

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jaroslav Semerád

ENDOKRINNÍ DISRUPTORY U PLAZŮ

Endocrine Disruptors in Reptiles

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne

Abstrakt

Informace o schopnosti některých kontaminantů životního prostředí ovlivnit reprodukci a vývoj obratlovců prostřednictvím narušení endokrinního systému je velmi rozšířená. Avšak přesný mechanismus, prostřednictvím něhož xenobiotika působí, může být velmi složitý a lišit se druh od druhu. Velmi vhodným modelem ke studiu dopadu těchto sloučenin na populace živočišných druhů se díky různým způsobům determinace pohlaví (genotypově či environmentálně) a rozmnožování (oviparie a viviparie) zdají být plazi. Pohlaví je u mnohých druhů závislé na teplotě během inkubace vajec a aplikací xenogenních steroidních hormonů nebo enzymatických inhibitorů lze tuto determinaci zvrátit. Právě této nestálosti určování pohlaví u některých plazích druhů lze využít jako markeru pro dopady látek s endokrinně disruptivním efektem (EDC), a to i pro extrémně nízké dávky a směsi sloučenin. Novorozená mláďata vystavená EDC během embryogeneze navíc umožňují další způsob zkoumání endokrinní disrupce, kterým je měření hladiny steroidních hormonů v jejich krvi. Navíc mnoho druhů plazů žije v prostředí bohatém na vodu, v blízkosti zemědělských oblastí, kde je používání pesticidů nejintenzivnější, a jsou masožravci či mrchožrouti, což zvyšuje počet možných zdrojů expozice. Mnozí rovněž produkují vejce s flexibilní skořápkou, která umožňuje snadný přenos vody mezi okolní půdou a hnízdem po dobu inkubace. Tato vejce mohou přes skořáčku vstřebat i větší molekuly, jež dokáží změnit fenotyp vyvíjejícího se embrya. Dále prostřednictvím působení malých dávek pesticidů, jako je atrazín, používaných v jejich přirozeném prostředí, může být pozměněno i chování novorozených mláďat, jež je kritické pro přežití raného období, kdy jsou kořistí predátorů.

Klíčová slova

Atrazín, behaviorální vzorce, bisfenol A, deformace gonád, EDC, endosulfan, metyltiofanát, morfologické abnormality, plazi, reverze pohlaví, řídnutí vaječné skořápky, steroidní hormony, steroidogeneze.

Abstract

The ability of environmental contaminants to influence reproduction and development in vertebrates via disruption of the endocrine system is widespread. The mechanisms through which xenobiotics act can be complex and vary greatly among species. Reptiles are particularly good models for studying endocrine affecting compounds due to the fact that different species differ in modes of sex determination (genotypic sex determination or temperature-dependent sex determination) and parity (oviparity or viviparity). The sex of individual is often determined by egg incubation temperature, and exogenous application of steroid hormones and their analogs or steroidogenic enzyme inhibitors can reproduce effects of temperature. The lability of sex determination in some reptile species offers opportunity to use gonadal sex as a marker for effects of endocrine disrupting compounds (EDC), even for the effects of extremely low dosages of EDCs or EDC mixtures. The neonatal offsprings exposed to EDCs during embryogenesis provide yet another way to assess endocrine disruption, i.e., measurement of steroid hormone levels in their blood. In addition, many reptile species are highly aquatic, they use habitats near agricultural areas, where usage of pesticides is the most intense, and they are carnivores or scavengers. Therefore, the number of the potential sources of exposition is high. Many of reptiles also produce flexible-shelled eggs, which readily exchange moisture with the surrounding soil in the nest during incubation. These eggs have capacity to incorporate larger molecules across the eggshell that can influence phenotype of developing embryos. Furthermore, behavior of neonatal reptile offspring, which is critical for survival during the time of intense predation, can be altered by low doses of pesticides such as atrazine present in their natural habitats.

Key words

Atrazine, behavioral patterns, bisphenol A, EDC, endosulfan, eggshell thinning, gonadal deformation, methyl thiophanate, morphological abnormalities, reptiles, sex reversion, steroid hormones, steroidogenesis.

Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování panu docentu Mgr. Lukáši Kratochvílovi, Ph.D. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Rovněž bych mu chtěl poděkovat za vstřícnost a pomoc při získávání potřebných informací a podkladů.

Obsah

Seznam zkratk.....	7
Úvod	8
1 Obecná fakta o endokrinních disruptorech	10
1.1 Historický vývoj problematiky.....	10
1.1.1 EDC v kontextu Evropské unie	12
1.2 Základní charakteristika	13
1.2.1 Mechanismy endokrinní disrupce	13
1.3 Metody stanovování EDC	17
2 Série testů in vivo na zástupcích třídy plazů	19
2.1 Změny v pohlavní diferenciaci.....	19
2.2 Řídnutí vaječné skořápky	20
2.3 Vliv EDC na biosyntézu steroidních hormonů	22
2.4 Poruchy v behaviorálních vzorcích.....	25
3 Diskuze.....	27
Závěr	29
Literatura	30

Seznam zkratek

EDC	Endokrinně disruptční chemikálie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
BPA	Bisfenol A
E ₁	Estron
E ₂	Estradiol
E ₃	Estriol
END	Endosulfan
BrdU	Bromodeoxyuridin
ATZ	Atrazin
MT	Methyl-thiophanate
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
NR	Nukleární receptor
ER	Estrogenní receptor
AR	Androgenní receptor
SXR/PXR	Pregnanový X receptor
CAR	Konstitutivní androstanový receptor

Úvod

V posledních dvou desetiletích vzrostl počet studií potvrzujících schopnost některých chemických sloučenin negativním způsobem ovlivňovat endokrinní systémy živých organismů. Vystavení těmto látkám v kritických období vývinu může způsobit nezvratné defekty, které se projeví až v pozdějších fázích života. Právě tyto toxikologické vlastnosti spolu se schopností bioakumulace a perzistence v životním prostředí vzbuzují obavy, že endokrinně disruptční látky (EDC) mohou působit také jako mutageny či karcinogeny. Nicméně přesná identifikace možných rizik souvisejících s dlouhodobou či krátkodobou expozicí představuje zatím nejednotný a poměrně neorganizovaný proces, obzvláště v případech, kdy chemické sloučeniny zůstávají v tkáních jen velmi krátkou dobu po vystavení dané látce. Stále existují obrovské mezery ve znalostech týkajících se metod přípravy vzorků, analytických postupů a kritérií pro hodnocení škodlivosti. Vytvoření dostatečné teoretické základny v oblasti EDC se proto stalo jednou z hlavních priorit mnoha environmentálních politik.

Organizace WHO a Evropská unie definují endokrinní disruptory jako látky, které způsobují nežádoucí změny v organismu tím, že ovlivňují fungování endokrinního systému (Kortenkamp, 2011). Aby některá látka mohla být do této skupiny zařazena, musí nejdříve projít sérií testů *in vivo*. Potvrzení chemické sloučeniny jako EDC vyžaduje mnohdy i opakované série experimentů s různými dávkami látek a především na více generacích jedné populace. Současná kritéria také vyvolávají otázku ohledně volby zkoumaných objektů. Z důvodů obtížnosti identifikace vlivu EDC u některých živočišných druhů se převládající část výzkumu soustředí především na organismy, u nichž je ovlivnění nejvíce patrné, tedy na organismy, které v životním prostředí plní úlohu bioindikátorů. Pro účely výzkumu endokrinně disruptčních sloučenin u obratlovců bývají zpravidla vybíráni zástupci z řad ryb, hlodavců nebo plazů, jelikož se vyskytují v ekosystémech nejvíce zasažených potenciálními EDC.

Cílem této práce je shrnout základní fakta získaná při experimentálních studiích výhradně s plazy a vytvořit tak aktuální přehled poznatků o vlivu endokrinních disruptorů na jejich pohlavní dospívání a rozmnožování. Plazi nejen že se vyskytují v postižených ekosystémech, ale zpravidla bývají vystavováni hned několika zdrojům znečištění najednou. Kromě kontaminace půdního a vodního prostředí dochází rovněž

k ovlivnění potravního řetězce, který se u mnohých plazů skládá z vegetace, bezobratlých, ryb či z hlodavců, jež mohli být EDC také vystaveni.

První kapitola této práce představí stručný historický vývoj problematiky endokrinních disruptorů, dále současnou úpravu EDC v podmínkách Evropské unie a základní mechanismy působení endokrinně disruptčních sloučenin v živých organismech. Druhá kapitola se zaměří na vytvoření přehledu možných způsobů dopadu EDC na organismus jednotlivců a následně i na celé populace žijících zástupců skupiny Sauropsida.

1 Obecná fakta o endokrinních disruptorech

1.1 Historický vývoj problematiky

Vědci již před více než sedmdesáti lety začali mít podezření, že existují některé syntetické a přírodní sloučeniny, které dokáží napodobit chování řady hormonů v endokrinních systémech živočichů a lidí. Dnes jsou tyto sloučeniny souhrnně označovány jako endokrinní disruptory (EDC).

