

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Mapování výskytu (anti-)progestagenních aktivit
v povrchových vodách České republiky**

Autor: Jana Krulová

Vedoucí práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Pavel Šauer, Ph.D.

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: 3.ročník

České Budějovice, 2021

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Jana Krulová

Poděkování

Děkuji své vedoucí doc. Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D., i konzultantovi Ing. Pavlu Šauerovi, Ph.D., za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana KRULOVÁ**
Osobní číslo: **V18B027P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Téma práce: **Mapování výskytu (anti-)progesteronových aktivít v povrchových vodách České republiky**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

V posledních několika desetiletích byly shromážděny důkazy o tom, že některé kontaminanty životního prostředí mohou narušovat endokrinní systém volně žijících živočichů a lidí. Tyto látky bývají souhrnně označovány jako endokrinní disruptory. Kromě přírodních a syntetických hormonů můžeme do této kategorie látek zařadit i některé pesticidy, průmyslové chemikálie nebo sloučeniny obsažené v přípravcích pro domácnost a osobní péči. Ve vodním prostředí byla dosud největší pozornost věnována látkám s estrogenní aktivitou, tzv. (xeno)estrogenům, u kterých bylo prokázáno, že způsobují feminizaci u exponovaných obratlovců. Identifikovány byly i látky s anti-estrogenními a (anti-)androgenními aktivitami. Ve vodním prostředí se však vyskytují i sloučeniny s jinými hormonálními aktivitami, o kterých máme zatím velmi málo informací. Patří k nim látky s (anti-)progesteronovou aktivitou, tj. aktivitou zprostředkovanou přes progesteronový receptor (PR).

Cílem bakalářské práce bude zmapovat výskyt látek s (anti-)progesteronovou aktivitou v povrchových vodách České republiky pomocí specifického in vitro biotestu.

Metodický postup: Budou analyzovány extrakty z pasivních vzorkovačů POCIS (polar organic chemical integrative sampler), které byly exponovány v povrchových vodách na 21 lokalitách České republiky. V extraktech bude zjišťována (anti-)progesteronová aktivita pomocí (anti-)PR-CALUX in vitro biotestu. Syntetický progesteron ORG 2058 bude použit jako referenční látka pro progesteronovou aktivitu a syntetický anti-progesteron mifepriston (RU-486) bude použit jako referenční látka pro anti-progesteronovou aktivitu. Extrakty budou zároveň otestovány na cytotoxicitu pomocí testu redukce resazurinu, aby byl vyloučen toxický vliv extraktů na životnost buněk. Pomocí získaných dat bude možné vytipovat lokality, které jsou ohroženy kontaminací látkami s (anti-)progesteronovou aktivitou. Bude rovněž zjišťován pravděpodobný zdroj této kontaminace na základě dostupných informací o sledovaných lokalitách.

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Bain, P. A., Williams, M. & Kumar, A. (2014). Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(10), 2297-2307.
- Chatterjee, S., Kumar, V., Majumder, C. B. & Roy, P. (2008). Screening of some anti-progesterin endocrine disruptors using a recombinant yeast based in vitro bioassay. *Toxicology In Vitro*, 22(3), 788-798.
- Leusch, F. D., Khan, S. J., Laingam, S., Prochazka, E., Frosco, S., Trinh, T., Chapman H. F. & Humpage, A. (2014). Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*, 49, 300-315.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan F (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell

cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426.

Schriks, M., Heringa, M. B. & van der Linden, S. C. (2009). Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. *Association of Rhine Waterworks – RIWA, The Netherlands*, pp. 24.

Scott, P.D., Bartkow, M., Blockwell, S.J., Coleman, H.M., Khan, S. J., Lim, R., McDonald, J.A., Nice, H., Nuggeoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L.A., Warne, M.S.J. & Leusch, F.D.L. (2014). An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(22), 12951-12967.

Sonneveld, E., Pieterse, B., Schoonen, W. G., & van der Burg, B. (2011). Validation of in vitro screening models for progestagenic activities: inter-assay comparison and correlation with in vivo activity in rabbits. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 545-554.

Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R. & Kocour Kroupová, H. (2018). Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water Research*, 137, 64-71.

Van der Linden, S. C., Heringa, M. B., Man, H. Y., Sonneveld, E., Puijker, L. M., Brouwer, A. & Van der Burg, B. (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5814-5820.


Viswanath, G., Halder, S., Divya, G., Majumder, C. B. & Roy, P. (2008). Detection of potential (anti)progestagenic endocrine disruptors using a recombinant human progesterone receptor binding and transactivation assay. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 295(1), 1-9.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: Ing. Pavel Šauer, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: 3. února 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 3. května 2021



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

LS.



prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2020

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	Testování toxicity.....	9
2.2	<i>In vitro</i> biotesty	9
2.3	<i>In vitro</i> testy pro detekci (anti-)progestagenní aktivity	10
2.3.1	YPS (Yeast progesterone screen)	10
2.3.2	Test s buňkami HEK 293	10
2.3.3	Test s buňkami HELN-PR B	11
2.3.4	PR-GeneBLAzer.....	11
2.3.5	(Anti-)PR-CALUX biotesty	11
2.4	Látky s progestagenní aktivitou.....	14
2.4.1	Přírodní látky s progestagenní aktivitou	14
2.4.2	Syntetické progestiny.....	16
2.5	Progestagenní aktivita ve vodním prostředí	17
2.6	Látky s anti-progestagenní aktivitou.....	19
2.7	Anti-progestagenní aktivita ve vodním prostředí	19
3	Materiál a metodika.....	21
3.1	Odběr vzorků	21
3.2	Extrakce vzorků povrchových vod	23
3.3	Chemikálie.....	23
3.4	(Anti-)PR-CALUX <i>in vitro</i> testy	23
3.5	Kultivace buněčných linií.....	25
3.6	Nasazení buněk na 96-jamkovou mikrotitrační destičku	25
3.7	Expozice buněk testovaným extraktům povrchových vod.....	25
3.7.1	Progestagenní aktivita.....	25
3.7.2	Anti-progestagenní aktivita.....	27

3.8	Měření (anti-)progestagenní aktivity.....	29
3.9	Měření cytotoxicity	29
3.10	Analýza dat	31
3.10.1	Analýza dat (anti-)progestagenní aktivity	31
3.10.2	Analýza dat testu cytotoxicity	32
4	Výsledky.....	33
4.1	Hodnocení validity testů.....	33
4.1.1	(Anti-)progestagenní aktivita ve vzorcích z roku 2017	34
4.1.2	(Anti-)progestagenní aktivita ve vzorcích z roku 2016	36
4.2	Test redukce resazurinu.....	36
5	Diskuze	38
6	Závěr.....	43
7	Použitá literatura	44
8	Přílohy	52
9	Abstrakt	74
10	Abstract.....	75

1 Úvod

V posledních několika desetiletích byly shromážděny důkazy o tom, že některé kontaminanty životního prostředí mohou narušovat endokrinní systém volně žijících živočichů a lidí. Tyto látky bývají souhrnně označovány jako endokrinní disruptory. Kromě přírodních a syntetických hormonů můžeme do této kategorie látek zařadit i některé pesticidy, léčiva, průmyslové chemikálie nebo sloučeniny obsažené v přípravcích pro domácnost a osobní péči. Ve vodním prostředí byla dosud největší pozornost věnována látkám s estrogení aktivitou tzv. (xeno)estrogenům, u kterých bylo prokázáno, že způsobují feminizaci u exponovaných obratlovců. Identifikovány byly i látky s anti-estrogenními a anti-androgenními aktivitami. Ve vodním prostředí se však vyskytují i sloučeniny s jinými hormonálními aktivitami, o kterých máme zatím velmi málo informací. Patří k nim látky s (anti-)progestagenní aktivitou, tj. aktivitou zprostředkovanou přes progesteronový receptor (PR). (Anti-)progestagenní aktivitu mohou vykazovat látky, které jsou obsaženy především v hormonální antikoncepci, potratových pilulkách nebo se využívají při léčbě některých patologických stavů.

Cílem této práce bylo zmapovat výskyt látek s (anti-)progestagenní aktivitou v povrchových vodách České republiky pomocí (anti-)PR-CALUX *in vitro* biotestu.

2 Literární přehled

2.1 Testování toxicity

Biologické testy toxicity (biotesty) se využívají zejména ke zkoumání účinků látek (antropogenního i přírodního původu) na živé organismy. Testy se provádí za předem přesně definovaných podmínek a jsou navrženy tak, aby poskytovaly vhodná data o sledované látce. Výsledkem testů je stanovení míry vlivu testované látky na testovací organismus za daných expozičních podmínek (Kočí a Mocová, 2009).

K testování toxicity ve vodním prostředí se používá mnoho metod. Mezi ty nejčastěji využívané patří:

- a) Metody *in silico* = z lat. „v počítači“, odhadují toxicitu a rizika chemických látek pomocí matematických modelů (Cronin a Madden, 2010)
- b) Metody *in vitro* = z lat. „ve skle“, testy v laboratorních podmínkách využívající pouze části organismu jako jsou tkáně, orgány nebo buňky
- c) Metody *in vivo* = z lat. „v živém“, pro testování se využívají celé organismy (Russell a Burch, 1959)
- d) Metody *ex vivo* = z lat. „mimo živé“, testy prováděné v nebo na tkáních v umělém prostředí mimo organismus s minimální změnou přirozených podmínek (Gowing a kol., 2017)

2.2 *In vitro* biotesty

V posledních letech je snaha více využívat testy *in vitro* místo testů *in vivo*. Při testování *in vitro* se využívají pouze části organismu jako jsou tkáně, buňky nebo orgány, a ne celé organismy jako je tomu u *in vivo* testů. Ve 20. století vznikl ve Velké Británii tzv. princip 3R – replacement (nahrazení), refinement (zmírňování) a reduction (snižování). Hlavní myšlenkou tohoto principu je humánní přístup k experimentům na zvířatech a jeho cílem je přednostně využívat k testům toxicity nižší organismy nebo je úplně nahradit alternativními metodami, snížit počet zvířat využívaných k testování a zmírnit utrpení a minimalizovat jejich bolest. Testy *in vitro* spadají do zásady replacement (nahrazení). Díky tomu je využito, případně zabito mnohem méně živých organismů než u *in vivo* testů (Russel a Burch, 1959).

In vitro biotesty se používají zejména při teoretickém objasňování mechanismu účinku toxické látky, při screeningovém testování před testy na živých organismech, čímž

se snižuje počet pokusných organismů a dále pak i k rutinnímu testování toxicity (Svobodová a kol., 1997).

Výhodou *in vitro* biotestů je jejich vysoká citlivost, reprodukovatelnost a relativně nízké finanční i časové nároky. Naopak jejich nevýhodou je to, že nemohou zcela nahradit enzymaticko-imunitní systém živých organismů (Svobodová a kol., 1997).

K detekci hormonální aktivity se využívá mnoho *in vitro* biotestů, patří mezi ně například testy vazby ligandu na receptor, testy proliferace buněk nebo testy s reportérovými geny (Murk a kol., 2002; Schriks a kol., 2009; Blair a kol., 2000; Soto a kol., 1995).

2.3 *In vitro* testy pro detekci (anti-)progestagenní aktivity

Pro detekci (anti-)progestagenní aktivity byly doposud použity následující *in vitro* biotesty:

2.3.1 YPS (Yeast progesterone screen)

Při YPS testování se využívají geneticky modifikované kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*, do kterých jsou vneseny vektory obsahující sekvence DNA pro lidský progesteronový receptor a sekvence progesteron responzivních elementů, které jsou spojené s reportérovým genem LacZ kódujícím β -galaktosidázu (Chatterjee a kol., 2008). Chromogenní substrát 2-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid nebo chlorofenol- β -D-galaktopyranosid, který se přidává do média, je enzymem β -galaktosidázou štěpen na odpovídající žluté či červené produkty, jejichž absorbance je měřena (Gaido a kol., 1997).

2.3.2 Test s buňkami HEK 293

Savčí buňky HEK 293 byly transfekovány vektory obsahující sekvence DNA pro lidský progesteronový receptor a sekvence progesteron responsivních elementů, které jsou spojené s reportérovým genem luc. Po přidání substrátu luciferinu lze produkci luciferázy měřit vzniklou světelnou aktivitou. Výsledná hormonální aktivita je vyjádřena v bioanalytické ekvivalentní koncentraci (ekv.) vztahující se k příslušné referenční látce (Viswanath a kol., 2008).

2.3.3 Test s buňkami HELN-PR B

HELN-PR B je buněčná linie, která vznikla transfekováním buněčné linie HeLa s cílem detekovat ligandy progesteronového receptoru, izoformy beta (Balaguer a kol., 1999). Do buněčných linií byly transfekovány vektory obsahující sekvenci DNA pro lidský progesteronový receptor a sekvence progesteron responsivních elementů, které jsou spojené s reportérovým genem luc. Po přidání substrátu luciferinu lze produkci luciferázy měřit vzniklou světelnou aktivitou. Výsledky se vyjadřují jako procento maximální aktivity luciferázy vztahované k referenční látce (Bellet a kol., 2012).

2.3.4 PR-GeneBLAzer

Pro testování GeneBLAzer se používají savčí buněčné linie HEK 293T, do kterých jsou vneseny ligandy progesteronového receptoru a reportérový gen β -laktamáza. Metoda je založena na aktivitě β -laktamázy v buněčných liniích, která je detekována prostřednictvím substrátu na bázi přenosu fluorescenční rezonanční energie. Substrát obsahuje 2 fluorofory – kumarin a fluorescein. Substrát vytváří poměrovou odezvu reportéru s minimálním experimentálním šumem. Reportérová odpověď je vyjádřena jako poměr vzniklého modrého a zeleného světla (Cathleen Salomo, Molecular Devices [online]; Huang a kol., 2011).

2.3.5 (Anti-)PR-CALUX biotesty

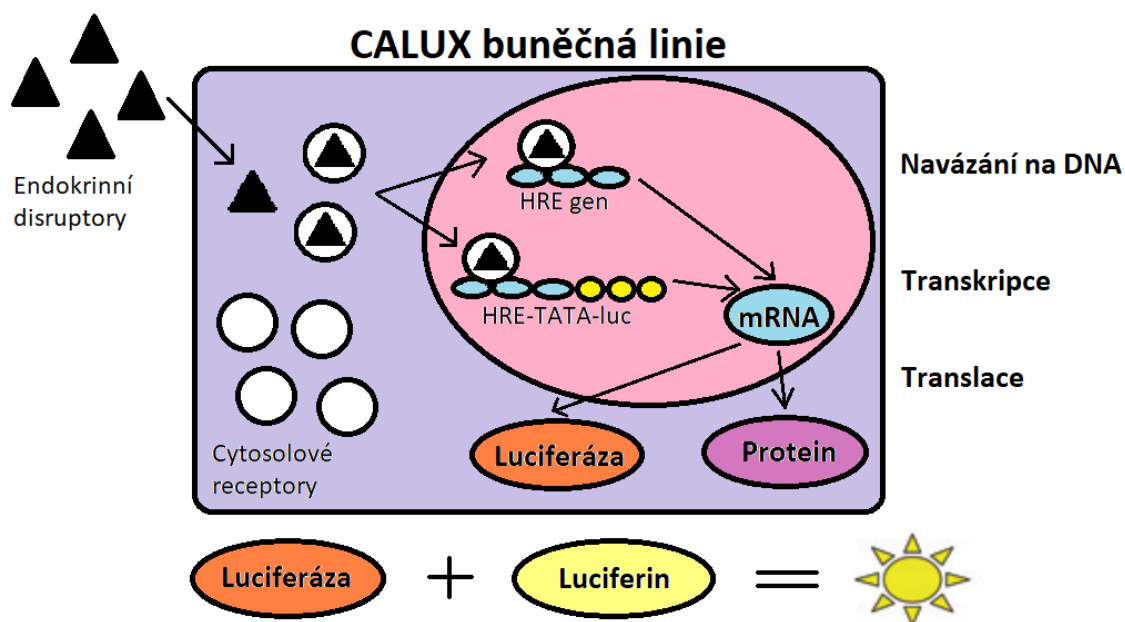
O CALUX biotestech je zde pojednáno podrobněji, protože tyto testy byly využity v mé bakalářské práci.

CALUX biotesty patří mezi *in vitro* testy založené na expresi reportérového genu. Tyto testy jsou poměrně rychlou a jednoduchou metodou používanou pro detekci účinků způsobovaných sloučeninami, které jsou schopné se navázat na určité hormonální receptory a stimulovat či inhibovat jejich transkripční aktivitu (Svobodová a Cajthaml, 2010). CALUX testy podávají informaci o celkovém účinku ligandů na určitý receptor (Murk a kol., 1996).

Podle receptorů, které CALUX testy obsahují je můžeme rozdělit na: estrogenní (ER-CALUX), androgenní (AR-CALUX), progestagenní (PR-CALUX), glukokortikoidní (GR-CALUX), thyroïdní (TR-CALUX), mineralokortikoidní (MR-CALUX) a mnoho dalších (Schriks a kol., 2009).

Pro CALUX biotesty se používají geneticky modifikované U2-OS buněčné linie (rakovinové buňky kostní dřevě). Pro tuto linii je typický rychlý růst, vysoká citlivost i k nízkým koncentracím detekovaných látek a relativně snadná manipulace (Sonneveld a kol., 2011). Principem CALUX testů (Obr. 1) pro detekci hormonálních aktivit je, že jsou nejprve do buněčných linií transfekovány vektory obsahující sekvence komplementární DNA pro lidské hormonální receptory a sekvence hormon responsivních elementů, které jsou spojené s reportérovým genem luc a TATA boxem (Sonneveld a kol., 2005). Jakmile hormony nebo sloučeniny podobné hormonům vstoupí do cílové buňky a navážou se na cytosolické receptory, dochází po dimerizaci k přemístění komplexu ligand-receptor do jádra. V jádře se naváže komplex ligand-receptor na úsek DNA, na kterém jsou hormon responsivní elementy. Při normálních fyziologických podmínkách jsou tyto hormonálně responsivní elementy (HRE) schopné spustit transkripci genů, tzn. dojde k syntéze mRNA a následně k translaci (produkci proteinů). U transgenních CALUX buněk je za hormonálně responsivními elementy umístěn speciálně vytvořený gen luc. Po dosednutí komplexu ligand-receptor na HRE pak dojde k syntéze proteinu luciferázy. Po přidání substrátu luciferinu lze produkci luciferázy měřit vzniklou světelnou aktivitou (Schriks a kol., 2009). Výsledná hormonální aktivita je vyjádřena v bioanalytické ekvivalentní koncentraci (ekv.) vztahující se k příslušné referenční látce ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. např. progesteronu, mifepristonu, levonorgestrelu, atd.).

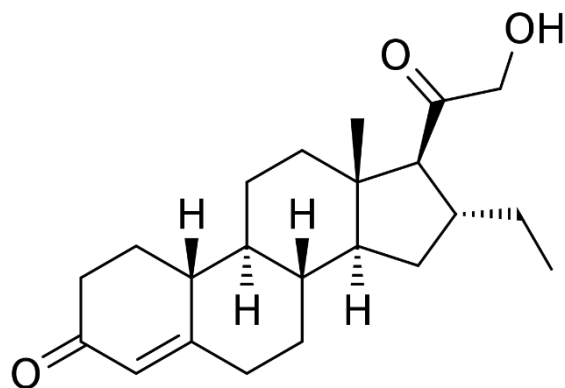
Tyto testy dokážou detekovat aktivitu látek, které se vážou na daný receptor a aktivují ho (agonistů) a látek, které se vážou na receptor a blokují jej (antagonistů) (Kinnberg, 2003). Výhodou těchto testů je, že jsou velmi citlivé, to znamená, že jsou schopné detekce aktivity i při nízkých koncentracích a selektivně odpovídají na ligandy daného receptoru (Sonneveld a kol., 2011).



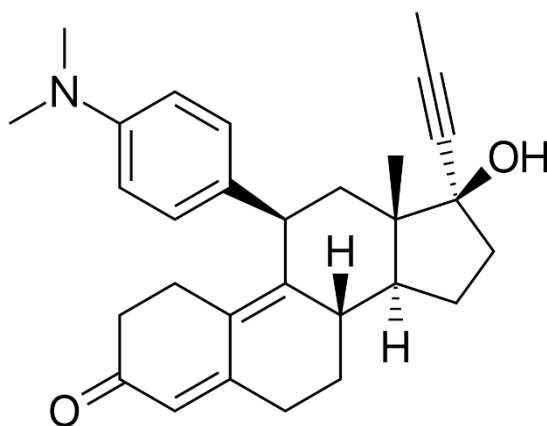
Obr. 1: Schématické zobrazení CALUX biotestu (upraveno podle Schriks a kol., 2009)

Pomocí (anti-)PR CALUX testu se měří progestagenní a anti-progestagenní aktivita (tj. aktivita zprostředkovaná skrze progesteronový receptor), kterou vykazují sloučeniny s podobným mechanismem účinku jako má progesteron, respektive mifepriston, což je modelový anti-progestin (Sonneveld a kol., 2011). Do buněčných linií byly vneseny dva plazmidy, první pro luciferázu a progesteron responzivní elementy, a druhý pro progesteronový receptor (Sonneveld a kol., 2011). Poprvé byl (anti-)PR CALUX použit pro detekci anti-progestagenní aktivity polycyklických mošusových sloučenin a UV filtrů (Schreurs a kol., 2005).

Jako referenční látky pro progestagenní aktivitu se používají steroidní látky: ORG 2058 (Obr. 2), progesteron, levonorgestrel, promegeston a medroxyprogesteron acetát. Jako referenční látka pro anti-progestagenní aktivitu se používá mifepriston (Obr. 3).



Obr. 2: Strukturální vzorec ORG2058



Obr. 3: Strukturální vzorec mifepristonu

2.4 Látky s progestagenní aktivitou

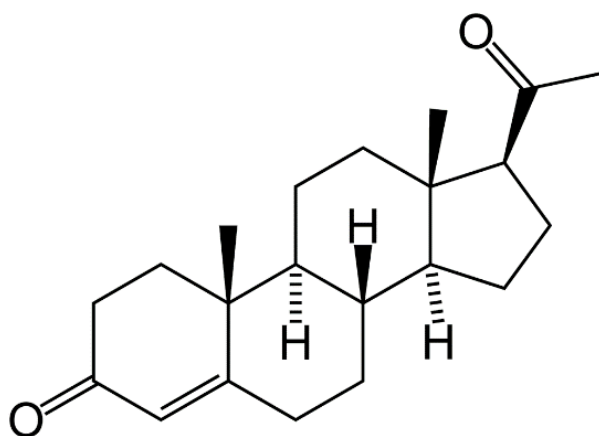
2.4.1 Přírodní látky s progestagenní aktivitou

Mezi přírodní látky vykazující progestagenní aktivitu se primárně řadí progesteron a jeho metabolity (Shore a Shemesh, 2003; Creusot 2014). Progesteron (Obr. 4) je lipofilní steroidní hormon, který je nezbytným regulátorem růstu a vývoje ženských pohlavních orgánů (Graham a Clarke, 1997). Společně s androgeny a estrogyeny se řadí mezi významné reprodukční hormony (Katzung, 1994). Syntetizuje se hlavně ve vaječnících, ale také v kůře nadledvin či ve varlatech (Sonneveld a kol., 2011). Ve vaječnících je progesteron produkován primárně žlutým tělískem. Velké množství progesteronu je též syntetizováno placentou během těhotenství (Katzung, 1994). Mezi jeho hlavní funkce patří příprava a udržení těhotenství, snížení kontrakcí gravidní dělohy, zvýšení viskozity hlenu děložního hrdla, stimulace a vyvolání sekrece mléčné žlázy, stimulace gonadotropinů nebo zvýšení bazální teploty (Trojan a kol., 2003). Mimo výše zmíněné

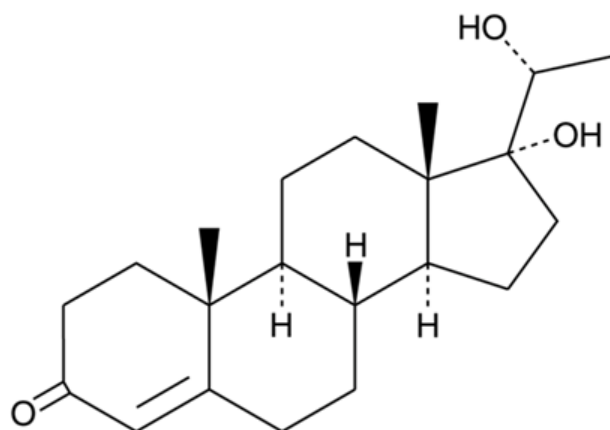
hormonální účinky slouží též jako prekurzor pro estrogény, androgeny a adrenokortikální steroidy (Katzung, 1994). Progesteron se odbourává v játrech a jeho metabolity jsou vylučovány primárně močí (Trojan a kol., 2003). U savců, ptáků, obojživelníků a plazů je progesteron hlavním progestagenním hormonem (Shore a Shemesh, 2003). U ryb nemá progesteron příliš velký význam, u nich se uplatňuje především hormon 17 α ,20 β -dihydroxy progesteron (DHP) (Obr. 5) (Scott a kol., 2010).

