

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### POTENCIÁLNÍ ENDOKRINNÍ AKTIVITA BENZONITRILOVÝCH HERBICIDŮ

PETRA LOVECKÁ, MARKÉTA THIMOVÁ  
a KATEŘINA DEMNEROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
loveckap@vscht.cz

Došlo 5.10.13, přijato 14.11.13.

Klíčová slova: benzonitrilové herbicidy, endokrinní  
aktivita, *Saccharomyces cerevisiae*, bisfenol A

#### Úvod

Endokrinní disruptor (ECD) je exogenní látka nebo směs, která zasahuje do funkcí endokrinního systému a následně působí nepříznivě na zdraví organismu, jeho potomstva nebo (sub)populace<sup>1</sup>. Patří k nim jednak přírodní sloučeniny jako hormony a fytohormony, ale také celá řada syntetických látek, jako jsou např. látky používané při výrobě plastických hmot či jiné průmyslově využívané látky a odpady<sup>2–4</sup>.

Mechanismus působení exogenních látek na endokrinní systém můžeme v podstatě rozlišit na receptorový a na mechanismus nezávislý na receptoru. Receptorový mechanismus působení vyžaduje přítomnost tzv. jaderných receptorů. Po navázání specifického ligandu dojde ke změně konformace těchto receptorů následované transportem do jádra, kde se naváží na specifické úseky DNA, čímž může dojít ke zvýšení exprese určitého genu.

Testy s reportérovými geny jsou založeny na schopnosti testovaných látek stimulovat transkripci závislou na daném receptoru. K expresi reportérového genu tedy dochází až po aktivaci receptoru. Endokrinně disruptivní aktivita pak může být zjištěna přímo stanovením množství vzniklého proteinu nebo stanovením enzymové aktivity<sup>5</sup>. Testování probíhá na geneticky modifikovaných savčích buňkách nebo kvasinkách, transfekovaných (transformovaných) vektorem, který obsahuje DNA sekvenci pro receptor, reportérový gen a specifické úseky DNA, na které se připojuje receptorový komplex, a které vyvolají expresi daného reportérového genu. Nejvyužívanějším reportérovým genem pro savčí buňky je gen pro luciferasu, u kvasinek je obvykle používán gen  $\beta$ -galaktosidasy<sup>6,7</sup>. Nejrozšířenějším takovým testem, využívajícím rekombi-

nantní kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* pro zjištění estrogenní aktivity látek, tzv. YES test, používaný pro rychlý screening různorodých chemikálií<sup>8,9</sup>.

Do skupiny benzonitrilových herbicidů patří čtyři strukturně si podobné látky – bromoxynil (3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril), dichlobenil (2,6-dichlorbenzonitril), chloroxynil (3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril) a ioxynil (3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril). Až na chloroxynil jsou všechny poměrně široce používány v zemědělství i v domácnostech pro kontrolu růstu plevelů. Mechanismus, kterým působí toxicky pro cílový organismus, byl detailně prostudován u bromoxynilu, dichlobenilu a ioxynilu<sup>10</sup>. Kromě základních látek na sebe v poslední době strhávají pozornost také jejich metabolity. Jde o látky vznikající v půdě mikrobiální a abiotickou degradací. Mezi nejvýznamnější metabolity benzonitrilových herbicidů řadíme benzamidy (2,6-dichlorbenzamid od dichlobenilu, 3,5-dibrom-4-hydroxybenzamid od bromoxynilu a 3,5-dijod-4-hydroxybenzamid od ioxynilu) a kyseliny odvozené od těchto látek (2,6-dichlorbenzoová kyselina od dichlobenilu, 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kyselina od bromoxynilu a 3,5-dijod-4-hydroxybenzoová kyselina od ioxynilu). Zejména v případě benzamidů se jedná o velmi perzistentní látky, u kterých bylo prokázáno, že jsou velmi obtížně odstraňovány z životního prostředí<sup>11</sup>.