Slovní spojení endokrinní disruptory vzniklo ve Wisconsinu roku 1991 na *Wingspread Conference Center*. I když toto označení pro hormonálně aktivní látky je poměrně nové, problém sahá již do počátku 20. století. První vědecké zprávy zmiňující existenci látek vykazujících stejné vlastnosti jako endokrinní hormony se objevily již ve 30. letech dvacátého století. V této době, především v USA, kde vzniká první továrna specializující se na výrobu plastů, dochází k rapidnímu vzrůstu produkce polychromovaných bifenyly. Dalším významným milníkem se stalo objevení insekticidních vlastností DDT Paulem Hermannem Millerem. Během druhé světové války masivně vzrostlo uvolňování této látky do životního prostředí kvůli nadměrnému užívání v zemědělské výrobě a při vojenských operacích v tropických oblastech (Westerhoff, 2003).

Ve čtyřicátých letech se předmětem zkoumání staly molekulární konfigurace plnicí obdobné funkce jako estrogen a testosteron. Syntetická forma estrogenu, diethylstilbestrol (DES), se v těchto letech podávala ženám během těhotenství, aby se předešlo spontánním potratům. V důsledku této léčby přibližně jeden milion dcer, jejímž matkám byla podávána tato látka, trpěl různými problémy s reprodukčními orgány (strukturními abnormalitami), poruchami imunitního systému a návaly deprese. U těchto dívek byl zaznamenán i vyšší výskyt rakoviny. Ani synové zmiňovaných matek se neobešli zcela bez újmy. Projevily se u nich různé abnormality varlat (Bitman, 1970).

V 50. letech vědci zjistili, že se organochlorynové pesticidy akumulují v životním prostředí. Kvůli této bioakumulaci se DDT rozšířilo i do vzdálenějších míst, kde k jeho použití ani nedošlo. Zhruba o deset let později se zjistilo, že DDT má negativní vliv i na predátory živící se živočichy, ve kterých je toto DDT akumulované. Akumulace DDT v rybách, které sloužily jako potrava pro orla bělohlavého (*Haliaeetus*

leucocephalus) vedla ke snížení populace tohoto druhu. Kvůli vlivu metabolitu DDT, DDE, se špatně usazoval vápník ve skořápce vajec během procesu jejího vytváření, následkem čehož samice snášely vejce s tak tenkou skořápkou, že při inkubaci docházelo k jejich rozsednutí. Od začátku používání tohoto pesticidu do zhruba 60. let se průměrný počet vylíhnutých mláďat změnil ze dvou z každého hnízdění na jen jedno úspěšně vylíhlé mládě z pěti hnízdění (Mitra, 2011).

V 70. letech došlo ve Spojených státech k výrazné změně. Zformovala se organizace, známá pod zkratkou EPA, zabývající se ochranou životního prostředí, která následně zakázala výrobu hnojiv se škodlivým účinkem na živé organismy. V následujících letech proběhlo mnoho studií nežádoucích efektů u pesticidů a jiných, člověkem vyrobených, sloučenin nebo látek, což vedlo v osmdesátých letech k prokázání souvislosti mezi rozmnožovacími problémy některých živočišných druhů a kontaminanty v životním prostředí. Bližší spojitosti mezi organochloridovými pesticidy, jejich metabolity a endokrinní disrupcí byly prokázány až skupinou vědců z Floridy, která objevila, že aligátoři (*Alligator mississippiensis*) z jezera Apopka trpí různými reprodukčními poruchami. V 80. letech zde došlo k vystavení místních aligátorů DDT. Kvůli užívání pesticidu v zemědělství se DDT dostalo do vod jezera. Aligátoři v jezeře Apopka se tak vlivem DDT (DDE) stali téměř neschopni reprodukce. Disruptory způsobily, že mladé samice měly v krvi více estradiolu, což mělo za důsledek neobvyklou stavbu pohlavních orgánů. U mladých samců aligátorů se objevili nedostatečně vyvinuté genitálie a penis dosahoval pouze jedné poloviny či třetiny obvyklé velikosti. Nejhorší dopad mělo však DDT na aligátoří vejce. V běžných podmínkách snůšku nepřežije 20 až 30 %, ale v období kontaminace se toto procento zvýšilo až na hodnotu mezi 80 a 95% (Guillette, 2000).

Od počátku devadesátých let řada dalších studií potvrdila spojitost mezi endokrinními disruptivními látkami a zmenšováním některých populací živočichů. Například u mořských mlžů (*Nucella lapillus*) vystavených tributyltinu vylučovanému z některých protihnilobných barviv a PVC trubek došlo k výraznému populačnímu poklesu v důsledku reprodukčních poruch zahrnujících mimo jiné i intersexualitu, konkrétně rozvoj samčích pohlavních znaků u samic (Gibbs, 1991). Ve Velké Británii i Spojených státech se rovněž zjistil výskyt reprodukčních abnormalit i u ryb žijících pod odpadními vodami. Mezi těmito abnormalitami se objevily například změny na úrovni

pohlavních steroidů, v histologii gonád nebo došlo k zvýšení hladiny prekurzoru vaječného žloutku u samců (Jobling, 2005). Počáteční pokusy identifikovat příčinu feminizace u ryb v odpadních vodách byly zaměřeny na syntetické organické chemikálie, u nichž bylo známo, že mají estrogenní účinky. Tyto pokusy prokázaly, že farmaceutický EE2 (17-alfa etynylestradiol) by mohl přímo vyvolávat endokrinně škodlivé procesy v rybách. Objevení tohoto přímého vztahu podnítilo další výzkumné projekty zaměřující se na identifikaci stopových léčiv v životním prostředí. Nečekané dopady stopových koncentrací EDC na volně žijící živočichy vyvolaly obavy ohledně možných účinků těchto látek na člověka (Flynn, 2005).

1.1.1 EDC v kontextu Evropské unie

Výzkumná činnost v oblasti endokrinních disruptorů a s tím i související legislativní úprava spadají v rámci Evropské unii pod správu Evropské komise. Na základě sílících důkazů o spojitosti zdravotních problémů s EDC a z důvodu ochrany veřejného zájmu se Evropská komise rozhodla vytvořit legislativně podpořený výzkumný projekt za účelem identifikovat inkriminované chemické sloučeniny a omezit jejich užívání.

V roce 1996 Komise zorganizovala mezinárodní setkání ve Velké Británii, jehož náplní bylo prozkoumání možných dopadů narušení endokrinního systému na zdraví člověka a volně se vyskytujících organismů. Hlavní úkol summitu spočíval ve vytvoření dlouhodobého integrovaného plánu pro budoucí výzkum a monitorovací aktivity v této oblasti. Účastníci se shodli, že stávající výzkum je v této oblasti nedostatečný, a proto bylo navrženo hned několik okruhů, na které by se vědci měli v budoucích letech zaměřit (European Workshop, 2012). O dva roky později Evropský parlament přijal usnesení vyzývající Komisi, aby přijala opatření týkající se problematiky EDC a napomohla tak ke zlepšení legislativního rámce v této oblasti.

Dalším důležitým krokem v procesu vytváření účinné strategie bylo vydání souhrnné zprávy Vědeckým výborem pro toxicitu, ekotoxicitu a životní prostředí (SCTEE) s názvem „*Human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods*“ (1999), která upozornila na vážná nebezpečí hrozící živočichům ve volné přírodě. Výbor rovněž uvedl, že u řady druhů byly zaznamenány poruchy rozmnožování v souvislosti s endokrinními disruptory, jež zapříčinily výrazné změny v místních populacích. Ještě

v témže roce Komise zveřejnila Společnou strategii společenství „*Community Strategy for Endocrine Disruptors - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*“, která vytvořila jednotný rámec pro budoucí výzkum EDC (Commission documents, 2012).

V současné době se Komise snaží koordinovat spolupráci na mezinárodní úrovni s cílem zabránit duplicitnímu výzkumu, urychlit proces výzkumu a rozprostřít náklady mezi jednotlivé spolupracující země. Základní postupy a výzkumné priority jsou shrnuty v dokumentu *State of the Art Assessment of Endocrine disruptors* (Kortenkamp et al., 2011).

1.2 Základní charakteristika

Skupina látek narušující endokrinní systémy živočichů je velmi heterogenní, a to jak vlastnostmi, chemickým složením, tak i výskytem. V podstatě je možné tyto látky rozdělit do dvou hlavních kategorií: přírodní a syntetické sloučeniny. Mezi nejznámější syntetické endokrinní disruptory patří průmyslová rozpouštědla a jejich produkty (polychlorované bifenyly [PCB], polybromované bifenyly [PBB], dioxiny), plasty (bisfenol A dále jen BPA), plastifikátory – změkčovadla (ftaláty), pesticidy (DDT, atrazin), fungicidy (linuron), insekticidy (chlorpyrifos), léčiva (DES) a těžké kovy, které vznikají jako vedlejší produkty syntetických reakcí (Cd, Hg, As, Pb, Mn, Zn) (Diamanti, 2009).

1.2.1 Mechanismy endokrinní disrupce

EDC dokáží zvýšit či blokovat metabolismus přirozených hormonů a jiných xenobiotických chemikálií prostřednictvím aktivace nebo antagonizace nukleárních hormonálních receptorů. Některé z těchto látek mohou způsobit celogenomové epigenetické změny a ovlivnit tak průběh metylace DNA. Bylo rovněž prokázáno, že určité typy EDC ovlivňují metabolismus tuků a adipogenezi, čímž přispívají k rozvoji obezity a narušení celkového stavu homeostázy organismu (Tabb, 2005).

