují u nich sníženou samčí neplodnost, defekty v pohlavním vývoji, zvýšení rakoviny prostaty, ale i samičí reprodukční problémy, zvýšení rakoviny prsu, endometriosu a u obou pohlaví narušení imunitního systému a problémy ve vývoji a chování u dětí (Keith et al., 1997).

Jedna z prvních látek, která byla popsána jako ED byl diethylstilbestrol (DES), farmaceutický produkt podávaný těhotným ženám od roku 1972 až do roku 1978 proti potracení. Způsobil karcinomy ve vagíně, reprodukční abnormality u ženských potomků a mnohem vyšší stupeň defektu genitálií u mužských potomků s projevy neplodnosti (nesestouplá, nevyzrálá varlata) (Jensen et al., 1995).

Jiným zdrojem endokrinně modifikujících chemikálií jsou syntetické chemické látky, které končí jako polutanti životního prostředí. V roce 1996 bylo registrováno okolo 600 pesticidů a 80000 průmyslových chemikálií a jejich počet se neustále zvyšuje (Keith et al., 1997).

Dalším zdrojem ED je potrava jako sojové boby, jablka, třešně, obilí a hrách. Existuje mnoho dalších rostlin, které produkují polycyklické látky jako isoflavonoidy, fytoestrogeny a koumesanty a jsou estrogeně aktivní. Kolektivně se nazývají fytoestrogeny a jejich stupeň endokrinní aktivity není ještě příliš objasněn, ačkoliv ve starověkém Římě byl používán (dnes již vyhynulý) obrovský fenykl nazývaný „silphium“ ke kontrole a ovlivnění porodu. Známým fytoestrogenem přítomným v sojových produktech je genistein. Konzumace soji je u lidské populace obvyklá. Zajímá nás hlavně z hlediska, že může způsobit hypospadii po jeho působení v děloze (testováno na myších). Spolu s genisteinem se často uvádí i vinklozolin (antiandrogen), který vykazuje podobné negativní účinky. Byly provedeny pokusy na myších, které byly živeny extrakty ze soji s určitou dávkou genisteinu a vinklozolinu v 13-17 dni těhotenství. Výsledky ukázaly, že výskyt hypospadiie byl 25% se samotným genisteinem, 42% se samotným vinklozolinem a 41% s oběma dohromady. Tyto pokusy prokázaly, že ovlivnění vinklozolinem a genisteinem během těhotenství může přispět na rozvoj hypospadiie (Vilela et al., 2007).

Určitý druh pozornosti si zaslouží obecně rozšířená feminizace samčích ryb a změny v reprodukci u mořských měkkýšů. Pozorování ukázala, že feminizace samčích ryb v řekách je způsobena odpadními vodami vypouštěných do řek, a že estrogeny a látky napodobující

estrogeny jsou zodpovědné za pozorované endokrinní poruchy. Tyto studie ukazují, že rozdílné druhy ryb vykazují rozdílnou citlivost na feminizující potenciály různých látek (Fairchild et al., 1992, Manning et al., 1999, Grist et al., 2003, Tabata et al., 2004).

Obecně rozšířená feminizace u ryb v řekách se stala vodítkem k jejich pozorování v zemích jako Velká Británie, Spojené státy americké, skoro celá Evropa a Japonsko. Epidemiologická data (získaná v Evropě a hlavně ve Velké Británii) ukázala, že výskyt feminizovaných ryb je spojen hlavně se znečištěním řek a volných vod vytékajícími odpadními vodami. Nejdůležitější a silně účinné estrogenní komponenty v odpadních vodách pochází z domácností. Rozsáhlá laboratorní data potvrzují, že steroidní estrogeny jsou schopné vyvolat efekty feminizace pozorované u ryb ve vloných vodách a to v koncentracích, které byly naměřeny v odpadních vodách v našem životním prostředí (Ankley et al., 1998, Matthiesse et al., 2002, Taylor et al., 1999, International Programme on Chemical Safety 2002, Gross-Sorokin et al., 2006).

Některé chemické látky, které obsahují mnoho ED se mohou „bioakumulovat“ nebo zabudovat do organismu. Jestliže jsou jednou začleněny do tkání a tuků u člověka a zvířat, mohou tam zůstat dlouhou dobu, až do té doby než jsou zmetabolizovány. Embryo, nejcitlivější stádium života, může být zničeno látkami, které měla matka v sobě dříve zabudované dny nebo roky. Asi nejvýznamnějším zdrojem, jak se vystavit působení těchto látek je konzumace kontaminovaných ryb. Jsou to hlavně organismy na vyšších stupních potravního řetězce, jako např. člověk. Ženy by měly být více náchylné na vyšší stupeň akumulace těchto polutantů než muži. Mají většinou vyšší procento tuku v těle, ale každý kdo konzumuje kontaminované ryby (potraviny) je potenciálně v ohrožení. U těhotných a kojících žen se kontaminanty mohou uložit v tukových tkáních a ovlivnit zárodečný a neonatální vývoj jejich dítěte. Dalším důležitým faktorem je načasování expozice ED na organismus. Často je to důležitější než koncentrace, či celková dávka ED. Jedna expozice ED ve zranitelné chvíli může u vyvíjejícího se embrya způsobit jeho smrt. Samozřejmě dlouhodobější tedy chronické působení po menších dávkách ho může také zničit. Dále se zjistilo, že některé kombinace dvou nebo tří EDs mohou mít multiplikační či exponencionální efekt, než kdyby působily samostatně (Keith et al., 1997).

Pro složitost lidské biologie je téměř nemožné zjistit pro určité endokrinní poruchy důvod deformací a nefunkčnosti určitých orgánů či celých soustav. Celková dávka nebezpečí těchto poruch musí zahrnovat další faktory působení jako absorpce, vyměšování, metabolismus,

bioakumulace a další chemické interakce (Harrison et al., 1997). Nedávné studie estrogenů vyskytujících se v životním prostředí (DDT, bisfenol A a j.) ukázaly, že jejich působení je o dost slabší, oproti dobře studovaným potentním estrogenům jako je diethylstilbestrol, nezpůsobují genitální deformace (Joffe, 2001). Jestliže estrogeny v životním prostředí mohou přispívat k deformacím, tak antiandrogeny (ftaláty, vinklozolin), prokazují androgenní efekt u mužů. Bylo zpozorováno, že během posledních dvou desetiletí se snížila koncentrace organochloridových látek. Někteří výzkumníci se domnívali, že působení těchto látek je zanedbatelné a síla antiandrogenních látek způsobující defekty ve vývoji genitálií je velice slabá. Záruka, kvalita a omezení je však vždy rozumná pouze s interpretovanými daty. V minulosti se výzkumníci domnívali, že estery ftalátů jsou zcela neškodné na mužskou fertilitu, jak prokázaly jejich první výzkumy. Časem se však ukázalo (po použití různých modelů a různých analýz), že tyto látky dramaticky ovlivňují vývoj mužských genitálií a deformace u žen (Steinhardt et al., 2004).

Endokrinními disruptory způsobují v přírodě rozmanité reprodukční změny a defekty. Tyto změny jsou např.: nesestouplá varlata u pantera (Florida), malé penisy u aligátorů, změna pohlaví u ryb, změny chování u ptáků. ED také přispívají k růstu rakoviny varlat, k nárůstu vrozených defektů a snižování počtu spermií u člověka. Kombinované *in vitro* a *in vivo* studie jsou důležité pro úplnou charakterizaci reprodukčních změn po působení endokrinních disruptorů, které tyto změny způsobují. Bylo identifikováno mnoho pesticidů (vinklozolin, DDE aj.), které se váží na potkaní i lidské receptory reprodukčních orgánů, odkládají pubertu, redukuje velikost pohlavních přídatných žláz a mění pohlavní znaky hlavně u samců. Dále některé ftaláty, které jsou estrogeny *in vitro* způsobují malformace u samců potkanů, které působí jako antagonisté androgenů v dělohách u samic. Naproti tomu xenoestrogeny ovlivňují růst a vývoj samčích potomků, ale ti nejsou malformováni nebo nejsou neplodní (Gray, 1998).

Jak již bylo popsáno, mezi kandidáty s toxickým vlivem na fertilitu patří endokrinní disruptory. Endokrinní disruptor je definován jako exogenní činitel interferující se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, činností nebo odbouráváním přirozených hormonů v těle, které jsou odpovědné za udržování homeostázy, reprodukce, vývoje a chování (EPA, 1997). Je to exogenní látka nebo směs látek, které mění funkce endokrinního systému a způsobují nepříjemné zdravotní potíže. Endokrinní disruptory hrají nepříznivou roli v přijímané potravě. Vyskytují se např.: v soje, luštěninách, ovoci, atd. Nejsou však jediným zdrojem EDs mající vliv na lidskou i zvířecí populaci. Dalším zdrojem je právě životní prostředí – voda, vzduch,

půda, produkty vzniklé lidskou činností – detergenty, pesticidy, plasty (bisfenol A a ftaláty-MEHP), léčiva (diethylstilbesterol), průmyslové chemikálie (polychlorované bifenyly, dioxin), vedlejší produkty při výrobě papíru, kovů (kadmium, olovo, rtuť), látky vzniklé při spalování, atd.

Každý endokrinní disruptor je popsán určitými chemickými identifikačními daty. Základní jsou název a molekulová struktura. CAS Registry Number je číslo obsahující devět číslic, slouží jako registrační číslo. Synonyma – mnoho látek je známo pod více než jedním chemickým názvem, často mají komerční názvy. Dále je popsán sumárním vzorcem: počet a druh atomů v molekule, molekulovou hmotností. Můžeme se setkat i s popisem fyzikálních vlastností jako např.: hustota, bod tání, bod varu, rozpustnost, atd. (Keith et al., 1997).

1.2. Rozdělení endokrinních disruptorů

Endokrinní disruptory jsou látky vykazující estrogenní, antiestrogenní, androgenní a antiandrogenní aktivitu.

Rozdělení těchto látek je variabilní. Existuje mnoho seznamů těchto chemických látek. Některé endokrinní disruptory se objevují skoro v každém seznamu, ale jiné, jejichž účinek nebyl ještě úplně objasněn v seznamech prozatím chybí. Jejich počet se postupně zvyšuje a to zejména díky množství nových látek, které se v přírodě objevují, dále díky počtu testovacích metod a zvyšujícímu se počtu laboratoří ve světě, které se testováním a výzkumem ED zabývají.

Látky s estrogenní a antiestrogenní aktivitou obecně dělíme podle jejich původu do dvou skupin – xenoestrogeny a fytoestrogeny.

1.2.1. Xenoestrogeny

Xenoestrogeny jsou kontaminanty, které vznikají lidskou činností a vstupují do těla z vnějšího prostředí. Mohou napodobovat nebo reagovat s činností endogenních estrogenních hormonů (vom Saal et al., 1998; EPA, 1999). Tyto chemikálie jsou vytvořené člověkem. Vstupují do organismu různými cestami – pozřením, adsorpcí, atd. Mohou mít estrogenní aktivitu. Chemická struktura xenoestrogenů nemusí být podobná steroidním hormonům, a proto je jejich estrogenní aktivita často neočekávaná (Sonnenschein et al., 1995).

Xenoestrogeny se podle chemické struktury dělí na:

- 1) perzistentní organochloridy
- 2) alkylfenoly
- 3) bisfenol A
- 4) ftaláty
- 5) těžké kovy, atd.

1. Mezi perzistentní organochloridy se řadí polychlorované bifenyly, dioxiny a furany, DDT atd. Jejich stupeň rozkladu v organismu je velice nízký a pomalý.

A) Polychlorované bifenyly (PCB) začaly být používány v roce 1929. Jsou používána jak v průmyslu tak v domácnostech. Běžně se používají v kosmetice, elektrických transformátorech, lakýrnictví, jako pesticidy atd. Dnes existuje přes 100 různých PCB. Jsou vysoce toxické a vytrvalé v životním prostředí. PCB způsobují zpomalení růstu plodu (Yamashita and Hayashi, 1985), nádory prsu (Demers et al., 2002), ovlivňují parametry spermatu u mužů (Hauser et al., 2003; Guo et al., 2004).

B) Dioxiny a furany tvoří velkou skupinu chemikálií. Vznikají jako vedlejší produkty reakcí. Dochází k jejich uvolňování např. při požárech lesů, ze spaloven odpadů, papíren atd. Tyto chemikálie vytváří po reakci s primárním donorem chloru (PVC, plasty, pesticidy atd.) polychlorované dioxiny a furany. U lidí způsobují hormonální dysfunkce (Pluim et al., 1993)

C) DDT (dichlordifenyltrichlormethylmethan) byl široce používán v Severní Americe až do jeho zakázání v roce 1972. DDT narušuje lidské spermatogenní buňky (Chowdhury, 1987), snižuje motilitu spermií v nadvarlatech a jejich počet, produkci testosteronu a hmotnost varlat (ben Rhouma et al., 2001).

2. Alkylfenoly a jejich deriváty se používají jako průmyslové a domácí detergenty, herbicidy a pesticidy, barviva atd. (White et al., 1994). Jejich celosvětová produkce v roce 1998 překročila 300000 tun. Jsou uvolňovány kanalizačním systémem do vodního systému, kde jsou velice stabilní. V organismu se ukládají hlavně do tukových tkání a organismus se jich špatně zbavuje. Pentafenoly až nonylfenoly mají estrogení aktivitu (Routledge and Sumpter, 1997). p-nonylfenol ovlivňuje stav akrosomu myších spermií (snižuje procento pozitivně

značených akrosomů detekovaných pomocí intraakrosomálních monoklonálních protilátek) a v druhé generaci myši snižuje i počet narozených mláďat (Kyselová et al., 2003).

3. **Bisfenol A** (4,4'- isopropylidenbifenol). Bisfenol A je intermediátem při výrobě polymerů, pryskyřic, polykarbonátů, antioxidantů, barviv. Je také používán k výplni zubů. Primárním zdrojem výskytu bisfenolu A jsou emise při výrobě epoxidových pryskyřic, polykarbonátů a polysulfonových pryskyřic. Bisfenol A ovlivňuje reprodukci, reprodukční parametry a kvalitu spermií u myši (Peknicova et al., 2002).

4. **Ftaláty** dodávají plastům flexibilitu. Používají se v průmyslu plastů, jako přísady do barev, lepidel a inkoustů. Za endokrinní disruptory se považují např. butylbenzylftalát, diethylhexylftalát atd. U potkanů mohou způsobit nesestoupení varlat, hypospadii (Nakahara et al., 2003). Dále se mezi ftaláty řadí **MEHP (mono-2-ethylhexyl ftalát)** - aktivní forma obecně rozšířených ftalátů.

5. **Těžké kovy** – olovo, **rtuť**, kadmium. Olovo se používá v olověných bateriích, olovnatém benzínu, atd. Rtuť se používá v nikl-kadmiových bateriích, zubních amalgámech, v mnoha se zemích se používá k výrobě chloru, atd. Způsobila snížení koncentrací spermií, jejich morfologie a motility u mužů v Hong Kongu, kteří měli v krvi zvýšenou hladinu rtuti (Leung et al., 2001). Těžké kovy ohrožují ženský organismus v těhotenství a vyvíjející se plod (Semczuk and Semczuk-Sikora, 2001).

1.2.2. Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou sloučeniny odvozené z rostlin. Odlišují se od ostatních látek tím, že jsou přirozeného původu. Jsou to nesteroidní látky. Tvoří rozdílné skupiny sloučenin s ohledem na jejich biologickou a chemickou aktivitu. Stávají se tělu nebezpečnými až po jejich konzumaci. Jejich existence byla poprvé prokázána v souvislosti s neplodností ovcí pasených na určitých pastvinách. Ovce konzumovaly jetel (*Triforium pretense*), který obsahoval velkou dávku genisteinu (isoflavonoid) a způsobil abnormality v reprodukci. Studie však ukazují, že strava bohatá na fytoestrogeny může být i zdraví prospěšná. V zemích kde je vysoká spotřeba soji (jako Japonsko) je riziko nádorů souvisejících s estrogenem, tj. prsu a prostaty, nízká (Messina, 1999). Strava bohatá na fytoestrogeny může být prevencí pro onemocnění (související s estrogenem), jako jsou kardiovaskulární nemoci, menopauzální symptomy,

postmenopauzální osteoporóza atd. (Barnas and Peterson, 1995, Strauss et al., 1998, Goodman-Gruen and Kritz-Silverstein, 2003).

