

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Laboratoř rostlinných biotechnologií,  
společná laboratoř ÚEBAV ČR v.v.i. a VÚRV

# **Hormonální a jiná endokrinní disruptory v životním prostředí**

Hormone remedies and other endocrine disruptors  
within the living environment

Bakalářská práce  
oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Robert Pfitzner

**Vedoucí bakalářské práce:**

RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Laboratoř rostlinných biotechnologií ÚEB AV ČR

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Radky Podlipné, Ph.D., a že jsem v ní všechny použité materiály řádně citoval. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze popísemně a s mou souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. července 2010.

***Poděkování***

*Velice děkuji své školitelce RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. za její vedení mé bakalářské práce, odbornou pomoc a velkou trpělivost.*

## **Abstrakt**

S rozvojem lidského pokroku nastává problém s kontaminací životního prostředí kolem nás nejrizičnějšími chemickými látkami, pocházejícími z mnoha odvětví antropogenní činnosti. Mezi látky, které tímto způsobem kontaminují naše okolí, jsou sloučeniny schopné ovlivnit endokrinní systém organismů narušením fyziologických funkcí endogenních hormonů. Spolu s přirozeně se vyskytujícími látkami vykazujícími estrogenní aktivitu jsou označovány jako endogenní disruptory. Tyto exogeny mají společné strukturální rysy jako hormon estrogen, proto jsou schopné interakce s estrogenními receptory. Nebezpečnost těchto látek spočívá v tom, že ovlivňují biologické funkce již při velmi nízkých koncentracích. V současné době probíhá souběžně s rozvojem instrumentálních metod intenzivní výzkum vlivu na životní prostředí, včetně člověka.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o vlivu endokrinních disruptorů na životní prostředí, rozdělení podle jejich zdrojů, souhrnně naznačit metody analýzy a možnost jejich odbourávání pomocí biodegradace.

## **Klíčová slova:**

Endokrinní disruptory, estrogenita, xenoestrogeny, fytoestrogeny

## **Abstract**

The progress of modern society has brought along the issue of environmental contamination with various chemical substances which ensue from all kinds of anthropogenous activity. Among the substances which contaminate the living environment in this way are compounds that influence the endocrine system of an organism by disrupting the physiological function of its endogenous hormones. These compounds are known as endogenous disruptors and alongside certain substances of natural origin they, too, show estrogenic activity. The exogens in question have similar structural features, such as the hormone estrogen, which is why they can interact with estrogenic receptors. The compounds are dangerous in that they can influence biological functions, despite being at very low concentrations. At present, intensive research employing the latest instrumental methods is carried out with the aim of assessing the impact of these compounds on mankind and its living environment.

The aim of this bachelor's thesis is to summarise the present knowledge of the impact of endocrine disruptors on the living environment, classify them according to their source and outline the methods of analysis as well as the possibility of their decomposition with the help of biodegradation.

## **Keywords:**

Endocrine disruptors, estrogens, xenoestrogens, phytoestrogens

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	6
<b>2. Endokrinnídisruptory</b> .....	7
2.1. Molekulárnímechanismushormon ůad ůvodyjehonarufeníendokrinními disruktory.....	7
<b>3. Zástupciendokrinn ěaktivníchlátek</b> .....	8
3.1. Endogenníestrogeny.....	8
3.2. Fytoestrogeny.....	8
3.2.1. <i>Isoflavonoidy</i> .....	10
3.2.2. <i>Lignany</i> .....	11
3.2.3. <i>Kumestany</i> .....	12
3.2.4. <i>Stilbeny</i> .....	13
3.3. Mykoestrogeny.....	13
3.4. Xenoestrogeny.....	14
3.4.1. <i>Ftaláty</i> .....	14
3.4.2. <i>Alkylfenoly</i> .....	15
3.4.3. <i>BisfenolA</i> .....	15
3.4.4. <i>Farmaceuticképreparáty</i> nabázium ělýchestrogen ů.....	16
<b>4. Chemickáanalýza</b> .....	17
4.1. Prekoncentrace .....	17
4.2. Plynováchromatografie .....	18
4.3. Kapalinováchromatografie.....	19
<b>5. Metodydetekceestrogenity</b> .....	20
5.1. Aktivacegenu.....	21
5.2. Prolifera čníkontrola.....	21
5.3. Vitellogeninjakobioindikátor .....	22
5.4. Laktoferrinjakobioindikátor .....	22
<b>6. Orienta čníobsahendokrinníchestrogen ůvevodách</b> .....	23
<b>7. Biodegradace</b> .....	24
<b>8. Záv ěr</b> .....	26
<b>9. Literatura</b> .....	27

# 1. Úvod

V posledních pětidešeti letech prudce stoupla produkce látek, které jsou v životním prostředí schopny interagovat s endokrinním systémem člověka a volně žijících zvířat.<sup>[1]</sup> Jedná se o širokou skupinu látek antropogenního charakteru využívaných zejména pro lidskou medicínu. Jejich společným rysem je chemická příbuznost s endogenním hormonem estrogenem.<sup>[2]</sup> Pokud k těmto látkám připočteme látky přírodního původu, jež mají obdobné účinky na hormonální systémy jako látky umělé, vznikne skupina souhrnně nazývána endokrinní disruptory.

Nebezpečí pro životní prostředí spočívá především v tom, že některé tyto látky jsou biologicky aktivní již při velmi nízkých koncentracích. S vývojem metod instrumentální analýzy se tyto sloučeniny dostaly do popředí zájmu, protože byly detekovány ve vodách po celé světě. Ze začátku nebyla těmto stopovým množstvím přikládána velká váha, než byla prokázána jejich spojitost s abnormálním reprodukčním vývojem vodních živočichů. Nejprostudovanější v tomto směru jsou ryby<sup>[3]</sup>, ale důkazy se postupně objevují u různých živočichů, jako jsou například aligátoři<sup>[4]</sup>. V současné době probíhají výzkumy mezi expozicí člověka a rostoucím výskytem některých nemocí (poruchy reprodukčního systému, vývojové vady plodu). Souběžně jsou prováděny výzkumy možnosti zefektivnění účinnosti čištění odpadních vod a degradaci endokrinních disruptorů pomocí mikrobiologických a enzymatických metod. Doposud se rovněž dostává možnost odbourávat tyto látky fyto-remedací, což je metoda využívající zelené rostliny.

## 2. Endokrinní disruptory [ED]

Jsou definované podle EPA ( *Environmental Protection Agency*) jako exogenní látky, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou většinou odpovědné za homeostázi, reprodukci, vývoj a chování. <sup>[5]</sup>

### 2.1. Molekulární mechanismus hormonů a důvody jeho narušení endokrinními disruptory

Hormony jsou biokatalyzátory, které produkují endokrinní žlázy, tj. žlázy s vnitřní sekrecí.

Dostávají se v organismech buďně k cíli extracelulární cestou jako tzv. první poslové. Podle schopnosti prostupovat cytoplazmatickou membránou dělíme hormony na lipofilní a hydrofilní, lišící se způsobem předání signálu buďně.

Exogenní látky zodpovědné za endokrinní disrupci v organismu mohou působit receptorovým mechanismem nebo mechanismem nezávislým na receptoru.

