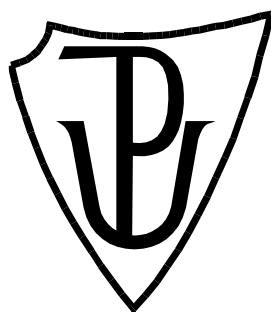


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Účinky vybraných herbicidů na transkripční aktivitu  
thyroidního receptoru (TR)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Zuzana Bertová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.</b>
Rok:	2017

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 2.5.2017

Rada by som poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce, doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D., za jeho trpezlivosť, vedenie a cenné rady pri písaní tejto práce. Ďalej by som chcela poďakovať celému laboratóriu molekulárnej toxikológie a molekulárnej farmakológie za ochotu vždy mi poradiť a pomôcť. Ďakujem tiež za finančnú podporu projektu IGA PrF-2016-003.

## **Bibliografická identifikácia:**

<b>Meno a priezvisko autora</b>	Zuzana Bertová
<b>Názov práce</b>	Účinky vybraných herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora (TR)
<b>Typ práce</b>	Bakalárska
<b>Pracovisko</b>	Katedra biochémie
<b>Vedúci práce</b>	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce</b>	2017

## **Abstrakt**

Tyroidný hormonálny receptor je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý patrí do rodiny jadrových receptorov. Pomocou tyroidných hormónov dochádza k aktivácii tyroidného receptora, ktorá ovplyvňuje transkripciu.

Herbicídy sú chemické látky využívané na hubenie nežiaducich rastlín nielen v poľnohospodárstve.

V tejto bakalárskej práci bol skúmaný vplyv niektorých bežne využívaných druhov herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora. Pomocou metódy MTT bolo stanovené cytotoxické pôsobenie herbicídov paraquat, diquat, triklopyr, 2,4-D, 2,4,5-T, dikamba a alachlór na bunky reporterovej bunkovej línie PZ-TR. Na základe týchto výsledkov boli zvolené koncentrácie herbicídov, ktoré boli použité pri skúmaní transkripčnej aktivity tyroidného receptora. Metódou Gene Reporter Assay bolo skúmané agonistické a antagonistické pôsobenie vybraných herbicídov na tyroidný receptor.

Po pôsobení herbicídov paraquat, diquat a alachlór bola pozorovaná zvýšená transkripčná aktivita TR. Nárast transkripčnej aktivity bol pozorovaný aj po pôsobení herbicídov triklopyr, 2,4-D, dikamba, paraquat, diquat a alachlór spoločne s T3.

<b>Kľúčové slová</b>	tyroidný receptor, tyroidné hormóny, herbicídy
<b>Počet strán</b>	43
<b>Počet príloh</b>	0
<b>Jazyk</b>	Slovenský

## **Bibliographical identification:**

<b>Author's first name and surname</b>	Zuzana Bertová
<b>Title</b>	The effects of selected herbicides on transcription activity of thyroid receptor (TR)
<b>Type of thesis</b>	Bachelor
<b>Department</b>	Department of Biochemistry
<b>Supervisor</b>	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
<b>The year of presentation</b>	2017

## **Abstract**

Thyroid hormone receptor is a ligand-activated transcription factor that belongs to the family of nuclear receptors. Thyroid hormones activate the thyroid receptor what subsequently influence the transcription.

Herbicides are chemical substances used for the disposal of unwanted plants not only in agriculture.

In this bachelor thesis the effects of certain types of commonly used herbicides on the transcriptional activity of the thyroid receptor were studied. Cytotoxic effects of herbicides paraquat, diquat, triclopyr, 2,4-D, 2,4,5-T, dicamba a alachlor on cells of reporter cell line PZ-TR were determined using MTT method. Based on these results, concentrations of herbicides that were used in the examination of the transcriptional activity of thyroid receptor were chosen. Agonistic and antagonistic activity of selected herbicides on the thyroid receptor was examined by Gene Reporter Assay.

The effect of paraquat, diquat and alachlor caused higher transcriptional activity of TR to be observed. Higher activity of TR was also observed with the effect of herbicides triclopyr, 2,4-D, dicamba, paraquat, diquat and alachlor together with T3.

<b>Keywords</b>	thyroid receptor, thyroid hormones, herbicides
<b>Number of pages</b>	43
<b>Number of appendices</b>	0
<b>Language</b>	Slovak

## **OBSAH**

<b>1 ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
2.1 Metabolizmus tyroidného receptora	2
2.1.1 Tyroidné hormóny	2
2.1.2 Tyroidný receptor	4
2.1.3 Poruchy tyroidného metabolizmu	6
2.2 Herbicídy	8
2.2.1 Triklópyr	8
2.2.2 Alachlór	9
2.2.3 Dikamba	11
2.2.4 Paraquat dichlorid	12
2.2.5 Diquat dibromid	14
2.2.6 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina	15
2.2.7 2,4,5- trichlorofenoxyoctová kyselina	16
2.3 Pôsobenie herbicídov na tyroidný receptor	17
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b>	<b>19</b>
3.1 Materiál a metódy	19
3.1.1 Biologický materiál	19
3.1.2 Chemikálie a použité roztoky	19
3.1.3 Laboratórne pomôcky	20
3.1.4 Prístroje	21
3.1.5 Použité metódy	21
3.1.5.1 Pasážovanie buniek	21
3.1.5.2 Príprava experimentu	22
3.1.5.3 Nanášanie pôsobiacich látok pri testovaní cytotoxicity (MTT test)	22
3.1.5.4 MTT test	23
3.1.5.5 Nanášanie pôsobiacich látok pri Gene Reporter Assay	24
3.1.5.6 Gene Reporter Assay	25
<b>4 VÝSLEDKY</b>	<b>27</b>
4.1 Stanovenie cytotoxického pôsobenia vybraných herbicídov	27
4.2 Stanovenie agonistického pôsobenia vybraných herbicídov	28
4.3 Stanovenie antagonistického pôsobenia vybraných herbicídov	30
<b>5 DISKUSIA</b>	<b>33</b>
<b>6 ZÁVER</b>	<b>34</b>
<b>7 LITERATÚRA</b>	<b>36</b>
<b>8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK</b>	<b>42</b>

**CIELE PRÁCE:**

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce
2. Stanovenie cytotoxického pôsobenia vybraných herbicídov na TR-responzívnu bunkovú líniu metódou MTT
3. Stanovenie transkripčnej aktivity TR v prítomnosti vybraných herbicídov metódou gene reporter assay
4. Vypracovanie bakalárskej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe bakalárskej práce

# 1 ÚVOD

Metabolizmus hormónov štítnej žľazy je predmetom výskumov už niekoľko desaťročí. Už v 40. rokoch minulého storočia bola známa existencia hormónu štítnej žľazy a predpokladala sa jeho dôležitá úloha pre správne fungovanie organizmu (Voitkevich, 1945). Vďaka rozvoju bioanalytických metód, ktoré nám umožňujú objavovať a bližšie študovať molekulárne mechanizmy rôznych fyziologických procesov, je už dnes vo veľkej miere preskúmaná štruktúra nielen tyroidných hormónov, ale aj tyroidného receptora, ktorý je jedným z kľúčových článkov tyroidného metabolizmu.

Tyroidné hormóny väzbou na tyroidný receptor regulujú génovú transkripciu. Rovnováha tohto systému je dôležitá nielen pre metabolizmus cukrov, tukov a bielkovín, ale aj pre kardiovaskulárny systém a správny vývoj nervovej sústavy. Je často narušená rôznymi syntetickými látkami, čo môže mať za následok metabolické poruchy, počnúc hypotyroidizmom či hypertyroidizmom. Zvýšená a znížená funkcia štítnej žľazy nemusí byť spôsobená len zmenou transkripčnej aktivity tyroidného receptora. Xenobiotické látky môžu tiež interagovať s prenášačmi tyroidných hormónov v krvi (Zhang *et al.*, 2015), či negatívne ovplyvňovať inú časť tyroidného metabolizmu. Z tohto dôvodu je dôležitá včasná identifikácia týchto škodlivých látok a mechanizmu ich pôsobenia, aby bolo možné týmto spomínaným negatívnym vplyvom predísť, poprípade nájsť spôsob ich kompenzácie.

Herbicídy sú látky, ktoré sú dnes viac-menej súčasťou bežného života. Používajú sa nielen v poľnohospodárstve, ale aj pri likvidácii nežiaducich rastlín v domácnostiach. Niektoré druhy herbicídov sú známe svojimi cytotoxickými či genotoxickými účinkami, avšak epidemiologické štúdie poukazujú aj na negatívny vplyv herbicídnych zmesí na hladinu tyreoidálnych hormónov v krvi (Zaidi *et al.*, 2000). Úroveň pôsobenia rôznych druhov herbicídov na tyroidný metabolizmus však nie je doposiaľ objasnená.



## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Metabolizmus tyroidného receptora

Tyroidný hormonálny receptor (TR) sa podieľa na regulácii mnohých dôležitých fyziologických procesov, metabolizmov a systémov v ľudskom tele, medzi ktoré patrí predovšetkým energetický metabolizmus, termogenéza, makronutričný metabolizmus a kardiovaskulárny systém (Murk *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Tyroidné hormóny

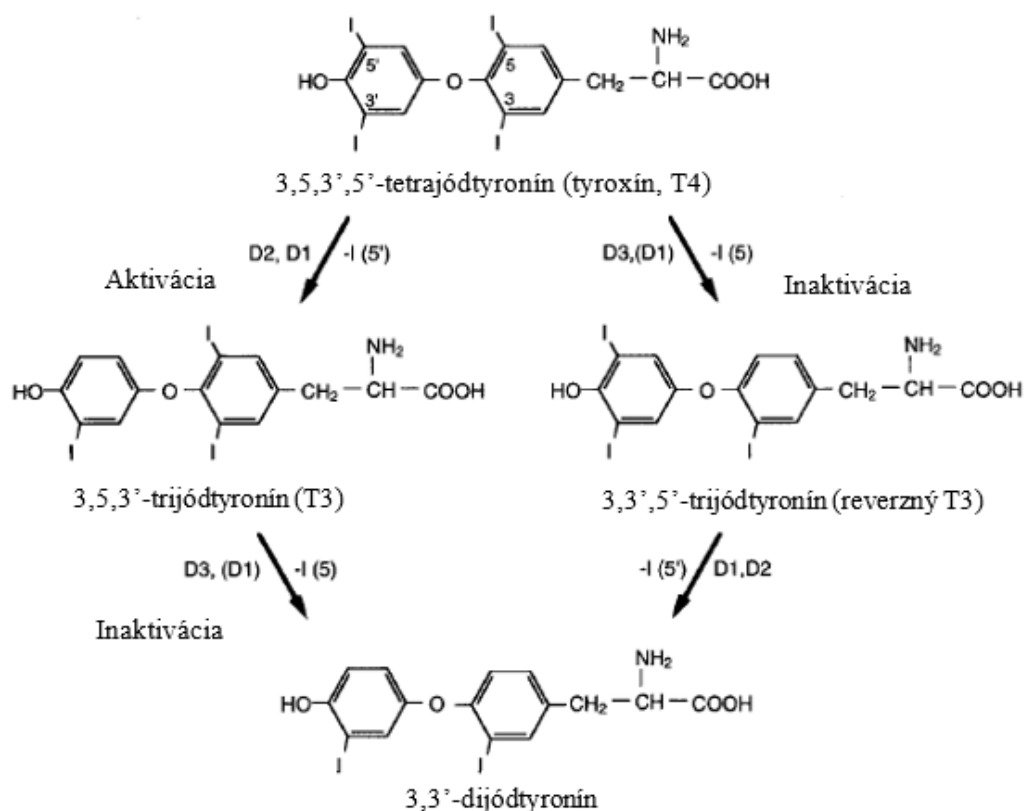
Tyroidné hormóny (TH) sú esenciálne pre normálny vývoj, rast a metabolizmus. Syntéza a sekrécia tyroidných hormónov sú regulované systémom s negatívnou spätnou väzbou, ktorý zahŕňa hypotalamus, hypofýzu a štítnu žľazu (Shupnik *et al.*, 1989). Prvý krok stimulácie syntézy tyroidných hormónov prebieha v paraventriculárnom jadre hypotalamu, kde sa syntetizuje tyrotropín uvoľňujúci hormón tyreoliberín (TRH; thyrotropin releasing hormone). TRH je následne cez axóny a kapilárny plexus transportovaný do predného laloku hypofýzy. Tu sa naviaže na špecializovaný receptor (TRH receptor), čím dochádza k stimulácii sekrécie tyroidného stimulujúceho hormónu (TSH; thyroid stimulating hormone). Nasleduje naviazanie TSH na TSH receptor, pričom touto väzbou dochádza k aktivácii TSH receptora. Aktivácia TSH receptora vedie k zvýšeniu vnútrocelulárneho cAMP a k stimulácii dráhy sprostredkovanej proteinkinázou A. Všetky tieto podmienky výsledne stimulujú syntézu tyroidných hormónov (TH) (Yen, 2001). Sekrécia TRH a TSH je negatívne regulovaná okrem vlastných tyroidných hormónov (TH) tiež somatostatínom a dopamínom, ktoré sú produkované hypotalamom (Yen, 2001).

Prekurzorom TH je tyreoglobulín, ktorý je syntetizovaný drsným endoplazmatickým retikulom folikulárnych buniek štítnej žľazy. Z krvného riečiska je pomocou  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symportéru aktívne vychytávaný jód vo forme aniónu  $\text{I}^-$  (Dai *et al.*, 1996). Jodidový anión je enzýmom tyreoperoxidázou (TPO) ďalej oxidovaný na  $\text{I}^0$  a reaguje s tyrozínovými zbytkami tyreoglobulínu, dochádza k jodácii tyreoglobulínu. Posledným krokom syntézy TH je proteolýza tyreoglobulínu, ktorý sa štiepi na jednotlivé molekuly T4 (Yen, 2001). Dejodáciou T4 v polohe 5' vzniká T3. Tento proces už nie je priamo viazaný na štítnu žľazu, len z 20 % prebieha v štítnej žľaze, zvyšných 80 % T3 vzniká v pečeni, obličkách a svaloch (Racek *et al.*, 2006). Znížená expresia tyreoglobulínu je spájaná s malígnymi nádormi štítnej žľazy (Kogan *et al.*, 2006).

Medzi tyroidné hormóny patria tyroxín (T4) a 3,5,3'-trijódtyronín (T3). T4 je produkovaný vo veľkom množstve spolu s malým množstvom T3. Reverzný T3 vzniká len v malom množstve a je neúčinný (Racek *et al.*, 2006). T4 je prekursor vlastného aktívneho hormónu, na jeho premene na aktívnu formu sa podieľajú enzýmy dejodinázy (Obr. 1). Dejodinázy sa tiež podieľajú na deaktivácii T3 jeho premenou na metabolicky neaktívny 3,3'-dijódtyronín (Obr. 1) (Bianca *et al.*, 2002).

Tyroidné hormóny sú hydrofóbne zlúčeniny, preto potrebujú špeciálne transportéry, ktoré umožnia ich prenos vnútorným polárnym prostredím ľudského tela. Ľudským transportérom tohto typu je predovšetkým globulín viažuci TH (TBG; thyroxine-binding globulin), menej transtyretín (TTR) a albumín, ktoré prenášajú tyroidné hormóny krvnou plazmou do cieľového tkaniva (Racek *et al.*, 2006).

Vlastný aktívny hormón T3 je ligand tyroidného hormonálneho receptora (TR), ktorý reguluje genetickú expresiu.



Obr.1: Premena TH dejodinázami (upravené podľa Bianca *et al.*, 2002)

## 2.1.2 Tyroidný receptor

Transkripčná regulácia cieľových génov pomocou tyroidných hormónov je sprostredkovaná tyroidným receptorom (TR). Tento ligandom aktivovaný hormonálny receptor patrí do rodiny jadrových receptorov a plní v jadre funkciu transkripčného faktora.

