



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Koncept AOP (dráhy škodlivého účinku) Testování potenciálu endokrinní disrupce

Klára Hilscherová
RECETOX- Přírodovědecká fakulta MU Brno

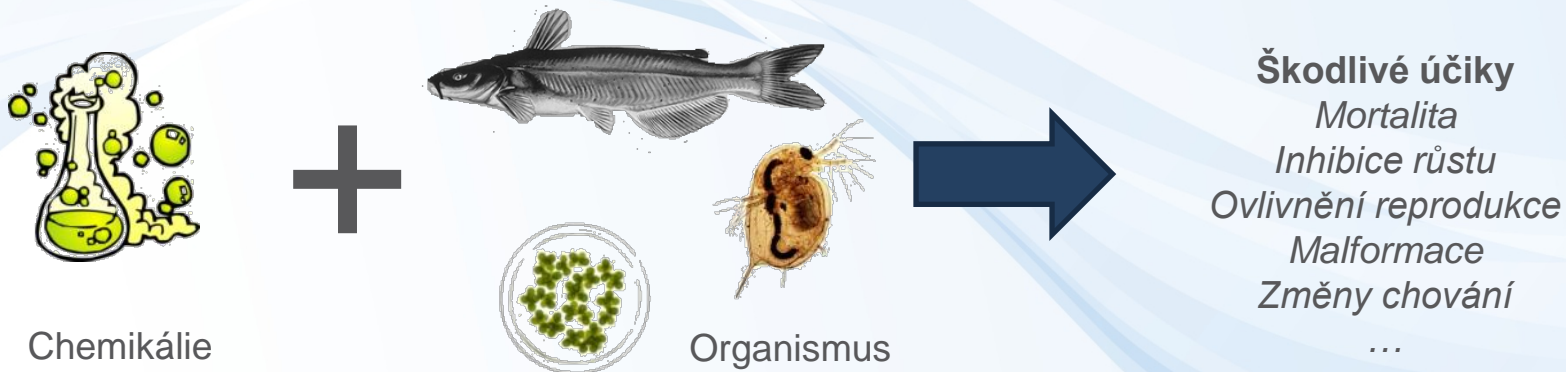


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Hodnocení toxicity chemických látek

Tradiční přístupy – Hodnocení škodlivého účinku na úrovni organismu



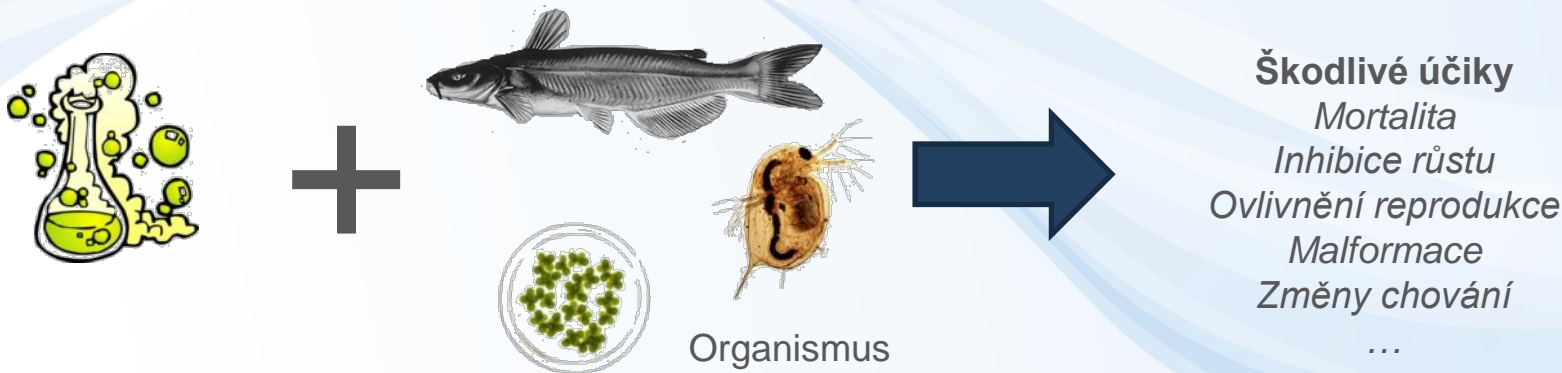
- Údaje o toxicitě existují pouze pro malou část z desítek tisíc látek, které jsou vyráběny/prodávány
- Zásadní nedostatek informací ohledně potenciálních rizik řady látek
- Rostoucí požadavky regulačních orgánů na toxikologická data pro velký počet látek – nemožné získat tradičními postupy → Snaha o efektivnější, rychlejší a levnější přístupy k hodnocení bezpečnosti/rizika látek

Současné hodnocení nebezpečnosti – často k dispozici především krátkodobé, akutní testy, nebo jen základní dlouhodobější (mortalita, růst, reprodukce) využívány extrapolace – z akutních na chronické účinky, mezi druhy - používány faktory nejistoty – problematické – nemožno predikovat dlouhodobější subletální účinky z akutních testů, neznáme mechanismy



Hodnocení toxicity chemických látek

Tradiční přístupy – Hodnocení škodlivého účinku na úrovni organismu

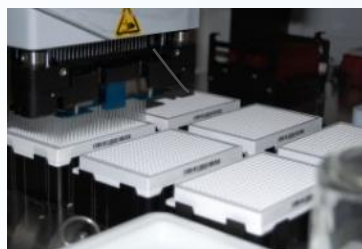


Nové přístupy

- Hodnocení účinků na nižších úrovních biologické organizace
- Ex vivo / in vitro / In chemico / In silico metody
- **ovlivnění genů, proteinů, buněčných funkcí, biomarkerů**
- Testování s vysokou propustností (HTS – high throughput screening)



10^4 Látek



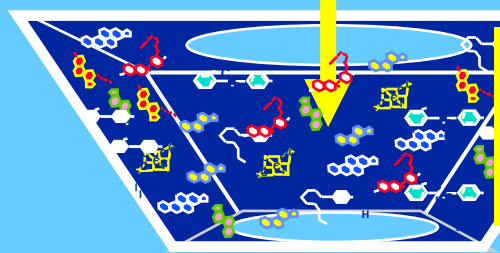
HTS



Chemicko-biologické interakce
Informace o mechanismech
Interakce s receptory
Ovlivnění signálních drah
Aktivity enzymů
Ovlivnění buněčných procesů
...