Fytoestrogeny se podle své chemické struktury dělí do pěti skupin:

- 1) isoflavonoidy
- 2) flavonoidy
- 3) koumesanty
- 4) lignany
- 5) zearalenone

1. **Isoflavonoidy** (daidzen, genistein) se nacházejí hlavně v sojových bobech, a tím i ve všech výrobcích ze soji (Fukutake et al., 1996, Messina, 1999). Byly publikované rozdílné výsledky, které mohou souviset s použitým modelem a dávkou látky. Negativní vliv na reprodukci samců např. potlačení reakce epididymálních spermií u potkanů genisteinem (GEN) byly popsány v práci Kumi-Diaka and Townsenda (2003). V práci na myších nebyl popsán negativní vliv na reprodukci *in vivo*. GEN neměl vliv na počet narozených mláďat ani na oplození samic. U samců nebyly zaznamenány změny v koncentraci testosteronu ani v počtu spermií (Kyselova et al., 2004). U žen byly prokázány pozitivní výsledky v období menopausy.

2. **Flavonoidy** (lutelin, apigenin) vyskytjí se častěji než isoflavonoidy. Nachází se např. v zelenině, ovoci, zeleném čaji, bylinách atd. Extrakt bohatý na flavonoidy vedl u potkanů ke snížení počtu epididymálních spermií a ke zpomalení jejich motility (Das et al., 2004).

3. **Koumesanty** - jsou zdrojem koumestrolu. Jediným významným zástupcem z této skupiny jsou výhonky vojtěšky a různé boby.

4. **Lignany** – jejich prekursory jsou rostlinného původu a modifikují se střevní mikroflórou savců na lignany. Prekursori se nacházejí v potravinách bohatých na vlákninu jako jsou žito, semena lnu atd. (Strauss et al., 1998)

5. **Zearalenone (ZEN)** - fytoestrogen, patří mezi mykotoxiny. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky, které produkuje většina druhů hub. Jsou jejich sekundárními metabolity.

1.2.3. Anti-estrogeny

Anti-estrogeny jsou sloučeniny, které soutěží s estrogeny o jejich receptory. Podle mechanismu působení se antiestrogeny dělí do dvou skupin. Typ I – agonisté/antagonisté a typ II – čistí antagonisté.

Anti-estrogeny typu I jsou většinou analogy tamoxifenu a nebo jeho metabolity. Další antiestrogeny jsou např.: toremifen, idoxifen, droloxifen, raloxifen atd. V roce 1985 byl tamoxifen schválen pro používání jako pomocné látky při chemoterapii postmenopauzálních pacientek s pozitivními lymfatickými uzlinami. Od roku 1989 se používá k léčbě pre- i postmenopauzálních pacientek s pokročilým karcinomem prsu, jejichž nádorová tkáň exprimuje estrogení receptor a jejichž lymfatické uzliny jsou zvětšené (MacGregor and Jordan, 1998). U mužů s oligozoospermii, kteří byli léčeni tamoxifenem, došlo ke zvýšení počtu spermií a poklesl počet mrtvých spermií (Kotoulas et al., 1994). Tamoxifen má však i negativní vliv, např. na motilitu spermií, a to jak u lidí, tak i u jiných savců, např. potkanů (Sethi-Saberwal et al., 2003).

Anti-estrogeny typu II jsou nesteroidní sloučeniny. Vždy inhibují účinek estrogenů. ICI 162 782 (Faslodex) je jediným čistým antiestrogenem, který byl klinicky testován. Je silným antagonistou, jež inhibuje nádory prsu stimulované tamoxifenem (Gottardis et al., 1989, Wakeling et al., 1991).

1.2.4. Androgeny

Androgeny a jejich deriváty jsou často považovány za možná kontraceptiva pro muže. Byl popsán vliv testosteron propionátu k potlačení spermatogeneze. Tyto a další studie dokázaly, že testosteron je schopen reversibilně indukovat azoospermii při použití krátce účinného esteru testosteron propionátu (Reddy and Rao, 1972). Jiné studie popisují podávání testosteronu enanthátu v kombinaci s progestiny, které vedou k zvýšení jeho účinnosti

(Anderson and Baird, 2002). Další deriváty testosteronu jako např: testosteron undekonát se dají použít jako hormonální antikoncepce (Anderson and Baier, 2002, Gu et al., 2004).

1.2.5. Antiandrogeny

Antiandrogeny se nacházejí v našem životním prostředí. Často se vážou na receptorová místa androgenů a vznikají tak odlišné konformace v porovnání s konformacemi po navázání přirozeného ligandu (Kelce et al., 1995; Wong et al., 1995).

Pokud jsou antiandrogeny podávány během diferenciacce gonád při embryonálním vývoji mají negativní vliv na reprodukci u samců. Toto poškození bývá nevratné (Elzeinová et al., 2008) Puberta je dalším citlivým obdobím pro vývoj samčích reprodukčních orgánů. Setkáváme se také s ovlivněnými reprodukčními parametry po podávání antiandrogenů myším samcům v období puberty (Elzeinova et al., 2008).

Mezi nejznámější a účinné androgeny řadíme: linuron, flutamid a vinklozolin (Kelce and Wilson, 1997, Miyata et al., 2003, Elzeinova et al., 2008).

Linuron je herbicid ureového typu. Je antagonistou androgenního receptoru *in vivo* i *in vitro*. Po jeho podávání těhotným potkaním samicím, jejich mláďata vykazovala zmenšenou anogenitální vzdálenost, poškození nadvarlat a chámovodu (Gray et al., 1999).

Flutamid je nesteroidním antagonistou androgenního receptoru. Může i při podávání v dospělosti u potkanů způsobit poškození exprese mnoha genů i hormonů, které jsou spojeny s produkcí spermií schopné oplození (Ohsako et al., 2003, Zhang et al., 2003). Dále může také způsobit zmenšení anogenitální vzdálenosti, váhy nadvarlat a délky penisu (Casto et al., 2003).

Vinklozolin je dikarboximidový fungicid, antiandrogen, který blokuje funkci receptoru a nedovoluje testosteronu aby byl produkován na normální úrovni vývoje u samců.

1.3. Působení endokrinních disruptorů

1.3.1. Mechanismus endokrinní disrupce

Endokrinní disrutory mohou působit nepříznivě mnoha způsoby na endokrinní systém. Zpravidla jsou endokrinní disruptory přírodní produkty nebo syntetizované chemikálie, které napodobují, posilují nebo brzdí působení hormonů. Existuje mnoho domněnek o mechanismu působení těchto látek v těle.

Zde jsou některé, které působí hlavně na disrupci pohlavních hormonů.

1) Vazba a aktivace receptoru, falešné hormony

Tento proces se děje hlavně při napodobování hormonů. Látka podobná těmto hormonům interaguje přímo s receptorem pro daný hormon, dochází k nadbytečné odpovědi a abnormálním buněčným funkcím. Jde o velice složitý způsob účinku, který navíc způsobuje skutečnost, že existují různé varianty přirozených receptorů v mnoha tkáních.

2) Inhibice interakce hormon/receptor

Látka může pozměnit vazbu hormonu s jeho receptorem. Tím ovlivní normální buněčné funkce spojené s tímto hormonem.

3) Vazba na jiné receptory

Endokrinní systém zahrnuje mnoho dalších receptorů. Na ty se mohou vázat látky s různou afinitou . Tato vazba může buď aktivovat nebo inaktivovat receptor.

4) Modifikace metabolismu přirozených hormonů

Některé látky mohou působit na metabolické cesty estradiolu produkujícího víc estrogeních metabolitů. Jiné látky aktivují enzymy, které pak urychlují metabolismus hormonů a narušují tím jejich přirozený stav. Např. varlata obsahují specifické enzymy, které metabolizují estrogeny. Tyto enzymy pak rychle pozmění estrogen do formy, ve které se nemůže delší dobu vázat na svůj receptor. Když je tento enzym ovlivněn xenoestrogenem, jeho

metabolismus bude redukován a poroste vystavení testes neúměrnému množství estrogenů. Toto je důležité hlavně během fetálního vývoje, kdy jsou hladiny estrogenů vysoké.

5) Modifikace počtu receptorů pro hormony

V buňkách existuje mechanismus, který kontroluje počet hormonálních receptorů. Chemikálie mohou zvýšit nebo snížit počet těchto receptorů a působit tak na změnu odpovědi přirozených nebo umělých hormonů.

6) Modifikace produkce přirozených hormonů

Chemické látky mohou působit na přirozené hormony zásahem do signálních drah jiných systémů, např. hormonálních systémů jiného typu (thyroidálního), nebo imunitního a nervového systému.

7) Abnormality a chyby u přirozených hormonů

Chemické látky mohou poškodit produkci hormonů, obzvláště ty, které regulují metabolismus steroidů a způsobují pak hormonální abnormality, vady nebo nedostatky.

Činnost endokrinních disruptorů je různorodá, jejich chování je často nepředvídatelné a obsahují mnoho možných faktorů, které je ovlivňují. Např.: některé identické chemické látky mohou působit různým způsobem na odlišné orgány, stejné chemické látky mohou mít odlišný efekt v různých stupních vývoje, tyto látky mohou být ovlivněny individualitou každého organismu, jeho věkem, výživou, stejné chemické látky mohou reagovat odlišně u různých druhů organismů, variace účinku za přítomnosti jiných chemických látek atd.

Tyto disruptory neovlivňují pouze endokrinní systém, ale také systémy vyššího řádu, jako jsou nervový a imunitní systém (www.ffcr.or.jp).

1.3.2. Cesty expozice endokrinních disruptorů

Mechanismus působení a hlavně cesty působení endokrinních disruptorů jsou často velmi komplikované. Je velice důležité si objasnit jak se lidé i ostatní organismy vystavují působení těchto chemických látek a to za účelem zhodnocení jejich potenciálního účinku a následnému vyvarování se nebo omezení jejich účinku.

Zde jsou některé možné cesty expozice: vzduchem – dýchací cesty (atmosféra, vzduch v domácnostech), potravou – orální cesty, kůží – subkutánní cesty atd.

Každá chemikálie má většinou mnohonásobné cesty působení. Cesty expozice těmito látkami jsou různé. Ftaláty a estery, které se používají pro výrobu plastů, se šíří jak vzduchem, tak vodou i přímým kontaktem. Dioxiny působí hlavně ve vodě a v půdě. Je důležité prozkoumat cesty působení endokrinních disruptorů, jejich vliv na zdraví a reprodukci živých organismů a případně ovlivnit i legislativu pro jejich omezení

1.4. Struktura a vliv vybraných endokrinních disruptorů na savce *in vivo*

Toxikant (jedovatá látka) vyskytující se v prostředí jsou zejména představovány chemikáliemi vyrobenými člověkem. Tyto látky mohou ovlivňovat metabolismus organismů nebo jejich metabolity mohou přetrvávat v prostředí a hromadit se v potravním řetězci. Některé z těchto přetrvávajících chemikálií jsou přenášeny na dlouhé vzdálenosti (vzduchem, vodou) a mohou pak působit na ryby, divoká zvířata i člověka. Proto budou následně diskutovány vztahy mezi strukturou, jejich způsobu vlivu a jejich možné roli v nepříznivých procesech při vývoji a reprodukci u živočichů (Younglai et al., 2007).

Mezi tyto látky patří i následující vybrané EDs.

- **vinklozolin = antiandrogenní fungicid**
- **zearalenone = fytoestrogen**
- **bisfenol A = monomer plastů a polykarbonátů**
- **rtuť = xenoestrogen, těžký kov**

1.4.1. Vinklozolin

Identifikační informace:

CAS číslo: 50471-44-8

SYNONYMA: Ronilan, 3-(3,5-dichlorfenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidineodine

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Sumární vzorec: C₁₂H₉NO₃Cl₂

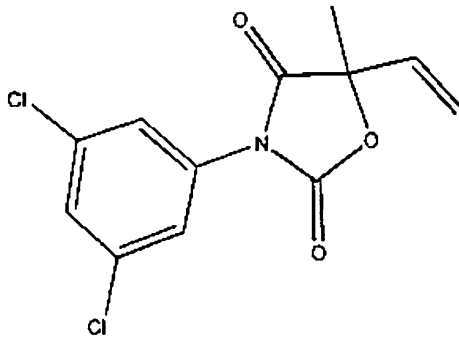
Molekulová hmotnost: 286,11 (<http://chemfinder.camsoft.com>)

Bod tání: 108°C (<http://chemfinder.camsoft.com>)

Bod varu: 131°C (<http://chemfinder.camsoft.com>)

Riskantní (chronické) vlastnosti: nevykazuje žádné podstatné akutní nebo chronické riziko (Keith et al., 1997)

Obr. č. 1: Chemická struktura vinklozolinu (Keith et al., 1997).



Vinklozolin, 3-(3,5 dichlorfenyl)-5-methyl- 5-vinyloxazolidin-2,4-dione (VIN) je fungicid používaný na ovoci, zelenině a okrasných rostlinách. (EPA, 1998). Vinklozolin je endokrinní disruptor, který se chová jako antiandrogen a poškozuje vývoj samčího reprodukčního systému u potkanů během období sexuální diference. Antiandrogenní účinky vinkozolinu byly nalezeny u mnoha savců jako králík, myš a pes. Vinklozolin je dikarboximidový fungicid, jehož metabolity M1 a M2 mají antiandrogenní aktivitu. Samostatný VIN není příliš stálý, ale jeho metabolity M1 (3-[[[3,5-dichlorophenyl]-carbamoyle]oxy]-2-methyl-3-butenic acid) a M2 (3'5'-dichloro-2-hydroxy-2-methylbut-3-enanilide) mají životnost více jak 180 dní a jsou mobilní ve vodné fázi (Kelce et al., 1994; Wong et al., 1995; Kelce and Wilson, 1997). VIN je degradován do prostředí nebo metabolizován v organismech do mnoha metabolitů (např. již zmíněné M1 a M2 metabolity), které tlumí (brzdí) androgenní receptory *in vitro*.

In vivo vinklozolin inhibuje AR (androgen receptor), závislé geny a způsobuje anatomické defekty jako zmenšení anogenitální vzdálenosti, snížení váhy varlat, semenných váčků, snížení počtu spermií, atd. (Gray et al., 1994)

VIN je považován za silný ED, který je uvedený v EPA a ve World Wildlife Foundation jako možná endokrinní modifikující chemikálie. Je také přirovnáván k androgennímu receptoru, který okupuje, či blokuje funkci receptoru a nedovoluje testosteronu, aby byl produkován na normální úrovni vývoje u samců. Výsledkem je, že samci se mohou stát hermafrodity (obojetný stav; organismus nemůže fungovat v obojetném pohlaví). V laboratoři ve Spojených státech amerických samice potkanů vystavované působení vinklozolinu porodily samečky se samičími vlastnostmi (Keith et al., 1997).

VIN způsobuje u potkanů zmenšení anogenitální vzdálenosti, hypospadii, nesestouplá varlata a zmenšení popř. i vymizení přídatných žláz (Hellwig et al., 2000; Gray et al., 2001). Jeho antiandrogenní vlastnosti mohou být jednou z příčin lidského syndromu dysgenese varlat (TDS = testicular dysgenesis syndrom).

