



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

TESTY EKOTOXICITY NA ÚROVNI BUNĚK

ECOTOXICITY TESTS ON CELLULAR LEVEL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Procházková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: FCH-BAK0926/2015 Akademický rok: 2015/2016
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): Petra Procházková
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Testy ekotoxicity na úrovni buněk

Zadání bakalářské práce:

Práce bude rešeršního charakteru. Bude popsána podstata, princip, možnosti a význam testů cytotoxicity pro posouzení kontaminace životního prostředí se zaměřením na kontaminanty typu endogenních disruptorů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petra Procházková
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Endokrinní disruptory patří mezi významné polutanty životního prostředí. Nebezpečné jsou jak pro člověka, tak pro jiné organismy, tím, že ovlivňují jejich hormonální systém. Do prostředí se dostávají při výrobě, používání a likvidaci některých chemických látek, mohou však být i neantropogenního původu. Cílem této práce je podat stručný přehled o možných způsobech stanovení přítomnosti ekotoxických látek v životním prostředí se zaměřením na endokrinní látky, a to pomocí *in vitro* testů ekotoxicity. Tyto testy místo testovacích organismů využívají buněčných kultur. V práci jsou popsány principy testů ekotoxicity na buněčné úrovni, jako jsou testy buněčné viability, proliferace, metabolické aktivity buněk a také DNA microarrays. Podstatná část práce je zaměřena na možnosti stanovení přítomnosti právě endokrinních disruptorů pomocí vybraných testů, a to testu vazby ligandu na receptor, testu s reportérovými geny (rekombinantní kvasinkové testy a testy s liniemi buněk získaných ze savců) a testu proliferace buněk, tzv. E-screen. Význam a opodstatnění využití testů k prokázání endokrinních aktivit environmentálních matric je uveden na příkladech studií, ve kterých byly tyto testy použity.

ABSTRACT

Endocrine disrupting compounds among significant environmental pollutants. They are dangerous both for humans and other organisms by affect their hormonal system. They enter the environment during production, use and disposal some chemicals, but they may be of natural origin. The aim of this work is to give a brief overview of possible methods of determination of the presence of ecotoxic substances in the environment, using the *in vitro* toxicity assays. These tests use cell cultures instead of test organisms. The work describes principles of ecotoxicity tests at the cellular level, such as cell viability assays, cell proliferation assays, assays based on the metabolic activity of cells or DNA microarrays. A significant part of this work is focused on the possibilities of determination of endocrine disruptors by selected assays. They are ligand binding assays, reporter gene assays (recombinant yeast assay, mammalian-based reporter gene assays) and cell proliferation assay called E-screen. Significance and rationale use of tests to prove the endocrine activities in environmental matrice is given through examples of studies in which the tests were used.

KLÍČOVÁ SLOVA

cytotoxicita, ekotoxicita, tkáňové kultury, endokrinní disruptory

KEY WORDS

cytotoxicity, ecotoxicity, tissue culture, endocrine disruptors

PROCHÁZKOVÁ, P. *Testy ekotoxicity na úrovni buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 41 s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Můj velký dík patří MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a také cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat svému manželovi, rodičům a celé mé rodině za podporu při studiu a synovi za to, že mi umožnil práci dokončit.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Ekotoxikologie a ekotoxicita	8
2.1	Ekotoxikologie	8
2.2	Ekotoxicita	8
3	Testy ekotoxicity.....	9
3.1	Definice testů ekotoxicity.....	9
3.2	Testy toxicity dle doby expozice.....	9
3.2.1	Akutní testy toxicity	9
3.2.2	Subakutní testy toxicity (subchronické)	9
3.2.3	Chronické testy toxicity.....	10
3.3	Testy první generace	10
3.4	Testy druhé generace.....	10
3.4.1	Animální biotesty – <i>in vivo</i>	10
3.4.2	Neanimální biotesty.....	11
3.4.2.1	In vitro	11
3.4.2.2	In silico	11
3.5	Testy třetí generace	12
3.6	Testy čtvrté generace.....	12
4	Testy ekotoxicity <i>in vitro</i>.....	14
4.1	Cytotoxicita	14
4.2	Testy cytotoxicity	14
4.2.1	Testy prokazující viabilitu buňky	15
4.2.1.1	Test s neutrální červení.....	15
4.2.1.2	Test s trypanovou modří.....	16
4.2.1.3	Test s fluorescein diacetátem.....	16
4.2.1.4	Test s laktát dehydrogenázou	17
4.2.2	Testy ovlivňující buněčnou proliferaci.....	17
4.2.2.1	Biuretová reakce.....	17
4.2.2.2	Proteinový test s využitím kyseliny bicinchoninové	18
4.2.2.3	Lowryho proteinový test.....	18
4.2.2.4	Bradfordův proteinový test.....	19
4.2.2.5	Piercův proteinový test při 660 nm	20
4.2.2.6	Test pomocí měření ATP.....	20
4.2.2.7	Test pomocí měření poměru ADP/ATP	20
4.2.2.8	Testování pomocí inkorporace ³ H-thymidinu	21
4.2.2.9	BrdU test.....	21
4.2.2.10	EdU test	21
4.2.3	Testy ovlivňující metabolickou aktivitu buňky	22
4.2.3.1	MTT test.....	22
4.2.3.2	MTS, XTT a WTS-1 testy	22
4.2.4	DNA čipy (microarrays).....	23
5	Endokrinní disruptory.....	24
5.1	Mechanismy působení hormonů	24
5.1.1	Estrogenní receptor.....	25
5.1.2	Androgenní receptor.....	25
5.1.3	Aryl uhlovodíkový receptor	25
5.2	Endokrinní disruptory v životním prostředí	25
5.2.1	Pesticidy	25
5.2.1.1	DDT a jeho metabolity	26

5.2.1.2	Organické sloučeniny cínu	26
5.2.2	Bisfenol A.....	26
5.2.3	Ftaláty.....	26
5.2.4	Alkylfenoly.....	27
5.2.5	Polycyklické aromatické uhlovodíky	27
5.2.6	Dioxiny.....	27
5.2.7	Polychlorované bifenyly.....	27
5.2.8	Polybromované difenylethery	28
5.2.9	Farmaceutické produkty na bázi estrogenů	28
5.3	<i>In vitro</i> testy ekotoxicity se zaměřením na endokrinní disruptory	28
5.3.1	Test vazby ligandu na receptor.....	28
5.3.2	Testy s reportérovými geny	29
5.3.2.1	Kvasinkové testy	30
5.3.2.2	Test s reportérovými geny využívající luciferázu	30
5.3.2.3	Test založený na buněčné linii MVLN.....	31
5.3.2.4	Test využívající chimérického receptoru.....	31
5.3.2.5	Test produkce vitellogeninu	31
5.3.3	Test proliferace buněk	32
5.4	Vybrané ekotoxikologické studie zaměřené na endokrinní disruptory	32
6	Závěr	34
7	Seznam použité literatury	35
8	Seznam zkratek	41

1 ÚVOD

Některé chemické látky jsou schopné interagovat s endokrinním systémem organismů. Jedná se především o sloučeniny antropogenního původu používané např. jako pesticidy, hnojiva, některé farmaceutické přípravky, aj., které nepříznivě ovlivňují hormonální systém organismů. Spolu s látkami přírodního původu vykazujícími stejné vlastnosti se řadí do skupiny endokrinních disruptorů. Endokrinní disruptory jsou nebezpečné už jen tím, že často působí již při nízkých koncentracích. K určení, zda se ve vzorcích získaných z životního prostředí nachází endokrinní disruptory, jsou využívány ekotoxikologické biotesty, a to především na buněčné úrovni, tzv. *in vitro* biotesty. Buňky se používají proto, aby bylo možné snížit počty testovacích organismů, ale i objemů látek k testům potřebných.

Ekotoxikologické biotesty využívající buněčných kultur, tzv. testy cytotoxicity, využívají nejčastěji rybích nebo savčích buněk. U buněk se zkoumá jejich reakce na přítomnost chemických látek prostřednictvím sledování jejich životaschopnosti, proliferace, metabolické aktivity a lze využít i DNA mikročipů inkorporovaných do DNA buňky. Mezi testy životaschopnosti se řadí kolorimetrické metody využívající barviva k detekci porušené buněčné stěny, kterou mají buňky napadené nebo mrtvé. Testy buněčné proliferace jsou často založeny na biuretové reakci, měření ATP nebo inkorporaci vhodné sloučeniny do buněčné DNA. Při testu metabolické aktivity buněk dochází k přeměně dávkované sloučeniny na stanovitelný metabolit, tento proces je většinou detekován opět např. spektrofotometricky. Metoda DNA mikročipů využívá genové exprese.

Testy ekotoxicity zaměřené na endokrinní disruptory zahrnují test vazby ligandu na receptor, kvasinkové testy, testy na buněčných liniích získaných z obratlovců nebo testy buněčné proliferace. I když tyto testy nedokáží zcela postihnout všechny účinky testované látky, jsou systémem, který dokáže odhalit případný mechanismus účinku toxických látek a takto i potenciální projev poškození na vyšší, než buněčné úrovni. Proto se používají jako včasný screening.

2 EKOTOXIKOLOGIE A EKOTOXICITA

2.1 Ekotoxikologie

Pojem ekotoxikologie zavedl roku 1969 francouzský toxikolog René Truhaut. Jde o interdisciplinární vědní obor, který kombinuje znalosti z oblasti ekologie a toxikologie. Zabývá se vlivem toxických látek, které mohou být antropogenního i přirozeného původu, na živé organismy, kdy zohledňuje jejich vztahy s prostředím, ale i jejich vzájemné vztahy na úrovni populací, společenstev a ekosystémů [1].

Ekotoxikologie si klade za hlavní cíl poznat důsledky interakcí živých organismů s chemickými látkami, které mohou být toxické, v prostředí na všech úrovních. Tyto poznatky pak využívá k racionální ochraně živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů před chemickým znečištěním [2]. Další oblastí, kterou se ekotoxikologie zabývá, je vývoj metod umožňujících charakterizovat vliv látek na organismy životního prostředí [3].

2.2 Ekotoxicita

Ekotoxicita je legislativně zaváděna jako nebezpečná vlastnost v oblasti odpadů a mohou ji vykazovat některé chemické látky, pesticidy, hnojiva, odpady a léčiva v nich obsažené. Jedná se o látky, které toxicky působí na životní prostředí jako celek nebo na živé organismy.

Jako vlastnost H14 – ekotoxicita je definována ve vyhlášce č. 376/2001 Sb. ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Vykazují ji odpady, které představují nebo mohou představovat akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo i více složek životního prostředí.

Ve vlastnosti ekotoxicita je pozitivní ten odpad, jehož vodný výluh ve zkouškách akutní toxicity vykazuje pro alespoň jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus hodnoty $LC(EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$. Testovací organismy jsou *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* po dobu působení 96 hod., *Daphnia magna* po dobu působení 48 hod., *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* po dobu 78 hod. a semena *Sinapis alba* po dobu působení 72 hod. [4].

Látky, které jsou toxické pro životní prostředí, ale nemusí vykazovat tuto legislativou stanovenou vlastnost, protože takto definovaná ekotoxicita nepostihuje všechny možné toxické účinky látek na životní prostředí. Soubor stanovených testů je vhodný pouze pro látky rozpustné ve vodě, ale velké množství toxických látek je ve vodě špatně nebo málo rozpustných [3].

3 TESTY EKOTOXICITY

3.1 Definice testů ekotoxicity

Kontaminanty vstupující do životního prostředí pocházejí převážně z antropogenních zdrojů, jejich přísun bývá neustálý a jejich koncentrace často stoupá nad úroveň přirozeného pozadí. Nezastupitelnou roli ve zhodnocení stupně znečištění zaujímá chemická a fyzikální analýza, která umožňuje s vysokou přesností stanovit i velmi malá množství nežádoucích látek ve vzorku. Analytické metody ale neposkytnou odpověď na všechny otázky týkající se xenobiotik, tj. látek antropogenních, kdy nelze spolehlivě předpovědět jejich toxický vliv na různé formy života. Směsi toxikantů pak zpravidla neposkytují účinek, který by odpovídal pouhému součtu toxických vlivů jednotlivých složek a tak nemůžeme předem odhadovat, zda bude směs vykazovat synergický nebo antagonistický efekt. Proto jsou využívány biologické metody stanovení toxicity, tzv. biotesty. Biotesty jsou nespecifické a je u nich požadována jednoduchost, snadná proveditelnost, reprodukovatelnost výsledků a nízké ekonomické náklady.

Biotesty jsou navrhovány tak, aby indikátorovými organismy byly typické druhy zastupující nejvýznamnější složky daného ekosystému. Bioindikátory mohou na přítomnost toxikantu reagovat např. změnou některé fyziologické funkce, změnou pohyblivosti, růstu nebo reprodukce. V krajním případě může nastat úhyn organismu.

Toxicita určité látky může být pro různé organismy odlišná, proto je důležité při zobecňování získaných informací postupovat velmi opatrně. Často se ke zvýšení objektivity testování používá soubor několika biologických druhů různé složitosti a trofické úrovně [5].

3.2 Testy toxicity dle doby expozice

Testy jsou nejčastěji klasifikovány dle doby expozice, po kterou testovaná látka působí na testovací organismus. Tato doba je různorodá, závisí na konkrétním organismu a druhu zkoumané chemické látky. Toxické účinky pak mohou také být krátkodobé (akutní) či dlouhodobé (chronické). Stejná látka v různém množství může také vyvolat více typů účinků [6].

3.2.1 Akutní testy toxicity

Tyto testy slouží k hodnocení účinku toxických látek na organismy během krátkého období jejich života při jednorázovém podání. Posuzují efekty toxikantů v období během dvou týdnů nebo i v kratším časovém úseku (často i méně než 24 hodin, nejčastěji pak 24 až 96 hodin). Stanovuje se úmrtnost (mortalita), z výsledků se pak určí koncentrace nebo dávka, při níž uhne právě 50 % testovacích organismů, která se vyjadřuje jako LC50 nebo LD50. Výsledkem působení takové toxické látky je akutní účinek. Akutní toxicita dané látky často velmi závisí na typu expozice, je tedy nutné rozlišovat, jakým způsobem byla látka při experimentu podána a tento údaj pak musí být spolu s charakterizací testu uveden u hodnoty stanoveného indexu [7], [8].