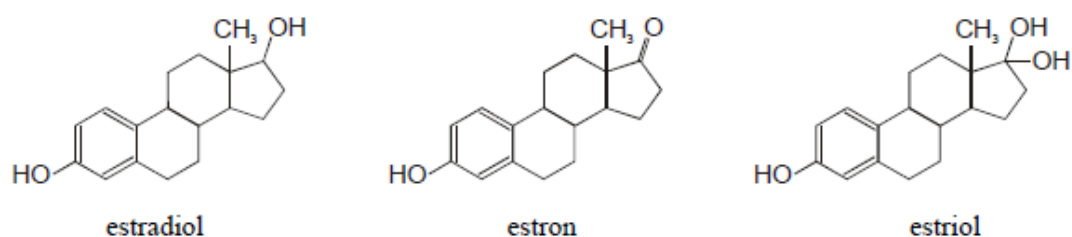
V jádře se vážou na specifické úseky DNA, jejichž aktivace má za následek zvýšení exprese cílového genu a tedy vyvolání buněčné odpovědi (projeví se například estrogenická látka). Pokud látka působí stejně jako přirozený ligand, nazýváme to agonizmus.

Na druhé straně, interakce některých látek s receptorem může negativně ovlivnit vázání receptoru na DNA a tím zablokovat funkci receptoru. Tento děj se nazývá antagonizmus. <sup>[6]</sup>

### 3. Zástupci endokrinně aktivních látek

#### 3.1. Endogenní estrogeny

Steroidní hormony jsou přirozenou cestou syntetizovány v těle živočichů. Krví se přenáší tak, že se váží na albumin a plazmatické proteiny. Nejúčinnějším hormonem této skupiny je  $17\beta$ -estradiol, další pak jsou estron a estriol.



*Obr.1: Endogenní estrogeny* [2]

Látky ze žej jsou přirozenou součástí metabolismu a rozdělují se podle úvodu vzniků na fytoestrogeny, mykoestrogeny a xenoestrogeny.

#### 3.2. Fytoestrogeny

Rozsáhlá skupina látek se steroidním účinkem vyskytující se přirozeně v rostlinách. Rostlin obsahujících tyto látky je známo mnoho a patří mezi ně především luštěniny, obiloviny, listová zelenina a mnohé další. Mají slabě estrogenní účinky, v některých koncentracích však mohou mít účinek i slabě antiestrogenní.

Mají mnoho pozitivních účinků na lidské zdraví. Ale stále vyvstává mnoho otázek ohledně upřesnění mechanismu účinku, o tom, jak ovlivňují zdraví člověka při dlouhodobé expozici. Studie například ukazuje, že genistein (fytohormon sóji luštěnaté (*Glycine hispida*), tak equol (hormonu podobná sloučenina vznikající bakteriálním metabolismem jiných fytoestrogenů v zažívacím traktu živočichů) mají za následek



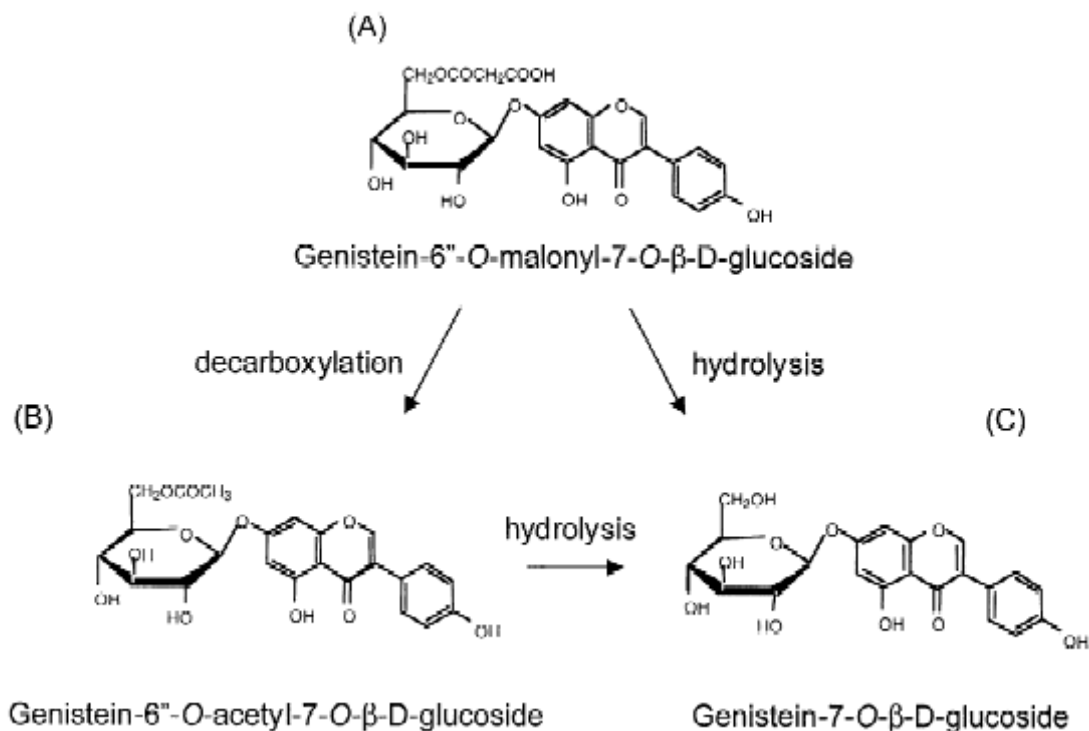
časné narušení potkaního estrálního cyklu a v případě genisteinu i předčasný nástup puberty potkanů.<sup>[7]</sup>

Další klinická pozorování vycházejí z poznání, že v řadě asijských zemí, kde je strava bohatá na sóju, nemají ženy rozvinuté klimakterické obtíže jako u evropské a americké populace. Pozorování, že samice zvířat žijící v zajetí a krmené sójou nemohou zabřeznout, že ovce pasoucí se na určitém druhu červeného jetele jsou neplodné, vedly k úvaze, že vysoký obsah fytoestrogenů v těchto rostlinách působí u vyšších živočichů jako endogenní estrogény.<sup>[8]</sup>

Chemická struktura a biogeneze je ovšem odlišná od endogenních estrogenů. Společným znakem je fenolové jádro molekule, které působuje estrogenní vlastnosti fytoestrogenům, umožňuje jejich vazbu na estrogenní receptor. Tak jako přirozené estrogény se fytoestrogény vstřebávají střevem, podléhají enterohepatálnímu cyklu, konjugují se s kyselinou glukuronovou a sírovou, konjugáty jsou vylučovány do moči a žluči, kde podléhají enterohepatální cirkulaci.<sup>[9]</sup>

Jednotlivé formy fytoestrogenů se od sebe liší místem výskytu. Obecně lze říci, že v rostlinách se nacházejí převážně ve formě konjugovaných glykosidů (deriváty sacharidů). Ve fermentované potravě je nacházíme ve formě aglykonů.<sup>[7]</sup>

V sóji je hlavním fytoestrogenem genistein, ten se konjuguje s glykosidem 6'-*O*-malonyl- $\beta$ -glukosid, který se váže na isoflavonoid na sedmém uhlíku. Tento konjugát podléhá dekarboxylaci na 6''-*O*-acetyl- $\beta$ -glukosid, nebo hydrolyzou na  $\beta$ -glukosid.<sup>[10]</sup>