Nukleární receptory jako cíl endokrinní disrupce

V rámci rodiny nukleárních receptorů bylo doposud nejvíce testů provedeno v oblasti receptorů steroidních hormonů. Cílem těchto testů bylo zjistit, které exogenní látky dokáží steroidní hormony svými vlastnostmi napodobovat a jakým způsobem dochází k aktivaci příslušných receptorů.

Významnou roli v procesu regulace steroidních hormonů hrají pregnanový X receptor (SXR/PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR), které v reakci na xenobiotické ligandy a steroidní hormony zprostředkovávají indukci enzymů cytochromu P450, konjugačních enzymů a membránových transportérů (např. P-glykoprotein). SXR, stejně jako většina nukleárních receptorů, aktivuje transkripci příslušných genů po navázání ligandu. Naproti tomu CAR je konstitutivně aktivní ve většině případů, přičemž jeho vysoká bazální aktivita je potlačována steroidy a SRX bez navázaného ligandu. Aktivací SXR/PXR a CAR dochází ke změně biologické dostupnosti endogenních androgenů a estrogenů (Mu, 2005).

O nepřímé aktivaci steroidních receptorů hovoří ve své studii i Jansen (2004), který dokazuje že xenobiotické mastné kyseliny s krátkým řetězcem, kyselina valproová a methoxyoctová, zvyšují aktivitu hormonálních receptorů ($ER\alpha$, $ER\beta$, AR, progesteronového receptoru a receptorů hormonů štítné žlázy) změnou buněčných signálů, které buď aktivují proteinkinázy, nebo inhibují histon deacetylázy. Histon deacetyláza za normálních okolností přejímá z histonů acetylovou skupinu, čímž jim umožňuje navázat se na DNA a zabránit transkripci genů. Vystavení těmto mastným kyselinám s krátkým řetězcem zvyšuje buněčnou citlivost na estrogény, progestiny a jiné ligandy a zároveň zvyšuje transkripční účinnost ligandem aktivovaných nukleárních receptorů (Brown, 2000).

U některých nukleárních receptorů dochází k degradaci prostřednictvím ubikvitin-proteazomové dráhy. Tato degradace brání nadměrné stimulaci buněk endogenními hormony nebo jinými aktivačními signály. Inhibice ubikvitin-proteazomové dráhy reguluje transkripční aktivitu steroidních receptorů. $ER\alpha$ prochází různými stupni degradace v přítomnosti ER agonistů, antagonistů a selektivních modulátorů, které naznačují, že transkripční aktivita může být ovlivněna modulací receptorové stability. To vede k hypotéze, že EDC mohou ovlivňovat proteazomovou degradaci jaderných receptorů, popřípadě koregulační proteiny, čímž mají přímý vliv na rozsah a trvání hormonální odezvy (Wijayaratne, 2001).

Výše popsané mechanismy působí na mnoho aspektů transkripce a transkripční regulace, čímž ovlivňují načasování a množství exprese cílových genů. Tyto příklady narušení endokrinního systému podtrhují složitost transkripce spuštěné ligandem aktivovaným receptorem a poukazují na další potenciální cíle xenobiotické disrupce

signalizace endogenních hormonů (Tabb, 2005).

Přeprogramování metylace DNA a transgenerační dopady EDC

Procedury, jako je ozařování či chemoterapie, a sloučeniny, jako jsou toxiny vyskytující se v životním prostředí, představují hrozbu pro integritu genomu. Studie ukázaly, že tyto látky mohou mít za následek genetické nebo vývojové vady u potomků generace F1 exponované matky. Schopnost vnějších činitelů vyvolat transgenerační účinek vyžaduje stabilní chromozomální změny nebo epigenetické jevy, mezi něž patří metylace DNA (Daxinger, 2003).

Během období determinace gonadálního pohlaví fetální varle obsahuje steroidní receptory, což z něj činí potenciální cíl pro endokrinní disruptory. Androgenový receptor (AR) a estrogenový beta receptor (ER β) jsou přítomny v Sertolihových buňkách, které jsou prekursori peritubulárních myoidových a zárodečných buněk. Ačkoli steroidy nejsou v této fázi varletem produkovány, estrogeny a androgeny sloučeniny mají schopnost ovlivňovat buněčné funkce vznikajícího varlete. Z tohoto důvodu představuje působení exogenních steroidních látek v době determinace gonadálního pohlaví vysoké nebezpečí, jelikož mají potenciál přeprogramovat zárodečné linie prostřednictvím epigenetického mechanismu a způsobit tak transgenerační přenos pozmeněného fenotypu či genetické vlastnosti (Fischer, 2004).

Jediný dosud známý mechanismus mající vliv na přenos zárodečné linie zahrnuje změny v metylačním vzoru. Pokusy s vinklozolinem a methoxychlorem prokázaly, že krátké vystavení těmto EDC v době kritické pro diferenciaci gonadálního pohlaví vede k prosazování fenotypu způsobujícího sníženou spermatogenní kapacitu a mužskou neplodnost. U zkoumaných objektů však nebyly zpozorovány žádné abnormality ve zkoumané tkáni a hladiny testosteronu se pohybovaly v normálních hodnotách (Anway, 2005).

Obezigenní vlastnosti EDC

Přibývá důkazů, že expozice EDC *in utero* v koncentracích běžných v životním prostředí může prostřednictvím změn v genové expresi nebo imprintingu ovlivnit vývojové naprogramování plodu, které nemusí mít za následek viditelné dopady, jakými jsou například nízká porodní hmotnost či deformace, ale může se naopak způsobit

vytvoření funkčních deficitů, které nejsou patrné a zpravidla se projeví až v pozdějším věku v podobě větší náchylnosti k nemocem a obezitě (Baille-Hamilton, 2002).

Je zřejmé, že mnohé hormony a růstové faktory působí na diferenciaci tukové tkáně a metabolismus. Nicméně role estrogenů ve vývoji tukových buněk a tukové tkáně není jasná. U dospělých jedinců ztráta cirkulujícího estrogenu v důsledku ovariectomie vede ke zvýšení tělesné hmotnosti a hmotnosti tukové tkáně. Při pokusech s AERKO (alfa estrogen receptor knock-out) myšmi byl u nich zaznamenán zvýšený obsah tělesného tuku a snížená aktivita lipoproteinové lipázy. Stejná studie potvrdila, že genestein, fytoestrogen, který se váže jak na alfa, tak i na beta estrogenové receptory, vyvolává antilipogenní účinky, což má za následek snížení velikosti adipocytů (Naaz, 2003).

Otázkou působení estrogenů a endokrinně disruptivních látek s estrogenními vlastnostmi na vývoj adipocytů z prekurzorových buněk *in vitro* se zabývá i série studií od Masuno et al. V těchto publikacích autoři použily klonálně izolované linie myších fibroblastů (3T3-L1), které se mohou diferencovat v adipocyty, pokud jsou konfluentní kultury vystaveny inzulínu, dexametazonu a 1-methyl-3-isobutylxyntinu po dobu dvou dní. Jako markery diferenciaci v adipocyty byly použity exprese lipoproteinové lipázy a aktivita glycerol 3-fosfát-dehydrogenázy. Autoři dokazují, že přítomnost bisfenolu A, dokonce i v tak nízkých koncentracích jako 2 µg/ml, spolu s inzulínem stimulovala diferenciaci 3T3L1 buněk do adipocytů (Masuno, 2005).

Dále byl také zkoumán vliv 4-nonylphenolu (NP) na buněčnou proliferaci a tvorbu adipocytů. V návaznosti na hormonální indukci diferenciaci v adipocyty byly 3T3-L1 buňky vystavovány po 8 dní působení NP. Výsledky ukazují, že NP má schopnost stimulovat proliferaci plně diferencovaných 3T3-L1 buněk. NP v koncentracích 5 a 10 µg/ml způsobil snížení triacylglycerolů (TG) o 26% a 58%, v uvedeném pořadí, a rovněž snížení aktivity lipoproteinové lipázy (LPL) o 51% a 71% (Masuno, 2003).

Výsledky výše uvedených testů poukazují na možnost, že vystavení EDC dokáže ovlivnit průběh vývoje adipocytů. Diferenciaci může být inhibována, čímž dojde k vytvoření více potenciálních tukových buněk, jako tomu je v případě NP, nebo naopak může být diferenciaci stimulována (BPA). V obou případech je výsledkem zvýšený počet adipocytů a tedy i větší sklon k obezitě.

1.3 Metody stanovení EDC

Mezi nejčastěji používané metody pro kvantifikaci endokrinně disruptivních sloučenin patří metody analytické, mezi něž patří vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie / hmotnostní spektrometrie (GC/MS) a kapalinová chromatografie na principu LC-MS/MS. Tyto metody umožňují hloubkovou identifikaci a kvantifikaci látek s estrogenními vlastnostmi v pevných či kapalných vzorcích. Jejich hlavní nevýhodou však zůstává, že nejsou dostatečně citlivé pro přímé měření EDC ve vzorku, jelikož vyžadují přípravnou fázi. Tento prekoncentrační krok spočívá v extrakci EDC sloučeniny prostřednictvím L-L extrakce, extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi (SPME) nebo pomocí techniky SBSE (*stir bar sorptive extraction*) (Pocurull, 2002).

Dohromady tyto techniky umožňují přesnou detekci sloučenin s nízkou detekční hranicí, avšak neposkytují informace o estrogenních či antiestrogenních vlastnostech těchto molekul. Navíc se zaměřují pouze na specifické molekuly, u nichž již tyto vlastnosti byly identifikovány. Nicméně je možné pomocí *in vitro* a *in vivo* testů nevýhody analytických metod překonat (Kerdivel, 2013).