3.2.2 Subakutní testy toxicity (subchronické)

Při těchto testech jsou organismy opakovaně, obvykle jednou denně, vystavovány dané látce nebo kombinaci látek, a to po dobu 28 až 90 dnů. Dávka testované látky bývá nižší

než u akutních testů. Testy subchronické toxicity slouží ke stanovení biologického účinku toxikantu, ke zjištění jeho kumulativního účinku a možných patogenních změn organismů. Lze získat hodnoty NOAEL (No Observer Adverse Effect Level), tj. taková dávka, při níž ještě nebyl pozorován škodlivý účinek, a LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level), tj. nejnižší dávka, při které již škodlivý účinek pozorován byl [8].

3.2.3 Chronické testy toxicity

Chronické testy toxicity se využívají pro dlouhodobé testování účinků látek na organismy, během významné části jejich životního cyklu, obvykle déle než 90 dní. K navržení chronického testu toxicity slouží výsledky testu subchronického, také proto, že chronické testy jsou velmi náročné na čas i peníze. Výsledkem jsou informace o dlouhodobém působení látky na organismus. Výsledky testů mohou také sloužit k určení hodnot NOAEL a LOAEL [7], [8].

3.3 Testy první generace

Tuto generaci testů představují testy klasické, standardní, s konvenčními metodikami, jež jsou založeny na akutních testech toxicity na organismech chovaných v laboratoři. Testovaná látka se aplikuje alespoň na tři druhy organismů, dochází tedy k paralelnímu testování, které se označuje jako základní baterie testů. Ty jsou založeny na poznacích o propustnosti a stavbě buněčné stěny různých organismů (destruent, producent a konzument). Nejpoužívanější jsou testy na bakteriích, řasách, semenech, bezobratlých (např. korýši) a rybách [9].

3.4 Testy druhé generace

Jedná se o alternativní biotesty, jinak také mikrobiotesty. Původně byly pouze vylepšením standardních testů toxicity, ale postupně docházelo k jejich standardizaci, proto jsou dnes některé alternativní biotesty běžnou součástí sad biotestů. Tyto testy využívají minimální množství objemů potřebných pro testování, kladou minimální požadavky na laboratorní prostory i vybavení, proto jsou nazývány miniaturními testy. Díky malé spotřebě testovaných roztoků jsou vhodné k provedení více testů paralelně a v případě potřeby i opakování testu. Testy jsou dostupné, poměrně levné a rychlé na realizaci, lze je používat i k hodnocení akutní toxicity a odhadu environmentálního rizika sloučenin [9], [10], [11].

V širším slova smyslu v oblasti toxikologie a ekotoxikologie jsou alternativní metody testování takové metody, které rychle poskytují dostatečné informace o toxických a nežádoucích účincích chemických látek, jsou méně nákladné a omezují počet testů na obratlovcích, a to vše s dostatečnou kapacitou. Navíc tyto metody splňují podmínky tzv. „3R“ – nahrazení, redukce nebo vylepšení podmínek pro využití zvířat v testech (replace, reduce, refine). Alternativní metody tedy zahrnují testy *in vivo* na organismech (animální), testy *in vitro* na tkáních či buňkách a počítačové modely *in silico*. Musí také poskytovat stejné nebo lepší informace než metody standardní na pokusných zvířatech [12].

3.4.1 Animální biotesty – *in vivo*

Byly vyvinuty na základě snahy snížit počty testovacích organismů, nebo je zcela nahradit alternativou, proto se místo obratlovců používají jejich vajíčka či raná vývojová stádia, příkladem je test využívající vajíčka a embrya obojživelníků, nejběžněji se při testu FETAX (Frog Embryo Teratogenity Assay *Xenopus*) používá drápatka vodní (*Xenopus laevis*), dále se

provádí testy na rybích embryích, popř. se minimalizuje počet testovacích organismů a tímto i objemů testovaných látek. Využívají se také cysty, ephipia, kdy se klidová stádia organismů nechají vylíhnout a na vylíhnutých živočiších se pak provádějí testy. Je tak minimalizován počet jedinců v testu využitých. Dále se využívají imobilizované a lyofilizované skupiny organismů, jako je např. v testu na lyofilizovaných kulturách mořské bakterie *Aliivibrio fischeri* (dříve *Vibrio fischeri*) [6], [11].

Chov testovacích organismů je často náročný jak na obsluhu, na laboratorní místo i na spotřebu chemikálií, proto je někdy výhodnější nepoužívat organismy z vlastních chovů. Z toho důvodu jsou na trhu komerčně dostupné sady tzv. toxkity (mikrobiotesty). Jedná se o sady organismů v klidovém stádiu, laboratorních potřeb a chemikálií v jednom balení, např. s klidovými stádii hrotnatek *Daphnia magna* Daphtoxkit nebo Thamnotoxkit případně ProToxkit využívající koryše, popř. nálevníka [11].

3.4.2 Neanimální biotesty

Neanimální metody testování zahrnují testy *in vitro* na tkáních a buňkách a predikční modely na počítačích, tzv. testy *in silico*.

3.4.2.1 *In vitro*

Jedná se o testy na buněčné úrovni, které jsou využívány především k teoretickému objasnění účinku toxické látky. Buněčné kultury se dříve získávaly z tkání ryb, tato metoda je však nestandardní a špatně reprodukovatelná, proto se dnes využívají stabilní buněčné linie, které umožňují snadné „rozpěstování“, uchování v hibernovaném stavu.

Výhodou testů na buněčných kulturách je jejich vysoká citlivost a reprodukovatelnost, nízké finanční i časové nároky. Nevýhodou je, že systémy *in vitro* nemohou nahradit enzymaticko-imunitní systém živého organismu [6].

3.4.2.2 *In silico*

Metody testování *in silico*, jinak také odhady výpočtem, využívají rozsáhlé soubory dat získané z testování pomocí standardních i alternativních animálních testovacích metod. Nejčastěji se výpočetní modely tvoří zobecněním údajů získaných pokusem pomocí technik analýzy QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností chemických látek).

Jedná se o metodu analýzy souboru experimentálních údajů o velikosti biologických a fyzikálně chemických vlastností chemických látek pomocí matematické statistiky. Daný soubor údajů se může týkat jak série látek, které jsou si strukturně podobné (homologická série), tak látek strukturně různorodých (heterogenní série). Odvození QSAR modelu je tím lepší, čím je daná série větší. Oblast použitelnosti modelu je vymezena rozsahem hodnot biologických a fyzikálně chemických vlastností použitých k jeho tvorbě. Model QSAR pak kvantitativně vyjadřuje vztah mezi velikostí změny biologické účinnosti a velikostí změny struktury molekuly (např. změny substituentů) [13].

Dále se využívají kinetické fyziologické simulační modely (PBSM – Physiologically-Based Simulation Models), modely založené na biologické podobnosti a alometrických rovnicích, expertní systémy založené na souborech znalostí a pravidel, modely vytvořené technikami molekulové grafiky a nakonec kombinace různých modelů s umělou neuronovou sítí (ANN –

Artificial Neural Network). U těchto testovacích metod musí být uvedena pravděpodobnost jejich správnosti, protože se výsledky mohou od skutečnosti různě lišit. Do správnosti odhadu výpočtem se mohou promítnout faktory jako podmínky expozice, nemoci a jejich léčení, životní historie, věk, apod. [12].

3.5 Testy třetí generace

Třetí generaci ekotoxikologických testů představuje využití tzv. biomarkerů. Tato metoda má původ v toxikologii člověka, kde se osvědčila k určení míry vystavení lidského organismu specifickým chemikáliím nebo jako indikátor včasného varování před specifickými nemocemi a syndromy. Důležitou podmínkou při použití biomarkerů je předpoklad dobré znalosti biologie testovacího organismu, což zvyšuje pravděpodobnost správné odpovědi organismu prostřednictvím změn daného biomarkeru [14].

Biomarkery jsou součástí biomonitoringu životního prostředí, kde jsou ke zjištění přítomnosti škodlivé látky používány indikační organismy (bioindikátory). Přítomnost toxikantu vyvolá stresovou reakci bioindikátoru a dochází k produkci, popř. alteraci fyziologických hladin, již zmíněného biomarkeru. Biomarker je tedy jakákoliv odezva testovacího organismu na toxickou látku přítomnou v prostředí, tato odezva může být biochemická, fyziologická, histologická, nebo může jít o změnu v chování organismu.

Biomarkery jsou dvojího druhu. Biomarkery expozice indikují expozici organismu toxikantem či jeho metabolitem, nepodávají ale informaci o stupni a rozsahu vyvolaného poškození. Biomarkery efektu indikují škodlivé účinky nebo změny na úrovni organismů, jsou tedy projevem poškození organismu. Mohou poskytovat včasné varovné signály o poškození zdraví organismu nebo o narušení životního prostředí. Příkladem takového biomarkeru je enzym cholinesteráza zodpovědný za přenos nervových vzruchů, přítomen je i v krvi. Při expozici testovacího organismu organofosfátovým insekticidům dojde k inhibici a poklesu aktivity daného enzymu [15], [16].

3.6 Testy čtvrté generace

Další z metod ekotoxikologického testování je použití biosenzorů. Jde o analytické zařízení, které poskytuje elektronický signál přímo úměrný koncentraci daného analytu ve vzorku, složené z prvku biologického původu (mikroorganismus, enzym, protilátka, oligonukleotid, biomembrána, buněčná organela, tkáň), který je součástí nebo je v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem (elektrochemický, optický, piezoelektrický a akustický, kalorimetrický). Biosenzory jsou vysoce citlivé, mají nízké provozní náklady a spotřeby vzorků, výrazně nezasahují do rovnováhy studovaných systémů. V ekotoxikologii jsou využívány převážně optické biosenzory, založené na interakci světelného záření s chemickými látkami, konkrétně se využívají techniky jako je fluorescence, luminiscence a absorbance.

Při luminiscenci dochází důsledkem chemických reakcí k emisi světla z molekuly v excitovaném stavu, intenzita tohoto světla je závislá na čase (v určitém okamžiku prochází maximem) a kvantový výtěžek luminiscence odpovídá počtu vyzářených fotonů a excitovaných molekul.

Bioluminiscence je emisí světla při biochemické reakci v živém organismu a obvykle se jí účastní enzym luciferáza, který štěpí substrát luciferin (různé druhy podle použitého organismu). Během štěpení dochází k emisí světla.

Biosenzory využívající bioluminiscence jsou vhodné např. k citlivé detekci těžkých kovů (rtuť, arsen), kdy se využívá bakterie *Escherichia coli*, nebo ke stanovení vápenatých iontů (druhy *Aequora* a *Obelia*) [17], [18].

4 TESTY EKOTOXICITY *IN VITRO*

Jedná se o neanimální testy druhé generace, které úplně nahrazují testovací organismy jejich *in vitro* alternativami. Namísto testovacích organismů využívají pouze buňky, tkáň nebo izolované orgány. Spojení *in vitro* pochází z latiny a znamená „ve skle“, kdy jsou testy prováděny ve zkumavce, na Petriho misce nebo laboratorním skličku, využívají tkáňových kultur a buněčných linií [19].

Buňky byly vybrány proto, že k počáteční interakci mezi chemickou látkou a biologickým systémem dochází právě na buněčné úrovni. Lze tedy očekávat jejich reakci po vystavení toxikantu. Právě tato odezva je pak výchozím bodem řetězce reakcí, které vedou k ekologickým změnám. Vztahy mezi toxickými efekty na odlišných úrovních biologické organizace jsou spíše komplexní než jednoduché a ne všechny procesy odehrávající se v buňkách mají patologický význam, ale jsou pouze adaptivní a nevedou tedy k poškození a následné smrti buňky.

Studie na buněčných strukturách představují vhodný přístup k detekci obecného mechanismu toxicity. Buňky, díky své reakci na chemickou látku v prostředí, se využívají ke včasné a citlivé detekci chemických látek v prostředí, proto jsou buněčné reakce také úspěšně využívány jako biomarkery expozice [20].

4.1 Cytotoxicita

Chemické látky, které vyvolávají poškození buňky, jsou cytotoxické. Cytotoxicita je schopnost chemické látky způsobit buněčnou smrt jako důsledek změn v buněčném chování a v buněčných procesech. Cytotoxiny mohou způsobovat vratné nebo nevratné účinky, a to akutní, nebo chronické [21].

Buňky, které byly vystaveny cytotoxické látce, mohou reagovat různými způsoby. Buď jsou tyto látky metabolizovány a v dané buněčné linii nedochází k žádným pozorovatelným účinkům, nebo, jak je tomu u většiny buněk, dochází po kontaktu s toxickou látkou k jejich nekróze či apoptóze.

Nekróza nastává po expozici buněk podmínkám, které se extrémně liší od fyziologických podmínek, nebo sloučeninám poškozujícím buněčné membrány. Nejprve dojde ke zhoršení schopnosti buňky udržovat homeostázu, a tím k průniku vody a extracelulárních iontů. Následně celá buňka, včetně nitrobuněčných organel, nabobtná a praskne, dochází k tzv. buněčné lýze. Po zhroucení plazmatické membrány je cytoplasma, včetně lysozomálních enzymů, uvolněna do extracelulární tekutiny. Ke stanovení stupně nekrózy je sledována aktivita těchto enzymů v extracelulárním médiu.

Na rozdíl od nekrózy, k apoptóze dochází za působení normálních fyziologických podmínek a buňka je aktivním účastníkem své programované smrti. Apoptóza je vyvolána fyziologickými signály, např. změnami v hormonálním prostředí buňky, nebo apoptickými sloučeninami, jako je kyselina máselná nebo kamptotecin [22].