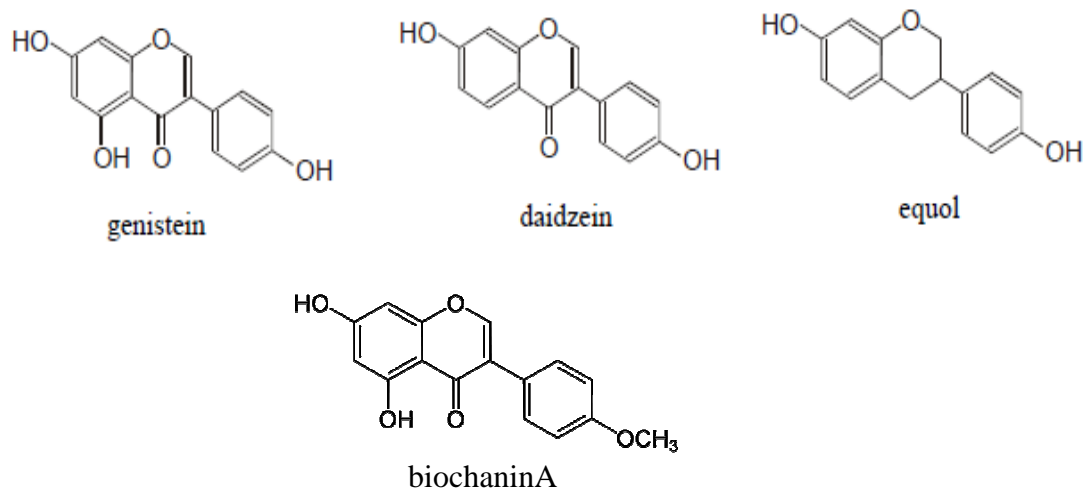


**Obr.2** :Chemickástruktura konjugovaných glykosidů genisteinu <sup>[10]</sup>

## Jednotlivé typy fytoestrogenů

### 3.2.1. Isoflavonoidy

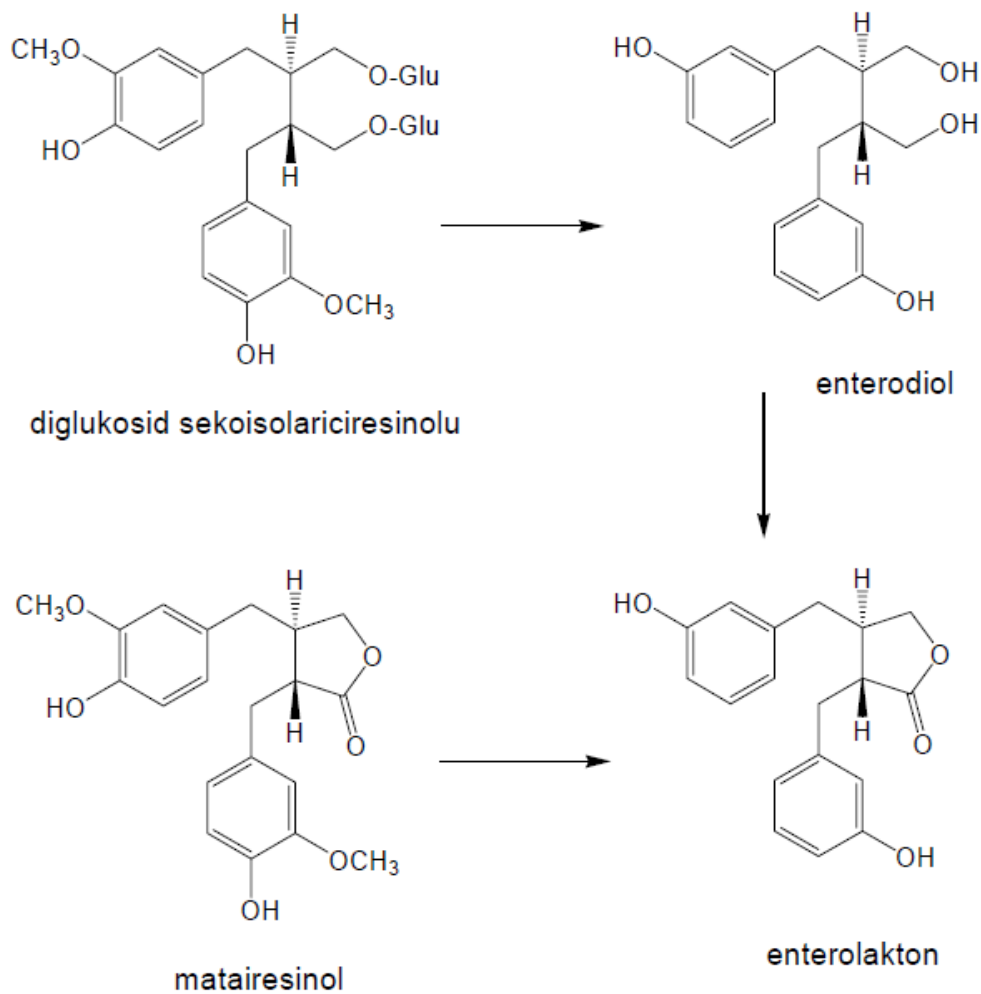
Jsou subtypem flavanoidů, typické pro určité druhy vikvovitých rostlin, kde se účastní chemických interakcí mezi rostlinou a jejími symbionty nebo patogeny. Nejvíce prostudované isoflavonoidy jsou daidzein, equol a genistein. Mohou existovat jako glukosidy a aglykony. Ve formě aglykonů jsou snadno vstřebávány epitelovými buňkami intestinálního traktu. V organismu živočichů konzumujících rostlinnou stravu působí isoflavonoidy jako antioxidanty, ovlivňují metabolismus steroidů a funkci estrogeního receptoru. V posledních letech probíhá také intenzivní výzkum inhibičního působení některých isoflavonoidů (např. biochanin A, genistein) na nádorové buňky a u některých z nich již byl prokázán pozitivní účinek při léčbě rakoviny prostaty. <sup>[11]</sup>



**Obr.3** :Isoflavonoidy <sup>[2]</sup>

### 3.2.2. Lignany

Jsou polyfenoly odvozené od fenylalaninu. Většina výzkumů fytoestrogenů je zaměřena na sójové isoflavonoidy, přesto jsou lignany hlavním zdrojem fytoestrogenů v typické západní stravě. Jsou přítomny v celé řadě rostlinných produktů, včetně semen (len, dýň, slunečnice, mák, sezam), obilninách (žito, oves, ječmen, pšenice) fazolích, ovoci a zelenině. Nejbohatším zdrojem lignanů je lněné semeno. Některé již prozkoumané lignany nemají estrogenní účinky (matairesinol a diglukosid sekoizolariciresinolu), ale slouží jako prekurzory pro enterodiol a enterolakton vznikající v zažívacím traktu s pomocí střevních bakterií. Tyto látky již vykazují slabý estrogenní účinek. <sup>[12]</sup>

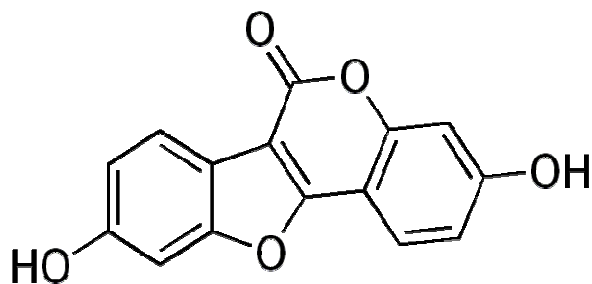


**Obr.4** :Lignanyajejichprekurzory,fitoestrogenylignan ovéhop úvodu<sup>[12]</sup>

### 3.2.3. Kumestany

Jsou další důležitou skupinou fytoestrogenů. Je jich velké množství, nicméně jen velmi málo z nich působí jako estrogény. Ale ty, které estrogení účinky mají, jsou přibližně desetkrát silnější než isoflavonoidy

