

VITELLOGENIN – BIOMARKER ENDOKRINNÍ DISRUPCE U RYB

ZUZANA KOUTKOVÁ, JANA BLAHOVÁ
a ZDEŇKA SVOBODOVÁ

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

KoutkovaZuzana@gmail.com

Došlo 16.7.19, přepracováno 4.5.20, přijato 12.5.20.

Klíčová slova: vodní prostředí, hormonální systém, xenoestrogenní látky

Obsah

1. Úvod
2. Endokrinní disrupce
3. Vitellogenin
4. Stanovení a využití vitellogeninu jako biochemického markeru
 - 4.1. Detekce vitellogeninu v laboratorních podmínkách
 - 4.2. Detekce vitellogeninu v terénních podmínkách
5. Závěr

1. Úvod

Látky ovlivňující hormonální systém (a jejich přítomnost ve vodním prostředí) jsou poslední dobou velmi diskutovaným tématem. Provádí se řada výzkumů za účelem sledování jejich výskytu v prostředí a sílí snahy o jejich degradaci a odstranění. V mnoha studiích byl prokázán jejich negativní vliv na vodní živočichy a o jejich účincích na lidský organismus se stále diskutuje. Abychom se mohli zaměřit na jejich odstranění z vodního prostředí, musíme být schopni tyto látky detegovat. Mnoho látek se ale ve vodě vyskytuje ve stopových koncentracích, a tak je jejich stanovení technicky náročné. Z těchto důvodů je posuzování jejich přítomnosti často založeno na využití biochemických markerů kontaminace.

2. Endokrinní disrupce

Kontaminanty životního prostředí, které mohou narušit funkci neuroendokrinního systému obratlovců, nazýváme endokrinní disruptory¹. Látky s uvedeným efektem

můžeme najít v řadě produktů, které se v minulosti intenzivně využívaly, nebo se užívají i nyní. Jedná se například o pesticidy (atrazin, organofosfáty, arzenik), ftaláty využívané ke změkčování plastů, dioxiny, kovy (Cu, Pb), zpomalovače hoření, glykolethery používané jako rozpouštědla (v barvách, čistících prostředcích, kosmetických přípravcích, brzdových kapalinách) a mnoho dalších. V následujícím textu se zaměříme pouze na ty endokrinní disruptory, které vykazují xenoestrogenní účinek, tzn. že ovlivňují reprodukční systém napodobením vlivu estrogenů².

V oblasti humánní medicíny se dnes využívá odhadem asi 20 různých progestinů (jiným názvem gestagenů, progesteronů, progestagenů), které řadíme mezi endokrinní disruptory. Jedná se o látky, které mají široké spektrum použití. V kauzální medicíně se využívají například k léčbě děložních nádorů nebo při děložním krvácení³. V preventivní medicíně pak mají nezastupitelnou úlohu v orální antikoncepci. Například v roce 2017 bylo dle informací Státního ústavu pro kontrolu léčiv dodáno na trh v České republice více než 3,5 milionu balení léčiv řazených do skupiny „Pohlavní hormony a modulatory genitálního systému“⁴. Takto užitá léčiva se z organismu vylučují společně s močí a následně odchází do odpadních vod. Čistírny odpadních vod (ČOV) však často nemají natolik efektivní technologie, aby tyto látky z vody zcela odstranily. ČOV tedy opouští nedokonale vyčištěná voda, která následně kontaminuje různé složky vodního ekosystému (např. řeky a potoky). Zde dochází, za předpokladu většího průtoku, k jejímu dalšímu naředění. Pokud je ale průtok nízký, například během suchého letního období, jsou látky ve vodě ve vyšší koncentraci a mohou na vodní organismy působit s větší intenzitou⁵. Konkrétní proces probíhá pravděpodobně tak, že ačkoliv z těla tyto látky odcházejí v konjugované podobě, ve formě glukuronidů a sulfátů, v ČOV díky bakteriím v odpadním kalu dochází k jejich dekonjugaci, tedy aktivaci⁶. V roce 2018 provedli Šauer a spol.⁷ odběr vzorků odpadních vod v několika větších městech České republiky a analyzovali přítomnost estrogeně působících látek. Vzorky byly odebírány na přítoku vody do ČOV i na jejím odtoku. Na odtoku byla zjištěna koncentrace testovaných látek ve většině případů nižší, nikoli však nulová. Příkladem může být ČOV v Brně, kde ze všech 17 testovaných látek byla naměřena nejvyšší koncentrace u cyproteron acetátu, konkrétně v množství 12,0 ng l⁻¹ na přítoku a 0,5 ng l⁻¹ na odtoku⁷. Vzhledem k tomu, že ve vodním prostředí se látky tohoto typu vyskytují v různých kombinacích, je třeba brát toto v potaz při testování jednotlivých estrogeně působících látek. Ekpeghere a spol.⁸ stanovili na odtoku vody z ČOV hladiny estrogenů v rozmezí od hodnot pod hranici detekce (0,0001 ng l⁻¹) až po 0,05 ng l⁻¹, přičemž nejnižší účinnost ČOV byla zaznamenána u hladin estronu. Vzorky odebírali v letech 2009 a 2010 na řekách v Koreji⁸. Jejich výsled-

ky potvrdili i Ben a spol.⁹, kteří porovnávali koncentrace látek před a po průchodu vody ČOV v provincii Jiangsu ve východní Číně. Sledování těchto polutantů na přítoku a odtoku vody z ČOV prováděla i řada dalších autorů. V laboratorních podmínkách je často testován vliv jedné látky v různých koncentracích. Pokud jsou zaznamenány změny až při výrazně vyšších hodnotách, než je běžně se vyskytující koncentrace, neznamená to, že k uvedenému jevu nemůže v přírodě dojít. Ve vodním prostředí je řada látek a jejich metabolitů, z nichž některé mají vůči sobě agonistické nebo antagonistické účinky¹⁰.