4.2 Testy cytotoxicity

Testování cytotoxicity je rychlé, standardizované, citlivé a poměrně nenákladné. Využívá se k určení toho, zda je chemická látka toxická nebo netoxická, je vhodné pro screening. Testy cytotoxicity se dělí do několika skupin dle toho, co daná toxická látka v buňce ovlivňuje. Nejčastěji jsou pro hodnocení ekotoxicity používány rybí nebo savčí buněčné linie.

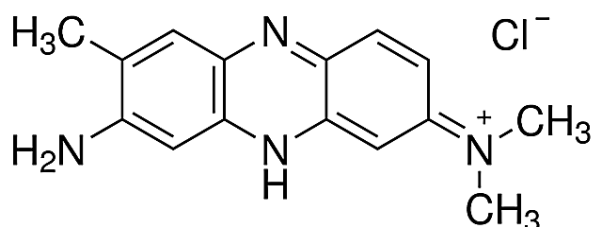
4.2.1 Testy prokazující viabilitu buňky

Viabilita (životaschopnost) buněk je definována jako schopnost buněk množit se a vykazovat metabolickou aktivitu v daných podmínkách. Je jedním ze základních parametrů, které se při práci s buněčnými kulturami stanovují. Kritériem pro hodnocení životaschopnosti buněk je nejčastěji stav (integrita) cytoplazmatické membrány. U živých buněk je neporušená (intaktní) a volně nepropouští ani malé molekuly s kladným nebo záporným nábojem. Proto se při posuzování neporušenosti membrány využívají právě barviva s nízkou molekulovou hmotností nesoucí kladný nebo záporný náboj. Dojde k zabarvení pouze takových buněk, které mají porušenou membránu (mrtvé buňky). Podle povahy barviva se viabilita posuzuje ve světelném, nebo fluorescenčním mikroskopu. Další možností je sledování uvolnění barviva, popř. izotopu, který viabilní buňky běžně zadržují nebo stanovení katalytické aktivity vnitrobuněčných enzymů v kultivačním médiu [23], [24].

4.2.1.1 Test s neutrální červení

Neutrální červeně (3-amin-7-dimethylamin-2-methylphenazin hydrochlorid) je slabě bazické, ve vodě rozpustné, supravitální barvivo, které se hromadí v lysozomech životaschopných buněk.

Test s neutrální červení (NR assay, Neutral Red assay) je založen na inkorporaci barviva do lysozomů živých buněk, barvivo se do buňky dostane pasivním transportem přes plasmatickou membránu. Akumulace neutrální červeně do lysozomů je umožněna buď její vazbou na pevné kyselé skupiny uvnitř lysozomální matrice, jako jsou polysacharidy, nebo vycytáním barviva do kyselého prostředí lysozomů [25].



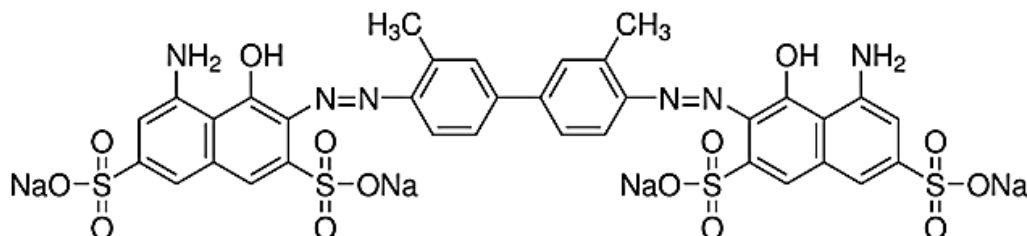
Obrázek 1: Chemický vzorec neutrální červeně [26].

Buňky využívané pro test s neutrální červení jsou zmrazeny v tekutém dusíku, v případě potřeby se nechají roztát, jsou resuspendovány a přeneseny do kultivační baňky, kde rostou a množí se. Po přidání roztoku trypsinu dochází k resuspendaci buněk v médiu, buňky jsou počítány a naočkovány na 96jamkovou destičku. Testovaná látka se přidá do jamek, kdy každá deska obsahuje 12 kontrolních jamek naplněných rozpouštědlem. Testovaná látka je odstraněna dekantací a destičky jsou propláchnuty pufovaným fyziologickým roztokem, který vymyje zbytky testovaného materiálu. Následně je přidán roztok neutrální červeně a destičky se inkubují při standardních kultivačních podmínkách, aby došlo k absorpci barviva buňkami. Po 3 hodinách se přebytek neutrální červeně dekantuje a do všech jamek je přidáno rozpouštědlo, které extrahuje barvivo obsažené v buňkách (mrtvé nebo poškozené buňky barvivo neudrží). Na konec se měří absorbance každého vzorku při specifické vlnové délce. Získané hodnoty se používají ke stanovení životaschopnosti každé jamky ve srovnání s jamkami kontrolními [27].

4.2.1.2 Test s trypanovou modří

Trypanová modř je kyselé azobarvivo běžně používané k rozlišení životaschopných a neživotaschopných buněk. Je to známý zvířecí karcinogen a experimentální teratogen.

Trypanová modř je z živých buněk aktivně transportována přes buněčnou membránu, smísením buněčné suspenze s roztokem barviva tak zůstávají živé buňky bezbarvé a mrtvé se obarví modře [25].



Obrázek 2: Chemický vzorec trypanové modři [28].

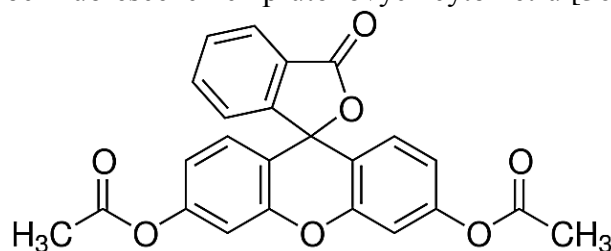
Test s trypanovou modří (TBE assay, Trypan Blue Exclusion assay) je jedním z nejstarších a nejběžnějších metod používaných k měření životaschopnosti buněk. Buněčná membrána je pro tuto molekulu za normálních podmínek nepropustná, a proto barvivo vstupuje pouze do buněk s poškozenými membránami. Po vstupu do buňky se trypanová modř váže na buněčné proteiny a buňka modrá. Tento test tak umožňuje přímou identifikaci živých, tj. bezbarvých, a mrtvých buněk (modré) v dané populaci.

Možným nahrazením trypanové modři je např. použití propidium jodidu (PI) nebo akridinové oranž, což jsou barviva, která se vážou na nukleové kyseliny. Akridinová oranž prostupuje buněčnou membránou všech buněk a způsobuje zelenou fluorescenci, zatímco propidium jodid generuje červenou fluorescenci pouze umírajících a již mrtvých buněk. Pokud jsou obě barviva použita současně, vykazují živé buňky pouze zelenou fluorescenci a mrtvé pouze červenou. Mimo propidium jodid lze použít i jiná barviva, jako jsou ethidium bromid, 7AAD (7-aminoaktinomycin D), SYTOX green, SYTOX red a DRAQ5.

Detekce viability buněk lze vyhodnotit pomocí průtokového cytometru, nebo fluorescenčního mikroskopu [29].

4.2.1.3 Test s fluorescein diacetátem

Fluorescein diacetát (FDA) je lipofilní nefluorescenční sonda procházející volnou difúzí do buňky, kde je zadržována a koncentrována. Pokud je cytoplazmatická membrána porušena, fluorochromy jsou vyplavovány zpět do extracelulárního prostoru. FDA je jednou z nejstarších sond k určování viability buněk vykazujících po intracelulární přeměně fluorescenci. Proniká do všech buněk, ale pouze živé buňky jsou schopny jej zadržet a pomocí enzymu esterázy hydrolyzovat na fluorescenční barvivo fluorescein zelenožluté barvy. Detekce se provádí pomocí fluorescenčních průtokových cytometrů [30].

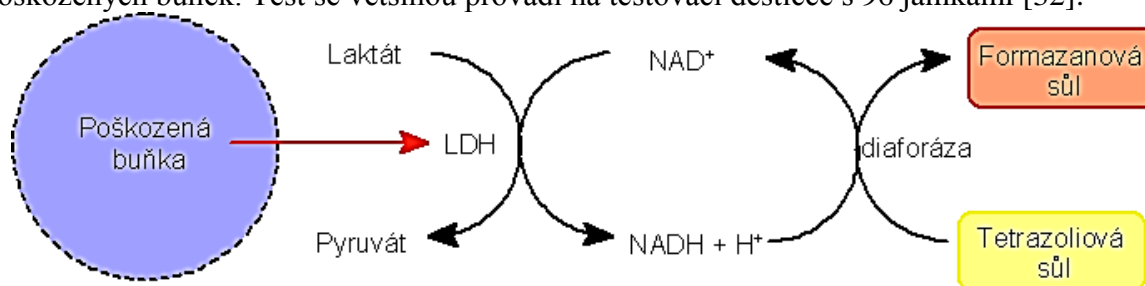


Obrázek 3: Chemický vzorec FDA [31].

4.2.1.4 Test s laktát dehydrogenázou

Laktát dehydrogenáza (LDH) je stabilní cytoplazmatický enzym přítomný ve všech buňkách. Pokud je plazmatická membrána buněk porušená, dojde k jeho uvolnění do extracelulárního média. Jedná se o optickou metodu využívající chromoforu, je jednoduchá, rychlá, spolehlivá, nenákladná a poskytuje reprodukovatelné výsledky.

Test probíhá ve dvou krocích. Nejprve LDH katalyzuje redukci NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotidu) na NADH a H^+ za současné oxidace laktátu na pyruvát. Následně enzym diaforáza využívá nově vzniklé NADH a H^+ ke stechiometrické katalýze redukce tetrazoliové soli na červenou formazanovou sůl. Vytvořený formazanový chromofor je ve vodě rozpustný a má absorpční maximum při 490 nm, intenzita absorbance je pak úměrná množství poškozených buněk. Test se většinou provádí na testovací destičce s 96 jamkami [32].



Obrázek 4: Schéma kvantitativního stanovení LDH.

Enzymu LDH využívá i Warburgův optický test. Jedná se o spektrofotometrické stanovení nárůstu absorbance při 340 nm. Test je založen na rozdílných absorpčních schopnostech NAD^+ a NADH , které jsou dány změnami nikotinamidového kruhu při oxidaci a redukci. Nejprve se poměří absorbance vzorku, přidá se LDH a dojde k přeměně NAD^+ na NADH a absorbance tedy vzroste [33].

4.2.2 Testy ovlivňující buněčnou proliferaci

Buněčná proliferace je proces dělení buněk, označuje se také jako buněčný růst (cell growth), je základem reparačních a regeneračních pochodů a předpokladem buněčné distribuce. Testy buněčné proliferace se soustředí na měření počtu buněk nebo na změnu podílu buněk, které se dělí. Slouží k testování účinků farmaceutik nebo růstových faktorů hodnotících cytotoxicitu nebo zkoumajících okolnosti buněčné aktivace. Testy se soustředí na stanovení celkového buněčného proteinu, měření DNA nebo ATP (dnes je upřednostňováno měření poměru ATP/ADP , který je u viabilních buněk konstantní) [24].

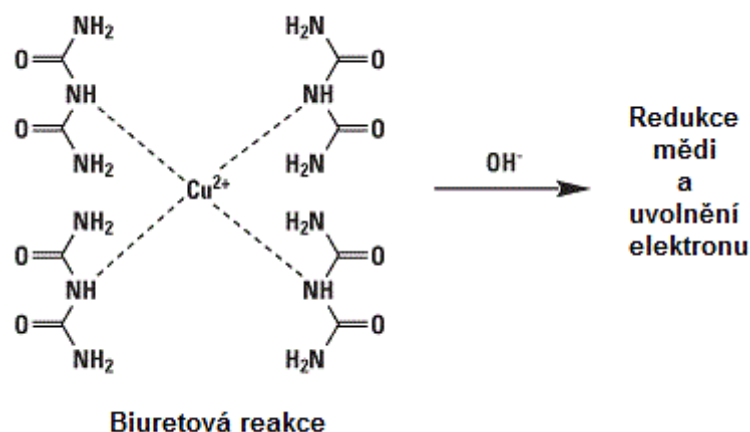
Pro stanovení buněčné proliferace pomocí celkového buněčného proteinu lze využít např. kolorimetrické testy, které se dělí do dvou skupin podle typu chemické reakce: testy zahrnující vazbu měďnatého kationtu na protein za tvorby chelátu se sekundární detekcí pomocí snížení koncentrace mědi a testy založené na přímé reakci proteinu s barvivem detekované přímo změnou barvy [34].

4.2.2.1 Biuretová reakce

Jde o test založený na reakci proteinů s mědí, tzv. biuretové reakci. Při ní v alkalickém prostředí reaguje měďnatý iont (stabilizovaný jako vinanový komplex) s proteinem nebo jeho štěpnými produkty. Peptidy, které obsahují tři a více aminokyselinových zbytků, tvoří barevné cheláty s Cu^{2+} ionty.

Jednoduché aminokyseliny a dipeptidy reakci neposkytují, tripeptidy a větší polypeptidy nebo proteiny reagují za vzniku světle modrého až fialového komplexu, který absorbuje světlo při vlnové délce 540 nm. Jeden měďnatý iont tvoří koordinační komplex se čtyřmi až šesti nejbližšími peptidovými vazbami. Intenzita zbarvení vzniklého komplexu je dána počtem peptidových vazeb poskytujících reakci.

Biuretová reakce je základem pro jednoduché a rychlé stanovení celkového buněčného proteinu [34].

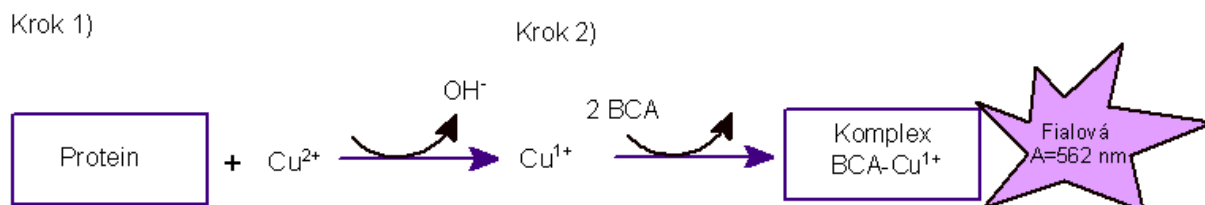


Obrázek 5: Schéma biuretové reakce. Redukci Cu^{2+} na Cu^+ reakce produkuje modrofialové zbarvení [34].