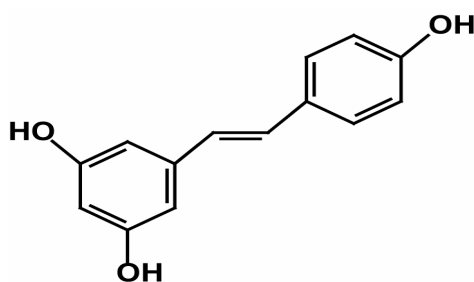
Mezi nejvýznamnější – estrogeně aktivní – kumestany patří kumesterol a 4'-methoxykumesterol. Jejich zdrojem je v první řadě vojtěška (*Medicago sativa*). V nemalých koncentracích je nalezneme i v některých druhích jetele (*Trifolium repens*) a kumesterol byl prokázán i v klíčcích semenech sóji.<sup>[13]</sup>



Obr.5 :Kumesteron

### 3.2.4. Stilbeny

Stejně jako isoflavonoidy jsou produkovány fenylpropanoid -acetátovou cestou. Nejznámějším stilbenem je resveratrol, který se nachází především v slupkách a semenech vinné révy, ale také například v bobulovkách. Má dva izomery z nichž pouze *trans* izomer je biologicky aktivní. Ovlivňuje metabolismus lipidů a působí jako silný antioxidant chránící buňky před volnými radikály. <sup>[7]</sup>



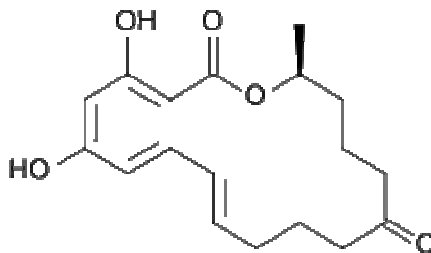
Obr.6 :Resveratrol

### 3.3. Mykoestrogeny

Jsou látky s estrogením účinkem produkované některými plísněmi. Nemají steroidní strukturu, mohou však reagovat se estrogením receptorem.

Nejznámějším mykoestrogenem je zearalenon a jeho deriváty. Zearalenon je mykotoxin produkovaný mnoha polními plísněmi zahrnující *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*. Mykotoxin je běžný v kukuřici a v kukuřičných produktech, ale byl zjištěn také v sóji a v různých obilovinách. U domestikovaných zvířat, jako jsou všechny druhy savičů, zearalenon spolupůsobí se estrogeními receptory a způsobuje zjevný nadbytek estrogenu, čímž snižuje plodnost. Zearalenony jsou přenášeny i do mléka krav krmených kontaminovanou stravou, což představuje riziko zvláště u

dětí.[14] Pro nutnost sledování mykoestrogenů v krmivech byly vyvinuty standardizované pracovní postupy identifikace pomocí HPLC.<sup>[15]</sup>



*Obr.7 :Zearalenon*

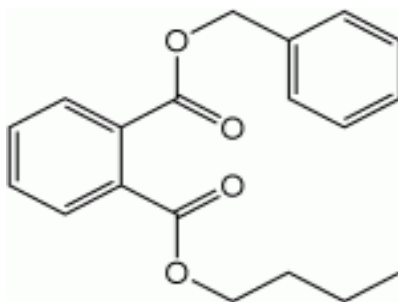
### 3.4.Xenoestrogeny

Jsou průmyslově vyráběné látky, které se chemicky liší od přirozeně se vyskytujících estrogenů produkovaných organismy. Někdy se také označují jako environmentální estrogení kontaminanty. Tyto látky je velké množství a jsou připravovány pro průmyslové účely. Velmi významným zdrojem jsou také farmaceutické přípravky používané jako hormonální antikoncepce.

**Vybrané xenoestrogeny, na kterých probíhají intenzivní výzkumy:**

#### 3.4.1. Ftaláty

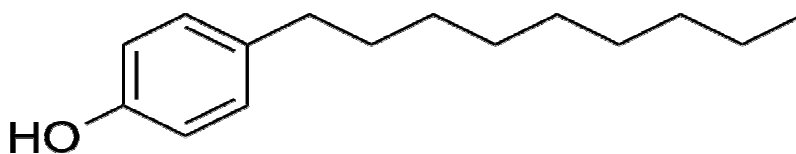
Jsou jednou z nejvíce se vyskytujících skupin antropogenních chemikálií v životním prostředí. Jsou průmyslově produkovány ve velkém množství, zvláště jako součásti plastů, z kterých se mohou uvolňovat do vody, půdy a případně do potravy. Např. butylbenzyl-ftalát se používá při výrobě linoleí, adheziv a syntetické kůže; jiné ftaláty se velice často používají jako změkčovadla v obalech potravin, v PVC a celulózech. Díky lipofilním vlastnostem mají ftaláty tendenci se akumulovat v tukových tkáních a mohou se také efektivně absorbovat přes kůži.<sup>[16]</sup>



*Obr.8 :Butylbenzyl-ftalát*

### 3.4.2. Alkylfenoly

Používají se pro úmyslový výrobě alkylfenol-polyethoxylátů sloužících jako aniontové detergenty a jako oxidanty. Ačkoliv samotné detergenty nejsou estrogenní, zpracování jimi kontaminované vody v čistírnách odpadních vod rozkladem aktivovaným kalem vede ke vzniku perzistentních hydrofobních metabolitů s estrogenní aktivitou. Ty se kumulují v čistírenském kalu. Nejproblematictější alkylfenol nonylfenol napodobuje přirozený hormon  $17\beta$ -estradiol.<sup>[17]</sup>

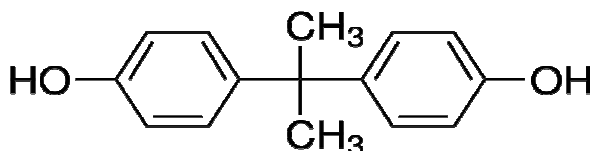


*Obr.9 :Nonylfenol*

### 3.4.3. Bisfenol A

Chemicky 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan je silně hydrofilní organická látka připravená již v roce 1891 kondenzací fenolu s acetonem. Dlouho neměl bisfenol žádné významné využití, ale s rozvojem chemie polymerů se stal důležitou surovinou pro přípravu plastů. V současné době je využíván zejména při přípravě polykarbonátových plastů, které se používají při výrobě makrolonových desek, nádob na tekutiny, kojeneckých lahví, nosičů CD a DVD, campingových přístorů, dóz na potraviny, k ošetření vnitřního povrchu konzerv apod. Laboratorní testy potvrdily, že bisfenol A se dostává do potravin, které jsou v kontaktu s polykarbonáty a lze jej

dokázat v krvi lidí, kteří takové potraviny konzumují. Bisfenol A nachází stále širší použití také ve stavebnictví, elektronice, medicíně, potravinářském průmyslu i jinde a jeho roční světová produkce se pohybuje kolem 3 milionů tun a rok od roku roste. Vzhledem k těmto expozičním cestám a množství vyprodukovaného bisfenolu A, představuje v současné době nejvýznamnější endokrinně disruptivní kontaminaci pro člověka.<sup>[18]</sup>