3. Vitellogenin

Vitellogenin je hlavním prekurzorem žloutkového proteinu. Jedná se o molekulu fosfoglykolipoproteinu, která je syntetizována v játrech dospělých samic oviparních obratlovců, tedy ryb, plazů, obojživelníků a ptáků. V následujícím textu se ale zaměříme pouze na jeho výskyt u ryb. Za určitých podmínek může k syntéze vitellogeninu dojít i u samců a juvenilních samic. Jeho syntézu indukuje estrogen, jehož koncentrace jsou v krvi samců velmi nízké. Pokud jsou však ryby samčího pohlaví vystaveny působení xenoestrogenních látek, dochází k jeho syntéze i u nich. Z uvedeného důvodu se vitellogenin často využívá jako vhodný biomarker pro hodnocení přítomnosti estrogenních kontaminantů ve vodním prostředí^{1,5}.

Proces syntézy vitellogeninu probíhá na základě aktivity hypothalamo-hypofýzo-ovariální osy. Hypothalamus zajišťuje produkci gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH). Na tento proces má vliv mnoho endogenních a environmentálních faktorů. Mezi uvedené faktory patří vrozený biorytmus, výživový stav, sezónní změny fotoperiody a teploty a další. Jako odpověď na GnRH začne hypofýza uvolňovat folikuly stimulující hormon, který následně indukuje tvorbu 17 β -estradiolu a jeho uvolňování ze tkáně *theca follicula* ovariálních folikulů. 17 β -Estradiol vyvolá v játrech syntézu vitellogeninu a jeho následné uvolnění do krevního řečiště. Z krevního řečiště vitellogenin difunduje přes bazální membránu a mezibuněčný prostor mezi buňky zóny granulosa. Přes folikulární buňky se vitellogenin dostává do kontaktu s oolemou. Do oocyty pak vstupuje pomocí specifických receptorů, které se nacházejí na jeho membráně¹¹. Molekula vitellogeninu je v konečném důsledku rozložena proteolytickými enzymy¹² a poté zabudována do vaječného žloutku. Stejně tak jako lipovitellin, fosfitin a fosvetin slouží jako hlavní zdroj energie pro následný vývoj embrya¹³. Z důvodu usnadnění proteolýzy je celá molekula vitellogeninu poměrně nestabilní a náchylná ke štěpení proteasami. Z uvedeného důvodu je třeba při skladování a analýze vzorků využívat pro stabilizaci speciální inhibitory proteas¹².

4. Stanovení a využití vitellogeninu jako biochemického markeru

Přítomnost vitellogeninu ve tkáních samců a nedospělých jedinců ryb byla na základě mnoha výzkumů zvolena jako jedna z možností detekce přítomnosti endokrinních disruptorů ve vodním prostředí¹⁰. Vitellogenin je obvykle detegován v krevním séru, játrech, plazmě, celotělových homogenátech¹⁴ a povrchovém hlenu ryb²³.

K detekci vitellogeninu se využívá řada metod. Jednou z nejčastěji používaných je metoda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)¹⁵. Protože je molekula vitellogeninu specifická pro každý jednotlivý živočišný druh, je k jeho detekci touto metodou třeba přípravy specifických protilátek v závislosti na typu pokusných zvířat¹⁴. Z modifikací imunochemické metody ELISA se pak využívá např. přímá¹⁶, nepřímá kompetitivní¹⁷ a dále i sandwichová varianta¹². Další možností je využití molekulárně-biologických metod (např. PCR) pro detekci mRNA vitellogeninu¹⁵. Detekci endokrinních disruptorů lze také provádět přímou analýzou jednotlivých analytů v různých biotických a abiotických matricích vodního ekosystému. Pro uvedené analýzy se běžně využívají chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrofotometrií¹⁸. Mezi další parametry, které lze využít pro hodnocení negativních účinků xenoestrogenů v laboratorních podmínkách, řadíme např. posouzení poměru pohlaví v testovaných skupinách, biometrické změny (např. délka a váha ryb) a histologické vyšetření gonád. Můžeme sledovat i vliv na následné generace tak, jak to provedli Bhandari a spol.¹⁹. Ti během svého experimentu zkoumali vliv bisfenolu A (100 $\mu\text{g l}^{-1}$) a EE2 (0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$) na následující (F1, F2, F3 a F4) generace *Oryzias latipes*. Oplozená vajíčka byla po dobu sedmi dní vystavena uvedenému lázni. Výrazný pokles přežití embryí byl zaznamenán až u F3 a F4 generace ($P < 0,05$), což jasně poukazuje na negativní vliv těchto látek na následné generace¹⁹.