4.2.2.2 Proteinový test s využitím kyseliny bicinchoninové

Poprvé byl tento test představen roku 1985 Paulem K. Smithem a stal se nejpopulárnější kolorimetrickou metodou ke stanovení celkového buněčného proteinu. Jeho výhodou je možnost stanovení i u vzorků, které obsahují až 5 % povrchově aktivních látek (detergentů).

Test kombinuje biuretovou reakci s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí měďného kationtu kyselinou bicinchoninovou (BCA), a to ve dvou krocích. Nejprve dochází k biuretové reakci, při níž je redukce Cu^{2+} na Cu^+ detekována modrým zbarvením. Následuje chelatace BCA s měďným iontem za vzniku intenzivního fialového zbarvení, kdy je výsledný fialový chelát tvořen dvěma molekulami BCA a jedním měďným iontem. Vzniklý komplex je rozpustný ve vodě a vykazuje silnou lineární absorbanci při vlnové délce 562 nm (roste s počtem proteinů). Tato metoda je přibližně 100krát citlivější než test založený na samotné biuretové reakci. Bicinchoninová metoda je velice citlivá na podmínky provedení, tj. na dobu a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého při standardizaci, apod. [34].

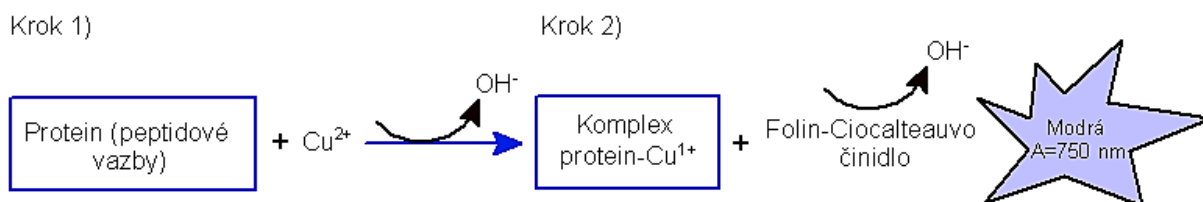


Obrázek 6: Schéma reakce využité při stanovení celkového proteinu pomocí BCA.

4.2.2.3 Lowryho proteinový test

Lowryho proteinový test objevil a roku 1951 představil Oliver H. Lowry jako vylepšení biuretové metody.

Test probíhá opět ve dvou stupních. Protein nejprve reaguje s alkalickým síranem měďnatým v přítomnosti vinanu po dobu 10 minut za laboratorní teploty, vzniká komplex složený ze čtyř peptidových vazeb a jednoho atomu mědi (biuretová reakce). Dále je přidána směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny, tzv. Folin-Ciocalteauovo činidlo, které je redukováno za vzniku modrého zbarvení, po 30 minutách inkubace je komplex stabilnější a vykazuje vyšší hodnoty absorbance.



Obrázek 7: Schématické zobrazení Lowryho testu.

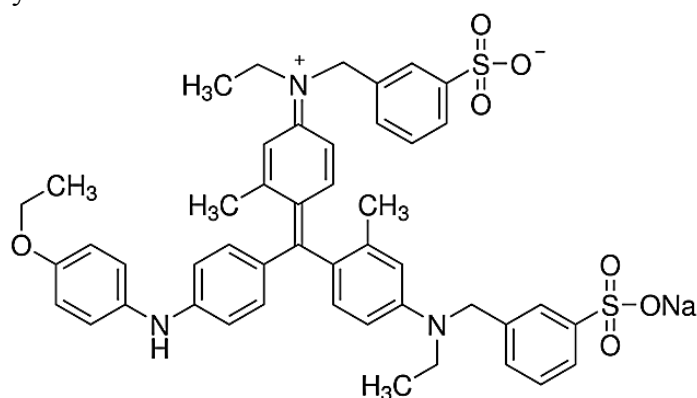
Absorbance je proměřena pro vlnovou délku v rozmezí mezi 650 až 750 nm, nejlépe však při 750 nm, při které absorbují jen několik málo dalších látek.

Intenzita zbarvení se zvyšuje s rostoucí velikostí peptidu, s přítomností některých aminokyselinových zbytků ve struktuře peptidu (tyrosin, tryptofan, cystein, histidin a asparagin).

Metoda byla několikrát upravována, jednu z modifikací vypracoval roku 1972 Hartree. V této modifikaci je využito tří činidel, první dvě slouží biuretovému stanovení. Výsledné zbarvení je mnohem intenzivnější, dochází tedy ke zvýšení citlivosti metody, a stanovení je lineární v širším rozsahu koncentrací [34], [35].

4.2.2.4 Bradfordův proteinový test

Jednou z populárních kolorimetrických metod vhodných ke stanovení celkového buněčného proteinu je Bradfordův test, který poprvé popsal Dr. Marion Bradford roku 1976. V testu je využíváno barviva Coomassie Brilliant blue G250 (briliantová modř), které tvoří komplex s buněčnými proteiny.



Obrázek 8: Chemická struktura barviva Coomassie Brilliant Blue G250 používaného pro Bradfordův test [36].

Barvivo se váže v kyselém pH na proteinové molekuly dvěma způsoby. Na nepolární části proteinu je navázána trifenylmethanová skupina, anion sulfoskupiny pak na bazické skupiny

vedlejších řetězců aminokyselin. Výsledkem reakce je barevná změna úměrná množství proteinu. Jako kalibrační protein je použit hovězí sérový albumin (BSA) [37].

4.2.2.5 Piercův proteinový test při 660 nm

Test patří mezi nejnovější kolorimetrické metody. Reagent obsahuje komplex kovu s barvivem v kyselém pufru, barvivo je na bázi polyhydroxybenzensulfoftaleinu, kov je použit přechodný. Tento komplex se v kyselém prostředí váže na protein, což způsobuje posun v absorpčním maximu barviva, sledovaná barevná změna je z červenohnědé na zelenou. Barva, tvořená deprotonací barviva při nízkém pH, je stabilní a její intenzita roste s koncentrací proteinu. Proces je usnadněn interakcemi zodpovědnými za vazbu proteinu prostřednictvím kladně nabitých aminokyselinových skupin a záporně nabitého deprotonovaného komplexu barvivo-kov. Vazba barviva na proteiny probíhá podobným způsobem, jako je tomu u Bradfordova proteinového testu. Měření probíhá při 660 nm.

Jedná se o rychlou a citlivou metodu, která není rušena detergenty, redukčními činidly a některými dalšími reagenty [34], [38].

4.2.2.6 Test pomocí měření ATP

Poprvé byl použit jako test životaschopnosti somatických buněk. Testování probíhá na mikrodestičkách. Mimo měření vlivů na proliferaci buněk testy poskytují informace o subletálním poškození buněk, protože produkce ATP je nezbytná pro správnou funkci buněčného metabolismu a může být dočasně potlačena různými formami buněčného stresu.

Pro měření se využívá přísné regulace vnitrobuněčného ATP. Mrtvé nebo umírající buňky obsahují nízké nebo nulové koncentrace ATP, existuje tedy jakýsi pevný lineární vztah mezi počtem buněk a koncentrací ATP měřenou v buněčném lyzátu nebo extraktu. Detekce je založena na bioluminiscenci, kdy je využito enzymu luciferázy a jeho substrátu D-luciferinu, a poskytuje velmi citlivou odezvu. Pokud je v testovaném vzorku přítomno ATP, dochází k produkci světla luciferázou, intenzita světla je úměrná koncentraci ATP. Světlo lze detekovat pomocí luminometru nebo čtečkou mikrodestiček vhodnou k měření luminiscenčních signálů [39].

4.2.2.7 Test pomocí měření poměru ADP/ATP

K měření buněčné proliferace a cytotoxicity se používají bioluminiscenční metody, takové testy využívají toho, že všechny buňky mají stejné nároky na ATP pro udržení životaschopnosti. Pro odlišení životaschopnosti buněk lze nyní využít i změn v poměru ADP/ATP. Pokud je v buňce zvýšená hladina ATP a hladina ADP je snížena, dochází k proliferaci. Je-li naopak hladina ATP snížena a hladina ADP zvýšená, nastává u buněk apoptóza nebo nekróza (pokles ATP a zvýšení ADP bývá mnohem výraznější, pokud dochází k nekróze buněk).

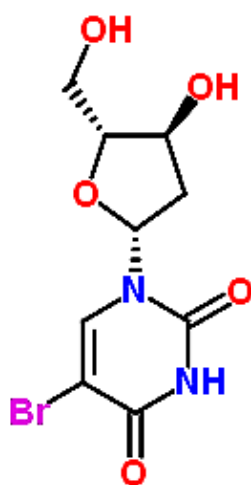
Při měření poměru ADP/ATP lze využít např. enzymu luciferázy, test obsahuje dva kroky. Nejdříve pracovní roztok lyzuje buňky, aby došlo k uvolnění ATP a ADP. V přítomnosti luciferázy ATP okamžitě reaguje s D-luciferinem a produkuje světlo, jehož intenzita je přímým měřítkem intracelulární koncentrace ATP. Ve druhém kroku dochází k enzymatické reakci, během níž je ADP převedeno na ATP, které opět reaguje s D-luciferinem za uvolnění světla [40].

4.2.2.8 Testování pomocí inkorporace ^3H -thymidinu

Výše uvedená metoda je vysoce citlivá pro detekci proliferace buněk. K monitorování rychlosti syntézy DNA a buněčné proliferace je použit radioaktivně značený ^3H -thymidin (3H-TdR), jenž je inkorporován do buněčné DNA. Inkorporace značeného thymidinu se měří na β -counteru [41].

4.2.2.9 BrdU test

Metoda nahrazující thymidinový test, neradioaktivní. BrdU (5-brom-2'-deoxyuridin) je syntetický nukleotid a analog thymidinu, který se začleňuje do dělicí se buňky během syntézy DNA. Pokud je již jednou zahrnut do DNA, zůstává již na svém místě a po dělení se nachází i v buňkách dceřiných. BrdU inkorporované do buněk lze sledovat pomocí vhodných sond (v tomto případě se jedná o protilátky).



Obrázek 9: Chemická struktura 5-brom-2'-deoxyuridinu [42].

BrdU se přidá do buněk kultivovaných na mikrotitračních destičkách, následuje inkubace po dobu 2 až 24 h, kdy je BrdU začleněno do proliferujících buněk. Po kultivaci se supernatant odstraní a buňky jsou inkubovány s anti-BrdU protilátkou konjugovanou s peroxidázou (anti-BrdU-POD). Protilátka se váže na BrdU, začleněný do DNA, a vzniklá vazba se detekuje substrátovou reakcí, kvantifikována může být pomocí absorbance [43].

4.2.2.10 EdU test

Roku 2008 přišli Adrian Salic a Timothy J. Mitchinson s alternativou k testování proliferace buněk pomocí BrdU, když ho nahradili EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin). Nová metoda je rychlejší, jednodušší a vysoce citlivá.

Ke značení nově syntetizované DNA se využívá EdU a detekce zakomponovaného thymidinového analogu je zajištěna „click“ reakcí, tj. mědi katalyzovanou [3+2] cykloadicí. Při ní vzniká stabilní triazolový kruh formovaný kovalentní vazbou alkylové skupiny v EdU na konjugovanou azidovou skupinu, kterou obsahuje činidlo AlexaFluor[®]. Vzhledem ke své malé velikosti a chemickým vlastnostem proniká fluorescenční azid účinně do živých a pevných tkání a pro EdU snadno přístupných nukleosidů v DNA. Počet proliferujících buněk je zjištěn cytometricky [44].

4.2.3 Testy ovlivňující metabolickou aktivitu buňky

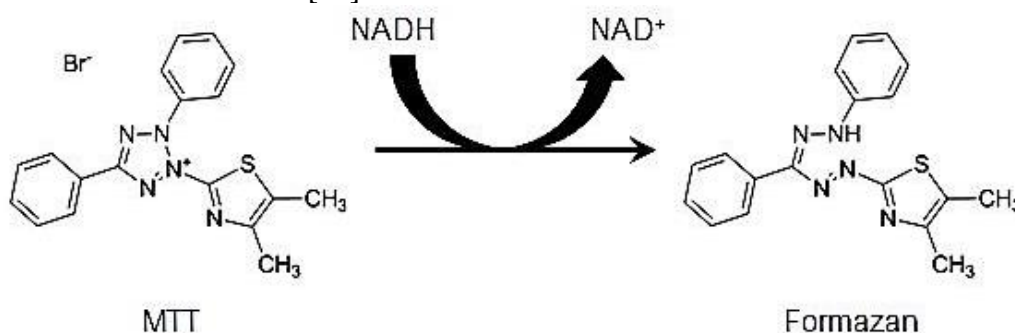
Jsou alternativou k testům permeability buněčné membrány, tj. k testům buněčné viability. Soustředí se na biologické funkce uvnitř nepoškozených buněk a zabývají se především funkcí mitochondrií. Provádí se v 96jamkových destičkách.

Životaschopné buňky jsou detekovány různými tetrazoliovými sloučeninami, jako je MTT, XTT, MTS a WST-1. Tyto sloučeniny se dělí do dvou základních kategorií podle náboje na kladně nabité MTT, které snadno proniká do viabilní eukaryotické buňky, a záporně nabitě MTS, XTT a WST-1, které do buněk pronikají špatně. Při takových testech je k usnadnění redukce tetrazoliové soli na barevný formazan využíváno intermediálních elektron-akceptorů, které mohou přenášet elektrony z cytoplazmy nebo plazmatické membrány [24], [45].