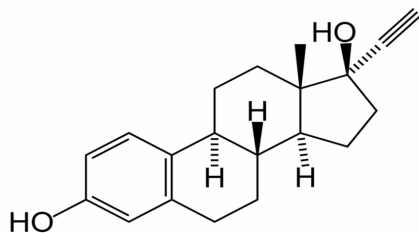
*Obr.10 :BisfenolA*

#### 3.4.4. Farmaceutické preparáty na bázi umělého estrogenu

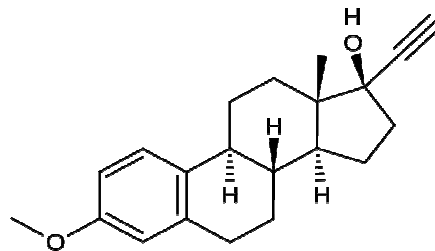
Jsou konstantní složkou kombinovaného hormonálního antikoncepce. Od okamžiku, kdy byl mestranol nahrazen 17  $\alpha$ -ethynylestradiolem se 17  $\alpha$ -ethynylestradiol objevuje jako nedílná součást každého přípravku. Rozdíl je pouze v množství hormonu v pilulce obsažené a kolísá mezi 15 až 50 mikrogramy. Za standard jsou dnes považovány přípravky s nízkou dávkou. Pro 17  $\alpha$ -ethynylestradiol je typický velmi silný „first-pass“ efekt, který snižuje jeho biologickou dostupnost v organismu ženy. V játrech jsou časně zvyšuje aktivitu jaterních enzymů, v menší míře proteinových komplexů. Klinicky velmi významným a nezastupitelným je především jeho příznivý vliv na zvyšování sérové hladiny proteinů vázajících pohlavní hormony.<sup>[19]</sup>

Tyto látky jsou v těle metabolizovány na jejich konjugáty s kyselinou glukuronovou a vyloučeny močí. Tyto konjugáty jsou následně, při zpracování splaškové vody aktivovaným kalem, hydrolyzovány glukoronidasou, produkovanou mikroorganismy (např. *Escherichiacoli*), zpětně na formy syntetického estrogenu a kyseliny glukuronové. Estron a 17  $\alpha$ -ethynylestradiol jsou tak často detegovány ve výpustích městských odpadních vod.<sup>[17]</sup>





**Obr.11** :17  $\alpha$ -ethynylestradiol



*Mestranol*

## 4. Chemická analýza

Analýza steroidních estrogenů ve vodách je obtížný analytický úkol vzhledem ke složitosti matice a nutnosti dosáhnout velmi nízkých a detekčních limitů, kdy již jsou estrogeny biologicky aktivní. Je zřejmé, že analýza vyžaduje vysoce citlivé analytické metody, kombinované se efektivním zkoncentrováním vzorku. V současnosti se nejvíce používají dvě metody stanovení. Separace pomocí plynové chromatografie (CG), nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) následnou detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (MS) a množství je určeno hmotně.

### 4.1. Prekoncentrace

Její nutnost je dána často velmi malým obsahem stanovované látky v matrici. Charakter všech operací se vzorkem, který předchází vlastnímu stanovení, závisí na typu matrice, jeho složitosti, druhu, množství a koncentraci analytu. Steroidy se vyskytují převážně ve vodných roztocích, a proto se používá na prekoncentraci nejčastěji klasická extrakce kapalina–kapalina (LLE) a kapalina–tuhá fáze (SPE).

**Extrakce kapalina – kapalina (LLE)** má své nevýhody v časové náročnosti a spotřebě velkého množství toxických organických rozpouštědel. Přesto se občas používá časově méně náročná kontinuální extrakce LLE, například z vodné fáze do dichlormethanu.<sup>[20]</sup>

**Extrakce pevným sorbentem (SPE)** je metoda nejčastěji používaná i vzhledem ke experimentální jednoduchosti, snadné automatizaci a nižší spotřebě rozpouštědel v porovnání s LLE.<sup>[20]</sup>

Nejběžnější sorpční mechanismus je založen na hydrofobní interakci. Sorpční materiály jsou komerčně dostupné a pro estrogeny jsou nejběžněji využívány alkyl-křemičitany nebo polymerní sorbenty např. polystyren-divinylbenzen. Nevýhodou konvekčních SPE sorbentů je případná nedostatečná selektivita na cílovou skupinu analytů. Tento problém se dá vyřešit pomocí vysoce specifických imunosorbentů založených na antigen-protilátkových interakcích. [20]

## 4.2. Plynová chromatografie

Separace pomocí GC se využívá pro analýzu estrogenů často. Výhody GC zahrnují vysokou separační účinnost, vysokou rychlost analýzy, dostupnost vysoce citlivých detektorů a v neposlední řadě šetrnost k životnímu prostředí. Vzhledem k tomu, že mobilní fáze jsou inertní plyny. Nejčastěji používanými detektory jsou hmotnostní spektrometry (MS).

Estrogeny můžeme analyzovat pomocí GC přímo, ale jejich převodu do více těkavých derivátů se obvykle dává přednost. Jednou z nejběžnějších derivatizačních metod je silylace. [20]

Ke stanovení estrogenů se v současné době používá mnoho různých variant založených na klasické GC-MS. Asi nejvýznamnější je SPME GC-MS/MS, která byla optimalizována na stanovení pěti estrogenů ve vodách (estron [E1], 17- $\beta$ -estradiol [E2], estriol [E3], 17- $\alpha$ -ethynylestradiol [EE], diethylstilbestrolu). Tato metoda je až o tři řády přesnější než klasická GC-MS. Srovnání v tabulce je podle dosažených výsledků z dvou různých laboratoří. Pro GC-MS jsou hodnoty (viz Tabulka 1) od *Morteani et al. 2006* [21], pro SPME GC-MS/MS jsou použity hodnoty *Mitani et al. 2005*. [22]

*Tabulka 1. Detekční limity pro estron [E1], 17β-estradiol [βE2], estradiol [E3], 17α-ethynylestradiol [EE] [21,22]*

Stanovovaná látka	Detekční limity u GC-MS [ng/l]	Detekční limity u SPME GC-MS/MS [pg/l]
E1	7,4-11	2,7
βE2	1,3-11	7,4
E3	1,7-10	11,7
EE	1,6-51	10,5

### 4.3. Kapalinová chromatografie

Patří rovněž mezi užívané metody analýzy environmentálně významných estrogenů. Výhodou této metody je, že analýza může být provedena přímo bez derivatizace a vodné roztoky nevyžadují sušení, které je u CG nezbytné. Na druhé straně, nevýhodou klasického HPLC je vysoká spotřeba rozpouštědla a velký nákladů na instrumentální vybavení laboratoře. Samotná analýza opět předchází prekoncentrace, nejčastěji pomocí SPE. Separční HPLC systémy často využívají jako stacionární fázi oktadecyl. Jako mobilní fáze se využívá vodný roztok acetonitilu kombinovaný s pufrem. [20]

#### Pro stopová stanovení estrogenů se používá mnoho instrumentálních sestav založených na bázi LC-MS:

K stanovení E1, E2, EE z různých druhů matric je výhodné použít velice citlivé metody LC-ESI-MS/MS ( *Liquid Chromatography ElectroSpray Ionisation tandem Mass Spectrometry* ). Detekční limity u této metody jsou závislé na analytu a rozsahu 0,1 ng l<sup>-1</sup> až 2 ng l<sup>-1</sup>. [23] Při elektrosprejové ionizaci (ESI) je eluát z kolony veden do

