



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



# Ekotoxikologie

\*Molekulární a buněčná toxikologie\*

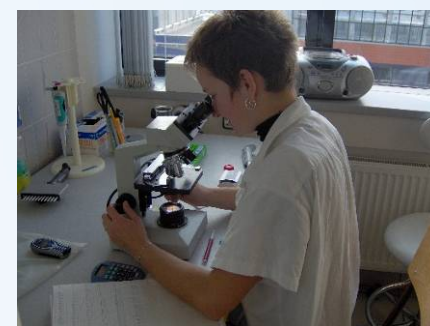
\*Toxicita látek ve vodních ekosystémech a ve vzduchu\*

Luděk Bláha, Klára Hilscherová, Pavel Babica a kol.

RECETOX PŘF MU Brno  
[www.recetox.cz](http://www.recetox.cz)

# Bakalářky a diplomky

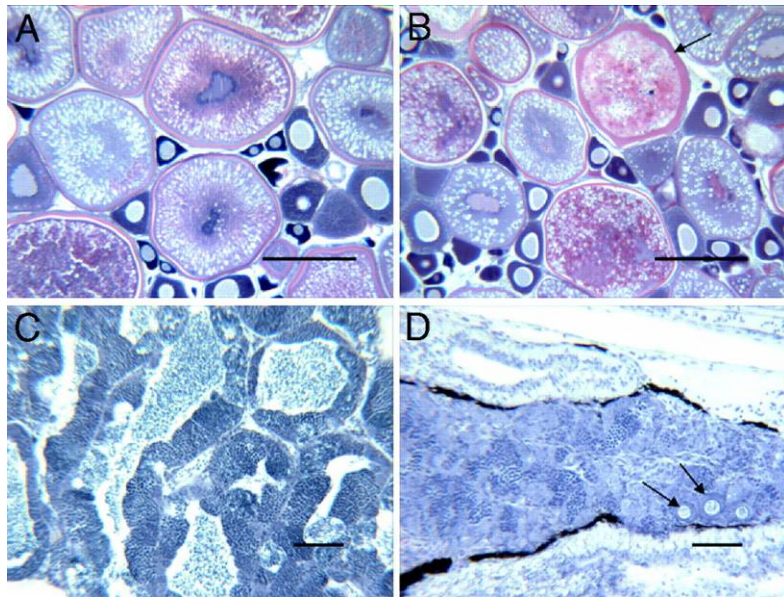
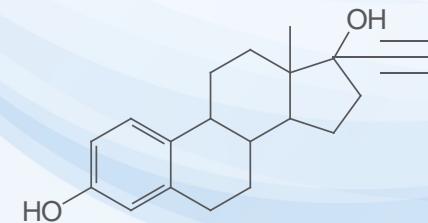
- **Endokrinní disruptory**
  - „nové typy“ znečištění - léčiva, vonné látky, UV filtry, pesticidy
  - látky s vlivem na rozmnožování (reprodukční toxicita)
  - látky s vlivem na časný vývoj organismů (embryotoxicita)
  - látky ovlivňující kmenové buňky (karcinogenita)
- **Sinice a jejich toxiny**
- **Směsi chemických látek**
- **Kmenové buňky jako cíl toxických látek**
  
- **Hlavní otázky:**
  - Hladiny a efekty - kde jsou?, v jakých koncentracích?
  - Jakým mechanismem působí? **v buňkách in vitro**
  - Účinky na vodní organismy? **in vivo**
  - Jaké jsou možnosti odstraňování?
  - Lze předpovídat (modelovat) účinky?
  - Možnosti sledování (estrogenita, senzory, kity pro praxi)?
  - Jak změnit legislativu
  
- **Zapojení studentů**
  - vždy řešení aktuálních vědeckých otázek ... spojených s reálnými problémy znečištění vody, vzduchu, potravin atd



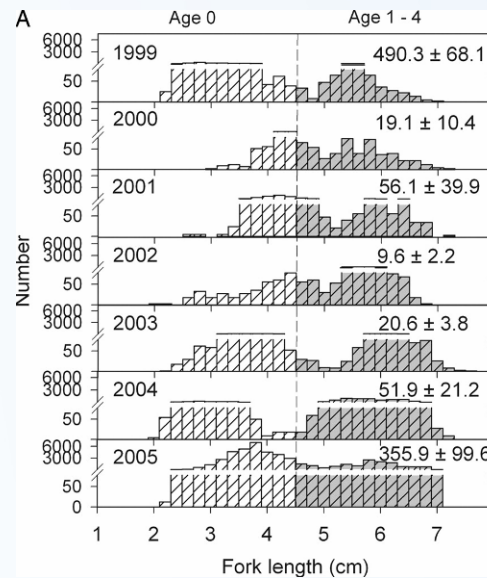
Kidd, K.A. et al. 2007. **Collapse of a fish population** following exposure to **a synthetic estrogen**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(21):8897-8901



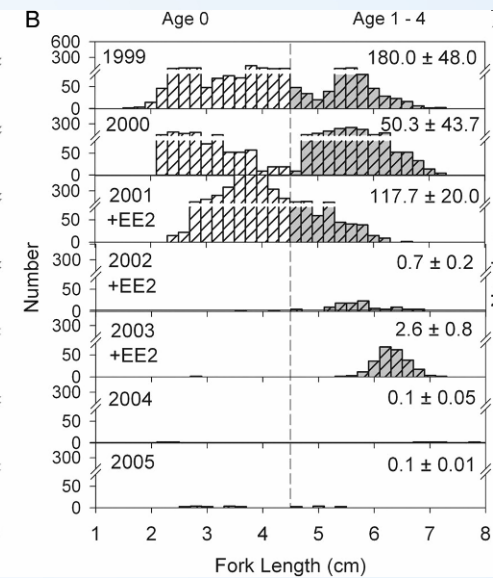
5 ng/L (!)  
7 years



### Controls



### + Ethinylestradiol





# Reálný problém endokrinní disrupce v ČR

## Nádrž Pilňok

- Region Ostrava-Karviná



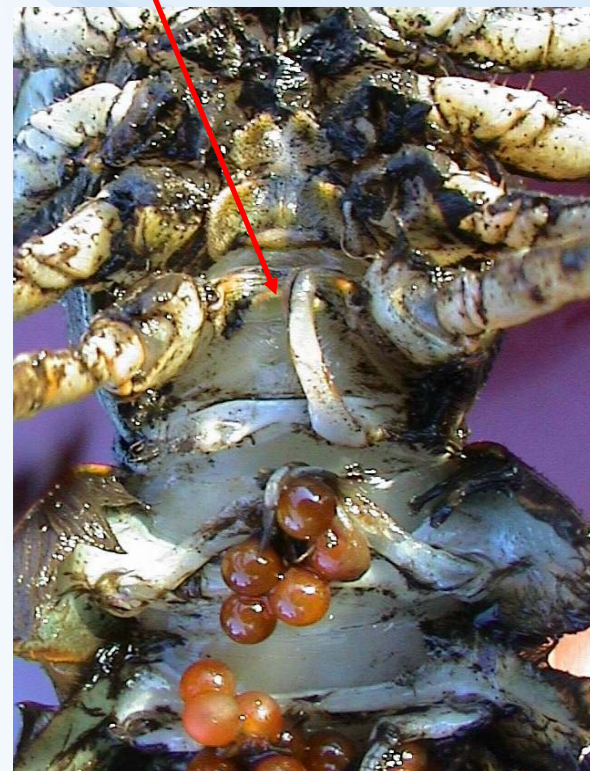
## Rak bahenní

*Pontastacus leptodactylus*

## INTERSEX

Samice s mužskými gonopody?

Samec s vajíčky?