4.2.3.1 MTT test

Prvním homogenním testem životaschopnosti buněk pro formát s 96 jamkami, který je vhodný pro vysoce výkonný screening, byl test redukce tetrazoliové sloučeniny MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan. MTT test byl vyvinut jako neradioaktivní alternativa k testu s tritiovým thymidinem (nedokáže ale vypovídat o buněčné proliferaci, pouze o metabolické aktivitě buněk).

Viabilní buňky s aktivním metabolismem převádí MTT na fialově zbarvený formazanový produkt s maximem absorbance okolo 570 nm. Mrtvé buňky schopnost přeměnit MTT na formazan ztrácejí. Formazanový produkt se hromadí ve formě nerozpustné sraženiny uvnitř buněk, u povrchu buněk a v kultivačním médiu. Tato sraženina musí být před měřením absorbance rozpuštěna, používá se např. okyselený isopropanol, DMSO, dimethylformamid, SDS, nebo kombinace detergentu a organického rozpouštědla. Velikost generovaného signálu je závislá na koncentraci MTT, délce inkubační doby, počtu životaschopných buněk a na jejich metabolické aktivitě [45].



Obrázek 10: Schéma přeměny MTT na barevný formazanový produkt [45].

4.2.3.2 MTS, XTT a WTS-1 testy

Při použití činidel z druhé skupiny (MTS, XTT, WST-1) není potřeba dodatečně rozpouštět formazanový produkt, protože je rozpustný již v kultivačním médiu. Tato tetrazoliová činidla se používají v kombinaci s intermediálními elektron-akceptorními činidly, např. fenazin methylsulfát (PMS) a fenazin ethylsulfát (PES), která pronikají viabilními buňkami, redukují se v cytoplazmě nebo na povrchu buněk a opouští buňky, kde mohou převést tetrazoliovou sloučeninu na rozpustný formazanový produkt. Absorbance může být zaznamenávána již během raných stádií inkubace [45].

4.2.4 DNA čipy (microarrays)

Genová exprese je citlivým indikátorem expozice toxické látky, nemocného stavu a buněčného metabolismu, představuje tedy jedinečný způsob charakterizující, jak se buňky a organismy přizpůsobují změnám ve vnějším prostředí. Měření hladin genové exprese po expozici chemické látky mohou být použity k popisu mechanismu působení toxické látky a tvoří „genetický podpis“ k identifikaci toxických produktů. Možnost analýzy účinku chemikálií a environmentálních stresorů na velké množství genů v jednom experimentu vedla k rozvoji v oblasti toxikogenomiky, její zastánci usilují o uplatnění mRNA a technologie proteinové exprese při studiu účinků chemických látek v biologických systémech. Dostupnost nejen lidského genomu, ale i genomu několika dalších organismů umožňuje použití technologie mikročipů na několika modelových organismech a savčích buněčných liniích.

In vitro DNA microarrays byly použity např. k porozumění odpovědi endokrinních modulátorů u vodních zebříček (*Danio rerio*), jejichž embrya byla exponována 4-nonylfenolem (4NP). Profilování genové exprese u těchto testovacích organismů pomohlo identifikovat 9 genů spojených s funkcí estrogenní odpovědi, kterou lze u embryí po expozici 4NP indikovat již v nízkých koncentracích.

Roku 2003 byl představen modelový systém profilující genovou expresi u endokrinních disruptorů, které napodobují estrogény [46].

5 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY

Endokrinní disruptory (ED) jsou exogenní činidla ovlivňující endokrinní (hormonální) systém. Negativně působí na syntézu, sekreci, transport, metabolismus, vazbu nebo eliminaci přírodních hormonů, které jsou zodpovědné za udržení homeostázy, reprodukce, vývoje a chování. Z fyziologického hlediska je endokrinní disruptor přírodní nebo syntetická látka, která prostřednictvím životního prostředí nebo nevhodné vývojové expozice mění hormonální a homeostatické systémy umožňující organismu komunikovat a reagovat na jeho prostředí.

Velké množství disruptorů s různou chemickou strukturou vykazuje podobné účinky, mechanismus je často odlišný. ED proto není možné jednoznačně rozdělit podle jejich struktury a funkce, kritéria se zaměřují především na společný účinek.

Základní stavební charakteristikou pro většinu ED je monocyklická nebo polycyklická struktura s různou substitucí vodíků, často s chlorem nebo bromem. Cyklická jádra ale nejsou základní podmínkou. Hormonální aktivitu často ovlivňuje délka a rozvětvení postranního řetězce. ED mohou působit buď přímo vazbou na receptory jako agonisté (chovají se jako přirozené hormony) nebo antagonisté (blokace receptorů pro přirozené hormony), nebo nepřímo ovlivněním biosyntézy, metabolismu, vylučování nebo biodostupnosti přirozených hormonů (např. inhibice aromatázy) [47], [48].

5.1 Mechanismy působení hormonů

Hormony slouží v tělech mnohobuněčných organismů jako biokatalyzátory, jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí, tzv. endokrinními žlázami. V organismech se hormony dostávají k buňkám extracelulární cestou, jsou tzv. prvními posly. Existují dva způsoby, jak mohou hormony předat signál buňce. Rozlišují se dle schopnosti prostupovat cytoplazmatickou membránou na hormony lipofilní a hydrofilní.

Lipofilní (steroidní) hormony prochází membránou a své receptorové molekuly nachází až v cytoplazmě cílových buněk, následně komplex hormon-receptor vstupuje do jádra, kde indukuje transkripci a proteosyntézu enzymů nebo strukturních bílkovin, které vyvolávají buněčnou odpověď.

Hydrofilní (polární proteinové) hormony nemohou membránou procházet a jejich receptory jsou připraveny na vnějším povrchu membrány. Receptor aktivovaný vazbou s peptidickým hormonem předává do nitra buňky signál prostřednictvím membránových enzymů, které se postupně aktivují. Poslední z nich vyvolá na vnitřní straně membrány produkci tzv. druhého posla. Druhým poslem je např. cAMP. Jeho úkolem je aktivovat proteinkinázy, které fosforylují specifické cytoplazmatické enzymy katalyzující již vlastní buněčnou reakci [49].

Endokrinní disruptory se nedefinují podle chemické struktury, ale podle jejich biologického účinku. Účinky se odehrávají prostřednictvím odlišných mechanismů. ED mohou způsobovat agonistické účinky, kdy dochází k napodobení biologické aktivity hormonu vazbou endokrinního disruptoru na buněčné receptory. Dalším možností je účinek antagonistický, kdy receptor po navázání endokrinního disruptoru není aktivován, ale je zabráněno vazbě přirozeného ligandu. ED se také mohou vázat na transportní proteiny obsažené v krvi a způsobovat tak změny v množství přirozených hormonů v krevním oběhu, nebo zasahují do metabolických procesů v těle a ovlivňují tak syntézu nebo rozklad přírodních hormonů. V místech zodpovědných za syntézu hormonů mohou ED tvořit DNA adukty nebo mohou reagovat s druhými posly [50].

Většina *in vitro* studií, zabývajících se endokrinními disruptory, se věnuje estrogenímu a androgenímu receptoru.

5.1.1 Estrogení receptor

Estrogení sloučeniny vykazují charakteristickou schopnost vázat se na estrogení receptor (ER) a aktivovat ho.

V jádře se nachází komplex inaktivního ER s asociovanými stresovými proteiny HSP (heat shock proteins). Pokud má dojít k vazbě estrogení látky na ER, stresové proteiny disociují a uvolňují vazebné místo pro ligand. Následuje dimerizace receptoru s ligandem a vazba homodimerního komplexu na specifické úseky DNA, tzv. EREs (estrogen response elements), umístěné v promotoru genů pro indukci estrogení odpovědi buňky. Připojení dalších transkripčních faktorů vede k transkripci genů a syntéze proteinů, které jsou potřebné pro projev estrogeního děje [51].

5.1.2 Androgení receptor

V cytosolu buňky se nachází inaktivní androgení receptor (AR), který je náchylný k rychlé degradaci proteázami. Vazba ligandu na AR vyvolá konformační změny, jež jsou předpokladem pro stabilizaci, dimerizaci. Dimer se v jádře váže na úseky DNA v promotoru genů pro indukci androgení odpovědi. Jejich transkripce vyvolá androgení odpověď (AREs, androgen response elements) [52].

5.1.3 Aryl uhlovodíkový receptor

Po navázání ligandu na cytosolové aryl uhlovodíkové receptory (AhR) je komplex receptor-ligand aktivován a přemístěn do jádra, HSP oddisociují a dojde k tvorbě dimeru s proteinem ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Homomerní komplex ligand-AhR-ARNT se váže na specifické úseky DNA, tzv. DRE (dioxin-responsive element). Vazba na DRE způsobuje ohyb DNA, narušení chromatinu a nukleozomu. To způsobuje lepší dostupnost promotoru a transkripční aktivaci genů zodpovědných za odpověď [51].

5.2 Endokrinní disruptory v životním prostředí

Skupina ED je velmi různorodá a zahrnuje steroidní hormony (estrogeny, androgeny), pesticidy (včetně herbicidů a fungicidů), změkčovadla, surfaktanty, organokovy, halogenované polyaromatické uhlovodíky a fytoestrogeny. Mnohé látky, které se chovají jako endokrinní disruptory se řadí mezi perzistentní organické polutanty (POPs) [48].

Přímo v těle živočichů jsou syntetizovány endogenní estrogeny. Mezi tyto látky patří estron, 17 β -estradiol a estriol. Látky, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému, se označují jako environmentální, případně exogenní estrogeny. Dělí se dle původu na fytoestrogeny (isoflavonoidy, lignany, kumenstanany, laktony, steroly), mykoestrogeny (zearalenon a jeho deriváty) a xenoestrogeny (průmyslově vyráběné produkty a jejich metabolity: pesticidy, bisfenol A, ftaláty, alkylfenoly, polyaromatické uhlovodíky, dioxiny, furany a farmaceutické produkty na bázi estrogenů) [53].

5.2.1 Pesticidy

Největší skupinu endokrinních disruptorů představují pesticidy. Pocházejí ze zemědělské činnosti. Spojitost mezi pesticidy a endokrinními disruptory byla poprvé pozorována roku

1949, kdy došlo ke snížení počtu spermií u mužů podílejících se na letecké aplikaci DDT. V poslední době se ED pesticidy podílí na etiologii některých druhů rakoviny, potratech a jiných poruchách reprodukce, vrozených vadách, poruchách chování, atp.

Rezidua pesticidů jsou snadno detekovatelná v čerstvém ovoci i zelenině. Maso, vejce a mléčné výrobky často obsahují stopy perzistentních pesticidů jako je chlor i přesto, že se dané sloučeniny již po mnoho let nepoužívají. Detekované koncentrace jsou však mnohdy nízké a mají pouze malý vliv na lidské zdraví, některé látky ale vykazují schopnost akumulace a po čase jsou schopné negativně působit na lidi i volně žijící zvířata [54].

5.2.1.1 DDT a jeho metabolity

DDT se používalo jako insekticid, je neúčinnější zbraní proti malárii. V Evropě i v USA je jeho použití již zakázáno, ale v řadě rozvojových zemí se stále používá, v současnosti je jeho jediným producentem Indie. V životním prostředí se DDT dehydrochloruje na DDE. DDT i jeho metabolity patří mezi perzistentní, ekologicky i zdravotně závadné látky, které se velmi dobře kumulují v tukových tkáních organismů a adsorbují na povrchy pevných částic. Rozkládáno je chemickou i biologickou cestou. Akutní expozice poškozuje nervový systém, chronická expozice může způsobit rozvoj rakoviny jater, narušit metabolismus steroidních hormonů, způsobit poruchy vývoje plodu i plodnosti [55].

5.2.1.2 Organické sloučeniny cínu

Uměle vytvořené sloučeniny cínu s uhlíkem se nejčastěji uplatňují jako stabilizátory při výrobě plastů (PVC). Do prostředí se uvolňují během výroby, použití a likvidace. Jsou součástí obalů potravin, plastových trubek, pesticidů, barev, ochranných nátěrů a přípravků proti hlodavcům. Mezi nejnebezpečnější z nich se řadí tributylcín. Jejich významnou vlastností je schopnost bioakumulace. V půdě jsou organické sloučeniny cínu pevně vázány, ve vodě se usazují do sedimentů, případně tvoří tenkou vrstvu u hladiny. Toxické účinky závisí na konkrétní sloučenině – negativně působí na nervovou soustavu a poškozují hormonální systém [55].

5.2.2 Bisfenol A

BPA je průmyslová chemikálie používaná při výrobě běžných umělých hmot, jako jsou polykarbonáty a epoxidové pryskyřice. Polykarbonáty najdeme v kojeneckých lahvích, barelech na vodu, dózách na potraviny, používají se i ve stomatologii, stavebnictví nebo medicíně. Epoxidové pryskyřice slouží k potahování vnitřků kovových výrobků, přidávají se do lepidel, nátěrových hmot nebo laků na nehty. Dále se BPA přidávají do pesticidů, antioxidantů, retardérů hoření, brzdových kapalin, zubních plomb, aj. Z výrobků se bisfenol A snadno uvolňuje do prostředí a kontaminuje ho. BPA jako endokrinní disruptor napodobuje funkci přirozeně produkovaných hormonů, blokuje v buňkách jejich receptory a ovlivňuje syntézu, transport, metabolismus a vylučování hormonů. Používání BPA v kojeneckých lahvích je od roku 2011 zakázáno ve všech zemích EU [55].

5.2.3 Ftaláty

Estery kyseliny ftalové (ftaláty) se používají jako změkčovadla plastických hmot, uplatňují se při výrobě PVC, najdeme je v kosmetice, adhezivech, barvách a pesticidech. V materiálech nejsou pevně vázány a unikají do okolního prostředí. Často se jedná o látky perzistentní, které

jsou schopné bioakumulace, některé jsou neškodné, jiné mohou být toxické. Ty pak poškozují reprodukční a endokrinní systém, jedná se např. o benzyl butyl ftalát (BBP), dibutyl ftalát (DBP), diisobutyl ftalát (DIBP). Jejich použití v obalových materiálech potravin a kosmetice bylo omezeno. Ftaláty blokují mužské hormony, tzv. androgeny, a tím způsobují demaskulinizaci populace [55].