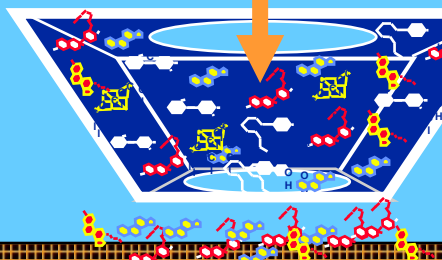


Inventarizace chemických látek

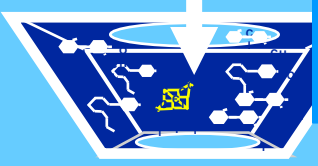


Existující znalosti
data ohledně expozice,
toxicity, *in silico*

Proces
Prioritizace



In Vitro
charakterizace:
Molekulární interakce,
Buněčné odpovědi



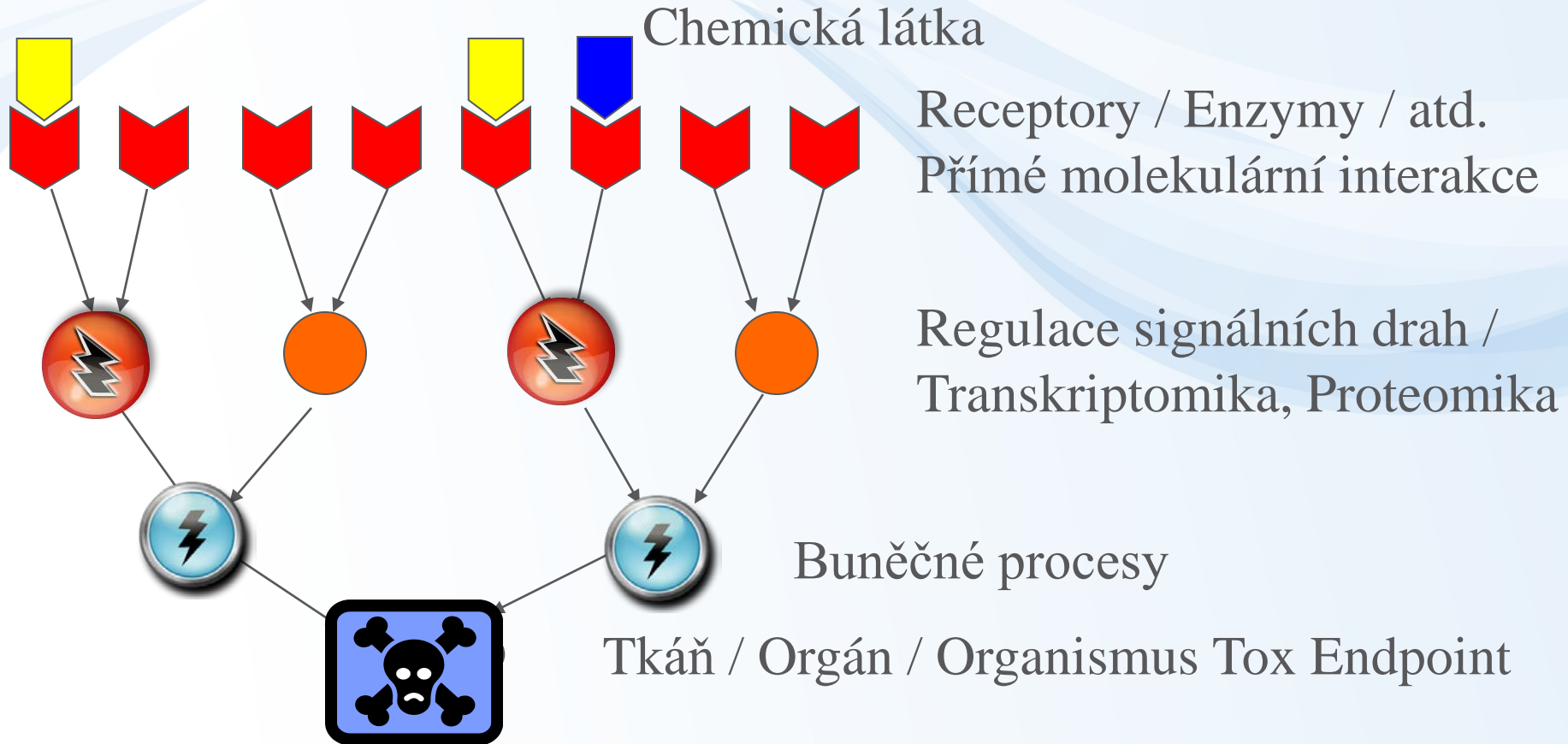
Efektivně cílené
***In Vivo* Testy**

Hodnocení relevantních účinků

Hodnocení rizik

Výzkum:
Doplnění
informací

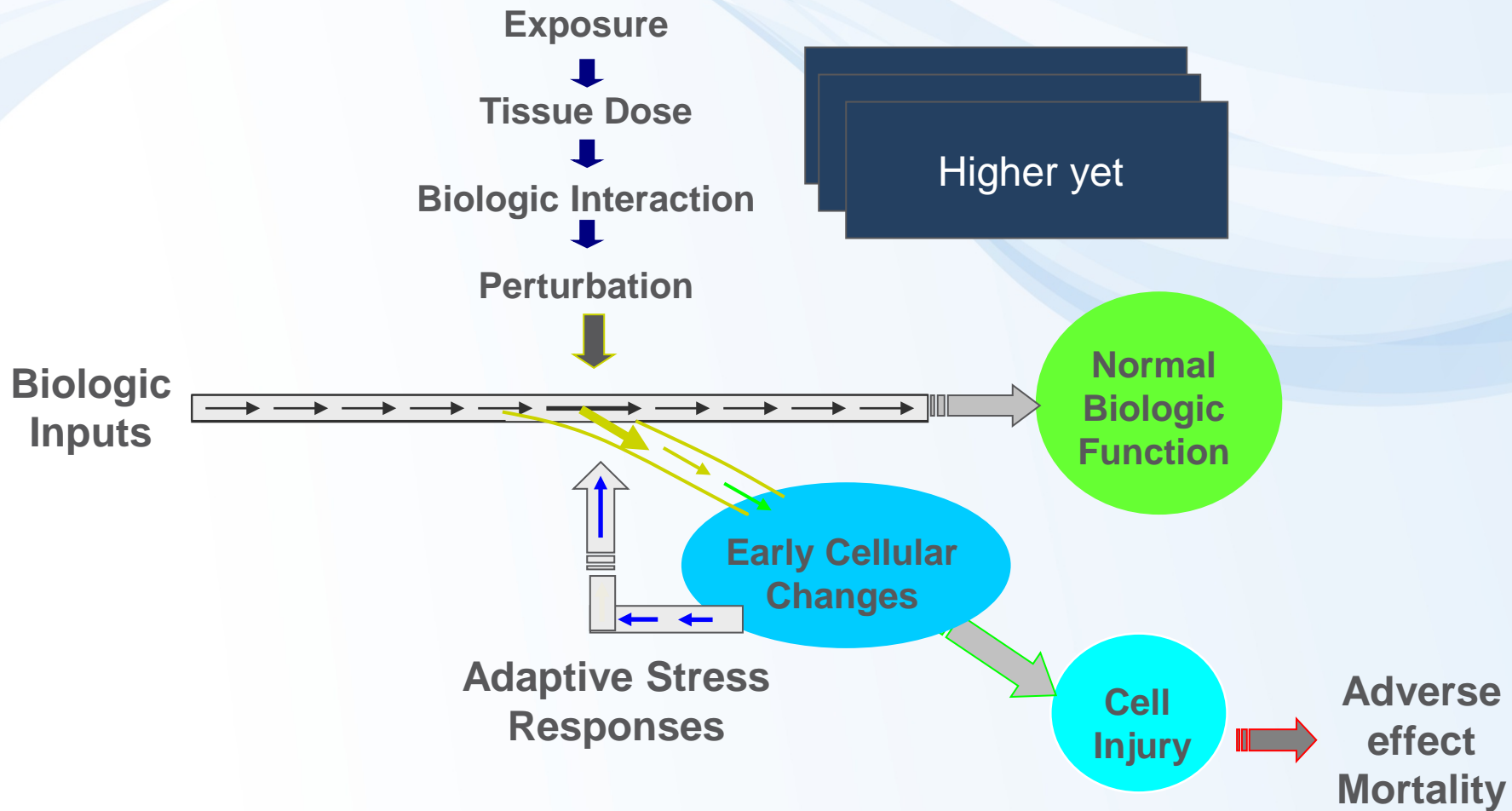
Dráhy toxicity



Biologické dráhy, jejichž narušení vede ke škodlivým účinkům látek

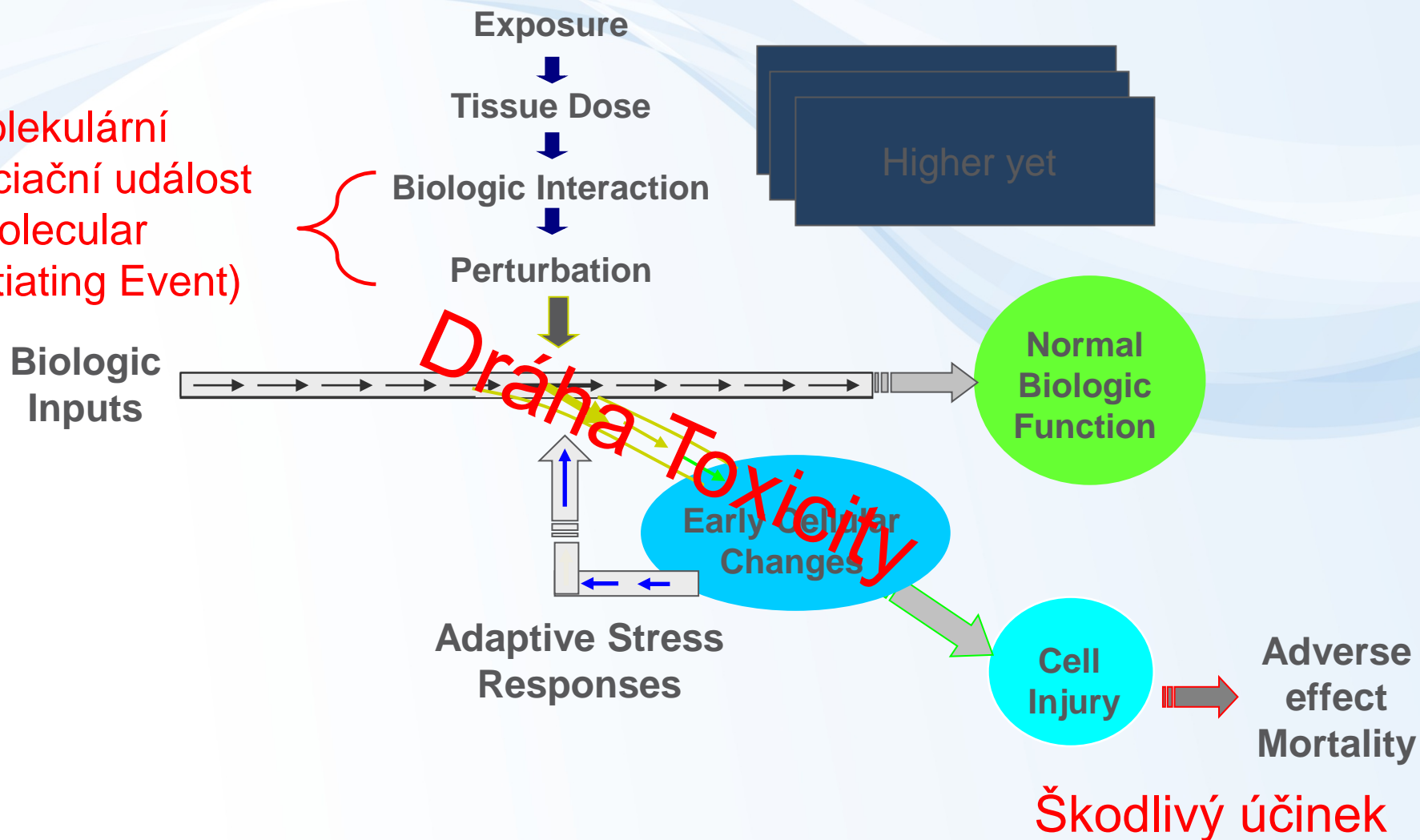


Nový přístup: Aktivace drah toxicity

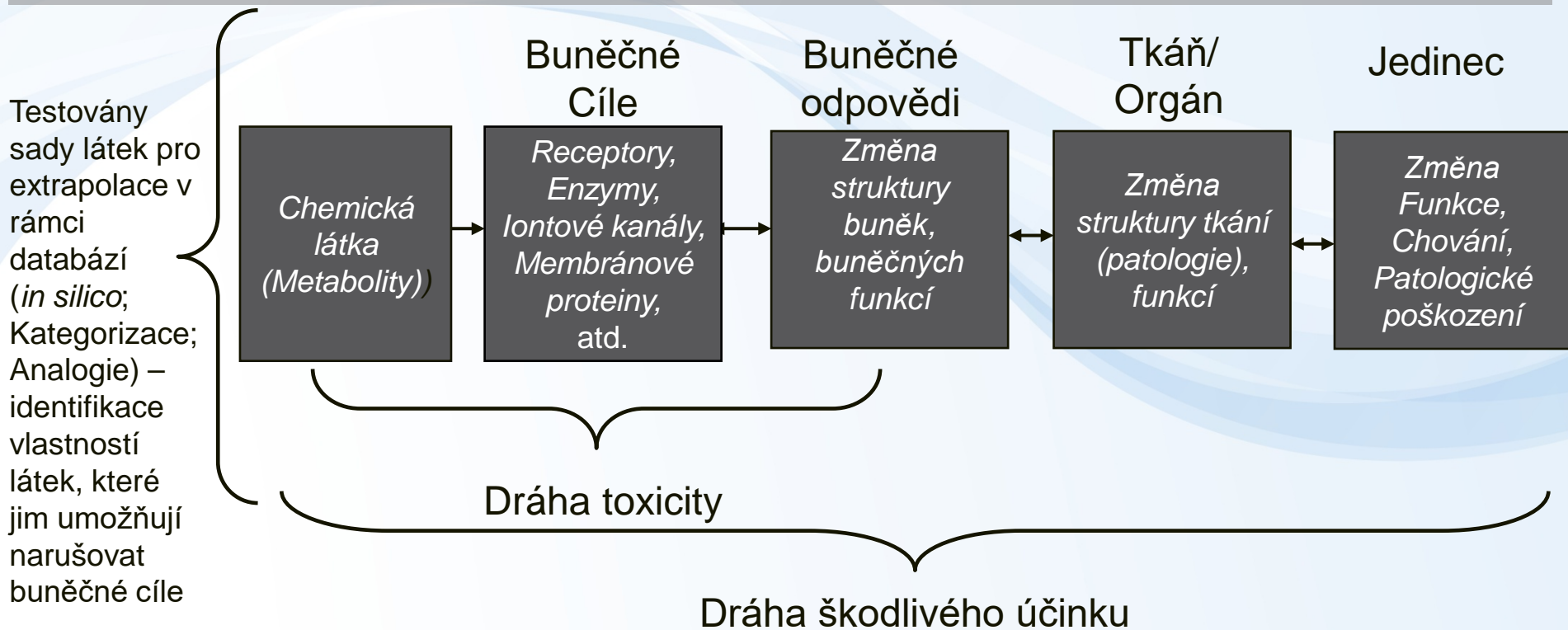


Nový přístup: Aktivace drah toxicity

Molekulární
iniciační událost
(Molecular
Initiating Event)



Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway) a Chemické Extrapolace

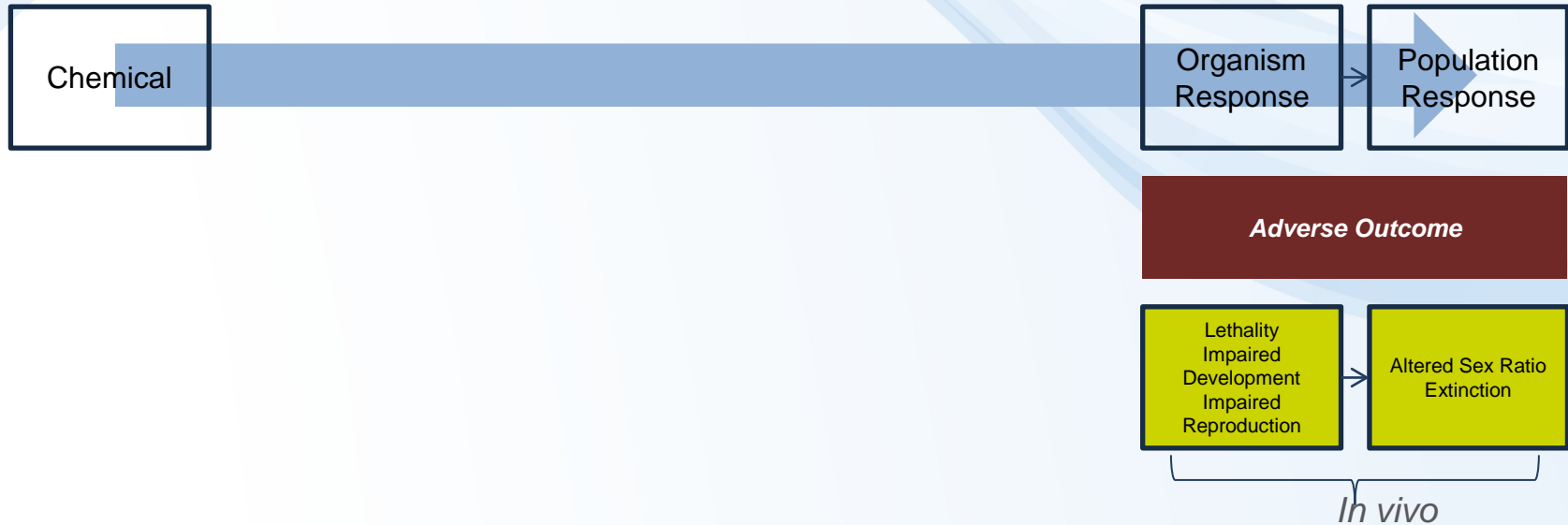


Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway) = sled událostí od počátečního (iniciačního) bodu přes dráhu toxicity (Toxicity Pathway) ke škodlivému účinku

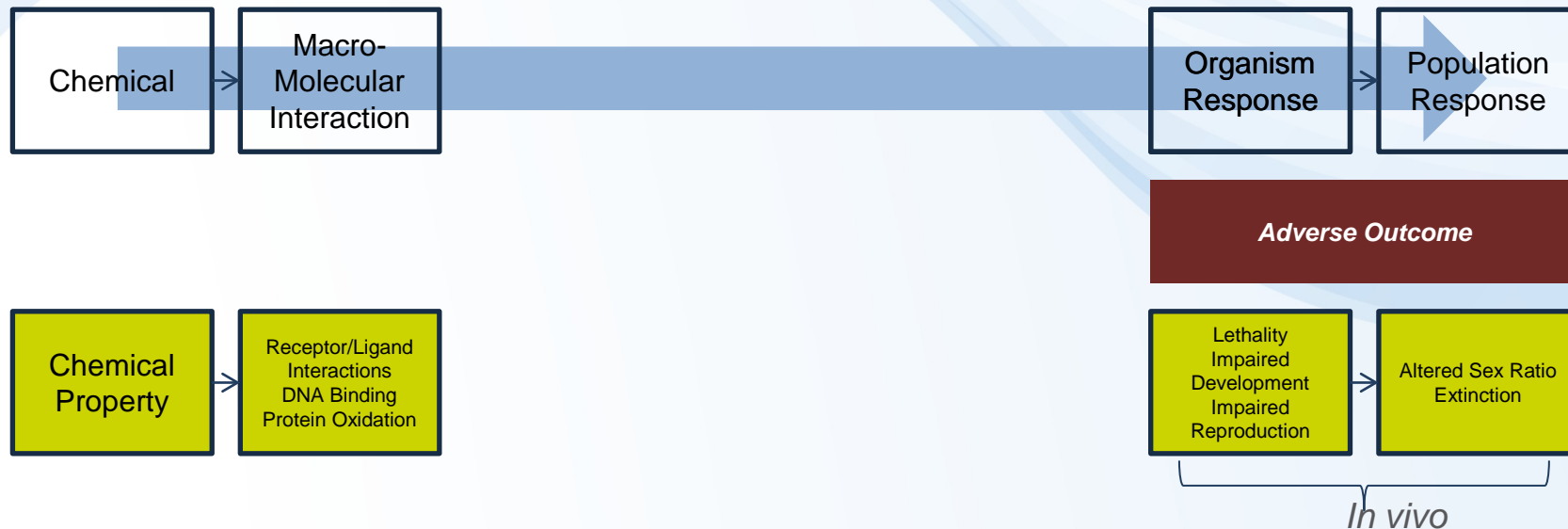
Toxická dráha/dráha toxicity (Toxicity Pathway) = dráha buněčné odpovědi, která pokud je dostatečně silně narušena, povede k negativním zdravotním účinkům



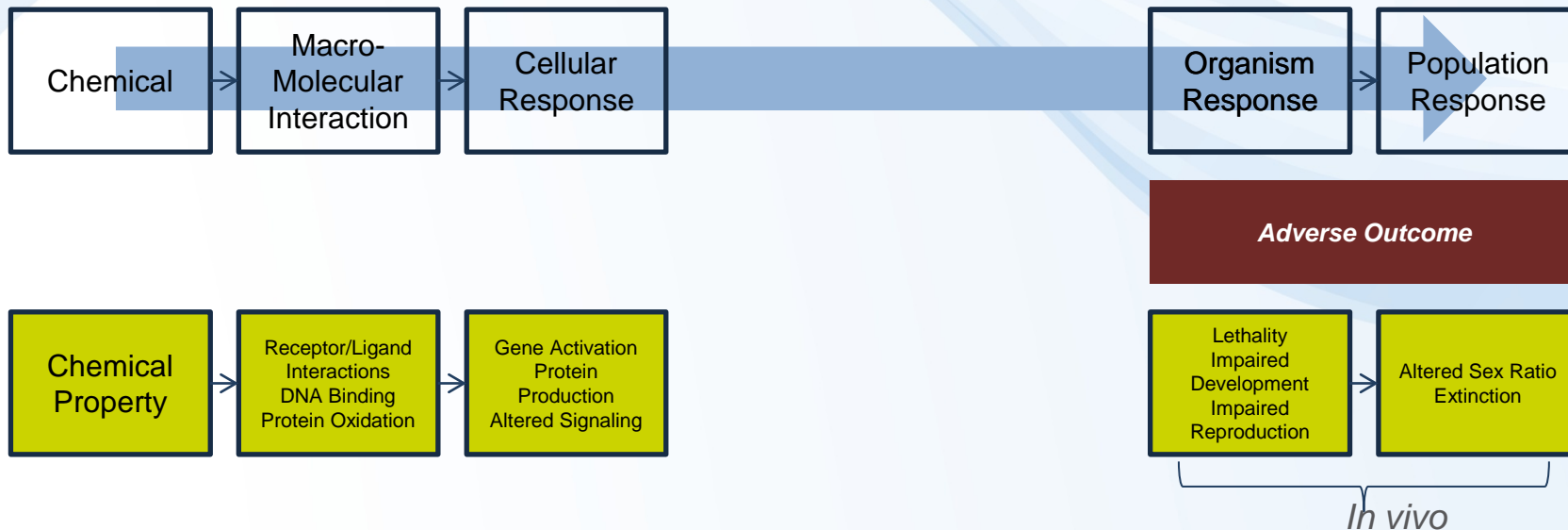
Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway



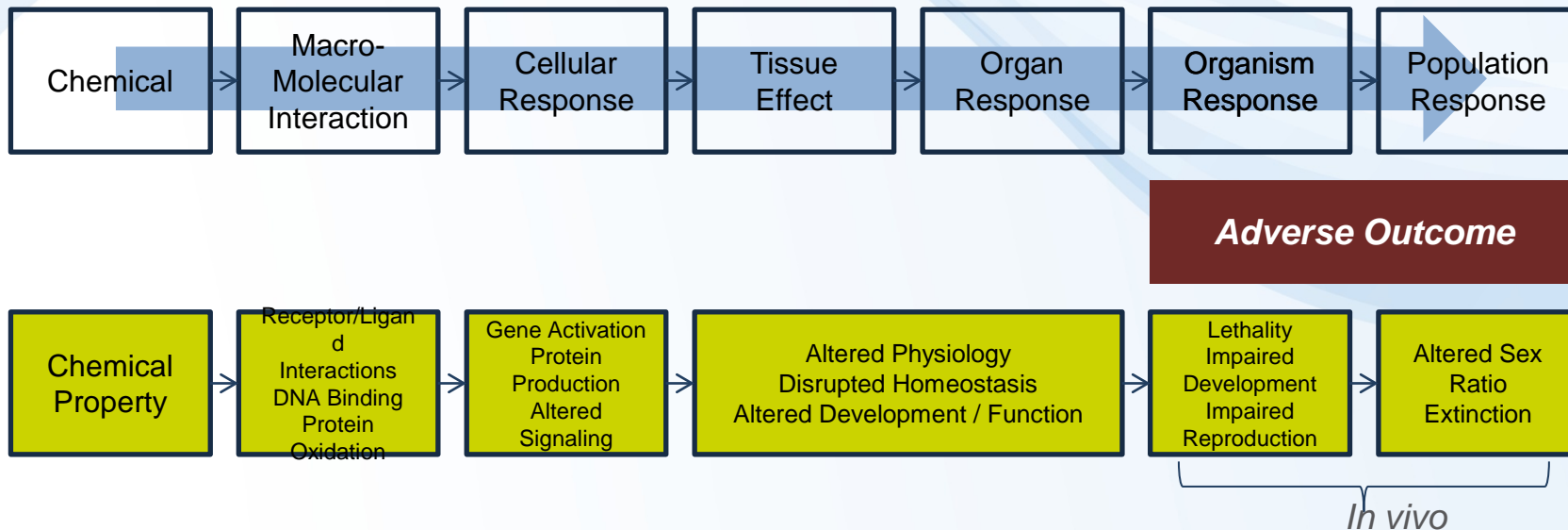
Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway



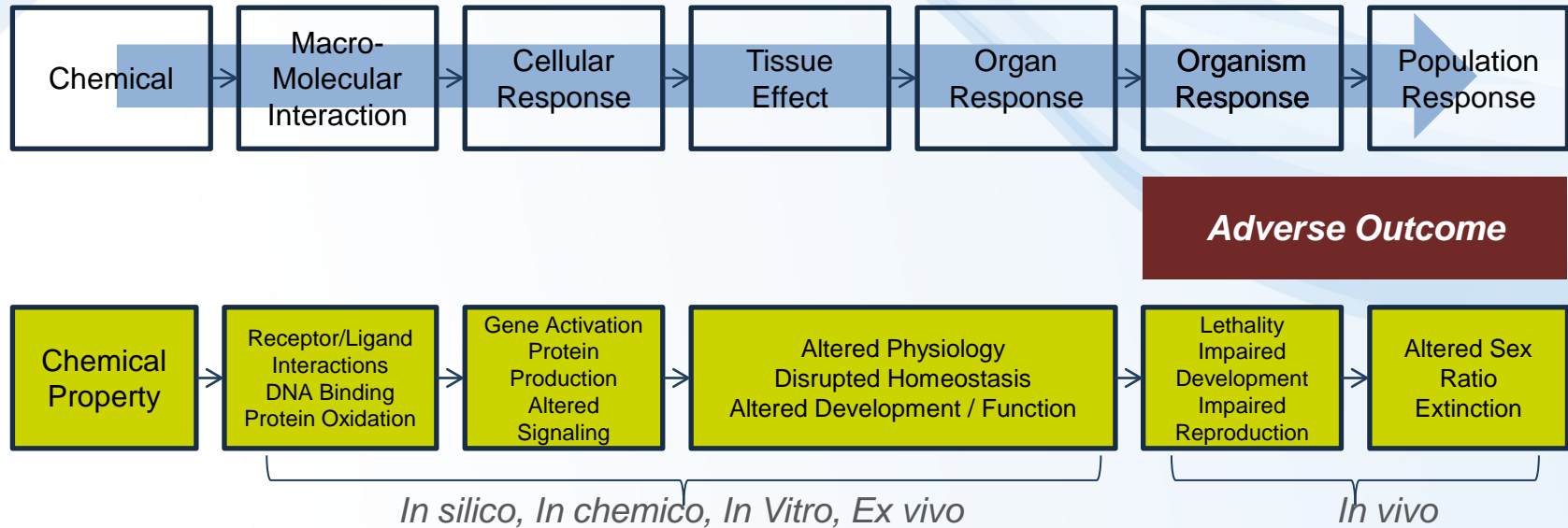
Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway



Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway

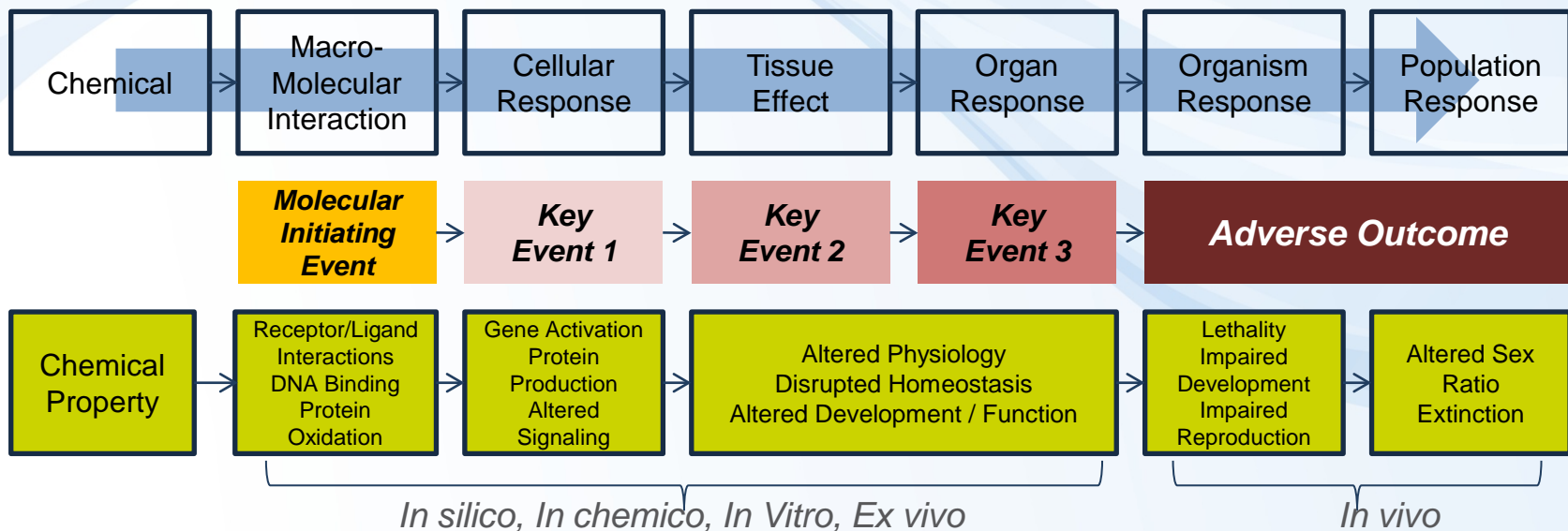


Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway



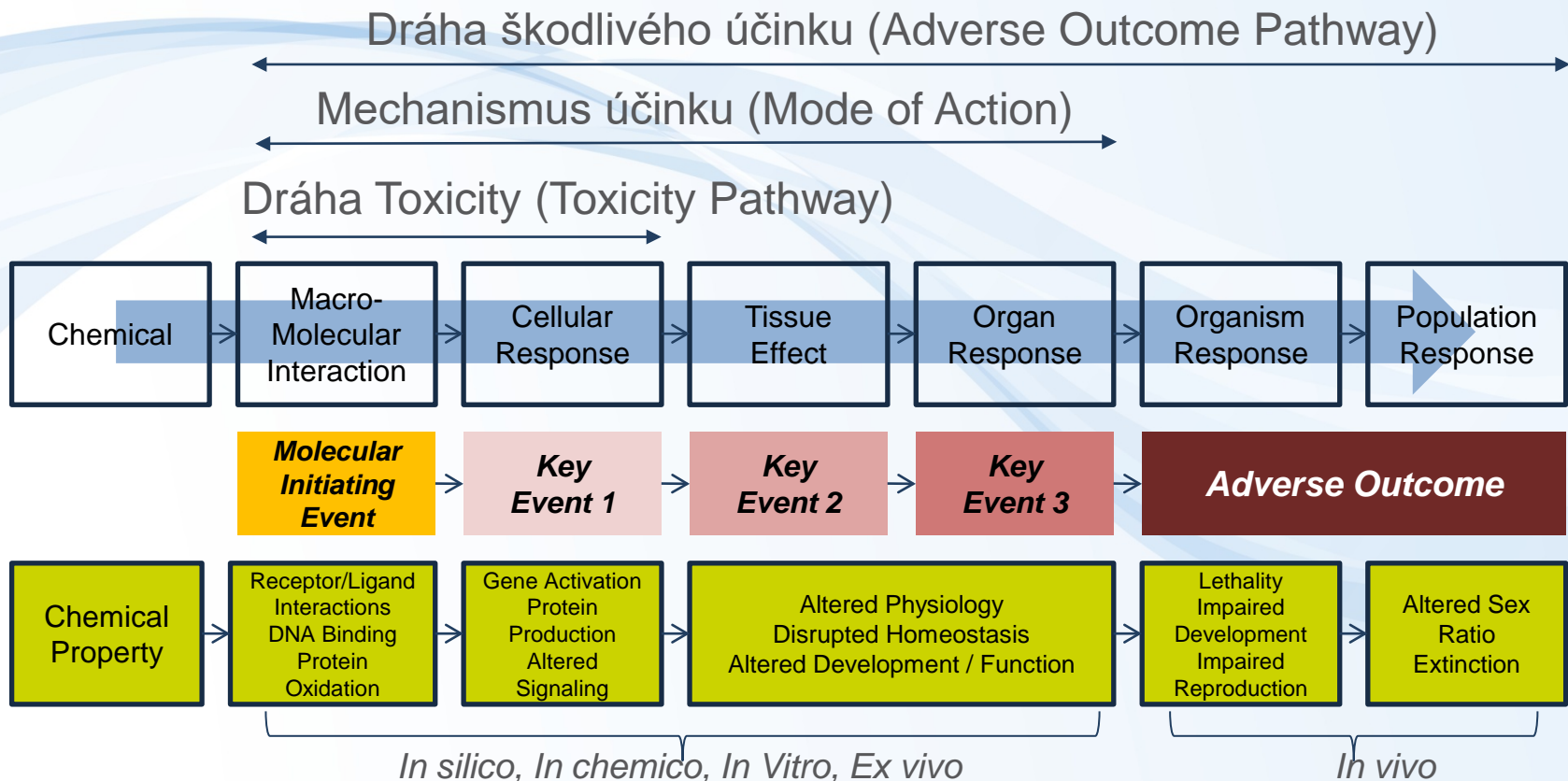
propojení informací o interakcích chemikálií s biologickými systémy (makromolekulami, buňkami, tkáněmi...) s informacemi o relevantních biologických odpovědích, které vedou ke škodlivému účinku (in vivo)

Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)



- série definovaných a kauzálně spojených událostí napříč různými úrovněmi biologické organizace, které vedou k poškození zdraví nebo (eko)toxicitě
- Využití existujících znalostí a informací k propojení dvou ukotvujících bodů: **Molekulární iniciační událost** (Molecular Initiating Event, MIE) a **Škodlivý účinek** (Adverse Outcome, AO) přes sérii mezikroků, tzv. **Klíčové události** (Key Events)
- AOPs umožňuje propojit výsledky z *in vitro* studií a *in vitro* screeningu se škodlivými účinky na úrovni organismu nebo populací





- série definovaných a kauzálně spojených událostí napříč různými úrovněmi biologické organizace, které vedou k poškození zdraví nebo ekotoxicitě
- Využití existujících znalostí a informací k propojení dvou ukotvujících bodů: **Molekulární iniciační událost** (Molecular Initiating Event, MIE) a **Škodlivý účinek** (Adverse Outcome, AO) přes sérií mezikroků, tzv. **Klíčové události** (Key Events)
- **AOPs umožňuje propojit výsledky z *in vitro* studií a *in vitro* screeningu se škodlivými účinky na úrovni organismu nebo populací**



Hlavní principy a stavební kameny AOP

MIE

Molekulární iniciační událost (Molecular Initiating Event)

interakce látky s biologickým systémem na makromolekulární úrovni

KE

Klíčové události (key events)

- mezikroky, které jsou toxikologicky relevantní a vedou k škodlivému účinku
 - jsou základem pro formulování hypotéz a testování => musí být **experimentálně kvantifikovatelné**
- Molekulární iniciační událost nebo klíčové události (Key Events) – měřitelné *in vitro* - lze je zpravidla hodnotit pomocí **rychlých skriningových metod**
- Kauzální důkazy pro **škodlivé *in vivo* účinky** (Adverse outcome = AO)
- AOP zahrnuje účinky na populační úrovni

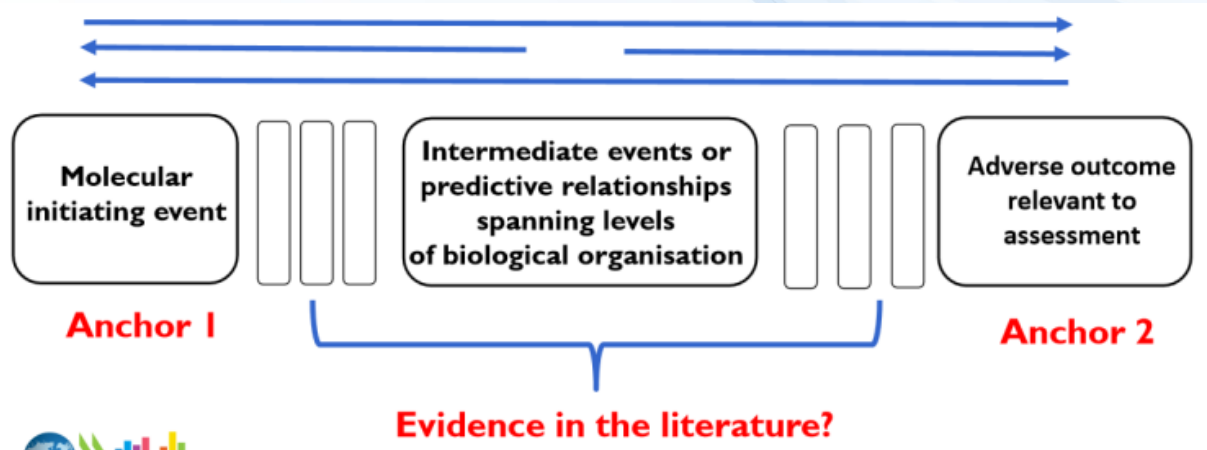
AO

KER → Key Event Relationship = vztah mezi klíčovými událostmi zahrnuje **důkaz příčinného vztahu** mezi po sobě jdoucími KEs



Vývoj AOP

- Identifikace interakce látky s biol. systémem na makromolekulární úrovni - **Kotva 1 = MIE**
- Identifikace konečného důsledku vyvolaného MIE – **Kotva 2 = AO**
- Identifikace jednotlivých mezikroků na základě známých / dostupných informací o AO



Konkrétní AOP: vždy 1 molekulární iniciační událost (MIE) => 1 dráha škodlivého účinku

- stejná MIE může vést k jinému AO => vždy nutno definovat jako zvláštní AOP
- dvě různé MIE mohou vést ke stejnému AO => vždy nutno definovat jako zvláštní AOP
- počet definovaných klíčových událostí (KE) není omezen

MIE, KE, AO – mohou být sdíleny mezi různými AOPs => syntéza, propojení informací do jednoho celku => AOP sítě (AOP networks)

Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

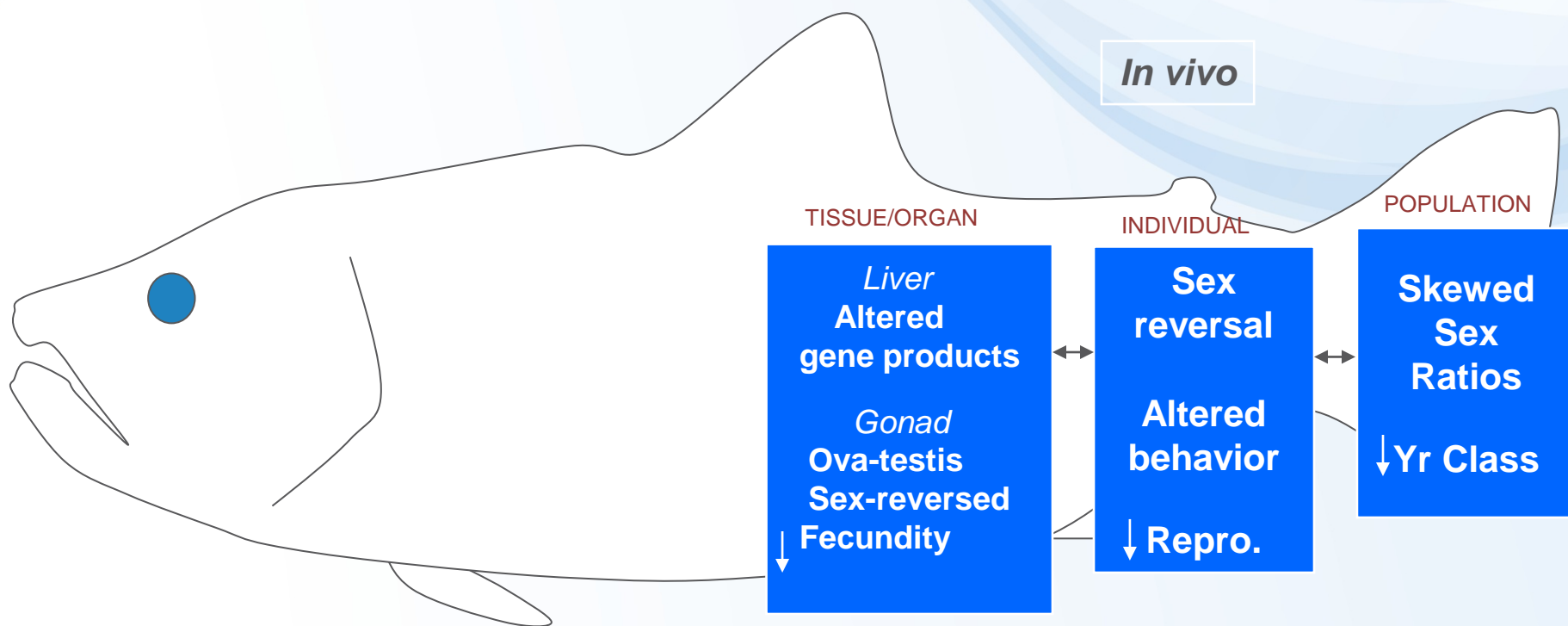
ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)

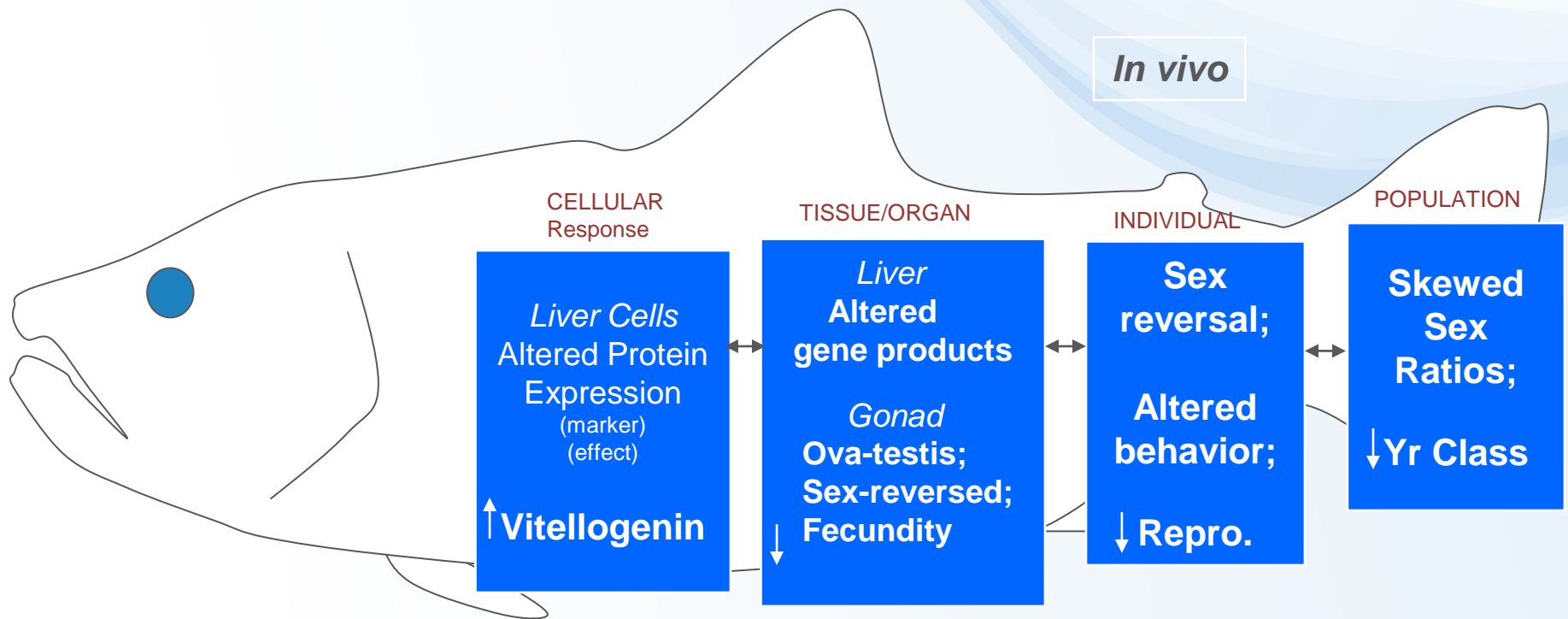
ER-zprostředkované narušení reprodukce Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Adverse Outcome Pathway

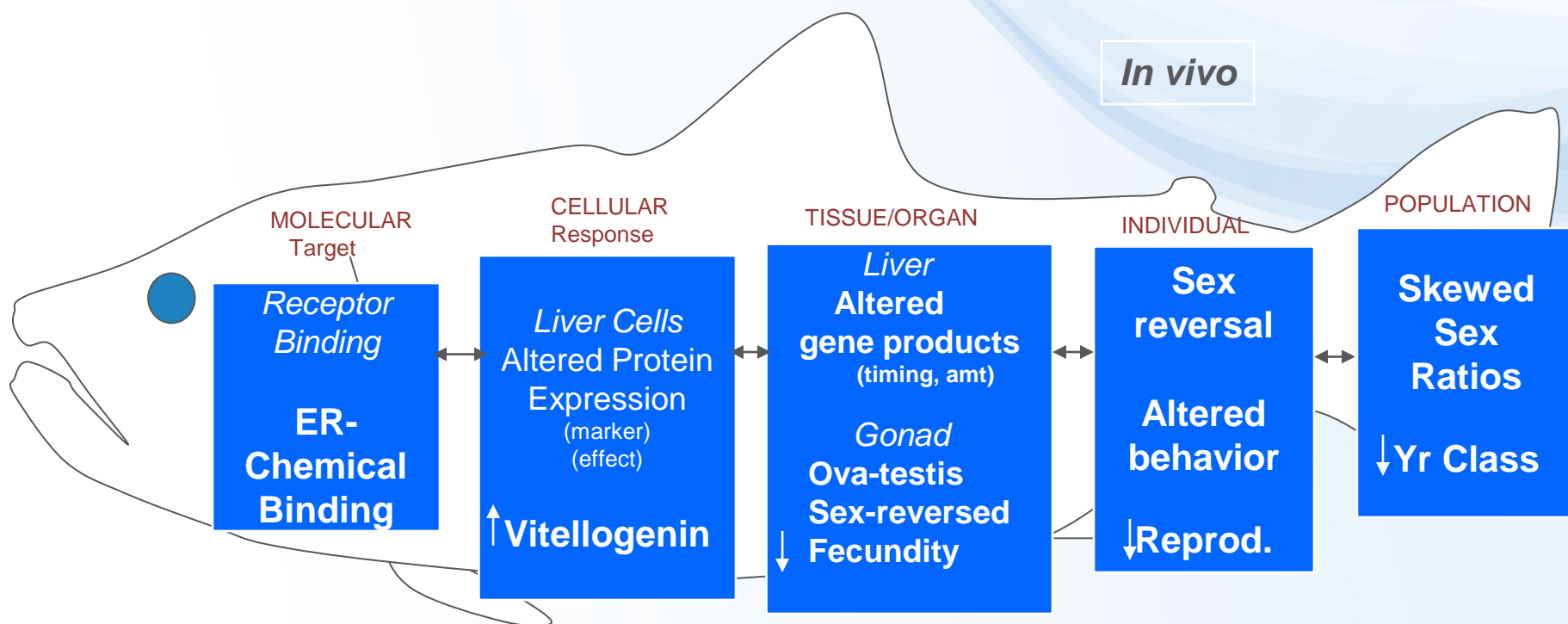
ER-mediated Reproductive Impairment

Measurements across levels of biological organization



Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

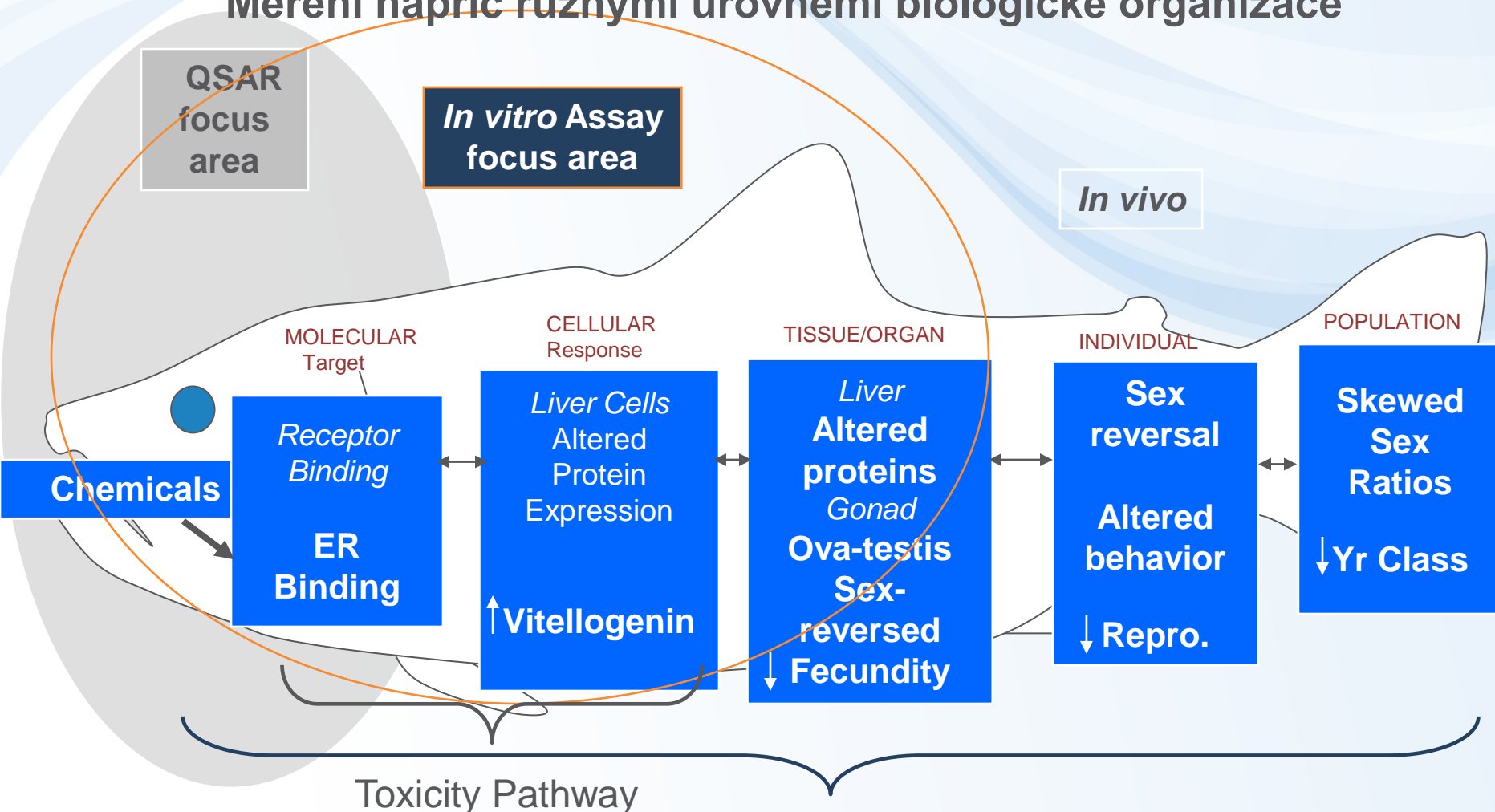


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

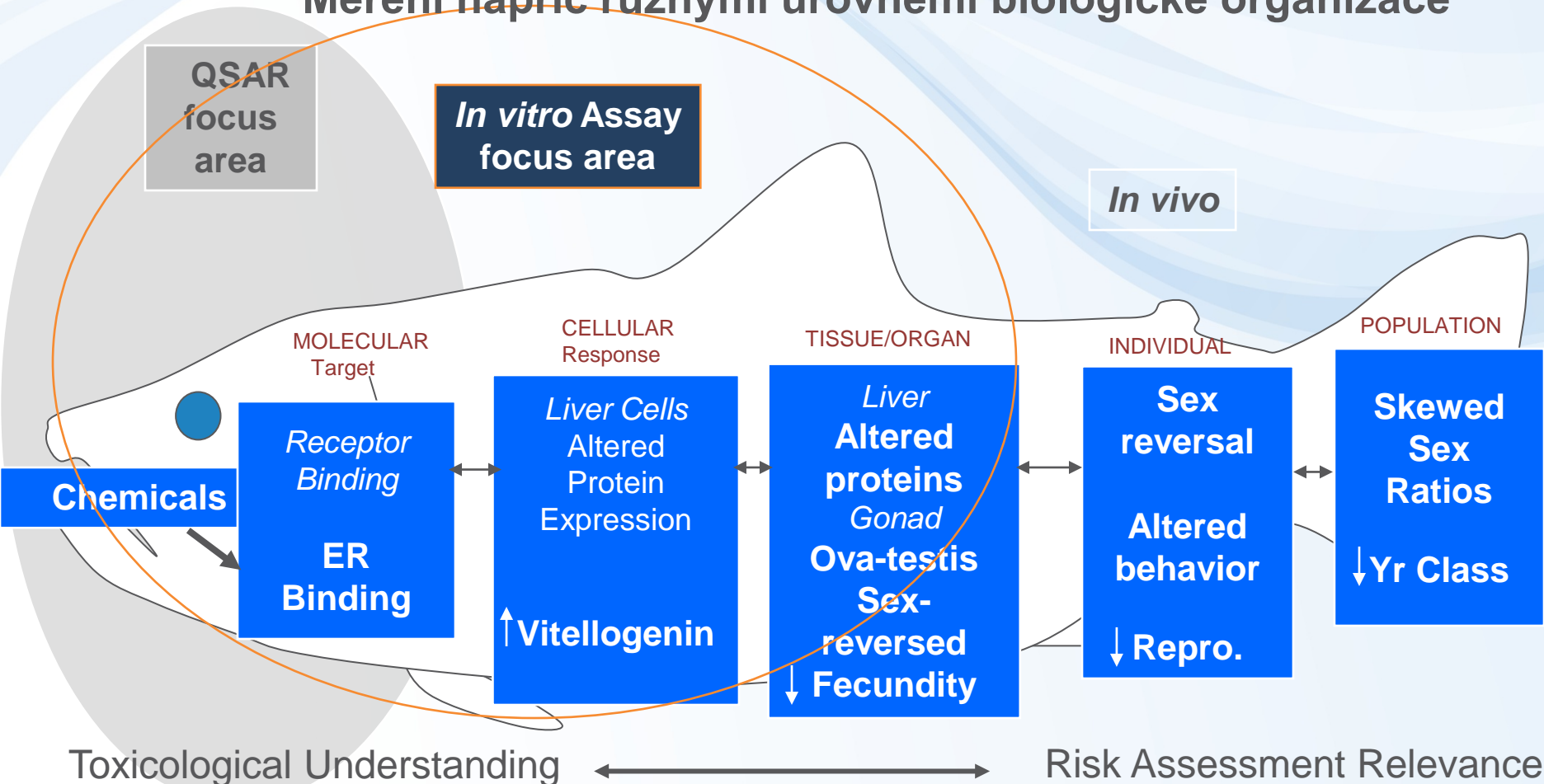
Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