# Integrované hodnocení



## Sedimenty

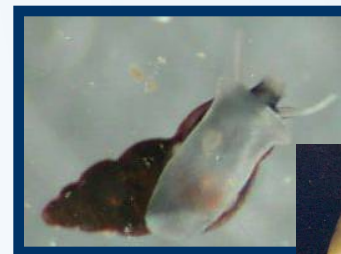
- Pilňok
- Referenční lokality  
*Karviná, Steinlach (Německo)*

## Extrakce

Chemické  
analýzy

*In vitro*  
účinky

*In vivo* účinky





# Chemical contamination ?



## Organics (ng/g d.w.)

	<b>Pilnok</b>	Karvina	Steinlach	Dřevnice	Morava
<b>16 PAHs</b>	<b>18420</b>	<b>10075</b>	<b>422</b>	<b>9427</b>	<b>5263</b>
$\Sigma$ PCBs	18.7	6.7	0.86	14.8	13.6
$\Sigma$ DDTs	1.7	2.8	0.33	5.8	22.4

- High concentrations of PAHs in PILNOK
- Other POPs (PCBs, OCPs) ~ low-average



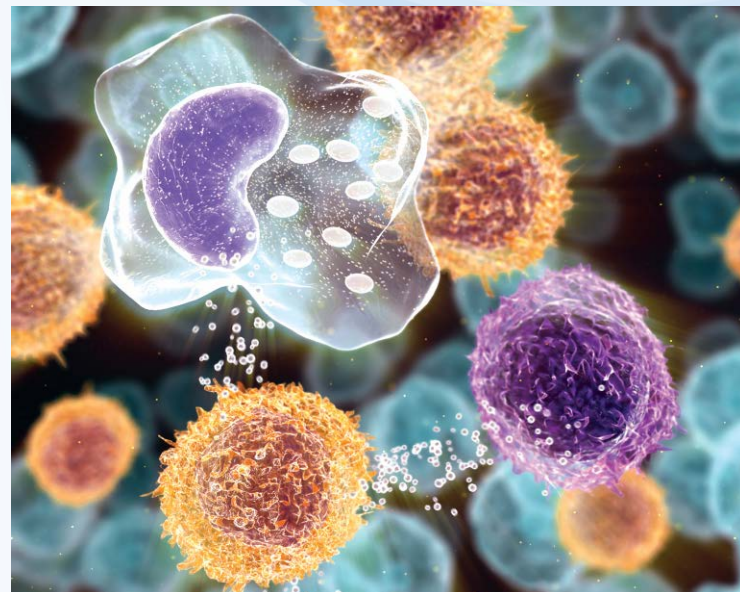
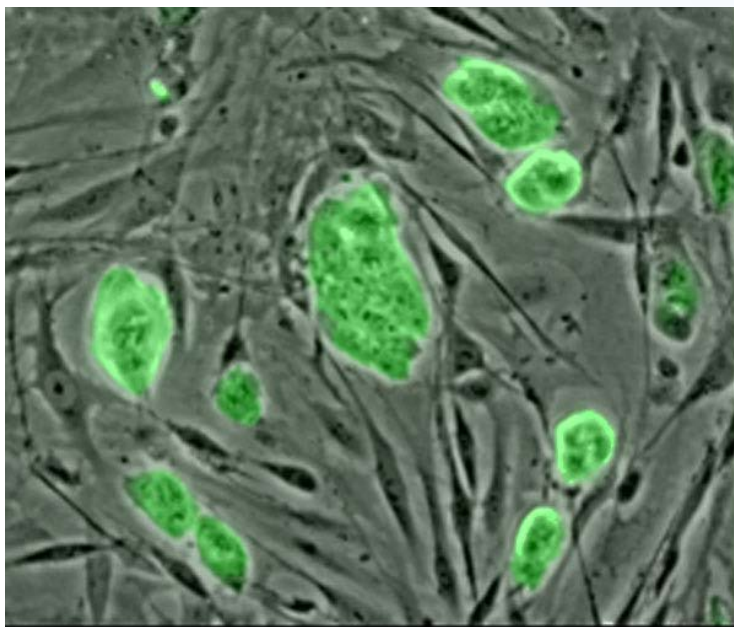
## Metals ( $\mu\text{g/g}$ d.w.)

	<b>Pilnok</b>	Karvina	Steinlach
<b>Pb</b>	47	<b>109</b>	3.5
<b>Cu</b>	29.1	31	2.9
<b>Zn</b>	45.7	<b>86</b>	21.5





## Effects *in vitro* ?



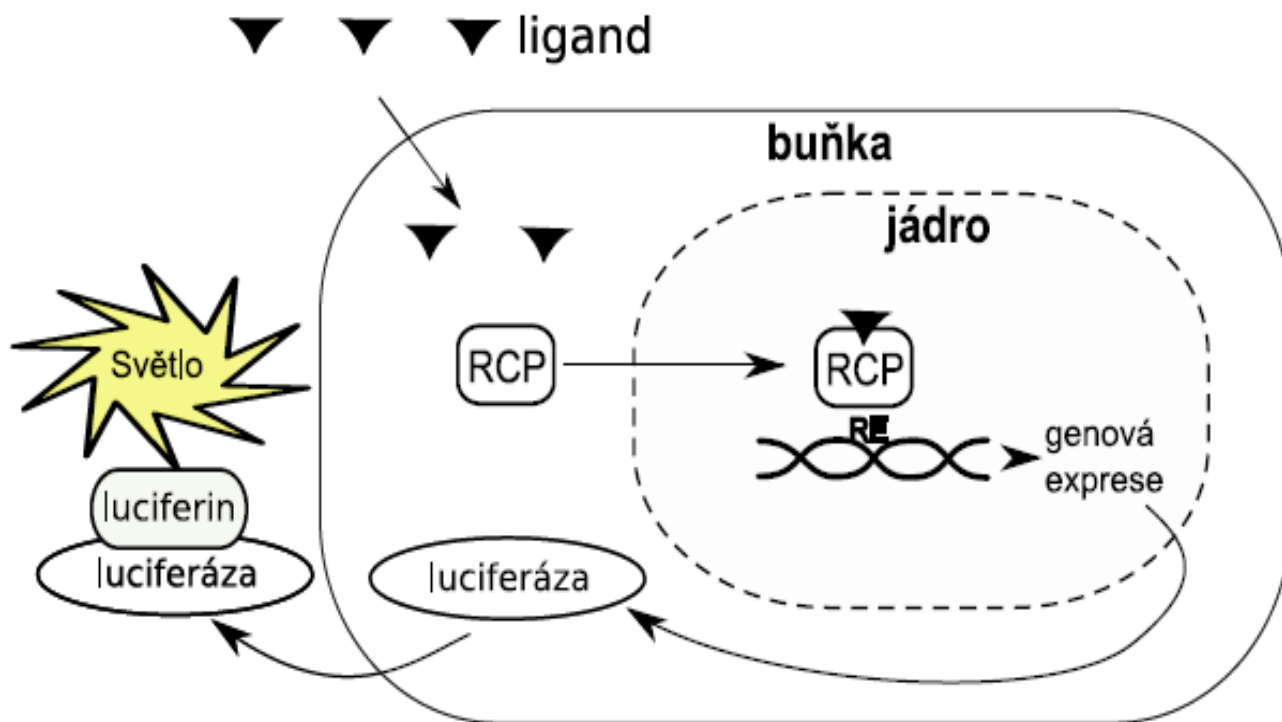
# Nástroje pro sledování endokrinní disrupce - aktivace jaderných receptorů -

Reporterové (GMO) testy s luciferázou  
*savčí buňky, kvasinky, umělé in vitro systémy*