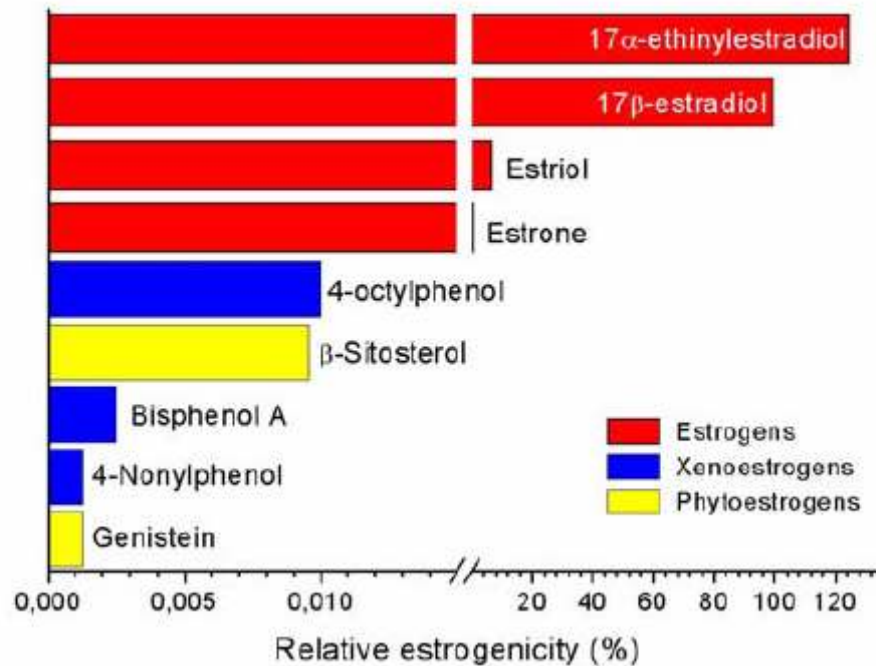
pneumatického zmlžovače, na který je přivedeno vysoké napětí. Kapilky se nabíjejí a předpařování roste hustota naboje na jejich povrchu a dochází k ionizaci [24]

Velmi rychlé analýzy k efektivnímu oddělení jedenácti estrogenů ve vodných matricích bylo dosaženo s použitím UPLC ( *Ultra Performance Liquid Chromatography*) na krátkém sloupci s mikrozrny. Doba analýzy výsledků činí méně než 8 minut, což je pouhá jedna šestina času potřebného pro konvenční HPLC. Meziroční stabilita je asi 5 ng l<sup>-1</sup>. [20] UPLC je nově vyvinutý separační proces, který využívá sorbentů připravených patentovanou technologií " *bridged hybrid particle* ". Sorbenty vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý proces probíhá z velké části při vysokém tlaku (100 MPa). [25]

Pro detekci estrogenů se využívají i jiné detektory než MS. Koncentrace může být stanovena také UV spektrofotometrickým, nebo fluorescenčním detektorem, avšak detekční citlivost je horší než poskytují MS. Z tohoto důvodu jsou tyto jednoduché a nenákladné postupy využívány především k stanovení analytů s vyššími koncentracemi.

## 5. Metody detekce estrogenu [16]

Je třeba rozlišovat mezi analytickým stanovením jednotlivých látek a stanovením jejich celkových estrogenních účinků. Estrogenitu nelze určit pouze na základě chemické struktury (lze ji předpovědět), k jejímu určení se používají různé biologické metody. V zásadě většina estrogenních látek má společné strukturální rysy, a to přítomnost fenolu nebo jeho funkčního ekvivalentu, lipofilitu, jistou odolnost vůči metabolismu, schopnost bioakumulace v tukových tkáních a membránách. Toto však není nutnou podmínkou estrogenního působení, neboť estrogení receptory jsou schopné vázat širokou skupinu steroidních látek.



**Obr.12: Relativní estrogenita vybraných ED** [26]

Z grafu lze vyčíst, že nejvyšší estrogení aktivitu vykazují steroidní estrogény. Phytoestrogeny a xenoestrogeny mají aktivitu výrazně nižší.

### 5.1. Aktivace genu

Určité geny jsou specificky regulovány působením estrogenů skrze estrogenový receptor tak, že komplex estrogen-receptor interaguje s určitým elementem v regulační oblasti příslušného genu. Metoda genové aktivace je založena na sledování indukce chloramfenikol acetyltransferázy, která je úměrná koncentraci estrogenů. Tato technika je tedy založena na specifickénostilátke působícímediovanou genovou expresi a regulaci skrze estrogenový receptor.

### 5.2. Proliferační kontrola

Estrogeny jsou látky schopné vyvolat mitotickou stimulaci tkání samičích genitálního ústrojí. Proto sledování buněčné proliferace je důležitým klíčem při určování a odhadu estrogenity. Chceme-li zjistit, zda-li je určitá látka estrogení, musíme sledovat její schopnost vyvolání proliferace buněk, jenž jsou schopny na přítomnost estrogenů reagovat. Screening estrogenů pomocí samičích tkání není možný,

jelikož byla popsána indukce mitotického dělení pouze u samičích sekundárních pohlavních orgánů. V současnosti se používá tzv. E-SCREEN test. Je to *in vitro* test používající buněčnou kulturu rakovinných buněk prsu. Jsou-li buňky přestovány bez přítomnosti estrogenních látek neproliferují.

### 5.3. Vitellogenin jako bioindikátor

Vitellogenin je fosfolipoglykoprotein a slouží jako hlavní prekurzor proteinů vaječného žloutku. Vitellogenin je syntetizován v játrech pod kontrolou estrogenů, zpravidla u dospělých samic. Je p řítomný v plasmě samic několik měsíců před ovulací. U dospělých jedinců u samců není za normálních podmínek detekován, jestliže však detekován je, pak to značí expozici endogenními nebo exogenními estrogeny nebo látkami se estrogení aktivitou. Obecně platí, že zvýšené množství vitellogeninu značí zvýšenou expozici environmentálními estrogeny. Pro screening estrogení aktivity je možné vytvoření monoklonální protilátky vitellogeninu pro mnoho živočišných druhů.

### 5.4. Laktoferrin jako bioindikátor

Laktoferrin se používá jako biomarker estrogenity u savců. Je to železo-vázající glykoprotein. V molekule obsahuje dvě vazebná místa pro kation  $Fe^{3+}$ , nebo bikarbonátový anion. Má mnoho biologických funkcí, např. obrana proti bakteriím a virům, podpora DNA syntézy, zapojení do imunitního systému, inhibice růstu nádorů, ap. Má také růst-stimulující aktivitu. Jeho množství je regulováno různými mechanismy lišícími se v různých tkáních. Právě jeho indukce estrogeny v děloze (nejčastěji myší) se využívá ke screeningu. Při expozici vnějšími estrogeny se jeho hladina mnohonásobně zvýší.

## 6. Orientační obsah endokrinních estrogenů v úvevodách

V Praze se produkce estrogenů u ženskou populací odhaduje na 2,1 g/den. Byly provedeny výpočty, které odhadly množství estrogenů v odpadních vodách na 50 ng/l. V roce 2004 byla provedena studie, která mapovala koncentrace těchto látek v pražských vodních tocích, včetně vtoků a výpustí ČOV. V tocích byly celkové koncentrace estrogenů většinou těsně nad úrovní detekčních limitů (detekční limity jednotlivých estrogenů byly 1 ng l<sup>-1</sup>). Splašková odpadní voda vtékající do ČOV byla estrogeny látkami kontaminovaná do značné míry. Čistící proces množství estrogenických látek snížil, avšak koncentrace byly stále vysoké. [27]