Sú známe 2 hlavné izoformy TR – TR $\alpha$  a TR $\beta$  (Yen, 2001). Štruktúry TR $\alpha$  a TR $\beta$  sú spoločné pre viacero živočíšnych druhov, pričom tieto izoformy sa líšia svojou tkanivovou distribúciou (Tab. 1) a schopnosťou viazať T3 (Yen, 2001; Chen, 2000). Tyroidné receptory sú zakódované v samostatných génoch lokalizovaných na chromozómoch 3 a 17. Na chromozóme 17 je lokalizovaný gén pre TR $\alpha$  izoformy TR – TR $\alpha$ 1 a TR $\alpha$ 2. Izorforma TR $\alpha$ 2 nie je schopná viazať T3. Na chromozóme 3 sú lokalizované gény pre ďalšie dve izoformy tohto receptora – TR $\beta$ 1 a TR $\beta$ 2, ktoré sú oboje schopné viazať T3 (Lazar, 1993).

Podľa niektorých výskumov existujú ešte ďalšie izoformy TR – TR $\beta$ 3, TR $\Delta$  $\beta$ 3, ktorých úloha v metabolizme nie je ešte úplne objasnená (Williams, 2000).

Samotné receptory sa skladajú z niekoľkých domén - obsahujú doménu s N koncom, centrálnu doménu, ktorá sa viaže na DNA, pántovú oblasť obsahujúcu jadrový lokalizačný signál a doménu viažucu ligand (LBD; ligand-binding domain) na C konci. Dĺžka domény s N koncom je závislá od izoformy TR, teda pre každú izoformu špecifická (Yen, 2001). Jej úloha je len málo preskúmaná.

Centrálna doména, ktorá sa viaže na DNA je lokalizovaná v centrálnej časti receptora a obsahuje dva zinkové prsty, ktoré sú tvorené štyrmi cysteínmi spojenými koordinačnou

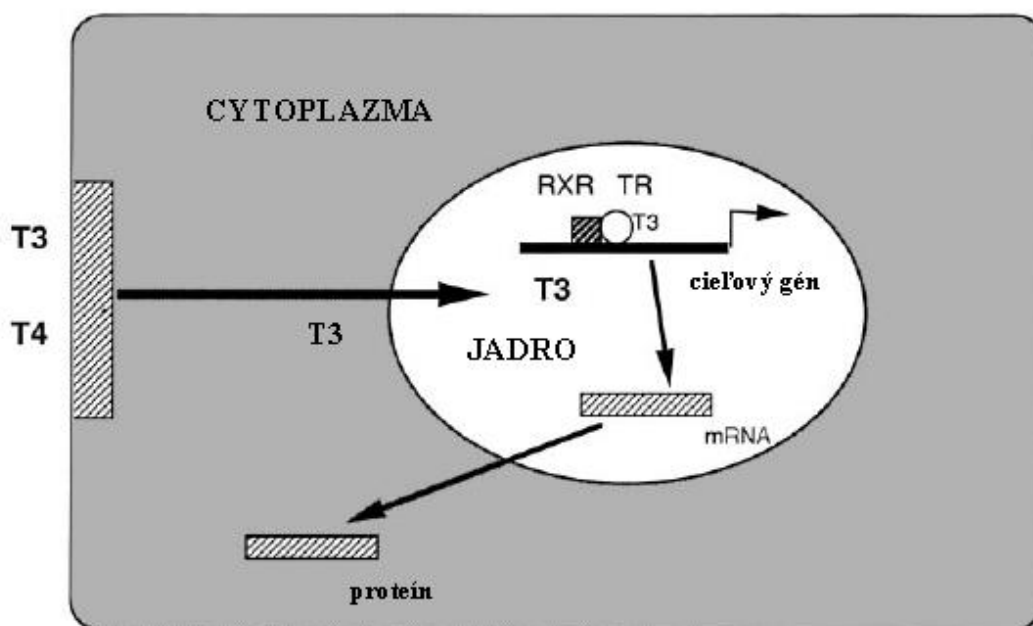
Tab. 1: Expresia TR v organizme

Izoforma tyroidného receptora	Expresia v organizme
TR $\alpha$ 1	kostrové svalstvo, hnedá tuková hmota (Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1988)
TR $\alpha$ 2	mozog (Mitsuhashi a Nikodem, 1989)
TR $\beta$ 1	mozog, obličky, pečeň (Hodin <i>et al.</i> , 1990)
TR $\beta$ 2	predná hypofýza (Hodin <i>et al.</i> , 1989), paraventriculárne a ventromedálne jadrá hypotalamu (Cook <i>et al.</i> , 1992)

väzbou s iónom zinku (Green *et al.*, 1988). TR sa touto doménou viaže na úsek DNA so špecifickou sekvenciou, čím dochádza k regulácii transkripcie. Pri väzbe T3 na LBD dochádza k tvorbe hydrofóbneho obalu okolo hydrofóbneho T3, na ktorom sa podieľa tiež nepolárny C koniec domény (Yen, 2001). Organizácia domén v TR je rovnaká ako u všetkých ostatných jadrových hormonálnych receptorov (Yen, 2001).

Po naviazaní ligandu T3, ku ktorému má receptor vysokú afinitu, dochádza k naviazaniu komplexu ligand-receptor na špecifický úsek DNA v promótorovej oblasti (TRE; thyroid hormone response element) a dochádza k aktivácii či represii cieľového génu a následnej regulácii v syntéze proteínov (Obr. 2). Pri fyziologických podmienkach je sekvencia TRE tvorená najčastejšie priamymi opakovanými úsekmi DNA, menej často prevrátenými opakovanými úsekmi, poprípade palindrómami (Yen, 2001).

TR sa môžu viazať na TRE ako monoméry, homodiméry a heterodiméry *in vitro*, avšak vo veľkej väčšine sa viažu na DNA ako heterodiméry spolu s retinoidným X receptorom (RXR), menej často ako homodiméry. Retinoidné X receptory patria rovnako ako TR do skupiny jadrových hormonálnych receptorov, heterodiméry TR/RXR sa viažu do promótorovej oblasti regulovaného génu so špecifickou polaritou a ich správne naviazanie tiež moduluje transkripčnú aktivitu. Na RXR sa s vysokou afinitou viaže príbuzný ligand, 9-cis-retinová kyselina (Heyman *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1992). RXR dokáže tvoriť homodiméry aj heterodiméry s inými receptormi než TR. V prípade tyroidného receptora RXR upevňuje väzbu tohto receptora na TRE (Yen, 2001).



Obr. 2: Väzba TR na TRE (upravené podľa Yena, 2001)

Okrem receptorov iného typu môžu TR tvoriť heterodiméry s tzv. TR pomocnými proteínmi (TRAPs; thyroid receptor auxillary proteins). Jedná sa o proteíny nachádzajúce sa hlavne v jadrách buniek hypofýzy a pečene, ktoré upevňujú väzbu medzi TR a TRE. Heterodiméry TR/TRAP sa viažu na TRE oveľa ľahšie ako homodiméry TR (Burnside *et al.*, 1990).

Na rozdiel od steroidného receptora, u ktorého platí, že bez naviazania ligandu nedôjde k transkripcii cieľového génu, u tyroidného receptora dochádza k jeho väzbe na TRE aj bez naviazania ligandu, avšak v tomto prípade dochádza k represii bazálnej transkripcie pozitívne regulovaného génu (Zhang *et al.*, 1991). Okrem tejto situácie môže byť transkripcia aktivovaná komplexom TR/ligand modulovaná ďalšími represormi, napr. jadrovým receptorovým korepresorom (NCoR) (Hörlein *et al.*, 1995).

Okrem represorov, ktoré potláčajú transkripciu aktivovanú komplexom TR/TRE, môže tento komplex interagovať ešte s inými jadrovými proteínmi, ktoré pôsobia naopak ako aktivátory a zosilňujú transkripciu (Fondell *et al.*, 1993).

Tyroidný receptor reguluje transkripciu veľkého množstva génov, čím ovplyvňuje syntézu proteínov dôležitých pre ľudský organizmus. Produkcia proteínov krvnej plazmy ako napríklad transferínu, protrombínu, angiotensinogénu, haptoglobínu a fibrinogénu je stimulovaná TH, resp. TR (Lin *et al.*, 2003). Naopak produkcia iných proteínov krvnej plazmy ako  $\alpha$ -2-makroglobulínový prekursor a protymozín  $\alpha$  je tyroidným receptorom potlačená (Lin *et al.*, 2003). Genová expresia myšieho proteínu SREBP-1c (sterol response element binding protein-1c) je pravdepodobne rovnako negatívne regulovaná tyroidnými hormónmi (Hashimoto *et al.*, 2006).

### **2.1.3 Poruchy tyroidného metabolizmu**

Narušenie rovnováhy metabolizmu tyroidných hormónov môže spôsobiť rôzne tyroidné ochorenia, či už subklinické, alebo klinické. Subklinické ochorenia sú spojené so zvýšenou hladinou TSH hormónu, avšak s normálnou hladinou hormónov T3 a T4, teda nie vždy je potrebná klinická liečba tohto ochorenia. Klinické ochorenie je naopak charakteristické zvýšenými hladinami TSH, aj T3, aj T4, a preto si vyžaduje klinickú liečbu (Baskin *et al.*, 2002).

Známymi faktormi pre vznik ochorenia štítnej žľazy je vonkajšie ožiarenie hlavy alebo krku, zvýšená autoimunita, porucha v metabolizme jódu, tumor alebo užívanie liekov (Baskin *et al.*, 2002). Ďalšími faktormi, ktoré zvyšujú riziko tyroidného ochorenia, sú vyšší vek, ženské pohlavie a genetická predispozícia (Strieder *et al.*, 2003).

Látkami narúšajúcimi tyroidný metabolizmus (THDCs; thyroid hormone disrupting chemicals) môžu byť rôzne xenobiotiká, napr. bromfenoly (Meerts *et al.*, 2000), polyfluoroalkylové zlúčeniny (Weiss *et al.*, 2009) a perfluoroalkylové zlúčeniny (Weiss *et al.*, 2009; Lopez-Espinosa *et al.*, 2012). Látky ako bisfenol A a určité hydroxylované polybromované difenylétery (PBDEs) pôsobia priamo na TR a tým narúšajú expresiu cieľových génov (Moriyama *et al.*, 2002; Zoeller, 2007; Freitas *et al.*, 2011).

Tyroidný metabolizmus nemusí byť narušený len na úrovni receptora. Polybromované difenylétery (PBDEs) a určité polyfluoroalkylované zlúčeniny nepôsobia priamo na TR, ale na jeho transportér – transtyretín (TTR) a tým narúšajú transport tyroidných hormónov (Weiss *et al.*, 2009; Hamers *et al.*, 2006).

Narušenie rovnováhy tohto systému v embryonálnom štádiu vývoja má za následok problémy so spracovávaním priestorového videnia (Haddow *et al.*, 1999), v neskorších fázach života sa predpokladá spojitosť narušenia tyroidného metabolizmu so vznikom depresíí a Alzheimerovej choroby (de Jong *et al.*, 2009; Tan a Vasani, 2009).

## 2.2 Herbicídy

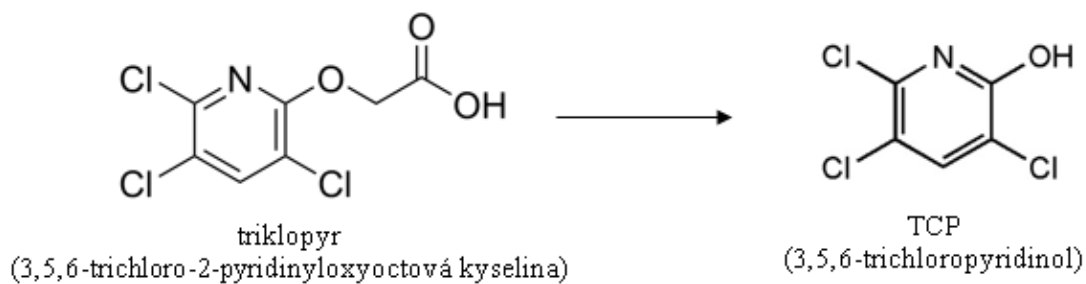
Pesticídy sú chemické látky používané na hubenie nežiadúcich organizmov (škodcov). Herbicídy sú chemické látky, ktoré sa používajú na hubenie nežiadúcich rastlín (burín). Herbicídy majú chemické vlastnosti, ktoré im umožňujú dostať sa do vnútorného prostredia rastliny, v rámci rastliny sú prenesené do určitej časti, kde sa pri dostatočnom množstve prejaví ich účinok. Väčšina herbicídov inhibuje špecifický rastlinný hormón, ktorý je esenciálny v rastlinnom metabolizme (Powles a Yu, 2010).

Rezistencia rastliny na herbicíd môže byť spôsobená dvomi spôsobmi. Prvým spôsobom je, že herbicíd nie je translokovaný v rámci rastliny na cieľové miesto účinku v dostatočnom množstve, ktoré by predstavovalo letálnu dávku. Iný spôsob je, že herbicíd je síce translokovaný na cieľové miesto účinku v rámci rastliny v dostatočnom množstve, ale tento metabolizmus je určitým spôsobom pozmenený, takže účinok herbicídu nie je fatálny (Powles a Yu, 2010).

Hoci je použitie herbicídov regulované a kontrolované, napriek tomu sa dostávajú do vodných tokov, či už priamou aplikáciou, alebo zavlažovacími kanálmi (Conte, 2016), alebo sa s nimi ľudia dostanú do styku priamo v domácnosti (Zhang *et al.*, 2015). V ďalších kapitolách bližšie charakterizujem toxicitu herbicídov, ktorých vplyv som skúmala v mojej bakalárskej práci.

### 2.2.1 Triklopyr

Triklopyr (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyoctová kyselina) je selektívny herbicíd, ktorý sa používa na kontrolu listnatých burín v poľnohospodárstve, ale aj ako herbicíd, ktorým sa ošetrujú ozdobné trávniky. Vo forme trietylamínovej soli sa často používa ako herbicíd na vodných plochách (Petty *et al.*, 2003).



Obr. 3: Štruktúra triklopyru a TCP

Tento herbicíd narušuje v rastline metabolizmus rastového hormónu auxínu, čo má za následok nadmerné množenie buniek a tým ohýbanie vrcholovej časti stonky, zatáčanie stonky a vlnenie sa listov. Keďže rastlina nie je schopná nárazovo vyživovať také množstvo buniek, dochádza k strate chlorofylu z rastúcich častí rastliny, spomaleniu rastu, vädnutiu až nekróze, ktorá nastáva pomaly, väčšinou behom 3 - 5 týždňov (Cessna *et al.*, 2002).

Výhodou triklopyru je nízka miera absorpcie a rýchla eliminácia z organizmu. Viac ako 80% dávky triklopyru prijatej orálne alebo dermálne je z organizmu vylúčených bez transformácie (Carmichael *et al.*, 1989). Eliminácia triklopyru z organizmu sa pohybuje medzi 1,3 – 5,1 hodín pri orálnom podaní a 16,8 hodín pri podaní dermálnom (Carmichael *et al.*, 1989). Pri štúdiu analyzujúcej mieru absorpcie triklopyru do ľudského tela, ktorej sa zúčastnili pracovníci pracujúci denne s týmto herbicídom, bolo preukázané len malé riziko toxických účinkov. Priemerná denná absorbovaná dávka triklopyru u týchto pracovníkov činila od 0,008 do 0,133 mg triklopyru na 1 kg hmotnosti pracovníka (Gosselin *et al.*, 2005). Táto hodnota je výrazne nižšia než hodnota NOEL (no-observed-effect level) stanovená inštitúciou USEPA u triklopyru na 5 mg na 1 kg váhy jedinca (Gosselin *et al.*, 2005). Neboli pozorované ani žiadne iné výrazne toxické účinky tohto herbicídu na človeka.