4.1. Detekce vitellogeninu v laboratorních podmínkách

V laboratorních podmínkách je, v porovnání s pokusy prováděnými v terénních podmínkách, mnohem jednodušší zajistit stálé prostředí a tím zaručit validní výsledky. Využitím vitellogeninu, jako biochemického markeru při hodnocení látek s estrogenním účinkem, se zabývala řada autorů^{17,20–24}.

Vitellogenin v krevní plazmě a celotělovém homogenátu detegovali u juvenilních stádií jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) v rámci experimentu Tyler a spol.²⁰. Pro zhodnocení výsledků bylo třeba nejdříve stanovit běžné hladiny vitellogeninu. K tomu byly využity vzorky plazmy jelečka velkohlavého jiných než později testovaných ryb. Ty byly rozděleny do skupin podle pohlaví a fáze pohlavního cyklu. U samců se množství vitellogeninu v krevní plazmě pohybovalo v rozmezí 25,0 \pm 6,0 ng ml⁻¹. U nedospělých samic se jednalo o hodnoty

$37,0 \pm 6,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, u samic dospělých pak byly hodnoty $182,0 \pm 2,6 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pro samotný průběh pokusu byly použity skupiny ryb s kombinovaným poměrem samců i samic z důvodu nemožnosti zajistit vyrovnané pohlaví u takto mladých jedinců. Tyto skupiny ryb byly po dobu 30 dní po vykulení vystaveny testované látce 17 β -estradiolu. Z konečných výsledků je zřejmé, že existuje statisticky významná závislost mezi koncentrací vitellogeninu a hladinou testované látky. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u pokusné skupiny vystavené 100 ng l^{-1} 17 β -estradiolu. V tomto případě byla koncentrace vitellogeninu v plazmě $12,0 \pm 2,2 \text{ ng ml}^{-1}$ a $15,1 \pm 3,3 \text{ ng ml}^{-1}$ v duplicitním tanku²⁰.

Další z často užívaných látek je 17 α -ethinylestradiol (EE2). Jeho vliv na indukci tvorby vitellogeninu u oviparních živočichů, konkrétně dánia pruhovaného (*Danio rerio*), prokázali Andersen a Holbech²¹. V rámci svého pokusu vystavili pokusné ryby v několika věkově oddělených skupinách (jikry, larvy a jedince do 60 dnů věku) koncentraci $15,4 \pm 1,4 \text{ ng l}^{-1}$ EE2. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu byla analyzována 30. den po vylíhnutí, přičemž pro analýzu byla použita metoda ELISA. V pokusné skupině byly prokázány významně rozdílné koncentrace v porovnání se skupinou kontrolní. Nejvyšších koncentrací vitellogeninu dosahovala skupina vystavená EE2 ve fázi embrya. K tomu mohlo dojít z důvodu kumulace lipofilního EE2 ve žloutkovém vaku, neboť takto uložený EE2 mohl později vyvolat zvýšenou indukci vitellogeninu. Skupina vystavená testované látce do období deseti a dvaceti dní věku vykazovala naopak nižší koncentrace vitellogeninu než ostatní skupiny. To mohlo být způsobeno tím, že před dvacátým dnem věku nemají tyto ryby ještě zcela vyvinuté jaterní enzymy. Histologickým vyšetřením gonád 60. den věku Andersen a Holbech²¹ detegovali případné změny vývoje pohlavních orgánů. Histologicky byl prokázán feminizační efekt této látky na diferenciaci samčích pohlavních orgánů. U jedinců vystavených EE2 v období 20–40 dní po vylíhnutí byl u 59 % samic zaznamenán výskyt oocytů ve tkáni varlat²¹.

Uvedené experimenty ukazují pouze vliv krátkodobého působení estrogenních látek na vodní živočichy. Jak ale budou reagovat ryby vystavené xenoestrogenním látkám o známé koncentraci po delší časové období, v rámci let, je v laboratorních podmínkách velmi obtížné zjistit. Kidd a spol.¹⁷ proto provedli pokus v experimentálním jezeře, které se nachází v severozápadním Ontariu v Kanadě. Celý experiment trval sedm let (1999–2005) a byl zaměřen na sledování chronického vlivu nízkých koncentrací EE2 na jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*). Během prv-

ních dvou let pokusu byly odebírány vzorky ryb pro stanovení hladin vitellogeninu před přidáním EE2. Během dalších tří let trvání experimentu byl EE2 v množství 5–6 ng l^{-1} pravidelně přidáván do jezera. Následující dva roky experimentu již EE2 do vody v jezeře přidáván nebyl. Pro získání kontrolních vzorků bylo vybráno nezatížené jezero ze stejné oblasti. K detekci vitellogeninu byly použity celotělové homogenáty pokusných ryb. V období před zahájením podávání EE2 byly hodnoty koncentrací vitellogeninu u samic do $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Ve vzorcích odebraných během období, ve kterém byl do vody přidáván EE2, byly u samčí populace zaznamenány významně zvýšené hladiny vitellogeninu, které se pohybovaly od $2500 \mu\text{g g}^{-1}$ až po $12\,000 \mu\text{g g}^{-1}$. Během pokusu byly také odebrány vzorky jater pro analýzu množství mRNA vitellogeninu, které u jedinců vystavených EE2 bylo mnohonásobně vyšší. Tato skupina vykazovala množství exprimované mRNA vitellogeninu v rozmezí $0,4 \pm 0,6$ až $1,2 \pm 0,1$, zatímco u kontrolní skupiny zjištěné množství odpovídalo $< 0,1$ – $1,6$ % hodnot pokusné skupiny. Histologické vyšetření mimo jiné potvrdilo fibrózu a malformace tubulů testikulární tkáně u ryb vystavených účinkům EE2 (cit.¹⁷).