Progesteron se dostává do vodního prostředí s vyčištěnými komunálními odpadními vodami, protože nedochází k jeho kompletnímu odstranění na ČOV a dále s odpadními vodami z chovu hospodářských zvířat.

Dále můžeme mezi přírodní látky s progestagenní aktivitou zařadit některé flavonoidy (apigenin či kaempferol), které se nacházejí v ovoci a zelenině (Scippo a kol., 2004; Willemsen a kol., 2004) a kyselinu syringovou obsaženou v čaji a červeném víně (Rosenberg a kol., 1998). Za pravděpodobný zdroj progestagenních flavonoidů ve vodách by se mohly považovat komunální odpadní vody nebo odpadní vody z potravinářského průmyslu.



Obr. 4: Strukturální vzorec progesteronu



Obr. 5: Strukturní vzorec DHP

2.4.2 Syntetické progestiny

Syntetické progestiny jsou látky navrženy tak, aby se vážaly na progesteronový receptor a napodobovaly tak přírodní hormon progesteron (Africander a kol., 2011).

Používají se zejména v ženské antikoncepci, při hormonální léčbě rakoviny, při léčbě gynekologických onemocnění (Spitz a Chwalisz, 2000) či k redukci nadměrného ochlupení (Becker a kol., 2001) a představují tak nedílnou součást řady léčiv. Navíc megestrol acetát a medroxyprogesteron acetát jsou progestiny, které se využívají například při léčbě syndromu nádorové anorexie a kachexie (Maltoni a kol., 2001).

Schopnost syntetických progestinů vázat se i na jiné receptory, než jen na progesteronový má za následek řadu nežádoucích účinků (Besse a Garric, 2009). Tyto látky se mohou vázat například na estrogení, androgení, glukokortikoidní nebo mineralokortikoidní receptor (Kumar a kol., 2015).

Syntetické progestiny můžeme rozdělit na progestiny odvozené od progesteronu či testosteronu a derivát spirolaktonu (drospirenon). Progesteronové deriváty zahrnují deriváty 17- α -hydroxyprogesteronu (např. progesteron, megestrol acetát, medroxyprogesteron acetát) a deriváty 19-norprogesteronu (např. trimegeston, nestoron, nomegestrol acetát). Testosteronové deriváty jsou deriváty 19-nortestosteronu a můžeme je rozdělit na estrany (např. ethisteron, norethisteron, norethisteron acetát) a gonany (např. gestoden, levonorgestrel, desogestrel) (Kumar a kol., 2015).

2.5 Progestagenní aktivita ve vodním prostředí

Progestagenní aktivita byla zatím detekována v povrchových vodách a na odtoku z ČOV v Nizozemí, v povrchových vodách a v říčním sedimentu ve Francii, na odtoku z ČOV v Indii, na přítoku a odtoku z ČOV v Austrálii, na odtoku z ČOV a v povrchových vodách v České republice a v povrchové vodě v Srbsku (Tab.1).

V dosud publikovaných studiích zaměřených na progestagenní aktivitu byly použity různé referenční látky a z tohoto důvodu nelze porovnávat výsledky studií mezi sebou.

V České republice byla detekována progestagenní aktivita pomocí PR-CALUX biotestu na odtoku z ČOV v rozmezí 0,06-0,47 ng·l⁻¹ ekv. ORG 2058 a v povrchových vodách v rozmezí 0,03-0,06 ng·l⁻¹ ekv. ORG 2058 (Šauer a kol., 2018).

Tab. 1: Výskyt progestagenní aktivity ve vodním prostředí

	Rodičovská/transgenní buněčná linie	Země	Referenční látka	ng·l ⁻¹ ekv.	Citace
Přítok na ČOV	U2-OS/PR-CALUX	Austrálie	progesteron	8,35-10,3	Roberts a kol., 2015
Odtok z ČOV	U2-OS/PR-CALUX	Nizozemí	ORG 2058	0,78-0,86	van der Linden a kol., 2008
	HeLa/HELN-PR B	Francie	promegeston	ND	Bellet a kol., 2012
	U2-OS/PR-CALUX	Austrálie	levonorgestrel	<0,01-5,4	Leusch a kol., 2014
	U2-OS/PR-CALUX	Austrálie	progesteron	~17	Bain a kol., 2014
	U2-OS/PR-CALUX	Austrálie	progesteron	33,8-45	Roberts a kol., 2015
	HeLa/HELN-PR B	Austrálie	promegeston	11.8	Neale a kol., 2020
	transgenní HEK 293 buněčná linie	Indie	progesteron	4,08-7,23	Viswanath a kol., 2008
	HeLa/HG _s LNGal4-PR	Tunisko	promegeston	ND	Mnif a kol., 2010
	U2-OS/PR-CALUX	Česká republika	ORG 2058	0,06-0,47	Šauer a kol., 2018
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / YPS	Čína	progesteron	ND	Rao a kol., 2014
Povrchová voda	U2-OS/PR-CALUX	Nizozemí	ORG 2058	4,5	van der Linden a kol., 2008
	U2-OS/PR-CALUX	Austrálie	levonorgestrel	ND	Scott a kol., 2014
	HeLa/HELN-PR B	Francie	promegeston	514 400 ng/g	Creusot a kol., 2014
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / YPS	Čína	progesteron	ND	Rao a kol., 2014
	U2-OS/PR-CALUX	Česká republika	ORG 2058	0,03-0,06	Šauer a kol., 2018a
	HEK293T/PR-GeneBLAzer	Německo	promegeston	ND	Müller a kol., 2018
	HEK293T/PR-GeneBLAzer	Srbsko	promegeston	0,8-0,29	Hashmi a kol., 2020
Říční Sediment	HeLa/HELN-PR B	Francie	promegeston	0,4-3,5 ng/g	Creusot a kol., 2014

Vysvětlivky: ND – nebylo zjištěno; ekv. – ekvivalenty

2.6 Látky s anti-progestagenní aktivitou

Látky s anti-progestagenní aktivitou (anti-progestiny) jsou receptorové inhibitory progesteronu, jedná se tedy o antagonisty progesteronového receptoru. Mezi tyto látky můžeme zařadit léčiva vykazující afinitu k progesteronovému receptoru, jako je: antagonistu progesteronového receptoru mifepriston či selektivní modulátory progesteronového receptoru ulipristal acetát, lonaprisan a telapriston (Knutson a Lange, 2014). Tyto anti-progestiny jsou nejvíce obsaženy v postkoitální antikoncepci (vyvolávají potrat), ale používají se i při léčbě děložních myomů, při endometrióze, rakovině endometria a jako látky inhibující nebo zpožďující ovulaci (Tang, 2006). Dále se mohou využít při léčbě rakoviny prsu nebo fibróze močového měchýře (Knutson a Lange, 2014).

Mezi anti-progestiny se dále řadí například polycyklické mošusové sloučeniny (vonné přísady v domácích čistících prostředcích, v pracích prostředcích, parfémeh a kosmetice), UV filtry (organické sloučeniny absorbující UV-A a UV-B záření používané v opalovacích krémech a kosmetice) (Schreurs a kol., 2005) nebo některé bromované zpomalovače hoření (sloučeniny snižující hořlavost výrobku) (Hamers a kol., 2006). Další látkou, která vykazuje anti-progestagenní aktivitu je dikarboximidový fungicid vinclozolin a jeho dva metabolity (Molina-Molina a kol., 2006). Anti-progestagenní aktivitu ve slabší míře mohou vykazovat i některé androgeny (androstany) (Bellet a kol., 2012). Podle Šauer a kol. (2021) a Grimaldi a kol. (2019) vykazují anti-progestagenní aktivitu i některé bisfenoly například bisfenol TMC, bisfenol A, bisfenol AF, bisfenol Z, bisfenol M, bisfenol AP, bisfenol B, bisfenol P a mnoho dalších.

Podle Rosenberg a kol. (1998) mohou anti-progestagenní aktivitu vykazovat i některé fyto-anti-progestageny jako: β -caroten, kyselina chlorogenová, chlorofylin, kyselina ferulová, kyselina m-kumarová, kyselina listová a další.

2.7 Anti-progestagenní aktivita ve vodním prostředí

Doposud byla anti-progestagenní aktivita detekována v odpadních vodách na přítoku i odtoku z ČOV v Číně, na přítoku na ČOV ve Francii, na odtoku z ČOV v Indii, na odtoku z ČOV v povodí Dunaje, v povrchových vodách v Austrálii, na přítoku i odtoku z ČOV a v povrchových vodách v České republice (Tab. 2).

Nejvyšší anti-progestagenní aktivita na ČOV byla naměřena v Číně pomocí kvasinkového biotestu. Na přítoku na ČOV byla detekována aktivita 271 000 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu a na odtoku z ČOV byla změřena aktivita v rozmezí 31 500-207 000 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu (Rao a kol., 2014). Nejvyšší aktivita v povrchových vodách, která činila 121 000 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu byla naměřena též v Číně pomocí kvasinkového biotestu.

V České republice byla detekována anti-progestagenní aktivita pomocí PR-CALUX biotestu. V odpadní vodě na přítoku na ČOV byla změřena aktivita v rozmezí 2,6 – 83 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu, na odtoku z ČOV byla změřena aktivita s maximální hodnotou 3,6 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu a v povrchových vodách byla změřena aktivita s maximální hodnotou 1,4 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu (Šauer a kol., 2018).

Tab. 2: Výskyt anti-progestagenní aktivity ve vodním prostředí

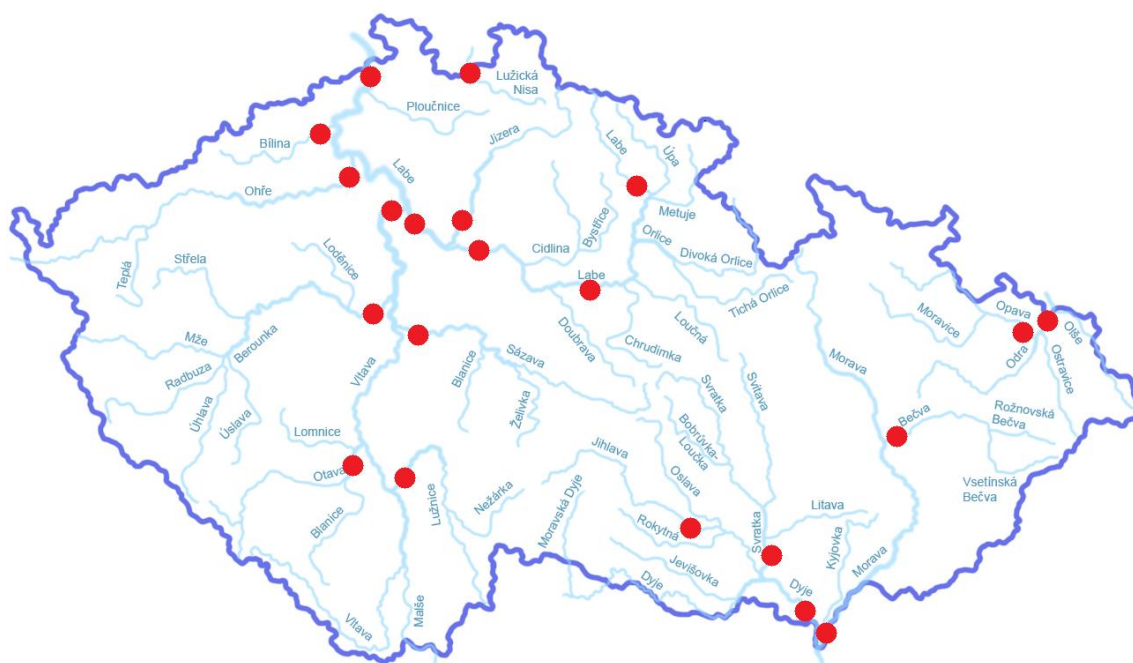
	Lokalita	Test/buněčná line	Anti-progestagenní aktivita (ng·l ⁻¹ ekv. mifepristonu)	Citace
Přítok na ČOV	Francie	HELN-PR B buněčná linie	2,8 – 3,8	Bellet a kol., 2012
	Česká republika	PR-CALUX	2,6 - 83	Šauer a kol., 2018a
	Čína	YPS	271 000	Rao a kol., 2014
Odtok z ČOV	Česká republika	PR-CALUX	<LOQ – 0,89	Šauer a kol., 2018a
	Česká republika	PR-CALUX	<LOQ – 3,6	Šauer a kol., 2018b
	Čína	YPS	15 200 – 81 600	Li a kol., 2011
	Čína	YPS	31 500 – 207 000	Rao a kol., 2014
	Indie	transgenní buněčná linie HEK 293	8 592 000	Viswanath a kol., 2008
	Povodí Dunaje	PR-CALUX	<LOQ – 17	Alygizakis a kol., 2019
Povrchová voda	Austrálie	PR-CALUX	<LOQ – 32 000	Scott a kol., 2014
	Česká republika	PR-CALUX	<LOQ	Šauer a kol., 2018a
	Česká republika	PR-CALUX	<LOQ – 1,4	Šauer a kol., 2018b
	Čína	YPS	121 000	Rao a kol., 2014

Vysvětlivky: ekv. – ekvivalenty, LOQ – limit kvantifikace

3 Materiál a metodika

3.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků byl prováděn pomocí pasivních vzorkovačů POCIS (z angl. Polar organic chemical integrative samplers) v roce 2017. POCIS vzorkovače byly umístěny v povrchových vodách České republiky (Obr. 6) v hloubce přibližně 0,4 metru. Celkem bylo sledováno 21 lokalit (Tab. 3) v 17-ti řekách. Jednalo se o tzv. uzávěrové profily (konec povodí) nebo významná vzorkovací místa podél profilu řeky Labe. Dále byly použity vzorky ze 3 lokalit (Lužická Nisa – Hrádek nad Nisou, Bílina – Ústí nad Labem, Vltava – Zelčín) odebrané v roce 2016 pro porovnání. Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) všechny tyto lokality pravidelně monitoruje ohledně stavu kvality vody. POCIS vzorkovače byly v povrchových vodách umístěny po dobu 3 týdnů a následně uskladněny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby extrakce a analýzy.



Obr. 6: Mapa lokalit, kde byly umístěny POCIS vzorkovače (upraveno podle Pavel Hrdlička, Wikipedia, [online])

Tab. 3: Seznam sledovaných lokalit a potenciální zdroje znečištění v okolí (Mapy. cz, Fedorova a kol. 2014)

Lokalita	Potenciální zdroje znečištění
Labe – Vestřev	KRPA PAPER, a.s. – výroba nepromastitelných, bariérových a silikonovaných papírů Malé zdroje komunálního znečištění
Labe – Valy	Synthesia a.s. – chemická firma zaměřená na výrobu výbušnin, barviv a pesticidů; PARAMO a.s. – výroba asfaltářských výrobků, mazacích a procesních olejů; ČOV Pardubice
Labe – Lysá nad Labem	Chemická výroba, olejová rafinérie; ČOV Lysá nad Labem
Labe – Obříství	SPOLANA s.r.o. – Výroba anorganických a chemických produktů na bázi ethylenu a PVC; CzechiaChem s.r.o. – výroba meziproduktů farmaceutických látek; Malé zdroje komunálního znečištění
Labe – Schmilka	ZINKPOWER Promptus s.r.o. – žárové zinkování kovů; ČOV Děčín
Lužická Nisa – Hrádek nad Nisou	Severochema – výroba podpalovačů (PePo), ředidel a čistících prostředků Malé zdroje komunálního znečištění
Jizera – Předměřice	Automobilka Škoda a.s. Mladá Boleslav; Malé zdroje komunálního znečištění
Bílina – Ústí nad Labem	Vysoce znečištěná řeka z těžby a chemické výroby: SPOLCHEMIE – výroba syntetických pryskyřic; Chempark Záluží – Unipetrol RPA; OV z povrchové těžby hnědého uhlí; Malé zdroje komunálního znečištění
Ohře – Terezín	Malé zdroje komunálního znečištění
Vltava – Zelčín	Město Praha – chemický průmysl (např. společnosti Durchema – výroba čistících prostředků, autokosmetiky, tmelů a barev na textil; Flexfill – výroba chemických výrobků na údržbu a opravy, ESTER – výroba mycích a čistících prostředků; MPOWER – výroba armatur pro různý průmysl), Malé zdroje komunálního znečištění
Berounka – Srbsko	ČOV Beroun
Sázava – Nespeky	Malé zdroje komunálního znečištění
Otava – Topělec	OV z jaderné el. Temelín; ČOV Písek
Lužnice – Bechyně	IMG BOHEMIA s.r.o. – Výroba plastových desek, fólií, hadic, trubek a profilů; Malé zdroje komunálního znečištění
Jihlava – Ivančice	Malé zdroje komunálního znečištění
Svratka – Židlochovice	Malé zdroje komunálního znečištění
Dyje – Pohansko	FOSA a.s. – zabývá se zpracováním žlutého fosforu, zaměřuje se na vývoj a výrobu ekologických produktů; ČOV Břeclav
Morava – Lanžhot	Tepelná elektrárna Hodonín; malé zdroje komunálního znečištění
Bečva – Troubky	Precheza a.s. – výroba titanové běloby, železitých pigmentů, kyseliny sírové a sádrovce; malé zdroje komunálního znečištění
Odra – Bohumín	BorsodChem – výrobce řady vysoce čistěných základních chemických látek, včetně anilinu, cyklohexylaminu (CHA), dicyklohexylaminu (DCHA) a dietyloxalátu (DEOX); ČOV Bohumín, ČOV Ostrava; OV z těžby černého uhlí
Opava – Děhylov	Moravskoslezské cukrovary – štěpný závod Opava Malé zdroje komunálního znečištění

3.2 Extrakce vzorků povrchových vod

Postup extrakce byl proveden podle Alvarez a kol. (2004). Nejprve byla připravena chromatografická kolona (průměr 12 mm × délka 420 mm) do které byla vložena asi 1 cm vrstva skelné silanizované vaty. Před extrakcí byla kolona promyta 10 ml methanolu a následně pod ní byla umístěna nádobka, ve které byl extrakt odpařován. Očištěný a suchý POCIS byl před vlastní extrakcí rozšroubován nad hliníkovou fólií a z něj byla pinzetou přenesena membrána na fólii. Sorbent byl z membrány převeden přes nálevku do extrakční kolony spláchnutím malým množstvím methanolu (přibližně 3×1 ml). Extrakt byl poté odpařen v koncentrátoru na objem 1 ml a kvantitativně převeden do předem zvážené vialky. Vialka se vzorkem byla zvážena a uchována při -20 °C do doby analýzy.

3.3 Chemikálie

Lysis mix (roztok sloužící k rozvolnění buněčných membrán), illuminate mix (roztok, který se přidává k buňkám, aby vyzařovaly luminiscenci), syntetický progestin ORG 2058 (referenční látka pro progestagenní aktivitu) (vše od BioDetection Systems b.v.), mifepriston (referenční látka pro anti-progestagenní aktivitu), 99%ní kyselina octová, dimethylsufoxid (DMSO), Dulbecův fosfátem pufovaný roztok (PBS) (vše od Sigma-Aldrich), DMEM médium-růstové (Dulbecem modifikované Eaglovo médium s fenolovou červení obohacené o Hamovo F12 médium), DMEM médium-testovací (Dulbecem modifikované Eaglovo médium bez fenolové červení obohacené o Hamovo F12 médium), trypsin (vše od Life-Technologies), fetální bovinní sérum (BioSera).

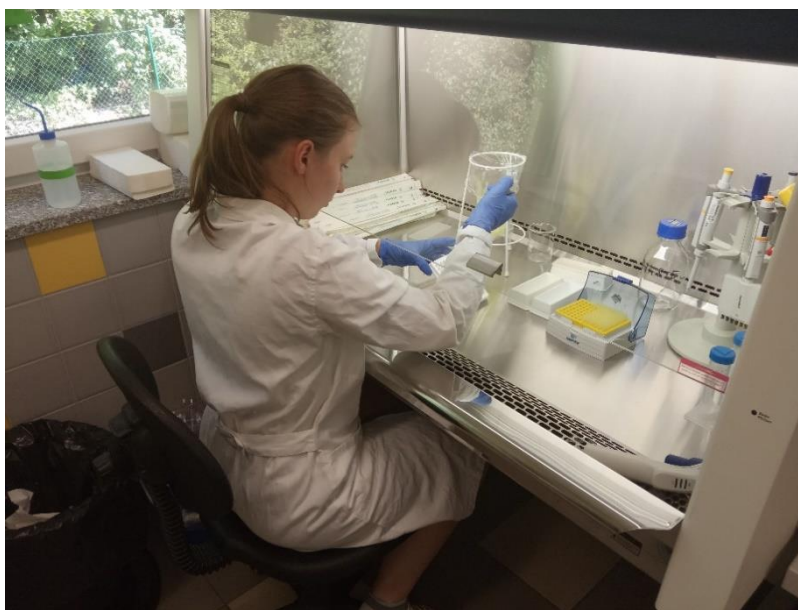
3.4 (Anti-)PR-CALUX *in vitro* testy

K detekci progestagenní a anti-progestagenní aktivity čistých látek nebo extraktů z POCIS vzorkovačů byly použity testy PR-CALUX a Anti-PR-CALUX (od BioDetection Systems b.v., Amsterdam, Nizozemí). CALUX patří mezi *in vitro* biotesty založené na expresi reportérového genu. Pomocí těchto biotestů se měří celková specifická endokrinní aktivita všech látek přítomných ve vzorku (Hilscherová a kol., 2001). Všechny postupy při CALUX testech byly prováděny podle protokolů od poskytovatele licence (BioDetection Systems b.v., Amsterdam, Nizozemí).

Pro (anti-) PR-CALUX se používají U-2 OS buňky (rakovinové buňky kostní dřene), do kterých byly vneseny dva plazmidy, první pro luciferázu a progesteron responzivní

elementy, a druhý pro progesteronový receptor. Tyto testy dokážou detekovat aktivitu agonistů (látek, které se vážou na receptor a aktivují ho) a antagonistů (látek, které se vážou na receptor a blokují jej) progesteronového receptoru. Tyto testy jsou velmi citlivé, to znamená, že jsou schopné detekce aktivity i při nízkých koncentracích a selektivně odpovídají na ligandy daného receptoru (Sonneveld a kol., 2011).

Nejprve byly buňky pro PR-CALUX nasazeny na 96-jamkovou destičku a kultivovány v DMEM médiu po dobu 24 hodin v inkubátoru při 37 °C a s 5 % CO₂ (Schreurs a kol., 2005; Sonneveld a kol., 2005). Poté byly buňky vystaveny kalibrační řadě referenční látky (ORG 2058 nebo mifepristonu) a řadě ředěných extraktů (ředění 1×, 2×, 4×, 8×, 16×) po dobu 24 hodin. Ředění extraktů se provádí z čistého extraktu pomocí DMSO. Následně bylo odstraněno médium, rozvolnily se buněčné membrány pomocí lysis mixu (Obr. 7), byl injikován illuminate mix, a nakonec se kvantifikovala světelná aktivita luciferázy pomocí luminometru (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko).