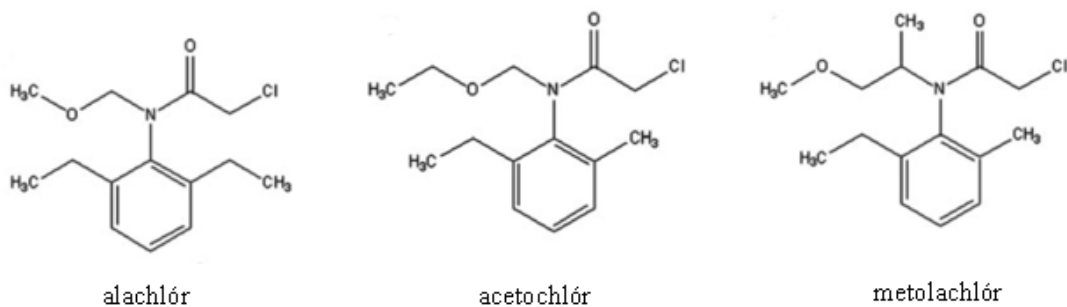
Pri odbúravaní triklopyru vo forme amínovej soli dochádza v prvom kroku k jeho disociácii na kyselinu, ktorá následne degraduje na primárny metabolit 3,5,6-trichloropyridinol (TCP) (Obr. 3). Boli skúmané toxické účinky tohto primárneho metabolitu na ontogenetický vývoj u rýb v podmienkach *in vitro* (Suvarchala a Philip, 2016). Už pri koncentrácii 200  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  TCP v kultivačnom médiu bol pozorovaný znížený srdcový tep u pozorovaných embryí, pri koncentrácii 600  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  TCP v kultivačnom médiu bola zaznamenaná aj zvýšená mortalita embryí (Suvarchala a Philip, 2016).

Používanie triclopyru ako pesticídu je na území Európskej únie povolené Európskou komisiou (European Commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### 2.2.2 Alachlór

Alachlór (2-chloro-N-(2,6-diethylfenyl)-N-(methoxymethyl)acetamid) je herbicíd patriaci do rodiny chloracetanilidových herbicídov (Obr. 4), ktoré sú využívané





Obr. 4: Štruktúra chlóracetanilínových herbicídov (upravené podľa Kale *et al.*, 2008)

na kontrolu listnatých burín a špecifických jednoročných rastlín rastúcich na poľnohospodárskych poliach (Tiedje a Hagedom, 1975).

Vo vode je veľmi dobre rozpustný, preto býva často identifikovaný v riečnych tokoch alebo v spodných vodách (Battaglin *et al.*, 2000). V pôdach sa udržiava po dlhú dobu, čo je spôsobené aj vinou pomalej mineralizácie. Jeho polčas rozpadu v pôde a vode je viac ako 30 - 70 dní (Katsumata *et al.*, 2006).

Boli preukázané cytotoxické a genotoxické účinky ako alachlóru, tak aj ostatných chloracetanilidových herbicídov – metolachlóru a acetochlóru (Kale *et al.*, 2008). Je preukázaným karcinogénom čuchovej sliznice potkanov, tvorba tumorov bola pozorovaná pri dávke 126 mg alachlóru na 1 kg váhy jedinca na deň podávanej po dobu 5 mesiacov (Genter *et al.*, 2000). Epidemiologické štúdie na farmároch, ktorí prichádzali s alachloróm do styku po niekoľko rokov, preukázali len mierne zvýšené riziko vzniku rakoviny (Acquavella *et al.*, 2004). Boli však dokázané negatívne účinky alachlóru na endokrinný hormonálny systém plaza *Alligator mississippiensis*. V *in vitro* podmienkach dochádza k štrnásťpercentnému zníženiu naviazania estradiolu na estrogénový receptor pri koncentrácii alachlóru  $27,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  v kultivačnom médiu (Vonier *et al.*, 1996). U mužov bola zistená znížená pohyblivosť a životnosť spermii už po 2 hodinovom pôsobení alachlóru v koncentrácii  $0,9 \text{ mmol.l}^{-1}$  na spermie v *in vitro* podmienkach (Grizard *et al.*, 2006).

Mechanizmus toxických účinkov alachlóru nie je úplne jasný. Alachlór vyvoláva zvýšený oxidačný stres (Bagchi *et al.*, 1995), ktorý môže byť príčinou poškodenia DNA (Grizard *et al.*, 2006). Spôsobuje zvýšenie hladín metaloproteinázy-2, metaloproteinázy-9, karboxypeptidázy Z a zvýšenú expresiu iných génov spájaných s homeostázou v extracelulárnej matrix (Genter *et al.*, 2002). Táto nerovnováha v extracelulárnej matrix spolu so zvýšením oxidačného stresu a zvýšenou tvorbou

ebnerínu majú za následok tvorbu tumorov v čuchovej sliznici potkanov (Genter *et al.*, 2002). Iné výskumy poukazujú na interakciu lipofilného alachlóru s lipidmi a proteínmi plazmatickej membrány bunky a následnú modifikáciu jej štruktúry a funkcie (Dearfield *et al.*, 1999).

S ohľadom na všetky spomenuté výskumy a potvrdené negatívne účinky nie je použitie alachlóru v štátoch Európskej únie dovolené (European Commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active/substance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### 2.2.3 Dikamba

Dikamba (kyselina 3,6-dichlór-2-metoxybenzoová) je herbicíd s nízkou prchavosťou, ktorý sa používa na kontrolu buriny medzi rastlinami bavlníku a sóje, ktoré sú geneticky modifikované a tým pádom voči dikambe odolné. Jedná sa o selektívny herbicíd z rodiny aromatických kyselín, ktorý sa nepoužíva len v poľnohospodárstve, ale aj v nebytových priestoroch, predovšetkým na golfových trávnikoch, kde reguluje rast burín ako púpavy alebo ďateliny (USEPA, 2017, dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/registration-dicamba-use-genetically-engineered-crops#q1> (30.1.2017)).

Jedná sa o syntetický auxín, ktorý pomaly nahrádza herbicíd glyfosát. Glyfosát patrí rovnako ako dikamba medzi selektívne herbicídy, ale veľké množstvo burín si už voči glyfosátu vyvinulo rezistenciu, čím sa stáva glyfosát málo účinným (Freydier a Lundgren, 2016; Shaner, 2000).

Rezistencia rastliny na tento herbicíd je závislá od umelo vytvoreného bakteriálneho génu DMO (dikamba monooxygenáza). Tento gén kóduje tzv. Rieskeho nonhemovú monooxygenázu, ktorá je exprimovaná z jadrového alebo chloroplastového genómu transgénej rastliny a je schopná deaktivovať dikambu pred tým, než sa stane pre rastlinu toxická (Behrens *et al.*, 2007).

Dikamba sa v prostredí neakumuluje a je veľmi dobre mineralizovateľná (Krueger *et al.*, 1989; Milligan a Häggblom, 1999).

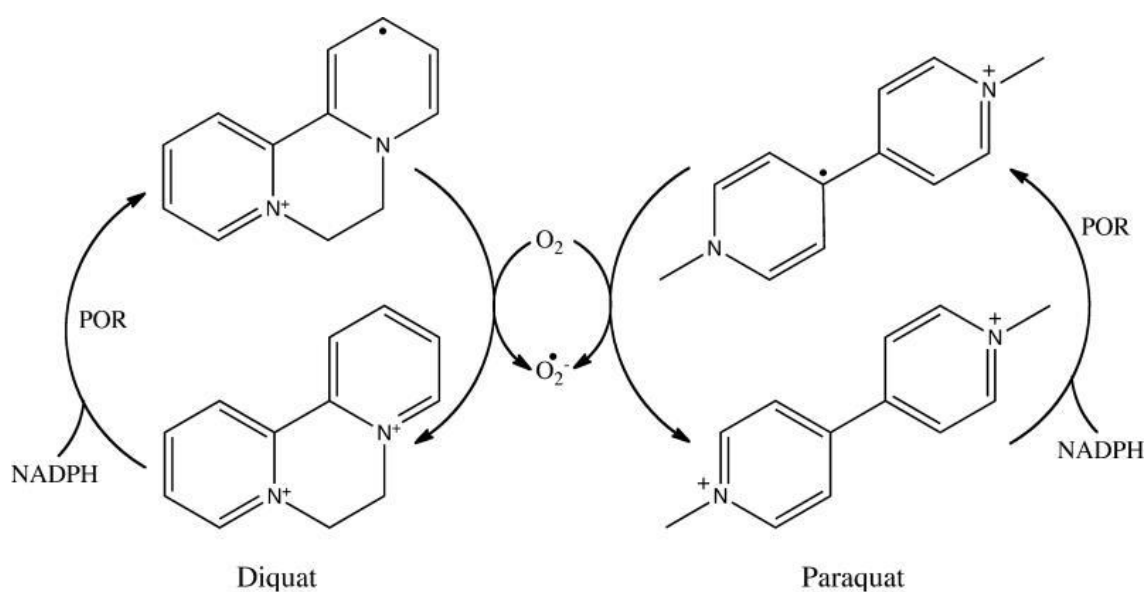
Pri správnom používaní nie sú známe toxické účinky tohto herbicídu na ľudí (USEPA, 2017, dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/registration-dicamba-use-genetically-engineered-crops#q1> (30.1.2017)). Negatívne pôsobí dikamba na larválne štádiá niektorých druhov motýľov. Tento efekt je nepriamy a pravdepodobne

zapríčinený zníženým nutričným obsahom rastlín, na ktoré bola dikamba aplikovaná (Bohnenblust *et al.*, 2013). Larvy hmyzu *Coleomegilla maculata* trpeli mierne zvýšenou úmrtnosťou a mierne zníženou hmotnosťou po pôsobení tohto herbicídu v koncentrácii 37  $\mu$ l dikamby v 1 ml roztoku, ktorý bol nanesený v dávke 0,5  $\mu$ l na larvu (Freydier a Lundgren, 2016). Žiadne výrazné toxické účinky dikamby na ľudí zatiaľ neboli pozorované.

V štátoch Európskej únie je používanie dikamby ako herbicídu povolené (European commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### 2.2.4 Paraquat dichlorid

Paraquat dichlorid (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid), častokrát nazývaný len paraquat, je jeden z najviac používaných herbicídov registrovaných v Spojených štátoch amerických. Používa sa v poľnohospodárstve a v industriálnych zónach, ale nepoužíva sa v domácnostiach alebo v obývaných oblastiach. Všetky herbicídy obsahujúce paraquat ako aktívnu zložku môžu byť predávané a aplikované len špeciálne certifikovanými osobami. Často sa užíva ako defoliant, napríklad v prípade bavlníku (USEPA, 2017, dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/paraquat-dichloride> (30.1.2017)).



Obr. 5: Generácia kyslíkových radikálov paraquatom a diquatom (prevzaté z Fussell *et al.*, 2011)

Paraquat sa nedostáva do ľudského tela pokožkou, do tela je prijímaný orálne (Vale *et al.*, 1987). Tento herbicíd indukuje tvorbu reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS) prostredníctvom mikrozomálnej NADPH-cytochróm-P450-reduktázy (Bismuth *et al.*, 1990) (Obr. 5), xantínoxidázy (Kelner *et al.*, 1988) a mitochondriálnej NADH-chinón oxidoreduktázy (Shimada *et al.*, 1998). Paraquat je NADPH-cytochróm-P450-reduktázou (POR) za prítomnosti NADPH redukovaný o 1 elektrón, výsledným produktom je bipyridylový kationový radikál. Tento radikál reaguje s molekulárnym kyslíkom za tvorby superoxidového aniónu a paraquatu, čím sa uzatvára redoxný cyklus (Obr. č. 5). Novovzniknuté kyslíkové radikály zvyšujú oxidatívny stres, ktorý vedie až k poškodeniu orgánov (Novaes *et al.*, 2016). Najviac postihnutým orgánom sú pľúca, kde u potkanov vyvoláva tvorbu edémov, krvácanie, zápal a tvorbu prázdnych miest medzi alveolami pri dávke 35 mg/kg podanej intraperitoneálnou injekciou (Choi *et al.*, 2013). Využíva polyamínový transportný systém (Rose *et al.*, 1974). Podľa niektorých štúdií je poškodenie pľúc paraquatom spôsobené práve nadmerne zvýšeným oxidačným stresom (Tian *et al.*, 2013).

Ďalším orgánom, ktorý je paraquatom značne ovplyvnený, sú obličky. Paraquat je v ľudskom tele len málo metabolizovaný, z ľudského tela je vylúčený močom a len málo transformovaný (Chan *et al.*, 1997). Odstraňovanie paraquatu z organizmu potkanov prebieha aktívne a zahŕňa kationový transportný systém (Chan *et al.*, 1997). Negatívny vplyv je pravdepodobne spôsobený už spomínanou indukciou oxidačného stresu, u ľudí spôsobuje dávka väčšia ako 20 mg paraquatu na 1 kg váhy jedinca akútnu tubulárnu nekrózu a renálne zlyhanie (Vale *et al.*, 1987).

Toxicita paraquatu sa tiež značne prejavuje na srdci. Po vyradení génu pre receptor TLR4 (toll-like receptor 4) u myši bola po dávke 45 mg paraquatu na 1 kg váhy jedinca podanej intraperitoneálne pozorovaná nižšia hladina autofágových markerov v kardiomyocytoch v porovnaní s kontrolou (Wang *et al.*, 2016), myši boli teda voči paraquatú odolnejšie. Podobný výsledok bol pozorovaný u myši s vyradeným génom pre proteínkinázu B. U týchto myši bola pozorovaná zmiernená mechanická dysfunkcia srdca spôsobená paraquatú (45 mg paraquatu na 1 kg váhy jedinca podaných jednorázovo a intraperitoneálne) v porovnaní s kontrolou (Wang *et al.*, 2017). U týchto myši bola po podaní paraquatu tiež pozorovaná zvýšená aktivácia jadrového faktoru Nrf2 (nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2), ktorá pravdepodobne tiež prispieva k zmierneniu toxických účinkov paraquatu (Wang *et al.*, 2017).

Opakované malé dávky tohto herbicídu (1 mg paraquatu na 1 kg váhy jedinca) môžu tiež spôsobiť degeneráciu dopaminergných neurónov v substantia nigra stredného mozgu - mezencefala (McCormack *et al.*, 2002). Príčinou je podobnosť štruktúry paraquatu s dopaminergným neurotoxínom 1-metyl-4-fenylpyridín a táto degenerácia podnecuje vznik Parkinsonovej choroby (McCormack *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2015).

Pre niekoľkonásobné toxické účinky nie je používanie paraquatu v štátoch Európskej únie povolené (European Commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### 2.2.5 Diquat dibromid

6,7-dihydrodipyrido[1,2-a:2,1-c]pyrazinediium dibromid je herbicíd, ktorý sa spolu s paraquatom zaraďuje medzi kvartérne amóniové soli a bipyridyly, je rozpustný vo vode a patrí medzi neselektívne herbicídy. Využíva sa ako herbicíd listnatých burín alebo ako sušidlo.

Diquat spolu s paraquatom sú herbicídy, ktorých hlavný toxický účinok spočíva v indukcii tvorby kyslíkových radikálov (ROS). K tomuto procesu dochádza v prítomnosti NADPH a NADPH-cytochrom-P450-reduktázy (POR) (Obr. č. 5). Vzniknuté ROS reagujú s molekulárnym kyslíkom, generujú superoxidový radikál a za prítomnosti železa hydroxylový radikál, ktorý poškodzuje DNA (Farrington *et al.*, 1973). Pri nízkych koncentráciách ( $0,3 - 30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) tvorí diquat 12 až 40-krát viac ROS než paraquat, pri saturujúcich koncentráciách je ich aktivita približne rovnaká (Fussell *et al.*, 2011).