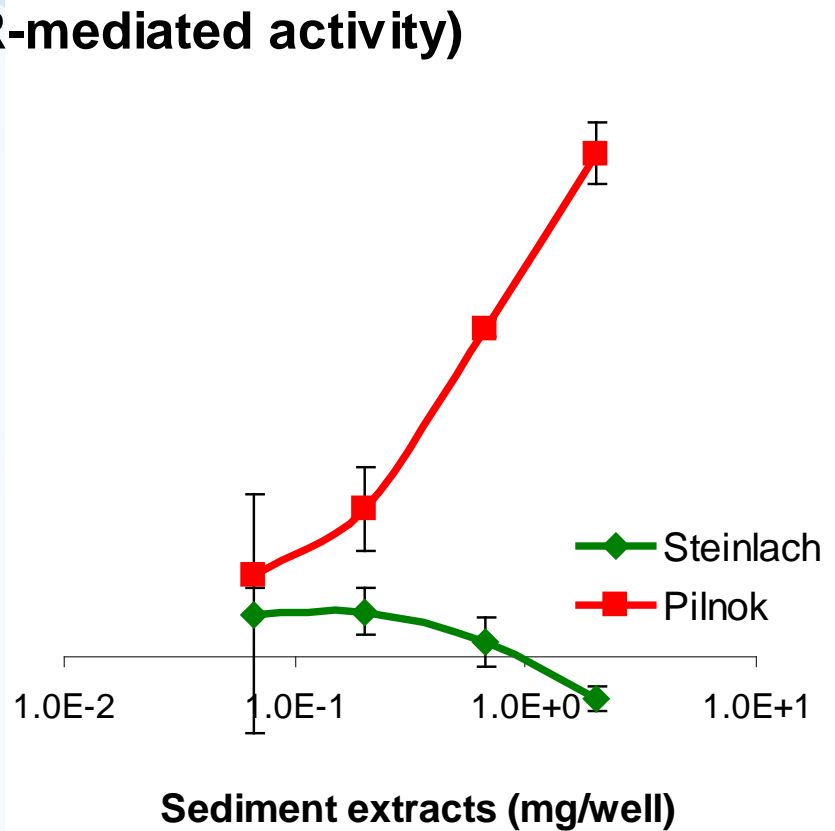
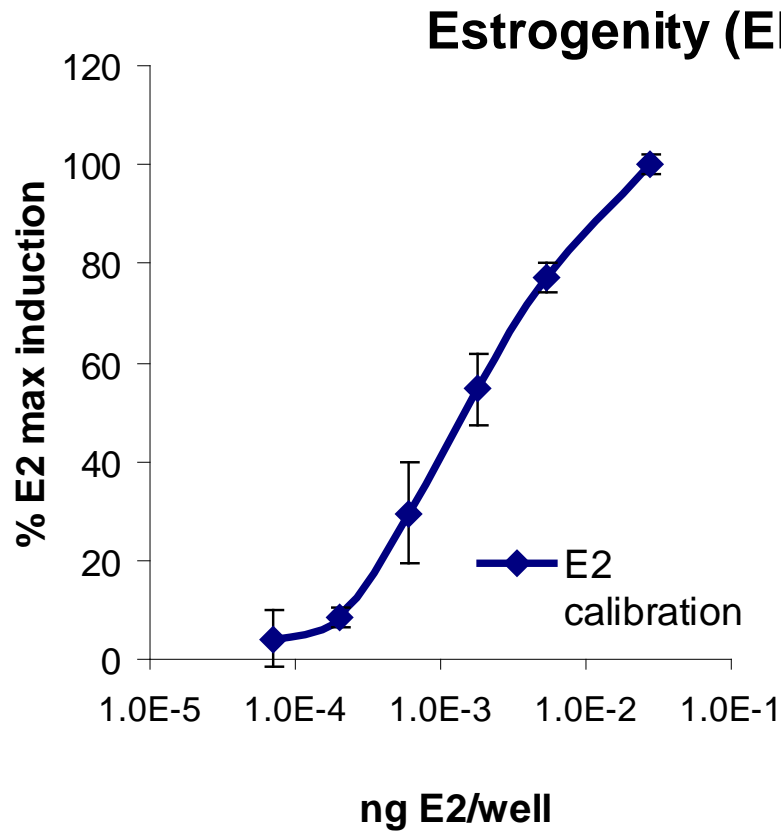
**Série detekčních systémů pro:**

Estrogenita  
Androgenita  
Dioxinová toxicita  
Retinoidní toxicita

Genotoxicita



## MVLN bioassay

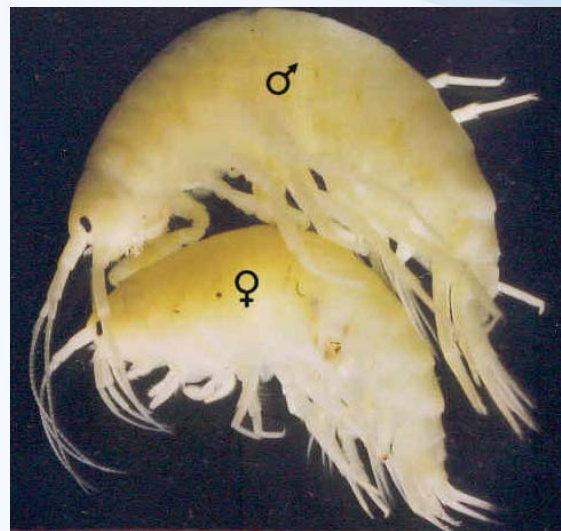


- **PILNOK** estrogenic
- Reference sediments - no effects

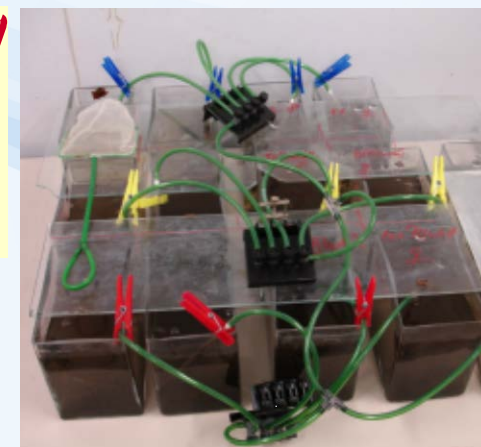
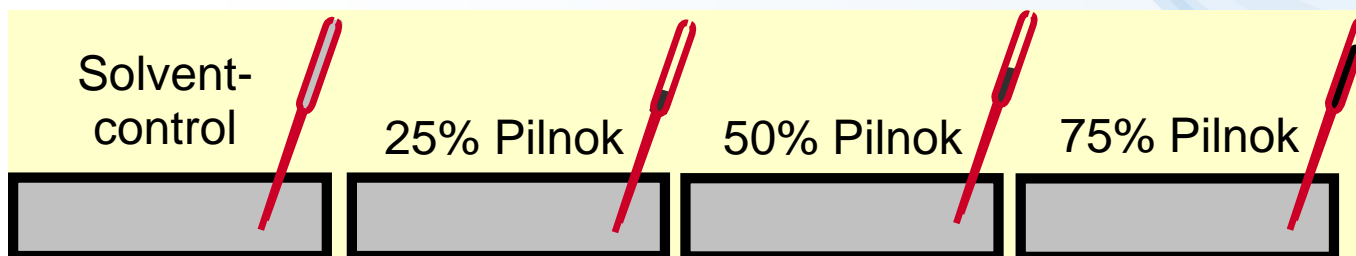
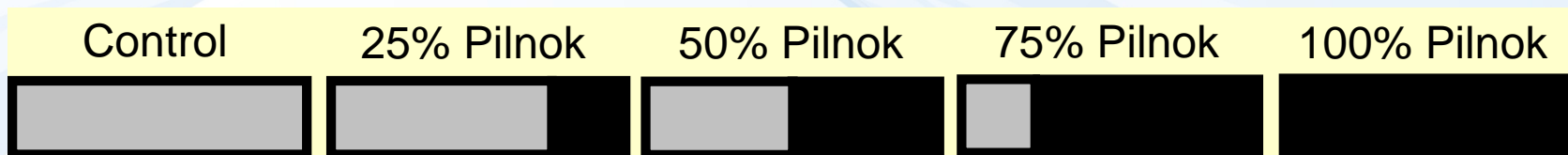