Ve vodním prostředí existuje nebezpečí kumulace vlivu více estrogenních látek a jejich možného synergického působení. Uvedenou problematikou se zabývali Žlábek a spol.²², kteří zkoumali účinek estrogenních a androgenních látek na stádia gonád, pohlavní diferenciaci a na indukci tvorby vitellogeninu u juvenilních stádií (stáří 5 měsíců) jelce tluuště (*Squalius cephalus*). Jedné skupině pokusných ryb byl v krmivu podáván 17 β -estradiol, druhé testosteron a třetí skupině kombinace těchto dvou látek (tab. I). Po třiceti dnech byl proveden odlov ryb a analýza hladin vitellogeninu v celotělových homogenátech. U skupiny ryb, která byla krmena krmivem obsahujícím 17 β -estradiol, se hladina vitellogeninu statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny. Nejvyšší produkce vitellogeninu byla zaznamenána u ryb, jejichž krmná směs obsahovala kombinaci 17 β -estradiolu a testosteronu. Testosteron tedy markantně zvýšil účinky estrogenu²².

Běžně se analýza hladiny vitellogeninu provádí z krve nebo tkání, které jsou získávány v rámci invazivního odběru, často s nutností usmrcení zvířete. Alternativou k těmto postupům je možnost analýzy hladiny vitellogeninu v povrchovém hlenu²³. Tato alternativa by mohla poskytnout možnost odběru většího množství vzorků a celkové zjednodušení odběru. Případné snížení stresových faktorů lze také považovat za pozitivní faktor. Maltais a Roy²³ provedli pokus, při kterém juvenilní stádia pakaprovce Hubbsova (*Moxostoma hubbis*) vystavili působení látek

Tabulka I
Indukce tvorby vitellogeninu u juvenilních stádií jelce tluuště

Testovaná látka	17 β -Estradiol	17 β -Estradiol + Testosteron	Testosteron	Kontrola
Množství testované látky v krmivu	20 mg kg^{-1}	20 mg kg^{-1} + 0,1 g kg^{-1}	0,1 g kg^{-1}	X
Koncentrace vitellogeninu po 30 dnech ($\mu\text{g g}^{-1}$)	7 \pm 11	32 \pm 28	0,4 \pm 0,4	0,4 \pm 0,3

EE2 a nonylfenolu (NP) v různých koncentracích (EE2: 10 ng l^{-1} ; NP: $1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) po dobu 21 dní a sledovali koncentraci vitellogeninu v krevní plazmě a povrchovém hlenu. Statistickou analýzou byla potvrzena statisticky vysoce významná pozitivní korelace ($P < 0,05$). Ke statisticky významnému zvýšení obsahu vitellogeninu ($P < 0,01$) došlo u ryb až při koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ NP ($6500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ plazmy; $3,1 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ proteinu v povrchovém hlenu). Pokusy s nižšími koncentracemi NP nevykazovaly statisticky významné zvýšení syntézy vitellogeninu ($< 1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ plazmy; $< 0,5 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ proteinu v povrchovém hlenu)²³.

U juvenilních stádií, 7–8 dní po vykulení, mořana japonského (*Pagrus major*) a okouníka načernalého (*Sebastes melanops*) byly prokázány statisticky významně zvýšené koncentrace vitellogeninu v plazmě při jejich vystavení NP v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ a 5 ng l^{-1} estrogenu (E2) po dobu šedesáti dní ($P < 0,05$). V pokusné skupině se vyskytovali jak samci, tak samice. Koncentrace vitellogeninu byla analyzována v průběhu experimentu (30. den) a na jeho konci (60. den) (tab. II). Dále bylo prokázáno, že vystavení ryb exogennímu vlivu E2 statisticky významně zvýší ($P < 0,05$) indukci produkce vitellogeninu²⁴.

4.2. Detekce vitellogeninu v terénních podmínkách

Detekce vitellogeninu v krevní plazmě/séru a ve tkáňích ryb v terénních podmínkách je důležitá z hlediska sledování estrogeně působících látek v životním prostředí. Analýza vzorků pro detekci vitellogeninu se ve světě běžně využívá a také na našem území byla provedena řada studií zabývajících se touto problematikou. Samotnou detekci vitellogeninu je vhodné kombinovat s chemickou analýzou konkrétní látky ve vodním prostředí. Mimo to jsou hodnoceny i další ukazatele – histologické vyšetření, poměr pohlaví, délka a váha ryb apod.