Dokázané boli embryotoxické, genotoxické a teratogénne účinky tohto herbicídu (Sewalk *et al.*, 2001). U 29 % lariev obojživelníkov vystavených pôsobeniu diquatu ( $0,125 \text{ mg/l}$ ) boli pozorované špecifické malformácie tela (Vismara *et al.*, 2000). Pri dávke diquatu 8 mg diquatu na 1 kg váhy jedinca aplikovanej u myši intraperitoneálne dvakrát týždenne po dobu 4 týždňov boli pozorované rôzne dysfunkcie rozmnožovacej sústavy, ako napríklad zníženie hmotnosti vaječníkov, či zníženie počtu funkčných vajíčok (Zhang *et al.*, 2016). Rovnako ako u paraquatu, aj pri pôsobení diquatu na organizmus má Nrf2 dôležitú úlohu. U myši s vyradeným génom pre Nrf2 boli pozorované pri podanej dávke diquatu ( $125 \text{ mg diquatu na 1 kg váhy jedinca}$ ) závažnejšie

poškodenia pľúc ako v prípade kontrolných myší (Wu *et al.*, 2012). Tento protektívny účinok je pravdepodobne spojený so zvýšenou hladinou glutatiónu (GSH) v pľúcach, ktorú pravdepodobne Nrf2 indukuje (Wu *et al.*, 2012). Pre bunky mezencefala je diquat toxickejší ako paraquat, pričom jeho toxicita nezahŕňa aktiváciu kaspáz, jedná sa teda o programovanú nekrózu nervových buniek (Nisar *et al.*, 2015).

Napriek preukázaným toxickým účinkom je používanie herbicídu diquat v štátoch Európskej únie Európskou komisiou povolené (European Commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### **2.2.6 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina**

2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D) je herbicíd používaný na kontrolu listnatej buriny. Využíva sa v rôznych vodných a lesnických lokalitách, ale predovšetkým na vypletie polí s ovocím a zeleninou. Spolu s herbicídom 2,4,5-T tvoril zmes s názvom Agent Orange. Jedná sa o selektívny herbicíd a syntetický auxín. V cieľovej rastline napodobňuje funkciu auxínu a spôsobuje nekontrolovateľné delenie buniek, čo má za následok smrť cieľovej rastliny. Aktívne formy herbicídu 2,4-D sú estery, soli a určité kyslé formy (USEPA, 2017, dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d> (31.1.2017)).

Herbicíd 2,4-D je z ľudského tela odstránený v relatívne krátkom čase (počas vylúčenia z ľudského tela je 17,7 hodín) a v ľudskom tele nedochádza ani k jeho metabolickej premene, ani k akumulácii (Sauerhoff *et al.*, 1977). Považuje sa za málo toxický herbicíd pre ľudský organizmus. Vo vyšších dávkach (100 - 200 mg 2,4-D na 1 kg váhy jedinca podávanú denne po dobu 30 dní) pôsobí negatívne na samčiu pohlavnú sústavu potkanov, po 24 dňoch pozorovania bola zaznamenaná znížená hmotnosť jedincov, vyhodnotenie výskumu preukázalo tiež zníženú produkciu testosterónu, zníženú hmotnosť semenníkov a prostaty a výrazný úbytok gamét v semenotvorných tubuloch v porovnaní s kontrolnými jedincami (Marouani *et al.*, 2017). Ľudské spermie vykazujú zníženú pohyblivosť po pôsobení 2,4-D v koncentrácii 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po dobu 1 hodiny v podmienkach *in vitro*, čo môže mať za následok zníženú plodnosť až infertilitu mužov (Tan *et al.*, 2016). Tvorbou reaktívnych kyslíkových radikálov a narúšaním pomeru glutatiónu a glutatión disulfidu (GSH/GSSG) 2,4-D v koncentrácii 1 – 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  indukuje peroxidáciu lipidov v ľudských a živočíšnych bunkách v *in vitro*

podmienkach (Palmeira *et al.*, 1995). Vo väčšej miere tiež negatívne ovplyvňuje nervovú sústavu potkanov, čo bolo pozorované *in vitro* pri koncentrácii herbicídu v kultivačnom médiu 1mM (Bongiovanni *et al.*, 2007). Je potrebné tiež spomenúť genotoxické účinky tohto herbicídu u rýb, ktoré boli pozorované pri koncentrácii 252 – 756 mg.l<sup>-1</sup> vo vode, v ktorej sa ryby nachádzali po dobu 48 - 96 hodín (Ruiz de Arcaute *et al.*, 2016).

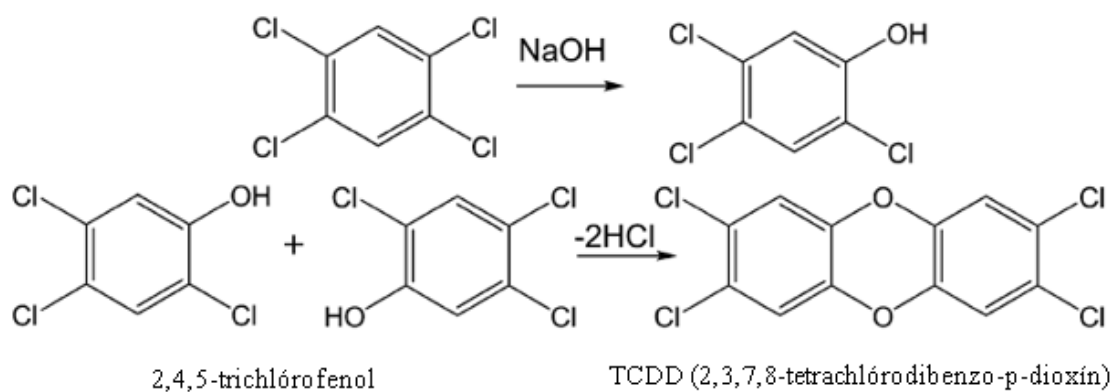
V štátoch Európskej únie je používanie tohto herbicídu povolené (European Comission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)).

### 2.2.7 2,4,5- trichlorofenoxyoctová kyselina

2,4,5-trichlorofenoxyoctová kyselina (2,4,5-T) je herbicíd, ktorý sa spolu s 2,4-D zaraďuje medzi organochlórové látky a syntetické auxíny, a ktorý bol spolu s herbicídom 2,4-D hlavnou zložkou vyššie spomínanej herbicídnej zmesi s názvom Agent Orange, ktorá bola použitá na defoliáciu lesov počas vojny vo Vietname.

Herbicíd 2,4,5-T znižuje hladinu superoxidodismutázy a katalázy, čím zvyšuje oxidačný stres a pôsobí toxicky na červené krvinky pri kultivácii *in vitro* a koncentrácii herbicídu 100 µg/ml (Bukowska, 2004). Tiež pôsobí negatívne na nervovú sústavu, ale len za zníženého pH. Pri pH 3,3 sa hodnota polovičnej maximálnej efektívnej koncentrácie (EC<sub>50</sub>) rovná 0,20 mmol.l<sup>-1</sup>, zatiaľ čo pri pH 7,2 je táto hodnota rovná 0,9 mmol.l<sup>-1</sup> (Zafeiridou *et al.*, 2005).

Pri syntéze 2,4,5-trichlorofenoxyoctovej kyseliny z 2,4,5-trichlorofenolu vzniká vysoko toxický vedľajší produkt reakcie – 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín (TCDD)



Obr. č. 6: Schéma premeny 2,4,5-trichlórfenolu na TCDD

(Obr. 6). Tento dioxín bol kontaminantom herbicídnej zmesi Agent Orange. Jedná sa o vysoko toxickú zlúčeninu, ktorá sa viaže na aryl uhl'ovodíkový receptor (AhR). AhR je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, po naviazaní ligandu je následne presunutý do jadra, kde sa viaže na špecifický úsek DNA a moduluje transkripciu cieľových génov (Patterson *et al.*, 2015). U potkanov vyvoláva už jedna podaná dávka herbicídu (3  $\mu\text{g}$  2,4,5-T na 1 kg váhy jedinca) vyvoláva zmeny v štruktúre histónov a hypometyláciu DNA závislú od AhR (Amenya *et al.*, 2016).

Negatívny vplyv látky TCDD a všeobecne dioxínov sa prejavuje viditeľne na pokožke tvorbou chlórakné, ktoré môže pretrvávať aj niekoľko rokov (Patterson *et al.*, 2015).

Podľa niektorých epidemiologických štúdií spôsobuje Agent Orange zvýšené riziko vrodených väd ako napríklad rázštepú chrbtice u novorodencov, ktorých otec bol ako vojak vo Vietname vystavený pôsobeniu tejto herbicídnej zmesi (Ngo *et al.*, 2010). Iné štúdie to popierajú (Fraser, 2009).

V štátoch Európskej únie je používanie tohto herbicídu zakázané (European Commission, 2016, dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017))

### **2.3 Pôsobenie herbicídov na tyroidný receptor**

Tyroidný metabolizmus môže narušiť veľké množstvo látok. Medzi tieto látky označované tiež skratkou THDCs (thyroid-hormone-disrupting chemicals) patria aj pesticídy a herbicídy (Zaidi *et al.*, 2000).

Epidemiologické štúdie potvrdzujú negatívny vplyv herbicídov na tyroidný metabolizmus a štítnu žľazu. Pravdepodobne existuje spojitosť medzi herbicídmi a zvýšenou hladinou TSH doprevádzanú zníženou hladinou T4 (Piccoli *et al.*, 2016). Pôsobenie paraquatu je výrazne spojené so vznikom hypotyroidizmu u žien (Goldner *et al.*, 2010). U herbicídov 2,4-D, 2,4,5-T, alachlóru a dikamby bola preukázaná zvýšená pravdepodobnosť vzniku hypotyroidizmu u mužov, ktorí boli vystavení pôsobeniu týchto herbicídov (Goldner *et al.*, 2013).

Príčiny takýchto ochorení a dysbalancií nie sú zatiaľ úplne objasnené. Herbicídy 2,4-D a 2,4,5-T sú podľa výsledkov z izotermálnej titračnej kalorimetrie schopné viazať sa na TR $\beta$ 1 podjednotku tyroidného receptora s väzbovou afinitou 60  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pre 2,4,5-T a 460  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pre 2,4-D (Zhang *et al.*, 2016). Vplyv ich väzby na TR však nie je ešte dostatočne preskúmaný, môžeme ich ale zatiaľ označiť ako potencionálne THDC.



Iné látky nenarúšajú priamo tyroidný receptor, ale viažu sa kompetitívne na prenášače tyroidných hormónov a tým ovplyvňujú celý metabolizmus. Pomocou metódy RLBA (radio-ligand binding assay) bola skúmaná schopnosť dopredu vybraných látok viazať sa na TTR (Zhang *et al.*, 2015). U herbicídu 2,4,5-T bola zistená hodnota  $IC_{50}$  pri väzbe na TTR  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a menej, patrí teda medzi látky, ktoré sa na TTR viažu (Zhang *et al.*, 2015). S TTR interaguje pravdepodobne cez aminokyselinu Ser117A v TTR (Zhang *et al.*, 2015).

V mojej bakalárskej práci sa zaoberám vplyvom herbicídov triklopyr, alachlór, dikamba, paraquat, diquat, 2,4-D a 2,4,5-T na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora.

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál a metódy

#### 3.1.1 Biologický materiál

- PZ-TR – bunková línia odvodená z ľudského hepatocelulárneho karcinómu HepG2 (ECACC no.85011430) transfekciou reportérovým plazmidom pGL4.14-TRE1 obsahujúcim dve kópie TRE oddelené 4 nukleotidmi, gén pre luciferázu a gén pre rezistenciu proti hygromycínu B (Illés *et al.*, 2014)

#### 3.1.2 Chemikálie a použité roztoky

- komerčné médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, D6546, Česká republika) s prídavkom 5 ml roztoku antibiotík penicilínu a streptomycínu (Sigma-Aldrich, P4333, Česká republika), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, G8540, Česká republika), 50 ml FBS (fetálne bovinné sérum) (Sigma-Aldrich, F6178, Česká republika) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, 11140-035, Veľká Británia)
- komerčné médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, D6546, Česká republika) s prídavkom 5 ml roztoku antibiotík penicilínu a streptomycínu (Sigma-Aldrich, P4333, Česká republika), 5 ml L-glutamínu (Sigma-Aldrich, G8540, Česká republika), 50 ml FBS hormonálne inaktivovaného (FBS-CS; Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped) (Sigma-Aldrich, F6765, Česká republika) a 5 ml neesenciálnych aminokyselín (Gibco, 11140-035, Veľká Británia)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049, Česká republika)
- trypanová modrá (0,4% Trypan blue v PBS)
- fosfátový pufo (PBS: Phosphate-Buffered Saline) (Gibco, 10010031, USA)
- hygromycín B (Sigma-Aldrich, H7772, Česko) – zásobný roztok 50 mg.l<sup>-1</sup>
- oktylfenol etoxylát (Triton X-100) (Serva, 37240, Nemecko)
- dimetylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, D8418, Česká republika)
- metyltetrazóliová soľ (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128, Česká republika)
- lyzačný pufo (Promega, E3971, USA)
- substrát pre luciferázu – 5 mg D-luciferín (Sigma-Aldrich, L9504, Česká republika), 9,6 mg adenzín-5'-trifosfát (ATP) (Sigma-Aldrich, A6419, Česká republika)

republika), 6,83 mg koenzým A (CoA) (Sigma-Aldrich, C4282, Česká republika), 168 mg dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43819, Česká republika), 1,32 ml trisacetát-EDTA pufo 1 mol.l<sup>-1</sup> (pH 7,8) (Sigma-Aldrich, T8280, Česká republika), 1,23 mg kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, E6511, Česká republika), 30,3 mg heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich, M5921, Česká republika) doplnené do 30 ml destilovanou vodou

- použité herbicídy – paraquat dichlorid (PRQ) (Sigma-Aldrich, 36541, Česká republika), diquat (DQ) (Sigma-Aldrich, N11816, Česká republika), triklopyr (TCR) (Sigma-Aldrich, 32016, Česká republika), dikamba (DIC) (Sigma-Aldrich, 45430, Česká republika), 2,4-D (Sigma-Aldrich, N10609, Česká republika), 2,4,5-T (Sigma-Aldrich, 45667, Česká republika), alachlór (ALA) (Sigma-Aldrich, 45316, Česká republika) – koncentrácia zásobných roztokov 500 mmol.l<sup>-1</sup>
- trijódtyronín (T3) (Sigma-Aldrich, T2877, Česká republika) – koncentrácia zásobného roztoku 10 mmol.l<sup>-1</sup>

### 3.1.3 Laboratórne pomôcky

- automatické pipety v rozsahu 0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Nemecko)
- multikanálové pipety v rozsahu 0,5 – 10 µl, 30 – 300 µl, 10 – 100 µl (Eppendorf, Nemecko)
- plastové špičky v rozsahu 0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Nemecko)
- pipetor FastPette (Labnet, USA)
- sterilné sklenené pipety s objemami 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP, Švajčiarsko)
- kultivačné fľaše s objemami 15 ml a 165 ml (TPP, Švajčiarsko)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP, Švajčiarsko)
- 96 jamková čierna doštička na meranie luminiscencie (NUNC, Dánsko)
- Petriho misky (TPP, Švajčiarsko)
- mikroskúmavky s objemami 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (BIOplastics, Holandsko)
- skúmavky s objemami 15 ml a 50 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Bürkerova komôrka (Assistent, Nemecko)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser, Nemecko)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky

- buničina (Tork, 130060, Švédsko)

### 3.1.4 Prístroje

- laminárny box Labculture® (ESCO, Singapur)
- inkubátor Mitre 4000 Series (Contherm, Nový Zéland)
- digitálny mikroskop (Novel Optics, Čína)
- vortex Reax top (Heidolph, Nemecko)
- optický systém Infinite® 200 (Tecan, Švajčiarsko)
- skriňový mraziaci box MDF-U53V (Sanyo, Japonsko)
- trepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan, USA)
- aspirátor FTA-1 (Biosan, Litva)
- vodný kúpeľ LCB 22D (Daihan Labtech, Južná Kórea)

### 3.1.5 Použité metódy

#### 3.1.5.1 Pasážovanie buniek

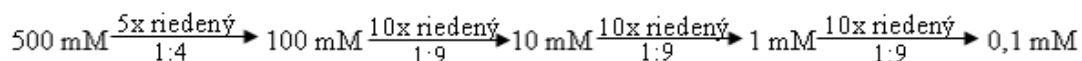
Kultivačné médiá, fosfátový pufr (PBS) a 0,25% trypsín boli predhriate vo vodnom kúpeli na teplotu 37°C. Plastová kultivačná fľaša s bunkami bunkovej línie PZ-TR bola sterilne prenesená do laminárneho boxu. Za sterilných podmienok v laminárnom boxe bolo odsaté kultivačné médium z kultivačnej fľaše a bolo nahradené 4 ml PBS. Bunky v kultivačnej fľaši boli opatrne premyté a PBS bolo odsaté. Do kultivačnej fľaše bol napipetovaný 1 ml 0,25% trypsínu a uzavretá kultivačná fľaša s bunkami bola sterilne prenesená do inkubátora na dobu 3 minúty. Po tejto dobe bola kultivačná fľaša s bunkami prenesená naspäť do laminárneho boxu a doplnená 9 ml kultivačného média, ktoré ukončilo trypsinizáciu. Pomocou pipetora boli bunky rozsuspendované a homogénna suspenzia bola prenesená do plastovej falkóny o objeme 15 ml. Z homogénnej suspenzie buniek PZ-TR boli odobrané 3 ml, ktoré boli prenesené do kultivačnej fľaše a doplnené 17 ml kultivačného média. Kultivačná fľaša bola sterilne prenesená do inkubátora (37°C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>). Raz za týždeň bolo do kultivačnej fľaše pridaných 80 µl hygromycínu B do výslednej koncentrácie 0,2 mg.ml<sup>-1</sup> v kultivačnom médiu pre udržanie selekčného tlaku. Pasážovanie bolo prevádzané každé 2-3 dni.