5.2.4 Alkylfenoly

Vysoce perzistentní organické polutanty odvozené od fenolu. Základní surovina pro syntézu neiontových detergentů, alkylfenol etoxylátů. Uplatnění mají i jako průmyslové detergenty, přísada pesticidů nebo barviv na bázi vody, slouží k úpravě textilií a kůže, najdeme je i ve výrobcích osobní hygieny a jako antioxidanty v některých plastech. Jsou vysoce toxické pro vodní organismy, bioakumulují se v potravních řetězcích. Největší riziko představují nonylfenol ethoxyláty a oktylfenol.

Nonylfenol ethoxyláty (NPE) jsou povrchově aktivní látky, které v prostředí snadno biodegradují na jednodušší, avšak toxičtější nonylfenoly (NP). Ty jsou podobné estrogenům, jejichž funkci mohou i zastoupit – mají negativní vliv na reprodukční systém a mohou způsobit feminizaci populace. Jsou velmi toxické pro vodní organismy. V zemích EU je použití NPE zakázáno.

Oktylfenol (OP) je používán k výrobě stabilizátorů, změkčovadel a antioxidantů. Spolu s oktylfeol ethoxyláty je považován za látku narušující hormonální systém organismu. U člověka pravděpodobně způsobuje pokles počtu spermií. OP je v půdě pevně vázán a neproniká tedy do podzemních vod, ve vodě je vázán na organické látky a usazuje se do sedimentu. Používání OP je v řadě zemí omezeno nebo zakázáno [55].

5.2.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky

PAHs jsou běžnou součástí životního prostředí, až na výjimky se cíleně nevyrábí, jsou však součástí řady průmyslových produktů (např. nafta, asphalt). Vznikají přirozeně během spalování organické hmoty, mezi jejich přirozené zdroje patří vulkanická činnost a požáry. Některé PAHs mají vysoký bioakumulační potenciál. Polycyklické aromatické uhlovodíky v čele s benzo(a)pyrenem patří mezi karcinogeny, negativně působí i na hormonální systém [55].

5.2.6 Dioxiny

Dioxiny zahrnují dvě skupiny látek: polychlorované dibenzodioxiny (PCDD) a polychlorované dibenzofurany (PCDF). Tyto látky nebyly nikdy cíleně vyráběny, vznikají jako vedlejší produkt při spalování fosilních paliv a odpadu, do prostředí se uvolňují i při výrobě spojené s chlorem. Přirozeně vznikají sopečnou činností nebo při lesních požárech. Dioxiny se řadí mezi POPs, likvidace je obtížná. Jejich dlouhodobé působení negativně ovlivňuje imunitní, nervový, ale i hormonální systém, zejm. štítnou žlázu, a reprodukční funkce [55].

5.2.7 Polychlorované bifenyly

PCB jsou vedlejším produktem řady průmyslových výrob, vznikají při spalování odpadů a při hoření olovnatého benzínu. Jedná se o odolné látky se schopností bioakumulace v potravních řetězcích, jsou tepelně odolné a nehořlavé. Ve vodním prostředí se kumulují

v sedimentech, jejich rozklad urychluje UV záření. Používaly se v chladicích, izolačních a mazacích systémech, jako aditiva při výrobě barev, lepidel, vosků, pesticidů a balicích papírů. Kontaminují všechny složky životního prostředí. Vyvolávají onemocnění jater, dále poruchy krevního oběhu, únavu, jsou příčinou reprodukčních problémů a prodlužují těhotenství [55].

5.2.8 Polybromované difenylethery

PBDE patří mezi uměle vyráběné organické sloučeniny, které se používají jako zpomalovače hoření. Do prostředí se mohou uvolňovat při výrobě, spotřebě a likvidaci. Mají vysokou schopnost bioakumulace a přenáší se v rámci potravních řetězců. Polybromované difenylethery téměř nepodléhají biologickému rozkladu, některé se rozkládají vlivem tepla, nebo světla. Ve vodním prostředí se vyskytují v sedimentech. PBDE negativně působí na imunitní systém, reprodukční cyklus organismu a na vývoj další generace, negativně ovlivňují také hormonální systém. Mezi nejnebezpečnější patří polybromované dibenzodioxiny (PBDD) a polybromované dibenzofurany (PBDF) [55].

5.2.9 Farmaceutické produkty na bázi estrogenů

Do této skupiny látek je řazena především hormonální antikoncepce, ale i specifické léky obsahující např. diethylstilbestrol. V hormonální antikoncepci jsou často jako účinné látky využívány 17 α -ethynylestradiol, mestranol a estradiolvaleran.

Látky užívané v hormonální antikoncepci jsou v těle metabolizovány na konjugáty s kyselinou glukuronovou a následně jsou vyloučeny močí. Konjugáty jsou během zpracování splaškové odpadní vody aktivovaným kalem hydrolyzovány glukoronidázou (enzym produkovaný mikroorganismy) zpět na syntetické estrogeny a kyselinu glukuronovou. Vzniklé estrogeny mohou svým účinkem napodobovat endogenní hormony a tak měnit jejich metabolismus [56].

5.3 *In vitro* testy ekotoxicity se zaměřením na endokrinní disruptory

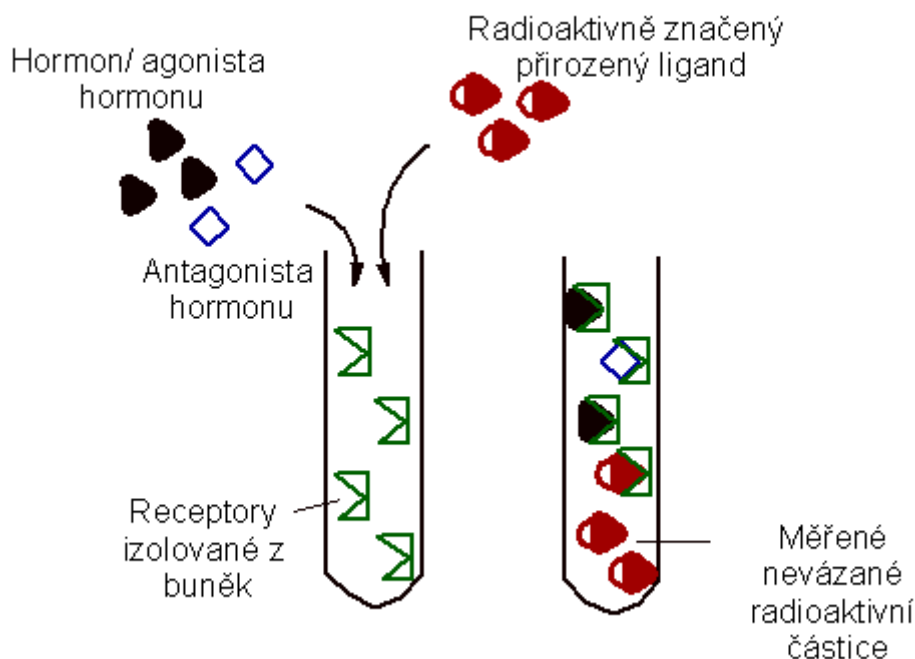
Pro stanovení a klasifikaci ED lze využít moderní analytické metody (využití plynové a kapalinové chromatografie spolu s hmotnostní spektrometrií), *in vivo* testy nebo specifické *in vitro* testy. Základem pro vývoj testovacích systémů *in vitro* je molekulární mechanismus působení estrogenerů.

5.3.1 Test vazby ligandu na receptor

Test vazby ligandu na receptor se zaměřuje na sledování kompetice testovaného vzorku s radioaktivně značeným přirozeným ligandem při vazbě na specifický receptor (ER, AR), nejčastěji se používá 17 β -estradiol nebo testosteron. Čím více látky s androgenní nebo estrogení aktivitou je obsaženo v testovaném vzorku, tím více radioaktivně značeného 17 β -estradiolu nebo testosteronu je vytěsněno.

Při testu se používají receptory získané z jaderného nebo cytosolového extraktu z tkání savců nebo obratlovců, např. z potkana. Sloučeniny se při tomto testu mohou navázat na ER, popř. AR, aniž by musely projít přes buněčnou membránu.

Test poskytuje informaci o tom, zda testovaná látka je nebo není ligandem daného receptoru, nezjistíme ale, zda působí stejně jako přirozený ligand (agonismus), nebo zda inhibuje jeho funkci (antagonismus) [57].



Obrázek 11: Mechanismus reakce při testu vazby ligandu na receptor.

5.3.2 Testy s reportérovými geny

Testy s reportérovými geny jsou založeny na schopnosti chemické látky podněcovat transkripční aktivitu závislou na ER. Expresce reportérového genu je výsledkem kaskády molekulárních dějů zodpovědných za aktivaci receptoru a jako taková poskytuje informace o estrogenní aktivitě sloučeniny. Testy se provádí na geneticky modifikovaných buňkách obratlovců (nejčastěji se jedná o savce) nebo s kvasinkovými buňkami. Buňky jsou transfekovány ERE nebo ARE spojenými s reportérovým genem. Nejčastěji se využívá reportérový gen kódující luciferázu u savčích buněk nebo β -galaktosidázu u buněk kvasinkových. Rozlišujeme testy kvasinkové a testy na savčích buněčných liniích (test s reportérovými geny využívající luciferázu, test založený na buněčné linii MVLN, test využívající chimérického receptoru, test produkce vitelogeninu). Výhodou testů na savčích buněčných liniích je vyšší citlivost oproti kvasinkovým testům, nevýhodou pak možná interference testovaných látek s dalšími jadernými receptory.

Pokud je reportérový gen vložen do buňky pouze po dobu potřebnou k provedení experimentu, jedná se o tzv. přechodnou transfekci, je-li zaveden trvale, jde o transfekci stálou, která je následována kultivací geneticky modifikovaných buněk.

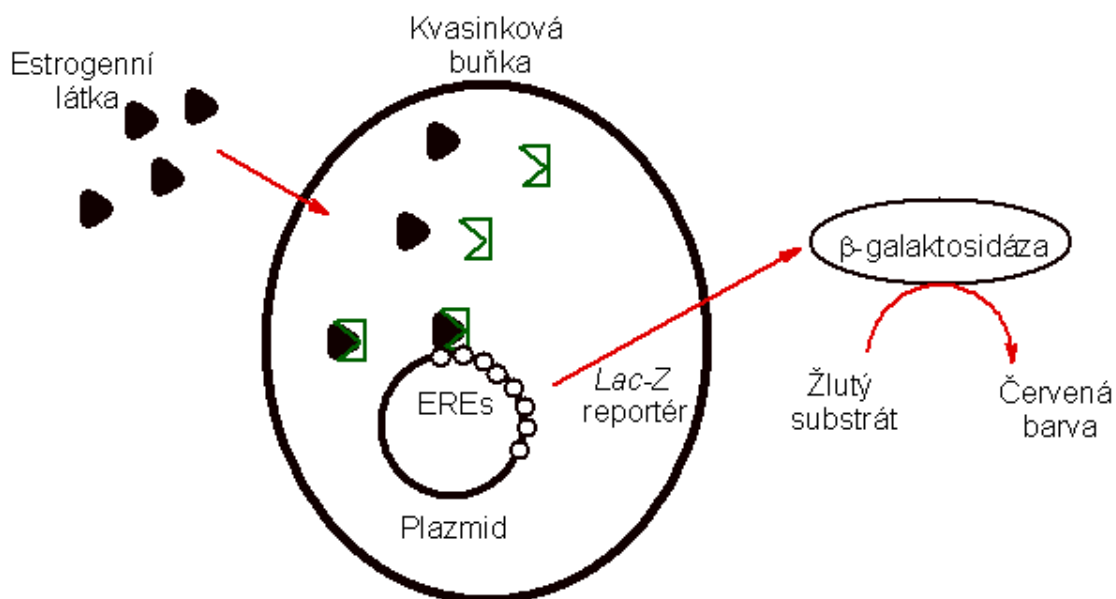
Na začátku testu vstupuje testovaná látka do buňky, kde interaguje s receptorem a aktivuje jej prostřednictvím konformačních změn. Aktivovaný receptor se po vstupu do jádra váže na DNA, čímž iniciuje expresi reportérového genu a produkci enzymu (β -galaktosidáza, luciferáza). Vzniklý enzym metabolizuje vhodný substrát přítomný v inkubační směsi a dochází k produkci snadno detekovatelného produktu. Při antagonistických studiích jsou buňky vystaveny zároveň testované látce i referenčnímu ligandu, ale kontrolní sada je vystavena pouze samotnému referenčnímu ligandu. Měřítkem antagonismu je rozdíl mezi aktivitou reportérového genu za přítomnosti nebo absence testované látky. Agonistické studie

zkoumají schopnost testované látky, případně vzorku, navodit přepis reportérového genu, získané hodnoty jsou srovnávány s hodnotami odpovědi přirozeného ligandu [57].

5.3.2.1 Kvasinkové testy

Buňky kvasinek neobsahují endogenní receptory steroidních hormonů a nejsou u nich proto pozorovány interakce mezi receptory. Transfekují se DNA sekvencí pro lidský organismus – vznikají tak rekombinantní kvasinkové buňky schopné exprese lidského estrogenního nebo androgenního receptoru. Obecně rekombinantní kvasinkové testy (RYA, recombinant yeast-based assays) využívají geneticky modifikované kvasinky kmene *Saccharomyces cerevisiae*. Nevýhodou kvasinkových testů je přítomnost buněčné stěny a mechanismus aktivního transportu, který se může lišit od mechanismu u savčích buněk a který může ovlivnit aktivitu některých testovaných sloučenin.