Toxicitní projevy na prokaryotní i eukaryotní organismy jsou u jednotlivých herbicidů již popsány<sup>12</sup>. Cílem práce je doplnit informace o endokrinně disruptivní aktivitě dichlobenilu, ostatních herbicidů a hlavně jejich metabolitů, které prozatím v literatuře chybí.

#### Experimentální část

Pro stanovení estrogenní aktivity benzonitrilových herbicidů a jejich mikrobiálních metabolitů byl zvolen test využívající luminiscenční kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* BMA64-1A (cit.<sup>13,14</sup>). Test je založen na expresi luciferasy, ke které dochází po aktivaci estrogenního receptoru. V testu je kromě kmenu *S. cerevisiae* BMA64-1A využíván ještě kmen *S. cerevisiae* BMA64/Luc, u kterého je luciferasa exprimována konstitutivně a který slouží jako kontrolní kmen pro zjištění toxicity testovaného vzorku. Příprava kvasinkových kmenů *S. cerevisiae* BMA64-1A a *S. cerevisiae* BMA64/Luc. Kmeny byly očkovány z misek do 10 ml tekutého SD média s obsahem glukosy a aminokyselin<sup>15</sup> a kultivovány přes noc za stálého třepání při 28 °C. Narostlá noční kultura byla naředěna SD médiem na  $OD_{600} = 0,6$  a dále kultivována na  $OD_{600} = 0,8$ .

## Pracovní postup

Do skleněných kyvet bylo pipetováno 180  $\mu\text{l}$  suspenze kmene *S. cerevisiae* BMA64-1A a do druhé sady 180  $\mu\text{l}$  suspenze kmene *S. cerevisiae* BMA64/Luc. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 20  $\mu\text{l}$  vzorku (testované látky, 17 $\beta$ -estradiolu nebo destilované vody). Kyvety byly inkubovány 2,5 hodiny při 30 °C. Po uplynutí této doby bylo stanoveno množství vzniklé luciferasy tak, že do každé kyvety bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  1mM roztoku D-luciferinu, rychle byla promíchána a okamžitě proměřena na luminometru FB 12 (Berthold Detection Systems, Německo). Měření probíhalo po dobu 1 minuty a data byla sbírána po 1 sekundě. Kyvety byly měřeny vždy po jedné, okamžitě po přidání D-luciferinu.

## Vyhodnocení testu

Po proměření získáme 60 hodnot RLU (relativní světelné jednotky) pro každou kyvetu. Indukce exprese luciferasy v kmeni *S. cerevisiae* BMA64-1A vlivem působení testované látky je vyjádřena hodnotou FI (indukční faktor).

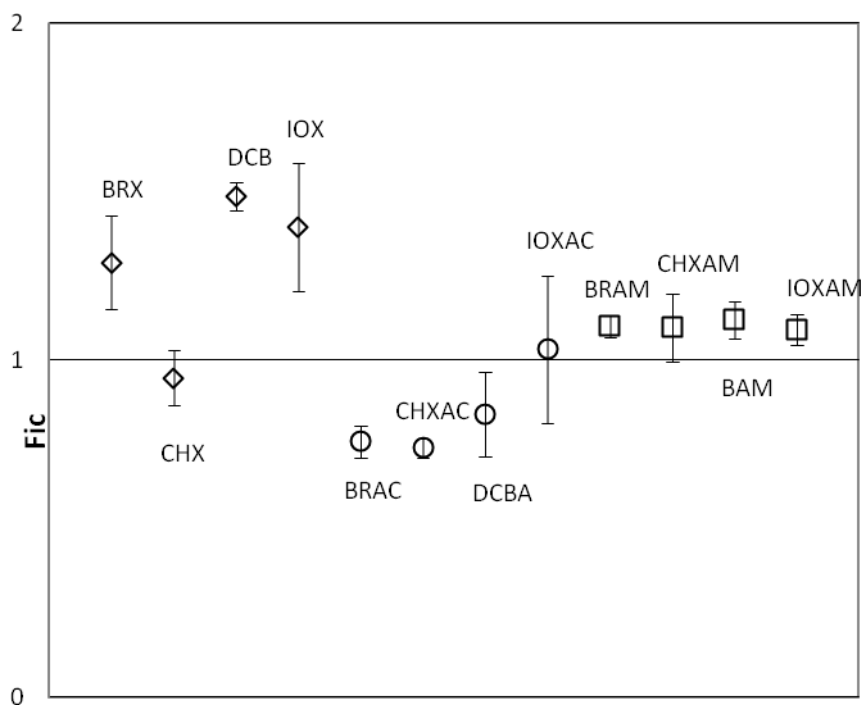
$$FI = \frac{\Sigma L_S}{\phi \Sigma L_B} \quad (1)$$