### 3.1.5.2 Príprava experimentu

Začiatkový postup pri príprave experimentu pozostával z rovnakých krokov ako metóda pasážovania buniek. Za sterilných podmienok bola kultivačná fľaša s bunkami prenesená sterilne do laminárneho boxu, kde bolo odsaté kultivačné médium, bunky boli premyté v 4 ml predhriateho PBS, ktoré bolo následne odsaté, na bunky bol aplikovaný 0,25% trypsin a kultivačná fľaša bola sterilne umiestnená v inkubátore po dobu 3 minút. Po tejto dobe bola kultivačná fľaša s bunkami znovu sterilne premiestnená do laminárneho boxu a trypsinizácia bola zastavená pomocou 9 ml predhriateho kultivačného média s pridaným hormonálne inaktivovaným FBS (FBS-CS). Bunky boli rozsuspendované a homogénna suspenzia bola prenesená do sterilnej plastovej falkóny o objeme 15 ml. Z homogénnej suspenzie bolo odobraných 10  $\mu$ l a prenesených do sterilnej mikroskúmavky. Mimo laminárneho boxu bolo do mikroskúmavky pridaných 90  $\mu$ l trypanovej modrej, suspenzia bola premiešaná pomocou pipety a 10  $\mu$ l suspenzie bolo prenesených na Bürkerovu komôrku za účelom počítania buniek v 1 ml. Pod mikroskopom bol spočítaný počet buniek v 10 štvorcoch, bola určená priemerná hodnota a vynásobená zried'ovacím faktorom  $10^5$ . Výsledná hodnota určujúca počet buniek na 1 ml bunkovej suspenzie bola použitá pri ďalších výpočtoch zriedenia tak, aby na 1 jamku kultivačnej doštičky (200  $\mu$ l) pripadalo 50 000 buniek. Po správnom zriedení bunkovej suspenzie kultivačným médiom s FBS-CS v sterilných podmienkach laminárneho boxu bola vzniknutá suspenzia rozpipetovaná pomocou multikanálovej pipety s plastovými špičkami na kultivačnú doštičku. Kultivačná doštička bola inkubovaná v inkubátore (37°C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>) po dobu 24 hodín do naniesenia skúmaných koncentrácií pôsobiacich látok.

### 3.1.5.3 Nanášanie pôsobiacich látok pri testovaní cytotoxicity (MTT test)

Pred prvým experimentom boli herbicídy (PRQ, DQ, TCR, DIC, 2,4-D, 2,4,5-T, ALA) zriedené zo zásobných roztokov o molárnej koncentrácii 500 mmol.l<sup>-1</sup> na koncentrácie 100 mmol.l<sup>-1</sup>, 10 mmol.l<sup>-1</sup>, 1 mmol.l<sup>-1</sup> a 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> (Obr. 7). Herbicídy paraquat a diquat boli zriedené na požadované koncentrácie deionizovanou vodou, u ostatných herbicídov bolo na zriedenie použité DMSO.



Obr. 7: Riedenie zásobného roztoku herbicídu pred 1. experimentom. 1 mM = 1 mmol.l<sup>-1</sup>

0,1 % DMSO											
Herbicíd 0,1 $\mu\text{M}$				Herbicíd 0,1 $\mu\text{M}$				Herbicíd 0,1 $\mu\text{M}$			
1 $\mu\text{M}$				1 $\mu\text{M}$				1 $\mu\text{M}$			
10 $\mu\text{M}$				10 $\mu\text{M}$				10 $\mu\text{M}$			
100 $\mu\text{M}$				100 $\mu\text{M}$				100 $\mu\text{M}$			
500 $\mu\text{M}$				500 $\mu\text{M}$				500 $\mu\text{M}$			
2 % Triton X-100											

Obr. 8: Systém nanášania pôsobiacich látok na kultivačnú doštičku pri MTT teste.  $1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Pred každým experimentom bola každá koncentrácia herbicídu zriedená 1000-krát kultivačným médiom s FBS-CS, teda koncentrácie herbicídov v kultivačnom médiu s FBS-CS pôsobiacom na bunky pri cytotoxickom teste boli  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 0,1% DMSO. Ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 2% Triton X-100. V sterilných podmienkach laminárneho boxu bolo odsaté kultivačné médium z jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky a nahradené  $200 \mu\text{l}$  kultivačného média s herbicídmi, s DMSO alebo s Triton X-100. Pozitívna a negatívna kontrola boli nanášané po 12 jamkách na každej doštičke, každá koncentrácia každého herbicídu bola nanesená po 4 jamkách, tzn. v kvadruplicáte (Obr. 8).

Kultivačné doštičky boli prenesené do inkubátora ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% vlhkosť) a kultivované 24 hodín do MTT testu.

### 3.1.5.4 MTT test

Táto metóda sa používa na stanovenie cytotoxického pôsobenia cudzorodých látok. Princíp tohto testu spočíva v premene tetrazólievej soli (MTT) pomocou enzýmu sukcinátdehydrogenázy na fialovo sfarbený formazán. Táto premena prebieha len v živých bunkách, preto tvorba formazánu je priamo úmerná počtu životaschopných buniek v médiu (Denizot a Lang, 1986). Výsledky sú stanovované spektrofotometricky a vyhodnotené percentuálne vzhľadom k negatívnej kontrole.

Po 24 hodinách kultivácie buniek s pôsobiacimi látkami bol experiment vyhodnotený. Pri vyhodnocovaní nebolo potrebné pracovať v sterilných podmienkach. Kultivačné médium bolo z jamiek na kultivačných doštičkách odstránené, kultivačná doštička bola zľahka osušená buničinou a bunky v každej jamke boli opláchnuté v 100  $\mu\text{l}$  PBS. PBS bolo následne odstránené a nahradené 100  $\mu\text{l}$  roztoku kultivačného média s MTT v koncentrácii 0,1  $\text{mg.l}^{-1}$ . Kultivačná doštička bola prenesená do inkubátora (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 95% vlhkosť) na 40 minút. Po inkubácii bolo kultivačné médium s MTT vyliate a nahradené 50  $\mu\text{l}$  dimetylsulfoxidu (DMSO), v ktorom sa kryštály formazánu rozpustili po 5 minútach za občasného premiešavania. Pomocou spektrofotometra Infinite® 200 bola zmeraná absorbancia v jednotlivých jamkách pri vlnovej dĺžke 565 nm. Výsledné hodnoty boli vyhodnotené a percentuálne stiahnuté na negatívnu kontrolu, pričom priemerná hodnota absorbancie jamiek negatívnej kontroly udávala 100 %.

### 3.1.5.5 Nanášanie pôsobiacich látok pri Gene Reporter Assay

Na základe výsledkov MTT testu boli pred prvým experimentom metódy Gene Reporter Assay doriedené koncentrácie herbicídov (PRQ, DQ, TCR, DIC, 2,4-D, 2,4,5-T, ALA) 0,01  $\text{mmol.l}^{-1}$  a 0,001  $\text{mmol.l}^{-1}$ , ktoré boli ďalej využívané pri experimentoch. Herbicídy PRQ a DQ boli zriedené na požadované koncentrácie deionizovanou vodou, u ostatných herbicídov bolo na zriedenie použité DMSO.

Bolo skúmané agonistické aj antagonistické pôsobenie herbicídov. Pri agonistickom pôsobení herbicídu na TR by dochádzalo k aktivácii TR daným herbicídom.

0,1 %DMSO											
Herbicíd 0,001 $\mu\text{M}$				Herbicíd 0,001 $\mu\text{M}$				Herbicíd 0,001 $\mu\text{M}$			
0,01 $\mu\text{M}$				0,01 $\mu\text{M}$				0,01 $\mu\text{M}$			
0,1 $\mu\text{M}$				0,1 $\mu\text{M}$				0,1 $\mu\text{M}$			
1 $\mu\text{M}$				1 $\mu\text{M}$				1 $\mu\text{M}$			
10 $\mu\text{M}$				10 $\mu\text{M}$				10 $\mu\text{M}$			
20 nM T3											

Obr. 9: Systém nanášania pôsobiacich látok na kultivačnú doštičku pri metóde Gene Reporter Assay. 1  $\mu\text{M}$  = 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Pri antagonistickom pôsobení herbicídu na TR by dochádzalo k inhibícii aktivity TR týmto herbicídom. Pri stanovovaní agonistického pôsobenia herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora bola pred každým experimentom každá koncentrácia herbicídu zriedená 1000-krát kultivačným médiom s FBS-CS, teda koncentrácie herbicídov v kultivačnom médiu s FBS-CS pôsobiacom na bunky pri Gene Reporter Assay boli  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $0,01 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $0,001 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Pri stanovovaní antagonistického pôsobenia herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora boli použité rovnaké koncentrácie herbicídov spolu s T3 v koncentrácii  $20 \text{ nmol.l}^{-1}$  (koncentrácia stanovená experimentálne). Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 0,1% DMSO. Ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a  $20 \text{ nmol.l}^{-1}$  T3 (koncentrácia stanovená experimentálne). Príprava experimentu bola rovnaká ako v prípade MTT testu. Po 24 hodinách inkubácie buniek s médiom FBS-CS bolo v sterilných podmienkach laminárneho boxu odsané kultivačné médium z jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky a nahradené 200  $\mu\text{l}$  kultivačného média s herbicídmi, DMSO alebo T3. Pozitívna a negatívna kontrola boli nanášané po 12 jamkách na každej doštičke, každá koncentrácia každého herbicídu bola nanosená po 4 jamkách, tzn. v kvadruplicáte (Obr. 9).

### 3.1.5.6 Gene Reporter Assay

Pre skúmanie génovej expresie a dejov s ňou spojených sa využívajú rôzne druhy Gene Reporter Assay. V mojej bakalárskej práci som na vyhodnotenie experimentov používala Luciferase Gene Reporter Assay. Táto metóda vyžaduje transfekovanú bunkovú líniu plazmidom, ktorý obsahuje okrem skúmaného génu tiež gén pre luciferázu, preto bola pri experimentoch použitá línia PZ-TR, ktorá tieto gény obsahuje (Illés *et al.*, 2014). Luciferase Gene Reporter Assay je založená na oxidácii substrátu luciferínu luciferázou za prítomnosti ATP a  $\text{O}_2$  na oxyluciferín, pričom je emitované svetlo (Simon *et al.*, 2008). Gén pre luciferázu je exprimovaný spolu so skúmaným génom, preto pri dostatočnom množstve substrátu je množstvo emitovaného svetla priamo úmerné miere expresie luciferázy, a teda aj skúmaného génu (Simon *et al.*, 2008).

Po 24 hodinách kultivácie buniek s pôsobiacimi látkami bol experiment vyhodnotený. Médium z jednotlivých jamiek kultivačnej doštičky bolo vyliate, doštička bola mierne osušená buničinou a do každej jamky bolo napipetovaných 23  $\mu\text{l}$  lyzačného pufru. Následne bola doštička umiestnená na 60 minút do mraziaceho boxu ( $-80^\circ\text{C}$ ). Na vodnom kúpeli bol rozmrazený substrát pre luciferázu. Doštička bola následne rozmrazená

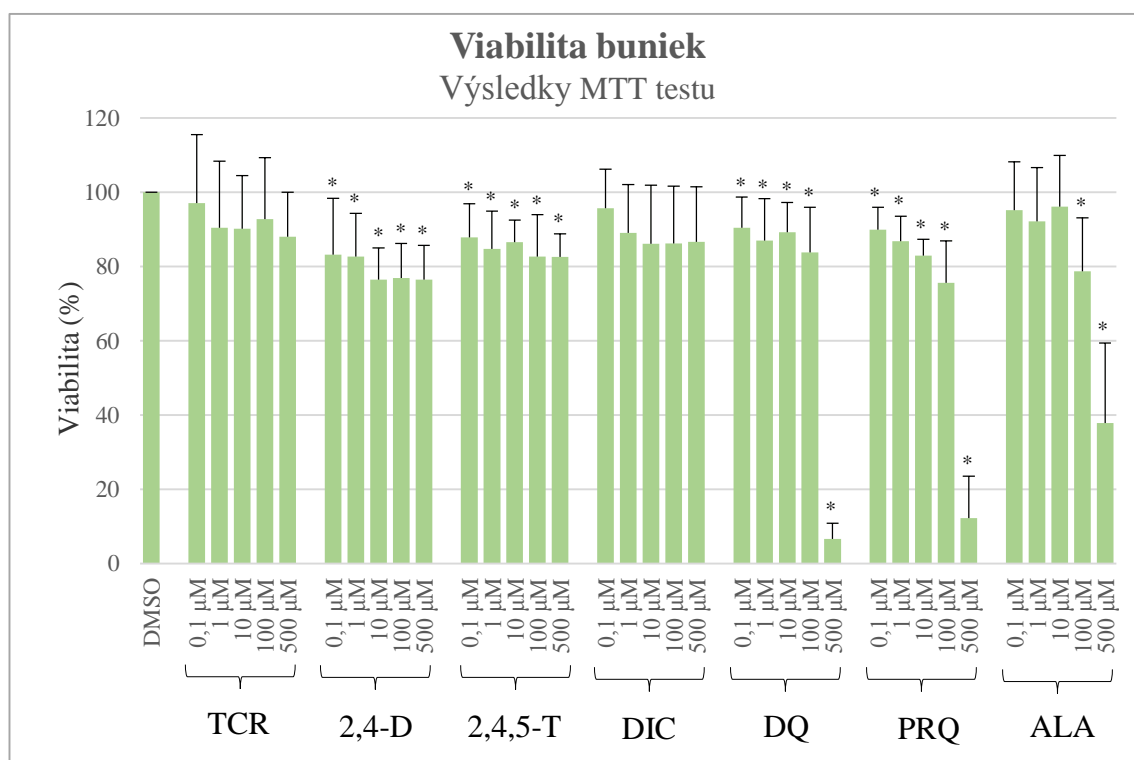


na trepačke. Z každej jamky kultivačnej doštičky bolo prepipetovaných 20  $\mu\text{l}$  do jamiek čiernej doštičky určenej na meranie luminescencie. Do každej jamky bolo následne napipetovaných 50  $\mu\text{l}$  substrátu. Množstvo emitovaného svetla bolo merané luminometrom Infinite® 200.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Stanovenie cytotoxického pôsobenia vybraných herbicídov

Pomocou MTT testu bolo stanovené cytotoxické pôsobenie jednotlivých vybraných herbicídov na TR-responzívnu bunkovú líniu PZ-TR. Cytotoxické pôsobenie bolo stanovené na základe viability buniek bunkovej línie PZ-TR po pôsobení herbicídov alachlór, dikamba, diquat, paraquat, 2,4-D, 2,4,5-T a triklopyr v koncentráciách 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v kultivačnom médiu s FBS-CS po dobu 24 hodín. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 0,1% DMSO. Ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 2% Triton X-100. Na základe výsledkov MTT testu a hodnôt absorbancií pri vlnovej dĺžke 565 nm bola stanovená viabilita buniek, ktorá bola percentuálne stiahnutá na negatívnu kontrolu. Tá predstavovala hodnotu 100% viability. Uvedené hodnoty sú výsledkami 6 nezávislých experimentov.