Existuje několik druhů *in vitro* testů, kterými je možno určovat endokrinně disruptivní potenciál jednotlivých látek. Tyto laboratorní metody představují teoretické východisko pro testy prováděné *in vivo*. Jejich aplikace umožňuje předem a s nižšími náklady určit, na kterou oblast působení EDC budoucí výzkum *in vivo* zaměřit.

První skupinou jsou testy zkoumající **schopnost potenciálních ligandů navázat se na receptor**. Aktivita látek či směsí je pro účely těchto testů hodnocena v porovnání s přirozenými ligandy. V průběhu testování je sledována kompetice s radioaktivně označeným přirozeným ligandem. Čím více neoznačené testované látky je ve vzorku přítomno, tím více radioaktivně označeného přirozeného ligandu je vytěsněno. Pro laboratorní pokusy se používají zejména receptory získané z cytozolového nebo jaderného extraktu ze savčích tkání či tkání jiných obratlovců. Bohužel tyto testy jsou schopné pouze určit, zda má daná látka vlastnosti odpovídající ligandu či ne, ale již nedokáží specifikovat, zda látka působí agonisticky nebo zda receptor inhibuje (antagonismus) (Kinnberg, 2003).

Druhou skupinu představují **testy s reportérovými geny**. Testy se provádí s geneticky modifikovanými liniemi kvasinkových buněk. Do buňky jsou transfekovány

vektorem, který obsahuje reporterový gen, DNA sekvence pro daný receptor a také specifické úseky DNA (EREs, AREs atd.), na něž se připojuje receptorový komplex a které vyvolávají expresi reporterového genu. V agonistických studiích se zjišťuje, nakolik dokáže testovaná látka/vzorek navodit přepis reporterového genu. Pro zjištění relativní potence k endokrinní disrupci jsou dosažené hodnoty srovnávány s hodnotami reakce přirozeného (referenčního) ligandu. V antagonistických studiích jsou buňky zároveň vystavovány testované látce i referenčnímu ligandu, zatímco kontrolní sada je vystavena pouze referenčnímu ligandu (Kinnberg, 2003).

Do této skupiny náleží rekombinantní kvasinkové testy (RYA, *recombinant yeast-based assays*), které využívají geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*. Jedním z rozšířených testů používaných pro zjištění estrogenity látek je test YES (*Yeast estrogen screen*). Princip testu spočívá v tom, že do genomu kmene *Saccharomyces cerevisiae* je stabilně integrována sekvence DNA pro tvorbu lidského ER. Buňky obsahují také plasmid, ve kterém je přítomen reporterový gen lacZ (kóduje β -galaktozidázu) a také specifické úseky DNA indukující estrogení odpověď. Po navázání ligandu na ER nastává sled dějů zakončený produkcí β -galaktozidázy, která metabolizuje médium, čímž se změní jeho barva. Pro hodnocení androgení aktivity vzorků se využívá rekombinantní kvasinkový test YAS (*Yeast androgen screen*). Hlavní principy tohoto testu jsou stejné jako v případě testu YES. Kvasinkový kmen je transfekován genem pro tvorbu lidského AR, dále úseky DNA, na které se AR váže a reportérovým genem lacZ. V přítomnosti ligandu se AR váže na DNA. Tím je opět spuštěna transkripce genu lacZ a syntéza β -galaktozidázy (Kinnberg, 2003).

2 Série testů *in vivo* na zástupcích plazů

V rámci této kapitoly budou představeny souhrnné výsledky několika studií *in vivo* na zástupcích třídy Sauropsida (klasifikace podle Bentona, 2004). Skupina Sphenodontia není do žádného z výzkumů zahrnut, jelikož oba dva druhy, hatérie novozélandská (*Sphenodon punctatus*) i hatérie Guentherova (*Sphenodon guntheri*) představují ohrožené živočichy, a proto z etických důvodů nejsou vhodné pro pokusy vyžadující usmrcení zkoumaných jedinců.

2.1 Změny v pohlavní diferenciaci

Pohlavní diferenciaci u plazů je z velké míry závislá na podmínkách okolního prostředí. To znamená, že pohlaví embrya může být určeno změnou některé z environmentálních proměných. U mnoha plazů je pohlaví mláďat determinováno inkubační teplotou. Vystavení vyvíjejícího se embrya některým exogenním chemikáliím dokáže vliv teploty na diferenciaci pohlaví napodobit (Sarre et al., 2004).

Například pokud jsou vejce želvy nádherné (*Trachemys scripta elegans*) během inkubace při teplotě produkující samce a v období pohlavní diferenciaci vystavena 17-beta-estradiolu (E2), dojde k reverzi pohlaví a z vajec se vylíhnou samice (Willingham et al., 1999). Podobné výsledky přinesly i pokusy s kajmany (*Caiman latirostris*), kdy ke změně pohlaví došlo i při působení vyšších dávek BPA (Stoker et al., 2003). Schopnost endokrinně disruptivních látek ovlivňovat determinaci pohlaví plazů potvrzují i další studie s jinými druhy želv (Neuman-Lee, 2011) či studie zaměřující se na aligátory (Guillette et al., 2000).

Tato estrogenem způsobená změna pohlaví se jeví být závislá na množství látky, kterému je objekt vystaven, a pravděpodobně zahrnuje i působení dalších mechanismů jako jsou agonisté, antagonisté a jiné disruptory sekrece steroidních hormonů. Wibbels et al. (2005) zjistili, že steroidní hormony nejsou jediné, které dokáží pozměnit proces pohlavní determinace, jelikož řada estrogenových agonistů a modifikátorů steroidogeneze dokáže napodobovat, nebo zcela obrátit vliv teploty na primární pohlavní znaky plazů. Přesný způsob, jakým teplota ovlivňuje pohlaví, není doposud znám. Ale předpokládá se, že teplota buď stimuluje, nebo potlačuje enzymy steroidogeneze. Tyto enzymy poté spustí řadu procesů vedoucích k vytvoření vaječnicků či varlat. Hypotézu o klíčové roli enzymů podporují i studie zabývající se

steroidogenním enzymem aromatázou, díky němuž dochází ke konverzi androgenů v estrogenu. Tyto studie ukazují, že činnost aromatázy se zvyšuje u samic v obdobích se zvýšenou termosenzitivitou. Dále také bylo zjištěno, že při vyšších dávkách (50-100 pg na jedno vejce) testosteronu může dojít k feminizaci i přes inkubační teplotu, při níž se za normálních podmínek líhnou samci (Crews et al., 1995). Jelikož testosteron je prekurzorem E2, lze předpokládat, že tento jev je způsobován enzymem aromatázou. Pokud je však tvorba aromatázy inhibována, z vajec partenogenických ještěrek a želv s teplotní determinací pohlaví se líhnou pouze samci (Wibbels et al., 1994).

Přestože mají ptáci genotypově určené pohlaví s dobře diferencovanými ZZ/ZW pohlavními chromozomy, k diferenciaci samičí gonády jsou potřeba estrogenu. Při absenci estrogenu se obě dvě gonády přemění ve varlata. Vystavení xenobiotickým estrogenům ve fázi pohlavní diferenciaci může tedy vést ke změně pohlaví embrya (Mitra et al., 2011). Tato skutečnost naznačuje, že možná i u druhů s teplotně-určeným pohlavím se estrogenu podílejí spíše na diferenciaci gonády než na determinaci pohlaví.

Kritické období pro pohlavní diferenciaci se mění v závislosti na biologii daného druhu. Účinky vystavení estrogenu způsobující odchylky v pohlavní diferenciaci pohlaví se u samců japonské křepelky (*Coturnix japonica*) objevily pouze pokud k expozici došlo před 12. dnem z 18-denní inkubační doby, zatímco k estradiolem vyvolané maskulinizaci samic zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) došlo jen při vystavení EDC po vylíhnutí (Adkins-Regan et. al., 1994). Mláďata křepelky patří mezi prekociální (při vylíhnutí velmi vyvinutá), zatímco mláďata zebřičky pestré jsou altriciální (málo vyvinutá při vylíhnutí). Prekociální a altriciální ptáci se vyvíjejí podobně (k pohlavní diferenciaci chování dochází zhruba ve stejnou dobu), ale líhnou se v různých fázích vývoje, čímž lze vysvětlit rozdílný efekt vystavení EDC před vylíhnutím (Adkins-Regan, 1987).

2.2 Řídnutí vaječné skořápky

Nejčastějším způsobem rozmnožování u plazů je oviparie, která spočívá ve snášení vajec s relativně nevyvinutými embryi. Oviparní plazi snášejí amniotická vejce, jež jsou svoji strukturou uzpůsobena tak, aby poskytovala embryu dostatečnou ochranu před okolním prostředím a nezbytnou výživu.