## In vivo effects?



# Assesment of *in vivo* effects



*Potamopyrgus antipodarum*

2,5,8 weeks: mortality,

embryos, hsp70



*Gammarus fossarum*

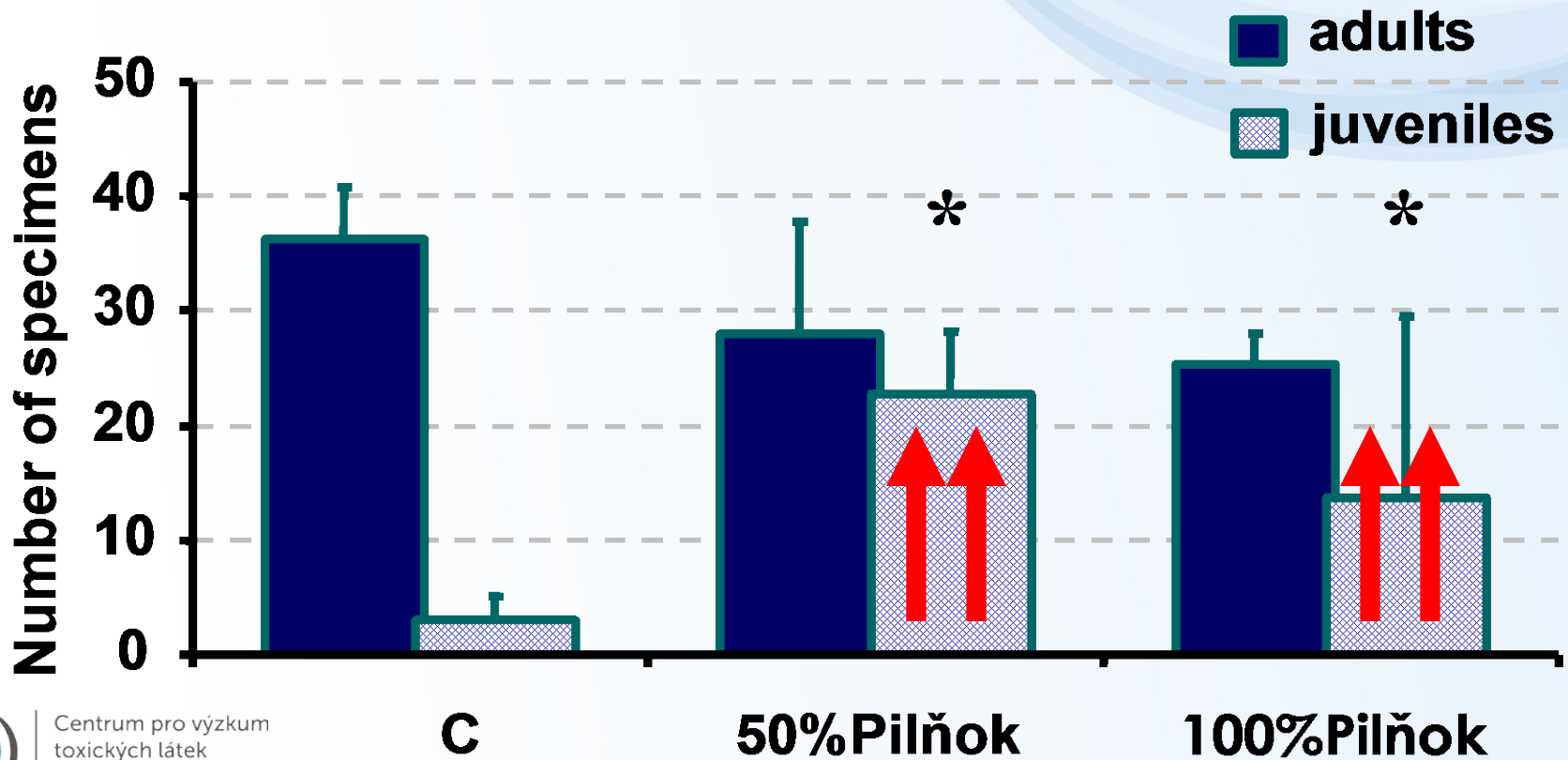
12 weeks: mortality,

juveniles, histopathology

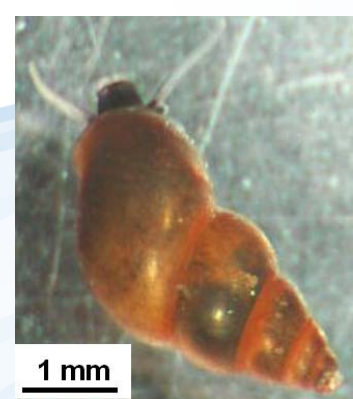


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Pilňok zvyšuje počty a veľkosť F1 juvenilů

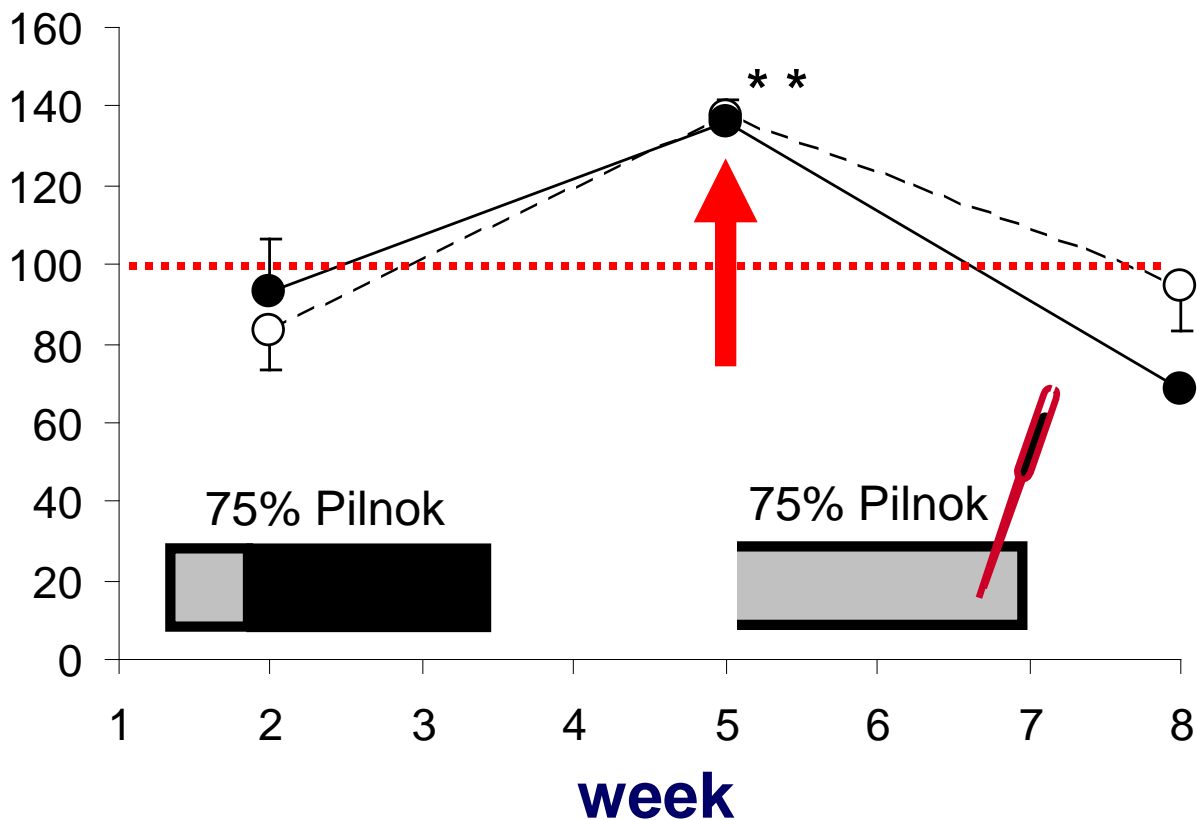






# Pilňok (sedimenty i extrakty) stimulují produkci embryí

No. Embryos / female  
(% of control)