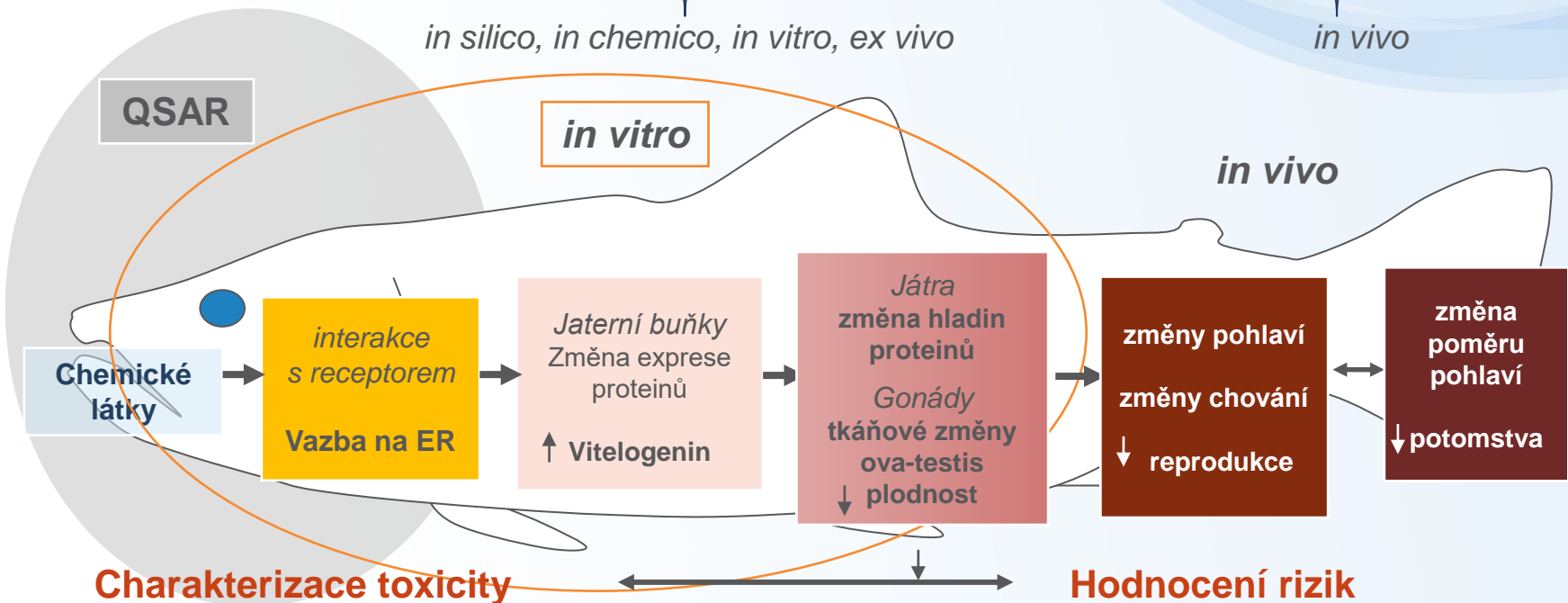
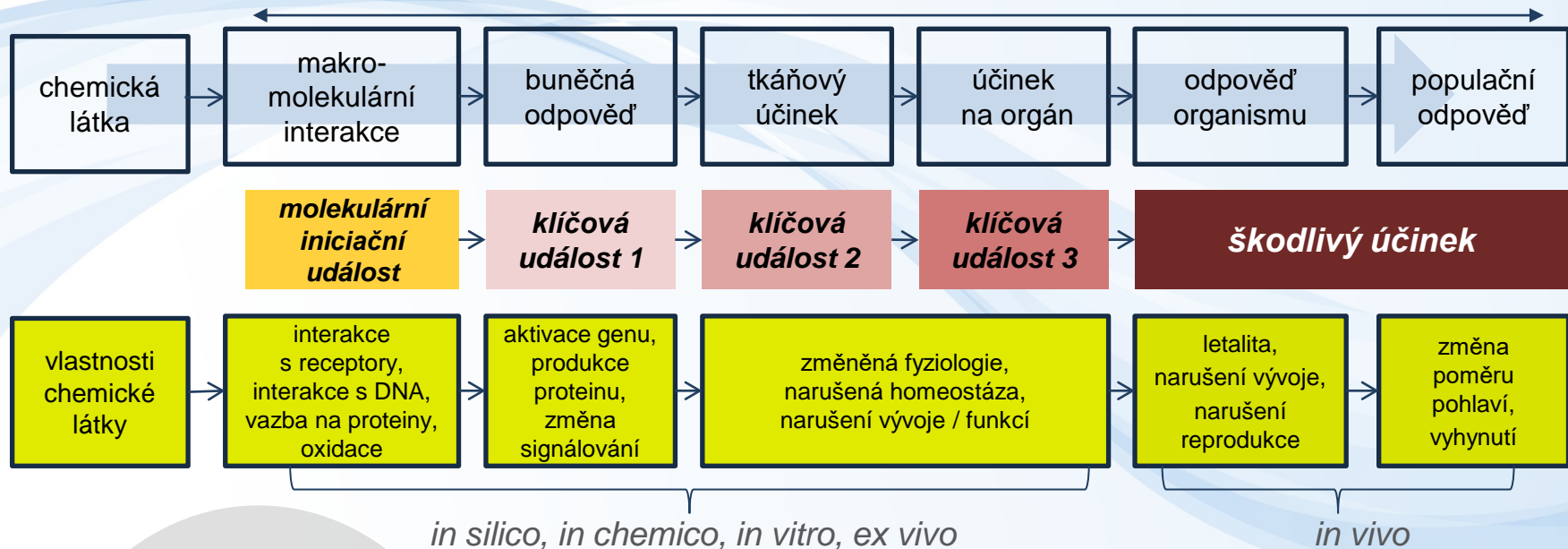
Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)

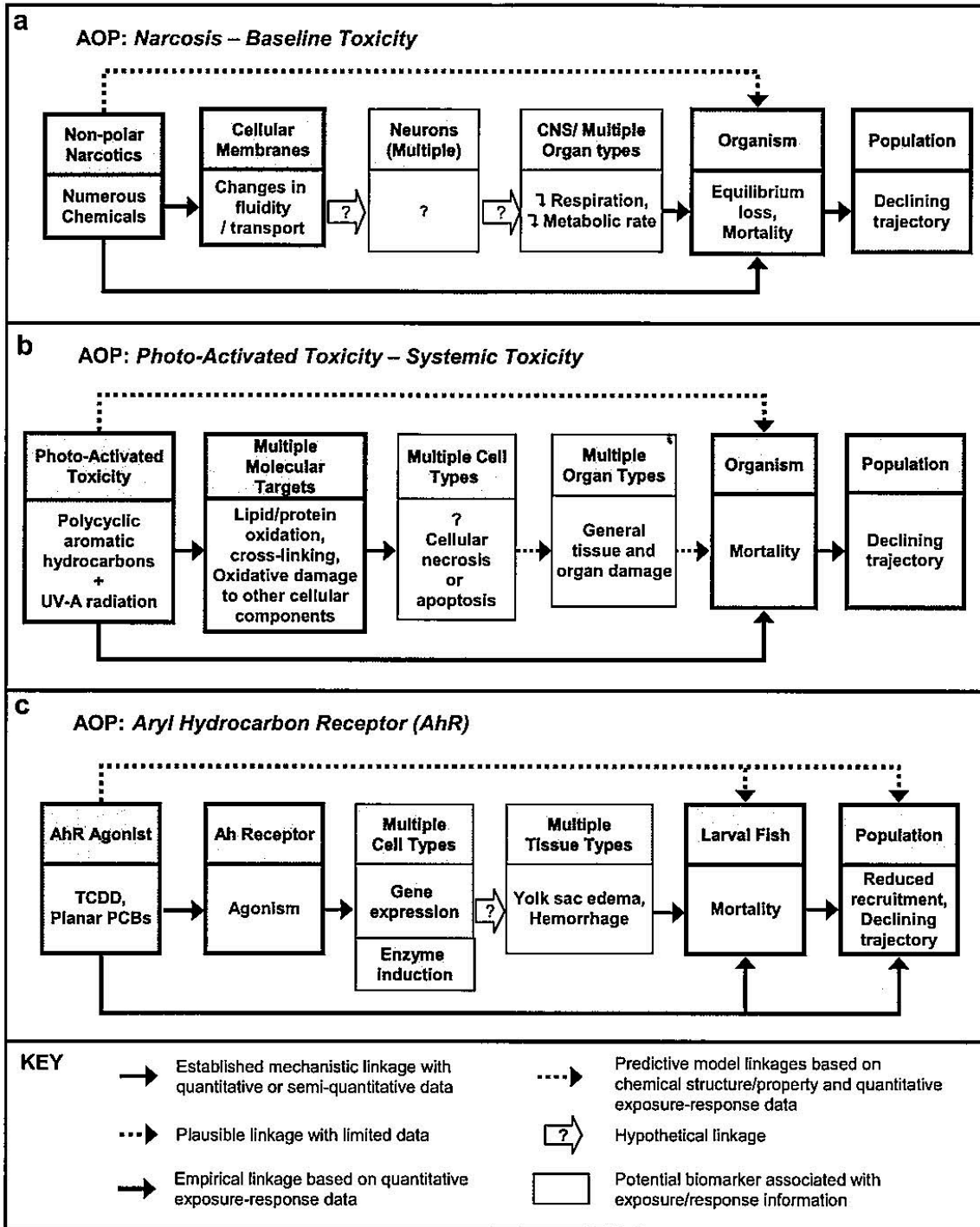
ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Dráha škodlivého účinku





Ankley et al. (2010) Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 29, Issue 3, pages 730–741, March 2010. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.34/pdf>

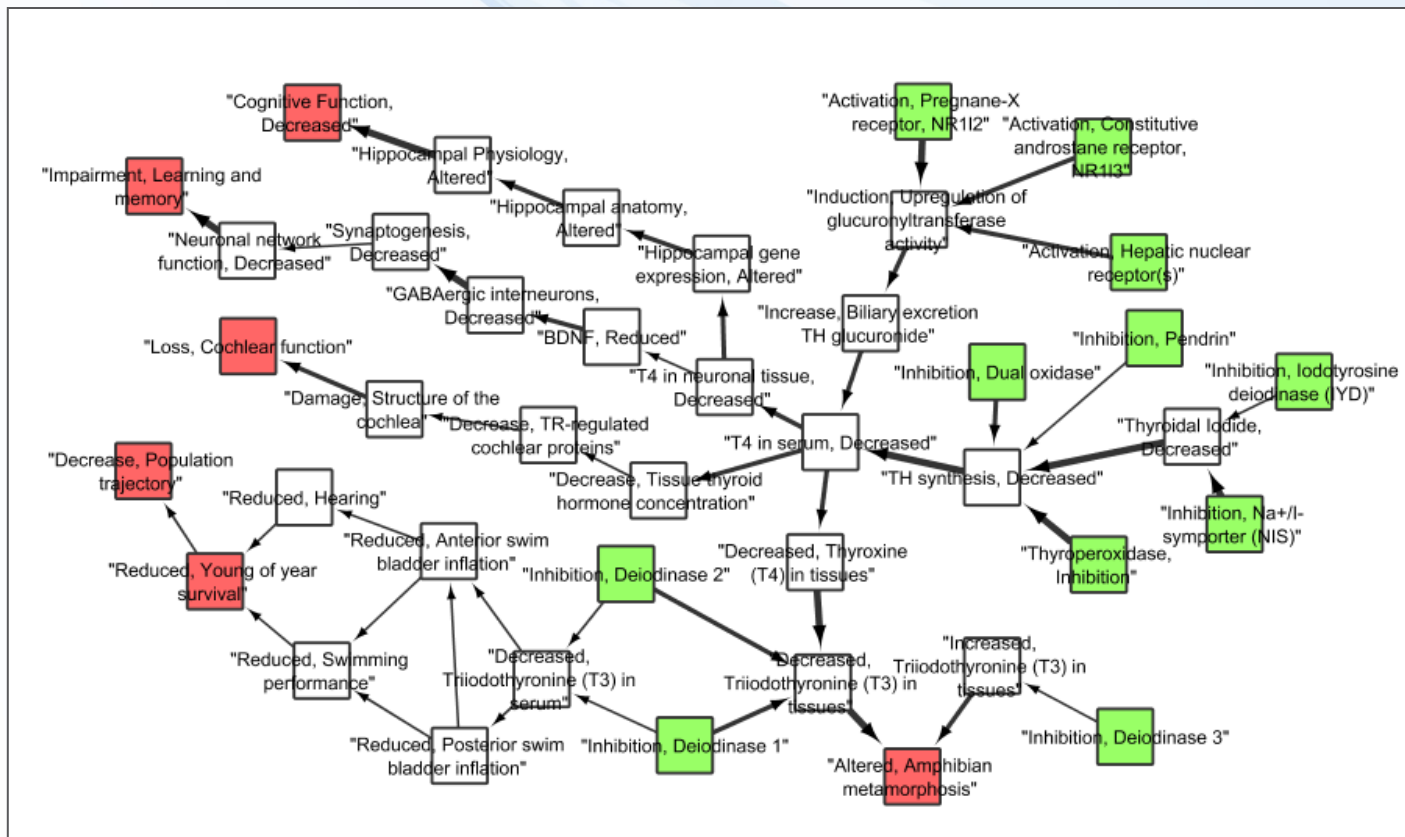
Realita – často propojené sítě AOPs (AOP networks)

Síť 14 AOPs

Narušení regulace
thyroidních hormonů –
jejich pokles v krvi



Škodlivé účinky na
vývoj obratlovců



Vývoj a Rámec AOP / MOA

Mezinárodní spolupráce – vývoj rámců a modelů

OECD – Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway, AOP)

WHO – Mechanismy účinku (Mode of action, MOA)

- Koncept rozvíjen/podporován v rámci **OECD, USEPA, EC-JRC, USFDA, WHO, US Army**
- **OECD Guidance document & a template for developing and assessing adverse outcome pathways (No. 184)**
 - Pravidla pro vývoj, hodnocení a schvalování AOP
 - Formální proces
- Vývoj & podpora informačních nástrojů pro **rychlé, široce dostupné sdílení již vytvořených AOP a pro budování nových AOP**
- => Inspirace sociálními médii, crowd-sourcing



AOPs = Global strategy with support from OECD, EU, USEPA

OECD AOP Development and Review Process

- EAGMST: Extended Advisory Group on Molecular Screening & Toxicogenomics – dohlíží na vývoj AOPs, jejich formální hodnocení
- Development & Support of Information Tools for rapid, widely accessible, and collaborative sharing of established AOPs and building new AOPs
- Social media tools, crowd-sourcing

Formalization



Organisation for Economic Co-operation and Development

ENV/JM/MONO(2016)12

Unclassified

English - Or. English

14 February 2018

ENVIRONMENT DIRECTORATE
JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY
ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY

Cancels & replaces the same document of 27 January 2017

USERS' HANDBOOK SUPPLEMENT TO THE GUIDANCE DOCUMENT FOR
DEVELOPING AND ASSESSING AOPs

Series on Testing & Assessment

No. 233

Series on Adverse Outcome Pathways

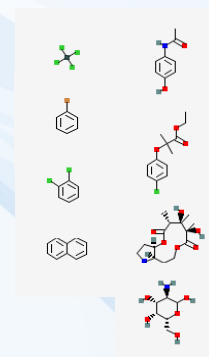
No. 1

AOP Assessment

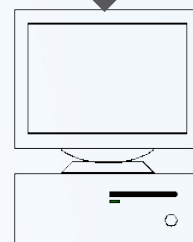
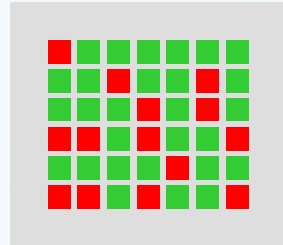
- Completeness (reliability & robustness)
- Qualitative Understanding
- Weight-of-Evidence supporting AOP
- Quantitative Understanding