Životní prostředí, které je znečištěno endokrinními disruptory jako je vinklozolin může mít epigenetický dopad na zárodečnou linii a podpořit rozvoj chorob i u následujících generací. V přirozené populaci se obě pohlaví mohou setkat s individualitami ovlivněnými těmito látkami během období vývoje. Zkoumal se způsob působení fungicidu vinklozolinu u potomků samců a samic potkanů. Tento účinek byl pohlavně specifický a ukázalo se, že tři generace samic preferovaly samce, kteří nebyli v minulosti vystaveni vinklozolinu. Tato pozorování naznačila, že následky po endokrinních disruptorech nejsou pouze transgenerační, ale i transpopulační (Crews et al., 2007). Dalším objektem pozorování bylo působení endokrinního disruptoru vinklozolinu během embryonálního vývoje gonád. Došlo ke změnám v samčí zárodečné linii a k rozvoji transgeneračních chorob u dospělých jedinců. Tyto choroby zahrnují nemoce prostaty, abnormality u varlat, nemoce ledvin a vývoj tumorů. Tyto epigenetické transgenerační nemoci poskytují unikátní pohled, ze kterého můžeme vyčíst počátky dědičných chorob u dospělých jako je rakovina (Skinner and Anway, 2007).

Po působení VIN na embrya se ukázalo, že způsobuje choroby u první (F1) generace. U dospělých zvířat z F1 generace a u všech následujících zkoumaných generací (F1-F4) se rozvinuly choroby nebo alespoň tkáňové nepravidelnosti. Patří mezi ně choroby prostaty, ledvin, abnormality u varlat, u imunitního systému, rozvoj nádorů. Vedle toho se rozvinuly u mnoha experimentálních zvířat krevní abnormality jako např. hypercholesteremie. Pozorování

ukázala, že na podkladě výzkumu endokrinních disruptorů, které způsobují transgenerační nemoci nebo abnormality byly objeveny molekulární podstaty těchto chorob (Anway et al., 2006).

Byl také studován vliv vinklozolinu na expresi vybraných genů varlat a proteinů spermií. Vinklozolinem byly indukovány poškození reprodukčních parametrů během puberty u CD1 myši. Jako markery genové exprese ve varlatech byla použita skupina genů vztahujících se k akrosomu (preproacrosin, protein dinasu A ukotvující protein 110), androgennímu receptoru (androgenní receptor, heat shock protein 70-2, APG-1, FK506 vazebný protein 5, gonadotropinem-regulovaná RNA helikasa varlat), ubiquitin (ubiquitin aktivující enzym E1, ubiquitin konjugující enzym E2, ubiquitin lipasa E3) a apoptose (p53, p21). Stav spermií z cauda epididymis byl hodnocen pomocí monoklonálních protilátek proti intra akrosomálním proteinům, heat shock proteinu 70 a ubiquitin. K detekci apoptosy byl použit TUNEL a annexin V. Vinklozolin působil velmi intenzivně na změnu v expresi vybraných genů. Dále došlo ke snížení značení intra akrosomálních proteinů. Po působení tohoto antiandrogenu došlo k poškození akrosomu hlavně na úrovni proteinů, kdežto protein dinasa A ukotvující protein 110 byl spíše ovlivněn na úrovni exprese mRNA. Vinklozolin tedy způsobuje dramatické změny exprese genů i proteinů, když je podáván během pohlavní diferenciaci a hlavně v období puberty (Elzeinová et al., 2008).

Jak již bylo mnohými experimenty prokázáno, fungicid vinklozolin narušuje hormonální aktivitu u potkanů a myši. Měl by prokázat nepříznivé účinky i u jiných zvířat. V jednom experimentu byl vinklozolin testován na populaci hrabošů (*Microtus canicaudus*). Pokus byl prováděn během období dešťů. Zmenšily se velikosti varlat a semenných váčků, pokleslo množství testosteronu a snížil se poměr březích (těhotných) samic s porovnáním s kontrolními zvířaty. V pokusu provedeného za období sucha nebyly nalezeny žádné rozdíly u reprodukčních orgánů. Výsledky naznačují, že působení těchto chemikálií je vyšší, když jsou smyty z atmosféry na zem. Tím se zvyšuje příjem toxických metabolitů rostlinami s následnou kontaminací divokých zvířat i v divočině, která se tak jen zdánlivě jeví jako příroda neovlivněna člověkem (Caslin and Wolff, 1999).

Vinklozolin rovněž u domácích zvířat, např. psů, způsobil viditelné změny ve váze u samic i samců (u ledvin došlo k poklesu v jejich váze a ke zvýšení koncentrace tukových kapének v distálních tubulech) (Keith et al., 1997).

1.4.2. Zearalenone

Identifikační informace:

CAS číslo: 17924-92-4

SYNONYMA: 3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-methyl-1H-2-

benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)-dione nebo 6-(10-hydroxy-6-oxo-*trans*-1-un-decenyl)- β -resorcylic-acid-lactone

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Sumární vzorec: C₁₈H₂₂O₅

Molekulová hmotnost: 318.36

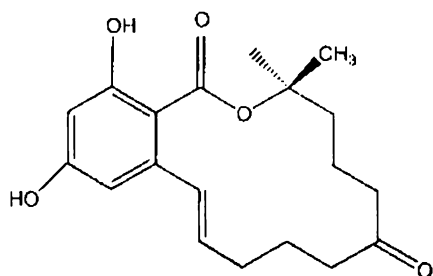
Bod tání: 164-165°C

Stálost: je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v ethylenacetátu, acetonitrilu, alkoholech, diethyletheru, benzenu, chloroform atd.

Popis látky: bílá krystalická látka

(Betina, 1989, Budavari, 1989)

Obr. č. 2: Chemická struktura ZEN (Budavari, 1989).



Zearalenone (ZEN) patří mezi mykotoxiny. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky, které produkuje většina druhů hub. Jsou jejich sekundárními metabolity. Tyto sekundární metabolity hrají důležitou roli v ekonomice, používají se buď jako antibiotika nebo jako škodlivé

mykotoxiny. Z 350 různých druhů hub se syntetizovalo přes 300 mykotoxinů (Cole and Cox, 1981). Mezi nejdůležitější producenty těchto mykotoxinů patří *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Betina, 1989).

ZEN byl izolován v roce 1962 Stobem a odvodil jeho jméno z houby *Giberella zae* z jehož mycelia, který kontaminuje kukuřici (*Zea mays*), byl izolován. Jeho struktura byla poprvé objevena v roce 1966. Zen byl dále izolován z kmenů mnoha druhů hub patřících do rodu *Fusarium* jako např.: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cereale*, *F. nival* atd. (Betina, 1989; Logrieco et al., 2002). Rod *Fusarium* je popsán produkcí makrokonídií a tento rod produkuje rychle rostoucí kolonie s jasně zbarveným myceliem. Tyto houby jsou široce rozšířeny v půdě a jsou schopny rozkládat celulosu v rostlinách, což vede k onemocnění rostlin

hlavičkovou plísní (FHB = *Fusarium head blight*) na kukuřici (Bottalico and Perrone, 2002, Logrieco et al., 2002). *Fusarium* kolonizuje obiloviny (nejčastěji během kvetoucí fáze), ale může pokračovat ve své toxické aktivitě i během skladování. Vše je ovlivněno dalšími faktory jako např.: vlhkost semen, teplota a vlhkost vzduchu.

ZEN patří mezi nejvíce rozšířené mykotoxiny v zemědělství. Průzkumy na výskyt ZENU jsou pravidelně publikovány.

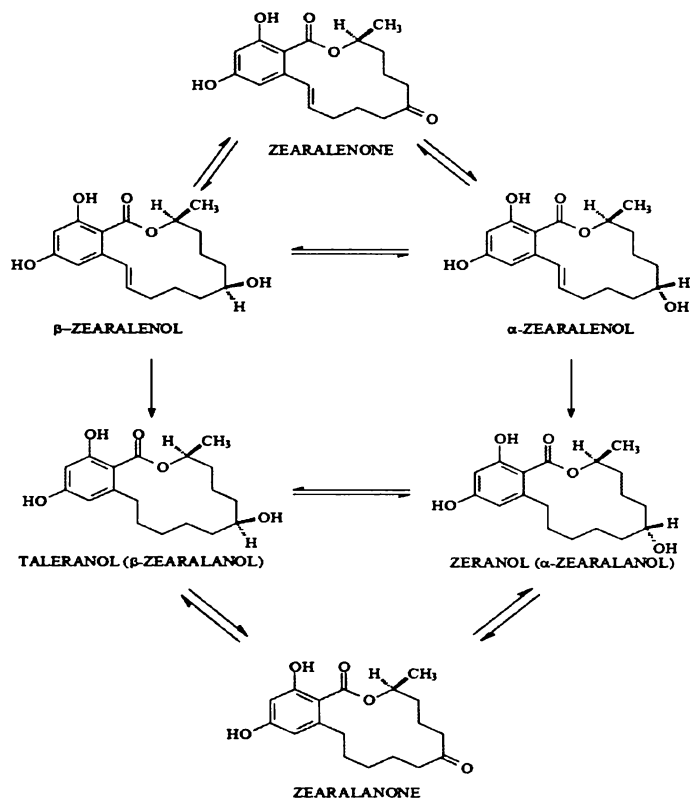
ZEN je velice stabilní látka, která nepodléhá změnám při vysokých teplotách. V alkalických podmínkách může být ZEN laktonový kruh hydrolyzován a schopností esterového kruhu se štěpit, vede ke ztrátě ZENU (Krska and Josephs, 2001; Schuhmacher et al., 1998). ZEN je velice nestálý v hydroxidu sodném. Během zpracování obilí, nerozpustnost ZENU ve vodě hraje důležitou roli v redistribuci tohoto mykotoxinu v různých frakcích jako v lepku (49-56%), vláknech (15-19%), v zárodcích (9-11%). Žádný nebyl nalezen ve škrobu (Bennet et al., 1978, Laure and Ringrose, 1997).

ZEN je rychle absorbován orálním podáním. U myši a potkanů je ZEN vylučován žlučovou tubicí, ale u králíků, prasat a lidí je vylučován močovými cestami. V *in vivo* metabolismu může být ZEN transformován na α -ZOL a β -ZOL a oba mohou podstoupit redukci na zeranol (ZAL) a taleranol (TAL). *In vivo* ZEN a jeho metabolity jsou konjugovány s kyselinou glukoronovou (Kuiper-Goodman, 1987). Koncentrace každého metabolitu je závislá na druhu zvířete, ve kterém se vyskytuje, např. u prasat je metabolizován převážně na α -ZOL. U přežvýkavců je metabolizován převážně na β -ZOL (Jodlbauer et al., 2000) nebo rovnoměrně na α -ZOL a β -ZOL (Kennedy et al., 1998). U člověka po požití potravin kontaminovaných ZENem byly tyto mykotoxiny nalezeny v moči jako glukuronové konjugáty ZENU a α -ZOLu (Kuiper-Goodman, 1987).

Zearalenone byl vyhodnocen „International Agency for Research on Cancer (IARC)“ v roce 1993 a zařazen do skupiny látek, které nejsou klasifikovány jako látky člověku karcinogenní (IARC 1993, IARC 1999). Nicméně denní maximální toleranční dávka je 0,5 μ g/kg tělesné váhy. Má nízkou akutní toxicitu u myši a potkanů po orálním podání - jedna dávka 20000mg/kg nezpůsobuje u těchto druhů smrt. Po dlouhodobějších výzkumech na experimentálních i domácích zvířatech se ukázalo, že ZEN je závislý na interakci s estrogením receptorem. Prasata jsou na tuto látku nejcitlivějším druhem. Jiné studie prováděné na myších (krmeny 0,5 nebo 100 mg/kg ZENU) neprokázaly žádné změny na tělesné váze (NTP, 1982).

ZEN byl testován mnohými genotoxickými testy. Nevypovídal žádné mutace v mitotickém crossoveru, byl také negativní ve zkoušce mutací eukaryotických buněk *Saccharomyces cerevisiae* (Wang and Groopman, 1999), ačkoliv ukázal pozitivní škodlivý účinek DNA v rekombinačním testu u *Bacillus subtilis* (Ueno and Kubota, 1976), chromosomovou aberaci u křečka a slabé negativní účinky na lidských lymfocytech.

Obr. č. 3: Cesta metabolismu zearalenonu (Kuiper-Godmann, 1987).



Nejdůležitější toxický účinek ZENU je jeho estrogenní účinek, proto je řazen mezi endokrinní disruptory. Chemická struktura ZENU a jeho podobných derivátů 17 β -estradiolu (E2), jim umožňuje kompetitivně se vázat na estrogenní receptor (ER). Např. afinita ZENU k děložnímu ER a ER vejcovodu je různá u různých zvířat a je v sestupném pořadí: prase, potkan, kur (Coulombe, 1993). Podle zkoušky proliferace provedené u MCF7 linie lidských nádorových buněk rakoviny prsu byla relativní estrogenita (po

srovnání s E2) nalezena u: α -ZOL=92%, ZAL=18%, TAL=3,5%, ZON=1% a β -ZOL=0,44% (Shier et al., 2001). Vyhodnocení estrogenní účinnosti na *in vivo* modelu ryby přineslo výsledky okolo 50% v klesajícím pořadí α -ZOL>ZON> β -ZOL (Arukwe et al., 1999).

ZEN *in vivo* způsobuje u laboratorních zvířat (myš, potkan, křeček) změny v reprodukčním traktu, sníženou fertilitu, zvýšení embryo-letální reabsorbce, změny ve váze nadledvinek, štítné žlázy a příštítných tělísek, variace u hormonů (estradiol a progesteron) (Williams et al., 1989). Nejcitlivějšími zvířaty na ZEN jsou svině. Nejevidentnějšími symptomy působení ZENU jsou vidět, když jsou krmeny stravou kontaminovanou ZENem o dávce 1mg/kg, ale mohou se objevit i při mnohem nižších koncentracích především u samic v období puberty. Typickými symptomy ZENU jsou zarudnutí a otoky lůna, otoky prsních žláz a mnoho vesikulárních a cystických folikulů na ováriích...atd. Ačkoliv při malých dávkách nebyly patrné žádné vnější změny, pitva potvrdila vesikulární folikuly na ováriích. Vysoká citlivost

k ZENu byla prokázána u samic, ale ne u samců. Přežvýkavci jsou více odolní k ZENu než prasata (Diekman and Green, 1992). Podobných výsledků bylo dosaženo podáním ZENu (od 31,25 mg/den až po 500 mg/den) dojnicím, kde jediným účinkem ZENu bylo zmenšení žlutého tělíska (Weaver et al., 1986). Ve studii ZENu na neplodnost a poklesy ve výnosu mléka (Bloomquist et al., 1982) bylo dosaženo závěru, že tyto efekty nejsou způsobeny pouze ZENem, ale i ostatními mykotoxiny v krmivu, a proto je nutné v experimentech pokračovat.

V současnosti se vyskytuje jen několik studií pojednávajících o estrogenní aktivitě ZENu na člověka. Vzniklo podezření, že ZEN způsobil epidemii předčasných pubertálních změn u malých dětí v Puerto Ricu (Saenz de Roriguez, 1984) a zvýšení výskytu předčasných telarche (= počátek vývoje ženského prsu v pubertě) v jihovýchodním Maďarsku (Szuetz et al., 1997). S rostoucími informacemi o nežádoucích účincích mykotoxinů rostou i regulační omezení těchto látek. V letech 1987-1997 došlo k uplatnění těchto limitů u 35% států. Ve většině evropských zemí je stanoven limit pouze pro mykotoxiny alfatoxin a ochratoxin a jen málo zemí má „nulovou toleranci“ těchto látek. Jelikož mykotoxiny jsou přírodními toxikanty, je těžké vyvarovat se jich v krmivu a potravě (FAO, 1997).