Před začátkem vitelogeneze dochází ke zvýšení cirkulujících estrogenů a k syntéze vitellogeninu (Vtg), hlavního žloutkového proteinu, v játrech. (Guillette Jr.,

1993). Vitellogenin je poté přenášen krevním řečištěm až do ovocytů, kde je rozštěpen na menší žloutkové jednotky. Tyto podjednotky později slouží jako zdroj živin pro vyvíjející se embryo. Embryo se nachází v tekutinou naplněném váčku zvaném amnion, který je odvozený od samotného embrya a slouží jako ochrana proti vysoušení. Kožovitá skořápka je vytvářena žlázami dělohy. U druhů s pevnou skořápkou okolo této membrány následně vznikávají další čtyři vrstvy: vnitřní vrstva tvořená vápníkem a organickým materiálem (20-29 μm silná), blanitá organická vrstva sloužící k uchycení vápených krystalů (8-12 μm silná), dále pórovitá vrstva (300-400 μm silná) a na závěr vnější, silně kalcifikovaná vrstva s četnými vápennými krystaly (100-200 μm silná) (Packard et al., 1982).

V průběhu 60. a 70. let dvacátého století, kdy se DDT vyskytovalo v životním prostředí ve větších koncentracích, došlo k výrazným poklesům populací některých ptačích druhů a aligátorů v důsledku neschopnosti úspěšně inkubovat mláďata kvůli abnormálně tenké vaječné skořápce. Přesto, že po omezení používání DDT došlo opět k obnovení těchto populací (Elliott et al., 1988), mechanismus zodpovědný za jejich úpadek není doposud zcela identifikován. Některé z navrhovaných mechanismů, jako je předčasné ukončení procesu tvorby skořápky, předčasná snůška, vliv na proteinovou matici skořápky nebo posílení inhibitorů skořápkového růstu, mohou být prozkoumány prostřednictvím podrobnějšího vyšetření struktury a skladby skořápky.

U druhů snášejších vejce s vápenatou skořápkou bylo po vystavení DDE zaznamenáno ztenčení jedné či více vrstev skořápky (Elliott et al., 1988). Obdobné problémy byly zaznamenány i u aligátorech populací na Floridě, kde v důsledku změn parametrů skořápky docházelo k úmrtí vysokého počtu embryí. Následné analýzy struktury a složení vaječné skořápky odhalily, že vejce pocházející z oblasti kontaminovaných jezer měla o poznání tenčí vnější skořápku a zcela chybějící blanitou organickou vrstvu (Woodward et al., 2011).

Studie provedené na ptačích koloniích z Nového Zélandu upozornily na skutečnost, že řídnutí vaječné skořápky může být přičítáno řadě faktorů z životního prostředí. Cílem výzkumu bylo zjistit příčiny řídnutí skořápky albatrose královského (*Diomedea epomophora*) na jednom ze subantarktických ostrovů. Zatímco pozorované řídnutí bylo typu a rozsahu naznačujícím xenobiotický původ, postižena jím byla jen jedna kolonie z celé vybrané oblasti. Chemická analýza ukázala přítomnost

perzistentních organochlorinů včetně DDT, nicméně naměřené koncentrace byly podobné těm, které byly zjištěny i v ostatních koloniích. Další šetření ukázalo, že příčinou ztenčování skořápky byl hromadící se stres způsobený katastrofální degradací životního prostředí postižené kolonie (Muir et al., 2002).

Podrobnější výzkum působení xenobiotických látek na kvalitu a funkci vaječné skořápky byl proveden na kuru domácím (*Gallus domesticus*) (Berg et al., 2004). Po vystavení embryí xenoestrogenu (EE_2) došlo nejen ke snížení tloušťky skořápky, ale zároveň poklesl i počet kapilár vykazujících aktivitu vyvolanou karbонickou anhydrázou (CA). Zmiňovaná studie je jednou z prvních, která naznačuje, že řídnutí skořápky může být zapříčiněno vývojovou poruchou. U ptáků vystavených EE_2 pokles CA aktivity mohl mít negativní vliv na proces tvorby vaječné skořápky, jelikož mohlo dojít k omezení zdrojů vápníku a uhličitých iontů. Uhličitě ionty nezbytné pro tvorbu skořápky jsou dodávány prostřednictvím hydratace CO_2 na HCO_3^- v procesu katalyzovaném CA. CA je přítomno v membránách granulárních buněk a stejně tak i v kapilárách, CO_2 je obstaráváno krevním proudem a buněčným metabolismem. Z tohoto důvodu limitovaná difúze CO_2 v důsledku sníženého množství CA v kapilárách u ptáků vystavených xenoestrogenu může omezit transfer HCO_3^- do lumenu žláz produkujících skořápku. Lze tedy předpokládat, že pozměněná mikrocirkulace a snížení počet kapilár vedly k redukcí množství dostupného vápníku pro tvorbu skořápky.

U japonských křepelek (*Coturnix japonica*) pozměněná morfologie žláz vytvářejících skořápku a nedostatečná distribuce CA přetrvávaly po celou dobu přepeřování, to je po dobu, než došlo k regresi a následné regeneraci vaječnic (Holm et al. 2001). Možná vývojová vada by také dokázala vysvětlit, proč staré samice orla bělohlavého (*Haliaeetus leucocephalus*) stále snášejí vejce se ztenčenou skořápkou, přestože úroveň kontaminantů značně klesly. Tyto výsledky ještě více posílily hypotézu, že k řídnutí skořápky pravděpodobně dochází kvůli funkčním a strukturálním deformacím způsobeným během embryonální fáze (Berg, 2004).

2.3 Vliv EDC na biosyntézu steroidních hormonů

Interference EDC s biosyntézou steroidních hormonů může vyústit v problematickou reprodukci, pozměněnou pohlavní diferenciací a ovlivnit růst a vývin jedince. Předpokládá se, že nesprávná steroidogeneze je rovněž zodpovědná za rozvoj

některých druhů rakoviny. Syntéza steroidních hormonů je kontrolována aktivitou několika enzymů cytochromu P450 a řadou steroidních dehydrogenáz a reduktáz. Nejvíce zkoumaným enzymem z hlediska působení xenogenních látek na steroidogenezi je aromatáza (CYP19), která zodpovídá za konverzi androgenů v estrogeny (Sanderson, 2006).

Výzkum zaměřující se na dopady inhibice aromatázy na vývin embrya u kuřat vystavených fadrozolu ukázal, že tento inhibitor vyvolává maskulinizaci. Jinými slovy, inhibice aromatázy v kritickém období embryotického vývoje způsobuje, že se z jedinců se samičím genotypem stávají samci (Elbrecht et al., 1992). Pozdější studie na kuřetech a krocanech vystavených *in ovo* fadrozolu zjistila, že vylíhnuté samice měly gonády podobné varlatům a atypické semenotvorné tubuly (Vaillant et al., 2001).

Pozměněná steroidogeneze může mít také vliv na vývoj folikulární dynamiky ve vaječnicích. U novorozených kajmanů vystavených E₂, BPA, ATZ či END se ve vaječnicích objevily nadbytečné shluky zárodečných buněk a folikuly ve fázích I-III. V zárodečných buňkách začaly vznikat mitotické figury, což bylo potvrzeno inkorporací BrdU ve vaječnicích novorozených a tři měsíce starých kajmanů. V kontrolovaných podmínkách bylo až 10% zárodečných buněk u novorozených kajmanů BrdU pozitivních. Vaječnisky starších kajmanů (stáří 12 měsíců) měly nepravidelnou a lehce prodlouženou strukturu. Shluky zárodečných buněk byly méně časté a nepodařilo se pozorovat žádné mitotické figury. Kromě folikulů ve fázích I-III, které byly popsány již u novorozených kajmanů, se u starších jedinců objevily i značně pokročilejší fáze folikulů před začátkem vitelogeneze. Vzácně byly přítomny i folikuly s dvěma oocyty (Stoker, 2008).

Studie dále prokázala, že E₂, BPA a ATZ ovlivňují dynamiku tvorby folikulů. U END byla tato tendence pozorována jen při vyšších dávkách. Navíc u jedinců vystavených nižším dávkám E₂ bylo zvýšení počtu folikulů III doprovázeno také značným poklesem zárodečných buněk. Na druhou stranu novorozené samice vylíhlé na základě ovlivnění estrogenu nebo xenoestrogeny při inkubační samčí teplotě vystavené *in ovum* vyšším dávkám E₂ nebo BPA neměly ve vaječnicích téměř žádné folikuly ve fázi III. U novorozených samic, jejichž pohlaví bylo určeno pouze teplotou a jež byly vystaveny vysokým i nízkým dávkám E₂ a BPA, byly zaznamenány zvýšené úrovně estrogenu, zatímco v případě vystavením vysokým i nízkým dávkám pesticidů (END a

ATZ) nebyla zpozorována žádná změna. Značně nižší úrovně testosteronu oproti kontrolním skupinám byly naměřeny u teplotně determinovaných samic vystavených *in ovum* vyšší dávce E₂, nízkým dávám BPA, ATZ nebo vysoké a střední dávce END (Stoker, 2008).

Podobný účinek jako výše uvedené látky mohou mít i některé kovy, z nichž doposud nejvíce prozkoumaný je vliv kadmiových iontů. Výsledky ukazují, že intraperitoneálně vpravené kadmium se dostane do vaječnicků, kde dochází k jeho postupné akumulaci. Cytologická pozorování odhalila, že zárodečná lůžka ve vaječnicích samic ještěrky *Podarcis sicula* vystavených kadmiu byla zvětšená a obsahovala vysoký počet oocytů. Přítomnost několika pyknotických jader naznačovala i silnou degradaci oocytů ve fázích zygoténe a diploténe. Degenerační procesy byly znatelné i v několika previtelogenních folikulech, u nichž byly viditelné atretické oocyty a/nebo apoptické folikulární buňky. Po spočítání zárodečných buněk v různých fázích oogeneze bylo zjištěno, že vystavení kadmiu značně pozměňuje hierarchii oocytů a zvyšuje počet oocytů v počáteční fázi leptoténe (Simoniello, 2011).