Jedna ze studií proběhla na řece Jihlavě, která je jedním z přítoků Dyje. Jako oblast pro odběr vzorků byl vymezen úsek mezi městy Třebíč a Ivančice. Studie proběhla v letech 1999–2002 a jako modelový organismus byla vybrána parma obecná (*Barbus barbus*). Odlov ryb probíhal během doby sledování třikrát. Prvním místem odběru

byl úsek řeky nad městem Ivančice, konkrétně v obci Hrubšice. Další místo odběru bylo situováno pod Třebíčí a poslední místo odběru pak bylo nad Třebíčí. V Třebíči se nachází ČOV, mezi Třebíčí a Ivančicemi vodní elektrárna Dalešice a Mohelno, v Dukovanech pak jaderná elektrárna. U odlovených ryb byly odebrány vzorky jater a gonád pro histologické vyšetření. Během studie bylo celkem odchyceno 993 kusů ryb, přičemž 47,5 % z nich byli samci. Feminizace byla zaznamenána u 6 odchycených jedinců. Histologické vyšetření gonád pak odhalilo, že frekvence feminizovaných samců je nižší u ryb odchycených v méně znečištěné vodě (v Hrubšicích), než ve vodě obsahující více polutantů (u Třebíče). Přítomnost polutantů ve vodě se stanovovala na základě jejich detekce ve tkáni ryb. Jednalo se o Hg, As, Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, polychlorované bifenylly (PCB), hexachlorbenzen (HCB) a dichlordifenyltrichlorethan (DDT) a jeho metabolity. Koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců byla výrazně nižší v méně znečištěné vodě v Hrubšicích ($0\text{--}3,84 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) než ve vodě znečištěné ($0,02\text{--}880,26 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). Autoři ve své studii uvádějí, že příčinou feminizace samců (celkově 2,8 %) mohlo být i souhrnné působení více faktorů, zahrnujících kromě xenoestrogenních látek ve vodním prostředí i přírodní a hydrologické podmínky (koncentrace ryb, teplota vody) a věk²⁵.

Králický potok, přítok Tiché Orlice, byl v minulosti využíván pro umělou reprodukci lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) a pstruha obecného potočního (*Salmo trutta fario*). Kolem roku 1990 byla v okolí města Králíky poprvé zaznamenána snížená reprodukce ryb, což vedlo k detailnějšímu sledování této oblasti. Jedním z pokusů zaměřených na tuto oblast bylo sledování koncentrace vitellogeninu v krvi ryb na řece Tichá Orlice, která je levostranným přítokem Labe. Jako indikátorový organismus byl vybrán pstruh obecný potoční (*Salmo trutta fario*). Vzorky krevní plazmy byly odebrány od ryb odlovených na dvou místech (obce Králíky a Lichkov) a jako kontrolní místo byla zvolena lokalita Červená Voda. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu byla detegována ve vzorcích z lokality Králíky ($3\text{--}30 \text{ mg ml}^{-1}$). V lokalitě Lichkov byl vitellogenin detegován v množství od $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$ a v Červené Vodě byla koncentrace vitellogeninu pod mezí detekce. Ze zjištěných výsledků bylo

Tabulka II

Hladiny vitellogeninu v plazmě (ng ml^{-1}) u mořana japonského a okouníka načernalého

	30. den		60. den	
<i>Koncentrace NP</i> ^a	$10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$	$50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$	$10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$	$50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$
Mořan japonský	≤ 2900	≤ 4000	≤ 3900	≤ 2900
Okouník načernalý	≤ 4000	≤ 3400	≤ 5000	≤ 4000
<i>Koncentrace E2</i> ^b	0 ng l^{-1}	5 ng l^{-1}	0 ng l^{-1}	5 ng l^{-1}
Mořan japonský	≤ 1000	≤ 8500	≤ 1100	≤ 7000
Okouník načernalý	≤ 900	≤ 7000	≤ 800	≤ 8500

^a NP – nonylfenol, ^b E2 – estradiol

potvrzeno, že zvýšená koncentrace vitellogeninu v krvi samců může indikovat poruchy spermiogeneze a reprodukce^{26,27}.