V práci na myších byl u samic zpozorován výskyt jaterních nádorů (Pohl-Leszkowicz et al., 1995). ZEN a jeho metabolity způsobily poškození DNA v rekombinačních testech s *Bacillus subtilis*. Zen byl negativní ve zkoušce mutace eukaryotických buněk s *Saccharomyces cerevisiae* i se *Salmonella typhimurium*. Některé DNA adukty byly nalezeny u samic v ledvinách a játrech po podání ZENu (dávka 2 mg/kg). Po 10denní studii byl celkový počet DNA aduktů v těchto orgánech $17+(-)5$ aduktů / 10^9 nukleotidů. Tyto výsledky potvrzují genotoxicitu ZENu a jeho schopnost vyvolat nádory na játrech, spíše než nádory pohlavních orgánů, u myší.

Ve studii na potkanech (Kiang et al., 1978) byl popsán pozitivní účinek ZENu a jeho derivátů na cytosol a jaderné receptory v děloze. ZEN soutěžil s estradiolem o jeho místo uchycení na receptorech cytosolu, způsobil translokaci receptorů cytosolu do jádra a zvýšil počet jaderných receptorů.

1.4.3. Bisfenol A

Identifikační informace:

CAS číslo: 80-05-7

SYNONYMA: 4,4'-isopropylidendifenol, bis(4-hydroxyfenyl)methylmethan, bis(4-hydroxyfenyl)propan, bisfenol, 4,4'-bisfenol A, dian, 4,4'-dihydroxydifenyldimethylmethan atd.

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Sumární vzorec: $C_{15}H_{16}O_2$

Molekulová hmotnost: 228,29

Popis látky: bílé nebo snědčí (žlutohnědé) krystalky nebo vločky

Hustota: není dostupná (N/A)

Bod tání: 153-156°C (Lenga, 1987)

Bod varu: 220°C (Lenga, 1987)

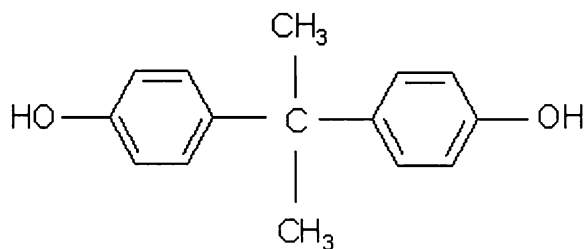
Risikantní (chronické) vlastnosti: bisfenol A (BPA) může být toxický přijímáním potravy, dýcháním nebo absorpcí kůží. Působí jako dráždivo a při zahřívání uvolňuje toxické výpary CO a CO₂.

Reaktivnost: je neslučitelný se silnými oxidanty, se silnými zásadami a kyselými chloridy a anhydridy (Lenga, 1985).

Stálost: je stálý za normálních laboratorních podmínek.

Symptomy působení: zahrnují dráždění očí, nosu, hrdla, kůže, sliznice a horních cest dýchacích. Může způsobit kýčání, přecitlivělou pokožku, zrudnutí pokožky a otoky.

Obr. č. 4: Chemická struktura BPA (Gregory et al., 2008).



BISPHENOL A

Bisfenol A je intermediátem při výrobě polymerů, pryskyřic, polykarbonátů, antioxidantů, barviv atd. Je také používán k výplni zubů (plomby). Primárním zdrojem výskytu BPA jsou emise při výrobě epoxidových pryskyřic, polykarbonátů a polysulfonových pryskyřic. Nejpravděpodobnější cesty výskytu

k této látce je inhalací a kožním kontaktem člověka při výrobě. Když je BPA vypouštěn do půdy, má malou mobilitu a při úniku do atmosféry se rozptýluje na malé částičky.

Bisfenol A je znám svými estrogenními účinky již od roku 1938. Je uveden v EPA a ve World Wildlife Foundation jako modifikující endokrinní chemikálie. Vyskytuje se při výrobě polykarbonátů. Polykarbonáty se objevují při konzervování, takže šťáva z konzervované zeleniny obsahující BPA může u člověka způsobit rakovinu prsou (Keith et al., 1997). Používá se jako nátěr (povlak) v kovových konzervách proto, aby se předešlo kontaktu mezi kovem a potravinářským obsahem. Dále se využívá jako umělá hmota v potravinářských obalech, pro výrobu regálů v lednicích, dětských láhví, vratných obalů od džusů, mléka atd. Má své využití také v elektrotechnice jako kompaktní disky, elektrické spotřebiče atd. (Gregory et al., 2008). Po podávání BPA potkanům byla u jejich jejich mlád'at (samci) nalezena zmenšená varlata a redukovaný počet spermií (Keith et al., 1997).

NTP (= National Technology Program) v roce 1982 se zabýval výzkumem BPA a publikoval práci nazvanou „Technical report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6CRF1 mice“. V této 103 týdenní studii použili skupiny 50 potkanů obojího pohlaví a krmili je stravou obsahující 0, 1000 nebo 2000 ppm BPA. U všech skupin potkanů, kde byla látka podávána po dobu 5 týdnů, se snížila jejich tělesná váha srovnáním s kontrolami. Tento účinek však nebyl zpozorován po 12 týdenním užívání. Redukovaná váha byla považována za škodlivý účinek BPA. Ve stejné studii (NTP) použili myši (samce) 50/skupinu a krmili je stravou obsahující 0, 1000 nebo 5000 ppm a dále myši (samice) 50/skupinu a podávali jim 0, 5000, 10000 ppm bisfenolu A. U samců (5000 ppm) a samic (5000 a 10000 ppm) se snížila jejich tělesná hmotnost. U 1000 a 5000 ppm u samců došlo ke snížení počtu mnohjaderných velkých hepatocytů. Tento účinek nebyl považován za škodlivý a je u myši popisován jako NOAEL (= No Observed Adverse Effect Level). Předpokládaný potravní faktor je u myši 0,13, což odpovídá dávce 130 mg/kg/den. Protože LOAEL (= Lowest Observed Adverse Effect Level) 50 mg/kg/den u potkanů je nižší než 130 mg/kg/den u myši, NOAEL u myši nemůže být považován jako základ pro RfD (= Reference dose for chronic oral exposure). LOAEL 50 mg/kg/den u potkanů, nejnižší dávka použitá i u ostatních druhů v chronických studiích, byla vybrána jako základ pro chronický ustní RfD.

Působení jedné látky nemusí být stejné u různých druhů živočichů, např. u myši byla dávka 1250 mg/kg/den asociována s fetotoxicitou (plodová) a mateřskou toxicitou, ale nezpůsobila žádný důležitý nárůst malformací (Keith et al., 1997), zatímco u potkanů dávka menší nebo

rovna 1280 mg/kg/den nebyla škodlivá a nezpůsobila žádné malformace u plodu (NTP, 1985a). Outbrední linie myši (CD1) je známa vysokým stupněm reprodukce, obvykle 12-13 mlád'at na samici (= průměrná velikost vrhu). Tato outbrední linie byla použita ke dvěma experimentům (AnLab Ltd., Praha). Prvním bylo zjistit účinek BPA na narozené potomky. Ve třech generacích CD1 myši byly porovnávány počty narozených mlád'at dvou experimentálních skupin (podávány dávky BPA 2 a 20 ppb) s kontrolními skupinami. U skupiny myši, kde byly podávány dávky 2 ppb BPA, došlo ke snížení počtu narozených mlád'at. U druhé skupiny myši (20 ppb BPA) nedošlo k úbytku mlád'at, naopak u třetí generace myši došlo k nárůstu (cca 15-16 mlád'at/samici). Dalším experimentem bylo zjištění účinku BPA na samčí reprodukční orgány. Váha varlat u experimentálních a kontrolních skupin byla srovnatelná. Na druhé straně histologické obrázky varlat (u skupin s 2 ppb BPA) ukázaly patologické změny, jako poškození semenných tubul ve varlatech, snížení spermatogeneze atd. Histologické obrázky experimentální skupiny (20 ppb BPA) a kontrolní skupiny byly srovnatelné. Výsledky u outbrední linie myši (CD1) po podávání dvou dávek BPA (2 a 20 ppb) byly paradoxní, nižší dávka měla vyšší vliv na *in vivo* reprodukci a stav spermií, než vyšší dávka (Peknicova et al., 2002). Tento možný efekt (t.j. vyšší odpověď na nízkou koncentrací než na vyšší) je znám z endokrinologie, v praxi ukazuje na zvýšené riziko působení ED látek s nízkou koncentrací.

V současnosti existuje méně zpráv o BPA v odpadních vodách než o chemických látkách jako estrogeny a alkylfenoly. Koncentrace BPA v povrchových vodách je nižší než v odpadních vodách. Koncentrace v odpadních vodách byla detekována v rozmezí < 0,001-1 µg/l. Po připočtení odpadních vod vypouštěných z továren, vzrostla jeho koncentrace na 8 µg/l. Předpokládá se však, že v povrchových vodách je BPA dobře biologicky rozkladatelný (Staples et al., 1998, Klecka et al., 2001).

Anaerobní biotransformace BPA nepřinesla žádné ztráty BPA při rozdílných podmínkách (např. za podpory methanu, redukcí síranem, redukcí Fe³⁺ atd.) po její 162 denní inkubaci. Tím se navrhlo, že BPA by se mohl akumulovat v bezkyslíkatých sedimentech. (Voordeckers et al., 2002).

BPA je méně účinný jako estrogenní agonista než alkylfenoly. U samce pstruha duhového byla LOEC mezi 40 a 70 µg/l (Lindsholst et al., 2000). U střevle potoční 16 µg/l BPA po 164 denní expozici snížila počet zralých spermií u sexuálně zralých samců (Sohoni et al., 2001). Všeobecně vyšší koncentrace BPA mají za příčinu negativní reprodukční účinky. U samce halančíka rýžovištního byla upozorována inhibice růstu gonád s LOEC 640 µg/l a jejich degenerace (Sohoma et al., 2001).

1.4.4. Rtut'

Identifikační informace:

CAS číslo: 7439-97-6

SYNONYMA: mercury, quick silver (anglicky), mercurio (italsky a španělsky), mercure (francouzsky), quicksilber (německy), hydrargyrum (latinsky)

Fyzikální a chemické vlastnosti: Rtut' je jediný kov, který je za normálních podmínek tekutý. Je poměrně špatným vodičem tepla, ale dobrým elektrickým vodičem. Rtut' snadno tvoří slitiny (amalgámy) skoro se všemi běžnými kovy, včetně stříbra, hliníku a zlata. Se železem však slitinu netvoří. Běžným oxidačním stavem je +1 a +2, výjimečně se vyskytuje ve stavu 3+.

Vzorec: Hg

Molekulová hmotnost: 200, 59 (EPA, 1991)

Popis látky:

Bod tání: -38,8°C (EPA, 1991)

Bod varu: 357°C (EPA, 1991)

Rizikantní (chronické) vlastnosti: jed při vdechování, leptá kůži, oči, sliznice. Rtut' je experimentální tumorigen a teratogen. U člověka může způsobit změny v reprodukci a mutageneze. Výraznější účinky mají výpary rtuti na centrální nervovou soustavu, na jednotlivé orgány i celé organové soustavy (Sax et al., 1989).

Reaktivnost: rtuť může explodovat po kontaktu s 3-brompropinem, alkyny + stříbrnými perchlorečnany, ethylenoxidem, lithiem atd. Páry rtuti prudce reagují s chemikáliemi jako acetylenové sloučeniny, chlor, chlordioxide, methyl azid, amoniak atd. Reaguje také s ostatními kovy (hliník, vápník, sodík, rubidium atd.) (Sax et al., 1989).

Stálost: je stálá za normálních laboratorních podmínek, ale velice lehce vytváří slitiny (amalgám) s mnohými laboratorními a elektrickými kovovými přístroji a způsobuje jejich korozi.

Symptomy působení: páry rtuti mohou způsobit kašel, bolest na hrudi, nespavost, třes, horečku, únavu, zrudnutí očí a pokožky, bolesti žaludku, ztrátu váhy, dýchací problémy atd. (NIOSH, 1990).

Limity koncentrací rtuti a jejich sloučenin v ovzduší pracovišť v ČR:

rtuť: PEL (= Permissible Exposure Limit = přípustný limit expozice) – 0,05 mg.m⁻³, NPK – P (= nejvyšší přípustná koncentrace chemické látky v pracovním ovzduší) – 0,15 mg.m⁻³; alkylsloučeniny rtuti: PEL – 0,01 mg.m⁻³, NPK – P – 0,03 mg.m⁻³, anorganické a

arylsloučeniny rtuti: PEL – 0,05 mg.m⁻³, NPK – P – 0,15 mg.m⁻³
(http://www.irz.cz/latky/rtut_a_sl).

Již velice dlouho je známo, že těžké kovy jsou jedny z mnohých faktorů, které narušují endokrinní systém organismů. Bylo dokázáno, že těžké kovy jako např. Cd, Cu, Pb, Hg mohou všechny negativně ovlivnit fungování varlat i jejich endokrinní funkce stejně jako ostatní endokrinní systémy. Rtuť (Hg) je přítomna v atmosféře ve formě elementárního plynu. Vzniká uvolňováním ze zemské kůry prostřednictvím sopek a poté se odpařováním z oceánů dostává do atmosféry. Dále se do životního prostředí dostává lidskou činností jako součást průmyslových emisí při těžbě olova, mědi a zinku. Většina emisí rtuti je antropogenního původu. Přibližně 80% rtuti uvolňované lidskou činností je emitováno do vzduchu ve formě kovové rtuti (Hylander a Meili, 2003). V místech těžby je voda ve velké míře kontaminovaná Hg. Z atmosféry proniká rtuť do biosféry – dostává se do organismů žijících ve vodě a do půdy (Swain et al., 2004; Fitzgerald et al., 1998). Takto uložená anorganická rtuť je organismy jako jsou bakterie (ale i fytoplakton a plísňe) methylována, tím se anorganická rtuť přeměňuje na organickou ve formě monomethylhydrargyrum a může se bioakumulovat do potravního řetězce → organická rtuť se může hromadit v potravních řetězcích, zatímco anorganická rtuť do potravního řetězce nevstupuje. Nejvyšší obsahy organické rtuti v těle se nacházejí u mořských ryb, vysoké koncentrace rtuti mohou obsahovat i houby. Naopak, akumulace v rostlinách není příliš vysoká. (St. Louis et al., 2005). Methylhydrargyrum je považována za více toxickou než elementární rtuť a narušuje endokrinní systém ryb i savců (Wester a Canton, 1992, Dufresne a Cyr, 1999, Homma-Takeda et al., 2001).

Toxicita jednotlivých sloučenin rtuti je závislá především na jejich rozpustnosti ve vodě. Z tohoto pohledu jsou nejvíce rizikové sloučeniny dvojmocné rtuti Hg²⁺. Naopak toxicita samotné elementární rtuti je prakticky nulová, protože jen obtížně vniká do organických tkání. Mnohem škodlivější jsou její páry, které se však do ovzduší dostávají velmi pomalu (bod varu rtuti je 357 °C). Páry rtuti jsou těžší než vzduch a proto se mohou hromadit v špatně odvětrávaných níže položených oblastech. Zvláště nebezpečné jsou organokovové sloučeniny rtuti, které se mohou snadno dostat do živých tkání a to například i pouhým stykem s pokožkou.