Graf 1: Viabilita buniek bunkovej línie PZ-TR stanovená pomocou MTT testu po 24 hodinách pôsobenia herbicídov v rôznych koncentráciách (1  $\mu\text{M}$  = 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Výsledky sú percentuálne stiahnuté k negatívnej kontrole, ktorá predstavuje hodnotu 100% viability. Hodnoty označené [\*] sú štatisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti negatívnej kontrole. 1  $\mu\text{M}$  = 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Po pôsobení každého herbicídu vo všetkých skúmaných koncentráciách bol pozorovaný pokles viability buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (Graf 1). U herbicídov triklopyr a dikamba bola percentuálna hodnota viability po pôsobení najvyšších skúmaných koncentrácií znížená len o 12% v prípade triklopyru a 13% v prípade dikamby. Tieto hodnoty neboli Studentovým t-testom určené ako štatisticky významné, u týchto herbicídov teda neboli preukázané cytotoxické účinky na bunkovú líniu PZ-TR pri použitých koncentráciách. U herbicídu alachlór bol štatisticky významný pokles viability pozorovaný len po pôsobení herbicídu v koncentrácii 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , preto by bolo vhodné pri ďalších experimentoch tieto koncentrácie vylúčiť. V prípade herbicídov 2,4-D, 2,4,5-T, diquat a paraquat bol pozorovaný štatisticky významný pokles viability vo všetkých skúmaných koncentráciách. Pri najvyššej pozorovanej koncentrácii paraquat a diquat bol pokles viability veľmi výrazný, činil viac ako 80 % v porovnaní s negatívnou kontrolou.

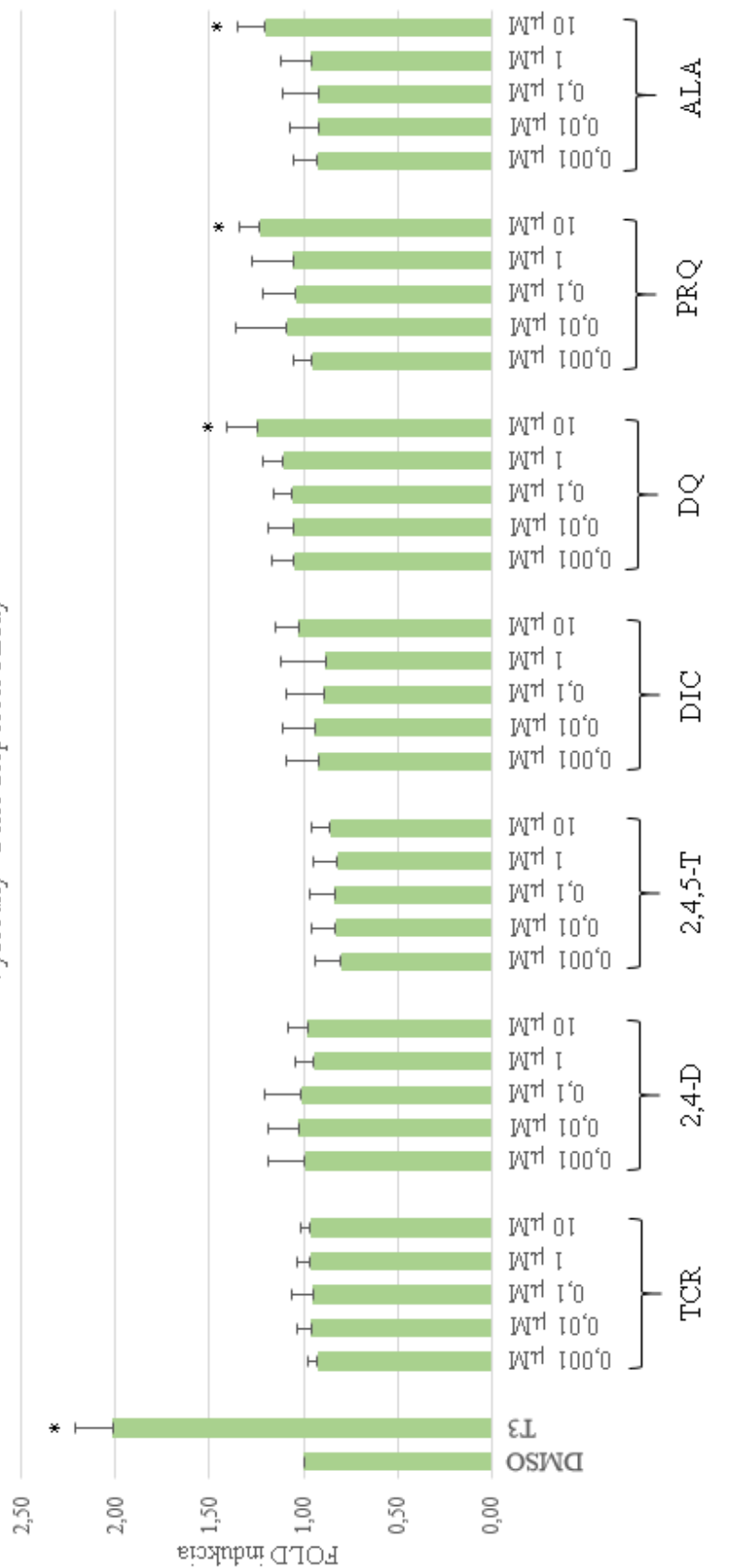
Na základe získaných dát boli stanovené koncentrácie herbicídov, ktoré boli ďalej použité na skúmanie transkripčnej aktivity TR na 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,01  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

## **4.2 Stanovenie agonistického pôsobenia vybraných herbicídov**

Pomocou metódy Luciferase Gene Reporter Assay bolo stanovené agonistické pôsobenie vybraných herbicídov vo zvolených koncentráciách na tyroidný receptor. Bolo skúmané pôsobenie herbicídov alachlóru, dikamby, diquat, paraquat, 2,4-D, 2,4,5-T a triklopyru v zvolených koncentráciách 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,01  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora. Pri stanovovaní agonistického pôsobenia bola pozorovaná schopnosť herbicídov v rôznych koncentráciách aktivovať tyroidný receptor. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 0,1% DMSO. Ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a T3 v koncentrácii 20  $\text{nmol.l}^{-1}$ . Jednotlivé experimenty boli vyhodnocované po 24 hodinách pôsobenia herbicídu pomocou luminometra. Množstvo emitovaného svetla vyjadrené v jednotkách RLU bolo následne prevedené na násobky negatívnej kontroly (FOLD indukcia). Uvedené hodnoty sú výsledkom 4 nezávislých experimentov.

## Transkripčná aktivita tyroidného receptora - agonistický efekt

Výsledky Gene Reporter Assay



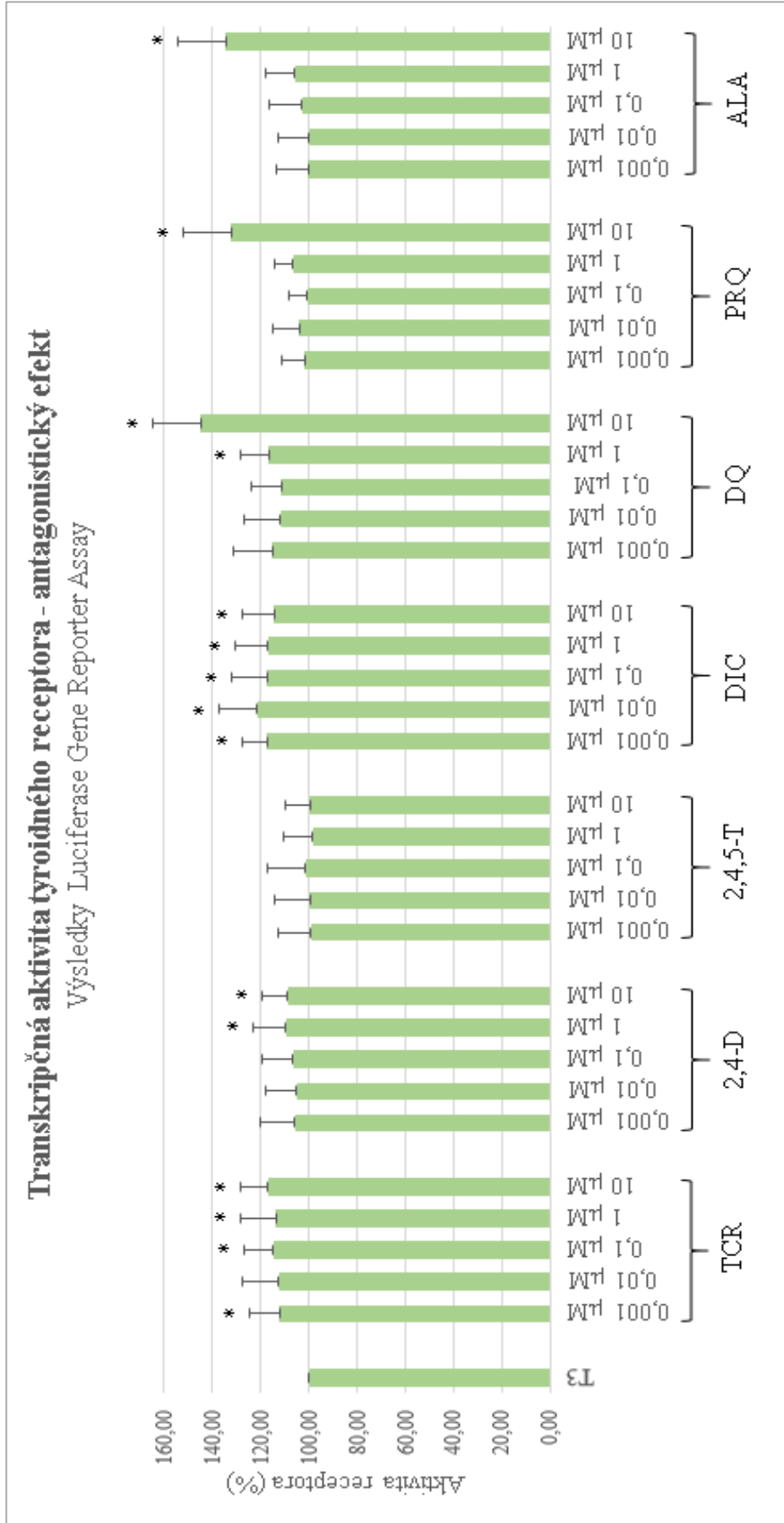
Graf 2: Aktivácia tyroidného receptora bunkovej línie PZ-TR po pôsobení herbicídov v rôznych koncentráciách po 24 hodinách pôsobenia. Výsledky sú vyjadrené formou FOLD indukcie, tzn. v násobkoch negatívnej kontrole. Hodnoty označené [\*] sú štatisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti negatívnej kontrole.  $1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

U väčšiny použitých koncentrácií skúmaných herbicídov nebolo pozorované výrazné zvýšenie aktivácie tyroidného receptora v porovnaní s negatívnou kontrolou (Graf 2). Pri použitých koncentráciách herbicídu 2,4,5-T môžeme vidieť mierne zníženie aktivácie TR oproti negatívnej kontrole. Tieto rozdiely však neboli Studentovým t-testom stanovené ako štatisticky významné.

Len v prípade najvyšších použitých koncentrácií herbicídov paraquat, diquat a alachlór bol zaznamenaný vzostup hodnoty FOLD indukcie, ktorý bol určený Studentovým t-testom ako štatisticky významný. Hodnoty FOLD indukcie dosahovali približne 63 % aktivácie v porovnaní s hodnotou FOLD indukcie u T3, čo je o 13 % viac v porovnaní s negatívnou kontrolou. Tieto výsledky poukazujú na miernu aktiváciu tyroidného receptora týmito herbicídmi pri dostatočne vysokej koncentrácii herbicídu.

### **4.3 Stanovenie antagonistického pôsobenia vybraných herbicídov**

Posledná séria experimentov skúmala pomocou metódy Luciferase Gene Reporter Assay antagonistické pôsobenie vybraných herbicídov alachlóru, dikamby, diquatu, paraquatu, 2,4-D, 2,4,5-T a triklopyru v zvolených koncentráciách 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 0,01  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora. V prípade antagonistického pôsobenia herbicídu by došlo k inhibícii aktivovaného TR. Pre aktiváciu TR bolo ku každej skúmanej koncentrácii herbicídu pridané T3 vo výslednej koncentrácii 20  $\text{nmol.l}^{-1}$  v kultivačnom médiu s FBS-CS. Ako negatívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a 0,1% DMSO. Ako pozitívna kontrola bolo použité kultivačné médium s FBS-CS a T3 v koncentrácii 20  $\text{nmol.l}^{-1}$ . Jednotlivé experimenty boli vyhodnocované po 24 hodinách pôsobenia herbicídu pomocou luminometra. Množstvo emitovaného svetla vyjadrené v jednotkách RLU bolo následne percentuálne stiahnuté na pozitívnu kontrolu, ktorá predstavuje 100% aktiváciu tyroidného receptora. Uvedené hodnoty sú výsledkom 6 nezávislých experimentov.



Graf 3: Aktivácia tyroidného receptora bunkovej línie PZ-TR po pôsobení herbicídov v rôznych koncentráciách spolu s 20 nM T3 po 24 hodinách pôsobenia. Výsledky sú percentuálne stiahnuté k pozitívnej kontrole, ktorá predstavuje hodnotu 100% aktivácie. Hodnoty označené [\*] sú štatisticky významné ( $P < 0,05$ ) oproti pozitívnej kontrole.  $1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Pri skúmaní antagonistického pôsobenia jednotlivých herbicídov na tyroidný receptor nebolo v daných koncentráciách preukázané žiadne potencionálne inhibičné pôsobenie herbicídov na tyroidný receptor (Graf 3). Pri žiadnej zo skúmaných koncentrácií herbicídov nebol pozorovaný významný pokles aktivácie receptora oproti pozitívnej kontrole.

U všetkých použitých koncentrácií herbicídu 2,4,5-T sa výsledné percentuálne hodnoty pohybovali približne okolo 100%, u tohto herbicídu nebola zaznamenaná žiadna štatisticky významná odchýlka od pozitívnej kontroly. Rovnako tomu bolo aj v prípade herbicídov paraquat, 2,4-D a alachlór pri koncentráciách od 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  do 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a v prípade herbicídu diquat pri koncentráciách od 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  do 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

V prípade herbicídu 2,4-D v koncentráciách 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  bolo pozorované len malé štatisticky významné zvýšenie aktivácie tyroidného receptora. Podobne tomu bolo aj v prípade herbicídu diquat v koncentrácii 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Mierny synergický efekt bol pozorovaný u všetkých použitých koncentrácií herbicídov triklopyr a dikamba. U triklopyru bol pozorovaný nárast aktivácie receptora priemerne o 12%, v prípade dikamby činil tento nárast približne 18% v porovnaní s pozitívnou kontrolou. Miera tohto zvýšenia nebola priamo závislá od koncentrácie, pri všetkých použitých koncentráciách bol nárast približne rovnaký. Okrem jednej použitej koncentrácie triklopyru boli všetky tieto odchýlky určené Studentovým t-testom ako štatisticky významné.

Výrazné zvýšenie aktivácie tyroidného receptora bolo pozorované predovšetkým u herbicídov diquat, paraquat a alachlór v najvyššej použitej koncentrácii – 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U diquatu v tejto koncentrácii bolo pozorované zvýšenie aktivácie tyroidného receptora o 44% v porovnaní s pozitívnou kontrolou, u paraquatu a alachlóru bol pozorovaný nárast o približne 30% v porovnaní s pozitívnou kontrolou. Všetky tieto hodnoty boli podľa Studentovho t-testu určené ako štatisticky významné.