Na řece Labi v roce 2008 provedli Randak a spol.²⁸ v rámci experimentu odběr vzorků ryb na třech místech toku řeky, a to v oblastech, ve kterých se předpokládalo větší znečištění. Sledovaným organismem byl jelec tlušť (*Squalius cephalus*). Ryby byly odloveny v okolí města Pardubice, Neratovice a Ústí nad Labem. Odlov se vždy prováděl nad a pod uvedenými lokalitami. Ve svalovině ryb byla provedena analýza vybraných perzistentních polutantů (Hg, PCB, DDT, HCH a dalších). Dále byly analyzovány vybrané biomarkery, mezi kterými byl i vitellogenin. Jako kontrolní lokalita bylo vybráno odběrové místo na řece Vltavě nad nádrží Lipno, kde byl předpoklad minimálního znečištění. Nejvyšší koncentraci vitellogeninu obsahovaly vzorky z ryb odlovených na řece Labi nad Ústím nad Labem. Naopak nejnižší koncentraci vitellogeninu obsahovaly vzorky odebrané pod městem Neratovice. Kromě detekce vitellogeninu provedli Randak a spol.²⁸ také histologické vyšetření gonád. U dvou samců ze čtyř odlovených pod Ústím nad Labem byly nalezeny patoanatomické anomálie. Ve tkáni varlat se nacházely perinukleární oocyty. Ve vzorcích z jiných lokalit podobné změny nebyly nalezeny. Během odlovu ryb pod Ústím nad Labem byli z necelých padesáti ryb pouze čtyři samci, z toho pohlavní orgány dvou z nich vykazovaly histologickou anomálii. Jak vyplývá z uvedeného, rozložení pohlaví v populaci jelce tluště nebylo ani z daleka podobné přirozenému poměru 1:1. K tomuto úkazu mohlo dojít z několika důvodů. Samci mohou být na přítomnost endokrinních látek ve vodě mnohem citlivější, což mohlo ovlivnit pohlavní vývoj v raném stádiu ryb a zapříčinit vyšší procentuální zastoupení samic. Tento nepoměr mohla ale také zavinit migrace samic za potravou po směru toku řeky. Obecně lze říct, že vzorky odebrané pod městy ukazují vyšší kontaminaci než vzorky odebrané nad městskou aglomerací. V Neratovicích byly zaznamenány nejvyšší koncentrace PCB ve svalovině ryb, nad Ústím nad Labem nejvyšší koncentrace HCH a pod Ústím nad Labem pak nejvyšší koncentrace DDT v tukové tkáni. Nejvyšší koncentrace Hg ve svalovině byly zaznamenány u ryb odlovených v referenčním místě na Vltavě²⁸.

Na soutoku řek Svitavy a Svatky leží druhé největší město České republiky, Brno. Na těchto řekách byly odebrány vzorky ze 7 lokalit. Na řece Svitavě se na horním toku jednalo o lokalitu Bílovice nad Svitavou. Na řece Svatce to pak na horním toku byla lokalita Kníničky. Na dolním toku pod Brnem to byla místa před soutokem obou řek, dále pak lokality Modřice, Rajhradice a Židlochovice. Jako indikátorový organismus byl vybrán jelec tlušť (*Squalius cephalus*), detekce vitellogeninu byla prováděna z krevní plazmy samců. Nejvyšší hodnoty vitellogeninu byly naměřeny v Bílovicích nad Svitavou (medián 52,2 ng ml⁻¹) a v Modřicích (medián 14,7 ng ml⁻¹). Nejnižší pak v Kníničkách, v Židlochovicích a na řece Svatce před soutokem (medián 0,5 ng ml⁻¹). Bílovice nad Svitavou byly určeny jako kontrolní lokalita, předpokládalo se zde nejnižší znečištění. Mezi hypotézy odůvodňující vyso-

ké hodnoty vitellogeninu v oblasti Bílovice nad Svitavou patří možnost kontaminace zapříčiněná chemickou a strojírenskou firmou v nedalekém Adamově nebo vliv bakterií odpadního kalu ČOV přímo v Bílovicích nad Svitavou. Odlov ryb v lokalitě Modřice i Bílovice nad Svitavou byl proveden pod ČOV (cit.²⁹).

Významným problémem je také skutečnost, že některými většími aglomeracemi protékají vodní toky s nízkým průtokem, tudíž nedochází k dostatečnému naředění přítomných nežádoucích látek ve vodě. Touto problematikou se zabývala např. studie provedená na Libotýňském potoce, Černém potoce a řece Moravici. Na těchto vodních tocích Zelníčková a spol.³⁰ sledovali obsah kontaminantů ve vodním prostředí, konkrétně ve tkáních ryb. Odlov pstruha obecného potočního (*Salmo trutta m. fario*) proběhl v září roku 2012 vždy nad a pod ČOV, a to ve městech Vlachovo Březí, Bruntál a Břidličná. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců byla zjištěna u ryb odlovených na Libotýňském potoce (Vlachovo Březí). Na toku pod ČOV byly naměřeny hodnoty 5,4–2978,1 ng ml⁻¹ (cit.³⁰).

Jeden z velkých pokusů zaměřených na sledování znečištění vodních toků proběhl na řekách v České republice v roce 2007–2011 (cit.³¹). V rámci sledování byly odebrány vzorky pro analýzy ze samců jelce tluště (*Squalius cephalus*) odlovených v závěrových profilech na 10 českých řekách (Berounka, Dyje, Labe, Lužnice, Odra, Ohře, Otava, Sázava, Svatka, Vltava). Nejnižší hodnoty vitellogeninu byly naměřeny u ryb odlovených v řekách Dyje, Labe, Ohře a Vltava. Naopak nejvyšší hodnoty v plazmě byly naměřeny u ryb odlovených na řece Svatce pod Brnem. Pouze 11 % samců jelce tluště zde odlovených mělo v krevní plazmě hodnoty vitellogeninu pod mezí detekce použité metody³¹.