Obr. 7: Odstraňování expoziční směsi a přidání lysis mixu v laminárním kabinetu (flowboxu)

Celý CALUX test pro vzorek povrchové vody z jedné lokality trval tři dny. Každý vzorek byl testován ve třech nezávislých experimentech, přičemž každý ředící bod byl měřen v triplicátu.

3.5 Kultivace buněčných linií

Kultivace buněčných linií neboli pasážování slouží k podpoře růstu buněčných kultur. Pasážování bylo prováděno ve sterilních podmínkách v laminárním kabinetu (flowboxu) (Obr. 7). Buňky byly nasazeny do 75 cm² kultivačních lahví s růstovým médiem a inkubovány v inkubátoru při 37 °C a s 5 % CO₂. Po určitém čase se živé buňky přichytí ke dnu kultivační lahve. Při pokrytí povrchu dna kultivační lahve buňkami ze 70-80 % se část buněk přemístí do nových kultivačních lahví s čerstvým růstovým médiem (zpravidla dvakrát týdně, kde mají více prostoru pro svůj růst. Během tohoto procesu dochází i k odstranění odumřelých buněk.

3.6 Nasazení buněk na 96-jamkovou mikrotitrační destičku

- 1) Bylo odsáto 10 ml kultivačního média pipetou z kultivační lahve. Buňky byly opláchnuty 5 ml PBS roztoku, který se následně odsál (ve dvou opakováních).
- 2) Poté byly buňky vystaveny 2-3 ml trypsinu, který byl po 25 sekundách odsát. Následně byla kultivační lahev uzavřena, obrácena dnem vzhůru a vložena na 1-3 minuty do inkubátoru.
- 3) Po vyndání z inkubátoru byly buňky ze dna kultivační lahve spláchnuty 10 ml testovacího média bez fenolové červeně a tato směs byla zhomogenizována pipetováním.
- 4) Vše z kultivační lahve bylo přeneseno do zkumavky. Bylo odpipetováno 17 µl na počítací destičku, aby se zjistila hustota buněk. Následně bylo spočteno kolik se musí odebrat buněčné suspenze a naředit médiem, aby konečná hustota buněk byla 10 000 buněk na jamku.
- 5) Z naředěné suspenze bylo pomocí multikanálové pipety odpipetováno 100 µl do příslušných jamek na 96-jamkové mikrotitrační destičce.

3.7 Expozice buněk testovaným extraktům povrchových vod

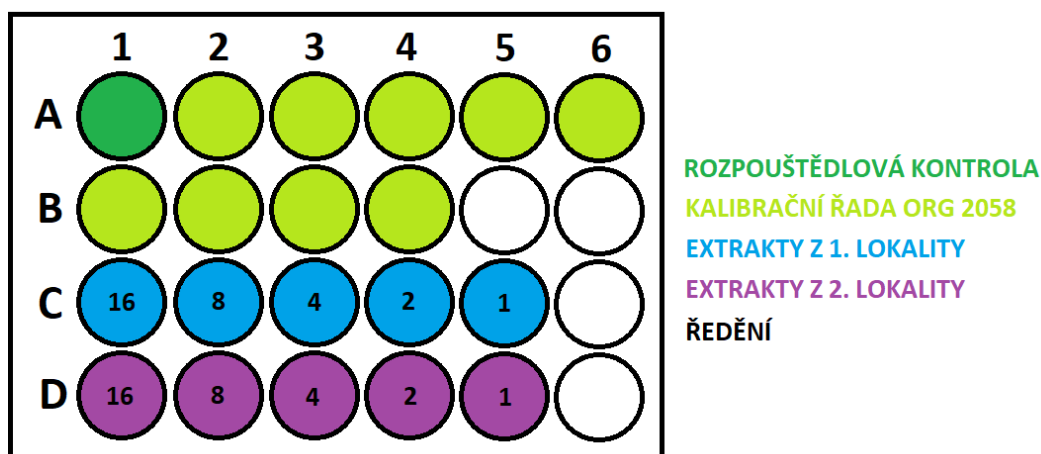
3.7.1 Progestagenní aktivita

- 1) Nejprve byly připraveny jednotlivé ředící body testovaných extraktů povrchových vod (1×, 2×, 4×, 8×, 16×) pomocí DMSO, které byly poté zhomogenizovány pomocí vortexu.
- 2) Na 24-jamkovou mikrotitrační destičku byl odpipetován 1 ml testovacího média, do kterého byl následně napipetován 1 µl příslušné chemikálie – DMSO (kontrolní skupina),

kalibrační řada ORG 2058 (Tab. 4) a jednotlivé testované extrakty povrchové vody (Obr. 8). Poté byla destička dána na 10 minut třepat při 300 otáčkách za minutu.

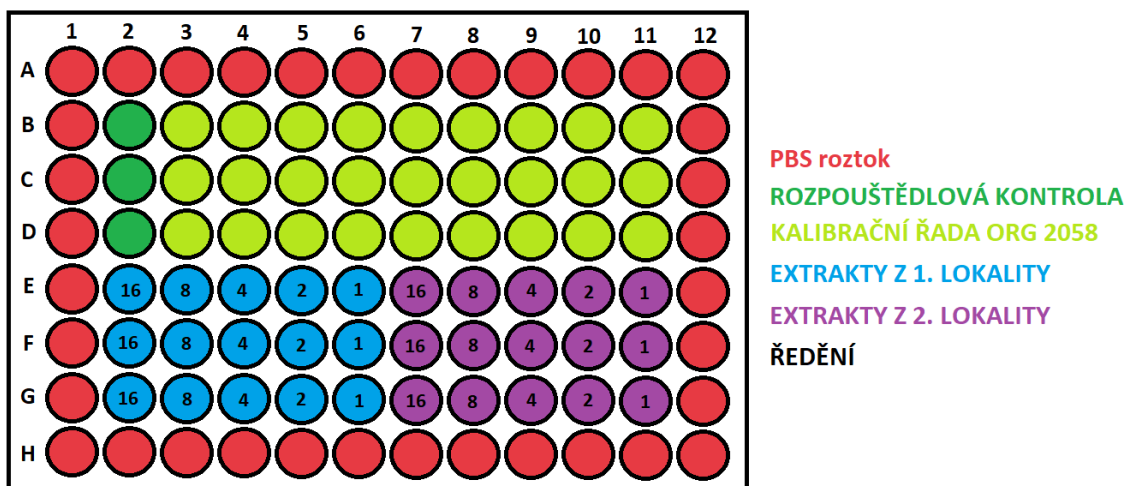
Tab. 4: Koncentrace kalibrační řady ORG 2058.

	Koncentrace v jamce c (mol·l ⁻¹)
1	3·10 ⁻¹²
2	1·10 ⁻¹¹
3	3·10 ⁻¹¹
4	6·10 ⁻¹¹
5	1·10 ⁻¹⁰
6	2·10 ⁻¹⁰
7	3·10 ⁻¹⁰
8	1·10 ⁻⁰⁹
9	1·10 ⁻⁰⁸



Obr. 8 Schéma 24-jamkové mikrotitrační destičky pro testování progestagenní aktivity.

3) Z inkubátoru se vyndala 96-jamková mikrotitrační destička, na kterou byly buňky nasazeny předešlý den a z jednotlivých jamek byl postupně pipetou odsát obsah, který byl nahrazen 200 µl příslušného média obohaceného o jednotlivé chemikálie z 24-jamkové destičky. Z každé jamky 24-jamkové mikrotitrační destičky bylo odpipetováno celkem 600 µl a rozděleno po 200 µl do tří jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky (představující tři replikáty) (Obr. 9). Následně byly buňky vloženy do inkubátoru na 24 hodin.



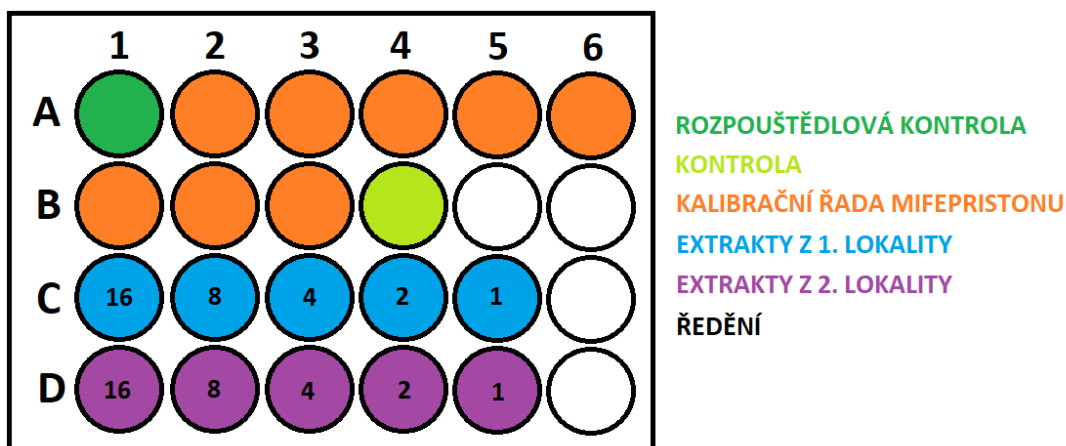
Obr. 9: Schéma 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření progesteronové aktivity.

3.7.2 Anti-progesteronová aktivita

- 1) Nejprve byly připraveny jednotlivé ředící body testovaných extraktů povrchových vod ($1\times$, $2\times$, $4\times$, $8\times$, $16\times$) pomocí DMSO, které byly poté zhomogenizovány pomocí vortexu.
- 2) Na 24-jamkovou mikrotitrační destičku byl odpipetován 1 ml testovacího média, do kterého byl následně napipetován 1 μ l příslušné chemikálie – DMSO (kontrolní skupina), kalibrační řada mifepristonu (Tab. 5) a jednotlivé testované extrakty povrchové vody (Obr. 10). Poté byla destička dána na 10 minut třepat při 300 rpm.

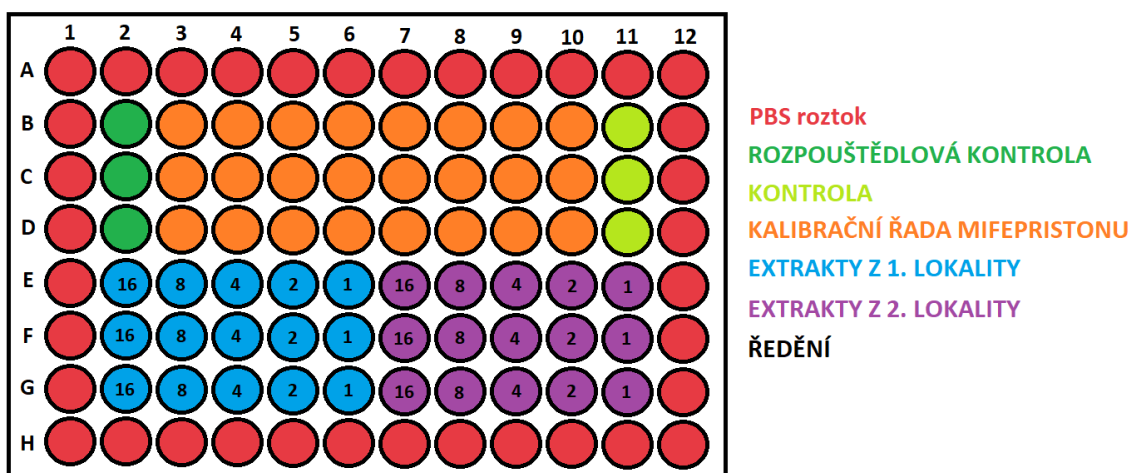
Tab. 5: Koncentrace kalibrační řady mifepristonu

	Koncentrace v jamce c (mol·l ⁻¹)
1	$1 \cdot 10^{-13}$
2	$1 \cdot 10^{-12}$
3	$3 \cdot 10^{-12}$
4	$1 \cdot 10^{-11}$
5	$3 \cdot 10^{-11}$
6	$1 \cdot 10^{-10}$
7	$3 \cdot 10^{-10}$
8	$1 \cdot 10^{-9}$



Obr. 10: Schéma 24-jamkové mikrotitrační destičky pro testování anti-progestagenní aktivity.

3) Z inkubátoru se vyndala 96-jamková mikrotitrační destička, na kterou byly buňky nasazeny předešlý den a z jednotlivých jamek byl postupně pipetou odsát obsah, který byl nahrazen 200 μ l příslušného média obohaceného o jednotlivé chemikálie z 24-jamkové destičky. Z každé jamky 24-jamkové mikrotitrační destičky bylo odpipetováno celkem 600 μ l a rozděleno po 200 μ l do tří jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky (představující tři replikáty) (Obr. 11). Následně byly buňky vloženy do inkubátoru na 24 hodin.

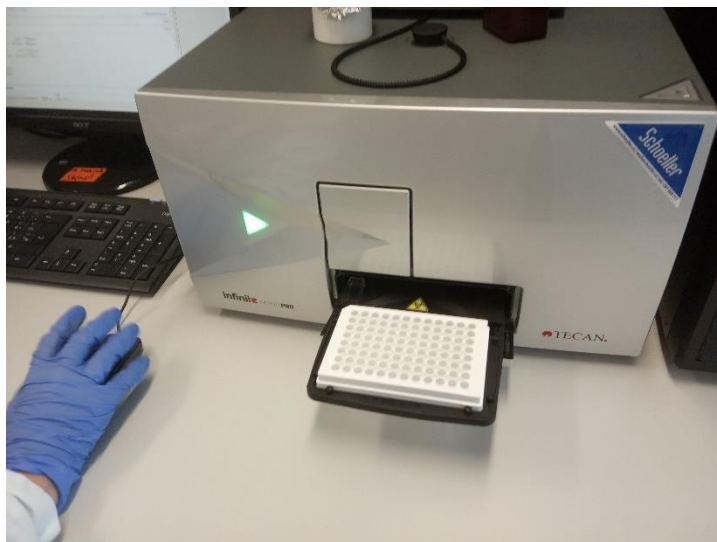


Obr. 11: Schéma 96-jamkové mikrotitrační destičky pro měření anti-progestagenní aktivity.

3.8 Měření (anti-)progestagenní aktivity

1) Z jednotlivých jamek bylo odstraněno médium, které bylo nahrazeno 30 μ l lysis mixu (na rozvolnění buněčných membrán).

2) Destička byla vložena do luminometru (Obr. 12). Do každé jamky byl nejprve injikován illuminate mix, poté byla změřena luminiscence a následně byla injikována 25%ní kyselina octová, kterou byla luminiscence zhasena. Výsledná data byla přenášena z luminometru do počítače, kde byla následně vyhodnocována v programu Excel (Microsoft).



Obr. 12: Destička před zasunutím do luminometru.

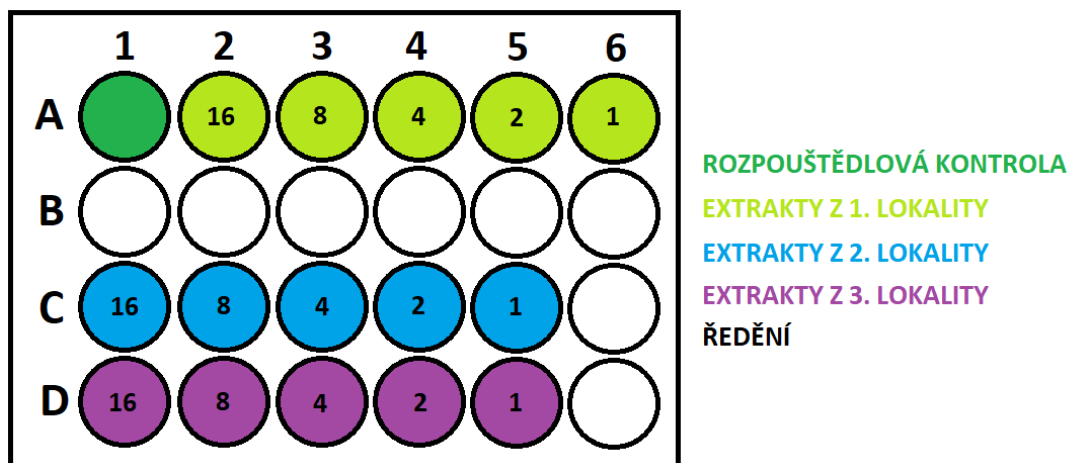
3.9 Měření cytotoxicity

Buněčné kultury byly pravidelně kontrolovány pod mikroskopem (Olympus), zda nevykazují známky kontaminace a poklesu viability (životnosti). Pro vyloučení toxických účinků testovaných vzorků vody na životnost buněk byl použit test redukce resazurinu (Sigma-Aldrich, Česká republika). Tento test spočívá v přeměně modrého indikátorového barviva resazurinu na růžový fluorescenční produkt resorufin za pomoci metabolicky aktivních buněk.

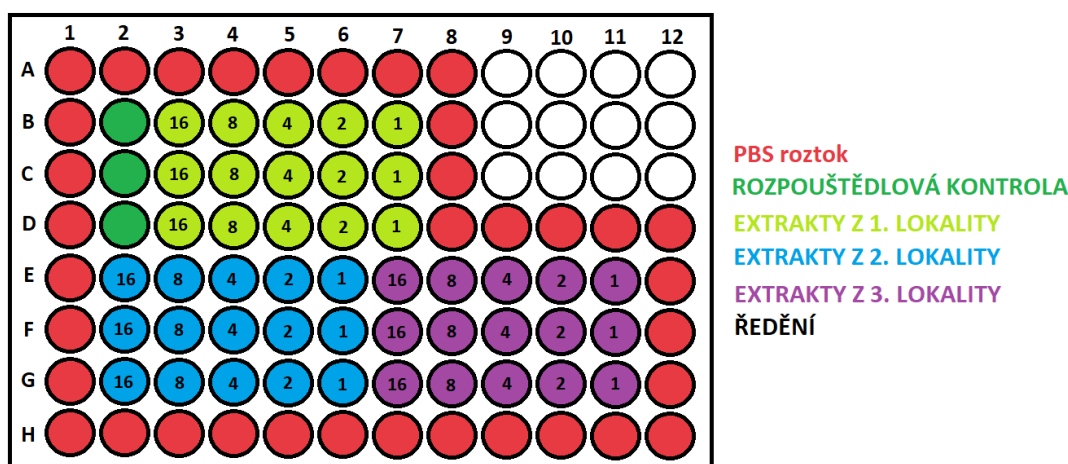
Test redukce resazurinu probíhal následujícím způsobem:

1) Nejprve byla nasazena buněčná suspenze (o hustotě 10 000 buněk na jamku) na 96-jamkovou mikrotitrační destičku a poté byly buňky vloženy na 24 hodin do inkubátoru. Stejný postup jako při (Anti-)PR-CALUXu.

2) Buňky byly vystaveny kontrole (DMEM médium + DMSO) a řadě ředěných vzorků (ředění 1×, 2×, 4×, 8×, 16×) po dobu 24 hodin v inkubátoru. Stejný postup jako při (anti-)PR-CALUXu (Obr. 13 a Obr. 14).



Obr. 13: Schéma 24-jamkové mikrotitrační destičky pro test redukce resazurinu



Obr. 14: Schéma 96-jamkové mikrotitrační destičky pro test redukce resazurinu

3) Do jednotlivých jamek 96-jamkové destičky bylo přidáno 10 µl resazurinu. Následně byly buňky vloženy do inkubátoru na 3 hodiny.

4) Po uplynutí inkubační doby byla změřena fluorescence přeměněného barviva luminometrem (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko). Výsledná data byla přenášena z luminometru do počítače a statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA 12 (Statsoft).

3.10 Analýza dat

3.10.1 Analýza dat (anti-)progestagenní aktivity

Intenzita luminiscence testovaných vzorků byla měřena v relativních světelných jednotkách (RLU). Pro výpočet (anti-)progestagenní aktivity byla od RLU testovaných látek odečtena hodnota RLU naměřená u rozpouštědlové kontroly s 0,1 % DMSO. Maximální signál referenční látky pro agonismus byl určen jako 100% indukce. Pro stanovení meze kvantifikace byly použity takzvané matricové limity kvantifikace, které jsou vypočteny z výsledků odpovědi referenční látky ve velkém počtu měření (cca 100 nezávislých experimentů – provedeno poskytovatelem licence BioDetection Systems b.v., Nizozemí) a zohledňují také odpověď referenční látky v jednotlivých experimentech (v daném měření) a relativní faktor zakoncentrování vzorku. Výsledné hodnoty limitů kvantifikace byly v rozmezí 6-11 ng·l⁻¹ ekv. látky ORG 2058 pro agonistickou aktivitu a 10-24 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu pro antagonistickou aktivitu. RLU testovaných látek a environmentálních extraktů byly převedeny na relativní indukci (RI) tj. procentuální odpověď. Jednotlivé kalibrační body referenční látky byly proloženy křivkou koncentrace-odpověď. Na vyhodnocení těchto dat byl použit program Excel (Microsoft) a byla pro ně vynesena sigmoidní křivka pomocí nelineárního regresního modelu se 4 parametry (sklon, EC₅₀, minimální a maximální indukce ORG 2058). Odpověď testovaných vzorků byla poté porovnána s odpovědí referenční látky. Výsledná hormonální aktivita byla přepočtena na ng·l⁻¹ ekvivalentního hormonu. V případě progestagenní aktivity se jednalo o ORG 2058 a v případě anti-progestagenní aktivity o mifepriston. Pro výpočet ekvivalentní koncentrace (anti-)progestagenní aktivity byla použita vzorkovací rychlost 0,1 litru za den podle doporučení ze studie Grabic a Vrana (v tisku). Bylo odhadnuto, že při expozici POCIS vzorkovačů po dobu 3 týdnů byl navzorkovaný objem 2,1 litrů.

Nakonec byla všechna data z roku 2017 analyzována pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu v programu STATISTICA 12 s cílem zjistit, zda se od sebe statisticky významně liší jednotlivé sledované lokality. Pro porovnání dat mezi lety 2016 a 2017 byl použit neparametrický Mann-Whitneyův U test.