--○-- Pilnok-Sediment

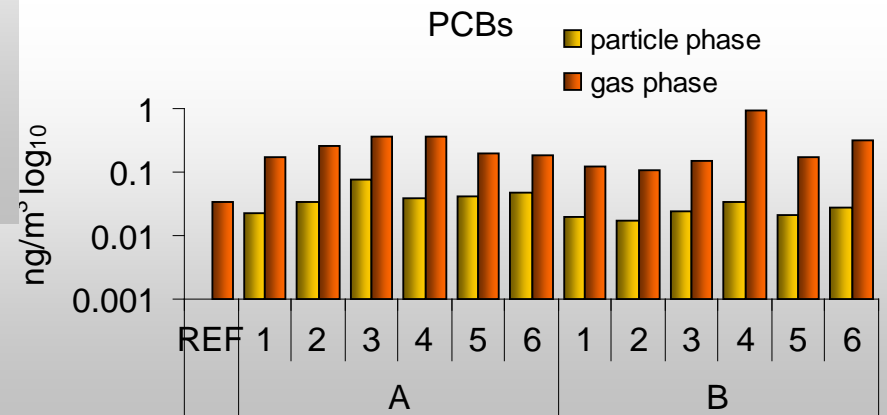
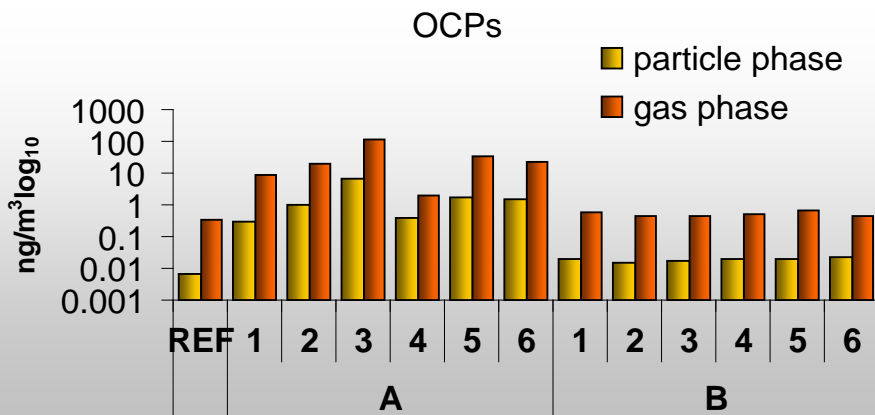
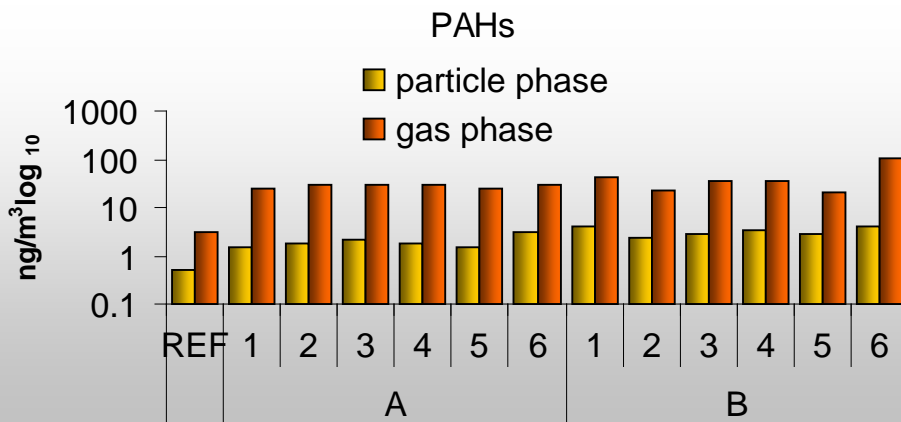
—●— Pilnok-Extrakt



# Chemické látky vs. ED-toxicita ve vzduchu

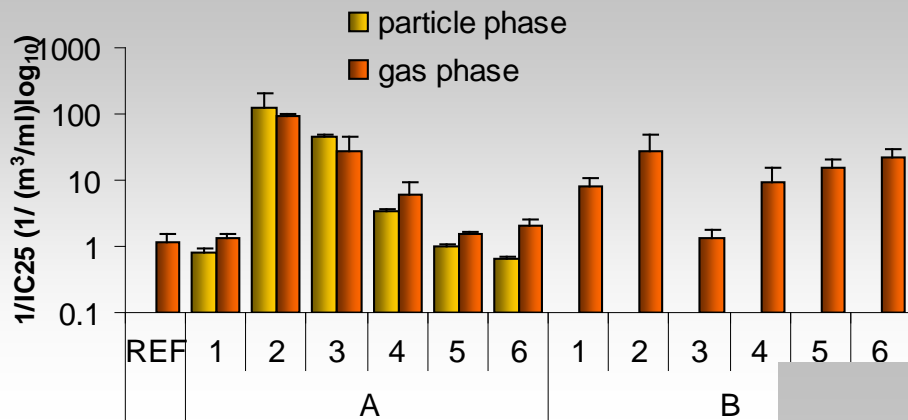
## Chemické analýzy:

+/- žádné trendy,  
žádné velké rozdíly  
mezi  
oblastmi,



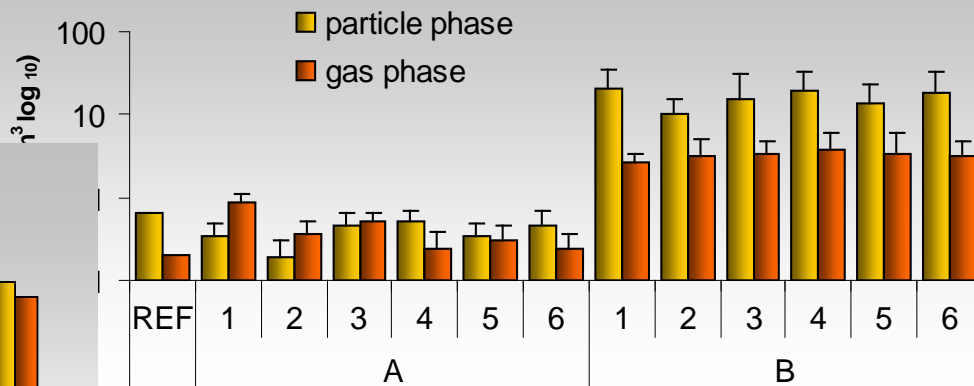
# BIOTESTY ... velké rozdíly v EFEKTECH !