kde  $\Sigma L_S$  je suma, získaná součtem všech 60 hodnot RLU pro 1 každou kyvetu s testovanou látkou,  $\phi \Sigma L_B$  průměr ze tří vypočtených sum, získaných součtem hodnot RLU pro negativní kontrolu (destilovanou vodu).

Pro zjištění, jestli není přírůstek nebo úbytek luminescence u kmene *S. cerevisiae* BMA64-1A způsoben toxicitou testované látky či přítomností nutrietů se stimulačním efektem, byl stanoven pro každou testovanou látku korekční faktor CF. Tento faktor byl vypočten z hodnot RLU získaných při měření s kmenem *S. cerevisiae* BMA64/Luc.

$$CF = \frac{\phi \Sigma L_B}{\phi \Sigma L_S} \quad (2)$$

kde  $\phi \Sigma L_B$  je průměr ze tří vypočtených sum, získaných součtem hodnot RLU pro negativní kontrolu (destilovanou vodu),  $\phi \Sigma L_S$  průměr ze tří vypočtených sum, získaných součtem hodnot RLU pro danou testovanou látku (koncentraci).



Obr. 1. Hodnoty  $FI_c$  (vyjadřující míru estrogenní aktivity látek) benzonitrilových herbicidů a jejich mikrobiálních metabolitů (pro koncentraci 10  $\text{mg l}^{-1}$ ); BRX – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril, BRAC – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoová kyselina, BRAM – 3,5-dibrom-4-hydroxybenzamid, DCB – 2,6-dichlorbenzonitril, DCBA – 2,6-dichlorbenzoová kyselina, BAM – 2,6-dichlorbenzamid, CHX – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril, CHXAC – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzoová kyselina, CHXAM – 3,5-dichlor-4-hydroxybenzamid, IOX – 3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril (v koncentraci 0,01  $\text{mg l}^{-1}$ ), IOXAC – 3,5-dijod-4-hydroxybenzoová kyselina, IOXAM – 3,5-dijod-4-hydroxybenzamid

Pokud je vypočtený korelační faktor vzorku CF mezi hodnotami 0,5 a 2, je indukční faktor příslušného vzorku upraven podle následujícího vzorce:

$$\text{Fic} = \text{FI} \times \text{CF} \quad (3)$$

Pokud je vypočtený korelační faktor vzorku  $\text{CF} > 2$ , vzorek je toxický a měření musí být provedeno s nižší koncentrací této látky.

#### Hodnocení výsledků

Jednovýběrovým jednostranným t-testem byly porovnány získané hodnoty Fic (vyjadřující míru estrogenní aktivity látek) pro jednotlivé látky (koncentrace) s hodnotou  $\text{Fic} = 1$ , kterou by měl vzorek s nulovou estrogenní aktivitou.

### Výsledky a diskuse

Míra estrogenní aktivity, která je přímo úměrná množství vznikající luciferasy u kmene *Saccharomyces cerevisiae* BMA64-1A, je vyjádřena pomocí koeficientu Fic.

Všechny sledované látky byly testovány v koncentraci  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ve třech paralelách. Při prvním měření samotných herbicidů se ukázalo, že u ioxynilu (IOX) je tato koncentrace příliš toxická, tudíž byla tato látka testována v koncentraci  $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ . Testován byl v koncentraci  $10 \text{ mg l}^{-1}$  také bisfenol A. Jedná se o látku, která je známým endokrinním disruptorem a interaguje s estrogenním receptorem. Bisfenol A byl měřen proto, aby bylo zřejmé, zda je možné v této koncentraci ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) detegovat estrogenní aktivitu u látky nehormonálního charakteru. Dále byl testován  $17\beta$ -estradiol, přirozený ligand lidského estrogenního receptoru, v koncentraci  $0,1 \mu\text{M}$ .