Některé organické sloučeniny rtuti se využívají v zemědělství hlavně jako fungicidy. Rtuť má široké pole uplatnění. Používá se primárně na výrobu průmyslových chemikálií, v elektronice a elektrotechnice. Malé elektrické články obsahující rtuť se často používají např. v naslouchacích přístrojích, kamerách, hračkách, malých přenosných radiopřijímačích,

kalkulačkách, měřicích přístrojích, detektorech kouře a radiomikrofonech. Svítidla s obsahem rtuti (zářivky, rtuťové lampy) mají vyšší světelnou účinnost než klasické žárovky s wolframovým vláknem. Používají se pro vnitřní i vnější osvětlení, v promítacích přístrojích a v reflektorech, ve zdravotnictví, laboratořích, při fotografování apod. Elementární rtuť se používá jako náplň teploměrů a tlakoměrů na měření atmosférického tlaku. Dobré elektrické vodivosti rtuti se občas využívá ke konstrukci sklopných spínačů elektrického proudu. Značné použití má rtuť také při výrobě amalgámů, např. zubařského amalgámu. Tvorby amalgámu se zlatem se využívá při těžbě zlata z rud o vysoké kovnatosti. Velkým problémem tohoto způsobu těžby je fakt, že dochází ke kontaminaci životního prostředí vysoce toxickou rtutí. Sodíkový amalgám vzniká při elektrolýze chloridu sodného s použitím rtuťové katody a dále se používá k výrobě hydroxidu sodného a plynného chloru. Rtuť se používá také jako katalyzátor při výrobě uretanové pěny a antrachinonu. Některé léky (diuretika, antiseptika, dermatologika) obsahují rtuť nebo její sloučeniny. Bývá obsažena jako antibakteriální a fungicidní přísada v nátěrových hmotách, vyskytuje se i v mazacích olejích. Rtuť nalézá uplatnění v analytické chemii. V polarografii se využívá rtuťová elektroda, často používanou referenční elektrodou je kalomelová elektroda (z chloridu rtuťnatého). Další uplatnění nalézá kalomel v gravimetrické analýze platinových kovů, kde působí jako selektivní redukční činidlo. Chlorid rtuťnatý (sublimát) byl dříve používán jako součást jedů na hlodavce a k moření obilí. Fulminát rtuťnatý (azid rtuti) je znám jako třaskavá rtuť. Tato sloučenina slouží k výrobě pyrotechnických rozbušek (http://www.irz.cz/latky/rtut_a_sl).

Mnohé studie dokázaly negativní efekt rtuti na savce a ryby *in vivo*. Ve studii působení těžkých kovů (mezi nimi i rtuť) na žlutého okouna (*Perca flavescens*) v těžící oblasti Rouyn-Noranda, Quebec, se ukázalo, že ryby v těchto místech měly méně vyspělé pohlavní orgány, porušené žábry a epitely štítné žlázy (Levesque et al., 2003).

Negativnímu účinku rtuti se nevyhne ani lidský organismus. Vliv rtuti na zdravotní stav lidského organismu je jednoznačně negativní. V jedné z nich se provádělo elektronické měření intenzity třesu těla u 26 pracovníků (po vystavení rtuti) v různých podmínkách (výroba zářivek, produkce acetaldehydu, chloralkanu). Dokázalo se, že u těchto pracovníků došlo ke zvýšení třesu. Intenzita třesu závisela více na délce vystavení organismu rtuti než na jeho věku (Fawer et al., 1983). V obdobné studii se studovaly účinky působení výparů rtuti při výrobě chloralkanu. U pracovníků, kteří byli ve styku se rtutí byla průměrná hladina rtuti v krvi 10 µg/l a v moči 17 µg/l. Vyskytly se i jiné problémy jako poruchy paměti a spánku, zvýšení únavy, zmatenosti a rakovina plic (Piikivi and Hanninen, 1989).

Negativní vliv rtuti na organismus závisí na její dávce a na délce její expozice. Zubaři, kteří se často dostanou do styku se rtutí ve formě amalgamu, jsou také vystaveni jejímu riziku. Jak však bylo prokázáno, závisí na fyzickém stavu zubaře, jeho věku a na počtu amalgamových plomb, které provedl. Prokázaly se u nich jen malé změny, oproti dělníkům v továrnách, jako poruchy koncentrace, koordinace a paměti (Ngim et al., 1992). Rtuť je tedy kumulativním jedem a z organismu se dostává jen pozvolna. Koncentruje se především v ledvinách a v menší míře i v játrech a slezině. V ledvinách může setrvat až desítky let. Právě ty jsou při chronické otravě rtutí nejvíce ohroženy. Projevy chronické otravy bývají často nespecifické – od studených končetin, vypadávání vlasů, přes zažívací poruchy, různé neurologické a psychické potíže až po závažné stavy jako např. chudokrevnost, revmatické choroby či poškození ledvin. Chronická expozice také může způsobovat vypadávání zubů, vyrážky, svalový třes, ztrátu paměti, změny v chování a poškození mozku a centrální nervové soustavy. Při jednorázové vysoké dávce rtuti se dostávají bolesti břicha, průjmy a zvracení. Rtuť může mít také vliv na plodnost. Organické sloučeniny rtuti způsobují poškození mozku a nervové soustavy. Nejohroženější skupinou jsou kojenci a nenarozené děti. Příznaky otravy jsou následující: poruchy řeči, sluchu, chůze a periferního vidění, narušení koordinace pohybů a svalová slabost (http://www.irz.cz/latky/rtut_a_sl).

Negativní účinky rtuti byly také zkoumány na zvířatech. Potkanům, kterým byly podávány injekčně dávky 0,1 ml rtuti se objevily nádory v oblasti pobřišnice. Bylo to zpozorováno jen u potkanů, kteří byli v přímém kontaktu se rtutí. Objevily se také komplikace u ledvin, ale nenašly se žádné nádory na ledvinách (Druckrey et al., 1957). V jiné studii se srovnávaly negativní účinky páry rtuti po čtyřhodinové inhalaci s účinky rtuti po intravenózní injekci. Pokus byl proveden na potkanech, králících a opicích. Měřilo se vychytávání a distribuce rtuti v jejich mozcích. Rtuť se akumulovala v mozku po inhalaci v 10x vyšší koncentraci než po injekci. Tyto výsledky ukázaly, že rtuť je nejnebezpečnější v plynné formě a to u všech zkoumaných druhů (Berlin et al., 1969).

Při výzkumu působení rtuti na fertilitu potkanů, se neprokázaly žádné abnormality ve vývoji plodu. Pouze se zvýšila úmrtnost narozených mláďat, jejichž matky byly vystaveny působení rtuti. Vyšší úmrtnost byla pravděpodobně způsobena poruchami laktace. Dále se ukázalo, že u samic potkanů po dlouhodobější inhalaci plynné rtuti došlo k prodloužení doby plodnosti. Prodloužení této doby plodnosti (cyklů říje) bylo způsobeno negativními účinky rtuti na jejich centrální nervovou soustavu (Baranski a Szymczyk, 1973).

2. CÍL PRÁCE

Během několika posledních desetiletí narůstá počet informací o tom, že řada běžných látek, které se vyskytují v přírodě mají estrogení aktivitu, a mohou negativně ovlivňovat kvalitu a vývoj pohlavních orgánů, gamet a tím snižovat reprodukci živočichů včetně člověka. Mezi tyto kontaminanty patří právě endokrinní disruptory. Tyto látky mají estrogení či antiandrogení povahu. Jak již bylo popsáno, patří mezi ně xenoestrogeny, fytoestrogeny i antiandrogeny. Tyto EDs rády napodobují nebo interferují s činností endogenních hormonů a tím narušují rovnováhu potřebnou ke správnému vývoji funkčních gamet a reprodukčních orgánů.

Můj projekt bude srovnávat vliv vybraných látek na dva modelové organismy – savce a ryby. Bude testován vliv těchto látek na reprodukci a vývoj reprodukčních parametrů (vývoj gonád, stav spermií) a exprese genů regulujících spermatogenesi *in vivo* (savci, ryby) a průběh kapacity a akrosomální reakce spermií *in vitro* (savci).

Pro studie budou použity metody histologické a molekulární biologie, biologická i biochemická funkční analýza kvality spermií (s použitím monoklonálních protilátek proti intra-akrosomálním a jiným vybraným proteinům spermie).

Specifické úkoly tohoto projektu jsou:

- 1) Analýza multigeneračního účinku vybraných ED na reprodukci *in vivo* a reprodukční parametry myši ovlivněných v období prenatálním a pubertálním.
- 2) Analýza dvougeneračního účinku vybraných ED na reprodukci *in vivo* a reprodukční parametry ryb.
- 3) Funkční analýzy kvality spermií podle spermatologických parametrů s využitím specifických monoklonálních protilátek proti proteinům po působení ED u obou skupin modelů – savec a ryba.
- 4) Kvantitativní genové exprese specifických genů ve vyvíjejících se gonádách po vystavení ED.
- 5) Srovnávací analýza změn na gonádách a zárodečných buňkách.

Projekt je navržen na práci ve dvou blocích podle pokusného zvířete – myši a rybí model.

Mým úkolem bylo zjistit co nejvíce informací o struktuře a vlivu vybraných endokrinních disruptorů na fertilitu myši, ryb popř. i jiných zvířat včetně člověka (viz. 1.4.)

Byly provedeny předběžné pokusy na okounu říčním (*Perca fluviatilis L.*) s dvěma EDs a to se rtutí (Hg) a s bisphenolem A (BPA).

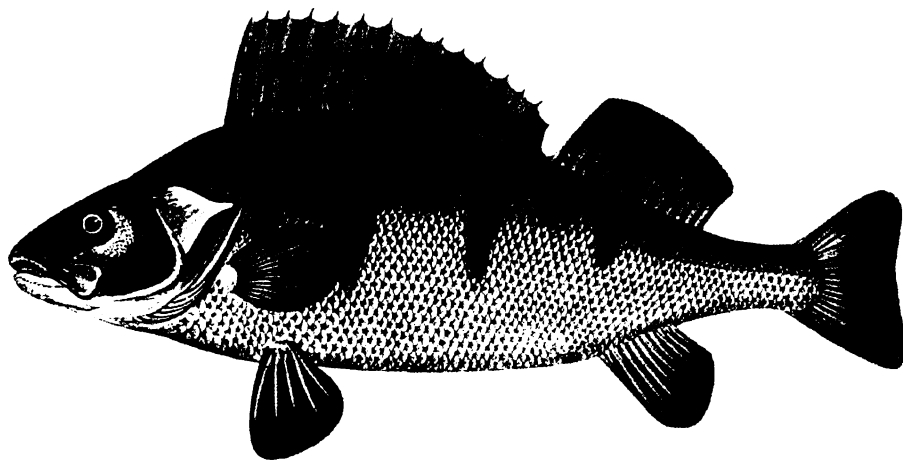
3. MATERIÁL A METODY

Experimentální zvířata

Myší model: CD1 (ICR) outbrední linie myší s vyšší heterozygositou a vyšším počtem mláďat (12-13 mláďat/samici/vrh). Experimenty budou probíhat v Biotechnologické ústavu v.v.i., Akademie věd ČR v Praze.

Rybí model: samci (mlíčáci) okouna říčního (*Perca fluviatilis L.*) dospívají ve 2-3 roku života. Okoun říční, jako všechny druhy našich sladkovodních kostnatých a chrupavčitých ryb, patří mezi ryby tzv. oviparní tzn., že k osetení a oplození dochází ve vnějším prostředí.

Obr. č. 5: Obrázek okouna říčního (*Perca fluviatilis L.*) (Linhart, 2004).



Okoun říční se vyznačuje mezi rybami největší plodností.

K reprodukci dochází při teplotě vody od 12-15 °C v období měsíce dubna. Při

jednorázovém výtěru spermatu samce o hmotnosti 80-150 g získáváme 1-3 ml spermatu s koncentrací spermií na úrovni 40×10^9 v ml spermatu (Linhart, 2004). Spermie okouna říčního jsou až do kontaktu s vnějším prostředím nepohyblivé a jejich pohyb je vyvolán kontaktem s vodou či aktivačním médiem. Spermie kostnatých ryb a rovněž okouna náleží mezi tzv. „aqua“ spermie s kulovitou hlavičkou bez akrozomu. Okouní spermie patří u ryb k těm nejmenším, hlavička má délku 1,5 μm a bičík 25-30 μm s nepatrnou střední částí. Pohyb spermií je velmi krátký a to pouze 15 až 20 s a s rychlostí pohybu na úrovni 200 $\mu\text{m/s}$ (Linhart, 2004). Dynamický pohyb je závislý na iontové úrovni aktivačního média či vody, kdy vápník a draslík je limitující pro dobu pohybu spermií a jejich trajektorii (dráhu a směr) při osmotické koncentraci na úrovni 100 mOsmol/kg (Alavi et al., 2009). Okoun říční se stal pokusným zvířetem díky své schopnosti chovu v uzavřených podmínkách, ideální velikosti (chov v akváriích), extrémní plodnosti, jednoduché manipulovatelnosti a citlivosti spermií na kvalitu aktivačních medií vyznačující se změnou doby, rychlosti, trajektorie a frekvence

pohybu spermií, včetně změny amplitudy pohybu bičíku. Experimenty se uskutečnily a budou dále probíhat na Jihočeské univerzitě, ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém, laboratoři fyziologie reprodukce ve Vodňanech.

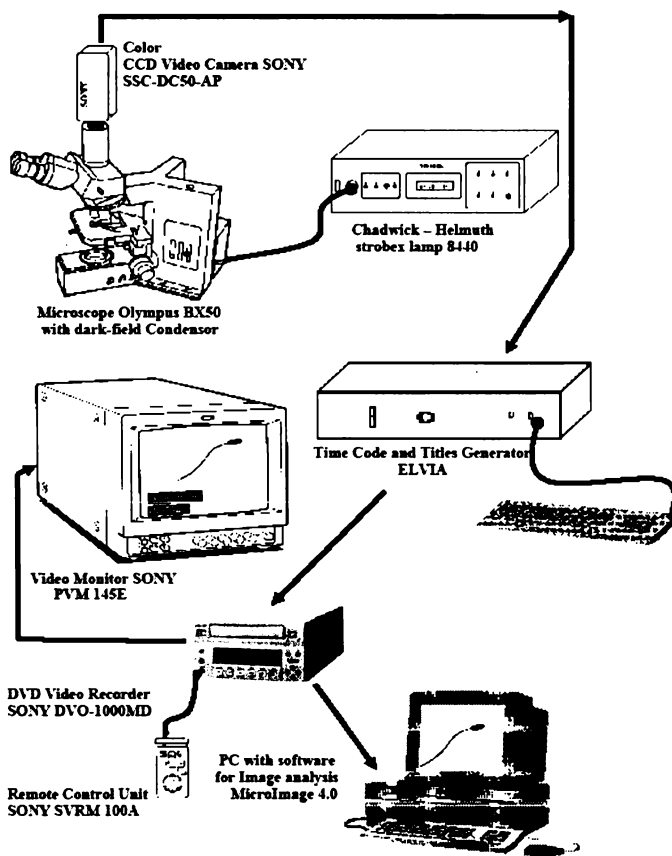
Experimenty na rybím modelu – okounu říčním

Příprava samců okouna k výtěru

Celkem byl připraveno 20 samců v telotním režimu 17 °C po dobu 14 dnů a k výtěru použito 8 samců o hmotnosti $125 \pm 49\text{g}$.

Odběr spermatu okouna říčního

Připravení a narkotizování mlíčáči k odběru spermatu byli osušeni v místě pohlavního otvoru. Sperma bez přimísenin moči či vody bylo odebíráno jednorázovou odběrovou stříkačkou o objemu 5 ml. Odebrané sperma bylo uchováváno na ledu při 0 °C pro experimenty v průběhu 12 h.



Obr. č. 6: Schéma aparatury pro vyhodnocení motility spermií (Linhart et al., 2002).

Ředění spermatu a hodnocení pohyblivosti spermií

Pohyb spermií byl pozorován v mikroskopu Olympus BX 50 se suchým kondenzorem vytvářejícím tmavé pole a objektivem Planachromát 20x, apertury 0,50 se stroboskopickým světlem (viz obrázek, Linhart et al., 2002).