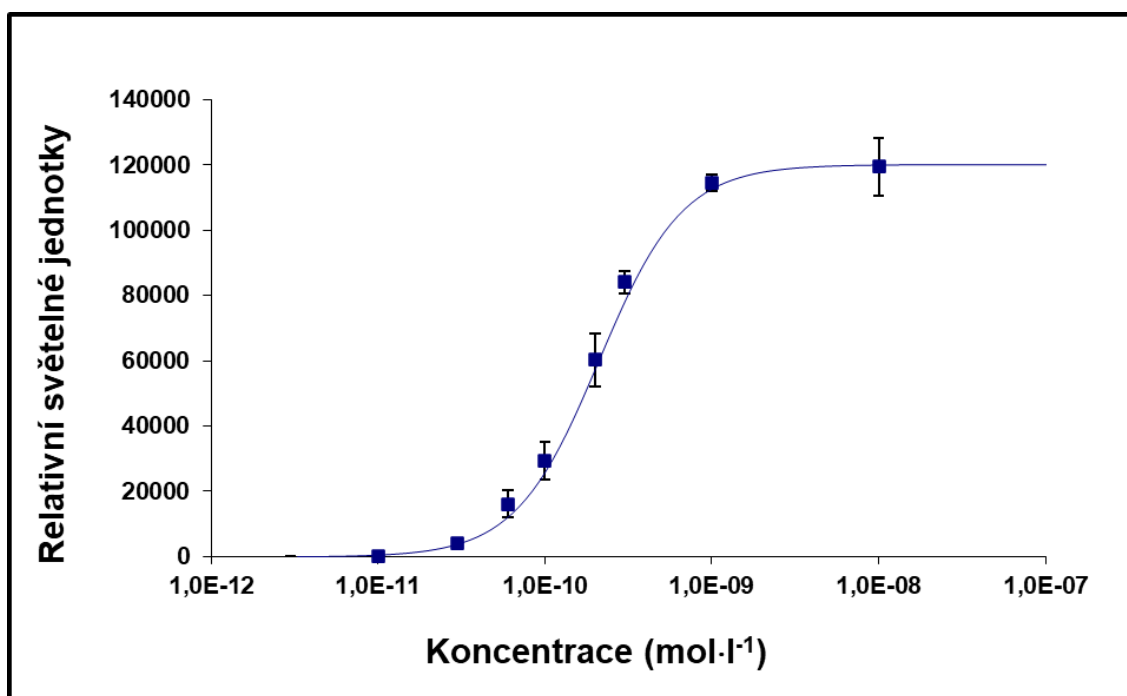
3.10.2 Analýza dat testu cytotoxicity

Data byla vyhodnocena v programu STATISTICA 12 pomocí jednofaktorové analýzy variance pro zjištění statisticky signifikantního rozdílu nastaveného na hladinu $\alpha = 0,05$. Poté byl proveden Dunnettův post-hoc test za účelem porovnat intenzitu fluorescence u jednotlivých ředěných vzorků s kontrolní skupinou. Pokud byla intenzita fluorescence v jamkách s ředěnými vzorky statisticky signifikantně odlišná ($p < 0,05$) oproti intenzitě v kontrolní skupině a došlo k poklesu viability buněk, byly tyto jamky (vzorky povrchové vody) označeny jako cytotoxické. Cytotoxické vzorky nebyly použity při analýze (anti-)PR-CALUXu.

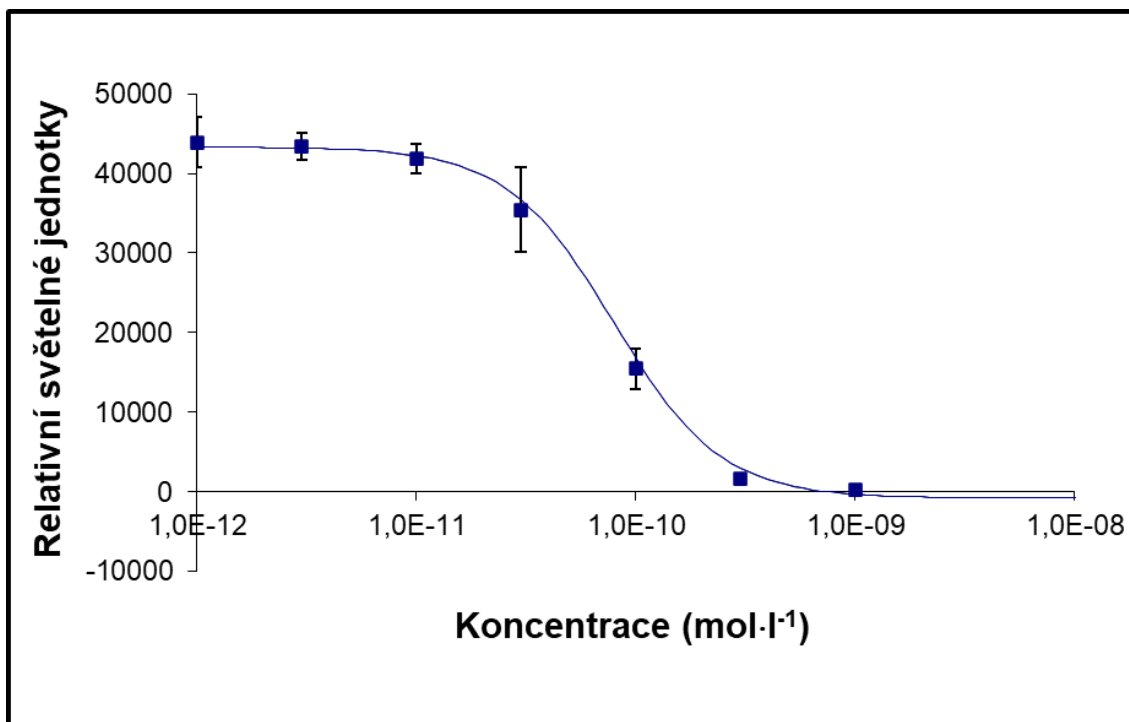
4 Výsledky

4.1 Hodnocení validity testů

Nejdříve byly vyneseny sigmoidní křivky referenčních látek – ORG 2058 (pro progestagenní aktivitu) (Graf 1) a mifepristonu (pro anti-progestagenní aktivitu) (Graf 2). Pokud splnily všechna kritéria ($R^2 > 0,98$; EC_{50} referenční látky pro ORG 2058 byla v rozmezí $88,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a IC_{50} pro mifepriston v rozmezí $28 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$; minimální indukce > 300 pro progestagenní a > 150 pro anti-progestagenní aktivitu; Z-faktor $> 0,6$) přistoupilo se k vyhodnocování příslušné hormonální aktivity ve vzorcích povrchových vod jednotlivých lokalit.



Graf 1: Sigmoidní křivka referenční látky ORG 2058

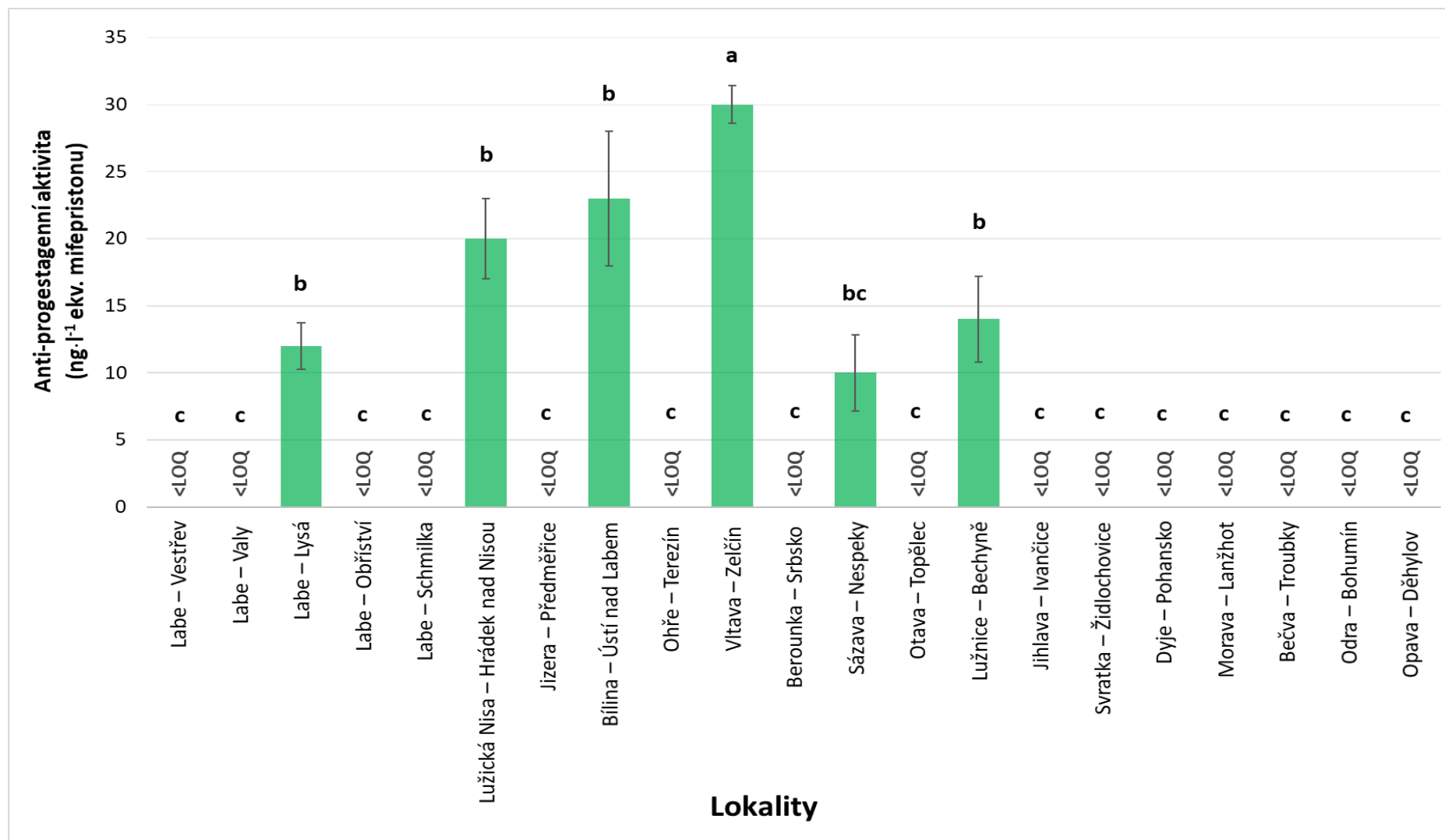


Graf 2: Sigmoidní křivka referenční látky mifepristonu

4.1.1 (Anti-)progestagenní aktivita ve vzorcích z roku 2017

Na všech 21 sledovaných lokalitách byla progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace (<6-11 ng·l⁻¹ ekvivalentů ORG 2058). Anti-progestagenní aktivita byla detekována na 6 lokalitách, a to v rozsahu od 12 do 33 ng·l⁻¹ ekvivalentů (ekv.) mifepristonu. Nejvyšší aktivita 33 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu byla zjištěna v řece Vltavě (Zelčín) a nejnižší aktivita 12 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu byla detekována na lokalitě Labe-Lysá nad Labem. Dále byla anti-progestagenní aktivita naměřena v řece Lužnici (Bechyně) 14 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu, v řece Sázavě (Nespeky) 15 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu, v řece Lužické Nise (Hrádek nad Nisou) 20 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu a v řece Bílině (Ústí nad Labem) 23 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu (Graf 3).

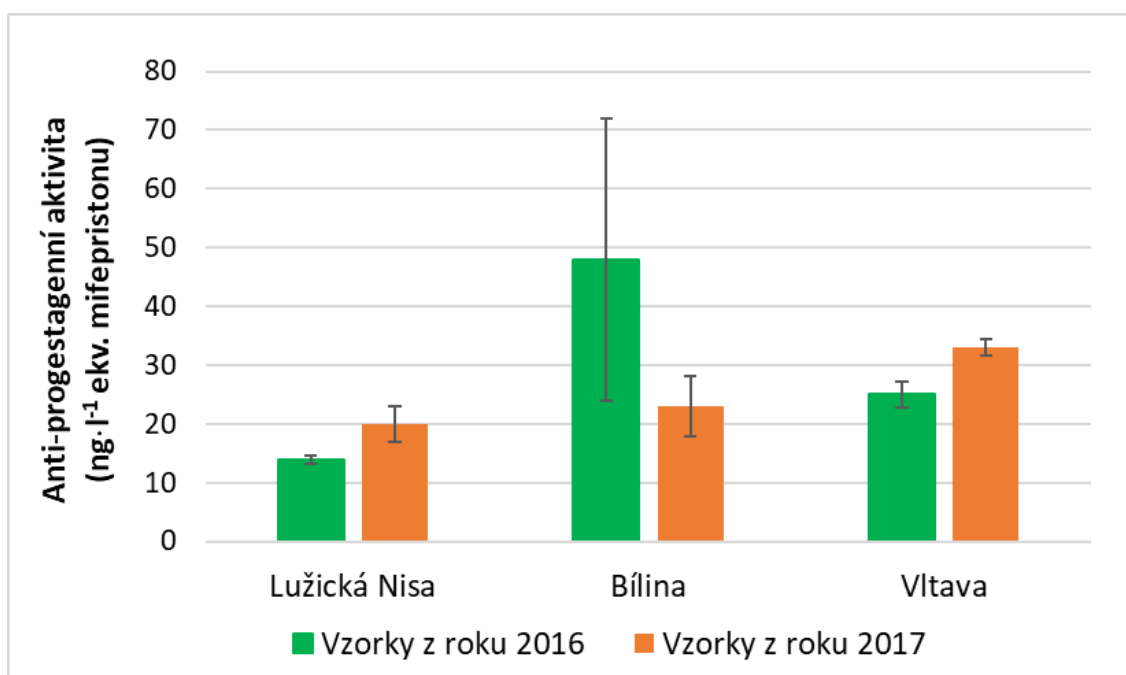
U zbylých 15 lokalit (Labe-Obříství, Dyje-Pohansko, Jizera-Předměřice, Labe-Schmilka, Berounka-Srbsko, Bečva-Troubky, Jihlava-Ivančice, Labe-Vestřev, Labe-Valy, Otava-Topělec, Morava-Lanžhot, Opava-Děhylov, Svratka-Židlochovice, Odra-Bohumín, Ohře-Terezín) byla anti-progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace (<10-24 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu).



Graf 3: Anti-progestagenní aktivita v ng.l⁻¹ ekv. mifepristonu v povrchových vodách České republiky (data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka; statisticky významné rozdíly mezi lokalitami jsou indikovány různými písmeny)

4.1.2 (Anti-)progestagenní aktivita ve vzorcích z roku 2016

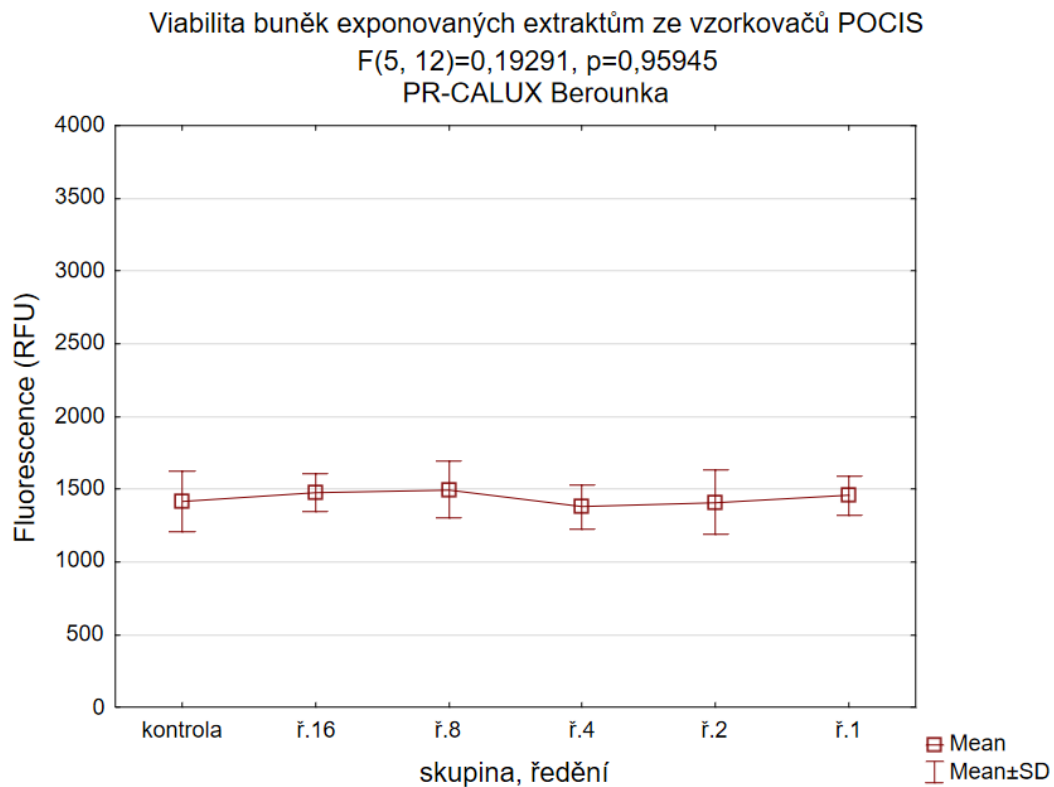
Pro srovnání byly provedeny analýzy vzorků z roku 2016 ze třech lokalit (Graf 4). Na všech 3 lokalitách byla progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace. Anti-progestagenní aktivita byla detekována v rozmezí od 14 do 48 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. V řece Lužické Nise (Hrádek nad Nisou) byla detekována aktivita 14 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. V řece Vltavě (Zelčín) byla naměřena aktivita 25 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. V řece Bílině (Ústí nad Labem) byla zjištěna aktivita 48 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými lety zjištěny nebyly.



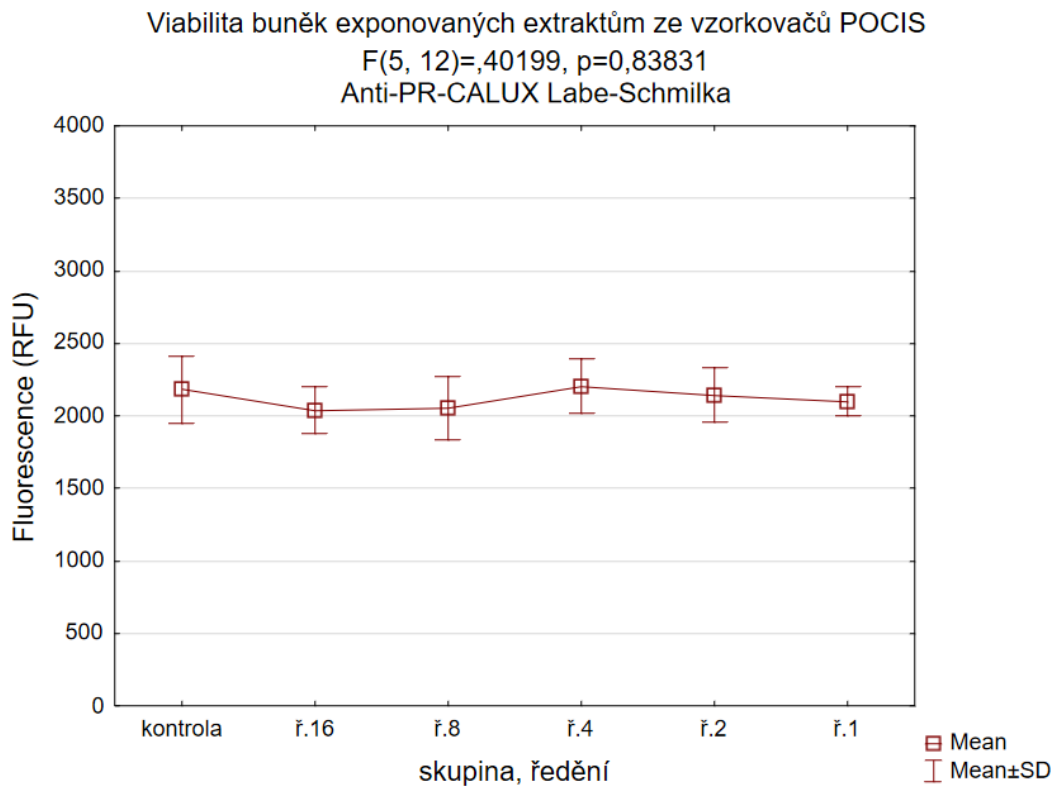
Graf 4: Porovnání anti-progestagenní aktivity v ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu na třech lokalitách mezi lety 2016 a 2017.

4.2 Test redukce resazurinu

U všech extraktů z roku 2017 i u všech extraktů z roku 2016 pro progestagenní i anti-progestagenní aktivitu se vyloučilo cytotoxické působení extraktů na buňky, protože nedošlo k poklesu viability buněk (Příloha č. 1 a Příloha č. 2). Pro ukázkou jsou zde uvedeny 2 grafy (Graf 5 a Graf 6) jak pro progestagenní, tak pro anti-progestagenní aktivitu.



Graf 5: Viabilita buněk exponovaných extraktům pro progesteragenní aktivitu



Graf 6: Viabilita buněk exponovaných extraktům pro anti-progesteragenní aktivitu

5 Diskuze

V povrchových vodách byla doposud progestagenní aktivita detekována v Nizozemí $4,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. ORG 2058 (van der Linden a kol., 2008), ve Francii v POCIS vzorkovačích $514\ 400 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ekv. promegestonu (Creusot a kol., 2014), v České republice v rozsahu $0,03\text{-}0,06 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. ORG 2058 (Šauer a kol., 2018) a v Srbsku v rozsahu $0,8\text{-}0,29 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. promegestonu (Hashmi a kol., 2020). Jednotlivé výsledky aktivit však lze mezi sebou obtížně porovnávat, protože v každé studii byly použity jiné referenční látky. Zatím není k dispozici žádná studie, kde by byly porovnávány referenční látky promegeston a ORG 2058 v PR-CALUX biotestu.

Mezi nejčastěji se vyskytující látky, které přispívají k progestagenní aktivitě ve vodním prostředí se řadí progestiny, a to konkrétně cyproteron acetát, dienogest, drospirenon, megestrol acetát, medroxyprogesteron, medroxyprogesteron acetát a progesteron, přičemž nejvýznamnější jsou medroxyprogesteron acetát, megestrol acetát a progesteron (Šauer a kol., 2018; Hashmi a kol., 2020). Creusot a kol. (2014) zjistili, že jediný progestin, levonorgestrel, může přispívat k progestagenním aktivitám v povrchové vodě až z 50 %. Podle Šauer a kol. (2018) se progestiny podílely z 83 % na progestagenních aktivitách v povrchových vodách České republiky. Podle Hashmi a kol. (2020) se progestiny podílely až z 90 % na progestagenní aktivitě v povrchových vodách Srbska. Podle Runnalls a kol. (2013) a Paulos a kol. (2010) bylo prokázáno, že některé progestiny jako je levonorgestrel, norethisteron a gestoden snižují produkci jiker a způsobují vývoj sekundárních samčích pohlavních znaků u samic jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*). Ve výše uvedených studiích zaměřených na sledování progestagenní aktivity ve vodním prostředí byla progestagenní aktivita měřena na lidském progesteronovém receptoru, ale podle nedávné studie Garoche a kol. (2020) bylo zjištěno, že některé progestiny (medroxyprogesteron, megestrol acetát, chlormadinon acetát, desogestrel, levenogestrel, gestoden, a mnoho dalších) vykazují anti-progestagenní aktivitu na rybím progesteronovém receptoru. Díky tomu by se dalo usuzovat, že výše popsané účinky progestinů (levonorgestrelu, norethisteronu a gestodenu) mohou být důsledkem anti-progestagenní aktivity zprostředkované přes rybí progesteronový receptor. Detekce progestagenní aktivity zprostředkované přes lidský PR je indikátorem výskytu progestinů a výskyt progestinů ve vodním prostředí představuje pro ryby i další vodní organismy poměrně velké riziko.

V mé práci byla progestagenní aktivita na všech 21 lokalitách České republiky pod limitem kvantifikace, což by mohlo indikovat, že se na sledovaných lokalitách nevyskytovaly progestiny nebo jejich koncentrace nebyla tak vysoká, aby mohla být progestagenní aktivita prokázána. Vzorky nebyly odebírány přímo pod zaústěním odtoku z čistíren komunálních odpadních vod, které bývají jejich zdrojem, ale až dále po proudu. Tyto látky mohly být tudíž odstraněny v důsledku samočisticí schopnosti vody. Na některých lokalitách mohlo také docházet k tzv. „masking effect“ neboli k „zamaskování“ progestagenní aktivity vysokou anti-progestagenní aktivitou (Weiss a kol., 2009).

Dále mohla být progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace z toho důvodu, že limit kvantifikace ($<6-11 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekvivalentů ORG 2058) byl v mé práci mnohem vyšší než dosud zjištěné hodnoty progestagenní aktivity, které byly naměřeny v povrchové vodě v České republice ($0,03-0,06 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. ORG 2058; Šauer a kol., 2018). Dále například i v Nizozemí byly naměřeny aktivity o něco nižší, než byl limit kvantifikace v této práci, a to $4,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. ORG 2058 (van der Linden a kol., 2008). V úvahu by se měla vzít i možnost, že pasivní vzorkovače POCIS sorbují převážně polárnější látky a progestagenní aktivitu vykazují spíše nepolární látky.