Z výsledkov tejto série experimentov môžeme usudzovať, že herbicídy triklopyr a dikamba pôsobia s T3 synergicky na tyroidný receptor, pričom tento efekt nie je závislý od koncentrácie herbicídu. V menšej miere u herbicídu 2,4-D, predovšetkým ale u herbicídov paraquat, diquat a alachlór sa prejavil výrazný synergický efekt, ktorý bol podmienený zvýšenou koncentráciou herbicídov.

## 5 DISKUSIA

V tejto bakalárskej práci bol sledovaný vplyv herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora. Pre experimenty bolo zvolených 7 druhov herbicídov, medzi ktorými boli herbicídy neselektívne, napr. paraquat alebo diquat, ale aj selektívne, napr. dikamba. Herbicídy paraquat, diquat, alachlór a 2,4,5-T sú známe svojimi toxickými účinkami na ľudský organizmus a v mnohých štátoch je ich používanie zakázané, alebo podlieha striktným predpisom. Naopak u dikamby, triklopyru a 2,4-D zatiaľ neboli pozorované žiadne výrazné toxické účinky na ľudský organizmus.

Pri experimentoch skúmajúcich agonistické a antagonistické pôsobenie herbicídov na tyroidný receptor boli zvolené použité koncentrácie tak, aby neovplyvňovali viabilitu buniek, a teda aj výsledky metódy Luciferase Gene Reporter Assay. U herbicídov 2,4-D a 2,4,5-T bol pozorovaný signifikantný pokles viability pri všetkých koncentráciách použitých v MTT teste, ktorý však bol približne konštantný. Z tohoto dôvodu boli z ďalších experimentov vylúčené rovnako ako aj v prípade ostatných použitých herbicídov len dve najvyššie koncentrácie –  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ako pozitívna kontrola bol použitý neviazaný trijódtyronín, aktívna forma tyroidného hormónu, v koncentrácii  $20 \text{ nmol.l}^{-1}$ . Táto hodnota bola stanovená experimentálne, pri vyšších koncentráciách nedochádza k výraznému nárastu transkripčnej aktivity TR. Táto hodnota je výrazne vyššia ako referenčné rozmedzie T3 v krvnej plazme, ktoré je u zdravých jedincov  $1,21 - 2,29 \text{ nmol.l}^{-1}$ , z toho voľný T3 tvorí len  $2,2 - 5,3 \text{ pmol.l}^{-1}$  (Dastych *et al.*, 2015). Použitím takto vysokej koncentrácie bola zaistená 100 % aktivácia tyroidného receptora ligandom T3.

Z výsledkov experimentov vyplýva, že herbicídy triklopyr a dikamba nie sú ani agonistami, ani antagonistami tyroidného receptora. Pozorovaný bol však synergický efekt týchto herbicídov po pôsobení s T3. Nárast transkripčnej aktivity TR nebol závislý od koncentrácie, vo všetkých skúmaných koncentráciách bol približne rovnaký, v prípade triklopyru činil približne 14 %, v prípade dikamby 17 %. Zvýšená transkripčná aktivita TR bola pozorovaná aj pri najnižšej použitej koncentrácii, preto by sme mohli zaradiť tieto 2 herbicídy medzi potencionálne THDC. Podľa epidemiologických štúdií je dikamba spájaná so zvýšenou pravdepodobnosťou vzniku hypotyreoidizmu (Goldner *et al.*, 2013), na ktorom môže mať podiel aj toto pozorované synergické pôsobenie. Sú však potrebné ďalšie výskumy, ktoré by preukázali vplyv tohto zvýšenia transkripcie na génovú expresiu a na celý tyroidný metabolizmus.



Zaujímavé sú výsledky v prípade herbicídu 2,4,5-T. U žiadnej z použitých koncentrácií nebola pozorovaná žiadna štatisticky významná zmena v transkripčnej aktivite tyroidného receptora v porovnaní s kontrolami. Tento herbicíd nie je ani agonistom, ani antagonistom TR. Nedávne výskumy preukázali, že herbicíd 2,4,5-T sa viaže na TR $\beta$ 1 izoformu tyroidného receptora (Zhang *et al.*, 2016). Tento výskum však nebol skúmaný na živých bunkách, preukázaná bola len schopnosť herbicídu 2,4,5-T viazať sa na LBD doménu TR $\beta$ 1 izoformy tyroidného receptora. Výsledky mojich experimentov naznačujú, že táto väzba neovplyvňuje transkripčnú aktivitu tyroidného receptora. 2,4,5-T sa viaže okrem TR aj na TTR (Zhang *et al.*, 2015), čo môže mať negatívny vplyv na tyroidný metabolizmus, poprípade zvýšenú pravdepodobnosť vzniku hypotyroidizmu, ktorý je s týmto herbicídom spájaný (Goldner *et al.*, 2013). Nie je však možné túto hypotézu potvrdiť výskumom v *in vitro* podmienkach, keďže u bunkových línií nedochádza k transportu T3 pomocou TTR.

U herbicídov alachlór, paraquat a diquat sa výrazne prejavilo agonistické pôsobenie a synergický efekt na tyroidný receptor v oboch prípadoch pri najvyšších použitých koncentráciách (10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). V prípade agonistického pôsobenia bol pozorovaný nárast transkripčnej aktivity TR o 20 – 25 % v porovnaní s negatívnou kontrolou, v prípade pôsobenia herbicídov s T3 činil tento nárast 32 – 45 % v porovnaní s pozitívnou kontrolou. Tieto koncentrácie sú príliš vysoké a v prostredí sa nevyskytujú, preto pravdepodobne nepredstavujú hrozbu. Pre dosiahnutie takejto vysokej koncentrácie v organizme je potrebné, aby bol herbicíd úmyselne (Sun *et al.*, 2016) alebo neúmyselne (Davarpanah *et al.*, 2015) požitý či inou formou podaný do organizmu.

U herbicídu 2,4-D sa neprejavilo ani agonistické, ani antagonistické pôsobenie na TR pri žiadnej z použitých koncentrácií, mierny synergický efekt bol pozorovaný v prípade koncentrácií 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Tento nárast transkripčnej aktivity činil len približne 9 %. V nedávnej dobe bolo poukázané na schopnosť 2,4-D viazať sa na TR (Zhang *et al.*, 2016), avšak pri oveľa vyššej koncentrácii (460  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) než bola použitá v mojich experimentoch, takže v mojich experimentoch pozorovaná nebola. Väzba 2,4-D na TR v prítomnosti T3 v tejto štúdii nebola skúmaná. Epidemiologické štúdie spájajú 2,4-D so zvýšenou pravdepodobnosťou vzniku hypotyroidizmu (Goldner *et al.*, 2013), čo môže byť v kontexte celého metabolizmu spojené s týmto pozorovaným synergickým efektom. Sú potrebné ďalšie výskumy, ktoré by skúmali vplyv uvedenej zvýšenej transkripčnej aktivity na génovú expresiu.

## 6 ZÁVER

Bol testovaný vplyv vybraných herbicídov (triklopyru, 2,4-D, 2,4,5-T, dikamby, diquat, paraquat a alachlór) na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora stabilne transfekovanej bunkovej línie PZ-TR.

V teoretickej časti bakalárskej práce bola popísaná štruktúra tyroidných hormónov, tyroidného receptora a mechanizmus regulácie transkripcie týmto systémom. Ďalej boli bližšie charakterizované použité herbicídy, pričom bol kladený dôraz na ich toxické účinky na živé organizmy. Záver bol venovaný negatívnym účinkom herbicídov na tyroidný metabolizmus.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bolo metódou MTT stanovené cytotoxické pôsobenie jednotlivých herbicídov v koncentráciách 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Z dôvodu zvýšenej cytotoxicity herbicídov v koncentráciách 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  boli tieto koncentrácie vylúčené z ďalších experimentov a boli nahradené koncentraciami 0,01  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,001  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Agonistické a antagonistické pôsobenie herbicídov na transkripčnú aktivitu tyroidného receptora bolo stanovené metódou Luciferase Gene Reporter Assay. Ako pozitívna kontrola bolo použité T3. Najvýraznejší nárast transkripčnej aktivity bol pozorovaný pri skúmaní agonistického aj antagonistického pôsobenia po pôsobení herbicídov alachlór, diquat a paraquat v koncentrácii 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Herbicídy triklopyr a dikamba spôsobili pri pôsobení s T3 mierne zvýšenú transkripčnú aktivitu, ktorej nárast bol konštantný u všetkých použitých koncentrácií. Žiadne ovplyvnenie transkripčnej aktivity nebolo pozorované v prípade herbicídu 2,4,5-T. Herbicíd 2,4-D po pôsobení s T3 mierne zvyšoval transkripčnú aktivitu pri použitých koncentráciách 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Výsledky tejto bakalárskej práce poukazujú na synergické pôsobenie herbicídov triklopyr, dikamba, 2,4-D, alachlór, paraquat a diquat s T3 na tyroidný receptor. Toto zvýšenie transkripčnej aktivity tyroidného receptora môže mať za následok narušenie tyroidného metabolizmu a tým ovplyvnenie celého organizmu. Sú potrebné ďalšie výskumy, ktoré by sa zaoberali expresiou génov, ktoré sú na tento receptor viazané.

## 7 LITERATÚRA

- Acquavella J.F., Delzell E., Cheng H., Lynch C.F., Johnson G. (2004): Mortality and cancer incidence among alachlor manufacturing workers 1968-99. *Occupational and Environmental Medicine* **61**, 680-685.
- Amenya H.Z., Tohyama C., Ohsako S. (2016): Dioxin induces Ahr-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver. *Scientific Reports* **6**: 34989. <http://www.nature.com/articles/srep34989>.
- Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J. (1995): In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species. DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* **104**, 129-140.
- Baskin H.J., Cobin R.H., Duick D.S., Gharib H., Guttler R.B., Kaplan M.M., Segal R.L. (2002): American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocrinology Practise* **8**, 457-469.
- Battaglin W., Furlong E., Burkhardt M., Peter C. (2000): Occurrence of Sulfonylurea, Sulfonamide, Imidazolinone, and Other Herbicides in Rivers, Reservoirs and Ground Water in the Midwestern United States, 1998. *Science of the Total Environment* **248**, 123-133.
- Behrens M.R., Mutlu N., Chakraborty S., Dumitru R., Jiang W.Z., LaVallee B.J., Herman P.L., Clemente T.E., Weeks D.P. (2007): Dicamba Resistance: Enlarging and Preserving Biotechnology-Based Weed Management Strategies. *Science* **316**, 1185-1188.
- Bianco C.T., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. (2002): Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* **23**, 38-89.
- Bismuth C., Garnier R., Baud F.J., Muszynski J., Keyes C. (1990): Paraquat poisoning; an overview of the current status. *Drug Safety* **5**, 243-251.
- Bohnenblust E., Egan J.F., Mortensen D., Tooker J. (2013): Direct and Indirect Effects of the Synthetic Auxin Herbicide Dicamba on Two Lepidopteran Species. *Environmental Entomology* **42**, 586-594.
- Bongiovanni B., DeLorenzi P., Ferri A., Konjuh C., Rassetto M., Evangelista de Duffard A.M., Cardinali D.P., Duffard R. (2007): Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicity Research* **11**, 93-99.
- Bukowska B. (2004): 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role of glutathione. *CellBiology International* **28**, 557-563.
- Burnside J., Darling D.S., Chin W.W. (1990): A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements. *Journal of biological chemistry* **265**, 2500-2504.
- Carmichael N.G., Nolan R.J., Perkins J.M., Davies R., Warrington S.J. (1989): Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. *Human Toxicology* **8**, 431-437.
- Cessna A.J., Grover R., Waite D.T. (2002): Environmental fate of triclopyr. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **174**, 19-48.
- Chan B.S., Seale J.P., Duggin G.G. (1997): The mechanism of excretion of paraquat in rats. *Toxicology Letters* **90**, 1-9.
- Chen T., Mou Y., Tan J., Wei L., Qiao Y., Wei T., Xiang P., Peng S., Zhang Y., Huang Z., Ji H. (2015): The protective effect of CDDO-Me on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology* **25**, 55-64.
- Cheng Y., Ekker M., Chan H.M. (2014): Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **112**, 7-14.
- Choi J.S., Jou S.S., Oh M.H., Kim Y.H., Park M.J., Gil H.W., Song H.Y., Hong S.Y. (2013): The dose of cyclophosphamide for treating paraquat-induced rat lung injury. *The Korean Journal of Internal Medicine* **28**, 420-427.

- Conte L.O., Schenone A.V., Alfano O.M. (2016): Photo-Fenton degradation of the herbicide 2,4-D in aqueous medium at pH conditions close to neutrality. *Journal of Environmental Management* **170**, 60-69.
- Cook C.B., Kakucska I., Lechan R.M., Koenig R.J. (1992): Expression of thyroid hormone receptor  $\beta 2$  in rat hypothalamus. *Endocrinology* **130**, 1077-1079.
- Dai G., Levy O., Carrasco N. (1996): Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379**, 458-460.
- Dasty M., Breinek P. et al. (2015): *Klinická biochemie – bakalářský obor Zdravotní laborant*. 3. vydání, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 253 strán.
- Davarpanah M.A., Hosseinzadeh F., Mohammadi S.S. (2015): Treatment Following Intoxication With Lethal Dose of Paraquat: A Case Report and Review of Literature. *Iran Red Crescent Medical Journal* **1**: e19373. [http://ircmj.com/?page=article&article\\_id=19373](http://ircmj.com/?page=article&article_id=19373).
- De Jong F.J., Masaki K., Chen H., Remaley A.T., Breteler M.M., Petrovitch H., White L.R., Launer L.J. (2009): Thyroid function, the risk of dementia and neuropathological changes: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiology of Aging* **30**, 600-6.
- de Oliveira M.R., Ferreira G.C., Schuck P.F. (2015): Protective effect of carnosic acid against paraquat induced redox impairment and mitochondrial dysfunction in SH SY5Y cells: Role for P13K/AKT/NRF2 pathway. *Toxicology in Vitro* **32**, 41-54.
- Dearfield K.L., McCarroll N.E., Protzel A., Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.D. (1999): A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloroacetanilides and related compounds. *Mutation Research* **443**, 183-221.
- Denizot F., Lang R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**, 271-277.
- European Commission EU Pesticide Database: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> (31.1.2017)
- Farrington J., Ebert M., Land E.J., Fletcher K. (1973): Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **314**, 372-381.
- Felsot A.S., Unsworth J.B., Linders J.B.H.J., Roberts G., Rautman D., Harris C., Carazo E. (2011): Agrochemical spray drift; assessment and mitigation -- a review. *Journal of Environmental Science and Health* **46**, 1-23.
- Fondell J.D., Ge J., Roeder R.G. (1996): Ligand induction of transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8329-8333.
- Fraser F.C. (2009): Does paternal exposure to Agent Orange cause birth defects? *American Journal of Medical Genetics. Part A* **149A**, 835-836.
- Freitas J., Cano P., Craig-Veit C., Goodson M.L., Furlow J.D., Murk A.J. (2011): Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicology in Vitro* **25**, 257-266.
- Freydier L., Lundgren J.G. (2016): Unintended effects of the herbicides 2,4-D and dicamba on lady beetles. *Ecotoxicology* **25**, 1270-1277.
- Fussell K.C., Udasin R.G., Gray J.P., Mishin V., Smith P.J., Heck D.E., (2011): Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radical Biology and Medicine* **50**, 874-882.
- Genter M.B., Burman D.M., Dingeldein M.W., Clough I., Bolon B. (2000): Characterization of cell proliferation and immunohistochemical markers of alachlor-induced olfactory mucosal tumors in the Long-Evans rat. *Toxicologic Pathology* **28**, 770-781.
- Genter M.B., Burman D.M., Vijayakumar S., Ebert C.L., Aronow B.J. (2002): Genomic analysis of alachlor-induced oncogenesis in rat olfactory mucosa. *Physiological Genomics* **12**, 35-45.