Výsledkem testu jsou Fic hodnoty pro jednotlivé látky (obr. 1), které byly statisticky zpracovány. Pomocí jednostranného jednovýběrového t-testu byly hledány ty hodnoty

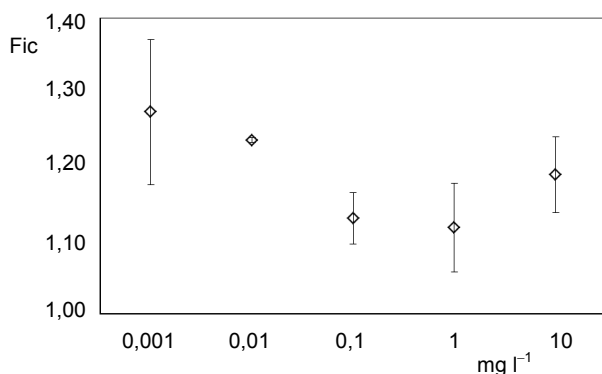
Fic, které jsou statisticky významně vyšší než hodnota  $\text{Fic} = 1$  (hodnota pro vzorek s nulovou estrogenní aktivitou). Koeficient  $\text{Fic} = 1,5 \pm 0,1$  pro herbicid dichlobenil ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) byl na hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,01$  rozpoznán jako statisticky vyšší. Na základě těchto výsledků byla pro dichlobenil proměřena koncentrační řada: 0,001; 0,01; 0,1; 1 a  $10 \text{ mg l}^{-1}$ . Z hodnot získaných proměřením více koncentrací dichlobenilu (obr. 2) vyplývá, že hodnoty Fic pro tento herbicid jsou vyšší, nicméně v porovnání s bisfenolem A, jehož  $\text{Fic} = 72,8 \pm 3,3$ , jsou zanedbatelné. Navíc se u dichlobenilu nenachází žádná závislost hodnoty Fic (estrogenní aktivity) na koncentraci látky. Hodnota koeficientu Fic získaná pro  $17\beta$ -estradiol je  $103 \pm 3$ .

Přestože byla již testována celá řada pesticidních látek, komplexní data popisující endokrinně disruptivní vlastnosti benzonitrilových herbicidů doposud chybí. Z benzonitrilových herbicidů byl na estrogenní aktivitu testován pouze dichlobenil. *In vitro* studie na ovariálních CHO buňkách, hepatocytech pstruha duhového a na rekombinantních kvasinkách<sup>16</sup> neprokázaly tento herbicid jako látku interferující s estrogenním systémem. Ioxynil, jako jediný z benzonitrilových herbicidů, je zde zařazen, a to jako antagonist thyróidních hormonů a jako látka ovlivňující expresi genů kódujících jaderné receptory pro thyróidní hormony<sup>17</sup>. Do této chvíle bylo na několika *in vitro* systémech prokázáno, že kromě antagonistické aktivity vůči trijodthyroninu<sup>18</sup> má ioxynil také vysokou afinitu k transthyretinu<sup>19,20</sup>. Pomocí *in vivo* testu na drápatce vodní však schopnosti ioxynilu interferovat s thyróidním systémem potvrzeny nebyly<sup>18</sup>.

S výsledky těchto studií se shodují výsledky získané měřením s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* BMA64-1A, pomocí které nebyla žádná estrogenní aktivita dichlobenilu, ostatních benzonitrilových herbicidů ani jejich mikrobiálních metabolitů potvrzena. Existují však i jiné mechanismy, kterými mohou tyto látky interferovat s estrogenním systémem a které tímto testem nejsou detegovatelné. Příkladem může být inhibice estrogenního receptoru nebo ovlivnění syntézy a metabolismu příslušných hormonů<sup>6</sup>.