Anti-progestagenní aktivita v povrchových vodách byla doposud detekována v Číně $121\,000 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu (Rao a kol., 2014), v Austrálii s maximální hodnotou $32\,000 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu (Scott a kol., 2014) a v České republice s maximální hodnotou $1,4 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu (Šauer a kol., 2018).

Anti-progestagenní aktivita byla v mé práci zjištěna ve vzorcích z pasivních vzorkovačů na 6 z 21 lokalit, a to v rozsahu od 12 do $33 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu. Oproti aktivitě, která byla naměřena v Austrálii a Číně v aktivních vzorcích z povrchové vody je aktivita zjištěná v mé práci výrazně nižší. Aktivita, která již byla dříve detekovaná v České republice (Šauer a kol., 2018), je v porovnání s aktivitou naměřenou v mé práci o řád nižší. Je možné, že díky jinému typu vzorkování (aktivní vzorkování – vzorky vody odebírány kompozitními vzorkovači po dobu 24 hodin) u některých vzorků mohly aktivity ve studii Šauer a kol. (2018) způsobovat jiné látky vykazující anti-progestagenní aktivitu, ale to je třeba zjistit během dalších výzkumů.

Podle zjištěných potenciálních zdrojů znečištění v okolí lokalit, kde byly odebrány vzorky, by se dalo usuzovat, že bude k výskytu anti-progestagenní aktivity v povrchových vodách nejvíce přispívat chemický průmysl z důvodu nedostatečné

účinnosti některých čistíren průmyslových odpadních vod. V okolí lokalit (Labe-Lysá nad Labem, Lužická Nisa-Hrádek nad Nisou, Bílina-Ústí nad Labem, Lužnice-Bechyně a Vltava-Zelčín), kde byla anti-progestagenní aktivita detekována, sídlí společnosti zaměřené na chemický průmysl. V okolí odběrového místa Labe-Lysá nad Labem sídlí společnost Donauchem s.r.o., což je jeden z hlavních distributorů chemických výrobků v oblasti potravinářství, bazénové chemie, krmivářství, galvanizování, tiskařského průmyslu, nátěrových hmot, technických chemikálií a stavebnictví. V blízkosti lokality Lužická Nisa-Hrádek nad Nisou sídlí společnost Severochema, která je výrobcem podpalovačů, ředidel a čistících prostředků. Řeka Bílina je považována za jednu z nejznečištěnějších lokalit, a to převážně z povrchové těžby hnědého uhlí a chemické výroby (Český hydrometeorologický ústav [online]; Fedorova a kol., 2014). Sídlí zde společnost Spolchemie zaměřená na výrobu syntetických pryskyřic a společnost Chempark Záluží zaměřená na zpracování ropy a výrobu, distribuci a prodej pohonných hmot a petrochemických produktů. V okolí lokality Lužnice-Bechyně sídlí společnost IMG Bohemia a dál proti proudu společnost Silon. Obě společnosti se zabývají výrobou plastových produktů. V blízkosti lokality Vltava-Zelčín se nachází město Praha, ve kterém sídlí mnoho průmyslových společností. Mezi tyto společnosti patří například: společnost Druchema, která se zabývá výrobou čistících prostředků, autokosmetiky, tmelů a barev na textil nebo společnost Flexfill zaměřená na vývoj a výrobu chemických výrobků na údržbu a opravy jako jsou odmašťovací prostředky, oleje a maziva, prostředky na údržbu povrchu podlah, ochranné vrstvy a výrobky pro úklid a hygienu. Dále zde sídlí společnost ESTER zabývající se výrobou speciálních stavebních prvků, mycích a čistících prostředků pro domácnost i průmyslové využití či společnost MPOWER Engineering, která se zabývá vývojem, výrobou a prodejem armatur pro energetický, chemický, petrochemický a hutní průmysl.

Ve společnostech Donauchem, Severochema, Spolchemie, IMG Bohemia, Druchema, Flexfill a ESTER by mohli být při výrobě jejich produktů využívány některé látky vykazující anti-progestagenní aktivitu jako jsou například polycyklické mošusové sloučeniny, bromované zpomalovače hoření nebo bisfenoly. Na lokalitách Lužická Nisa-Hrádek nad Nisou a Vltava-Zelčín by se mohly vyskytovat polycyklické mošusové sloučeniny, které jsou využívány mimo jiné i v čistících a hygienických prostředcích, protože v okolí se tyto prostředky vyrábí. Na lokalitách Lužnice-Bechyně a Bílina-Ústí nad Labem, kde se v blízkosti vyrábějí plastové produkty a syntetické pryskyřice, by se

mohly vyskytovat bisfenoly (Tab. 3). Bisfenoly se používají při výrobě polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic používaných v mnoha spotřebních výrobcích (Vandenberg a kol., 2007). Je ale zajímavé, že v blízkosti odběrového místa lokality Labe-Vestřev byla anti-progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace. Zde se předpokládalo, že bude anti-progestagenní aktivita detekována, protože podle zjištěných potenciálních zdrojů znečištění zde sídlí Krkonošské papírny zaměřené mimo jiné i na výrobu termopapíru. Podle Björnsdotter a kol. (2017) jsou v termopapíru obsaženy některé bifenoly, které mohou vykazovat anti-progestagenní aktivitu. Podle těchto informací je tedy možné, že zde byla anti-progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace z důvodu vyšší účinnosti místní průmyslové čistírny odpadních vod. Za účelem splnění předpisů požární bezpečnosti se na hořlavé materiály, používané ve stavebnictví, v textilním průmyslu nebo v počítačovém vybavení, aplikují zpomalovače hoření. Zpomalovače hoření jsou látky přidávané nebo nanášené na materiál ke zvýšení požární odolnosti tohoto produktu (WHO, 1997). Tyto látky by se tudíž mohly vyskytovat v okolí lokality Labe-Lysá nad Labem, kde se vyrábí produkty pro stavebnictví (tmely, nátěrové hmoty, přísady do betonu a stavebních směsí).

Mezi pozitivními lokalitami je však i Sázava-Nespeky, v jejímž okolí se podle mých informací nenachází žádné podniky chemického průmyslu. U této lokality by mohlo být zdrojem anti-progestagenní aktivity komunální znečištění. Mezi látky vykazující anti-progestagenní aktivitu, které se vyskytují v komunálních odpadních vodách se řadí především některé fyto-anti-progestageny (kyselina chlorogenová, kyselina m-kumarová a kyselina ferulová) obsažené v kávě, čaji a červeném víně (Rosenberg a kol., 1998), některá léčiva a polycyklické mošusové sloučeniny. Ty se do vodního prostředí mohou dostávat vlivem nedostatečné schopnosti čistíren komunálních odpadních vod tyto látky odbourat. Na ostatních lokalitách potenciálně ovlivněných komunálním znečištěním však anti-progestagenní aktivita detekována nebyla, proto tento zdroj není příliš pravděpodobný. Další příčinou výskytu anti-progestagenní aktivity ve vodním prostředí by mohla být biotransformace v důsledku, které by vlivem mikroorganismů docházelo k přeměně látek nevykazujících anti-progestagenní aktivitu na látky tuto aktivitu vykazující (Peng a kol., 2014).

Mezi další potenciální zdroj znečištění látkami s anti-progestagenní aktivitou by mohlo patřit zemědělství, konkrétně ovocné a zeleninové farmy. Některé tyto farmy se nacházejí v okolí lokalit Labe-Lysá nad Labem a Vltava-Zelčín. Výskyt

anti-progestagenní aktivity na těchto lokalitách by mohl být způsoben fungicidem vinclozolinem či některými fyto-anti-progestageny (chlorofylin a hesperetin) obsaženými v zelenině (Rosenberg a kol., 1998). Vinclozolin je účinný proti plísni šedé (*Botrytis cinerea*) a hlízenkám (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilia spp.*), které se vyskytují na ovoci, zelenině a víně (Spencer, 1982; Mourkidou, 1991).

Výskyt anti-progestagenní aktivity zprostředkované přes lidský progesteronový receptor ve vodním prostředí by mohl mít negativní vliv na vodní organismy, zejména na obratlovce jako jsou vodní savci nebo obojživelníci. Progesteronový receptor obojživelníků má podobnou aminokyselinovou sekvenci jako lidský progesteronový receptor (Bayaa a kol., 2000), a proto účinky expozice anti-progestestiniům u obojživelníků budou pravděpodobně podobné účinkům u vyšších obratlovců včetně lidí (Kvarnryd a kol., 2011; Säfholm a kol., 2014). Rybí progesteronové receptory mají v porovnání s lidským progesteronovým receptorem odlišnou afinitu k různým látkám, např. přírodním a syntetickým (anti-)progestiniům (Garoche a kol., 2020), tudíž způsob působení u ryb je pravděpodobně odlišný od toho, co známe u lidí (Kumar a kol., 2015). Z důvodu, že anti-progestagenní látky blokují progesteronový receptor a u lidí se používají hlavně k vyvolání potratu a inhibici či zpoždění ovulace (Tang, 2006) se domnívám, že vystavení vodních organismů těmto látkám by mohlo vést ke snižování plodnosti a poruchám vývoje pohlavních orgánů. Při dlouhodobém působení by mohlo dojít až k úplné ztrátě schopnosti se rozmnožovat, a tudíž i k úplnému vymizení populací některých vodních živočichů.

Při porovnání 3 vybraných lokalit (Lužická Nisa-Hrádek nad Nisou, Bílina-Ústí nad Labem, Vltava-Zelčín) mezi lety 2016 a 2017 nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl, což znamená, že výsledné hodnoty jsou srovnatelné. Z toho by se dalo usuzovat, že zatížení lokalit látkami s anti-progestagenní aktivitou je stabilní a ke kontaminaci nejspíše dochází soustavně a dlouhodobě. Z tohoto důvodu by byl vhodný další podrobnější výzkum, který by mohl být zaměřen na zjištění konkrétních zdrojů znečištění a díky tomu by se mohla udělat opatření, která by zamezila dalšímu znečišťování příslušných lokalit.

Zatím není známo, jaké chemické látky jsou zodpovědné za výskyt anti-progestagenní aktivity na sledovaných lokalitách, ale to by mohlo být předmětem dalšího výzkumu.

6 Závěr

Pomocí (Anti-)PR CALUX *in vitro* biotestu byla prokázána anti-progestagenní aktivita ve vzorcích z roku 2017 na 6 z 21 lokalit v České republice, tzn. na 28,6 % sledovaných lokalit, a to v rozsahu od 12 do 33 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. Anti-progestagenní aktivita byla detekována na lokalitách Labe-Lysá nad Labem, Lužická Nisa-Hrádek nad Nisou, Bílina-Ústí nad Labem, Lužnice-Bechyně, Vltava-Zelčín a Sázava-Nespeky. Progestagenní aktivita byla na všech 21 lokalitách pod limitem kvantifikace, což by mohlo indikovat schopnost čistíren odpadních vod odbourat tyto látky. Dále to mohlo být způsobeno tím, že limit kvantifikace byl v mé práci mnohem vyšší než hodnoty doposud naměřené v povrchových vodách. Progestagenní aktivita však mohla být též „zamaskována“ aktivitou anti-progestagenní.

Pro srovnání se vzorky z roku 2017 byly analyzovány vzorky ze 3 vybraných lokalit z roku 2016. Ve vzorcích z roku 2016 byla anti-progestagenní detekována v rozsahu od 14 do 48 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu a ve vzorcích z roku 2017 v rozsahu od 20 do 33 ng·l⁻¹ ekv. mifepristonu. Při porovnání aktivit mezi jednotlivými lety nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl, což znamená, že výsledné hodnoty jsou srovnatelné. Z toho by se dalo usuzovat, že zatížení lokalit látkami s anti-progestagenní aktivitou je stabilní a ke kontaminaci nejspíše dochází soustavně a dlouhodobě. Progestagenní aktivita byla na všech 3 lokalitách též pod limitem kvantifikace.

Výskyt anti-progestagenní aktivity byl prokázán převážně na lokalitách, kde se v okolí nachází podniky chemického průmyslu. To by mohlo indikovat nedostatečnou schopnost průmyslových čistíren odpadních vod odbourat látky vykazující anti-progestagenní aktivitu. Výskyt anti progestagenní aktivity v povrchových vodách by mohl mít negativní dopad na vodní organismy, zejména obratlovce. Expozice těchto organismů látkám s anti-progestagenní aktivitou by mohla vést ke snížení plodnosti a poruchám vývoje pohlavních orgánů.

7 Použitá literatura

- Africander, D., Verhoog, N., Hapgood, J.P., 2011. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*. 76, 636-652.
- Alvarez DA, Petty JD, Huckins JN, Jones-Lepp TL, Getting DT, Goddard JP, 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem.*; 23:1640–8.
- Alygizakis, N. A., Besselink, H., Paulus, G. K., Oswald, P., Hornstra, L. M., Oswaldova, M., Slobodnik, J., 2019. Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. *Environment international*, 127, 420-429.
- Bain, P.A., Williams, M., Kumar, A., 2014. Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33, 2297-2307.
- Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A. M., Pons, M., Nicolas, J. C., Casellas, C. (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of the Total Environment*, 233(1-3), 47-56.
- Bayaa, M., Booth, R. A., Sheng, Y., Liu, X. J., 2000. The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12607-12612.
- Becker, K.L., 2001. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 957 s.
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Sonia Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, CH., Fenet, H., Creusot, N., Ait-Aissa, S., Vincent Cavailles, V., Budzinski, Antignac, J.P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research*. 46, 1912-1922.
- Besse, J.P., Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*. 157, 3485-3494.
- Björnsdotter, M. K., de Boer, J., Ballesteros-Gómez, A., 2017. Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere*, 182, 691-706.

- Blair R.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*. 54, 138-153.
- Cathleen Salomo., *Molecular Devices* [online]. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/br/geneblazer-cell-based-fret-assay-for-g-protein-coupled-receptors>
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology*. 48, 3649-3657
- Cronin, M., Madden, J., 2010. *In silico toxicology: principles and applications*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 669 pp.
- Český hydrometeorologický ústav [online]. [cit. 2021-4-28]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/>
- Fedorova, G., Randak, T., Golovko, O., Kodes, V., Grabicova, K., Grabic, R., 2014. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. *Science of the total environment*, 487, 681-687.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, C., Babai, D., Portier, CH.J., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 143, 205-212.
- Garoche, C., Aït-Aïssa, S., Boulahtouf, A., Creusot, N., Hinfrey, N., Bourguet, W., Balaguer, P., Brion, F., 2020. Human and zebrafish nuclear progesterone receptors are differently activated by manifold progestins. *Environmental Science & Technology*, 54(15), 9510-9518.
- Gowing, Genevieve; Svendsen, Soshana; Svendsen, Clive N., 2017. "Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders". *Functional Neural Transplantation IV-Translation to Clinical Application, Part A. Progress in Brain Research*. 230. pp. 99–132.
- Graham, J. D., a Clarke, C. L., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews*, 18(4), 502-519.
- Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Toporova, L., Balaguer, P., 2019. Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology*, 420, 39-45.
- Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J., Brouwer, A., 2006. *In Vitro Profiling of the Endocrine-Disrupting Potency of Brominated Flame Retardants*. *Toxicological Sciences*. 92(1), 157-173.

- Hashmi, M. A. K., Krauss, M., Escher, B. I., Teodorovic, I., Brack, W., 2020. Effect-directed analysis of progestogens and glucocorticoids at trace concentrations in river water. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(1), 189-199.
- Hilscherova, K., Kannan, K., Kang, Y. S., Holoubek, I., Machala, M., Masunaga, S., Nakanishi, J. and Giesy, J. P., 2001. "Characterization of dioxin-like activity of sediments from a Czech river basin." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(12): 2768-2777.
- Hrdlička, Pavel. Mapa 50 nejdelších řek v Česku. In: Wikipedia [online]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Seznam_%C5%99ek_v_%C4%8Cesku#/media/Soubor:Czech_rivers_-_top_50.png
- Huang, R., Xia, M., Cho, M. H., Sakamuru, S., Shinn, P., Houck, K. A., Dix, D. J., Judson, R. S., Witt, K. L., Kavlock, R. J., Tice, R. R., Austin, C. P., 2011. Chemical genomics profiling of environmental chemical modulation of human nuclear receptors. *Environmental health perspectives*, 119(8), 1142-1148.
- Chatterjee, S., Kumar, V., Majumder, CH.B., Roy, P., 2008. Screening of some anti-progestin endocrine disruptors using a recombinant yeast based in vitro bioassay. *Toxicology in Vitro*. 22, 788-798.
- Katzung, B.G., 1994. *Základní & klinická farmakologie*. H & H, Jinočany, 1072 s.
- Kinnberg, K., 2003. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. University of Southern Denmark.
- Knutson, T.P., Lange, C.A., 2014. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 142, 114-125.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha, 199s.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H., 2015. The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research: A Critical Review. *Environmental Science & Technology*. 49 (5), 2625-2638.
- Kvarnryd, M., Grabic, R., Brandt, I., Berg, C., 2011. Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquatic Toxicology*, 103(1-2), 18-24.
- Leusch, F.D.L., Khan, S.J., Laingam, S., Prochazka, E., Froscio, S., Trinh, T., Chapman, H.F., Humpage, A., 2014. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*. 49, 300-3015.

- Li, J., Chen, M., Wang, Z., Ma, M., Peng, X., 2011. Analysis of environmental endocrine disrupting activities in wastewater treatment plant effluents using recombinant yeast assays incorporated with exogenous metabolic activation system. *Biomedical and environmental sciences*, 24(2), 132-139.
- Maltoni, M., Nanni, O., Scarpi, E., Rossi, D., Serra, P., Amadori, D., 2001. High-dose progestins for the treatment of cancer anorexia–cachexia syndrome: systematic review of randomised clinical trials. *Annals of Oncology*.12, 289-300.
- Mapy.cz [online]. [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=13.3112000&y=49.6990000&z=11>
- Mnif, W., Dagnino, S., Escande, A., Pillon, A., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Duchesne, M.J., Hernandez-Raquet, G., Cavallès, V., Balaguer P., Bartegi, A., 2010. Biological analysis of endocrine-disrupting compounds in Tunisian sewage treatment plants. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 59(1), 1-12.
- Molina-Molina, J. M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J. P., Fernández, M. F., Pillon, A., Nicolas, J.C., Olea, N., Balaguer, P., 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicology and applied pharmacology*, 216(1), 44-54.
- Mourkidou, E. P., 1991. Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74(5), 745-765.
- Müller, M. E., Escher, B. I., Schwientek, M., Werneburg, M., Zarfl, C., Zwiener, C., 2018. Combining in vitro reporter gene bioassays with chemical analysis to assess changes in the water quality along the Ammer River, Southwestern Germany. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-14.
- Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., van de Guchte, C., Brouwer, A. 1996. Chemical-Activated Luciferase Gene Expression (CALUX): A Novel in-Vitro Bioassay for Ah Receptor Active Compounds in Sediments and Pore Water. *Fundamental and Applied Toxicology*. 33 (2), 149-160.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkelnik, A., van den Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (1), 16-23.

- Neale, P. A., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Leusch, F. D., Balaguer, P., 2020. Assessing species-specific differences for nuclear receptor activation for environmental water extracts. *Water Research*, 185, 116247.
- Paulos, P., Runnalls, T. J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A. P., Sumpter, J. P., Huggett, D. B., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 256-262.
- Peng, F. Q., Ying, G. G., Yang, B., Liu, S., Lai, H. J., Liu, Y. S., Zhou, G. J., 2014. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*, 95, 581-588.
- Rao, K., Li, N., Ma, M., Wang, Z., 2014. In vitro agonistic and antagonistic endocrine disrupting effects of organic extracts from waste water of different treatment processes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 8(1), 69-78.
- Roberts, J., Bain, P. A., Kumar, A., Hepplewhite, C., Ellis, D. J., Christy, A. G., Beavis, S. G., 2015. Tracking multiple modes of endocrine activity in Australia's largest inland sewage treatment plant and effluent-receiving environment using a panel of in vitro bioassays. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(10), 2271-2281.
- Rosenberg, R. S., Grass, L., Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Diamandis, E. P., 1998. Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(3), 935-939.
- Runnalls, T. J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A. P., Sumpter, J. P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environmental science & technology*, 47(4), 2077-2084.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 238 s.
- Säfholm, M., Ribbenstedt, A., Fick, J., Berg, C., 2014. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130577.
- Scippo, M.L., Argiris, C., VanDeWeerd, C., Muller, M., Willemsen, P., Martial, J., Maghuin-Rogister, G., 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378, 664-669.

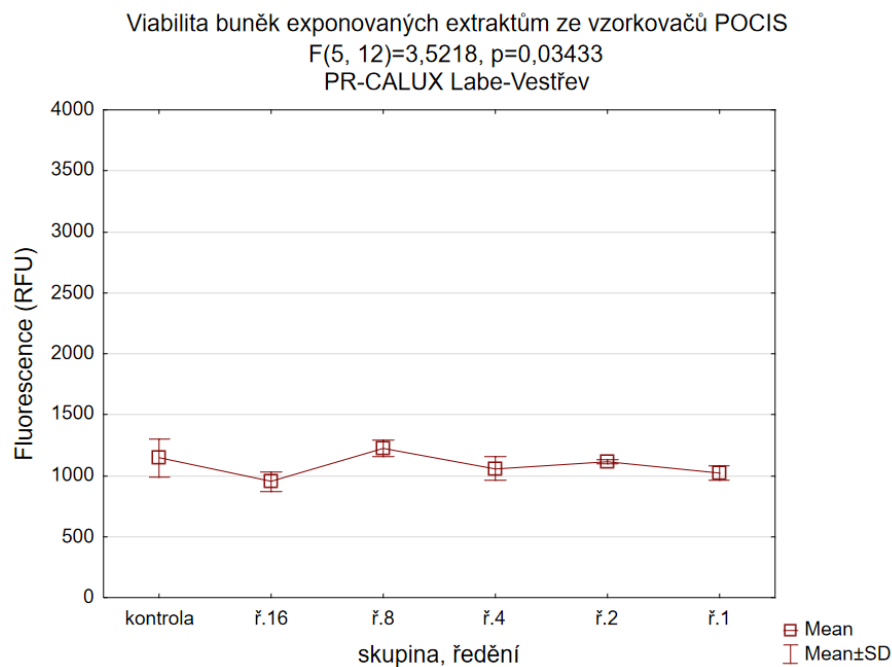
- Scott, A. P., Sumpter, J. P., Stacey, N., 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 183-224.
- Scott, P.D., Bartkow, M., Blockwell, S.J., Coleman, H.M., Khan, S.J., Lim, R., McDonald, J.A., Nice, H., Nugegoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L.A., Warne M.S.J., Leusch, F.D.L., 2014. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 12951-12967.
- Shore, L.S., Shemesh, M., 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry*. 75, 1859-187.
- Schreurs, R.H.M.M., Sonneveld, E., Jansen, J.H.J., Seinen, W., van der Burg, B., 2005. Interaction of Polycyclic Musks and UV Filters with the Estrogen Receptor (ER), Androgen Receptor (AR), and Progesterone Receptor (PR) in Reporter Gene Bioassays. *Toxicological Sciences*. 83, 264-272.
- Schriks, M., Heringa, M.B., van der Linden, S.C., 2009. Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. *RIWA*. 25 s.
- Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A.C., Brouwer, A., van der Burg, B., 2005. Development of Androgen-and Estrogen-Responsive Bioassays, Members of a Panel of Human Cell Line-Based Highly Selective Steroid-Responsive Bioassays. *Toxicological Sciences*. 83, 136-148.
- Sonneveld, E., Pieterse B., Schoonen, W.G., van der Burg, B., 2011. Validation of in vitro screening models for progestagenic activities: Inter-assay comparison and correlation with in vivo activity in rabbits. *Toxicology in Vitro*. 25, 545-554.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrano, F. O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental health perspectives*, 103(suppl 7), 113-122.
- Spencer, E. Y., 1982. Guide to the chemicals used in crop protection (7th edn.), Publication 1043, Agriculture Canada Research Branch, Ottawa, Canada KIA OS9, p. 585.
- Spitz, I.M., Chwalisz, K., 2000. Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids*. 65, 807-815.
- Svobodová, Z., Dušek, L., Vykusová, B., Modrá, H., 1997. Vývoj a současný stav testů toxicity se zaměřením na ryby. Hodnocení rizik pro životní prostředí-ERA 97, Masarykova univerzita Brno, Brno, s. 198-204.