- Předředění spermatu
- Z důvodu vysoké koncentrace spermií a následné synchronizace motility spermií

bylo sperma okouna předředěno imobilizačním roztokem (IR) (KUROKURA 180:180 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 1,36 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,38 mM NaHCO_3 v destilované vodě, pH 8,0;

osmolalita 343 mmol/kg, Rodina et al., 2004), tzn. roztokem, který neaktivoval pohyb spermií a to v poměru 1:50 a uchovávalo na ledu při 0 °C. Cílem předředění bylo získání možnosti vnést s imobilizačním roztokem do semenné plazmy příslušný polutant (rtuť atd.), sperma případně inkubovat a dosáhnout takové koncentrace spermií, která umožní individuální posuzování pohybu spermií, tak aby na monitoru bylo maximálně do 100 pozorovaných spermií.

- **Aktivace pohybu spermií**

Předředěné sperma o objemu 0.25 μ l s IR a experimentálním polutantem bylo napipetováno do 50 μ l aktivačního média (AM, ředění 1:200) (50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8) na podložním skle umístěném na stolku mikroskopu. Aktivace obvykle probíhala ihned po předředění spermatu a dále po 3, 6, a 24 h inkubace v IR s experimentálním polutantem. Finální ředění spermatu, včetně předředění tak představovala poměr 1:10000. K zabránění adheze spermií na podložním skle bylo přidáno do AM 0,1 % bovine serum albumin (BSA). Pohyb spermií byl pozorován v otevřené kapce (bez krycího skla), přenášen a zaznamenán od 10 s po jejich aktivaci, tzn. maximálně do 20-50 s, a to spolu s vnitřním časem viditelným na monitoru za pomoci 3 CCD video kamery (SONY DXC-970MD, Japan) s frekvencí blikajícího stroboskopického světla na úrovni 50 Hz.

Procento a rychlost pohybu spermií

Při vyhodnocování záznamu zaznamenané na DVD SONY DVO 1000MD zařízení byla pro zjištění rychlosti spermií měřena pozice nasnímaných hlaviček spermií z postupných videosnímků analyzovaných v určitém čase po aktivaci s kumulací pěti snímků s časovým odstupem 0,12 s (odstupem tří snímků, záznam 25 snímků/s) analýzou obrazu (verze 4.0.1. pro Windows od Olympusu se speciální aplikací od Olympusu C&S, ČR). Akumulované snímky byly uměle obarveny a to první snímek červeně, další tři zeleně a pátý snímek modře. Z vytvořené trajektorie byl na základě času a délky vyhodnocena automaticky rychlost pohybu. Procento pohyblivých spermií bylo odvozeno opět poloautomaticky z poskládaných a obarvených snímků, kdy červené body vždy znamenaly pohyblivé spermie a bílé body spermie nepohyblivé. Bílé body vznikaly u nepohyblivých spermií a to z efektu RGB, tedy vzájemného poskládání barev červených, zelených a modrých bodů u nepohyblivých spermií.

Amplituda kmitu bičíku

Z pořízených záznamů bude analýzou obrazu z jednotlivých snímků v závislosti na čase vyhodnocena výše amplitudy bičíku \pm od střední roviny a počty amplitud v délce bičíku.

Frekvence pohybu bičíku

K měření frekvence pohybu bičíku byla využita stejná mikroskopická technika stroboskopickým světlem Chadwick-Helmut se seřízeným světelným režimem stabilizující synchron sinusoidy bičíku. Výsledná frekvence pohybu bičíku byla manuálně zapisována z displeje stroboskopické lampy a představuje frekvenci pohybu bičíku, tzn. Hz/s, v určitém období po aktivaci motility.

Experiment 1: Přímá (velmi krátká) expozice $HgCl_2$ a BPA v aktivačním médiu se spermii
 $HgCl_2$ rozpuštěný v 20 mM KUOKURA 180 byla napipetován do AM na podložním skle na stolku mikroskopu s následující finální koncentrací $HgCl_2$ a to 0,313; 3,13; 31,3; 62,5; 125; 250 a 500 μ M (0,085; 0,85; 8,5; 17; 34; 68 and 136 mg/l) a následně přidáno předředěné sperma v objemu 0,25 μ l s IR.. Do BPA rozpuštěné v 20 mM dimethylsulfoxid (DMSO) a to v koncentracích 1; 0,5; 0,25; 0,125 mM bylo přidáno jako u rtuti předředěné sperma v objemu 0,25 μ l s IR. $HgCl_2$ a BPA tak ve svém důsledku ovlivnily pouze spermie ve fázi motility. Jako kontrola sloužilo sperma předředěné IR aktivované v AM bez EDs.

Experiment 2: Dlouhodobá inkubace spermií s $HgCl_2$ a BPA

$HgCl_2$ rozpuštěný v 20 mM KUOKURA 180 byla napipetován do IR s vytvořením koncentrační řady 0,313; 3,13; 31,3; 62,5; 125; 250 a 500 μ M (0,085; 0,85; 8,5; 17; 34; 68 and 136 mg/l). BPA rozpuštěný v 20 mM dimethylsulfoxid (DMSO) byl nepipetován do IR s vytvořením koncentrační řady 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 mM. Následně bylo přidáno sperma to v poměru 1:50 mezi spermatem a IR s rtutí (BPA) a kontrolován pohyb spermií v čase 0 (tzn. ihned po smísení spermatu s $HgCl_2$ nebo BPA) a dále po 3, 6 a 24 h inkubace spermatu s $HgCl_2$ (BPA) při 0°C. Kontrola spočívala v inkubaci spermií v IR bez $HgCl_2$ a BPA s aktivací pohybu spermií po smísení s aktivačním roztokem (v nultém čase), 3, 6 a 24 h. $HgCl_2$ a BPA tak ve svém důsledku ovlivnily neaktivní spermie v době jejich inkubace.

Experiment3: Vliv $HgCl_2$ na morfologii spermií

Sperma dlouhodobě inkubované v $HgCl_2$ v různých koncentracích (313; 3,13; 31,3; 62,5; 125; 250 a 500 μ M) bylo v čase inkubace 0, 3, 6 and 24 h nafiloxováno 2,5% glutaraldehydem s 0,1 M fosfatovým pufrém a uloženo při 4°C do identifikace změny morfologie skenovacím a transmisním elektronovým mikroskopem. Jako kontrola sloužilo sperma bez $HgCl_2$ s fixací ve stejné inkubační časové řadě. K postfixaci byl použit oxid osmičelý. Dehydratace vzorku proběhla v acetonové řadě.

Vzorky pro skenování elektronový mikroskop (SEM) byly dále:

- sušeny metodou kritického bodu pomocí dryer pelco CPD 2 (Ted Pella, Inc., Redding, Calif.),
- přilepeny na kovový terčik
- pozlaceny pomocí SEM Coating Unit E5100 (polyfon Equipment Ltd., England)
- pozorovány Jeol 6300 SEM s CCD kamerou (JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan)

Vzorky pro transmisní elektronový mikroskop (TEM) byly dále:

- zality do pryskyřice Polybed 812,
- řezány na ultratenké řezy ultramikrotomem Leica UCT (Leica Mikrosysteme GmbH, Austria),
- kontrastovány uranylacetátem a citrátem olova,
- pozorovány Jeol 1010 TEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)

Snímky se vyhodnocovaly analýzou obrazu Olympus MicroImage software (verze 4.0.1. pro Windows; Pšenička et al., 2008)

Experiment 4: Vliv $HgCl_2$ na úroveň ATP ve spermiích

Úroveň ATP byla hodnocena v závislosti na okamžitém vlivu $HgCl_2$ na spermie či na základě inkubace spermatu s $HgCl_2$ po dobu 3, 6 a 24 h. Byl použit roztok 25 mM HEPES, 10 mM magnesium acetate, 2 mM EDTA, 3 mM azidu sodného, pH 7,75 v objemu 5 ml a ve zkumavce zahřátý ve vodní lázni na 95 °C. Po dosažení bodu varu bylo do zkumavek přidáno 50 μ l spermatu s IR, případně $HgCl_2$ a opět zahřáto do bodu varu po dobu 2 min. Následně byly obsahy zkumavek centrifugovány po dobu 15 min při 15000 rpm a supernatant uchováván při -80°C až do měření ATP v nmol ATP/10⁹spermií na luminometru Bioluminescence Assay Kit CLS II. (Boryshpolets et al., 2009).

Experiment 5: Frekvence pohybu bičíku u spermií dlouhodobě inkubovaných v $HgCl_2$

K měření frekvence pohybu bičíku byla využita stejná mikroskopická technika stroboskopickým světlem Chadwick-Helmut se seřízeným světelným režimem stabilizující synchron sinusoidy bičíku. Výsledná frekvence pohybu bičíku byla manuálně zapisována z displeje stroboskopické lampy a představuje frekvenci pohybu bičíku, tzn. Hz/s, v určitém období po aktivaci motility. Experimentálně byla srovnána frekvence pohybu bičíku mezi kontrolou (tzn. sperma v IR) a spermatem inkubovaným po dobu 6 h v 0,0313 mM

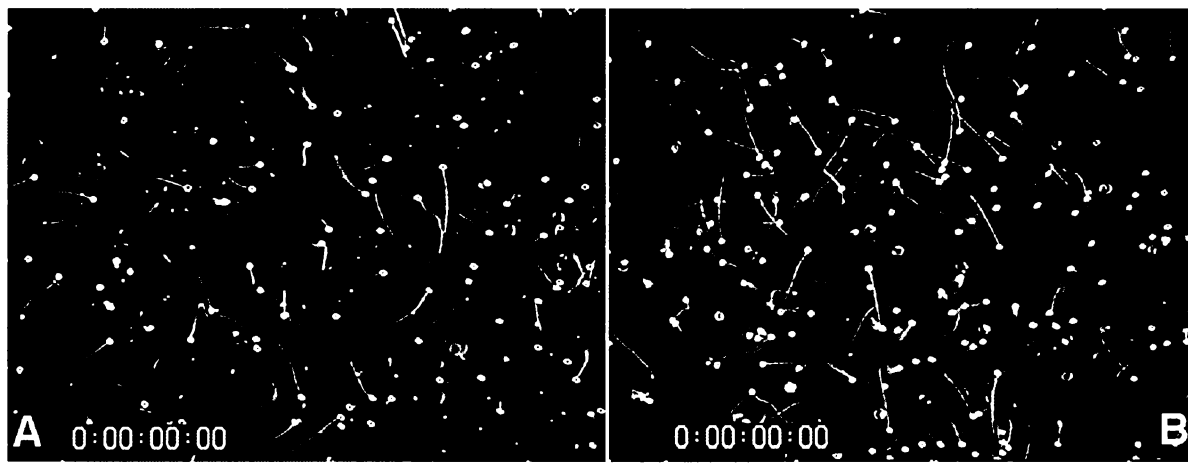
koncentraci $HgCl_2$. Daná koncentrace byla zvolena záměrně, neboť při vizuálním hodnocení daná koncentrace nevykazovala rozdíl s kontrolou. Chtěla jsem tuto skutečnost potvrdit.

Experiment 6: Demembrance a reaktivace spermií po přímé (velmi krátká) expozici v $HgCl_2$
Dva μ l neředěného spermatu byly přidány při 0 °C do 50 μ l demembranačního média (DM) obsahující 20 mM NaCl, 0,5 mM Ethylendiamintetracetové kyseliny (EDTA), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 20 mM Tris HCl pH 8,2; 0,04 % Triton X-100. Po 30 s při 0 °C, 2 μ l demembranovaných spermií bylo pipetováno a přidáno při pokojové teplotě (18-20 °C) na podložní sklo do 50 μ l reaktivačního média (RM = 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris HCl, pH 8,2; 1 mM $MgCl_2$, 2 mg/ml BSA a 1 mM ATP, vanadate free z Boehringer). Přítomnost BSA byla důležitá pro prevenci kontaktu spermií s podložním sklem. Přidání 50-200 μ M cAMP a to jak do DM nebo do RM nebylo důležité pro iniciaci motility (Linhart et al., 2002).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Ze záznamu neaktivovaných spermií je patrné, že spermie mají velmi malou kulovitou hlavičku s různorodou délkou bičíku spermií. Pro účely experimentu bylo použito od samců, viz obrázek B, které se vyznačovalo homogenností v délce bičíku.

Obr.č. 7: Ukázka nepohyblivých spermií okouna u samce A a B, které nebylo a bylo použito k experimentu.



Z velkého množství vzorků a DVD záznamů prozatím byly u okouna říčního vyhodnoceny kontroly procenta motility spermií a rychlosti pohybu. Procento motility spermií u kontroly představovalo po 10 s po aktivaci úroveň 95 % s rychlostí 200 $\mu\text{m/s}$ s postupným poklesem rychlosti až do 60 či 90 s. Doba pohybu spermií u okouna ve vodě obvykle nepřesahuje 20 s (Linhart, 2004). Prodloužení pohybu bylo způsobeno použitím AR. Dále byly vyhodnoceny výsledky frekvence pohybu bičíku s vlivem HgCl_2 nebo BPA, včetně kontroly, tedy spermií neošetřených HgCl_2 (BPA). Rovněž došlo k prvotnímu vyhodnocení kontroly spotřeby ATP při aktivaci pohybu spermií.

Za prvotní výsledky lze považovat nalezení úrovně hraniční toxicity, při kterých se spermie:

- nepohybovaly v případě smísení HgCl_2 nebo BPA s AR, tzn. kdy přímo polutanty ovlivnily mechanismus motility spermií,
- při dlouhodobé inkubaci v IM s BPA nebo AR po dobu 3-24 h, kdy HgCl_2 a BPA ovlivnily neaktivní spermie v době jejich uchování.

Experiment 1: Přímá (velmi krátká) expozice $HgCl_2$ a BPA v aktivačním médiu se spermii

Vliv $HgCl_2$

Hodnoty koncentrace 0,25 mM $HgCl_2$ a výše neaktivovaly pohyb spermii. Nižší koncentrace a to 0,125 mM způsobily krátkodobý pohyb na úrovni 30 s motility, oproti 60 s. Ještě koncentrace 0,0625 mM ovlivnila dobu pohybu, který se zkrátil na 45 s. Koncentrace 0,0313 mM neovlivnila dobu pohybu spermii. Dosažené výsledky přímého vlivu $HgCl_2$ na pohyb spermii jsou o něco vyšší než dosáhla Look et al., 2000 u pstruha duhového. Z pořízených záznamů nebyla patrná změna amplitudy bičíku v hodnotách koncentrace $HgCl_2$ 0,0625 mM.

Vliv BPA

Hodnoty koncentrace 0,5 mM BPA a výše ovlivnily dobu pohybu spermii. Pohyb spermii se zkrátil oproti kontrole, kdy spermie v kontrole vykazovaly 60 s, v BPA 45 s. U ryb nejsou známy žádné předchozí výsledky. Z pořízených záznamů byl patrný výrazný nárůst amplitudy bičíku v hodnotách koncentrace BPA 0,5 mM. Znamená to, že BPA pravděpodobně ovlivňuje samotný mechanismus přenosu energie ve vazbě na funkci mikrotubulů ve střední části bičíku.

Experiment 2: Dlouhodobá inkubace spermii s $HgCl_2$ a BPA

Vliv $HgCl_2$

Hodnoty koncentrace $HgCl_2$ 0,0625 mM při inkubaci se spermatem po dobu 3-24 h ovlivnily spermie tak významně, že po naředění AR nedošlo k aktivaci spermii. Nižší koncentrace a to 0,0313 mM způsobily krátkodobý pohyb na úrovni 30-45 s motility, oproti 60 s v kontrole. Koncentrace 0,00313 neovlivnila dobu pohybu spermii. Dosažené výsledky přímého vlivu $HgCl_2$ na pohyb spermii jsou naopak nižší než dosáhla Kime et al. (1996) u pstruha duhového a ukazují na vysokou citlivost spermii okouna a celého pohybového aparátu bičíku, včetně střední části.