## antiandrogenicity

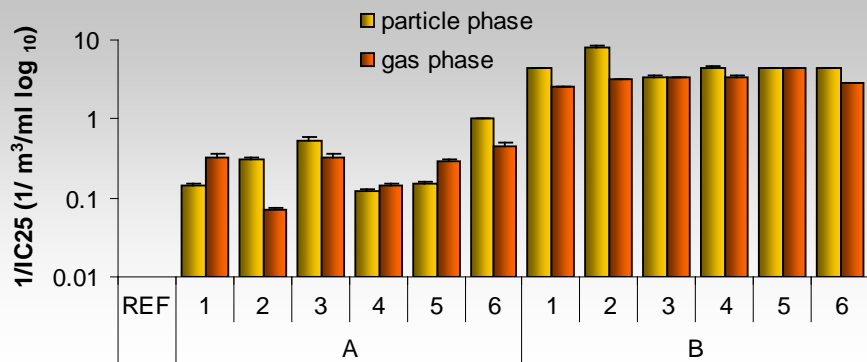


Které „nové“ (neměřené) látky jsou odpovědné za pozorované účinky ?

## dioxin-like toxicity



## antiestrogenicity





## Co to všechno znamená ? Závěry ?

- V prostředí jsou nebezpečné chemické látky, které chemické analýzy nedokážou postihnout, protože ...
  - nesledují se
  - velmi nízké koncentrace – nelze je stanovit
- ALE: lze je měřit biologickými detekčními nástroji
  - zavést biologické testování do monitoringu:
  - praktický dopad na kvalitu života (člověka a organismů v přírodě)



# SINICE (CYANOBAKTERIE)

- masový rozvoj sinic = **závažný problém**:
  - negativní vliv na chemismus vody (kyslík, pH, )
  - produkce **pachů, pachutí**
  - produkce **CYANOTOXINŮ** – látky toxické či jinak biologicky aktivní



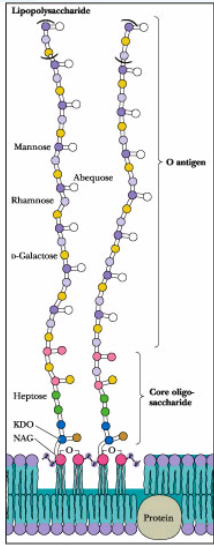
- komplikace při využívání nádrží (vodárenství, rekreace, chov ryb)
- nebezpečí pro ostatní živé organismy



Foto: Kerstin Bohm

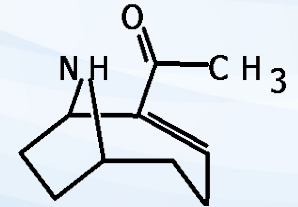
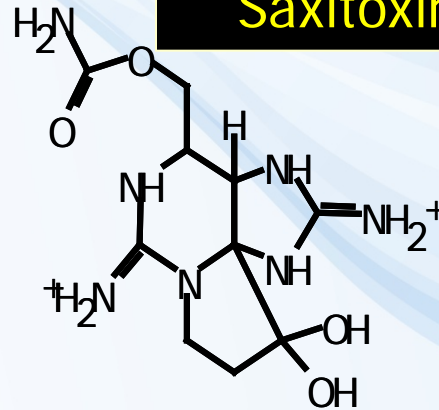


# Cyanotoxiny ...

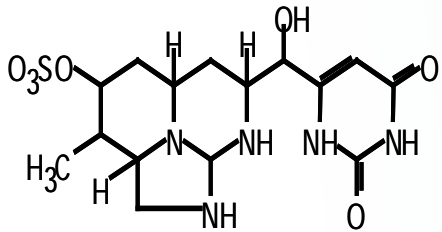


LPS

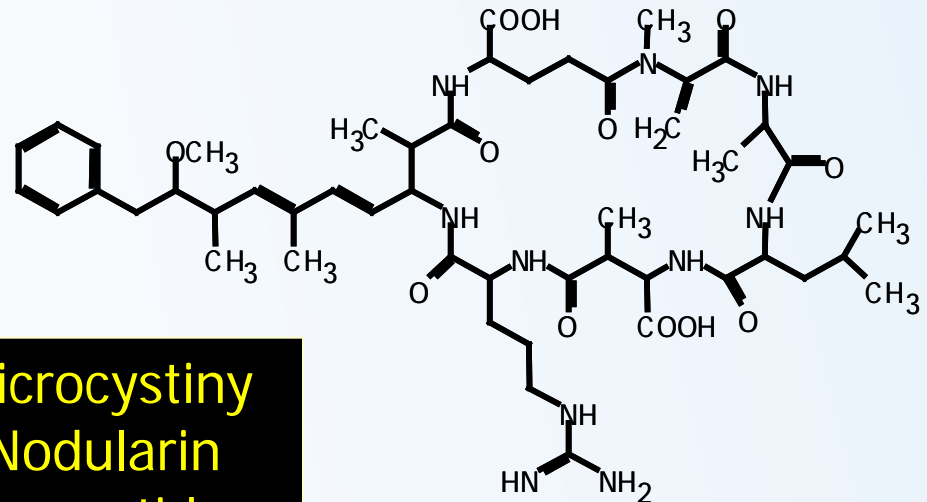
Saxitoxin



Anatoxin-a



Cylindrospermopsin



Microcystiny  
Nodularin  
... peptidy



# Toxicita microcystinů

- Akutní letální toxicita ....

Toxin	Zdroj	Skupina	LD50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ při inj. i.p. myš
Botulin	<i>Clostridium botulinum</i>	bakterie	0,00003
Tetan	<i>Clostridium tetani</i>	bakterie	0,0001
aphanotoxin	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	sinice	10
anatoxin A	<i>Anabaena flos-aquae</i>	sinice	20
hadí jed-kobra	<i>Naja naja</i>	had	20
Microcystin LR	<i>Microcystis aeruginosa</i>	sinice	43
Nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>	sinice	50
Kurare	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	rostlina	500
Strychnin	<i>Strychnos nux-vomica</i>	rostlina	2000

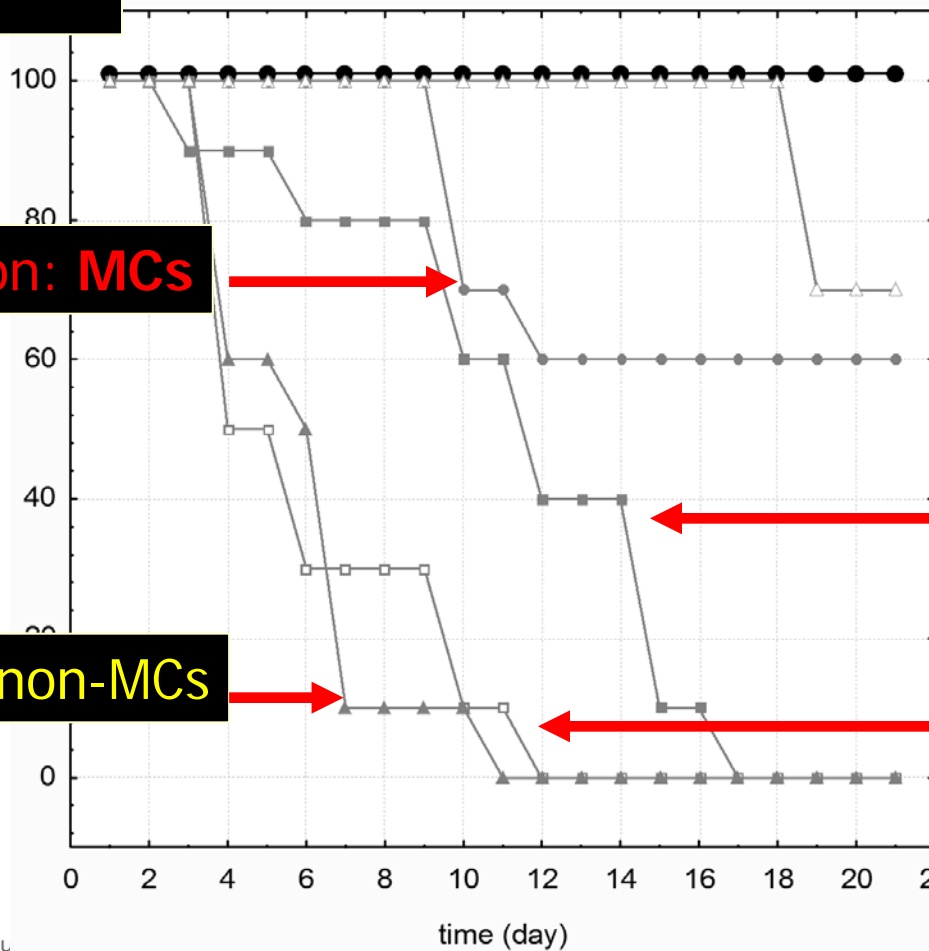




# Ekotoxicita sinic



Reproduction  
(natality)