Cíle a využití AOP konceptu

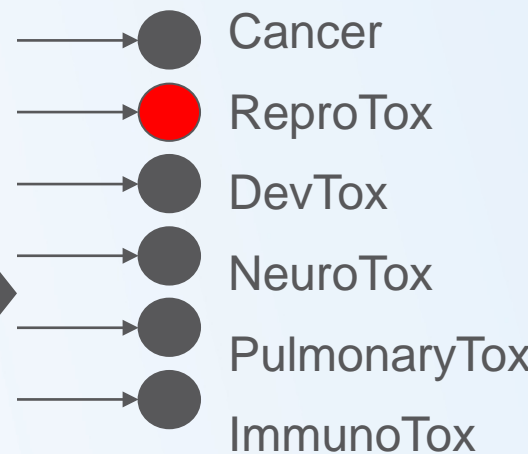
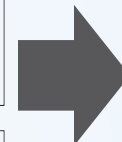
- porozumět toxicitě látek na molekulární úrovni
- Používat co nejméně pokusných zvířat (principy 3R)
- Postavit prediktivní modely
- Skríníng a prioritizace
- Studovat a hodnotit mnoho látek – zaměřit se na chybějící informace
- kombinovat High-throughput screening s počítačovými modely
- Zlepšit možnosti využití informací a dat o mechanismech účinku pro **hodnocení rizik a regulační účely**



in vitro testing



Bioinformatics/
Machine Learning



Využití dráhy škodlivého účinku

Základ pro:

Extrapolace mezi chemickými látkami

Extrapolace mezi druhy

Extrapolace mezi úrovněmi biologické organizace

Definování parametrů charakterizace rizika, které potřebujeme zjistit:

- Prioritizace chemických látek pro další testování (využití *in silico* modelování)
- Detailnější hodnocení rizika (např. stanovení referenční dávky, koncentračních limitů)

Typ potřebné informace se liší i dle akceptovatelné míry nejistoty



AOP = Mezinárodní strategie podporovaná OECD, EU, USEPA



OECD.org

Data

Publications

More sites



News

Job vacancies



> A to Z

Search oecd.org



OECD Home

About

Countries ▾

Topics ▾

> Français

[OECD Home](#) > [Chemical safety and biosafety](#) > [Testing of chemicals](#) > Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics

> Testing of chemicals

> Assessment of chemicals

> Risk management of chemicals

> Chemical accident prevention, preparedness and response

> Pollutant release and transfer register

> Safety of manufactured nanomaterials

> Agricultural pesticides and biocides

> Biosafety - BioTrack

Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics

WHAT'S NEW

SURVEY ON ADVERSE OUTCOME PATHWAYS (AOPS) TO IDENTIFY DEVELOPMENT PRIORITIES

The OECD has launched a survey to explore the utility of AOPs for regulatory assessment of chemicals and to identify development priorities. The objective is to collect feedback on how the AOP concept and/or existing AOPs are already being used for regulatory purposes, to understand where they fall short regarding their utility, and to identify what directions and priorities future AOP development work should embrace to increase their impact on regulatory toxicology and chemical risk assessment.

The survey is mainly for chemical safety regulators who are experiencing a transition in their work towards an increased use of 'alternative' methods and AOPs. However, stakeholders that come from the regulated community and environmental NGOs are also welcome to participate.

> **The survey is now closed. Thank you for your submissions.**

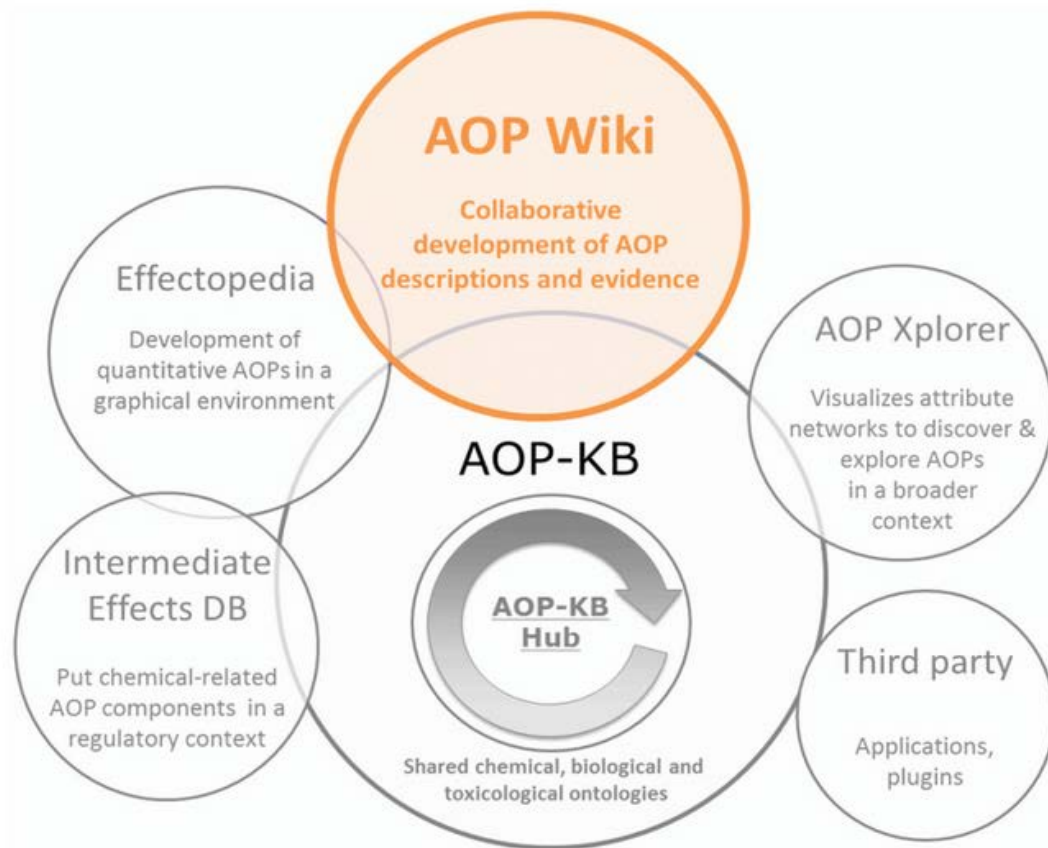
OECD-sponsorovaná AOP znalostní databáze (AOP Knowledgebase)

- Effectopedia (OECD)
- *AOP Xplorer (US Army Corps of Engineers)*
- *Intermediate Effects DB (JRC)*
- AOP Wiki
- <https://aopwiki.org/aops>
- Platforma odvozená od Wiki - pro vývoj a sdílení AOPs
- Společný projekt Evropské komise - JRC a [U.S. Environmental Protection Agency \(EPA\)](#)
- Editace možná pouze členy OECD AOP projektu



Adverse Outcome Pathway Knowledge Base (AOP-KB)

|| AOP-KB || Background || How to contribute ||



<http://aopkb.org/>

Hlavní dokumenty

OECD Guidance document and a template for developing and assessing adverse outcome pathways (Series No. 184, Series on Testing and Assessment)

Handbook for AOP developers

Please click on any of the AOP-KB elements you want to use.

Please note that the AOP-KB is work in progress and more elements will become available over time.

- <http://www.effectopedia.org/> -> odkaz na program pro spuštění Effectopedia
- Vizuální znázornění AOPs v **biologickém kontextu**:
 - Druh organismu, Životní stádium, Pohlaví, Trvání expozice, ...
- **Kvantitativní vztahy**
- **ADME** (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)
- Otevřená platforma
- Není nutný formální souhlas pro přispěvatele
- Kredit pro autory i recenzenty/editory
- Možno vkládat i fragmenty informací, nejen celé AOPs
- Propojení s AOP Wiki & jinými (Export<->Import)



Endokrinní disrupce (ED)

narušení hormonální rovnováhy organismů – negativní následky pro celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové a behaviorální funkce

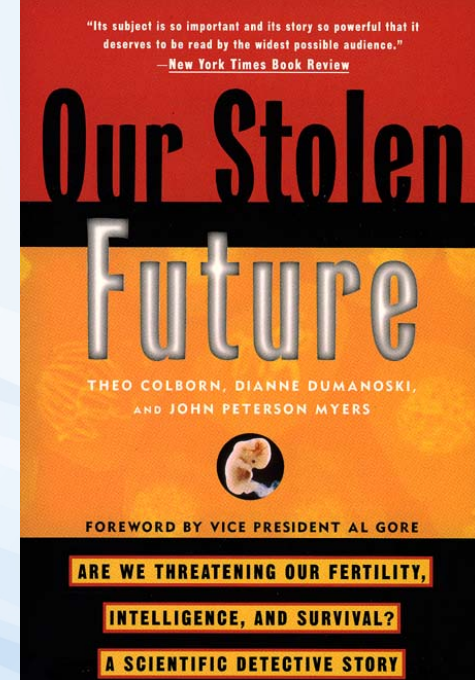
Endokrinní disruptory (EDCs)

látky nebo směsi, které mají schopnost způsobit endokrinní disrupci u zasažených organismů či potomstva



přímo nebo nepřímo ovlivňují hormonální systém

Definice platná od roku 2002 vymezuje endokrinní disruptor jako „*exogenní látku nebo směs látek, která vede ke změně funkce/funkcí endokrinního systému, a má tak nepříznivý účinek na zdraví intaktního organismu, jeho potomků nebo (sub)populací*“



Endokrinní disruptory

- **exogenní látky nebo směsi látek, které mohou narušovat funkci endokrinního systému a následně poškozovat zdraví jedince, jeho potomstva či dalších generací**
- **nepříznivě ovlivňují zdraví lidí a zvířat**
- **obavy z působení endokrinních disruptorů rostou od devadesátých let minulého století**
- **expozice člověka a celého životního prostředí těmto látkám vysoká**

- široké spektrum látek
- persistentní a „pseudo“-persistentní
- antropogenní (průmyslové látky, pesticidy, látky z předmětů běžné spotřeby, z detergentů, čistících prostředků, kosmetických přípravků) i přírodní

Příklady

- **ftaláty (změkčovadla v PVC)**
- **endosulfan (insekticid)**
- **bisphenol A (fungicid, plastové obaly potravin, dětské umělohmotné lahve)**
- **atrazin (široce používaný herbicid v zemědělství)**
- **dioxiny (vznik při spalování odpadu s chlórem)**

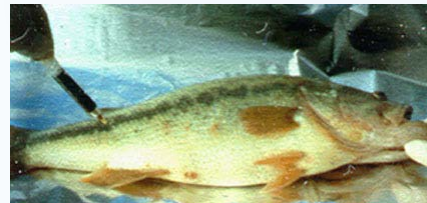


Endokrinní disrupce (ED)

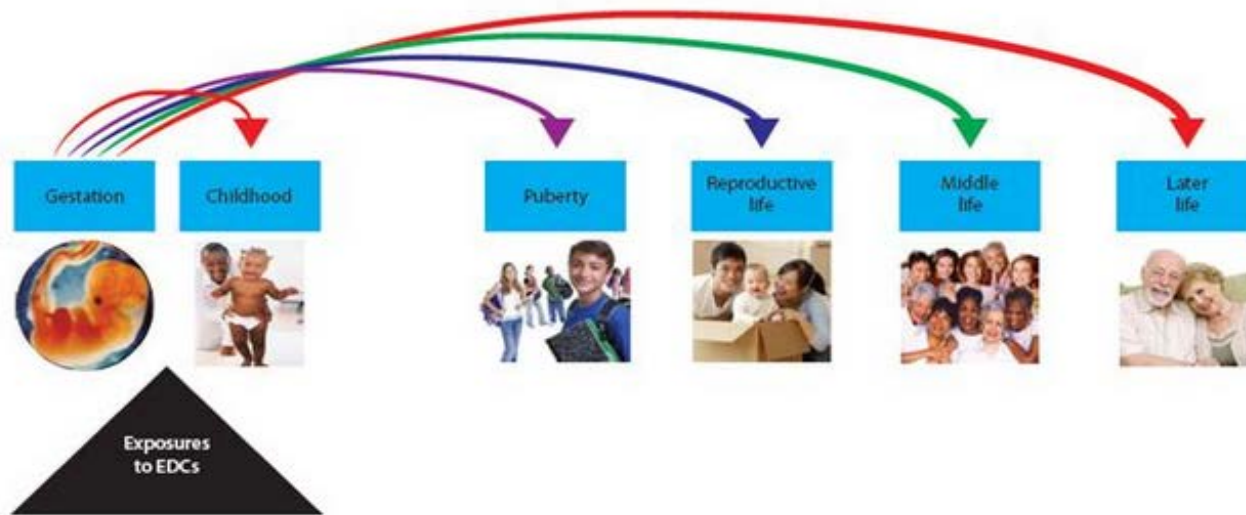
Hormonální regulace biologických procesů = společná charakteristika živočišného kmene – projevy ED u obratlovců i bezobratlých

- Účinky se pravděpodobněji projeví v mláďatech, než v dospělých
- Účinky jsou velmi ovlivňovány načasováním expozice - stupněm vývoje, na kterém byl jedinec exponován
- Účinky odlišné během doby života organismu (fetus vs. embryo vs. dospělec)
- Účinky často opožděné - ke kompletním projevům nemusí dojít až do dospělosti

- opožděné účinky
- nízké dávky
- okna senzitivity



Důležitým faktorem pro expozici endokrinním disruptorům jsou různá období vývoje (vývoj plodu a puberta - nejcitlivější)



endokrinní disruptory mohou narušovat endokrinní systém různými způsoby

Zvyšuje se také počet důkazů o tom, že endokrinní disruptory mohou společně vytvářet dodatečné účinky („účinek směsi látek“ nebo „koktejlový efekt“), takže expozice kombinaci endokrinních disruptorů může mít nepříznivé účinky při koncentracích, při nichž individuálně nebyl zjištěn žádný účinek



Následky ED ve volně žijících živočiších

- Snížená plodnost, líhnivost, kvalita a kvantita spermatu
- Změněný poměr pohlaví, feminizace, maskulinizace
- Snížené přežívání mláďat
- Změna funkce imunitního systému
- Změny chování
- Malformace pohlavních orgánů
- Vymizení populací – narušení ekosystémů



Vlivy v lidské populaci?

- Poruchy reprodukce, vývoje, chování
- Změny poměru pohlaví
- Poruchy imunitního systému
- Metabolické poruchy
- Onemocnění štítné žlázy
- Hormonálně podmíněné nádory



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

news@nature.com
The best in science journalism

Published online: 21 October 2005; | doi:10.1038/news051017-16

Pollution makes for more girls

The stress of dirty air skews sex ratios in Sao Paulo.

Erika Check

Toxic fumes favour the fairer sex, a group of researchers in Brazil has found.

Jorge Hallak and his team at the University of Sao Paulo turned up the surprising result by studying babies born in their city. They divided the metropolis of 17 million people into areas of low, medium and high air pollution, using test results from air-quality monitoring stations. They then studied birth registries of children born from 2001 to 2003.

The team found that 48.3% of babies were female in the least polluted areas, but 49.3% were female in the dirtiest parts of town. After measuring the ratio of boys to girls born in all the areas, they



Babies born in high pollution areas are more likely to be girls.