- Svobodová, K., Cajthaml, T., 2010. New in vitro reporter gene bioassays for screening of hormonal active compounds in the environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(4), 839-847.
- Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kroupová, H. K., 2018a. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water research*, 137, 64-71.
- Šauer, P., Bořík, A., Golovko, O., Grabic, R., Staňová, A. V., Valentová, O., Stará, A., Šandová, M., Kroupová, H. K., 2018b. Do progestins contribute to (anti-) androgenic activities in aquatic environments?. *Environmental pollution*, 242, 417-425.
- Šauer, P., Švecová, H., Grabicová, K., Aydın, F. G., Mackuřák, T., Kodeš, V., Blytt, L. D., Henningef, L. B., Grabic, R., Kroupová, H. K., 2021. Bisphenols emerging in Norwegian and Czech aquatic environments show transthyretin binding potency and other less-studied endocrine-disrupting activities. *Science of The Total Environment*, 751, 141801.
- Tang, O.S., Ho, P.CH., 2006. Clinical applications of mifepristone. *Gynecological Endocrinology*. 22, 655-659.
- Trojan, S., 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha, 771 s.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, 24(2), 139-177.
- van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology*. 42 (15), 5814-5820.
- Viswanath, G., Haldera, S., Divya, G., Majumder, CH.B., Roy, P., 2008. Detection of potential (anti)progestagenic endocrine disruptors using a recombinant human progesterone receptor binding and transactivation assay. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 295, 1-9.
- Weiss, J. M., Hamers, T., Thomas, K. V., van der Linden, S., Leonards, P. E., Lamoree, M. H., 2009. Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(5), 1385-1397.
- World Health Organization (WHO), 1997. Flame retardants: a general introduction. *Environmental Health Criteria*, (192)

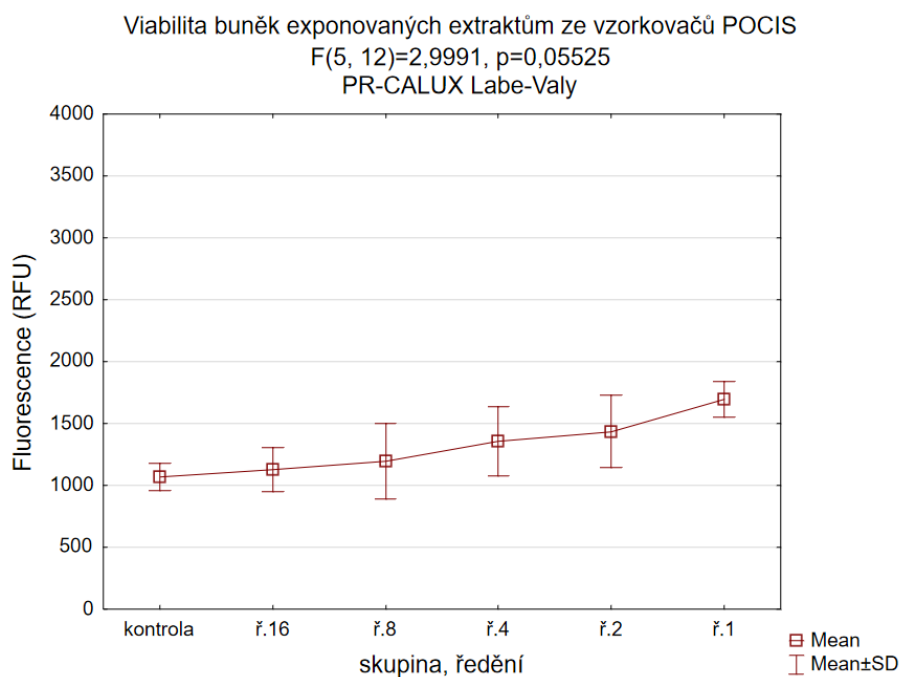
Willemsen, P., Scippo, M.L., Kausel, G., Figueroa, J., Maghuin-Rogister, G., Martial, J.A., Muller, M., 2004. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378, 655-663.

8 Přílohy

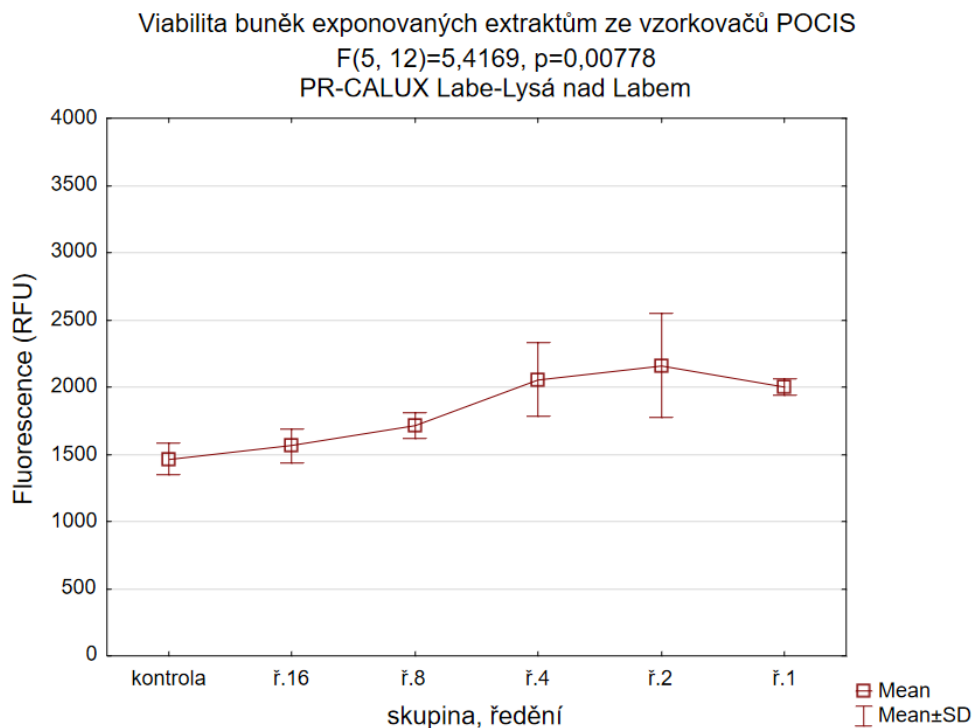
Příloha č. 1: Testování extraktů povrchových vod na cytotoxicitu pro progesteragenní aktivitu.



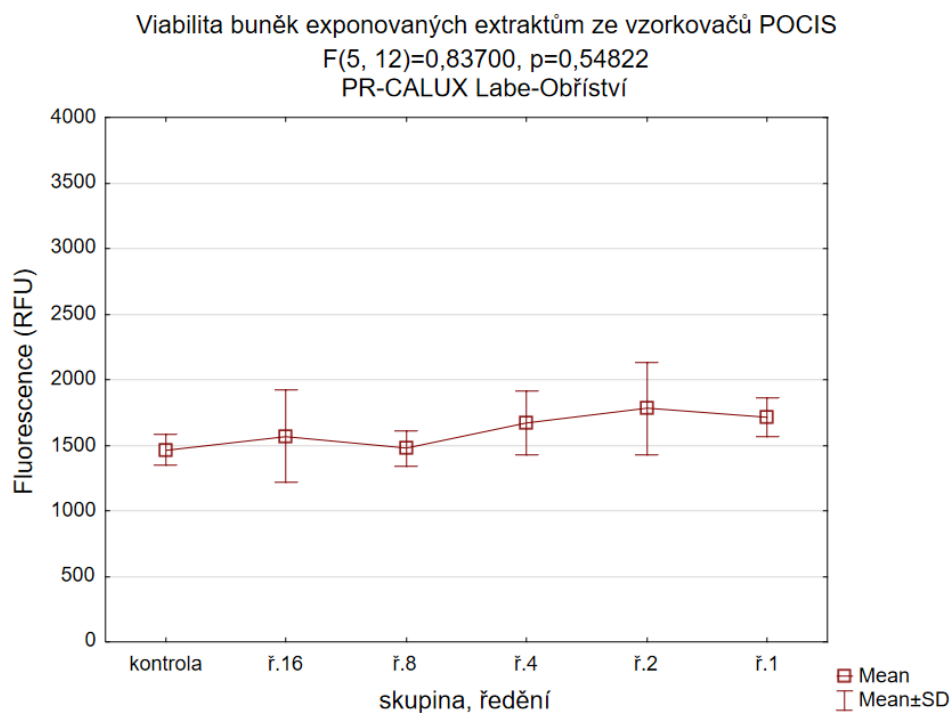
Graf P1-1: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Vestřev



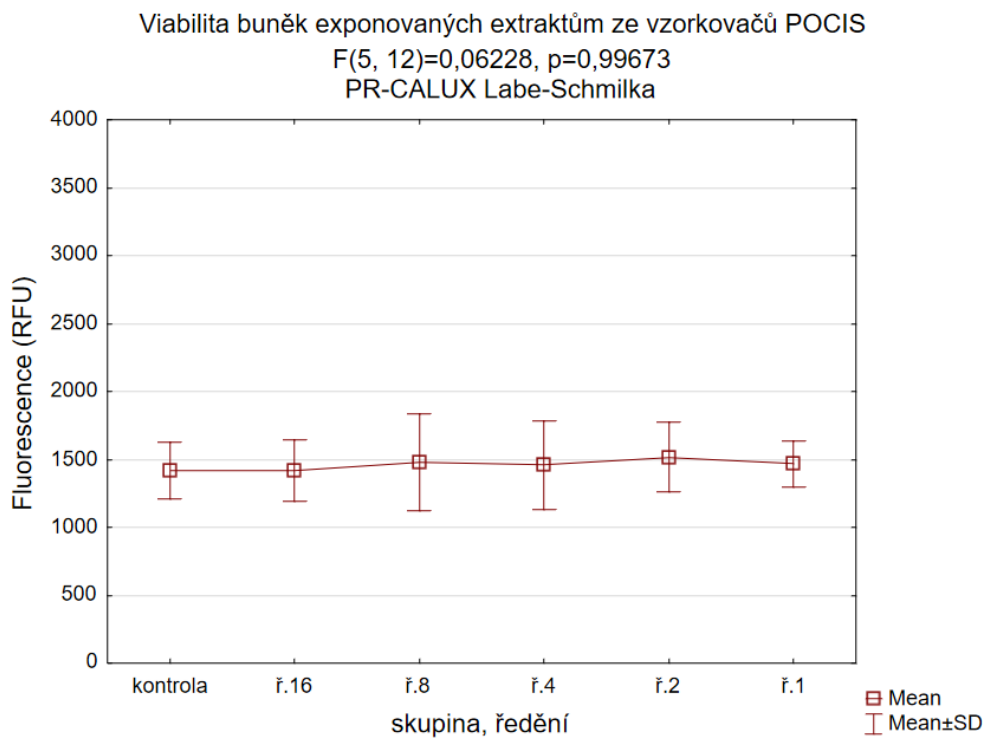
Graf P1-2: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Valy



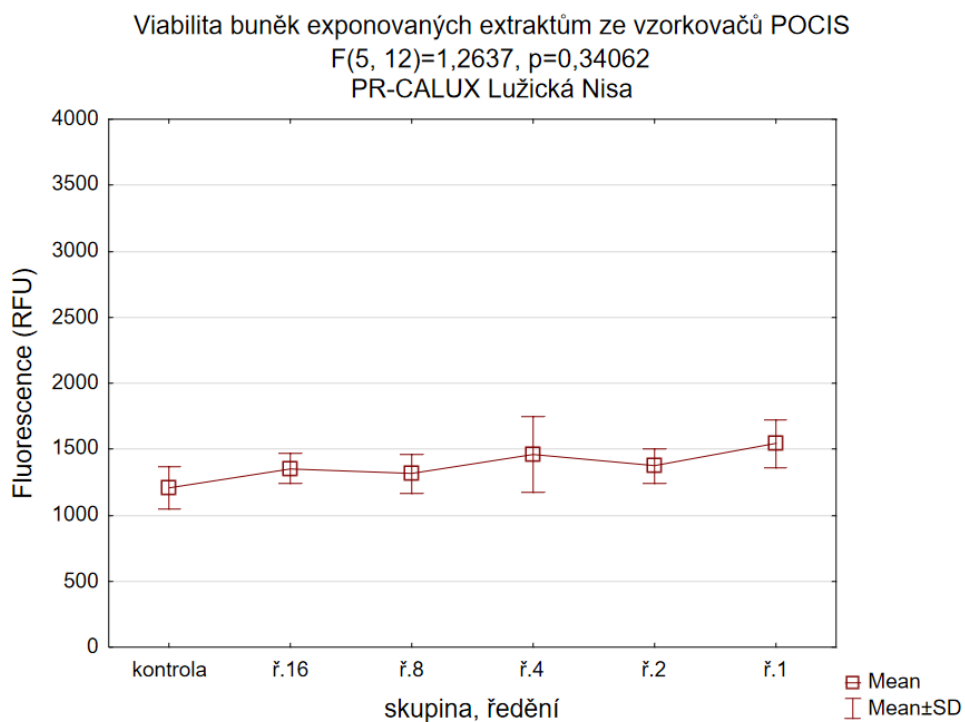
Graf P1-3: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Lysá nad Labem



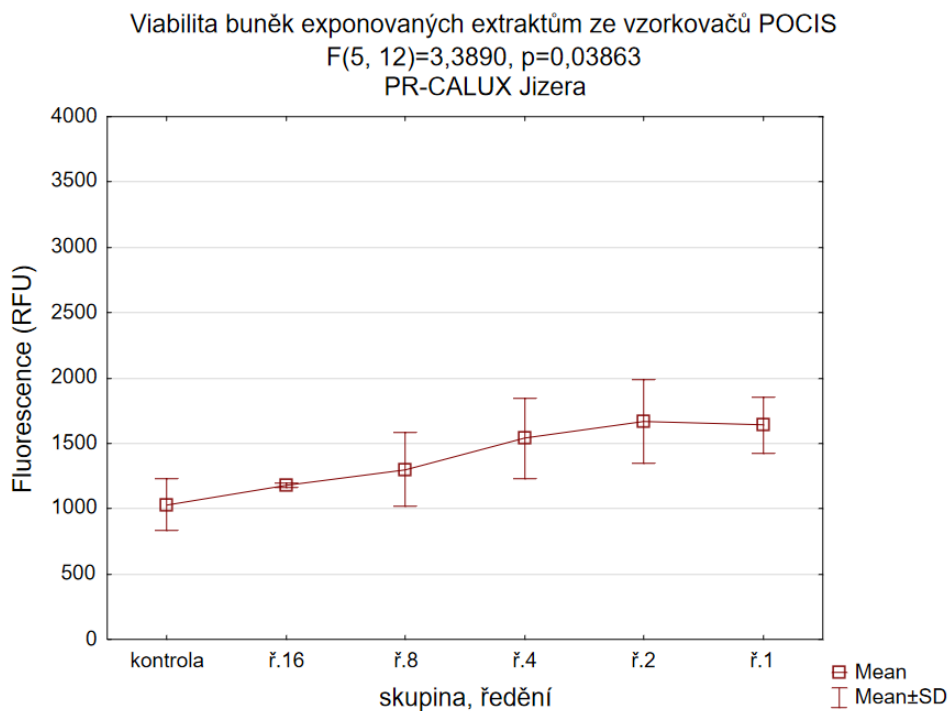
Graf P1-4: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Obříství



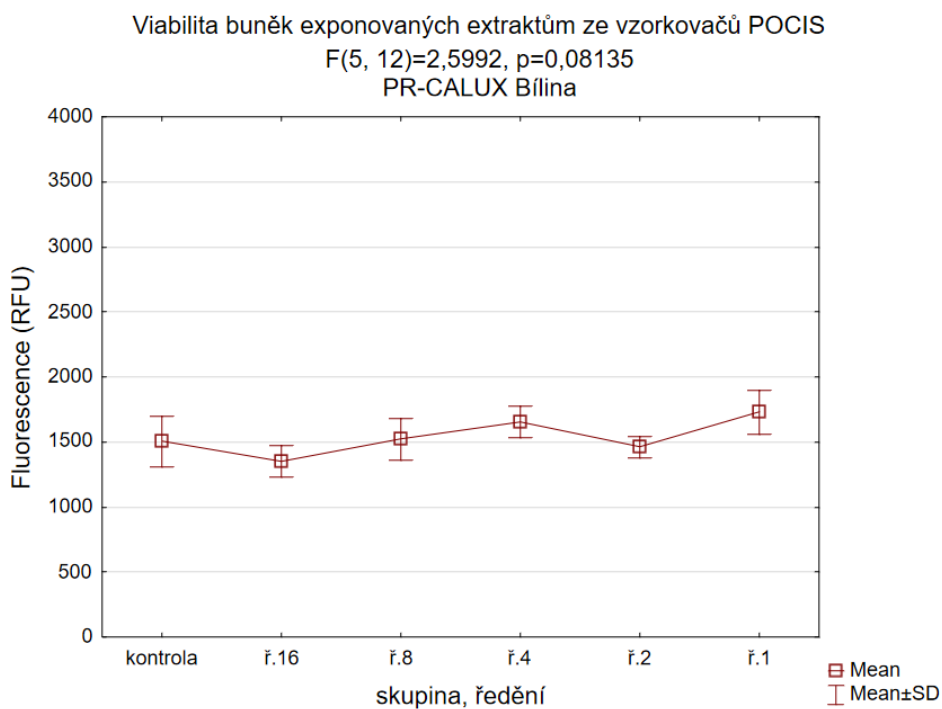
Graf P1-5: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Schmilka



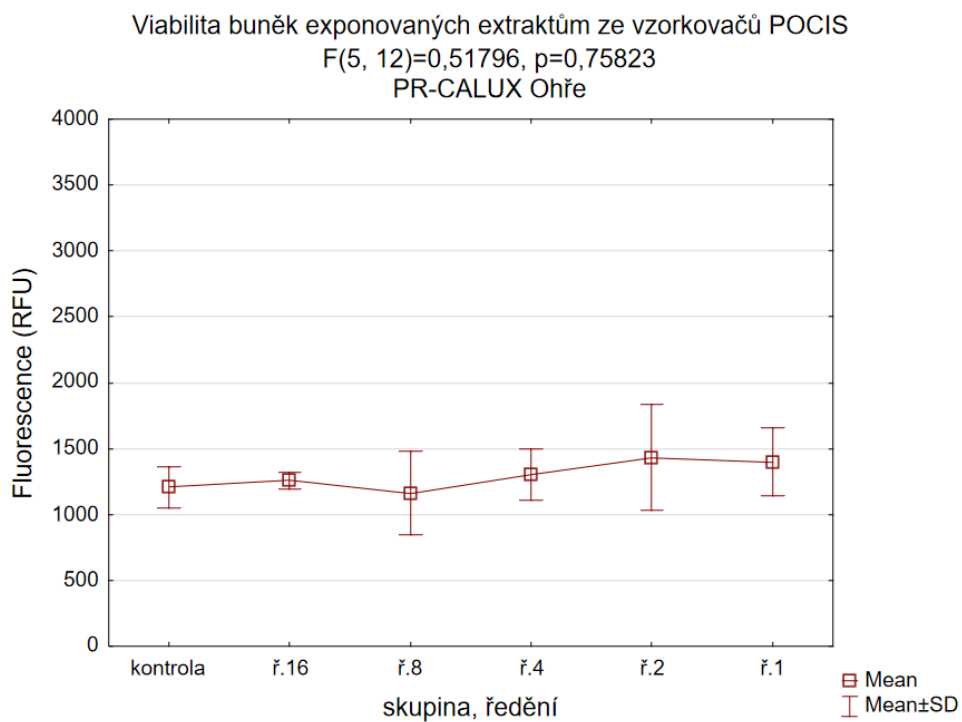
Graf P1-6: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Lužická Nisa



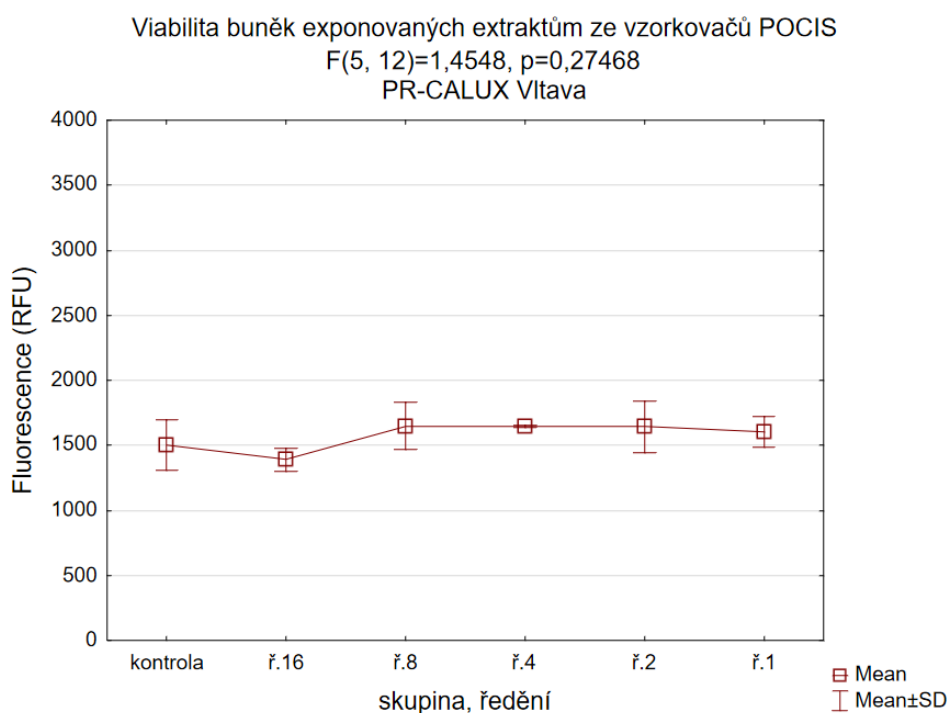
Graf P1-7: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Jizera