Jednou z testovacích metod je YES (yeast estrogen screen) test. Slouží k rychlému screeningu různých estrogenních sloučenin. Tento test využívá stálé transfekce kvasinkových buněk genem pro lidský ER a plazmidem obsahujícím specifické úseky DNA indukující estrogenní odpověď (EREs) a *lac-Z* gen (kódující reportérový gen pro β -galaktosidázu). Vazbou ligandu dochází k aktivaci receptoru, expresi *lac-Z* a produkci β -galaktosidázy. Enzym je vylučován do kultivačního média, které metabolizuje chromogenní substrát a dochází tak ke změně barvy ze žluté na červenou, její intenzita se měří spektrofotometricky. YES test slouží k měření agonistického účinku [57], [58].



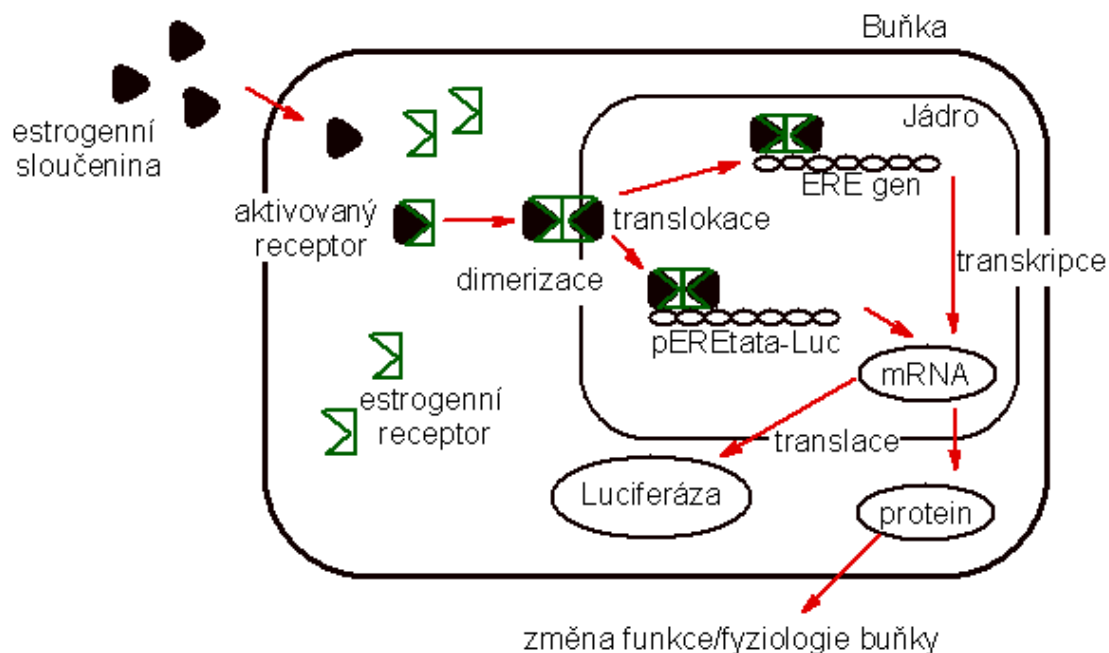
Obrázek 12: Mechanismus reakce kvasinkového testu.

5.3.2.2 Test s reportérovými geny využívající luciferázu

Patří do skupiny testů na savčích buněčných liniích, estrogenní toxicita je stanovena indukcí luciferázy u geneticky modifikovaných buněk. V literatuře test nalezneme pod názvem CALUX (chemical-activated luciferase-gene expression), případně ER-CALUX.

Tato metoda využívá buněčné linie T47D pocházející z lidského prsního karcinomu, jež obsahují reportérový gen, který kóduje luciferázu. Buňky jsou vystaveny estrogenním látkám, ty jsou následně navázány na endogenní ER. Receptor je aktivován a vzniká dimer schopný

vázat se na specifické úseky DNA. To vede k expresi luciferázového genu a produkci luciferázy, která je měřena luminometrem v lyzátu buněk.



Obrázek 13: Mechanismus estrogenního děje v lyzátu buněčné linie T47D.

5.3.2.3 Test založený na buněčné linii MVLN

Princip tohoto testu je podobný jako u testu ER-CALUX, namísto buněčné linie T47D využívá derivát MCF-7 z buněčné linie rakoviny prsu, která také obsahuje endogenní estrogenní receptor. Specifická estrogenní transkripční aktivita testované látky je závislá přímo na aktivitě luciferázy, která je měřena v lyzátu exponovaných MVLN buněk.

5.3.2.4 Test využívající chimérického receptoru

Chimerické receptory představují spojení savčí a kvasinkové DNA, jsou složeny z domény určené k vazbě receptoru pocházející ze savčích buněk (např. doména pro vazbu ligandu z ER) a z domény pro vazbu na DNA převzaté z kvasinek, zde může jít např. o transkripční faktor Gal4. Biotest je pak představován chimerickým receptorem, úsekem DNA, který se váže na receptor, a reportérovým genem kódujícím luciferázu, který je regulován transkripčním faktorem Gal4.

Transfekované buňky jsou exponovány testovaným sloučeninám. Estrogenní látky se vážou na chimerický receptor, vzniká konstrukt s vysokou afinitou k DNA vazebnému receptorovému komplexu, který se váže na element odezvy Gal4 na reportérovém genu luciferázy. Vazbou tohoto aktivovaného komplexu dojde k zahájení exprese genu luciferázy následované vyvoláním luciferázové aktivity, která je přímým měřítkem estrogenní aktivity dané sloučeniny [57].

5.3.2.5 Test produkce vitellogeninu

Biotest je založen na schopnosti primárních kultur hepatocytů vejcorodých organismů, např. pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), reagovat na estrogenní stimulaci produkcí vitellogeninu. Vitellogenin je velký lipoglykofosfoprotein s dvěma atomy zinku a dvěma

atomy vápníku v molekule. Estrogenní aktivita testované látky se porovnává dle množství vyprodukovaného proteinu.

Výhodou testu je, že buňky není potřeba na rozdíl od jiných testů s reportérovými geny nijak transfekovat. Funkci reportérového genu zastává endogenní gen k produkci vitellogeninu. Nevýhodou testu je nutnost živého organismu k získání primárních jaterních buněk, které jsou navíc méně stabilní než buňky geneticky modifikované [59].

5.3.3 Test proliferace buněk

Test proliferace buněk, tzv. E-screen, byl vyvinut pro hodnocení estrogenicity přírodních chemických látek pomocí proliferačních účinků estrogenů na jejich cílové buňky. V E-screen testu se estrogenní odpověď měří pomocí proliferace buněk z linie MCF-7.

Test je založen na třech předpokladech, a to, že faktory v lidském séru inhibují proliferaci buněk MCF-7, estrogeny indukují buněčnou proliferaci odstraněním inhibičního účinku a růstové faktory se spolu se steroidy, které nejsou estrogenního charakteru, nepodílejí na neutralizaci inhibičního signálu přítomného v lidském séru.

Nejdříve jsou buňky po dobu několika hodin vystaveny působení testované látky, po-té se nechají 4 až 6 dní inkubovat v médiu bez estrogenních látek. Po skončení inkubace se porovnává buněčný růst v kontrolní sadě s růstem buněk, jež byly exponovány testovaným látkám.

Antagonistické studie probíhají ve dvou krocích. V prvním kroku se zjišťuje, jestli je daná látka schopná inhibovat estrogen. Pokud ano, následuje ověření, že je inhibice způsobená receptorem.

Nevýhodou testu je nedostatečná specifita pro estrogeny – buňky MCF-7 proliferují v reakci na celou řadu dalších látek, jako jsou např. růstové faktory, nutrienty, jiné hormony a cytokiny [57].

5.4 Vybrané ekotoxikologické studie zaměřené na endokrinní disruptory

Estrogenní aktivita byla zjištěna ve vodních ekosystémech po celém světě. Detekce endokrinních disruptorů ve vodě je důležitým krokem v ochraně vodních ekosystémů.

Ve Slovinsku, kde současná legislativa nevyžaduje monitorování koncentrací přírodních a syntetických estrogenů v odpadních vodách, jsou údaje o potenciální estrogenicitě vod vzácné. Cílem studie z roku 2011 bylo zjistit potenciální estrogenicitu vzorků získaných ze tří čistíren odpadních vod. Stanovení bylo prováděno pomocí kvasinkového testu (YES assay). V prvním odběru vzorků nebylo, z důvodu vysoké inhibice růstu kvasinek toxickými látkami, možné detekovat žádnou estrogenní aktivitu. Při druhém odběru vzorků byl přidán silikagel jako čistící krok, což vedlo ke snížení toxicity vzorků. Výsledkem byla 95 % inhibice růstu kvasinek na základě relativní estrogenní aktivity. Pomocí kvasinkového YES testu byla zjištěna estrogenní aktivita téměř u všech přítoků a odtoků z čistíren odpadních vod. Významným zjištěním této studie bylo nejen potvrzení estrogenní aktivity odpadních vod, ale také skutečnost, že čistírny nejsou schopny z odpadních vod estrogenní látky odstranit [60].

Na některých řekách např. ve Velké Británii, Švýcarsku, Spojených státech amerických nebo v Kanadě došlo k poklesu rybí populace. Stejný jev byl pozorován na horním toku řeky Dunaj v jižním Německu, kde došlo k výraznému poklesu zejména u populace lipana podhorního (*Thymallus thymallus* – druh vysoce citlivý na chemické znečištění),

a to i přes intenzivní a nepřetržitou výsadbu ryb a zlepšování kvality vody (prokázané na základě chemických analýz, hydrologických a biologických studií). K prokazatelnému úbytku počtu ryb mohlo přispět právě estrogení znečištění, proto byla koncentrace endokrinních disruptorů zjišťována kvasinkovým testem. Mimo estrogení aktivitu byla zkoumána akutní toxicita (cytotoxicita, toxicita pro bakterie a toxicita pro embrya), genotoxicita, mutagenicita a teratogenicita. Získané výsledky potvrdily značnou zátěž pro vodní ekosystém. Byly nalezeny estrogení znečišťující látky jako 17 α -ethynilestradiol (látko obsažená v antikoncepci), povrchově aktivní látky – alkylfenol polyethoxyláty a jejich degradační produkty, estery ftalátů a některé chlorované pesticidy [61].

Zkoumána byla i estrogení aktivita říčních sedimentů v České republice. Jednalo se o sedimenty řek protékajících průmyslovými oblastmi, konkrétně byly vzorky odebrány z řeky Moravy, Dřevnice a jejích přítoků. Studie využila test založený na buněčné linii MVLN, kdy je estrogení aktivita zkoumaného vzorku detekována měřením aktivity luciferázy. U všech testovaných extraktů říčních sedimentů byla estrogení aktivita prostřednictvím tohoto testu prokázána [62].

V Itálii byla prováděna studie zaměřená na výskyt endokrinních disruptorů v řece Chienti. Řeka protéká významnou zemědělskou oblastí a je lemována řadou průmyslových podniků. Oba tyto faktory ovlivňují kvalitu vody. Studie zároveň porovnává citlivost mezi *in vitro* biotesty zastoupenými testem E-screen a *in vivo* biotesty – test produkce vitellogeninu u mladých zlatých rybek (*Carassius auratus*). Vzorky byly odebrány ze tří míst na toku řeky: pramen, střední tok řeky a ústí do moře. Test E-screen ukázal jasnou estrogení aktivitu pro většinu vzorků vody s různými proliferačními schopnostmi v závislosti na místě odběru, přičemž u vzorků z pramene se estrogení aktivitu prokázat nepodařilo. Test s vitellogeninem však prokázal jasnou estrogení aktivitu u všech vzorků [63].

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřená na ekotoxikologické testy *in vitro*, které využívají buněčné linie místo testovacích organismů. Dále jsou v ní popsány testovací metody vhodné pro stanovení endokrinních disruptorů v životním prostředí a na konkrétních případech je popsáno i využití takových biotestů v reálných studiích.

In vitro metody testování jsou využívány především proto, že umožňují snižovat objemy látek nutných k provedení testu, ale především počty testovacích organismů. K detekci toxických látek v životním prostředí využívají stanovení buněčné viability a proliferace, metabolické aktivity buněk, případně lze použít DNA mikročipy.

Endokrinní disruptory nacházející se v životním prostředí mohou být jak přírodního, tak antropogenního původu. Ty se do prostředí dostávají při výrobě, používání nebo likvidaci chemických látek s estrogení aktivitou, jako jsou např. pesticidy, hnojiva, farmaceutické produkty, aj. Endokrinní disruptory ovlivňují hormonální systém živých organismů, narušují fyziologické funkce endogenních hormonů, např. estrogeneru. Látky s estrogení aktivitou jsou v environmentálních vzorcích detekovány pomocí testu vazby ligandu na receptor, testů s reportérovými geny – kvasinkový test a test na buněčných liniích získaných z obratlovců, nebo testu buněčné proliferace, tzv. E-screen.

Vybrané studie ukazují použití ekotoxikologických testů se zaměřením na endokrinní disruptory pro screening látek s estrogení aktivitou v životním prostředí. Jedná se především o vzorky vod, případně dnových sedimentů.