Některé endokrinně disruptivní látky působí přímo na sekreci hormonů nadledvin. U sledovaných ještěrek (*Podarcis sicula*) vystavených methyl-tiofanátu (Falco et al., 2007) byl prokázán časově závislý nárůst hladin kortikosteronu. Kvůli lepšímu porozumění vzrůstu hladiny kortikosteronu byly pozorovány i hladiny ACTH. Na rozdíl od kortikosteronu byl u ACTH zaznamenán značný pokles. Pro objasnění naměřených biochemických dat byla provedena analýza účinků MT na morfologii nadledvin testovaných ještěrek. Tato analýza prokázala, že vystavení MT vyvolalo několik morfologických změn přímo úměrných době expozice. Po 15 dnech expozice nadledviny 85% subjektů vykazovaly zvýšení množství adrenalinu a větší rozšíření krevních kapilár v centrální části parenchymu. Kromě toho některé chromafinní buňky obsahovaly noradrenalin i adrenalin.

Utváření samčích reprodukčních kanálků a externích genitálií závisí na zvýšených hladinách androgenů v období embryonálního a postnatálního růstu. U aligátorů z jezera Apopka byly zaznamenány značně menší velikost penisu (o 24% méně než běžný průměr) a nižší koncentrace testosteronu odpovídající hodnotám naměřených u samic (Guillette Jr. et al., 2000). Spojitost mezi působením xenogenního estrogenu na steroidogenezi a následnými fyzickými deformacemi byla prokázána i u

želv rodu *Graptemys*, když se u nich po vystavení určitých dávek atrazinu objevily krunýřové abnormality. U samců byly nalezeny na varlatech stopy vaječnickového kortexu a pozůstatky vejcovodů. Dále bylo zjištěno, že abnormality krunýřových desek se snižují s rostoucím dávkováním atrazinu (Neuman-Lee, 2011).

2.4 Poruchy v behaviorálních vzorcích

S přibývajícím počtem studií v oblasti EDC roste i podezření, že tyto sloučeniny mohou působit rovněž na centrální nervovou soustavu a způsobovat dlouhodobé a nezvratné změny chování (Colborn et al., 1997). Například nízké dávky BPA podané v prenatálním stádiu mohou pozměnit expozitivní chování a uspíšit pohlavní dospívání u myších (*Mus musculus domesticus*) samic (Honma et al., 2002). Obdobné výsledky přinesla i studie od Gioiosa et al. (2007), jež zkoumala chování myších mlád'at matek vystavených estrogenním endokrinním disruptorům. U těchto mlád'at došlo ke změně sexuálního chování a k snížení emocionální odezvy. Krom zmíněných studií se podařilo nashromáždit více důkazů podporujících tuto teorii, nicméně většina z nich se zaměřuje pouze na určité druhy hlodavců a jen málo se věnuje ostatním obratlovcům. Výsledky testů naznačují, že mezi behaviorální poruchy způsobené EDC mohou patřit změny v úrovni aktivity, ztráta pohlavního dimorfismu, změny v četnosti snůšky a ovlivněná kognitivní schopnost.

Na aktivitu a pozměněnou schopnost přežití v důsledku vystavení EDC se zaměřuje studie se želvami rodu *Graptemys*, kde u starších mlád'at (3 měsíce) byla zkoumána schopnost útěku z hnízda do většího kontejneru. Počet útěků byl zaznamenáván každé tři dny. Ve stáří 10 měsíců byla mlád'ata podrobena sérii pokusů testujících jejich schopnost ulovit menší kořist (cvrček rodu *Acheta*). Při vylíhnutí se mlád'ata z jednotlivých skupin významně nelišila ani v délce a šířce krunýře ani ve váze. Avšak testy aktivity prokázaly, že želvy z kontrolní skupiny byly více aktivní než želvy vystavované dávce 0.1 μ /l atrazinu. Tyto rozdíly v chování se zdají být jednou z hlavních příčin výrazného úhynu v prvním roce života želvích mlád'at a to i přes eliminaci přirozených nepřátel a faktorů mající negativní vliv na populaci želv v přirozeném prostředí. Pozorování vyloučila jako příčinu boj o potravu, jelikož každé mládě mělo přísun potravy zajištěno (Neuman-Lee, 2011).

Ke ztrátě pohlavního dimorfismu může dojít v důsledku pozměněné steroidogeneze, jelikož s diferenciací gonadálního pohlaví dochází i k diferenciaci

neurálních substrátů zodpovědných za chování dospělých jedinců, které jsou ovlivňovány sekrecí hormonů z gonád. Pokusy na japonské křepelce (*Coturnix japonica*) prokázaly, že pokud je do vajec v kritické inkubační době vpraveno 1 μg estradiolu nebo 500 μg testosteronu, dochází u dospělých ptáků k zcela obrácenému sexuálnímu chování. Dospělí samci ztrácí veškeré typické behaviorální znaky umožňující jim přilákat samice za účelem páření. Samice křepelky vystavené před vylíhnutím antiestrogenů vykazovaly samčí chování a snažily se vábit ostatní samice (Tsutsui et al., 1995). Sexuální diferenciaci chování byla rovněž rozsáhle studována u zebřičky pestré. Tento druh vykazuje výrazný pohlavní dimorfismus některých částí mozku a chování. Podání exogenního estrogenu samicím během prvních týdnů po vylíhnutí způsobilo maskulinizaci mozku a chování. U samců vystavených estradiolu v tomto samém období došlo naopak k demaskulinizaci (Adkins-Regan, 1994).

Obecně lze shrnout, že těžké kovy a různé organochloriny působí na behaviorální vzorce, avšak existuje jen málo důkazů, které by potvrdzovaly, že tyto změny mohou mít dopady na přežití celých populací. Behaviorální dopady organochlorinů na ptáky zahrnují sníženou rodičovskou péči a neschopnost rodičů uhájít hnízdo či se postarat o správnou inkubaci vajec (Bustnes, 2001). Přesto však podrobnější studie v této oblasti stále chybí.

3 Diskuze

Statistické údaje z posledních let uvádějící klesající počty populací mnohých volně žijících druhů a častější úmrtnost embryí či mláďat vyvolaly obavy ohledně vlivu endokrinních disruptorů na rozmnožovací funkce (Guillette, 2006). Co se týče obratlovců, nejvíce studií bylo zatím provedeno na rybách, méně již na obojživelnících či plazech (Milnes, 2005). U ryb se již podařilo dokázat, že EDC mohou způsobovat opoždění spermatogeneze, nižší počty spermií či vyšší pravděpodobnost výskytu intersexů. Často kladenou otázkou je také schopnost endokrinně disruptivních chemikálií vyvolávat reverzi pohlaví a způsobovat změny ve struktuře pohlavních orgánů.

Reverze pohlaví u plazů v důsledku působení xenogenních estrogenů *in ovo* byla prokázána hned u několika druhů (*Caiman latirostris*, *Graptemys ouachitensis* a *G. pseudogeographica*, *Alligator mississippiensis*, atd.). Nicméně k tomuto jevu došlo jen u některých zkoumaných EDC a jen při některých koncentracích (Stoker, 2003; Guillette, 2003; Neuman-Lee, 2011). Změny v pohlavní determinaci byly ve většině případů doprovázeny rovněž nepravidelnostmi ve stavbě a struktuře gonád. V rámci studie s jedinci druhu *Caiman latirostris* (Stoker, 2008) byly zaznamenány změny v histologické stavbě varlat způsobené vystavením END a ATZ. Došlo ke ztrátě intratubulárních mezibuněčných vazeb, které hrají zásadní roli v buněčné proliferaci a diferenciaci při spermatogenezi (Sridharan, 2007). Ke změně struktury gonád došlo i u samic, u nichž byly zaznamenány folikuly v pokročilých fázích a dělící se zárodečné buňky (Stoker, 2008).

U řady volně žijících druhů plazů se v důsledku vystavení EDC objevily abnormality v hladinách pohlavních steroidních hormonů. Jedním z příkladů je případ aligátorů vylíhnutých z vajec sebraných u pesticidy kontaminovaného jezera Apopka na Floridě, kde samice měly dvakrát vyšší koncentraci estrogenu než samice z nekontaminovaného jezera (Guillette, 2006). Tyto výsledky jen potvrzují hypotézu, že expozice vaječnicků ve vývojové fázi estrogenickým sloučeninám souvisí se změnou tvorbou folikulů a steroidů.

Navzdory důležitosti adrenokortikální funkce a steroidogeneze bylo v této oblasti vedeno jen malé procento výzkumů (Harvey, 2003). Výzkum zaměřený na vliv fungicidu MT na druh *Podarcis sicula* zaznamenal časově závislý vzrůst hladin kortikosteronu a pokles ACTH u skupin vystavených tomuto fungicidu po 15 a 30 dní,

což naznačuje, že MT může napodobovat vlastnosti ACTH a tak přímo působit na nadledviny a sekreci kortikosteronu (Falco, 2007). Náhlý vzrůst produkce kortikosteronu kvůli vystavení MT může narušit řadu funkcí připisovaných kortikosteronu a stejně tak i funkce metabolické, vývojové a do značné míry i spalování uhlohydrátů, proteinů a tuků. Navíc u *P. sicula* náhlý vzrůst hladin kortikosteronu vyvolává zvýšené nároky na energii, což může být pro tento druh kritické vzhledem k jeho velmi silné závislosti na klimatických změnách, teplotě a fotoperiodě (Borrelli, 2000).