Problematika endokrinních disruptorů ve vodním prostředí je také intenzivně studována v zahraničí. V Kanadě byly v rámci pokusu v roce 2017 umístěny pokusné ryby v klecích, po dobu jednoho měsíce, do toku řeky North Saskatchewan u města Edmonton. Hlavním cílem studie bylo sledování vlivu musk sloučenin, syntetických analogů pyžma, galaxolidu a tonalidu na jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*). Mimo jiné autoři zkoumali u samců i syntézu vitellogeninu. Koncentrace sledovaných látek byly v uvedené řece natolik nízké, že nezpůsobily zvýšení syntézy vitellogeninu (nejvyšší zaznamenané hodnoty: galaxolid – 381,0 ng l⁻¹; tonalid – 21,6 ng l⁻¹)³².

Ve Spojených státech amerických, konkrétně na hranicích Arizony a Nevady, leží národní rekreační jezerní oblast (Lake Mead National Recreation Area). V letech 1999–2000 zde Jenkins a spol.³³ provedli sledování koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě kapra obecného (*Cyprinus carpio*), přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v zálivu Las Vegas. V listopadu 1999 byla zaznamenána hodnota 1504 μg ml⁻¹ a nejvyšší hodnota byla zaznamenána v květnu 2000 (68 074 μg ml⁻¹), jinak se hodnoty pohybovaly pod hranicí 200 μg ml⁻¹. V roce 2006 pak zjistili nejvyšší hladiny vitellogeninu (5192 μg ml⁻¹) v oblasti Willow Beach, kde byl zároveň zaznamenán nej-

vyšší výskyt PCB ($0,38 \mu\text{g g}^{-1}$), jehož možným zdrojem jsou transformátory v Hooverově přehradě³³.

V severozápadní oblasti Spojených států amerických na základě odběru vzorků z různých řek zjistili Iwanowicz a spol.³⁴ významně zvýšené hladiny vitellogeninu v krvi samců okounka pstruhového (*Micropterus salmonides*) odloveného na řece Ohio (Ohio River Island). Zároveň ale na této řece nebyl zaznamenán takový výskyt intersexualismu u samců (přítomnost oocytů ve tkáni varlat), jak by se mohlo očekávat vzhledem k naměřeným koncentracím vitellogeninu. V porovnání s ostatními řekami byl na řece Ohio výskyt intersexualismu poměrně nízký. Na řece Mosehorn zase pozorovali výraznou negativní korelaci vztahu hladiny vitellogeninu v plazmě a závažností patologických změn, kdežto na řece Assaber River naopak zjistili výraznou pozitivní korelaci sledovaných parametrů³⁴. Stejnou tematikou se zabývali i Geraudie a spol.³⁵, kteří odebírali vzorky z ryb ve francouzských řekách severozápadně od Paříže, konkrétně ze Seiny a jednoho z jejích přítoků, Epty. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevním séru samců plotice obecné (*Rutilus rutilus*) zaznamenali u města Poses (řeka Seina), a to $1225,0 \text{ ng ml}^{-1}$. Nižší hladiny, $435,0 \text{ ng ml}^{-1}$ a $156,0 \text{ ng ml}^{-1}$, pak zachytili u měst Gournay a Dampierre (řeka Epta). U samců ryb odlovených v oblasti Poses, Gournay a Dampierre byla histologickým vyšetřením gonád zjištěna přítomnost oocytů ve tkáni varlat, ale specifický vztah mezi hladinou vitellogeninu a histologickými změnami gonád nebyl potvrzen, jelikož samci ryb se známkami intersexualismu z oblastí Poses a Gournay vykazovali nižší koncentrace vitellogeninu než samci bez patologií odchycení ve stejných lokalitách³⁵.

5. Závěr

Význam vitellogeninu pro detekci hormonálních změn způsobených xenoestrogenními látkami u samců ryb v experimentálních a terénních podmínkách je nezastupitelný. Ve vodních tocích nalézáme samce ryb, u kterých je názorně vidět negativní vliv estrogenních látek na vývoj jejich pohlavních orgánů. Z českých toků, zmíněných v textu, byly nejvyšší hladiny vitellogeninu zjištěny v krevní plazmě ryb na řece Tichá Orlice a na Libotýňském potoce. Otázkou je, zda tomu je z toho důvodu, že se jedná o menší toky, které protékají řadou měst, nebo zda je zde ještě jiný důvod. Již proběhla řada výzkumů zaměřených na degradaci nebo odstranění reziduí estrogenů z vodního prostředí, ale zatím není znám způsob, jak tyto látky z vody jednoduše a kompletně odstranit.

Vypracováno s finanční podporou Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, projekt číslo 224/2019/FVHE.

Seznam použitých zkratk

ČOV	čistírna odpadních vod
E2	estradiol
EE2	17 α -ethinylestradiol

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GnRH	gonadotropin-uvolňující hormon
NP	nonylfenol
PCB	polychlorované bifenylly
HCB	hexachlorbenzen
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
HCH	hexachlorcyklohexan