**Tabulka 2.** Koncentrace estrogenů [27]

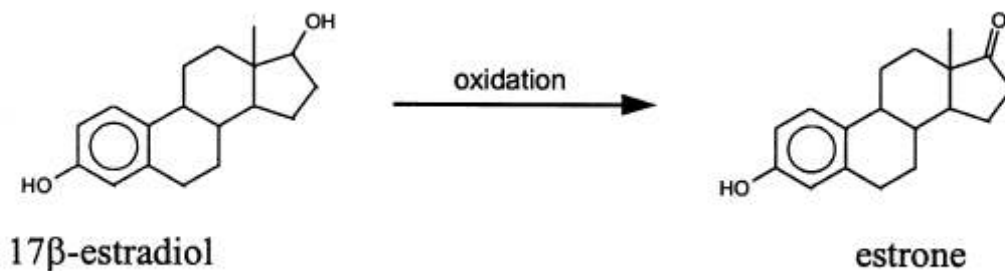
Zdroj	Místo odběru	BE2	E3	E1	Celková koncentrace
		[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]
Vltava	Jarov (3 km před Prahou)	<1	<1	<1	<1
Vltava	Veslařský ostrov	3,8	<1	<1	3,8
Vltava	Kralupy (15 km za Prahou)	3,4	<1	<1	3,4
Centrální čistička	vtok z kanalizace do čističky	<1	350	55	405
Centrální čistička	první výpusť do Vltavy	<1	100	<1	100
Centrální čistička	druhý výpusť do Vltavy	2	<1	75	77
Centrální čistička	třetí výpusť do Vltavy	2	<1	65	67

Stanovení estrogenů u výpustí ČOV probíhalo na mnoha místech po celém světě s obdobnými naměřenými koncentracemi. Například ve Velké Británii 1 ng l<sup>-1</sup> až 120 ng l<sup>-1</sup>, Německo 1 ng l<sup>-1</sup> až 90 ng l<sup>-1</sup>, Kanada 1 ng l<sup>-1</sup> až 150 ng l<sup>-1</sup>. [28,29,30] Probíhají výzkumy k zdokonalení technologických postupů, jenž by v čistícím procesu estrogenické látky lépe eliminovaly.

## 7. Biodegradace

Biodegradaci rozumíme buď úplné rozložení nebo jejich částečnou transformaci na degradací produkty díky mikrobiální aktivitě aktivovaného kalu. Účinnost odstranění estrogenů metodou aktivovaného kalu je nejefektivnější součástí čistícího procesu v ČOV. Je však třeba rozlišit jestli je tento úbytek způsoben biodegradací, nebo fyzikálními procesy. Sorpce jako nejvýznamnější z těchto procesů a je uskutečňována dvěma hlavními mechanismy - absorpcí a adsorpcí. Absorpce probíhá na základě hydrofilní sloučenin (alifatické, aromatické), jejich navázání na lipofilní membrány mikroorganismů a lipofilní část kalu. Adsorpce využívá působení elektrostatických sil mezi pozitivně nabitými skupinami xenobiotik a záporně nabitým povrchem biomasy.<sup>[31]</sup>

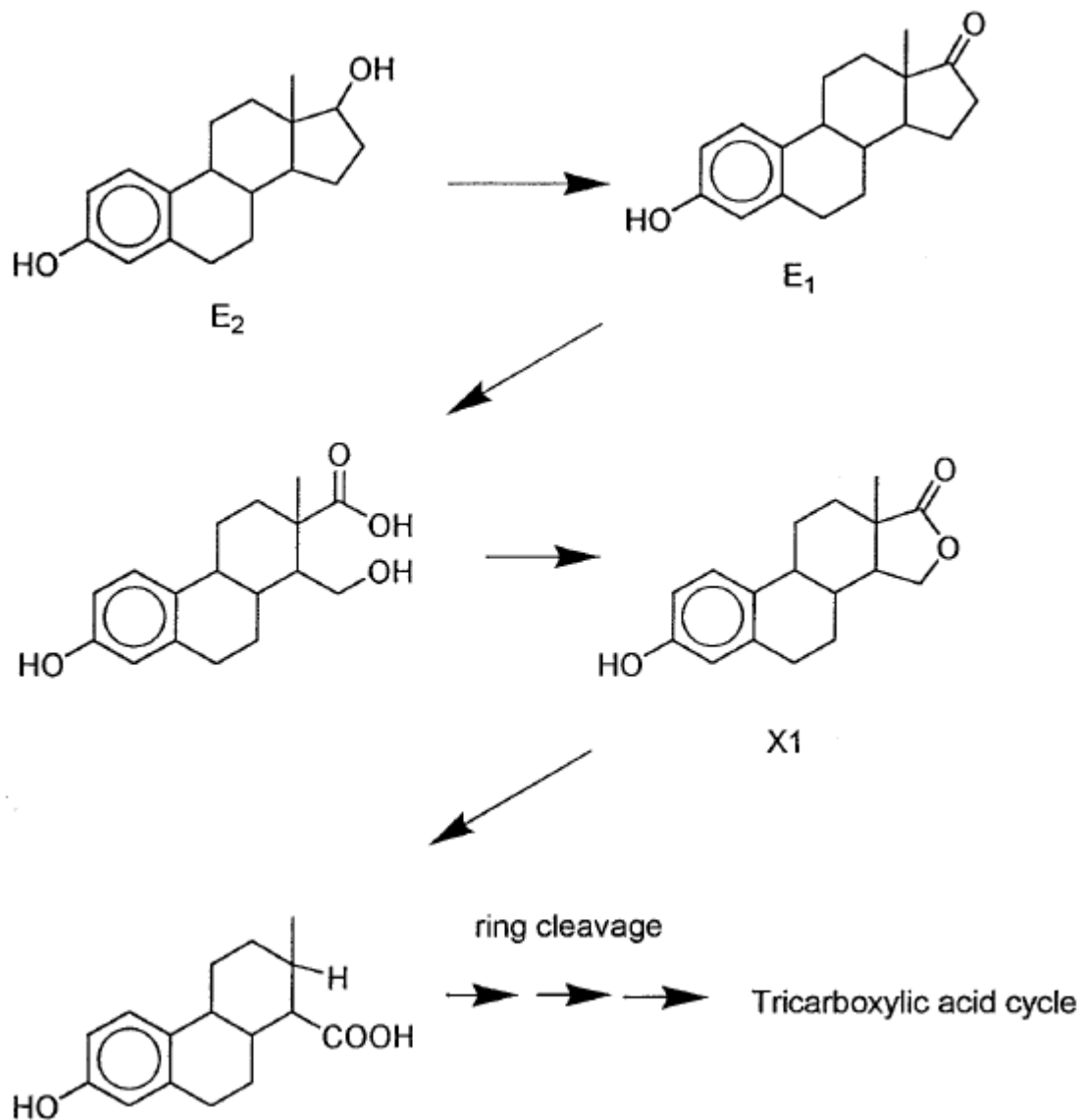
Při výzkumu se z řadě aktivovaným kalem prováděném v laboratorních podmínkách se sledovaly úbytky estronu a 17 $\beta$ -estradiolu. Bylo prokázáno, že 17 $\beta$ -estradiolu se velice rychle oxiduje na estron. Degradace estronu již probíhá pomalu a v tomto výzkumu nebyly detekovány žádné produkty rozpadu.<sup>[32]</sup>



**Obr.13** : Oxidace 17 $\beta$ -estradiolu na estron <sup>[32]</sup>

Probíhající experimenty hledají kmeny bakterií, jimž by bylo možno obohatit aktivovaný kal a vykazovaly schopnost degradace estrogenů až na látky bez estrogení aktivity. Tato schopnost byla nalezena například u bakterií kmene *Rhodococcus*, které pomocí enzymatického aparátu rozkládají estrogení skelet, rychlostí vhodnou na případné širší využití.<sup>[33]</sup>





**Obr.14** :Navrženádegrada čnídráha17β-estrodíolu [33]

Možnosti biodegradace jsou studovány také u jiných organismů než jsou bakterie. Asi nejslibnější je výzkum probíhající na houbách bílého dřeva, které díky produkci nespecifických ligninolytických enzymů dokáží odbourávat nejrozsáhlejší látky včetně ED.[34]

V oblasti dekontaminace životního prostředí od ED se začíná uvažovat o využití fytoremediace. Tato moderní, ekologicky šetrná metoda využívá k odstranění škodlivých látek prostředí zelených rostlin. Je však třeba vést intenzivní výzkumy, neboť se zatím o akumulaci, biotransformaci ani ovlivnění metabolismu rostlin v přítomnosti těchto látek, mnoho neví.