Graf P1-8: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Bílina

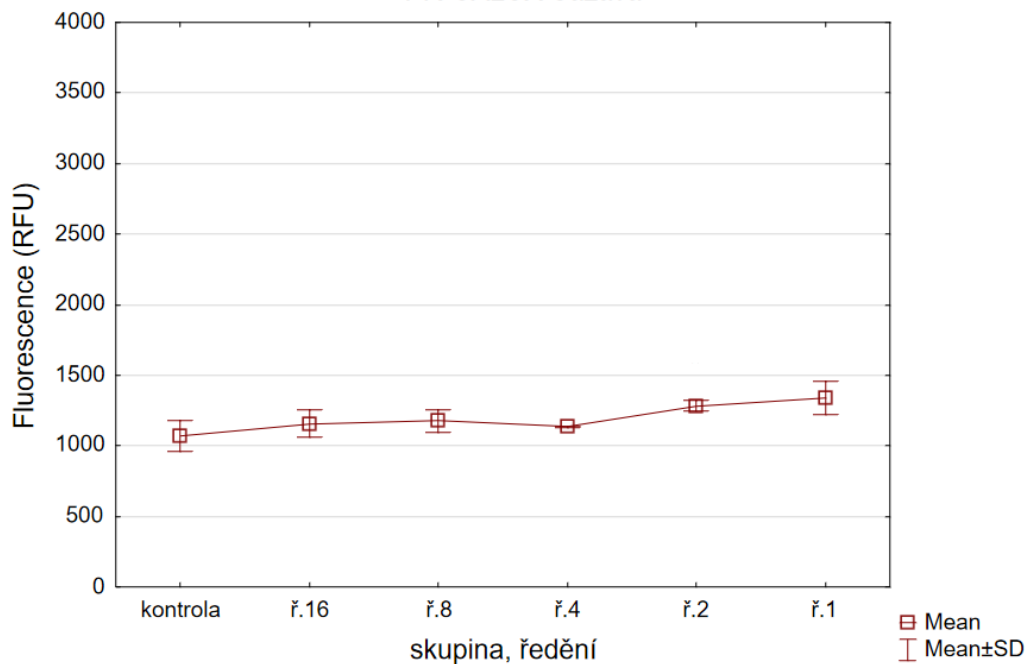


Graf P1-9: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Ohře



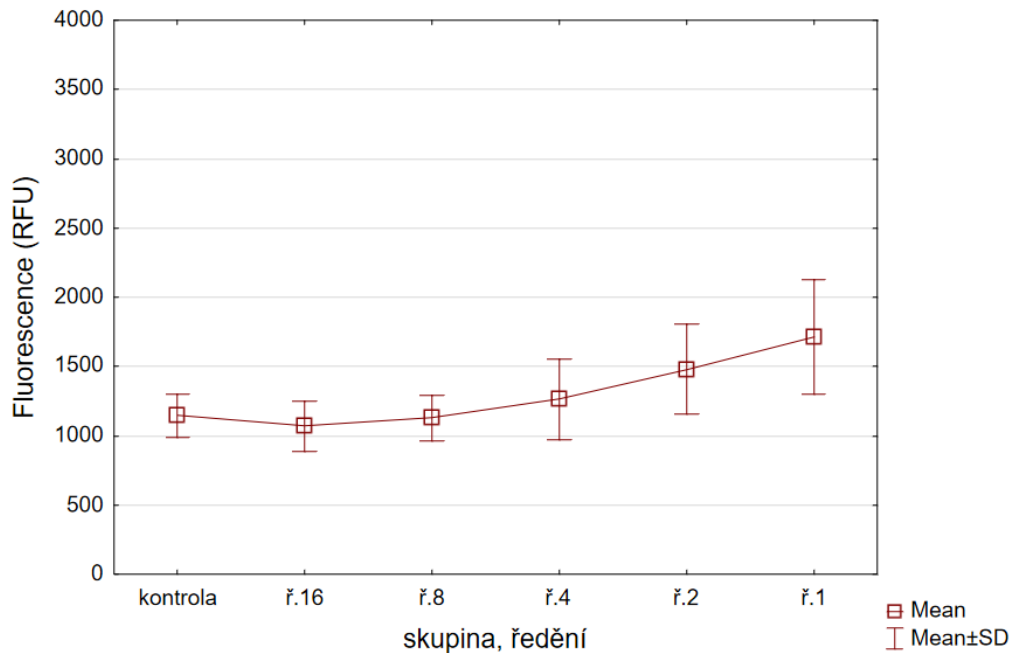
Graf P1-10: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Vltava

Viabilita buněk exponovaných extraktům ze vzorkovačů POCIS
 $F(5, 12)=4,0990$, $p=0,02105$
 PR-CALUX Sázava

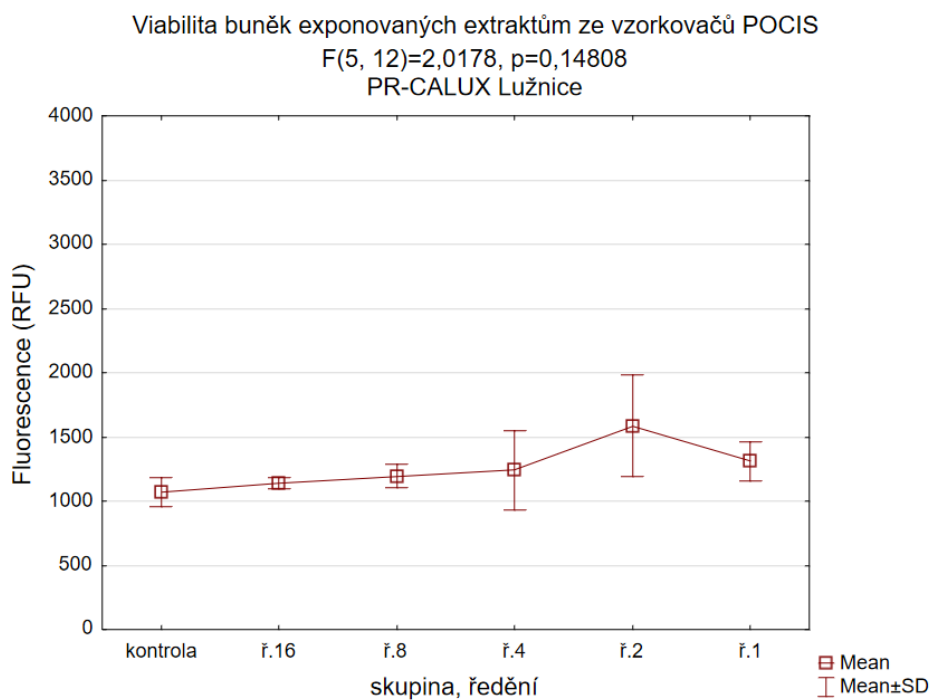


Graf P1-11: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Sázava

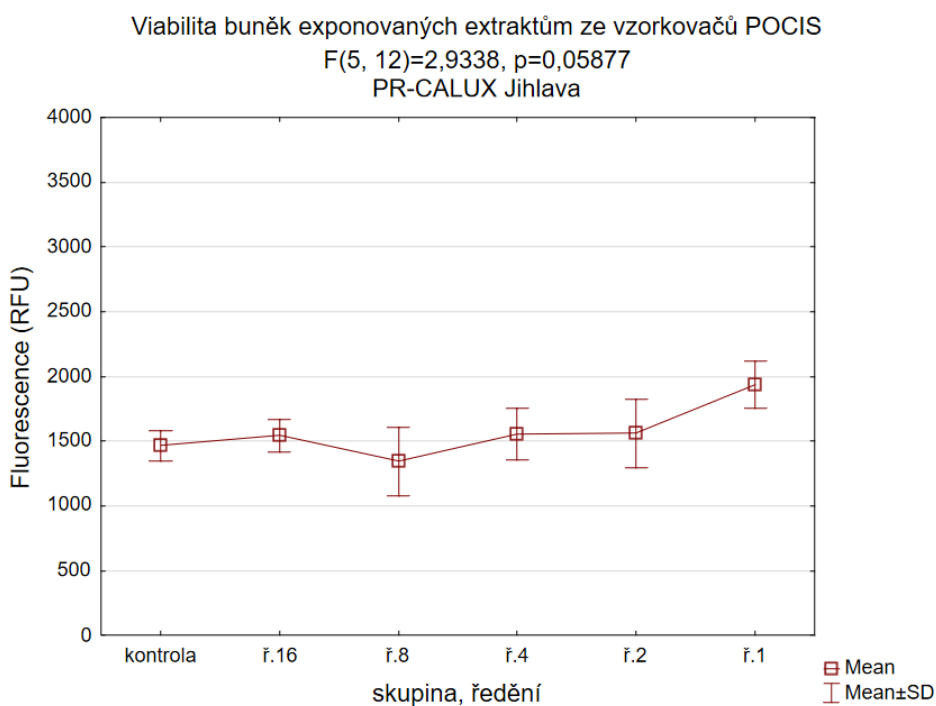
Viabilita buněk exponovaných extraktům ze vzorkovačů POCIS
 $F(5, 12)=2,5159$, $p=0,08840$
 PR-CALUX Otava



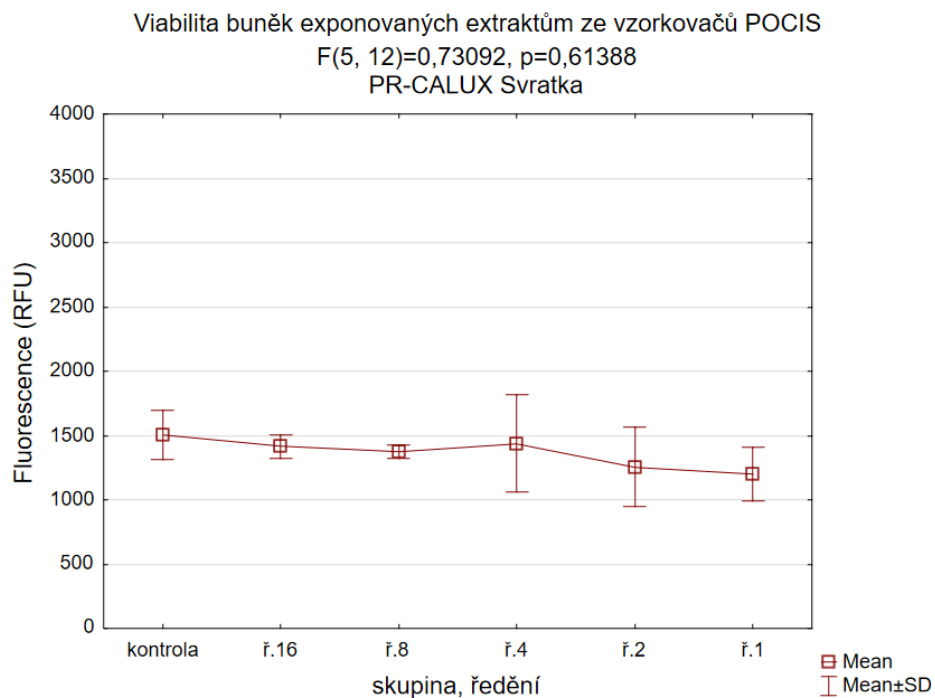
Graf P1-12: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Otava



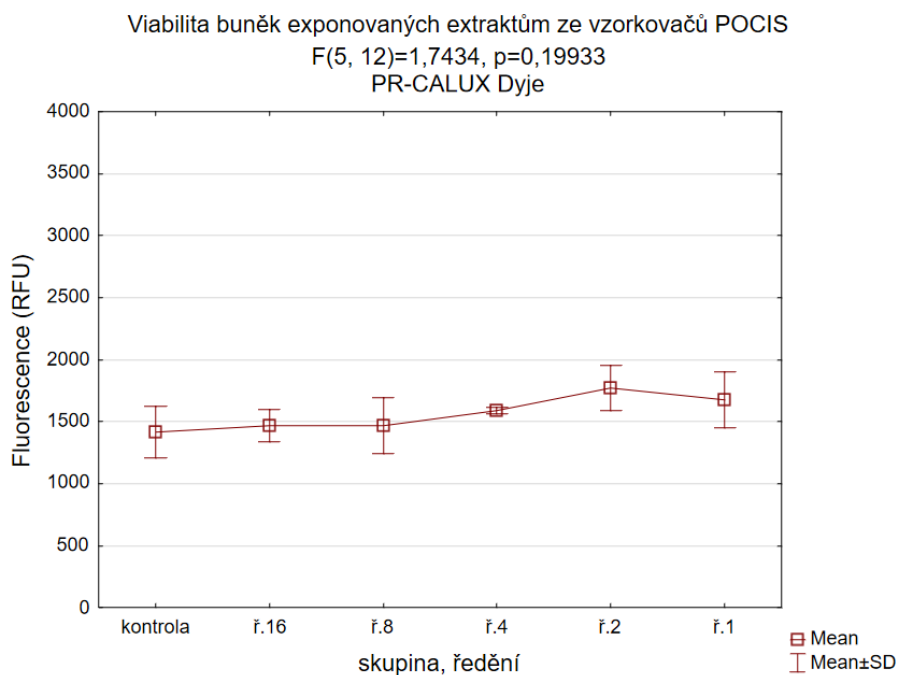
Graf P1-13: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Lužnice



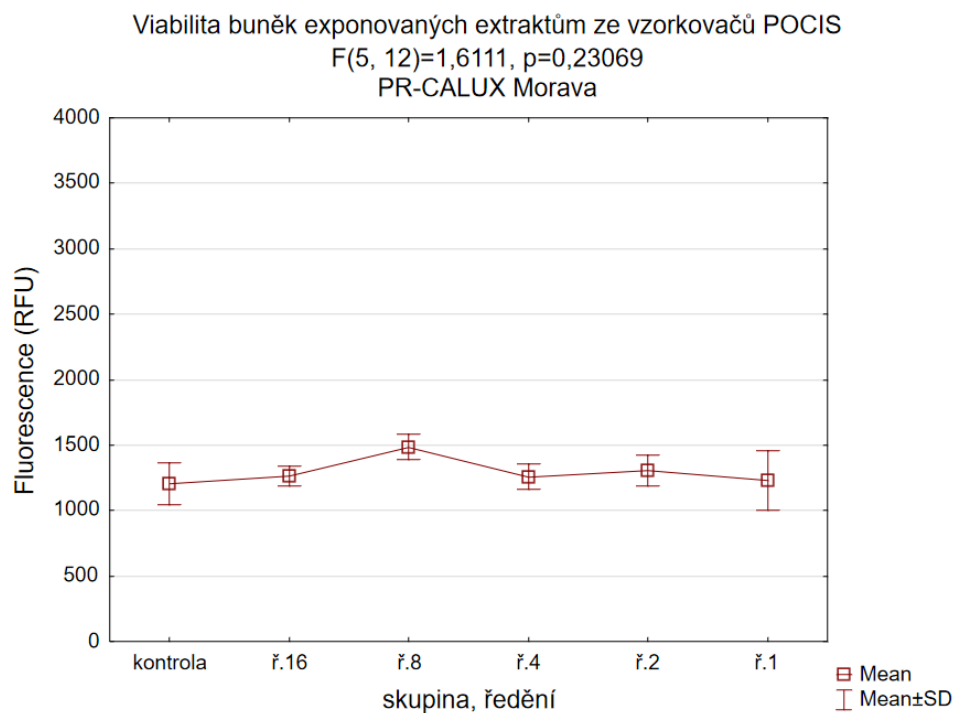
Graf P1-14: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Jihlava



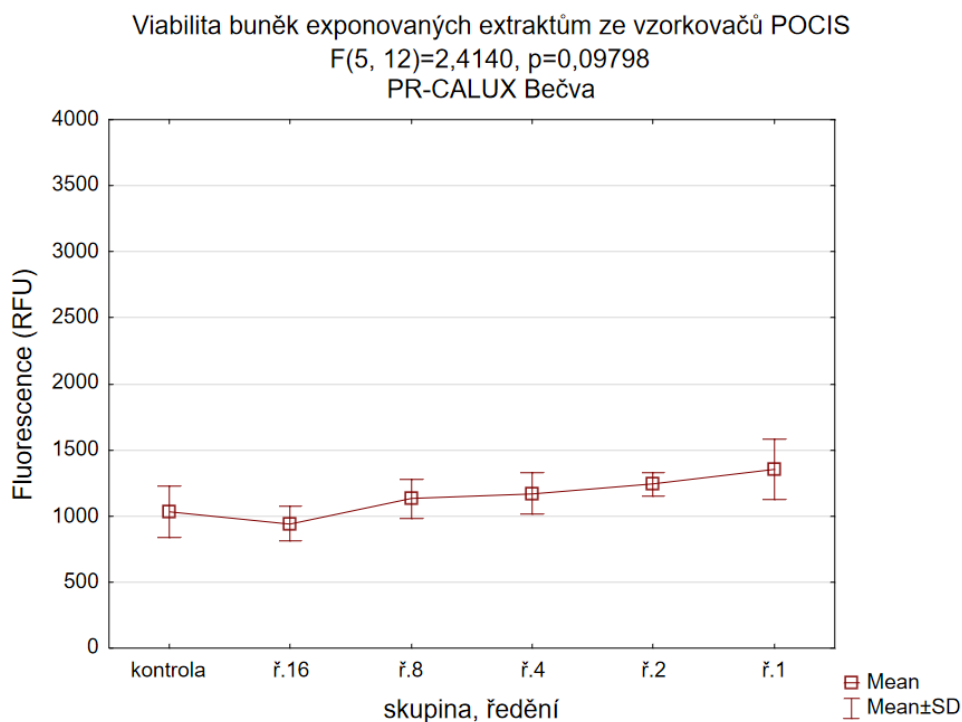
Graf P1-15: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Svratka



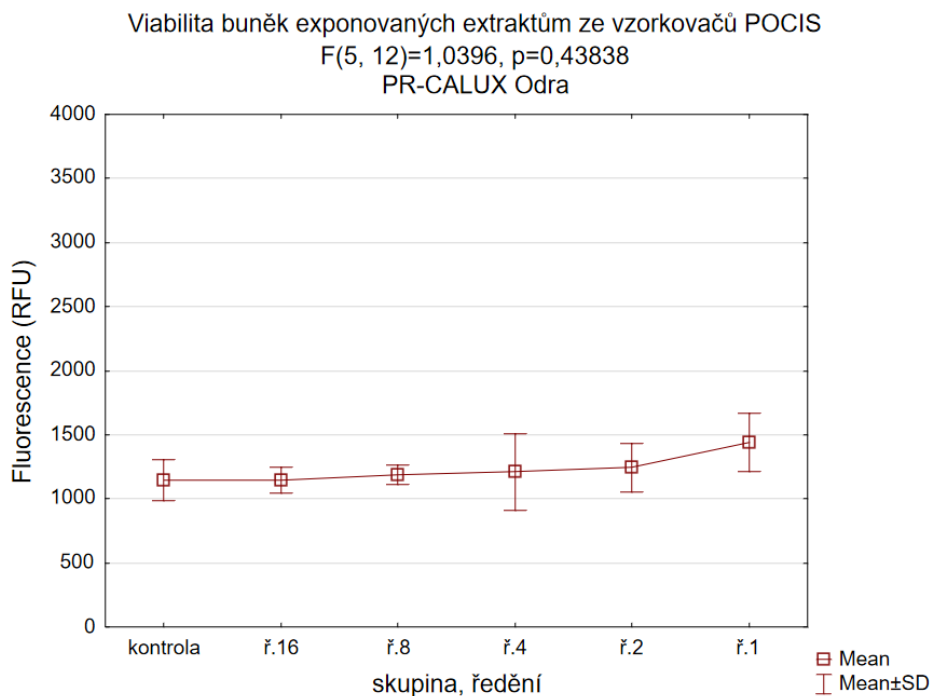
Graf P1-16: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Dyje



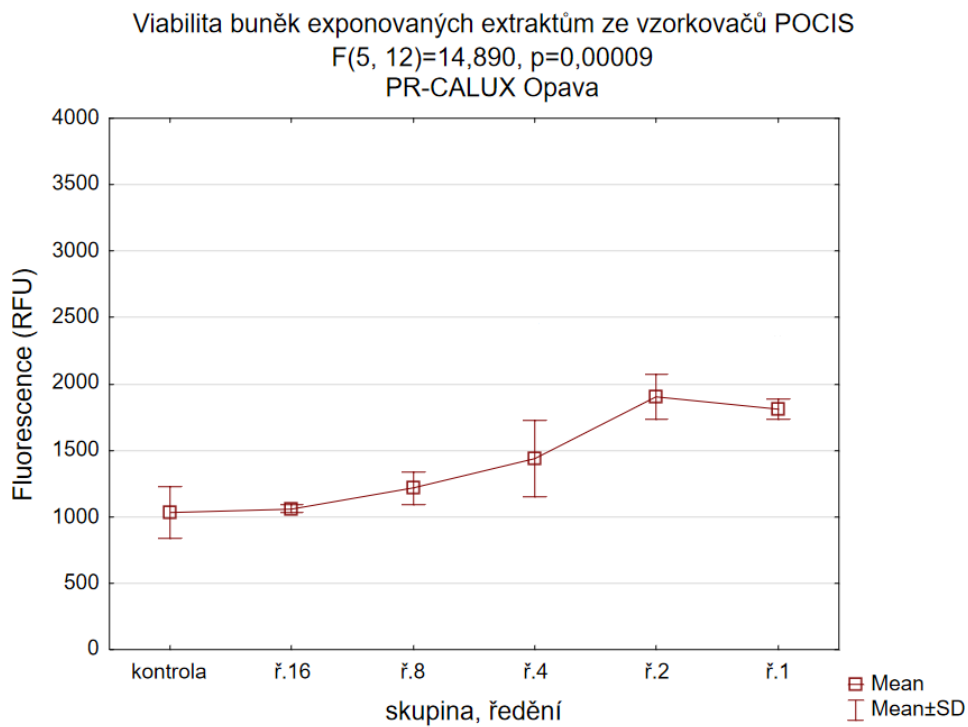
Graf P1-17: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Morava



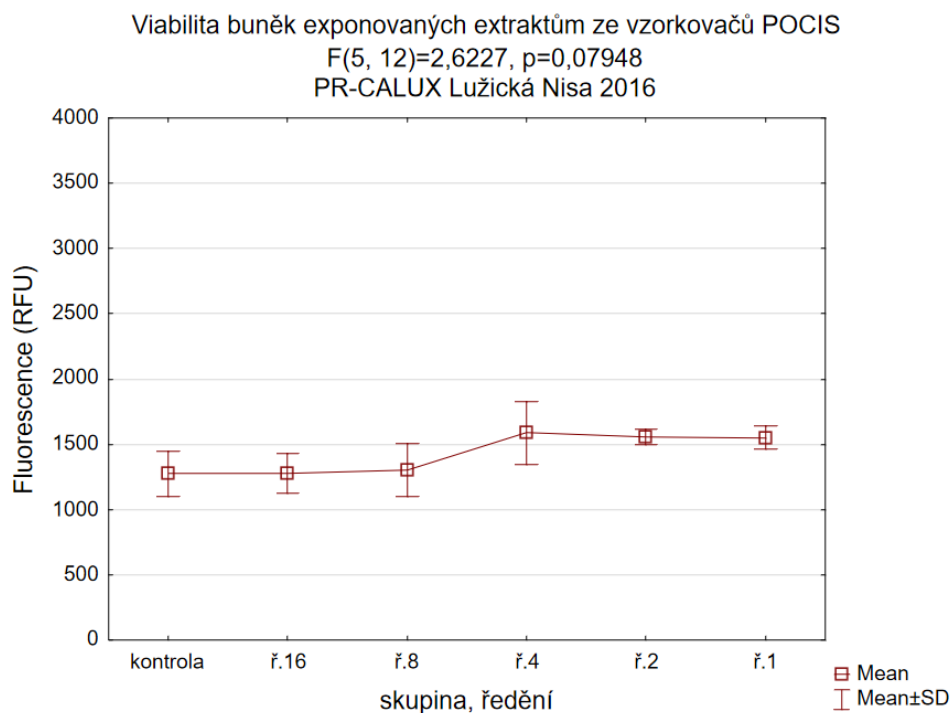
Graf P1-18: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Bečva



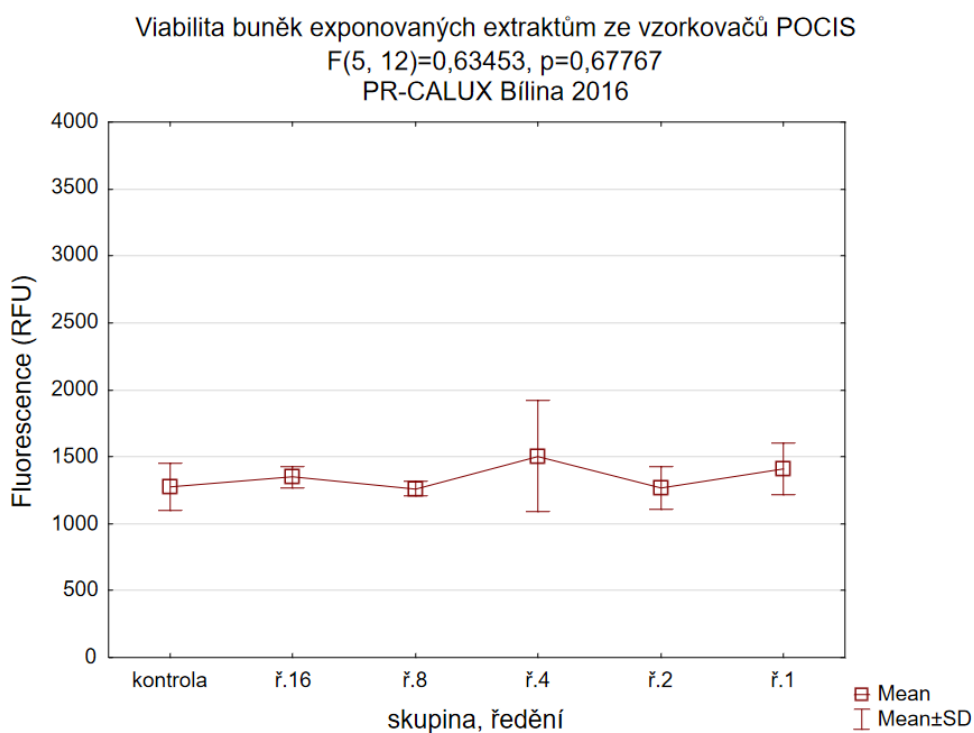
Graf P1-19: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Odra