LITERATURA

- Hiramatsu N., Matsubara T., Fujita T., Sullivan C. V., Hara A.: *Mar. Biol.* 149, 35 (2006).
- <https://www.ewg.org/research/dirty-dozen-list-endocrine-disruptors>, staženo 17. 6. 2019.
- Kumar V., Johnson A. C., Trubiroha A., Tůmová J., Ihara M., Grabic R., Kloas W., Tanaka H., Kroupová H. K.: *Environ. Sci. Technol.* 49, 2625 (2015).
- <http://www.sukl.cz/>, staženo 15. 1. 2019.
- Sumpster J. P.: *Toxicol. Lett.* 82–83, 737 (1995).
- Dascenzo G., Dicorcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R.: *Sci. Total Environ.* 302, 199 (2003).
- Šauer P., Stará A., Golovko O., Valentová O., Bořík A., Grabic R., Kroupová H. K.: *Water Res.* 137, 64 (2018).
- Ekpeghere K., Sim W.-J., Lee H.-J., Oh J.-E.: *Sci. Total Environ.* 640, 1015 (2018).
- Ben W., Zhu B., Yuan X., Zhang Y., Yang M., Qiang Z.: *Water Res.* 124, 244 (2017).
- Drastichová J., Šíroková Z., Žlábek V.: *Folia Vet.* 48, 14 (2004).
- Reading B. J., Sullivan C. V., Schilling J., v knize: *Reference Module in Life Sciences. Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment* (Farrell A. P., ed), 1. vyd. str., 635. Academic Press, Londýn 2011.
- Nilsen B. M., Berg K., Eidem J. K., Kristiansen S.-I., Brion F., Porcher J.-M., Goksøyr A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 621 (2004).
- Fenske M., van Aerle R., Brack S., Tyler C. R., Segner H.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 129, 217 (2001).
- Hansen P.-D., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M., Blaise C.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 17, 448 (1998).
- Crowther J., v knize: *Molecular Biomethods Handbook* (Walker J. M., Rapley R., ed.), 2. vyd., kap. 37, str. 657. Humana Press, Totowa 2008.
- Blazer V. S., Walsh H. L., Shaw C. H., Iwanowicz L. R., Braham R. P., Mazik P. M.: *Environ. Monit. Assess.* 190, 577 (2018).
- Kidd K. A., Blanchfield P. J., Mills K. H., Palace V. P., Evans R. E., Lazorchak J. M., Flick R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8897 (2007).
- Ortiz-Villanueva E., Jaumot J., Martínez R., Navarro-Martín L., Piña B., Tauler R.: *Sci. Total Environ.* 635, 156 (2018).
- Bhandari R. K., vom Saal F. S., Tillitt D. E.: *Sci. Rep.*

- 5, 9303 (2015).
20. Tyler C. R., van Aerle R., Hutchinson T. H., Maddix S., Trip H.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 337 (1999).
 21. Andersen L., Holbech H., Gessbo Å., Norrgren L., Petersen G. I.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 134, 365 (2003).
 22. Žlábek V., Randák T., Kolářová J., Svobodová Z., Kroupová H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 280 (2009).
 23. Maltais D., Roy R. L.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 168 (2014).
 24. Saravanan M., Nam S.-E., Eom H.-J., Lee D.-H., Rhee J.-S.: *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 216, 10 (2019).
 25. Peňáz M., Svobodová Z., Baruš V., Prokeš M., Drastichová J.: *J. Appl. Ichthyol.* 21, 420 (2005).
 26. Kolarova J., Svobodova Z., Zlabek V., Randak T., Hajslova J., Suchan P.: *Fresenius Environ. Bull.* 14, 1091 (2005).
 27. Havelková M., Svobodová Z., Kolářová J., Krijt J., Némethová D., Jarkovský J., Pospíšil R.: *Acta Vet. Brno* 77, 133 (2008).
 28. Randak T., Zlabek V., Pulkrabova J., Kolarova J., Kroupova H., Siroka Z., Velisek J., Svobodova Z., Hajslova J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 737 (2009).
 29. Blahová J. a 11 spoluautorů: *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 541 (2010).
 30. Zelníčková L., Blahová J., Maršálek P., Hostovský M., Ševčíková M., Dobšíková R., Široká Z., Divišová L., Plhalová L., Svobodová Z.: *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 109 (2013).
 31. Burkina V. a 10 spoluautorů: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 92 (2018).
 32. Lefebvre C., Kimpe L. E., Metcalfe C. D., Trudeau V. L., Blais J. M.: *Environ. Pollut.* 231, 1593 (2017).
 33. Jenkins J. A., Rosen M. R., Draugelis-Dale R. O., Echols K. R., Torres L., Wieser C. M., Kersten C. A., Goodbred S. L.: *Environ. Res.* 163, 149 (2018).
 34. Iwanowicz L. R. a 15 spoluautorů: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 50 (2016).
 35. Geraudie P., Gerbron M., Minier C.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 211, 29 (2017).

Z. Koutková, J. Blahová, and Z. Svobodová
(Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno):
Vitellogenin – Biomarker of Endocrine Disruption in Fish

Vitellogenin is one of biomarkers in aquatic environment which is widely used for laboratory testing of the influence of estrogens, especially on the function of fish genitals. While normal concentration of vitellogenin is very low in wild male fish, their exposure to water containing endocrine disruptors causes rapid increase of vitellogenin. Vitellogenin can cause fertility disorders, such as feminization of male fish or histopathology changes of gonads, which could lead to suppression of reproduction of fish and therefore it could result in a reduction of the fish population.

Keywords: aquatic environment, hormonal system, xenoestrogenic substances