Vliv BPA

Hodnoty koncentrace BPA 0,5 mM a výše ovlivnily dobu pohybu spermii. Pohyb spermii se zkrátil oproti kontrole, kdy spermie v kontrole vykazovaly 60 s, v BPA 45 s. U ryb nejsou známy žádné předchozí výsledky.

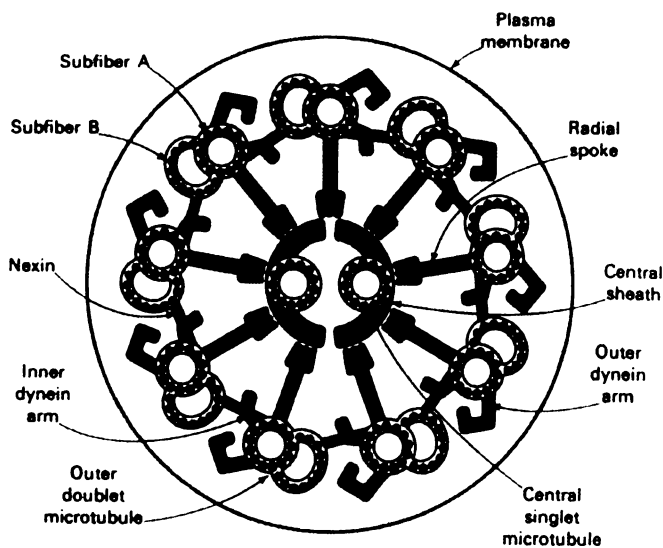
Experiment 3: Vliv $HgCl_2$ na morfologii spermií

Vzorky nafixované v různých časech aktivace jsou prozatím uloženy v ledničce pro elektronovou mikroskopii, kterou provedu ve spolupráci s Hadim Alavim, Azadeh Hatef a Martinem Pšeničkou – doktorandy VÚRH JU.

Experiment 4: Vliv $HgCl_2$ na úroveň ATP ve spermiích

Obdobně jako v případě experimentu 3 jsou vzorky zafixovány a uloženy při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Pouze se podařilo vyhodnotit úroveň ATP u kontrolních spermií v závislosti na motilitě spermií. Z výsledků u kontroly bylo patrné, nativní neaktivované sperma obsahovalo $43.9\text{ nmol ATP}/10^9$ spermií. Po 10 s od aktivace došlo k dramatickému snížení ATP na úroveň $10\text{ nmol ATP}/10^9$ spermií a po 60-90 s se úroveň ATP stabilizovala na $7\text{ nmol ATP}/10^9$ spermií, přičemž se pohyb spermií zastavil. Lze se domnívat, že v případě ovlivnění mechanismu přenosu a distribuce ATP v bičíku dojde k výraznému ovlivnění dyneinových ramen a tím frekvenci vlnění bičíku (Cosson et al., 2008).

Obr.č. 8: Schéma příčného řezu struktury bičíku (Cosson et al., 2008).

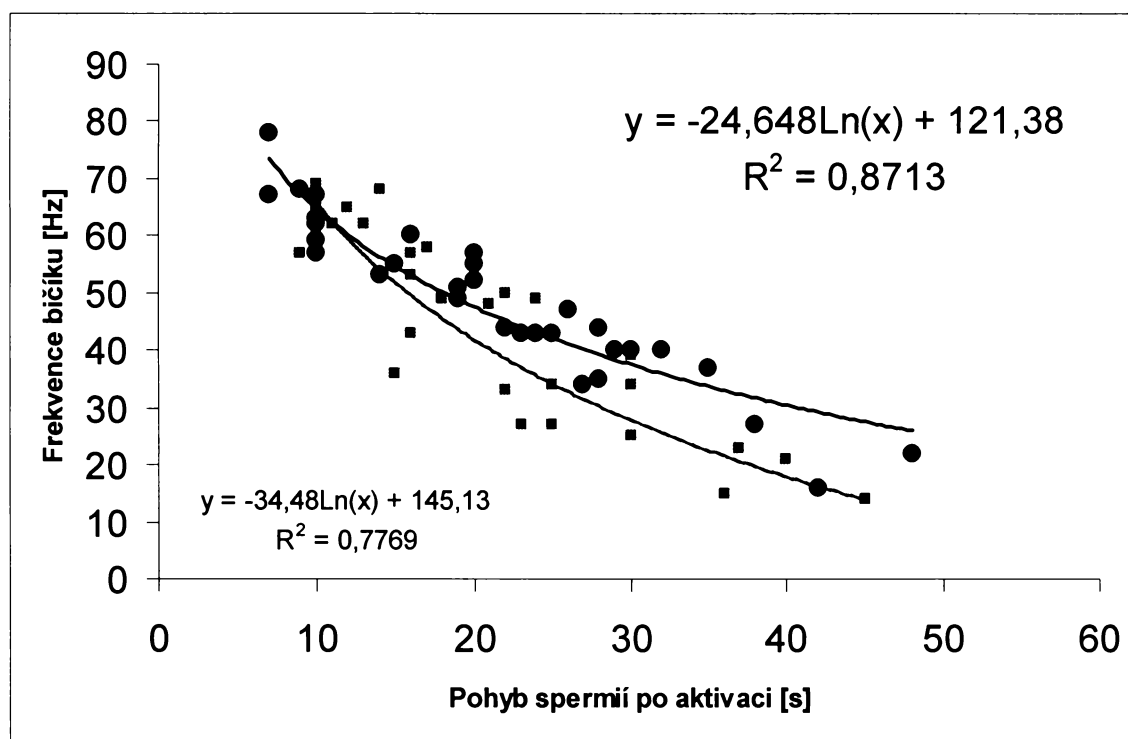


Experiment 5: Frekvence pohybu bičíku u spermií dlouhodobě inkubovaných v $HgCl_2$

Srovnávala jsem frekvenci pohybu bičíku mezi kontrolou (tzn. sperma v IR) a spermatem inkubovaným po dobu 6 h v $0,0313\text{ mM}$ koncentraci $HgCl_2$, viz obázek č. 9. Z průběhů křivek je patrné, že koncentrace $HgCl_2$ na úrovni $0,0313\text{ mM}$

negativně ovlivnila frekvenci vlnění bičíku a tím pravděpodobně i vlastní motilitu. Je tedy možné se domnívat, že i tato koncentrace má negativní vliv na celý mechanismus bičíku. Rovněž výsledek ukazuje na možnost jednoduchého využití daného parametru k posuzování toxicity látek.

Obr. č. 9: Graf závislosti frekvence bičíku na pohybu spermií po aktivaci. Kontrola – černá křivka, $HgCl_2$ o koncentraci 0,0313 mM - červená křivka.



Experiment 6: Demembrance a reaktivace spermií po přímé (velmi krátká) expozice v $HgCl_2$

$HgCl_2$ rozpuštěný v 20 mM KUOKURA 180 byl napipetován do reaktivačního média (viz metodika) a sledován pohyb spermií. Obdobně jako u spermií s membránou u demembranovaných spermií koncentrace $HgCl_2$ na úrovni 0,25 mM $HgCl_2$ a výše neaktivovaly pohyb spermií. Nižší koncentrace a to 0,125 mM způsobily pohyb pouze 50 % spermií, oproti kontrole, kde se pohybovaly všechny spermie. Ještě koncentrace 0,0625 mM ovlivnila procento pohybujících se spermií. Koncentrace 0,0313 mM neovlivnila množství pohyblivých spermií. Tyto předběžné výsledky odhadované přímo z monitoru, budou potvrzeny či vyvráceny analýzou z DVD záznamu. Je tedy možné konstatovat, že $HgCl_2$ přímo ovlivňuje vlastní mechanismus činnosti mikrotubulů bičíku a neovlivňuje pohyblivost spermií prostřednictvím permeability membrány.

5. SOUHRN

Předběžné výsledky ukazují, že endokrinní disruptory, jako rtuť a BPA, negativně ovlivňují v určitých koncentracích pohyb spermií okouna říčního. Přímou expozicí $HgCl_2$ o koncentraci 0,25 mM v aktivačním roztoku nedošlo k aktivaci pohybu spermií. Nižší koncentrace a to 0,125 mM způsobila aktivaci pouze krátkého pohybu spermií na úrovni 30 s motility, oproti 60 s u kontroly. Koncentrace 0,0313 mM $HgCl_2$ již neměla negativní vliv na dobu pohybu spermií. Hodnoty koncentrace 0,5 mM BPA a výše po krátkodobé expozici ovlivnily dobu pohybu spermií. Pohyb spermií se zkrátil oproti kontrole, kdy spermie v kontrole vykazovaly 60 s a v BPA 45 s. Při použití BPA byl patrnější výrazný nárůst výšky amplitudy bičíku oproti kontrole. BPA pravděpodobně ovlivňuje samotný mechanismus přenosu energie ve vazbě na funkci mikrotubulů.

Po dlouhodobé inkubaci spermatu okouna říčního v $HgCl_2$ o koncentraci 0,0625 mM po dobu 3-24 h nedošlo k aktivaci spermií. Nižší koncentrace a to 0,0313 mM již způsobila krátkodobý pohyb na úrovni 30-45 s motility, oproti 60 s v kontrole. Koncentrace 0,00313 neovlivnila dobu pohybu spermií. Při dlouhodobé inkubaci spermií okouna říčního s BPA o koncentraci 0,5 mM a výše se pohyb spermií zkrátil oproti kontrole, kdy spermie v kontrole vykazovaly 60 s a v BPA 45 s.

Z výsledků vlivu $HgCl_2$ na úroveň ATP ve spermiích došlo po 10 s od aktivace k dramatickému snížení ATP na úroveň 10 nmol ATP/ 10^9 spermií, oproti nativní kontrole s 43,9 nmol ATP/ 10^9 spermií. Po 60-90 s se úroveň ATP stabilizovala na 7 nmol ATP/ 10^9 spermií, přičemž se pohyb spermií zastavil.

Vyhodnocením frekvence pohybu bičíku u spermií dlouhodobě inkubovaných v $HgCl_2$ po dobu 6 h v 0,0313 mM koncentraci $HgCl_2$ jsem zjistila, že koncentrace $HgCl_2$ na této úrovni po 30 s pohybu spermií okouna snížila úroveň frekvence vlnění 10-12 Hz a tím pravděpodobně ovlivnila rychlost pohybu spermií.

U demembrance a reaktivace spermií po přímé expozice v $HgCl_2$ způsobila koncentrace 0,125 mM pohyb pouze u 50 % spermií, oproti kontrole, kde se pohybovaly všechny spermie. Ještě koncentrace na úrovni 0,0625 mM negativně ovlivnila procento pohybující se spermií. Koncentrace 0,0313 mM neměla vliv na pohybující se spermie. Je tedy možné se domnívat, že rtuť přímo ovlivňuje vlastní mechanismus činnosti mikrotubulů bičíku.

6. LITERATURA

Alavi S.M.H., Rodina M., Policar T., Kozak P., Psenicka M., Linhart O. (2007): Semen of *Perca fluviatilis* L: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenol* 68: 276-283.

Anderson R.A., Baird D.T. (2002): Male contraception. *Endocr Rev* 23: 735-762

Ankley G., Mihiach E., Stahl R., Tillett D., Colborn T., McMaster S. (1998): *Environ Toxicol Chem* 17: 68-87

Anway M.D., Leathers C., Skinner M.K. (2006): Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endokrinol* 147: 5515-5523

Arukwe A., Grotmol T., Haugen T.B., Knudsen F.R., Goksøyr A. (1999): Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Sci Total Environ* 236: 153-161

Baranski B. and Szymczyk I. (1973): Effects of mercury vapor upon reproductive functions of female white rats. *Med Pr* 24: 249-261

Barnes S., Peterson T.G. (1995): Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cells in lines. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:103-108

Ben Rhouma K., Tebourbi O., Krichah R., Sakly M. (2001): Reproductive toxicity of DDT in adult male rats. *Hum Exp Toxicol* 20:393-397

Bennet G.A., Vandergraft E.E., Shotwell O.L. (1978): Zearalenone distribution in wet-milling fractions from contaminated corn. *Cereals Chem* 55: 455-461

Berlin M., Fazackerley J. and Nordberg G. (1969): The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. *Arch Environ Health* 18: 719-729

- Betina, V. (Eds) , (1989): Bioactive molecules, mycotoxins. Vol.9: Elsevier, Amsterdam
- Bloomquist C., Davidson J.N., Pearson E.G. (1982): Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. J Am Vet Med Assoc 180: 164-165
- Boryshpolets S., Dzyuba B., Stejskal V., Linhart O. (2009): Dynamics of ATP and movement in Eurasian Perch *Perca fluviatilis* L. sperm in conditions of decreasing osmolality. Theriogenol (in press).
- Bottalico A., Perrone G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur J Plant Path 108: 611-624
- Budavari S., O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E. (Eds.) (1989):The Merck Index Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, USA
- Caslin T.M., Wolff J.O. (1999): Individual and demographic response of the gray-tailed vole to vinclozolin. Environ Toxicol and Chem 18: 1529-1533
- Casto J.M., Ward O.B., Bartke A. (2003): Play, copulation, anatomy and testosterone in gonadally intact male rats prenatally exposed to flutamide. Physiol Behav 79: 633-641
- Cole R.J., Cox R.H. Handbook of toxic fungal metabolites New York, Academic Press, ISBN 0-12-179760-0
- Cosson J. (2008): The motility apparatus of fish spermatozoa. Fish spermatology (ed. By Alavi SMH, Cosson J, Coward K, Rafiee G), pp.281-316. Alfa Science ltd.
- Coulombe R.A. Jr. (1993): Symposium: biological action of mycotoxins. J Dairy Sci 76: 880-891
- Crews D., Gore A.C., Hsu TS., Dangleben N.L., Spineta M., Schallert T., Anway M.D., Skinner M.K. (2007): Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. Proceedings of the national academy of science of United states of America 104: 5942-5946.

Das S., Parveen S., Kundra C. P., Pereira B. M. (2004): Reproduction in male rats as vulnerable to treatment with the flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. *Phytother Res* 18:8-13

Demers A., Ayotte P., Brisson J., Dodin S., Robert J., Dewailly E. (2002): Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. *Am J Epidemiol* 155:629-635

Diekman M..A, Green M.L. (1992): Mycotoxins and reproduction in domestic livestock *J Anim Sci* 70: 1615-1627

Druckrey H., Hamperl H. and Schmahl D. (1957): Carcinogenic action of metallic mercury after intraperitoneal administration in rats. *Z Krebsforsch* 61: 511-519

Dufresne J., Cyr D.G. (1999): Effects of short-term methylmercury exposure on metallothionein I, II and III mRNA levels in the testis and epididymis of rat. *J Androl* 20: 769-778

Elzeinova F., Novakova V., Buckiova D., Kubatova A., Peknicova J. (2008): Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol* 26:231-238

EPA (1991): Screening methods for the development of fair toxics emission factors. EPA/450/4-91-021

EPA (1997): Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012

EPA (1999): Reproductive and development toxicity of bisphenol A. www.bisphenol-a.org./toxicology/reproductive.html

FAO (1997): Food and Nutrition Paper 64, Worldwide regulations for Mycotoxins, a compendium, Rome

- Fairchild J.F., Little E.E., Huckins J.N. (1992): Arch Environ Contam Toxicol 22: 375-379
- Fawer R.F., DeRibaupierre Y., Guillemin M.P., Berode M., Lob M. (1983): Measurement of hand tremor induced by industrial exposure to metallic mercury. J Ind Med 40: 204-208
- Fitzgerald W.F., Engstrom D.R., Maso R.P. and Nater E.A. (1998): The Case for Atmospheric mercury contamination in Remote Areas. Environ Sci Technol 32: 1-7
- Fukutake M., Takahashi M., Ishida K., Kawamura H., Sugimura T., Wakabayashi K. (1996): Quantification of genistein in soybeans and soybean products. Food Chem Toxicol 34:457-461.
- Goodman-GruenD., Kritz-Silverstein D. (2003): Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. Menopa 10: 427-432.
- Gottardias M.M., Jiang S.Y., Jordan V.C. (1989): Inhibition of tamoxifen-stimulated growth of an MCF-7 tumor variant in athymic mice by novel steroidal antiestrogens. Cancer Res 49: 4090-4093
- Gray L.E. Jr. (1998): Xenoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects. Toxicol Lett 102-103: 331-335s
- Gray L.E. Jr., Wolf C., Lambright C., Mann P., Price M., Cooper R.L., Ostby J. (1999): Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethyl phthalate, PCB 169 and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. Toxicol Ind Health 15: 94-118
- Gray L.E., Ostby J., Wolf C.J., Lambright C., Parks L., Veeramachaneni D.N., Wilson V., Price M., Hotchkiss A., Orlando E., Guillette L. (2001): Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Human Reproduct Update 7: 248-264.