Vlivem MT došlo rovněž ke vzrůstu hladin adrenalinu a poklesu hladin noradrenalinu. Vzhledem k vysoké podobnosti mezi fyziologií nadledvinek a sekrecí nadledvikových hormonů mezi savci a plazy můžou plazi být považováni za spolehlivý modelový příklad při hloubkovém výzkumu mezibuněčných mechanismů a potenciálních toxických vlivů EDC.

Studie zaměřující se na vliv atrazinu na chování a životaschopnost želv (*G. ouachitensis* a *G. pseudogeographica*) přinesla znepokojující výsledky ohledně vysoké úmrtnosti mláďat v prvním roce (Neuman-Lee, 2011). Přestože mláďata byla odchována v podmínkách, kde byly eliminovány všechny přirozené faktory ohrožující jejich život, stále docházelo k vysokému úhynu v prvním roce u želv vylíhnutých z vajec vystavených nízké dávce atrazinu. Některá ze zkoumaných mláďat nebyla schopna opustit hnízdo, což v přírodních podmínkách pro želvy znamená, že v hnízdě zahynou nebo se stanou obětí predátorů (Sato, 2002). Navíc jedinci vystavení ATZ projevovali sníženou fyzickou aktivitu i v jiných oblastech jako jsou plavání či ulovení kořisti. Nicméně vzhledem k dostatku zajištěné potravy v laboratorních podmínkách nelze tyto faktory zahrnout do příčin úhynu. Proto lze předpokládat, že tyto problémy souvisí s fyziologickými abnormalitami či s narušením imunitního systému. Tuto teorii podporují i testy vlivu ATZ na schopnost axolotla tygrovaného (*Ambystoma tigrinum*) odolávat ranaviru, kdy po vystavení atrazinu došlo k poklesu leukocytů v periferní krvi (Forson et al., 2006).

Brzká úmrtnost je problematická především u druhů, které dospívají do pohlavní zralosti až v pozdějším věku, jelikož mnohdy nestihnou nahradit reprodukce schopné jedince, kteří uhynou. Populace těchto druhů mohou tak zažívat výrazné úbytky v počtu členů, poklesy v porodnosti či oboje najednou (Kuo, 2004).

Závěr

Nejvýraznější dopad znečišťujících látek jako jsou endokrinní disruptory bývá obvykle zaznamenán u jedinců, kteří jim jsou vystaveni v časně fázi vývoje. Studie zaměřené na nejpoužívanější pesticidy či fungicidy prokázaly, že embrya vystavena tomuto vlivu vykazovala ještě dlouho po expozici problémy vztahujícími se přímo k přežití a reprodukci. Pokusy se zástupci sauropsidů zmiňované v této práci upozorňují na tři typy obtíží, které se pravděpodobně mohou u plazů vyskytnout v důsledku vystavení EDC.

Bylo prokázáno, že vybrané pesticidy dokáží v určitých dávkách způsobit reverzi pohlaví a překonat tak teplotu, při které se za běžných okolností líhnou pouze samci. Endokrinně disruptivní látky zapříčinily také výrazné změny ve struktuře varlat a vaječníků spojené s pokročilou proliferací buněk, které by ve větším měřítku mohly vést i k narušení schopnosti rozmnožování. Vzhledem ke kontrolním skupinám se objevily rovněž rozdíly v sekreci hormonů nadledvin, které řídí některé metabolické reakce a mohou tak ovlivnit energetický cyklus plazů, který je mnohdy závislý na klimatických podmínkách a jeho nevhodná aktivace může vyústit k úmrtím z nedostatku potravy v nepříznivých ročních obdobích. Po vystavení EDC došlo k výrazným komplikacím i v oblasti fyzického výkonu a činností, které jsou stěžejní pro úspěšné přežití a dosažení pohlavní dospělosti.

Avšak slabinou všech uvedených studií byl nedostatek vstupních informací o průběžně naměřených hodnotách v životním prostředí. Pro všechny pokusy byly vybrány vždy jen průměrné dávky EDC, které byly aplikovány dle vlastního uvážení. Žádná ze zmiňovaných studií tedy nedokázala zcela přesně simulovat přirozené podmínky. Dalším nedostatkem provedených testů bylo jejich zaměření pouze na jednu oblast působení EDC u vybraného druhu. Pro vytvoření komplexnějšího obrazu o fungování endokrinních disruptorů by bylo vhodnější se zaměřit v rámci jedné studie na všechny výše uvedené oblasti vlivu a zkoumat celkovou expresi genů či metabolismus.

Literatura

ADKINS-REGAN, E., MANSUKHANI, V., SEIWERT, C., THOMPSON, R. Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: Critical periods for effects of early estrogen treatment. *Journal of Neurobiology*. 1994, roč. 25, č. 7, s. 865-877.

ADKINS-REGAN, E., ASCENZI, M. Social and sexual behaviour of male and female zebra finches treated with oestradiol during the nesting period. *Animal Behaviour*. 1987, č. 35, s. 1000-1011.

ANWAY, M.D., CUPP, A.S., UZUMCU, M., SKINNER, M.K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science*. 2005, roč. 308, č. 5727, s. 1466-1469.

BAILLIE-HAMILTON, P.F. Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2002, roč. 8, č. 2, s. 185-192.

BENTON, M. *Vertebrate palaeontology*. 3.vyd. Malden, MA: Blackwell Science, c2005, xi, 455 p. ISBN 06-320-5637-1.

BERG, C., BLOMQVIST, A, HOLM, L, BRANDT, I, BRUNSTRÖM, B, RIDDERSTRÅLE, Y. Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction*. 2004, roč. 128, č. 4, s. 455-461.

BITMAN, J., CECIL, H.C. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls: Geographical uniformity of the response and effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1970, roč. 18, č. 6, s. 1108-1112.

BORRELLI, L., DE STASIO, R, MOTTA, C.M, PARISI, E., FILOSA, S. Seasonal-dependent effect of temperature on the response of adenylate cyclase to FSH stimulation

in the oviparous lizard *Podarcis sicula*: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health?. *Journal of Endocrinology*. 2000, roč. 167, č. 2, s. 275-280.

BROWN, M., FONT DE MORA, J. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, roč. 20, č. 14, s. 5041-5047.

BUSTNES, J.O., BAKKEN, V., ERIKSTAD, K.E., MEHLUM, F., SKAARE, J.U. Patterns of incubation and nest-site attentiveness in relation to organochlorine (PCB) contamination in glaucous gulls. *Journal of Applied Ecology*. 2001, roč. 38, č. 4, s. 791-801.

COLBORN, T., DUMANOSKI, D., MEYERS, J.P. *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? : a scientific detective story : with a new epilogue by the authors*. New York: Penguin Group, c1997, xx, 316 p. ISBN 05-259-3982-2.

Commission documents. In: *Endocrine Disruptors Website* [online]. 2012 [cit. 2013-03-04]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/endocrine/odocuments/index_en.htm.

CREWS, D., CANTÚ, A.R., BERGERON, J.M., RHEN, T. The relative effectiveness of androstenedione, testosterone, and estrone, precursors to estradiol, in sex reversal in the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology*. 1995, roč. 100, č. 1, s. 119-127.

DAXINGER, L. Transgenerational epigenetic inheritance: More questions than answers. *Genome Research*. 2010, roč. 20, č. 12, s. 1623-1628.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J.P., GIUDICE, L.C., HAUSER, R., PRINS, G.S., SOTO, A.M., ZOELLER, R.T., GORE, A.C. Endocrine-Disrupting

Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. 2009, roč. 30, č. 4, s. 293-342 [cit. 2012-04-07].

European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife: Conclusions and recommendations. In: *Endocrine Disruptors Website* [online]. 2012 [cit. 2013-03-04]. Dostupné z:

http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm.

ELBRECHT, A., SMITH, R.G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*. 1992-01-24, roč. 255, č. 5043, s. 467-470.

ELLIOTT, J.E., NORSTROM, R.J., KEITH, J.A. Organochlorines and eggshell thinning in northern gannets (*Sula bassanus*) from Eastern Canada, 1968–1984. *Environmental Pollution*. 1988, roč. 52, č. 2, s. 81-102.

FALCO, M., SCIARRILLO, R., CAPALDO, A., RUSSO, T., GAY, F., VALIANTE, S., VARANO, L., LAFORGIA, V. The effects of the fungicide methyl thiophanate on adrenal gland morphophysiology of the lizard *Podarcis sicula*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. roč. 53, č. 2, s. 241-248.

FISHER, J. S. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction*. 2004, roč. 127, č. 3, s. 305-315.

FLYNN, K. M., FERGUSON, S.A., DELCLOS, K.B., NEWBOLD, R.R. Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats. *Toxicological Sciences*. 2005, roč. 55, č. 2, s. 311-319.

FORSON, D.D., STORFER, A. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications*. 2006, roč. 16, č. 6, s. 2325-2332.

GIBBS, P.E., BRYAN, G.W., PASCOE, P.L. TBT-induced imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*: Geographical uniformity of the response and effects. *Marine Environmental Research*. 1991, roč. 32, č. 1-4, s. 79-87.