- Goldner W.S., Sandler D.P., Yu F., Hoppin J.A., Kamel F., LeVan T.D. (2010): Pesticide Use and Thyroid Disease Among Women in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology* **171**, 455-464.
- Goldner W.S., Sandler D.P., Yu F., Shostrom V., Hoppin J.A., Kamel F., LeVan T.D. (2013): Hypothyroidism and pesticide use among male private pesticide applicators in the agricultural health study. *Journal of occupational and environmental medicine* **70**, 3536-3544.
- Gosselin N.H., Brunet R.C., Carrier G., Dosso A. (2005): Worker exposures to triclopyr: risk assessment through measurements in urine samples. *The Annals of Occupational Hygiene* **49**, 415-422.
- Green S., Kumar V., Theulaz I., Wahli W., Chambon P. (1988): The N-terminal DNA-binding "zinc finger" of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *The EMBO Journal* **7**, 3037-3044.
- Grizard G., Ouchchane L, Roddier H., Artonne C., Sion B., Vasson M.-P., Janny L. (2007): In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology* **23**, 55-62.
- Haddow J.E., Palomaki G.E., Allan W.C., Williams J.R., Knight G.J., Gagnon J., O'Heir C.E., Mitchell M.L., Hermos R.J., Waisbren S.E., Faix J.D., Klein R.Z. (1999): Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *The New England Journal of Medicine* **341**, 549-555.
- Hamers T., Kamstra J.H., Sonneveld E., Murk A.J., Kester M.H., Andersson P.L., Legler J., Brouwer A. (2006): In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicology and Science* **92**, 157-173.
- Hashimoto K., Yamada M., Matsumoto S., Monden T., Satoh T., Mori M. (2006): Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* **147**, 4292-4302.
- Hodin R.A., Lazar M.A., Wintman B.I., Darling D.S., Koenig R.J., Larsen P.R., Moore D.D., Chin W.W. (1989): Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary –specific. *Science* **244**, 76-79.
- Hodin R.A., Lazar M.A., Chin W.W. (1990): Differential and tissue-specific regulation of multiple rat *c-erbA* messenger RNA species by thyroid hormone. *The Journal of Clinical Investigation* **85**, 101-105.
- Hörlein A.J., Näär A.M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Söderström M., Glass C.K. (1995): Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Illés P., Brtko J., Dvořák Z. (2015): Development and Characterization of a Human Reporter Cell Line for the Assessment of Thyroid Receptor Transcriptional Activity: A Case of Organotin Endocrine Disruptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 7074-7083.
- Jones K. E., Brubaker J. H., Chin W. W. (1994): Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action. *Endocrinology* **134**, 543-548.
- Kale V.M., Miranda S.R., Wilbanks M.S., Meyer S.A. (2008): Comparative cytotoxicity of alachlor, acetochlor, and metolachlor herbicides in isolated rat and cryopreserved human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **22**, 41-50.
- Katsumata H., Kaneco S., Suzuki T., Ohta K., Yobiko Y. (2006): Photo.Fenton degradation of alachlor in the presence of citrate solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* **180**, 38-45.
- Kelner M.J., Bagnell R., Hale B., Alexander N.M. (1988): Methylene blue competes with paraquat for reduction by flavo-enzymes resulting in decreased superoxide production in the presence of heme proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **262**, 422-426.
- Kogan E.A., Rozhkova E.B., Seredin V.P., Paltsev M.A. (2006): Prognostic value of the expression of thyroglobulin and oncomarkers (p53, EGFR, ret-oncogene) in different types of papillary carcinoma of the thyroid: clinicomorphological and immunohistochemical studies. *Arkhiv Patologii* **68**, 8-11.
- Krueger J.P., Butz R.G., Atallah Y.H., Cork D.J. (1989): Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**, 534-538.

- Lanctôt C., Navarro-Martín L., Robertson C., Park B., Jackman P., Pauli B.D., Trudeau V.L. (2014): Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* **154**, 291-303.
- Lazar M. (1993): Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews* **14**, 348-399.
- Lin K.H., Lee H.Y., Shih C.H., Yen C.C., Chen S.L., Yang R.C., Wang C.S. (2003): Plasma protein regulation by thyroid hormone. *The Journal of Endocrinology* **179**, 367-377.
- Lock E.A., Ishmael J. (1979): The acute toxic effects of paraquat and diquat on the rat kidney. *Toxicology and Applied Pharmacology* **50**, 67-76.
- Lopez-Espinosa M.J., Mondal D., Armstrong B., Bloom M.S., Fletcher T. (2012): Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant. *Environment Health Perspect* **120**, 1036-1041.
- Marouani N., Tebourbi O., Cherif D., Hallegue D., Yacoubi M.T., Sakly M., Benkhalifa M., Ben Rhouma K. (2017): Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research International* **24**, 519-526.
- McCormack A-L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B., Thiffault C., Langston J.W., Cory-Slechta D.A., Di Monte D.A. (2002): Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of Disease* **10**, 119-127.
- Meerts I.A., van Zanden J.J., Luijckx E.A., van Leeuwen-Bol I., Marsh G., Jakobsson E., Bergman A., Brouwer A. (2000): Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences* **56**, 95-104.
- Milligan P.W., Häggblom M.M. (1999): Biodegradation and biotransformation of dicamba under different reducing conditions. *Environmental Science & Technology* **33**, 1224-1229.
- Mitsuhashi T.G., Tennyson G.E., Nikodem V.M. (1988): Alternative splicing generates messages encoding rat *c-erb* proteins that do not bind thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 5804-5808.
- Mitsuhashi T.G., Nikodem V.M. (1989): Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat  $\alpha$ -thyroid hormone receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 8900-8904.
- Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T., Saijo M., Kanamoto N., Hataya Y., Shimatsu A., Kuzuya H., Nakao K. (2002): Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 5185-5190.
- Murk A.J., Rijntjes E., Blaauboer B. J., Clewell R., Crofton K. M., Dingemans M. M., Furlow J. D., Kavlock R., Kohrle J., Opitz R., Traas T., Visser T. J., Xia M., Gutleb A. C. (2013): Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for identification of thyroid hormone disrupting chemicals. *Toxicology in Vitro* **27**, 1320-1346.
- Ngo A.D., Taylor R., Roberts C.L. (2010): Paternal exposure to Agent Orange and spina bifida: a meta-analysis. *European Journal of Epidemiology* **25**, 37-44.
- Nisar R., Hanson P.S., He L., Taylor R.W., Blain P.G., Morris C.M. (2015): Diquat causes caspase-independent cell death in SH-SY5Y cells by production of ROS independently of mitochondria. *Archives of Toxicology* **89**, 1811-1825.
- Novaes R.D., Goncalves R.V., Cupertino M.C., Santos E.C., Bigonha S.M., Fernandes G.J., Maldonado I.R., Natali A.J. (2016): Acute paraquat exposure determines dose-dependent oxidative injury of multiple organs and metabolic dysfunction in rats: impact on exercise tolerance. *International Journal of Experimental Pathology* **97**, 114-124.
- Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira M.C. (1995): Thiols metabolism is altered by the herbicides paraquat, dinoseb and 2,4-D: a study in isolated hepatocytes. *Toxicology letters* **81**, 115-123.
- Patterson A.T., Kaffenberger B.H., Keller R.A., Elston D.M. (2015): Skin diseases associated with Agent Orange and other organochlorine exposures. *Journal of the American Academy of Dermatology* **74**, 143-170.
- Petty D.G., Getsinger K.D., Woodburn K.B. (2003): A Review of the Aquatic Environmental Fate of Triclopyr and its Major Metabolites. *Journal of Aquatic Plant Management* **41**, 69-75.

- Piccoli C., Cremonese C., Koifman R.J., Koifman S., Freire C. (2016): Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. *Environmental Research* **151**, 389-398.
- Powles S.B., Yu Q. (2010): Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 317-347.
- Racek J. et al. (2006): *Hormony štítné žlázy*. In: *Klinická biochemie*. 2. vydání, (Houdek L.), Galén, Praha, Česká republika, 148-152.
- Rose M.S., Smith L.L., Wyatt I. (1974): Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. *Nature* **252**, 314-315.
- Ruiz de Arcaute C., Soloneski S., Larramendy M.L. (2016): Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **128**, 222-229.
- Sauerhoff M.W., Braun W.H., Blau G.E., Gehring P.J. (1977): The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology* **8**, 3-11.
- Sewalk C.J., Brewer G.L., Hoffman D.J. (2001): Effects of diquat, an aquatic herbicide, on the development of mallard embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **1**, 33-45.
- Shaner D.L. (2000): The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. *Pest Management Science* **56**, 320-326.
- Shimada H., Hirai K., Simamura E., Pan J. (1998): Mitochondrial NADH-quinone oxidoreductase of the outer membrane is responsible for paraquat cytotoxicity in rat livers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **351**, 75-81.
- Shupnik M.A., Ridgway E.C., Chin W.W. (1989): Molecular biology of thyrotropin. *Endocrine Reviews* **10**, 459-475.
- Simon T.M., Kopish A., Kopish K. (2008): Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes* **21**, 23 - 26.
- Strieder T.G., Prummel M.F., Tijssen J.G., Endert E., Wiersinga W.M. (2003): Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology* **59**, 396-401.
- Sun I.O., Shin S.H., Yoon H.J., Lee K.Y. (2016): Predicting the probability of survival in acute paraquat poisoning. *Kidney Research and Clinical Practice* **35**, 102-106.
- Suvarchala G., Philip G.H. (2016): Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. *Environmental Science and pollution research international* **23**, 15515-15523.
- Tan Z.S., Vasani R.S. (2009): Thyroid function and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* **16**, 503-507.
- Tan Z., Zhou J., Chen H., Zou Q., Weng S., Luo T., Tang Y. (2016): Toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human sperm function in vitro. *The Journal of Toxicological Sciences* **41**, 543-549.
- Tian Z.G., Ji Y., Yan W.J., Xu C.Y., Kong Q.Y., Han F., Zhao Y., Pang Q.F. (2013): Methylene blue protects against paraquat-induced acute lung injury in rats. *International Immunopharmacology* **17**, 309-313.
- Tiedje J.M., Hagedorn M.L. (1975): Degradation of Alachlor by a Soil Fungus, *Chaetomium Globosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**, 77-81.
- U.S. Environmental Protection Agency 2,4-D: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d> (30.1.2017).
- U.S. Environmental Protection Agency Registration of Dicamba for Use on Genetically Engineered Crops: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/registration-dicamba-use-genetically-engineered-crops#q1> (30.1.2017).
- U.S. Environmental Protection Agency Paraquat Dichloride: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/paraquat-dichloride> (30.1.2017).
- Vale J.A., Meredith T.J., Buckley B.M. (1987): Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Human Toxicology* **6**, 41-47.
- Vismara C., Battista V., Vailati G.I., Bacchetta R. (2000): Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology* **49**, 171-179.
- Voitkevich A.A. (1945): Role of the thyroid gland hormone in growth and differentiation of *Phalacrocorax carbo* L. *Izvestiia Akademii Nauk SSSR. Seriya biologicheskaya* **1**, 27-48.

- Vonier P.M., Crain D.A., McLachlan J.A., Guillette L.J. Jr., Arnold S.F. (1996): Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environmental Health Perspectives* **104**, 1318-1322.
- Wang S., Zhu X., Xiong L., Zhang Y., Ren J. (2016): Toll-like receptor 4 knockout alleviates paraquat-induced cardiomyocyte contractile dysfunction through an autophagy-dependent mechanism. *Toxicology Letters* **257**, 11-22.
- Wang S., Zhu X., Xiong L., Ren J. (2017): Ablation of Akt2 prevents paraquat-induced myocardial mitochondrial injury and contractile dysfunction: Role of Nrf2. *Toxicology Letters* **269**, 1-14.
- Weiss J.M., Andersson P.L., Lamoree M.H., Leonards P.E., van Leeuwen S.P., Hamers T. (2009): Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicological Sciences* **109**, 206-216.
- Williams G.R. (2000): Cloning and characterization of two novel thyroid receptor beta isoforms. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 8329-8342.
- Wu K.C., Zhang Y., Klaassen C.D. (2012): Nrf2 protects against diquat-induced liver and lung injury. *Free radical research* **46**, 1220-1229.
- Yen P. (2001): Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological Reviews* **81**, 1097-1142.
- Zafeiridou G., Geronikaki A., Papaefthimiou C., Tryfonos M., Kosmidis E.K., Theophilidis G. (2006): Assessing the effects of the three herbicides acetochlor, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the compound action potential of the sciatic nerve of the frog (*Rana ridibunda*). *Chemosphere* **65**, 1040-1048.
- Zaidi S.S.A., Bhatnagar V.K., Gandhi S.J., Shah M.P., Kulkarni P.K., Saiyed H.N. (2000): Assessment of thyroid function in pesticide formulators. *Human & Experimental Toxicology* **19**, 497-501.
- Zhang J., Kamstra J. H., Ghorbanzadeh M., Weiss J. M., Hamers T., Andersson P. L. (2015): In Silico Approach To Identify Potential Thyroid Hormone Disruptors among Currently Known Dust Contaminants and Their Metabolites. *Environmental science & technology* **49**, 10099-10107.
- Zhang J., Li Y., Gupta A.A., Nam K., Andersson P. L. (2016): Identification and Molecular Interaction Studies of Thyroid Hormone Receptor Disruptors among Household Dust Contaminants. *Chemical Research in Toxicology* **29**, 1345-1354.
- Zhang J.Q., Gao B.W., Wang J., Wang X.W., Ren Q.L., Chen J.F., Ma Q., Xing B.S. (2016): Chronic Exposure to Diquat Causes Reproductive Toxicity in Female Mice. *PLoS One* **11**:e0147075. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147075>.
- Zhang X.K., Wills K.N., Graupner G., Tzukerman M., Hermann T., Pfahl M. (1991): Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles. *The New Biology* **3**, 169-181.
- Zoeller R.T. (2007): Environmental chemical impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid* **17**, 811-817.



## 5 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
2,4,5-T	2,4,5-trichlorofenoxyoctová kyselina
AhR	aryl uhl'ovodíkový receptor
ALA	alachlór
ATP	adenozín-5'-trifosfát
CoA	koenzým A
DIC	dikamba
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMO	dikamba monooxygenáza
DMSO	dimetylsulfoxid
DQ	diquat dibromid
DTT	ditiotreitól
EC <sub>50</sub>	polovičná maximálna efektívna koncentrácia
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FBS	fetálne bovinné sérum
FBS-CS	hormonálne inaktivované fetálne bovinné sérum
GSH	glutatión
GSSG	glutatión disuldid
IC <sub>50</sub>	polovičná inhibičná koncentrácia
LBD	doména tyroidného receptora viažuca ligand
MTT	metyltetrazóliová soľ
NADH	nikotínamidadenín dinukleotid
NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NCoR	jadrový receptorový korepresor
NOEL	no-observed-effect level
Nrf2	nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2
PBDE	polybrómované difenylétery
PBS	fosfátový pufor
POR	NADPH-cytochróm-P450- reduktázou
PRQ	paraquat dichlorid
RLBA	radio-ligand binding assay
ROS	reaktívne kyslíkové radikály

RXR	retinoidný X receptor
SREBP-1c	sterolový responzívny element viažuci proteín 1c
T3	3,5,3'-trijódyronín
T4	tyroxín
TBG	globulín viažuci tyroidné hormóny
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín
TCP	3,5,6-trichloropyridinol
TCR	triklopyr
TH	tyroidné hormóny
THDC	chemikália narúšajúca tyroidný metabolizmus
TLR4	toll-like receptor 4
TPO	tyreoperoxidáza
TR	tyroidný receptor
TRAP	pomocný proteín tyroidného receptora
TRE	tyroidný responzívny element
TRH	tyrotropín uvoľňujúci hormón tyreoliberín
TSH	tyroidný stimulujúci receptor
TTR	transtyretín
USEPA	U.S.Environmental Protection Agency