Na příkladech jednotlivých studií je patrné, že environmentální analýza doplněná ekotoxikologickými studiemi dokáže poskytnout komplexnější informaci o stavu jednotlivých složek životního prostředí a že oba přístupy, analytický i ekotoxikologický, by měly být nedílnou součástí posuzování kontaminace životního prostředí a rizik, která z toho vyplývají.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011, 243, [22] s. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [2] JORGENSEN, Swen Erik (ed.). *Encyclopedia of ecology: Ecotoxicology: The History and Present Directions*. Oxford: Elsevier, 2008, s. 1195–1201. ISBN 9780080454054.
- [3] KOČÍ, Vladimír. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy*. 2006, **100**(10). ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_10_882-888.pdf
- [4] Vyhláška Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. In: *502/2004 Sb.*. 2004.
- [5] KAFKA, Zdeněk a Jana PUNČOCHÁŘOVÁ. Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí. *Chemické listy*. 1999, **93**(10). ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_10_604-606.pdf
- [6] KOPP, Radovan, Eva POŠTULKOVÁ a Klára HILSCHEROVÁ. *Základy vodní ekotoxikologie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-334-9.
- [7] HOFFMAN, David J. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995, x, 755 s. ISBN 08-737-1585-3.
- [8] PALEČEK, Jaroslav, Igor LINHART a Josef HORÁK. *Toxikologie a bezpečnost práce v chemii*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996, 189 s. ISBN 80-708-0266-9.
- [9] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/index.html
- [10] DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, Helena, Iva ŠTĚPÁNKOVÁ, Milada VÁVROVÁ a Alena LAPČÍKOVÁ. Stanovení toxicity "musk" sloučenin s využitím alternativních testů ekotoxicity. *Chemické listy*. 2013, **107**(2). ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_172-177.pdf
- [11] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOVARÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2009 [cit. 2016-02-23]. ISBN 978-80-7080-699-9. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-699-9/
- [12] TICHÝ, Miloň, Zdeněk ROTH, Karel BLÁHA a Andrew P. WORTH. Alternativní metody testování toxicity chemických látek in silico. *Chemické listy*. 2005, **99**(10). ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_675-681.pdf
- [13] TICHÝ, Miloň. Predikční toxikologie. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2008 [cit. 2016-02-29]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/predikcni-toxikologie>
- [14] FORBES, Valery E., Annemette PALMQVIST a Lis BACH. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006, **25**(1), 272-280. DOI: 10.1897/05-257R.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/05-257R.1>
- [15] CONNON, Richard E., Juergen GEIST a Inge WERNER. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic

- Environment. *Sensors*. 2012, **12**(12), 12741-12771. DOI: 10.3390/s120912741. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/12/9/12741/>
- [16] MRÁZ, Jaromír a Vladimír STRÁNSKÝ. Biologické monitorování a biologické expoziční testy. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2009 [cit. 2016-03-17]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>
- [17] SKLÁDAL, Petr. *Biosensory* [online]. Brno, 2002 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>
- [18] KIZEK, René, Jan VACEK, Libuše TRNKOVÁ, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Elektrochemické biosenzory v analýze zemědělských produktů a vzorků životního prostředí. *Chemické listy*. 2003, **97**(10). ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003_10_05.pdf
- [19] KUBINCOVÁ, Petra, Jiří NOVÁK a Iva SOVADINOVÁ. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. 2016, **110**(2), 118-125. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_02_118-125.pdf
- [20] SCHÜRMANN, Gerrit a Bernd MARKERT. *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998, xxix, 900 p. ISBN 04-711-7644-3.
- [21] FRESHNEY, Ian. Application of Cell Cultures to Toxicology. *Cell biology and toxicology*. Princeton, N.J.: Princeton Scientific Publishers, 2001, **17**(4), 213-230. Dostupné také z: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1012572930721>
- [22] MIRET, Silvia, Els M. DE GROENE a Werner KLAFFKE. Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*. 2005, **11**(2), 184-193. DOI: 10.1177/1087057105283787. ISSN 1087-0571. Dostupné také z: <http://jbx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1087057105283787>
- [23] KOLEKTIV AUTORŮ, ÚSTAV BIOLOGIE LF UP OLOMOUC. *Praktická cvičení z biologie* [online]. Olomouc, 2012 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: http://biologie.upol.cz/download/BIO-VCA11_BIO-VCB11/praktika/navody/VCA11-ZUA11_Skriptum-ZS.pdf
- [24] Testy cytotoxicity na buňkách pěstovaných in vitro. *Biologie v kostce* [online]. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/246-testy-cytotoxicity-na-bunkach.html>
- [25] DOYLE, Alan a J. Bryan GRIFFITHS (eds.). *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. Chichester: John Wiley, 1998, xvii, 332 p. ISBN 978-0-471-98255-5.
- [26] Neutral Red. In: *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, 2016 [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/neutralred2887855324211?lang=en&ion=CZ>
- [27] Neutral Red Uptake Assay Step-by-Step. *Institute for in vitro science* [online]. Gaithersburg: IIVS, 2016 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z:

- <http://www.wv3w.iivs.org/home/scientific-services/laboratory-services/systemic-tox/nhek-cytotoxicity/step-by-step/1/>
- [28] Trypan Blue solution. In: *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC., 2016 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=en&ion=CZ>
- [29] Using Trypan Blue and Acridine Orange/Propidium Iodide to Measure Cell Viability. *Nexcelom Bioscience* [online]. Lawrence: Nexcelom Bioscience LLC, 2016 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPI.php>
- [30] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(8), 586-593 [cit. 2016-05-18]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [31] Fluorescein diacetate. In: *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC., 2016 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7378?lang=en&ion=CZ>
- [32] WANG, Gang, Jianping ZHANG, Abiche H. DEWILDE, Anoop K. PAL, Dhimiter BELLO, Joel M. THERRIEN, Susan J. BRAUNHUT a Kenneth A. MARX. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology*. 2012, **229**(2-3), 99-111. DOI: 10.1016/j.tox.2012.05.012. ISBN 10.1016/j.tox.2012.05.012. ISSN 0300-483X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X12001680>
- [33] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 4. Praha: Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [34] Chemistry of Protein Assays. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. 2015 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>
- [35] JOHNSON, Mary. *Protein Quantitation* [online]. Princeton: Synatom Research, 2015 [cit. 2016-04-12]. DOI: <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.115>. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>
- [36] Brilliant Blue G. In: *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC., 2016 [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/brilliantblueg85402610458111?lang=en&ion=CZ>
- [37] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. Praha: VŠCHT Praha, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
- [38] ANTHARAVALLY, Babu S., Krishna A. MALLIA, Priya RANGARAJ, Paul HANEY a Peter A. BELL. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry* [online]. 2009, **385**(2), 342-345 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1016/j.ab.2008.11.024. ISBN 10.1016/j.ab.2008.11.024. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326970800763X>

- [39] SMITH, Caitlin. Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells. In: *Biocompare* [online]. 2012 [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/>
- [40] EnzyLight™ ADP/ATP Ratio Assay Kit (ELDT-100): Bioluminescent Assay for ADP/ATP Ratio. In: *BioAssay Systems* [online]. Hayward, 2013 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <https://www.bioassaysys.com/Datasheet/ELDT.pdf>
- [41] HU, Valerie W., Gavin E. BLACK, Armida TORRES-DUARTE a Fred P. ABRAMSON. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *The FASEB Journal* [online]. 2002, **16**(11), 1456-1457 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1096/fj.02-0142fje. ISBN 10.1096/fj.02-0142fje. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.02-0142fje>
- [42] Bromodeoxyuridine. In: *ChemSpider* [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5813.html?rid=97c11199-ca92-4027-b1bd-9ec664de2462>
- [43] IVANOVA, Lada, Eystein SKJERVE, Gunnar S. ERIKSEN a Silvio UHLIG. Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from *Fusarium avenaceum*. *Toxicon* [online]. 2006, **47**(8), 868-876 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.02.012. ISBN 10.1016/j.toxicon.2006.02.012. ISSN 0041-0101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004101010600095X>
- [44] MEAD, Timothy J. a Véronique LEFEBVRE. Proliferation Assays (BrdU and EdU) on Skeletal Tissue Sections. *Skeletal Development and Repair: Methods and Protocols* [online]. 1. 2014, **1130**, 233-243 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1007/978-1-62703-989-5_17. ISBN 978-1-62703-989-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-989-5_17
- [45] Cell Viability Assays. RISS, Terry L., Richard A. MORAVEC, Andrew L. NILES, Helene A. BENINK, Tracy J. WORZELLA a Lisa MINOR. *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016, s. 260-281 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [46] LETTIERI, Teresa. Recent applications of DNA Microarray technology to Toxicology and Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2006, **114**(1), 4-9 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.1289/ehp.8194. ISBN 10.1289/ehp.8194. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1332648/>
- [47] DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. 2009, **30**(4), 293-342 [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1210/er.2009-0002. ISBN 10.1210/er.2009-0002. ISSN 1945-7197. Dostupné z: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/er.2009-0002>
- [48] ROKYTA, Richard a kolektiv. *Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi* [online]. Praha: Grada Publishing, a.s., 2015 [cit. 2016-05-04]. ISBN 978-80-247-9902-5. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=I3x5CgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Fyziolog>

- ie+a+patologick%C3%A1+fyziologie:+pro+klinickou+praxi&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiIjr2BhsDMAhWHOBQKHVVWCsYQ6AEINDAA#v=onepage&q&f=false
- [49] VÁCHA, Martin, Ivana FELLNEROVÁ, Vítězslav BIČÍK, Richard PETRÁSEK a Vladimír ŠIMEK. *Srovnávací fyziologie živočichů* [online]. 1. Brno, 2010 [cit. 2016-05-05]. ISBN 978-80-210-3379-5. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/Bi3030/um/skripta_Vacha_a_kol._2010_mensi.pdf
- [50] What are endocrine disruptors? *European Commission* [online]. [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm
- [51] GIESY, J.P., K. HILSCHEROVA, P.D. JONES, K. KANNAN a M. MACHALA. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2002, **45**(1-12), 3-16 [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1016/S0025-326X(02)00097-8. ISBN 10.1016/S0025-326X(02)00097-8. ISSN 0025-326X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X02000978>
- [52] KELCE, W. R. a Elizabeth M. WILSON. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *Journal of Molecular Medicine* [online]. 1997, **75**(3), 198-207 [cit. 2016-05-06]. DOI: 10.1007/s001090050104. ISBN 10.1007/s001090050104. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s001090050104>
- [53] KUJALOVÁ, Hana, Vladimír SÝKORA a Pavel PITTER. Látky s estrogenním účinkem ve vodách. *Chemické listy* [online]. 2007, **101**(9), 706-712 [cit. 2016-05-06]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_09_706-712.pdf
- [54] MCKINLAY, R., J.A. PLANT, J.N.B. BELL a N. VOULVOULIS. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* [online]. 2008, **34**(2), 168-183 [cit. 2016-05-04]. DOI: 10.1016/j.envint.2007.07.013. ISBN 10.1016/j.envint.2007.07.013. ISSN 0160-4120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412007001444>
- [55] Látky poškozující hormonální systém (EDC). *Arnika* [online]. Praha: Arnika, 2014 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://arnika.org/latky-poskozujici-hormonalni-system-edc?limitstart=0>
- [56] KŘESINOVÁ, Zdena, Kateřina SVOBODOVÁ a Tomáš CAJTHAML. Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chemické listy*[online]. 2009, **103**(3), 200-207 [cit. 2016-05-06]. ISSN 12137103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_03_200-207.pdf
- [57] KINNBERG, Karin. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment: Working Report No. 43. Danish Environmental Protection Agency, 2003.
- [58] MURK, Albertinka J., Juliette LEGLER, Marola M. H. VAN LIPZIG, et al. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2002, **21**(1), 16-23 [cit.

- 2016-05-07]. DOI: 10.1002/etc.5620210103. ISBN 10.1002/etc.5620210103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620210103>
- [59] TARRANT, Heloise, Neville LLEWELLYN, Anne LYONS, Nicholas TATTERSALL, Suzanne WYLDE, Geriasmos MOUZAKITIS, Michelle MALONEY a Craig MCKENZIE. *Endocrine disruptors in the Irish aquatic environment*. Johnstown Castle: Environmental Protection Agency, 2005.
- [60] BISTAN, Mirjana, Romana LOGAR a Tatjana TIŠLER. Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay. *Central European Journal of Biology* [online]. 2011, **6**(5), 829-837 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.2478/s11535-011-0064-2. ISBN 10.2478/s11535-011-0064-2. ISSN 1644-3632. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2011.6.issue-5/s11535-011-0064-2/s11535-011-0064-2.xml>
- [61] CHEN, Lei, Chaofeng SHEN, Xianjin TANG, Chen CHEN a Yingxu CHEN. Estrogenic effects of dissolved organic matter and its impact on the activity of 17 β -estradiol. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2011, **19**(2), 522-528 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1007/s11356-011-0590-5. ISBN 10.1007/s11356-011-0590-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-011-0590-5>
- [62] HILSCHEROVA, K., K. KANNAN, I. HOLOUBEK a J. P. GIESY. Characterization of Estrogenic Activity of Riverine Sediments from the Czech Republic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2001, **43**(2), 175-185 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1007/s00244-002-1128-0. ISBN 10.1007/s00244-002-1128-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00244-002-1128-0>
- [63] COCCI, Paolo, Francesco Alessandro PALERMO, Luana QUASSINTI, Massimo BRAMUCCI, Antonino MIANO a Gilberto MOSCONI. Determination of estrogenic activity in the river Chienti (Marche Region, Italy) by using in vivo and in vitro bioassays. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2016, **43**, 48-53 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1016/j.jes.2015.07.018. ISBN 10.1016/j.jes.2015.07.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074215004192>

8 SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AR	androgenní receptor
AREs	androgen responsive element, element zodpovědný za androgenní odpověď
ARNT	nukleární translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinechinová
BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
BPA	bisfenol A
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CALUX	chemical-activated luciferase-gene expression, chemicky aktivovaná genová exprese luciferázy
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRE	dioxin-responsive element, element zodpovědný za odpověď dioxinu
ED	endokrinní disruptor
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
ER	estrogenní receptor
EREse	strogen responsive element, element zodpovědný za estrogenní odpověď
FDA	fluorescein diacetát
FETAX	frog embryo teratogenity assay xenopus, test s žabími embryii na teratogenitu
HSP	heat shock proteins, proteiny tepelného šoku
LC50	letální koncentrace pro 50 % testovacích organismů
LD50	letální dávka pro 50 % testovacích organismů
LDH	laktát dehydrogenáza
LOAEL	lowest observed adverse effect level, nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NOAEL	no observed adversed effect level – dávka, při které již nebyl pozorován škodlivý účinek
NP	nonylfenol
OP	oktylfenol
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBDE	polybromované difenyletery
PCB	polychlorované bifenyly
PVC	polyvinylchlorid
QSAR	quantitative structure-activity relationships, kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou
RYA	recombinant yeast-based assay, rekombinantní kvasinkový test
YES	yeast estrogen screen, screening estrogenní aktivity kvasinek