### Závěr

Organické pesticidy jsou největší skupinou xenobiotik, která je lidmi dobrovolně vnášena do životního prostředí. Je nutné zabývat se nejen riziky, která pro člověka a životní prostředí vyplývají z používání pesticidní látky samotné, ale také nutnost intenzivně zkoumat osud těchto látek v životním prostředí. Prostřednictvím biodegradčních pokusů lze vystopovat mikroorganismy s požadovanými degradačními schopnostmi a také určit, jaké látky z daného pesticidu vznikají. Důležité jsou také informace o pohybu a perzistentnosti pesticidních látek a jejich metabolitů v životním prostředí. Pro posouzení takového biodegradčního procesu jsou testy toxicity, mutagenity a také endokrinní disruptce nezbytné.



Obr. 2. Hodnoty koeficientu Fic (vyjadřující míru estrogenní aktivity látek) pro různé koncentrace herbicidu dichlobenilu (DCB)

*Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR 13-28283S.*

## LITERATURA

- World Health Organization: Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, Geneva, Switzerland (WHO 2002).
- Hrubá D.: *Hygiena 1*, 23 (2009).
- Krieger R., Doull J., Ecobichon D., Gammon D., Hodgson E., Reiter L., Ross J. (ed.): *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego 2001.
- Jacobs M. N., Dickins M., Lewis D. F. V.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 117 (2003).
- Giesy J. P., Hilscherová K., Jones P. D., Kannan K., Machala M.: *Mar. Pollut. Bull.* 45, 3 (2002).
- Danish Environmental Protection Agency: Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report No. 43., Copenhagen, Denmark (Danish EPA 2003).
- García-Reyero N., Grau E., Castillo M., López de Alda M. J., Barceló D., Piña B.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152 (2001).
- Arnold S. F., Robinson M. K., Notides A., Guillette L. J., McLachlan J. A.: *Environ. Health Perspect.* 104, 544 (1996).
- Routledge E. J., Sumpter J. P.: *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241 (1996).
- Janů P., Lovecká P.: *Chem. Listy* 108, 141 (2014).
- Holtze M. S., Sørensen S. R., Sørensen J., Aamand J.: *Environ. Pollut.* 154, 155 (2008).
- Veselá A. B., Franc M., Pelantová H., Kubáč D., Vejvodová V., Šulc M., Bhalla T. C., Macková M., Lovecká P., Janů P., Demnerová K., Martínková L.: *Biodegradation* 21, 761 (2010).
- Takeuchi S., Iida M., Yabushita H., Matsuda T., Kojima H.: *Chemosphere* 74, 155 (2008).
- Leskinen P., Virta M., Karp M.: *Yeast* 20, 1109 (2003).
- Leskinen P., Michelini E., Picard D., Karp M., Virta M.: *Chemosphere* 61, 259 (2005).
- Burke D., Dawson D., Stearns T.: *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2000.
- Petit F., Le Goff P., Cravédi J. P., Valotaire Y., Pakdel F.: *J. Mol. Endocrinol.* 19, 321 (1997).
- McKinlay R., Plant J. A., Bell J. N. B., Voulvoulis N.: *Environ. Int.* 34, 168 (2008).
- Sugiyama S., Shimada N., Miyoshi H., Yamauchi K.: *Toxicol. Sci.* 88, 367 (2005).
- Ishihara A., Nishiyama N., Sugiyama S., Yamauchi K.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 36 (2003).
- Morgado I., Hamers T., Van der Ven L., Power D. M.: *Chemosphere* 69, 155 (2007).

**P. Lovecká, M. Thimová, and K. Demnerová**  
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Potential Endocrine Activity of Benzonitrile Herbicides**

This review focuses on the estrogenic activity of the benzonitrile herbicides – bromoxynil, chloroxynil, dichlobenil and ioxynil and their microbial metabolites – acids (such as 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoic acid and its amide). Some of their metabolites are very persistent. The estrogenic activity of the benzonitrile herbicides and their metabolites were studied using the mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* BMA64-1A. However, their estrogenic activity was not proved.