## 8. Závěr

Zvýšedk ů mnoha studií vyplývá, že kontaminace životního prostředí ED je vsou časném industriálním sv ěte problém, kterým je nutno se zabývat na v ědecké úrovni. P ři sou časném vývoji civilizace nelze p ředpokládat sestupnou tendenci ve využívání látek sestrogenními ů ěinky. Vd ůsledku toho je d ůležité hledat možnosti jejich sekundárního odstran ění. Koncentrace estrogen ů v povrchových vodách dosahují častolimit ů, jenž dokážou ovliv ňovat fyziologické funkce vodních organism ů. Protože mají většinou dobrou schopnost akumulace, hrozí nebezpečí zasažení potravních řetězců.

Technologie využívané v ČOV nejsou prozatím koncipovány na dekontaminaci estrogenů a jejich ů ěinnost je tedy náhodná. Alternativou, pro životní prostředí velmi šetrnou, jsou biologické čistírny odpadních vod. Schopnost odstran ění látek sestrogenní aktivitou však u nich ještě nebyla dostatečně prokázána a vyžaduje další výzkum.

## 9. Použitá literatura

- [1] **J.J.AmaralMendes:** *The endocrinedisrupters: amajormedicalchallenge*, Food andChemicalToxikology, **2002**,781-788
- [2] **H.Kujanová,V.Sýkora,P.Pitter** : *Látkysestrogennímú čínkemvevodách* ,Chem. Listy101, **2007**,706–712
- [3] **S.Jobling,M.Nolan,C.R.Tyler,G.Brigity:** *WidespreadSexualDisruptionin WildFish,Environ.Sci.Technol* ., **1998**,2498–2506
- [4] **LouisJ.Guilletteet.al:** *AlligatorsandEndocrineDisruptingContaminants:A CurrentPerspective*, AmericanZoologist **2000**40(3),438–452
- [5] **ThomasM.Crisp,Ph.D.et.al:** *Specialreportonenvironmentalendocrine disruption*, **1997**,RiskAssessmentForumstr.1
- [6] **P.Macíková,** *Endokrinnídisruptorydetekovanéinvitrosystémuv r ůznýchsložkách prostředí*,Bakalářskápráce,P řFMUBrno **2007**
- [7] **J.Miná řová,** *Fytoestrogeny*,Bakalářskápráce,P řFMUBrno **2006**
- [8] **H.Patisaul:** *Atrazineactsinthebraintodisruptthehormones thattrigger ovulation*.**2009** ,EnvironmentalHealthNews
- [9] **M.Vrzá ňová,J.Heresová:** *Fytoestrogeny*, **2004**/1Internímedicínapropraktické lékaře
- [10] **Chao-ChengWanga,JeevanK.Prasaina,Stephen Barnes:** *Reviewofthe methodsusedinthedeterminationofphytoestrogens* ,JournalofChromatography , **2002**, 3–28
- [11] **VŠCHTPraha:** *Imunoanalýzaisoflavonoid ů*  
<[http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy\\_cz.html](http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy_cz.html)>[cit.10.8.2010]
- [12] **JHarmatha:** *Strukturníbohatstvíabiologickývýznamlignan ů*,Chem.Listy99 **2005**,622–632
- [13] *Tajemnýsv ěthormon ů*  
<<http://www.hormony.estranky.cz/clanky/fytohormony/kumestan-kumesterol-fytoestrogen-vigna-hormon.html>>[cit.18.8.2010]
- [14] **Biotox** <<http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/zearalenon.php>>, [cit.18.8.2010]
- [15] **Ústředníkontrolníazkušebníústavzem ědělský:** 561–*Stanoveníobsahu mykotoxinůmetodouHPLC–zearalenon*

- [16] **I. Holobek, L. Čadová:** *Estrogeny v životním prostředí ředí*, 2000, *Klinická onkologie* 25–30
- [17] **Z. Křesinová, K. Svobodová, T. Cejthaml:** *Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek*, *Chem. Listy* 103, 2009, 200–207
- [18] **J. Patočka:** *Nebezpečí plastových lahví*, *Toxikology* 2008
- [19] **V. Unzeitig :** *Aktivita hormonů a jejich vliv na organizmus uživatelsky orální antikoncepce*, *Moderní gynekologie a porodnictví* 14, 2005, č. 1
- [20] **V. Pacáková, L. Loukotková, Z. Bosáková, K. Štulík:** *Analysis of estrogens as environmental pollutants*, *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 867–882
- [21] **K. Mitani, M. Fujioka and H. Katanka :** *Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 2005 Volume 1081, Issue 2, 218–224
- [22] **G. Morteani, P. Möller, A. Giganti, Tomas Pace s:** *Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague*, *Environ. Geochem. Health*, 2006, 28, 257–264
- [23] **S. Zuehlke, U. Duennbier, T. Heberer :** *Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 11, 2007
- [24] **Kombinace chromatografických metod**, Univerzita Pardubice, přednáška [cit. 18.8.2010]
- [25] **Chromatografické fórum**, <<http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm>> [cit. 18.8.2010]
- [26] **Y. Filali-Meknassiet al:** *Analytical methodologies for determination of natural and synthetic steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry*, *Canadian Association on Water Quality*, 2004
- [27] **G. Morteani, P. Möller, L. Eichinger, C. Prein falk, T. Pačes:** *Bestimmung von Einzelöstrogenen im Oberflächenwasser des Einzugsgebietes der Stadt Prag*, *Zeitschrift der Fachsektion Hydrogeologie* 4/ 2004
- [28] **H. M. Kuch, K. Ballschmiter:** *Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC–(NCI)–MS in the Picogram per Liter Range*, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(15), pp 3201–3206
- [29] **Guang-Guo Ying and Rai S. Kookana:** *Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment*, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37(7), pp 1256–1260

- [30] **A.Svenson,A.S.Allard:** *OccurrenceandSomePropertiesoftheAndrogenic ActivityinMunicipalSewageEffluents* ,JournalofEnvironmentalScienceand Health,PartA,Volume39, **2005**,pages693–701
- [31] **JanKotyza,PetrSoudek,ZdeněkKafka,TomášVaněk:** Lé číva–,„nový“ enviromentální polutant,
- [32] **T.A.Ternes,P.Kreckel,J.Mueller:** *Behaviourandoccurrenceofestrogensin municipalsewagetreatmentplantsII.Aerobicbatch experimentswithactivated sludge*,TheScienceoftheTotalEnvironment225,1999.9 1–99
- [33] **SamirKumarKhanal et.al:** *Fate,Transport,andBiodegradationofNatural EstrogensintheEnvironmentandEngineeredSystems* ,EST,VOL.40,NO.21, **2006**
- [34] **Soon-HoYim,HyunJungKimandIk-SooLee:** *Microbialmetabolismofthe environmentalestrogenbisphenolA*, Archivesofpharmacalresearch, **2003**,Volume 26,Number10,805-808