© Alamy

Endokrinní disruptory

Syntéza hormonů (1)

Transport hormonů (2)

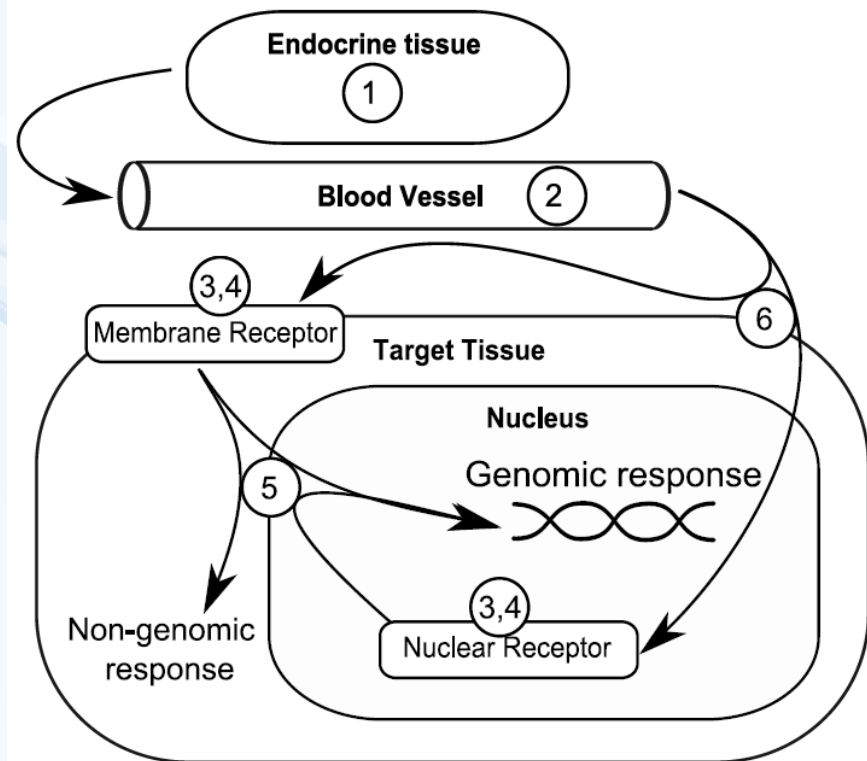
Inhibice

Interakce s receptory (3, 4)

„Cross-talk“ s jinou signální dráhou (5)

Stimulace

Metabolizace hormonů (6)



Počátky řešení problematiky endokrinních disruptorů (ED)

- na regulatorní úrovni spadají do závěru minulého století
- 1996 založena poradní komise pro skrínink a testování endokrinních disruptorů v USA (EDSTAC; Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)
- byla zahájena speciální aktivita OECD zaměřená na testování a hodnocení endokrinních disruptorů (**EDTA; Endocrine Disruptors Testing and Assessment**).
- **OECD** v roce 2002 navrhlo **koncepční rámec pro EDTA**, který byl **revidován v roce 2012**
- V rámci OECD byla od roku 2002 validována řada *in vitro* i *in vivo* testů pro detekci a charakterizaci endokrinně aktivních látek
- Na základě doporučení EDSTAC připravila americká Agentura na ochranu životního prostředí (**US EPA**) dvoustupňový program na skrínink endokrinních disruptorů (**EDSP; Endocrine Disruptor Screening Program**).
- 2009 byl ve Spojených státech vyhlášen první seznam vybraných prioritních látek k hodnocení na konkrétní sadě testů

Evropský parlament přijal v roce 1998 usnesení o endokrinních disruptorech

Evropská komise v prosinci 1999 přijala a uveřejnila Strategii Společenství v oblasti endokrinních disruptorů

- vytyčen rámec a stanoveny krátkodobé, střednědobé a dlouhodobé aktivity s cílem řešení problematiky endokrinních disruptorů v Evropě.

VĚDECKÉ POZNATKY O ENDOKRINNÍCH DISRUPTORECH

Od přijetí strategie Společenství v roce 1999 bylo zveřejněno několik tisíc recenzovaných vědeckých publikací o povaze narušování činnosti endokrinního systému, o jeho příčinách a důsledcích pro lidské zdraví a volně žijící živočichy.

Od roku 1999 se zvýšila průkaznost vědeckých poznatků o vztahu mezi expozicí endokrinním disruptorům a lidskými onemocněními nebo dopadem na volně žijící živočichy.

Evropská unie vydala čtyři hlavní legislativní nařízení, které přímo obsahují požadavky ohledně hodnocení potenciálu látek či jejich směsí působit endokrinní disrupci:

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH)
- č.1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh (Plant Protection Product Regulation)
- č.528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání (Biocidal Product Regulation)
- č.1223/2009 o kosmetických přípravcích (Cosmetics Products Regulation)

v rámci těchto legislativ stále neexistuje jednotný přístup k tomu, jak identifikovat a hodnotit potenciál látek a směsí způsobovat endokrinní disrupci

Kritéria pro pesticidy a biocidy:

- Vědecká kritéria, která 2016 Evropská Komise schválila, vycházejí z definice endokrinních disruptorů vypracované Světovou zdravotnickou organizací (WHO): „exogenní látka či směs, která mění funkci (funkce) endokrinního systému, a má tak nepříznivý účinek na zdraví intaktního organismu, jeho potomků nebo (sub)populací“
- ??co jsou negativní účinky způsobené primárně mechanismy endokrinní disrupce
- (eko)toxikologické testy, které by je zhodnotily, stále ve vývoji a předmětem intenzivní diskuse

Guidance for the identification of endocrine disruptors in biocides and pesticides in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009

**European Chemical Agency (ECHA) and European Food Safety Authority (EFSA)
with the technical support of the Joint Research Centre (JRC)**

- doi: 10.2903/j.efsa.2018.5311
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5311>
- Popisuje jak provést identifikaci nebezpečnosti ohledně endokrinně-disruptivních vlastností dle vědeckých kritérií z evropské legislativy pro pesticidy a biocidy (Commission Delegated Regulation (EU) 2017/2100 and Commission Regulation (EU) 2018/605 for biocidal products and plant protection products)

OECD GD 150 Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption (2018) – dokument zahrnující normy testů pro hodnocení endokrinně-disruptivních vlastností látek

<http://www.oecd.org/publications/guidance-document-on-standardised-test-guidelines-for-evaluating-chemicals-for-endocrine-disruption-2nd-edition-9789264304741-en.htm>

Pokyny ke zkoušení endokrinních disruptorů jsou uvedeny v konceptním rámci OECD pro testování a hodnocení endokrinních disruptorů

OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters

Koncepční rámec OECD pro testování a hodnocení endokrinních disruptorů uvádí seznam Pokynů pro využití OECD a standardizovaných testovacích metod, které jsou vyvíjeny nebo navrhovány a které lze použít k hodnocení chemických látek pro endokrinní disrupci. Účelem konceptního rámce je poskytnout návod k dostupným testům, které mohou poskytnout informace pro posouzení endokrinních disruptorů, ale nejsou zamýšleny jako strategie testování.

- Úroveň 1 - Existující údaje a dostupné informace
- Úroveň 2 - Testy *in vitro* poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech / drahách
- Úroveň 3 - Zkoušky *in vivo* poskytující data o vybraných endokrinních mechanismech / drahách
- Úroveň 4 - Testy *in vivo* poskytující údaje o nepříznivých účincích na relevantní endokrinní cílové parametry
- Úroveň 5 - Testy *in vivo* poskytující komplexnější údaje o nepříznivých účincích na relevantní endokrinní cíle v rozsáhlejších částech životního cyklu organismu

Úroveň 1 - Existující údaje a dostupné informace

- **Fyzikálně - chemické vlastnosti** (molekulová hmotnost, rozpustnost, reaktivita, biologická odbouratelnost...)
- **Všechny dostupné (eko)toxikologické informace** ze standardizovaných i nestandardizovaných testů
- **Propojování informací, kategorizace**, pomocí modelů **predikce účinku** (model ADME „absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování“ a popis osudu látky v organismu), **modelování kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou** (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)

Úroveň 2 - Testy in vitro poskytující údaje o vybraných endokrinních mechanismech / drahách

- Vazebná afinita k estrogenovému nebo androgenovému receptoru (OECD TG 493)
- Aktivace estrogenního receptoru (OECD TG 455 a TG 457)
- Test na aktivaci androgenního rec. (OECD TG 458)
- Steroidogeneze in vitro (OECD TG 456)
- Testy proliferace buněk MCF-7 (ER ant / agonista)
- Narušení regulace thyroidního hormonu (syntéza, transport)
- Jiné testy podle potřeby



Úroveň 3 - Zkoušky *in vivo* poskytující data o vybraných endokrinních mechanismech / drahách

Savci

- Uterotropní test na hlodavcích (OECD TG 440)
- Hershbergerův test (OECD TG 441) je založen na změnách hmotnosti pěti tkání závislých na androgenech u krysích peripubertálních samců



Ostatní organismy



- Thyroidní signálování v embryích žáby rodu *Xenopus*
- Test metamorfózy obojživelníků (OECD TG 231)
- Reprodukční screeningový test ryb (OECD TG 229)
- 21 denní rybí test (OECD TG 230), sledování estrogenní a androgenní aktivity, inhibice aromatázy
- Měření antiandrogenity maskulinizované samice koljušky
- *Xenopus* embryonic thyroid signalling assay (XETA)



Úroveň 4 - Testy *in vivo* poskytující údaje o nepříznivých účincích na relevantní endokrinní cílové parametry



Savci

- 28 denní studie orální toxicity s opakovanou dávkou na hlodavcích (OECD TG 407).
- 90 denní studie orální toxicity s opakovanou dávkou na hlodavcích (OECD TG 408).
- Studie reprodukční toxicity 1 generace –krysa, potkan, myš (OECD TG 415).
- Samčí pubertální test-vývoj a thyroidní funkce (GD 150, kapitola C4.3) - Male PP Assay
- Samičí pubertální test -vývoj a thyroidní funkce (GD 150, kapitola C4.4) - Female PP Assay
- Test na dospělých samcích (GD 150, kapitola příloha 2.5).
- Screening prenatalní vývojové toxicity (OECD TG 414).
- Screening chronické toxicity a karcinogenity (OECD TG 451-3).
- Reprodukční screeningový test (OECD TG 421).
- Kombinovaný 28denní / reprodukční screeningový test (OECD TG 422).
- Vývojová neurotoxicita (OECD TG 426).

Ostatní organismy

- Test pohlavního vývoje ryb (OECD TG 234).
- Test růstu a vývoje obojživelníků – 16 týdnů (OECD TG 241).
- Test reprodukce ptáků (OECD TG 206).
- Testy na měkkýších- část životního cyklu (OECD TG 242 a TG 243).
- Test toxicity na pakomárech (TG 218 a TG 219).
- Reprodukční test *Daphnia magna* (OECD TG 211).
- Test reprodukce žížal (OECD TG 222).
- Test reprodukce rousic (OECD TG 220).
- Zkouška toxicity sedimentů na kroužkocích pomocí spikovaného sedimentu (OECD TG 225).
- Reprodukční půdní test dravých roztočů (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) (OECD TG 226).
- Reprodukční test v půdě - chvostoskoci (OECD TG 232).

Úroveň 5 - Testy *in vivo* poskytující komplexnější údaje o nepříznivých účincích na relevantní endokrinní cíle v rozsáhlejších částech životního cyklu organismu

Savci



- Rozšířená jednogeneční studie reprodukční toxicity (OECD TG 443)
- Studie reprodukční toxicity druhé generace (OECD TG 416)

Ostatní organismy



- FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) toxicita pro kompletní životní cyklus ryb (př. vajíčko-vajíčko)
- Rozšířený jedno-generační reprodukční test s Medakou (OECD TG 240).
- Dvougenerační test reprodukční toxicity u ptáků
- Test toxicity - životní cyklus korýšů
- Reprodukční a vývojový test s korýši
- Test toxicity sedimentů - životní cyklus pakomárů (OECD TG 233)
- Testy životního cyklu měkkýšů
- Multigenerační test s *Daphnia magna*

Screeningový program endokrinních disruptorů (EDSP) – US EPA

- Dvoustupňový přístup pro screening chemických látek.

úroveň 1 - identifikace látek, které mají potenciál interagovat s endokrinním systémem

- kombinace *in vitro* a krátkodobých *in vivo* testů zaměřených na estrogení, androgení a thyroïdní dráhy a steroidogenezi
- Chemikálie, u kterých se zjistí, že vykazují potenciál interakce s estrogenovými, androgeními nebo thyroïdními hormonálními systémy, budou testovány na úrovni 2.
- Do budoucna – nahradit některé testy v 1. stupni – lepšími *in vitro* testy a také *in silico* testy

úroveň 2 - identifikace nepříznivých účinků na endokrinní systém, stanovení kvantitativního vztahu mezi dávkou a tímto nepříznivým účinkem - dlouhodobější a vícegenerační studie

- Výsledky zkoušek úrovně 2 budou kombinovány s dalšími informacemi o nebezpečnosti a posouzení expozice dané chemické látky, což povede k posouzení rizik, informování o opatřeních ke zmírnění rizika a regulační rozhodnutí týkajících se chemických látek.

úroveň 1 - identifikace látek, které mají potenciál interagovat s endokrinním systémem

- EPA v říjnu 2009 zveřejnila baterii jedenácti *in vitro* testů a krátkodobých testů *in vivo*, hodnotících širokou škálu koncových bodů (vazba na receptor, steroidogeneze, metamorfóza obojživelníků, reprodukce ryb, thyroïdní funkce, vliv na vývoj...) včetně metodiky testů a přesného postupu

- Baterie byla navržena tak, aby fungovala jako celek, zahrnuje dva hlavní aspekty:

Schopnost testu detekovat účinky zprostředkované estrogény a androgény různými způsoby působení, zejména vazby na receptor (agonista a antagonisty), transkripční aktivace, steroidogeneze a zahrnuje **vzájemné doplňování *in vitro* a *in vivo* testů**

- Testy na hlodavcích a obojživelnících *in vivo* byly navrženy na základě jejich schopnosti detekovat přímé a nepřímé účinky na thyroïdní funkce

úroveň 1 - identifikace látek, které mají potenciál interagovat s endokrinním systémem

In vitro

- Estrogenní receptor (ER) - vazba
- Estrogenní receptor (hER α) transkripční aktivace – lidská buněčná linie (HeLa-9903)
- Androgenní receptor (AR) - vazba
- Steroidogeneze – lidská buněčná linie (H295R)
- Aromatáza – lidské rekombinantní mikrozomy

In vivo

- Uterotropní test na hlodavcích
- Hershbergerův test
- Samčí pubertální test-vývoj a thyroïdní funkce
- Samičí pubertální test-vývoj a thyroïdní funkce
- Test metamorfózy obojživelníků
- Reprodukční screeningový test ryb

úroveň 2 - identifikace nepříznivých účinků na endokrinní systém, stanovení kvantitativního vztahu mezi dávkou a tímto nepříznivým účinkem

Dvougenerační test reprodukční toxicity u ptáků - křepelka
Rozšířený jedno-generační reprodukční test s Medakou
Test růstu a vývoje obojživelníků (LAGDA)

Další mechanismy účinku

Zavádění biomarkerů relevantních pro endokrinní disrupci do realizovaných *in vivo* testů

Řada *in vitro* testů ve vývoji a optimalizaci – aktuální evropské projekty

Zaměření zejména:

- Thyroidní regulace
- Metabolická disrupce
- Neurotoxicita a neurovývoj
- Poruchy reprodukce u obou pohlaví