Fraction: MCs

Fraction: non-MCs

Control

Spinach

Bloom biomass

Extract

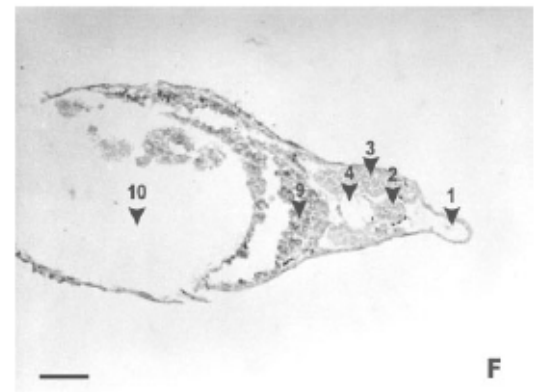
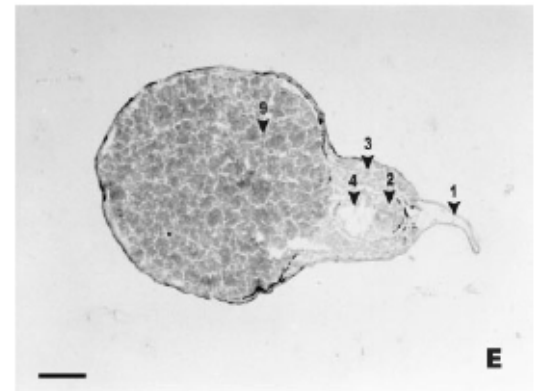
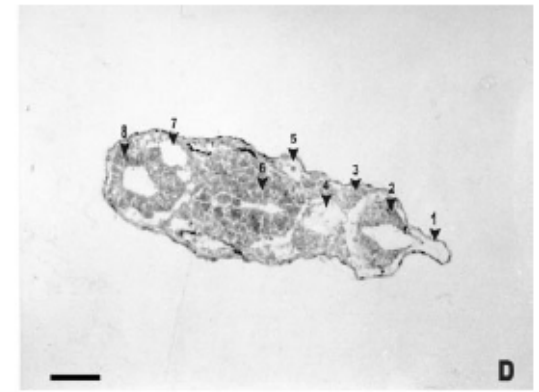
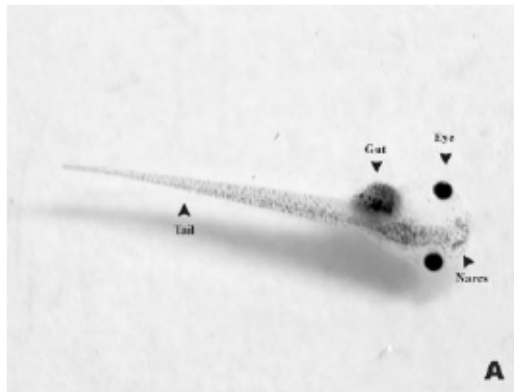
● control  
■ BIOM  
□ AQ.EXTRA  
▲ C18 PERMEATE  
○ C18 ELUATE  
△ SPINACH



# Vliv sinic na vývoj žab

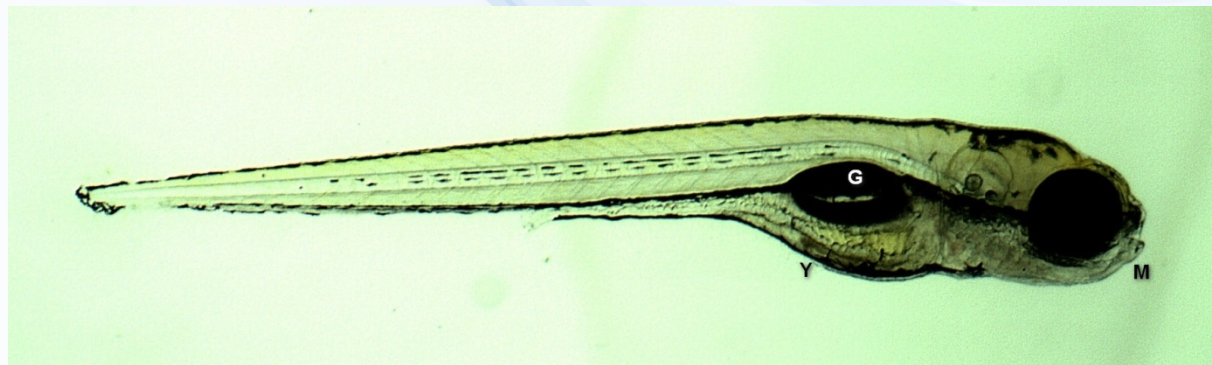
Účinky nelze jednoduše  
spojit se známými toxiny