GIOIOSA, L., FISSORE, E., GHIRARDELLI, G., PARMIGIANI, S., PALANZA, P. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Hormones and Behavior*. 2007, roč. 52, č. 3, s. 307-316.

GRONEMEYER, H., GUSTAFSSON, J.A., LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004, roč. 3, č. 11, s. 950-964.

GUILLETTE, L.J., CRAIN, D.A., GUNDERSON, M.P., KOOLS, S.A.E., MILNES, M.R., ORLANDO, E.F., ROONEY, A.A, WOODWARD, A.R. Alligators and Endocrine Disrupting Contaminants: A Current Perspective. *Integrative and Comparative Biology*. 2000, roč. 40, č. 3, s. 438-452.

GUILLETTE, L. J., IGUCHI, T. Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *Pure and Applied Chemistry*. 2003, roč. 75, č.11-12, s. 2275-2286.

GUILLETTE, L.J., MOORE, B.C. Environmental contaminants, fertility, and multioocytic follicles: A lesson from wildlife?. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2006, roč. 24, č. 3, s. 134-141.

GUILLETTE, L. J. The evolution of viviparii in lizards: ecological, anatomical, and physiological correlates lead to new hypotheses. *BioScience*. 1993, roč. 43, č. 13, s. 742-751.

HARVEY, P.W., EVERETT, D.J. The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity. *Journal of Applied Toxicology*. 2003, roč. 23, č. 2, s.

81-87.

HOLM, L., BERG, C., BRUNSTRÖM, B., RIDDERSTRÅLE, Y., BRANDT, I. Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following in ovo exposure to estrogen. *Archives of Toxicology*. 2001, roč. 75, č. 6, s. 362-368.

HONMA, S., Suzuki, A., BUCHANAN, D.L., KATSU, Y., WATANABE, H., IGUCHI, T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology*. 2002, roč. 16, č. 2, s. 117-122.

JANSEN, M.S., NAGEL, S.C., MIRANDA, P.J., LOBENHOFER, E.K., AFSHARI, C.A., MCDONNELL, D.P. Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, roč. 101, č. 18, s. 7199-7204.

JOBLING, S., WILLIAMS, R., JOHNSON, A., TAYLOR, A., GROSS-SOROKIN, M., NOLAN, M., TYLER, C.R., VAN AERLE, R., SANTOS, E., BRIGHTY, G. Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environmental Health Perspectives*. 2005, roč. 114, s. 32-39.

KELCE, W. MONOSSON, E., GAMCSIK, M.P., LAWS, S.C., GRAY, L.E. JR. Environmental hormone disruptors: Evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1994, roč. 126, č. 2, s. 276-285.

KERDIVEL, HABAUZIT, D., FARZAD, P., GWENNEG. Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *International Journal of Endocrinology*. 2013, roč. 2013, č. 1-2, s. 1-14.

KINNBERG, K. *Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in*

the environment. 2003. Dostupné z:

<http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2003/87-7972-922-3/pdf/87-7972-923-1.pdf>.

KORTENKAMP, A., MARTIN, O., FAUST, M., EVANS, R., MCKINLAY, R., ORTON, F., ROSIVATZ, E. State of the art assesment of endocrine disrupters: Final report. In: *Europa.eu* [online]. 2011 [cit. 2013-04-26]. Dostupné z:

http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report%20V3%206%20Feb%2012.pdf.

KUO, C.H., JANZEN, F.J. Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*): effects on the incubation period and mortality of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) pre-emergent hatchlings in Minabe, Japan. *Conservation Genetics*. 2004, roč. 5, č. 4, s. 425-437.

LEQUIN, R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. roč. 51, č. 12, s. 2415-2418.

MANZO, C., ZERANI, M., GOBBETTI, A., DI FIORE, M.M., ANGELINI, F. Is corticosterone involved in the reproductive processes of the male lizard, *Podarcis sicula*?. *Hormones and Behavior*. roč. 28, č. 2, s. 117-129.

MASUNO, H. Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicological Sciences*. 2005, roč. 84, č. 2, s. 319-327.

MASUNO, H. Effect of 4-nonylphenol on cell proliferation and adipocyte formation in cultures of fully differentiated 3T3-L1 cells. *Toxicological Sciences*. 2003, roč. 75, č. 2, s. 314-320.

MILNES, M., BRYAN, T.A., MEDINA, J.G., GUNDERSON, M.P., GUILLETTE, L.J.JR. Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in *Alligator mississippiensis*. *General and Comparative*

Endocrinology. 2005, roč. 144, č. 3, s. 257-263.

MITRA, A., CHATTERJEE, C., MANDAL, F.B. Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 2011, roč. 5, č. 2, s. 81-96.

MU, Y., SIMRAT, P., SAINI, S., GONG, H., TOMA, D., UPPALI, H., REN, S., LI, S., POLOYAC, S.M., XIE, W. Dual role of orphan nuclear receptor pregnane X receptor in bilirubin detoxification in mice. *Hepatology*. 2005, roč. 41, č. 3, s. 497-505.

MUIR, D.C.G., JONES, P.D., KARLSSON, H., KOCZANSKY, K., STERN, G.A., KANNAN, K., LUDWIG, J.P., REID, H., ROBERTSON, C.J., GIESY, J.P. Toxaphene and other persistent organochlorine pesticides in three species of albatrosses from the north and south Pacific Ocean. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002, roč. 21, č. 2, s. 413-423.

NAAZ, A. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*. 2003, roč. 144, č. 8, s. 3315-3320.

NEUMAN-LEE, L., JANZEN, F.J. Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. *Herpetologica*. roč. 67, č. 1, s. 23-31.

PACKARD, M.J., PACKARD, G.C., BOARDMAN, T.J. Structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. *Herpetologica*. roč. 38, s. 136-155.

REY, F., GONZÁLEZ, M., ZAYAS, M.A., STOKER, C., DURANDO, M., LUQUE, E.H., MUÑOZ-DE-TORO, M. Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology*. roč. 162, č. 3, s. 286 - 294.

SANDERSON, J.T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for

endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*. 2006, roč. 94, č. 1, s. 3-21.

SARRE, S.D., GEORGES, A., QUINN, A. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays*. 2004, roč. 26, č. 6, s. 639-645.

SATO, K., SAKAMOTO, W., BJORNDAL, K. Seasonal fluctuations in sand temperature: effects on the incubation period and mortality of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) pre-emergent hatchlings in Minabe, Japan. *Marine Biology*. 2002, roč. 140, č. 3, s. 639-646.

SIMONIELLO, P., FILOSA, S., SCUDIERO, R., TRINCHELLA, F., MOTTA, C.M. Cadmium impairment of reproduction in the female wall lizard *Podarcis sicula*. *Environmental Toxicology*. 2011, roč. 290, č. 7.

SRIDHARAN, S., BREHM, R., BERGMANN, M., COOKE, P.S. Role of connexin 43 in sertoli cells of testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007, roč. 1120, č. 1, s. 131-143.

STOKER, C., BELDOMÉNICO, P.M., BOSQUIAZZO, V.L., ZAYAS, M.A., REY, F., RODRÍGUEZ, H., MUÑOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E.H. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology*. roč. 156, č. 3, s. 604-608.

STOKER, C., REY, F., RODRIGUEZ, H., RAMOS, J.G., SIROSKY, P., LARRIERA, A., LUQUE, E.H., MUÑOZ-DE-TORO, M. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and comparative endocrinology*. 2003, roč. 133, č. 3, s. 287- 296.

TABB, M.M. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology*. 2005, roč. 20, č. 3, s. 475-482.

TSUTSUI, K., YAMAZAKI, T. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain: Hormonal regulation and sex differences. *Brain Research*. 1995, roč. 678, č. 1-2, s. 1-9.

VAILLANT, S., DORIZZI, M., PIEAU, C., RICHARD-MERCIER, N. Sex reversal and aromatase in chicken. *Journal of Experimental Zoology*. 2001, roč. 290, č. 7, s. 727-740.

WESTERHOFF, P., WESTERHOFF, P., YOON, Y., SEDLAK, D.L. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water. *Environmental Engineering Science*. 2003, roč. 20, č. 5, s. 449-469.

WIBBELS, T., CREWS, D. Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Journal of Endocrinology*. 1994, roč. 141, č. 2, s. 295-299.

WIBBELS, T., BULL, J.J., CREWS, D. et al. Temperature-dependent sex determination: A mechanistic approach. *Journal of Experimental Zoology*. 1994, roč. 270, č. 1, s. 71-78.

WIJAYARATNE, A. L. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 276, č. 38, s. 35684-35692.

WILLINGHAM, E., CREWS, D. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the *Red-Eared Slider Turtle*, a specie with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology*. 1999, roč. 113, č. 3, s. 429-435.

WOODWARD, A.R., ALLAN, R., PERCIVAL, H. FRANKLIN, RAUSCHENBERGER, R. HEATH, GROSS, TIMOTHY, S., RICE, KENNETH, G., CONROW, R. Abnormal alligators and organochlorine pesticides in Lake Apopka, Florida. *Environmental Pollution*. 1988, roč. 52, č. 2, s. 153-158.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno autora: Jaroslav Semerád

Obor: Klinická a toxikologická analýza

Forma studia: Bakalářské studium

Název práce: Endokrinní disruptory u plazů

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Rok: 2013

Počet stran: 37

Počet pramenů: 67