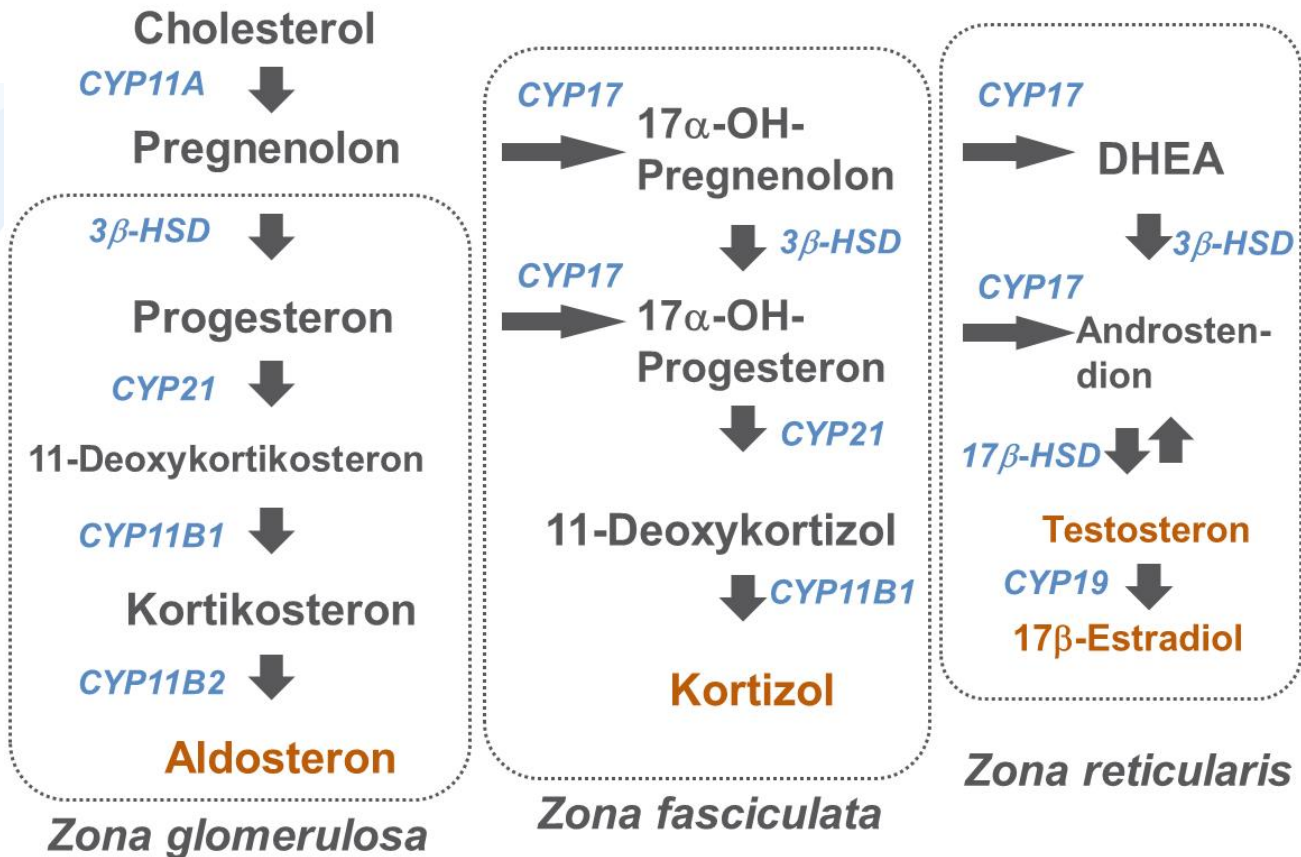
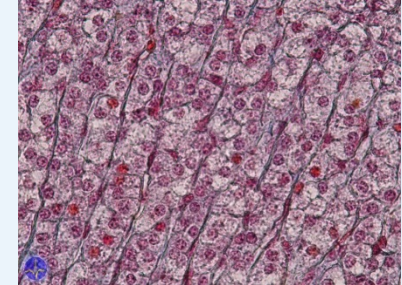
IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment = integrované přístupy k testování a hodnocení) založené na AOPs

2 přístupy:

1. Jednoduché rychlé screeningové metody
2. Pokročilejší – relevantnější systémy – náročnější, dražší
 - odvozené od iPSC (kmenových buněk)
 - 3D kultivace
 - Ko-kultury různých typů buněk – relevance pro tkáně



Produkce hormonů Steroidogeneze - H295R



Lidská kůra nadledvin
- účinky na různých
úrovních steroidogenní
dráhy

- modulace genů
- hladiny proteinů
- aktivity enzymů
- produkované hormony

- OECD 456 - Informace o účinku látek na produkci testosteronu a estradiolu

US EPA - EDSP



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Endokrinní disrupce - savci

Narušení funkcí endokrinního systému, hormonální regulace

Uterotrofický screeningový test

- použití pro testování estrogenity látek (xenoestrogenů) - méně často pro testování antiestrogenity
- Princip: aplikace testované látky pohlavně nedospělým nebo kastrovaným samicím → statisticky signifikantní **zvýšení hmotnosti dělohy** závislé na dávce ve srovnání s kontrolní skupinou = důkaz estrogenního agonismu
- růst děložní tkáně je pod vlivem estrogenů

Hershberger screeningový test

- použití pro testování androgenity (xenoandrogenů) či antiandrogenity
- Princip: aplikace testované látky kastrovaným samcům → statisticky signifikantní **zvýšení hmotnosti přídatných pohlavních orgánů** závislé na dávce ve srovnání s kontrolní skupinou = důkaz androgenního agonismu (např.: prostata, semenné vajíčky)
- růst některých tkání u samců pod vlivem androgenů



Testy endokrinní disrupce na rybách

OECD No. 230: 21-day Fish Assay (21denní rybí test)

- A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition
- dospělci (samci i samice) exponovaní 21 dní
- danio, medaka, střevle
- na konci hodnoceny biomarkery - vitelogenin a sekundární pohlavní znaky

OECD No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay (Krátkodobý test reprodukce ryb)

- dospělci (samci i samice) střevle exponovaní 21 dní
- sledována produkce vajíček
- na konci hodnoceny biomarkery - vitelogenin a sekundární pohlavní znaky
- histopathologické hodnocení gonád samců i samic



Testy endokrinní disrupce na rybách

OECD No. 234: Fish Sexual Development Test (Test pohlavního vývoje ryb)

- Ryby exponovány od stadia oplozených vajíček až do ukončení pohlavního vývoje cca 60 dní po vykulení

na konci hodnoceno:

- biomarker – protein vaječného žloutku - vitelogenin
- poměr pohlaví – proporce samců, samic, intersexu a ryb s nediferencovaným pohlavím
- také prostřednictvím histologie gonád



Testy odhalující narušení endokrinního systému obojživelníků

Endokrinní disruptory (ED's) jsou xenobiotika narušující endokrinní systém živočichů.

U obojživelníků působí ED's na několika úrovních:

- v embryonálním a larválním období
- při metamorfóze
- v období diferenciaci gonád
- v období sekundární pohlavní diferenciaci a
- v dospělosti (narušením fyziologického chování)

Následkem předčasné metamorfózy vznikají extrémně malí jedinci, neschopní reagovat na změny přírodních podmínek, s omezenou možností žít se větší potravou a s nízkými energetickými rezervami. Některé ED's ovlivňují regulační systém pohlavních steroidů. Pokud takové ED's působí na populaci larev v období vývoje gonád, dochází ke změně poměru pohlaví.



Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Testy metamorfózy a vývoje

Cíl: prokázat, zda zkoumaná látka ovlivňuje rychlost metamorfózy.

Čtrnáctidenní test metamorfózy - dle metodiky U. S. EPA Endocrine Disruptor Screening and Testing Committee (EDSTAC) T I. – *Frog metamorphosis assay* (Federal Register, 1998).

Do testu jsou nasazeny larvy drápatky vodní (*Xenopus laevis*) ve vývojovém stadiu 60, tzn. těsně před dosažením metamorfózy.

Larvy jsou po celou dobu testu (14 dnů) vystaveny expozici zkoumané látky.

- obdobný test **OECD Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay – 21 dní**

Do testu jsou nasazeny larvy drápatky vodní (*Xenopus laevis*) ve vývojovém stadiu 51, tzn. před dosažením metamorfózy.

Larvy jsou po celou dobu testu (21 dnů) vystaveny expozici zkoumané látky.

Sledované parametry: stádium vývoje a průběh metamorfózy.

Doplňkové údaje: výška ocasního lemu, délka ocásku, těla a pánevních končetin, histologie štítné žlázy..

Výsledek testu: hodnota IC_{50} , což je koncentrace testované látky, která způsobí u 50 % larev inhibici metamorfózy.



Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Testy metamorfózy a vývoje

Sedmdesátidenní test metamorfózy

- Výhoda: prodloužená expozice larev zkoumané látky, lépe simuluje přírodní podmínky
- embrya nasazena do testu ve stádiu střední blastuly až časně gastruly
- každých 72 hodin výměna 50% expozičního média
- od pátého dne larvy denně krmeny
- 12ti hodinová fotoperioda a teplota vody $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Sledovány teplota, kyslík a pH, množství amoniaku.
- Po 70ti dnech ukončení - stanoveno vývojové stádium

- **Sledované parametry:** stádium vývoje a průběh metamorfózy.
- Posuzuje se výskyt malformací pánevních končetin a přežití larev.
- Doplnujícím vyšetřením může být ještě histologické vyšetření štítné žlázy
- **Doplňkové údaje:** výška ocasního lemu, délka ocásku, těla a pánevních končetin.

- **Výsledek testu:** 5 d LC50, 70 d LC50, IC50 (koncentrace testované látky, která způsobí u 50 % larev inhibici metamorfózy).



Kontaminovaná lokalita

Referenční Lokalita



Zadní končetina



Zadní k.

Rana catesbeiana, American bullfrog

Photo courtesy of Dr. James Carr



Testy endokrinní disrupce obojživelníků

Sledování sexuálního vývoje

- Vlivem ED's dochází k poruchám vývoje gonád – mění se poměr počtu samců a samic a také se objevuje intersex – tzn. současná přítomnost ovarii (vaječnicků) i testes (varlat) u jednoho jedince
- Larvy drápatky *Xenopus laevis* jsou od stáří pěti dnů vystaveny působení testované látky.
- Pozitivní kontrola 17 β -estradiol a dihydrotestosteron.
- Po ukončení metamorfózy (po 78 dnech) se u každého jedince provádí histologické vyšetření gonád a svalu *m. dilatator laryngis* - jeho velikost patří mezi druhotné pohlavní znaky u drápatky vodní. U samců je tento sval vyvinut mohutněji. Při působení xenobiotik s androgenními účinky se *m. dilatator laryngis* zvětšuje.



Endokrinní disrupce (ED)

Projevy u bezobratlých:

Narušení reprodukce, rodivosti (fekundita)

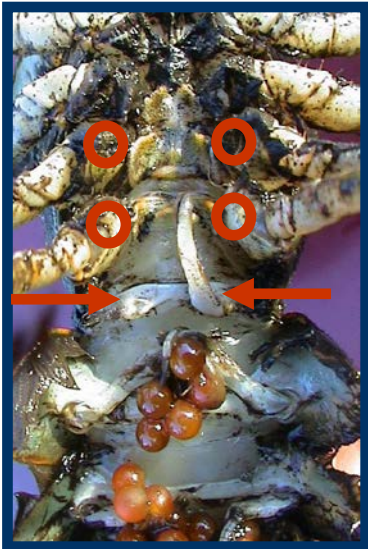
Poruchy růstu, sexuálního dozrání (maturace)

Narušení sexuálního dimorfismu, Intersex, Imposex

další procesy řízené hormony: pigmentace, regenerace končetin, diapauza

Sagi et al. (2003) – *Cherax quadricarinatus*

Rudolphi (1999) – *Samastacus spiniformis*



Suzuki (1999)
– *Armadillidium vulgare*



Barki et al. (2003)



Jungmann et al. (2004)
– *Gammarus fossarum*



SUBLETÁLNÍ TOXICITA U VODNÍCH MĚKKÝŠŮ

- vodní měkkýši využíváni jako testovací organismy pro vyhodnocení účinků endokrinních disruptorů ve vodním prostředí

Test sedimentů s písečníkem novozélandským *Potamopyrgus antipodarum* OECD 242 (2016): *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test

- vhodný a efektivní nástroj pro testování přírodních sedimentů a čistých látek

trvání	4 týdny (popř. 8 týdnů)
nádoba	objem 1 l
médium	800 ml vody
expozice	statická, 50 g sedimentu
odběry	20 jedinců po 4 (8) týdnech
parametry	mortalita; změny v morfologii pohl. orgánů; počet embryí, poměr embryí bez ulity a s ulitou



+ nízké nároky na kultivace

- nedostatečná velikost pro biochemické analýzy



Příprava



Typy sedimentů

- o přírodní
- o **artificiální**
listová hrabanka + křemitý písek
- o **spajkovaný artifciální sediment**
vyhodnocení efektů čistých látek

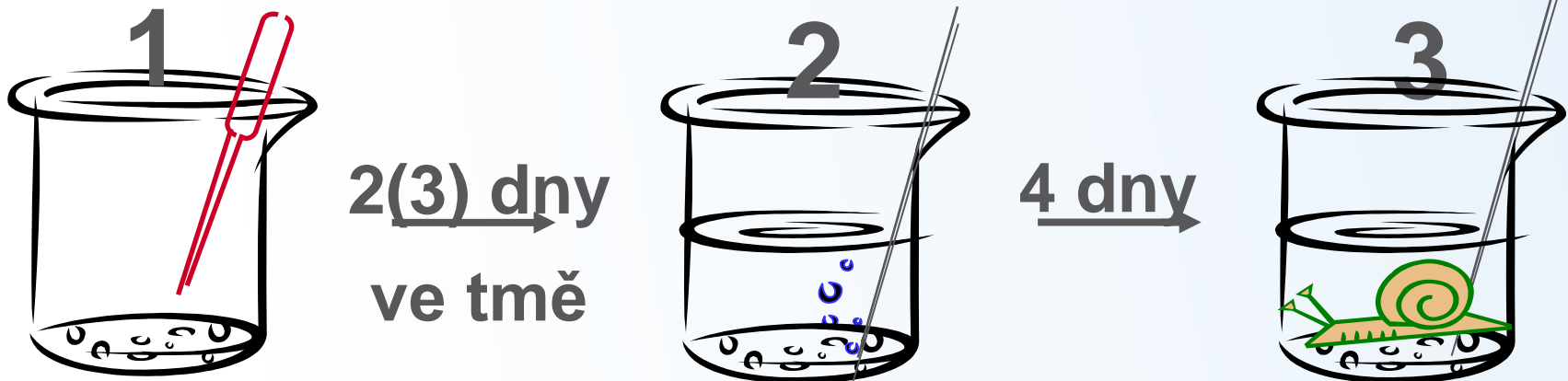
- (1) *spajkování artifciálního sedimentu.*
- (2) *po odpaření solventu je přidáno medium*
- (3) *ustavení rovnováhy mezi sedimentem a vodou, po 4 dnech přidání šneci .*

Médium

- voda s přidavkem NaHCO_3 , CaCO_3
- 16°C ,
 $700 \pm 100 \mu\text{S/cm}$

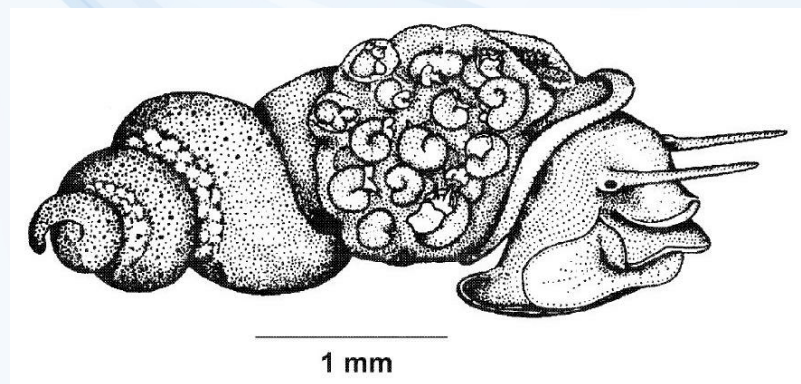
L:D 16:8

Komerční řasové pelety



Expozice, vyhodnocení

Parametry: mortalita a počet plně vyvinutých a nezralých embryí



(Xeno)estrogenní účinek

ethinylestradiol, bisfenol A, octylfenol, nonylfenol

Xenoandrogenní účinek

tributylcín, trifenylcín

Biomonitoring dnových sedimentů (Nisa, Odra)



Problémy testování ED

- Prokázání kauzality expozice – efekt
- Nelinearita křivky dávka/odpověď
- Nedostatečné informace o mechanismech účinku, zaměření pouze na efekty na receptorech
- Problém environmentálních vzorků, směsí
- Nedostatečné informace o ED potenciálu látek
- Velmi nízké účinné koncentrace EDCs