- Nové látky?
- Jak vypadají?
- Jak působí



# Jsou limity pro chemické látky opravdu bezpečné ?

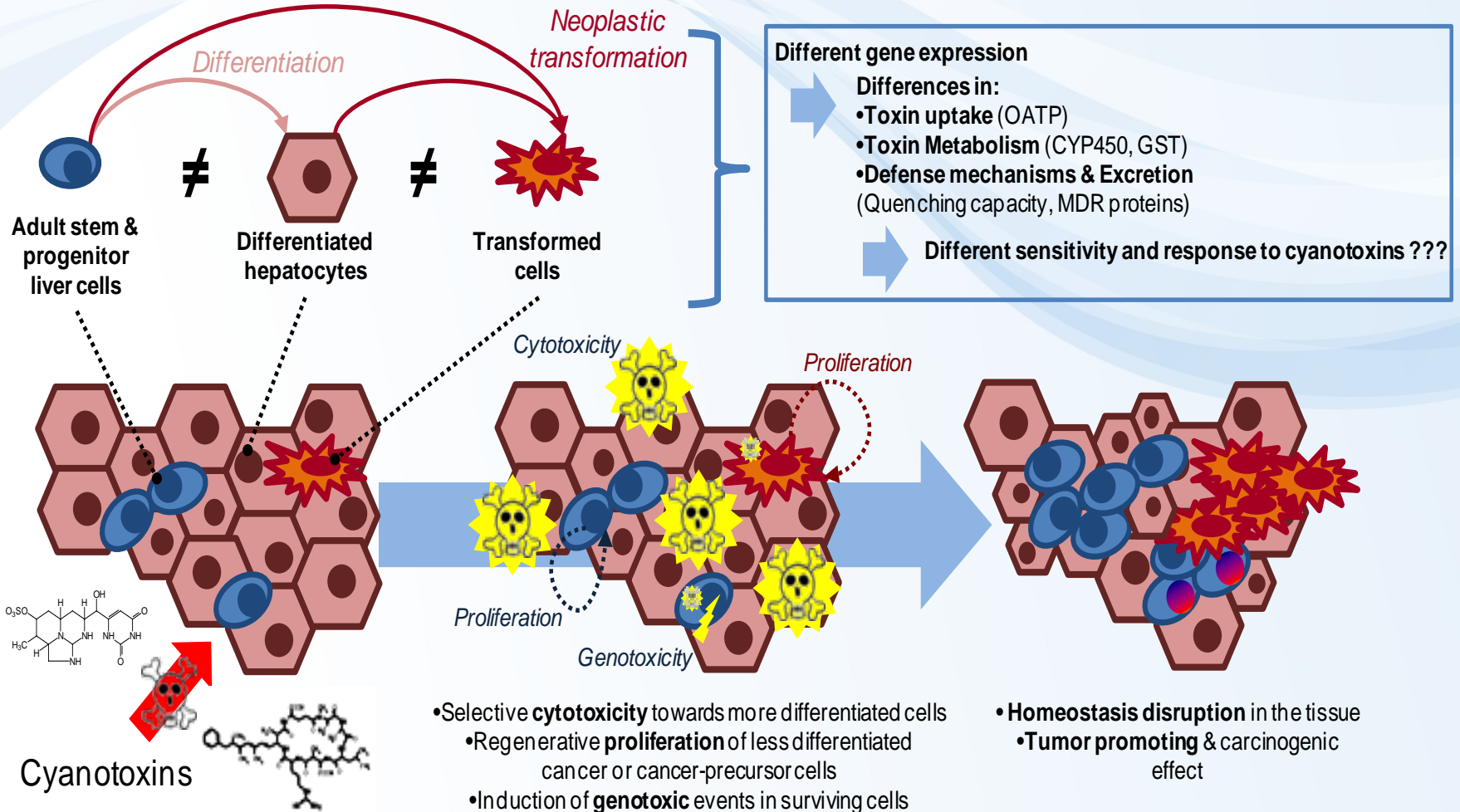
Kontrolní 5 denní  
embryo zebřičky  
*Danio rerio*



Směs 14  
chemických látek  
- všechny v  
bezpečných  
koncentracích



# Kmenové buňky (Dr. Babica)



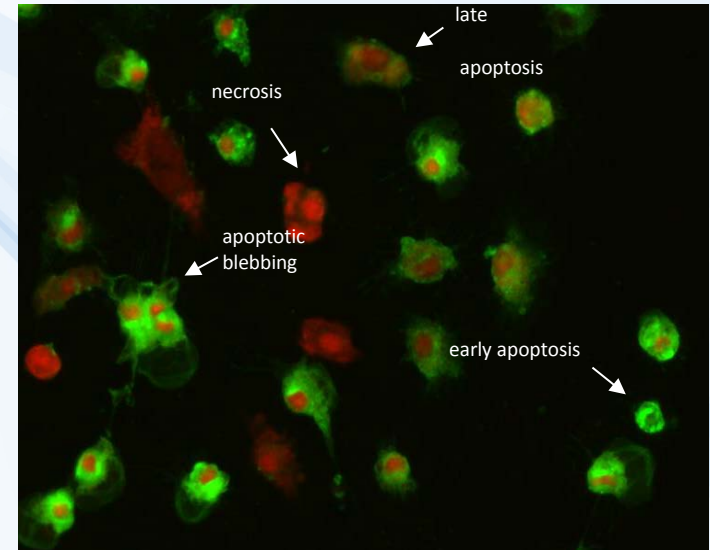
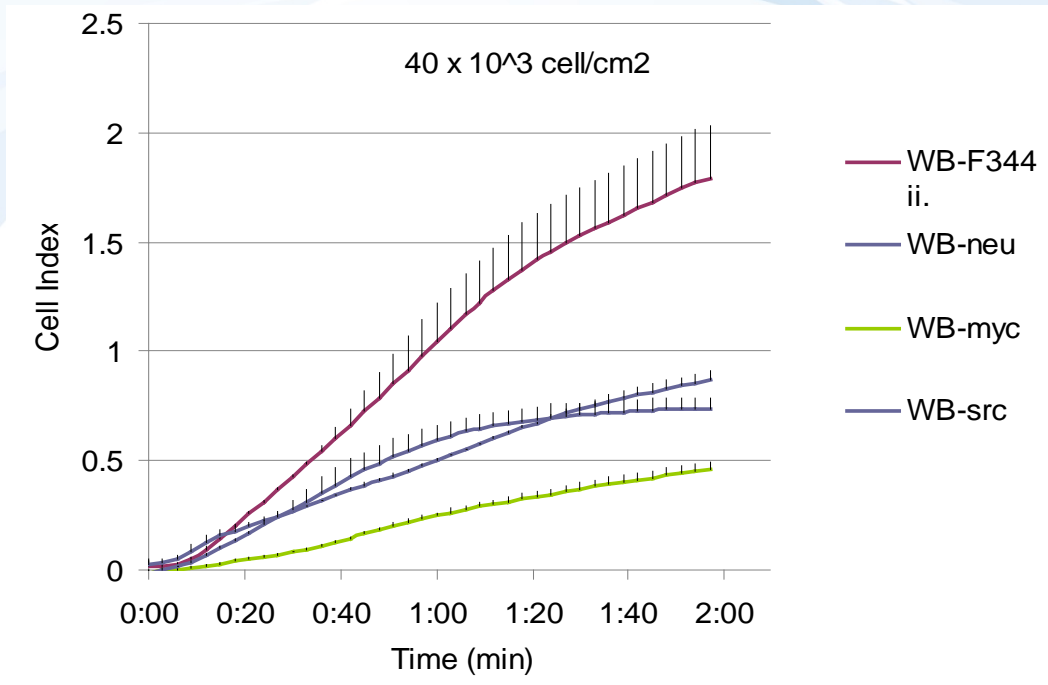
- Selective **cytotoxicity** towards more differentiated cells
- Regenerative **proliferation** of less differentiated cancer or cancer-precursor cells
- Induction of **genotoxic** events in surviving cells

- **Homeostasis disruption** in the tissue
- **Tumor promoting** & carcinogenic effect





# Kmenové buňky (Dr. Babica)



**Figure 4:** Upper panel: Detection of apoptosis and necrosis in WB-F344 cell culture upon nocodazole treatment (500 ng/mL, 16 h). Apoptotic cells were stained with Annexin-V-FLUOS (green fluorescence), whereas dead cells with compromised membrane integrity were stained with propidium iodide (red fluorescence). Lower panel: Effect of oncogene-activation (neu, myc, src) on the initial adhesion of WB cells evaluated by RTCA xCelligence SP.



# Bakalářky a diplomky

- **Endokrinní disruptory**
  - „nové typy“ znečištění - léčiva, vonné látky, UV filtry, pesticidy
  - látky s vlivem na rozmnožování (reprodukční toxicita)
  - látky s vlivem na časný vývoj organismů (embryotoxicita)
  - látky ovlivňující kmenové buňky (karcinogenita)
- **Sinice a jejich toxiny**
- **Směsi chemických látek**
  
- **Hlavní otázky:**
  - Hladiny a efekty - kde jsou?, v jakých koncentracích?
  - Jakým mechanismem působí? **v buňkách in vitro**
  - Účinky na vodní organismy? **in vivo**
  - Jaké jsou možnosti odstraňování?
  - Lze předpovídat (modelovat) účinky?
  - Možnosti sledování (estrogenita, senzory, kity pro praxi)?
  - Jak změnit legislativu
  
- **Zapojení studentů**
  - vždy řešení aktuálních vědeckých otázek ... spojených s reálnými problémy znečištění vody, vzduchu, potravin atd