Gregory, M., Aravindakshan, J., Nadzialek, S., and Cyr, D.G. (2008): Effects of endocrine disrupting chemicals on testicular functions. In: Fish spermatology (Eds, S.M. H. Alavi, J.J. Cosson, K. Coward and G. Rafiee), pp. 161-214, Alpha Science International Ltd., Oxford, U.K.

Grist E.P., Wells N.C., Whitehouse P., Brighty G., Crane M.E. (2003). *Environ Sci Technol* 37: 1609-1616

Gross-Sorokin M., Roast S.D., Brighty G.C. (2006). *Environ Health Perspect* 114: 147-151

Gu Y.Q., Tong J.S., Ma D.Z., Wang X.H., Yuan D., Tang W.H., Bremner W.J. (2004): Male hormonal contraception : effects of injections of testosterone undecanoate and depot medroxyprogesterone acetate at eight-week intervals in chinese men. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2254-2262

Guo Y.L., Lambert G.H., Hsu M.M. (2004): Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int. Arch. Occup Environ Health* 77: 153-158

Hauser R., Chen Z., Pothier L., Ryan L. and Altshul L. (2003): The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect* 111:1505-1511

Hellwig J., van Ravenzwaay B., Mayer M., Gembardt C. (2000): Pre- and postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 42-50

Homma-Takeda S., Kugenuma Y., Iwamuro T., Kumagai T. and Shimojo N. (2001): Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell-specific germ cell apoptosis. *Toxicol* 169: 25-35.

Hylander L.D. and Meili M. (2003): 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci. Tot. Environ.* 304: 13-27

Chowdhury A.R. (1987): Effect of pharmacological agents on male reproduction. *Adv Contracept Deliv Syst* 3: 347- 352

IARC (1993): Monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France

IARC (1999): Overall evaluation of carcinogenicity to humans IARC monographs 1-73: 1-36

International Programme on Chemical Safety (2002). Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors (Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R., van der Kraak G., eds). WHO/IPCS/EDC/02.2. (<http://ehp.niehs.nih.gov/who/>)

Jensen T.K., Toppari J., Keiding N., Skakkeback N.E. (1995): Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? Clin Chem 41: 1896-1901

Jodlbauer J., Zöllner P., Lindner W. (2000): Determination of zearanol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatogr 51: 681-687

Keith L.H. (1997): Environmental endocrine disruptors: a handbook of property data

Kelce W.R., Monosson E., Gamcsik M.P., Laws S.C., Gray L.E. Jr (1994): Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. Toxicol Appl Pharmacol 126: 276-285

Kelce W.R., Stone R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M.: (1995): Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature 375:581-585

Kelce W.R., Wilson E.M. (1997): Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. J Mol Med 75: 198-207

Kennedy D.G., Hewitt S.A., McEvoy J.D.G., Currie J.W., Cannavan A., Blanchflower J., Elliot C.T. (1998): Zearanol is formed from *Fusarium spp.* Toxins in cattle *in vivo* Food Addit Contam 15: 393-400

Kiang D.T., Kennedy B.J., Pathre S.V., Mirocha CH.J. (1978): Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res* 38: 3611-3615

Kime D.E., Ebrahimi M., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., Moore H., Ollevier F. (1996): Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquat Toxicol* 36: 223-237

Klecka G.M., Gonsior S.J., West R.J., Goodwin P.A., Markham D.A. (2001): Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environ Toxicol Chem* 20: 2725-2735

Kotoulas I.G., Cardamakis E., Michopoulos J., Mitropoulos D., Dounis A. (1994): Tamoxifen treatment in male infertility. Effect on spermatozoa. *Fertil Steril* 61: 911-914

Krska R., Josephs R. (2001): The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fres Anal Chem* 369: 469-476

Kyselova V., Peknicova J., Boubelik M., Buckiova D. (2004): Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenol* 61: 1307-1325

Kyselova V., Peknicova J., Boubelik M., Buckiova D. (2003): Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight in vivo outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1:30 (www.rbej.com)

Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H. (1987): Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Reg Tox Pharm* 7: 253-306

Kumi-Diaka J., Townsend J. (2003). Toxic potential of dietary genistein isoflavone nad beta-lapachone on capacitation and acrosome reaction of epididymal spermatozoa. *J Med Food* 6:201-208

Lauren D.R., Ringrose M.A. (1997): Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Addit Contam* 14: 435-443

Lenga R.E. (1987): *The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data*. Edition 1. Sigma-Aldrich Corporation

Leung T.Y., Choy C.M., Yim S.F., Lam C.W., Haines C.J. (2001): Whole blood mercury concentrations in sub-fertile men in Hong Kong. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 41:75-77

Levesque H.M., Dorval J., Hontela A., Van Der Krak G.J., Campbell P.G. (2003): Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental exposures. *J Toxicol Environ Health A* 66: 657-676

Lindholm, C., Pedersen, K.L. and Pedersen, S.N. (2000): Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol* 48: 87-94

Linhart O., 2004. Řízená reprodukce ryb. VÚRH JU Vodňany, 200 s

Linhart O., Cosson J., Mims S.D., Shelton W.L., Rodina M. (2002): Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reprod* 124: 713-719.

Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot Europe. *Eur J Plant Path* 108: 597-609

MacGregor J.I., Jordan V.C. (1998): basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50: 151-196

Manning, C.S., Lytle, T.F., Walker, W.W., Lytle, J.S. (1999): *Environ Contam Toxicol* 37: 258-266

Messina M. J. (1999): Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 70:439S-450S.

Miyata K., Yabushita S., Sano M., Okuno Y., Matsuo M. (2003): Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormone responsiveness in F1 male rats. *J Toxicol Sci* 28: 149-163

Nakahara H., Shono T., Suita S. (2003): Effects of prenatal exposure to phthalate ester on both testicular descent and urogenital development in rats. *Fukuoka Igaku Zasshi* 94: 331-337

Ngim C.H., Foo S.C., Boey K.W. and Jeyaratnam J. (1992): Chronic neurobehavioral effects of elemental mercury in dentists. *Br J Ind Med* 49: 782-790

NIOSH (1990) Pocket Guide to Chemical Hazards, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centre for Disease Control, National Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) 90: 117

NTP (National Toxicology Program) (1982): NTP Technical report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A (CAS No. 80-05-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP-80-35. NIH 82: 1771

NTP (National Toxicology Program) (1982): Carcinogenesis bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice. National Program Technical Report Series N 255

NTP (1985a): Teratologic evaluation of bisphenol A (CAS No. 80-05-7) administered to CD-1 mice on gestational days 6-15. NTP, NIEHS, Research Triangle Park, NC

Ohsako S., Kubota K., Kurosawa S., Takeda K., Qing W., Ishimura R., Tohyama C. (2003): Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly after subacute administration of the antiandrogen flutamide. *J Repro Dev* 49: 275-290

Pfohl-Leskowicz, A., Chemie-Ghedira, L. and Bacha H. (1995): Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Ox J Life Science Carcinogenesis* 16:2315-2320

Peknicova J., Kyselova V., Buckiova D., Boubelik M: Effect of endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. Amer J Reprod Immunol 47:311-318,2002

Piikivi L., Hanninen H. (1989): Subjective symptoms and physiological performance of chlorine-alkali workers. Scand J Environ Health 15: 69-74

Pluim H.J., de Vijlder J.J., Olie K., Kok J.H., Vulsama T., van Tijn D.A., van der Slikke J.W., Koppe J.G. (1993): Effects of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. Environ Health Perspect 101:504-508

Psenicka M., Alavi S.M.H., Rodina M., Gela D., Nebesarova J., Linhart O., (2007): Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biol of the Cell 99: 103-115.

Reddy P.R., Rao J.M. (1972): Reversible infertility action of testosterone propionate in human males. Contracept 5: 295-301

Rodina M., Cosson J., Gela D., Linhart O. (2004): Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.) Aquacul Inter 12: 119-131

Routledge E.J., Sumpter J.P. (1997): Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. J Biol Chem 272: 3280- 3288

Safe S. H. (2000a): Bisphenol A and related endocrine disruptors. Toxicol Sci 56:251-252

Sáenz de Rodriguez C.A. (1984): Environmental hormone contamination in Puerto Rico. N Eng J Med 310: 1741-1742

Sax N.I., Lewis R.J., Van Nostrand Reinhold (1989): dangerous properties of industrial materials, seventh edition, New York

Semczuk M., Semczuk-Sikora A. (2001): New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. Med Sci Monit 7: 332-340

Sethi-Saberwal G., Gill-Sharma M.K., Balasinor N., Choudhary J., Juneja H.S. (2003): Effect of tamoxifen treatment on motility related proteins in rat spermatozoa. *Cell Mol Biol* 49: 627-633

Sharp R.M. , Skakkebaek N.E. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395

Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. (2001): Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39: 1435-1438

Skakkebaek N. E., Berthelsen J.G., Giwercman A., Miller J. (1987): Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gynocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Nadrol* 10: 19-28

Skinner M.K., Anway M.D. (2007): Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit Rev Oncogol* 13: 75-82

Sohoni P., Tyler C.R., Hurd K., Caunter J., Hetheridge M., Williams T., Woods C., Evans M., Toy R., Gargas M., Sumpter J.P. (2001): Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35: 2917-2925

Sonnenschein C., Soto A. M., Fernandez M. F., Olea N., Olea-Serrano M. F., Ruiz-Lopez M. D. (1995): Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 41:1888-1895

St. Louis V.L., Sharp M.J., Steffen A., May A., Barker J., Kirk, J.L., Kelly D.J., Arnot S.F., Keatley B., Smol J.P. (2005): Some sources and sinks of monomethyl and inorganic mercury on Ellesmere Island in the Canadian High Arctic. *Environ Sci Technol* 39: 2686-2701

Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T. and Harris, L.R. (1998): A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosph* 36: 2149-2173

Steindhart G.F. (2004): Endocrine disruption and hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 545: 203-215

Strauss L., Santti R., Saarinen N., Streng T., Joshi. S., Mäkelä S. (1998) Dietary phytoestrogen and their role in hormonally dependent disease. *Toxicoll Lett* 102-3:349-354

Swain E.B., Engstrom D.R., Brigham M.E., Henning T.A., Brezonik P.L. (2004): Increasing rates of atmospheric mercury deposition in midcontinental North America. *Science* 257: 184-787

Szuets P., Mesterhazy A., Falkay G.Y., Bartok T. (1997): Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuffs. *Cereals Res Comm* 25: 429-436

Tabata A., Watanabe N., Yamamoto I., Ohnishi (2004): *Water Sci Technol* 50: 125-132

Taylor M.R., Holmes P., Duarte-Davidson R., Humfrey C.D.N., Harrison P.T.C. (1999): *Sci Total Environ* 233: 181-191

Tyler C.R., Jobling S., Sumpter J.P. (1998): *Crit Rev Toxicol* 28: 319-361

Ueno Y., Kubota K. (1976): DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Res* 36: 445-451

Vilela, M.L.B, Willingham, E., Buckley, J., Liu, B.C., Agras, K., Shiroyanagi, Y., Baskin, L.S. (2008): Endocrine disruptors and hypospadias: Role of genistein and fungicide vinclozolin. *Urology*, 70: 618-621

vom Saal F. S., Cooke P. S., Buchanan D. L., Palanza P., Thayer K.A., Nagel S. C., Parmigiani S., Welshons W. V. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and the other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14:239-260

Voordeckers J.W., Fennell D.E., Jones K., Haggblom M.M. (2002): Anaerobic

biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments. *Environ Sci Technol* 36: 696-701

Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambre C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D.: *Crit Rev Toxicol* 30: 71-133 (2000)

Wakeling A.E., Dukes M., Bowler J. (1991): A potent specific pure antiestrogen with clinical potencial. *Cancer Res* 51: 3867-3873

Wang J.S., Groopman J.D. (1999): DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 424: 167-181

Weaver G.A., Kurtz H.J., Behrens J.C., Robison T.S., Seguin B.E., Bates F.Y., Mirocha C.J. (1986b): Effect of zearalenone on dairy cows. *Am J Vet Res* 47: 1826-1828

Wester P.W., Canton H.H. (1992): Histopathological effects in *Poecilia reticulata* (guppy) exposed to methyl mercury chloride. *Toxicol Pathol* 20: 81-92

White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol* 135: 175-182

Williams B.A., Mills K.A.T., Burroughs C.D., Bern A. (1989): Reproductive alteration in female C57BL/Crgl mice exposed neonatally to zearalenone an estrogenic mycotoxin. *Cancer Lett* 46: 225-228

Wong C., Kelce W.R., Sar M., Wilson E.M. (1995): Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem*, 270: 19998-20003

Yamashita F., Hayashi M. (1985): Fetal PCB syndrome : clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. *Environ Health Perspect* 59:41-45

Younglai E.V., Wu Y.J., Foster W.G. (2007): Reproductive toxicology of environmental toxicants, emerging issues and concerns. *Curr Pharm Des* 13: 3005-3019

Zhang F.P., Pakarainen T., Poutanen M., Toppari J., Huhtaniemi I. (2003): The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 100: 13692-13697

Použité internetové odkazy:

[2009-01-30]: www.ffcr.or.jp

[2009-04-22]: http://www.irz.cz/latka/rtut_a_sl

[2009-01-25]: <http://chemfinder.camsoft.com>

SEZNAM ZKRATEK

AM= aktivační médium

AR= androgenní receptor

ATP= adenosintrifosfát

BPA= bisfenol A

BSA= Bovine Serum Albumin= hovězí sérový albumin

cAMP = cyklický adenosin-3'5'-monofosfát

CAS= registrační číslo ED

DDT= dichlordifenyiltrichlormethylmethan

DES= diethylstilbesterol

DM= demembranační medium

DMSO= dimethylsulfoxid

ED= endokrinní disruptor

EDTA= ethylendiamintetraoctová kyselina

ER= estrogenní receptor

FHB= Fusarium head blight= hlavičková plíseň

HEPES= 4-(2-hydroxyethyl)1-piperazinethansulfonová kyselina

Hg= rtuť

HgCl₂= chlorid rtuťnatý

IARC= International Agency for research of Cancer

IR= imobilizační roztok

LOAL= Lowest Observed Adverse Effect Level= nejnižší pozorovaný nežádoucí účinek na úrovni

LOEC= Lowest Observed Effect Concentration= nejnižší koncentrace s pozorovanými efekty

NOAL= No Observed Adverse Effect Level= žádný pozorovaný nežádoucí účinek na úrovni

NPK-P= nejvyšší přípustná koncentrace chemické látky v pracovním ovzduší

NTP= National Technology Program

PBC= polychlorované bifenyly

PEL= Permissible Exposure Limit= přípustný limit expozice

PVC= polyvinylchlorid

Ppb= parts per billion= jedna miliardtina

Ppm= parts per million= jedna miliontina

RGB= red, green, blue

RM= reaktivační médium

SEM= skenovací elektronový mikroskop

TAL= taleranol

TEM= transmisní elektronový mikroskop

VIN= vinklozolin

ZAL= zearanol

ZEN= zearalenone

α ZOL, β ZOL= α – zearalenol, β - zearalenol