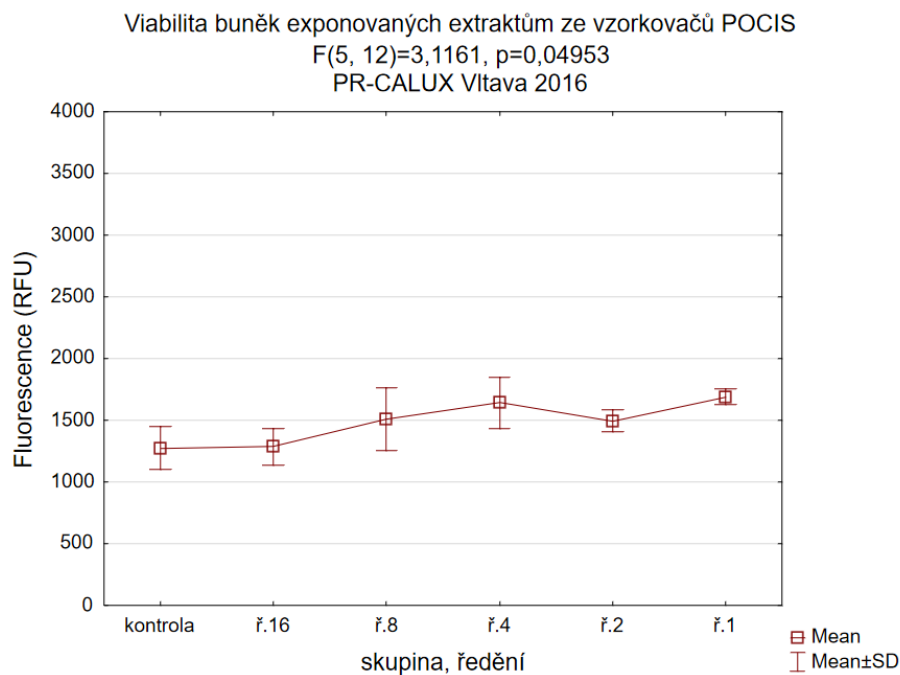
Graf P1-20: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Opava



Graf P1-21: Viabilita buněk exponovaných extraktům z roku 2016 pro lokalitu Lužická Nisa

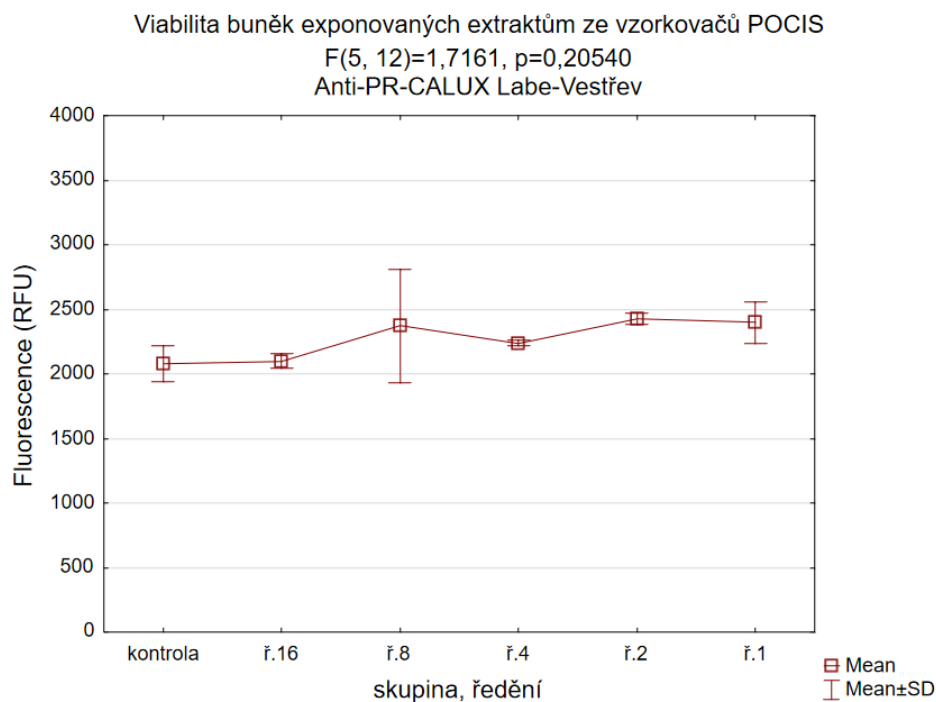


Graf P1-22: Viabilita buněk exponovaných extraktům z roku 2016 pro lokalitu Bílina

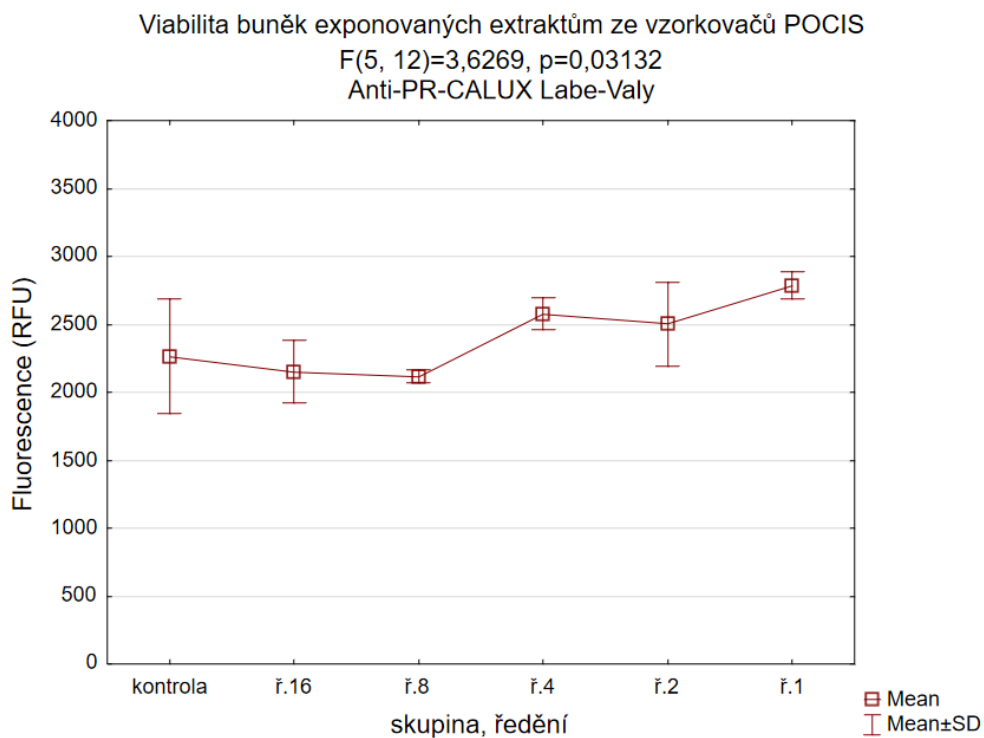


Graf P1-23: Viabilita buněk exponovaných extraktům z roku 2016 pro lokalitu Vltava

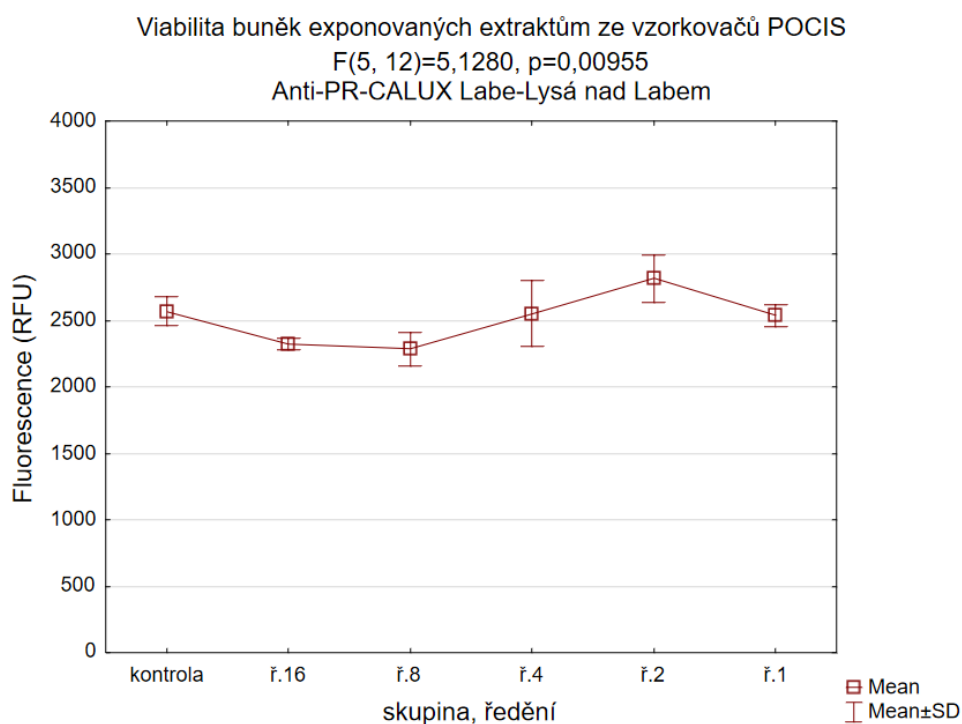
Příloha č. 2: Testování extraktů povrchových vod na cytotoxicitu pro anti-progestagenní aktivitu.



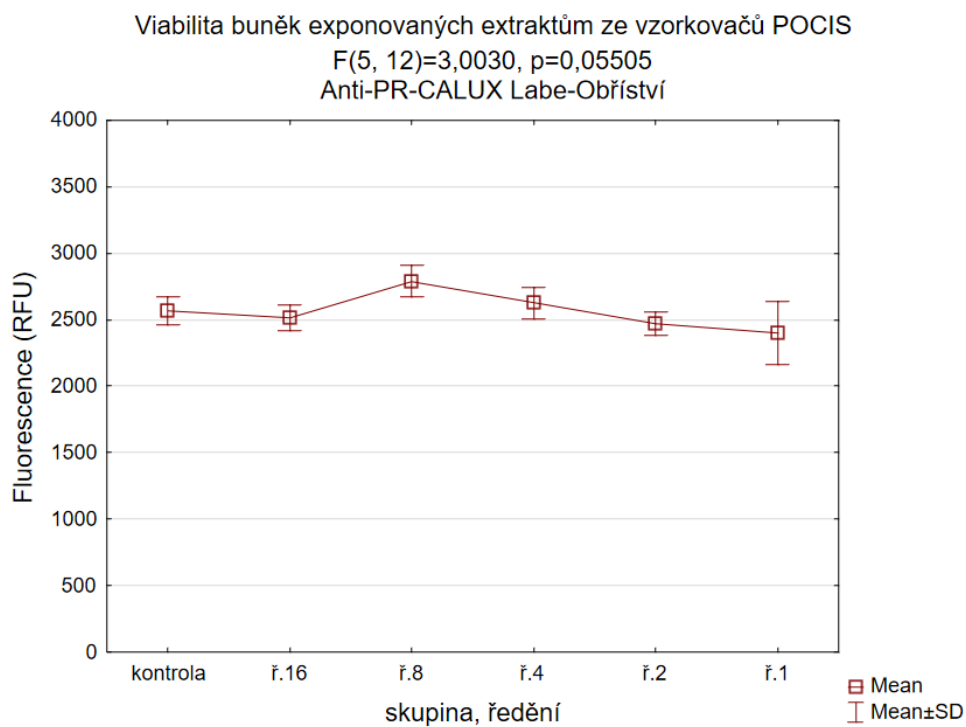
Graf P2-1: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Vestřev



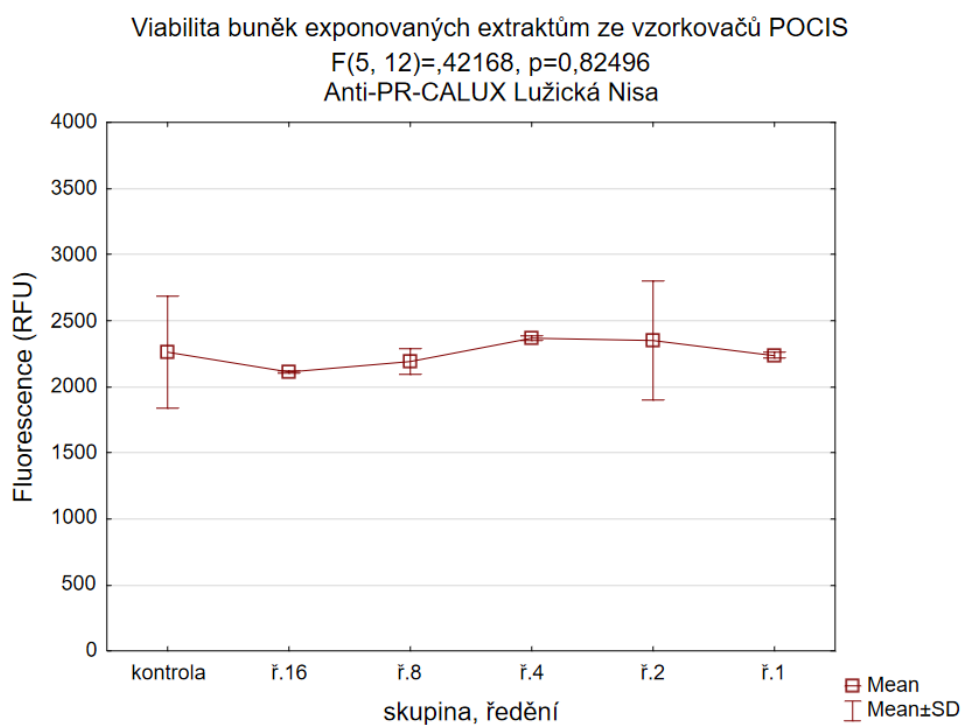
Graf P2-2: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Valy



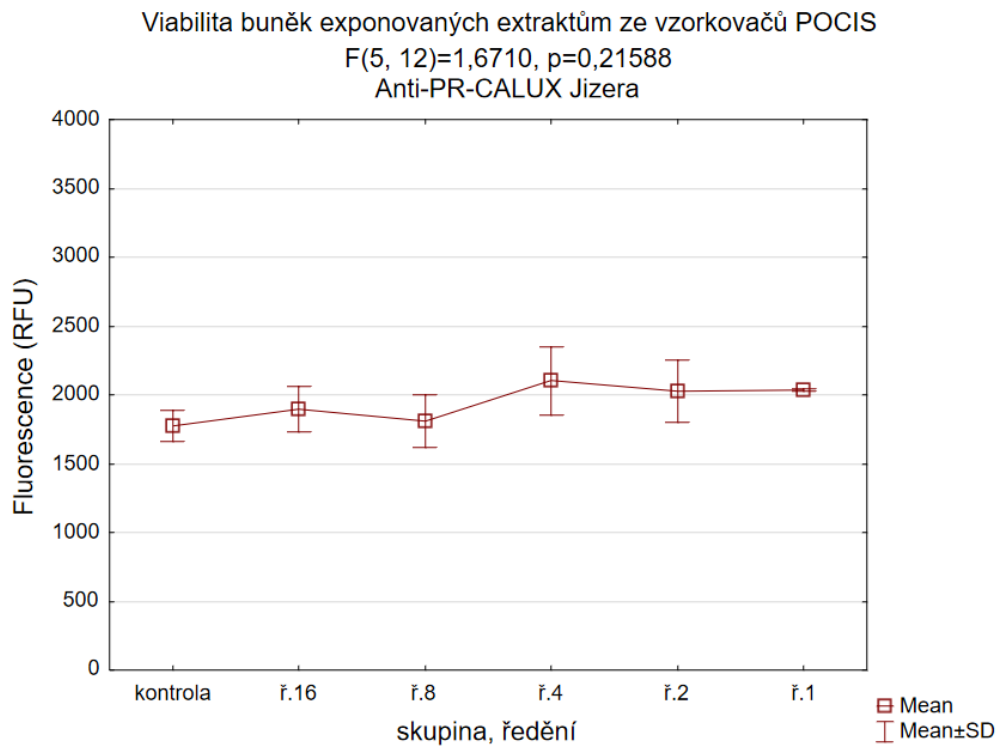
Graf P2-3: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Lysá nad Labem



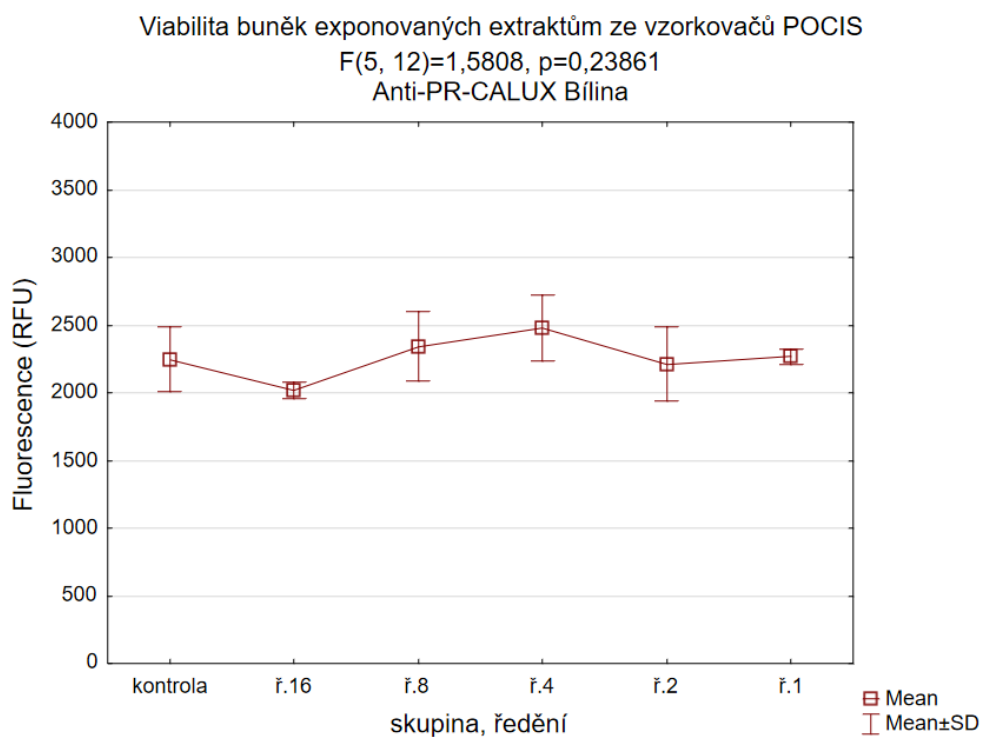
Graf P2-4: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Labe-Obříství



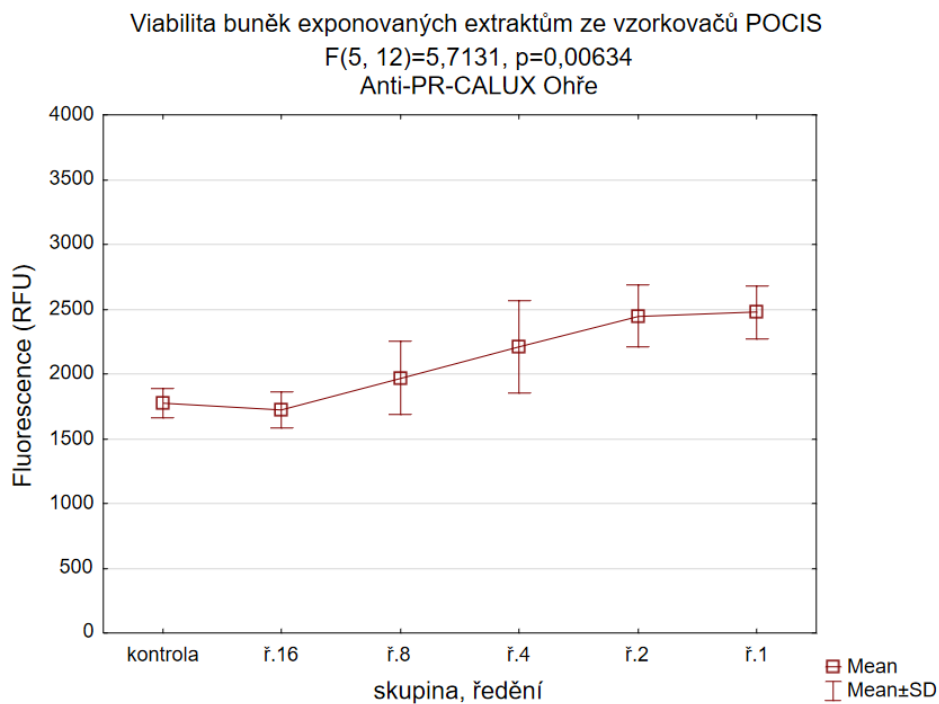
Graf P2-5: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Lužická Nisa



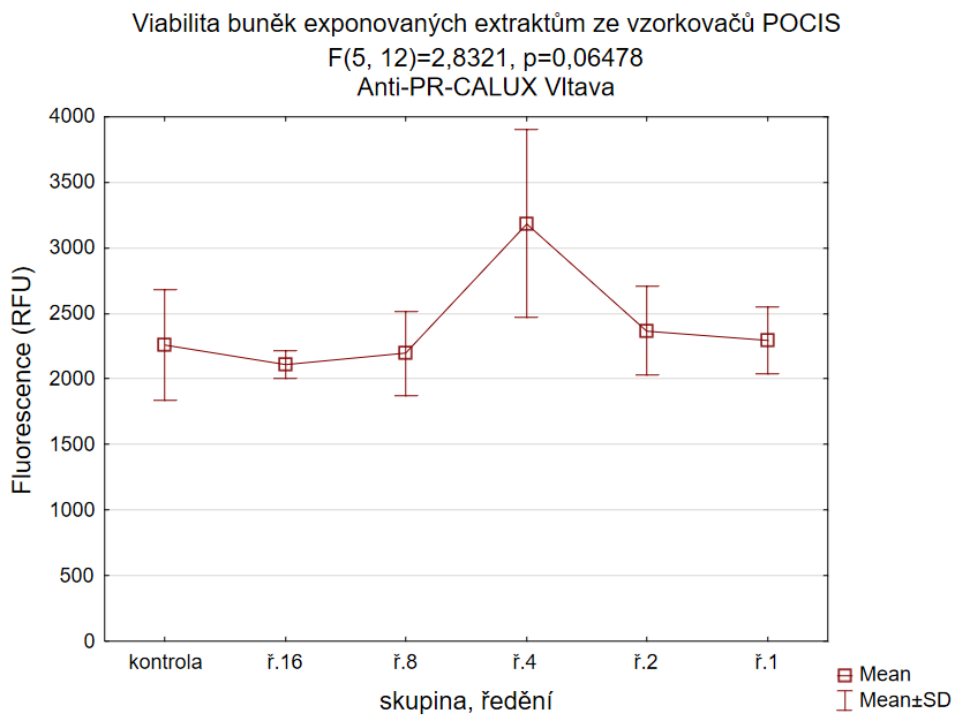
Graf P2-6: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Jizera



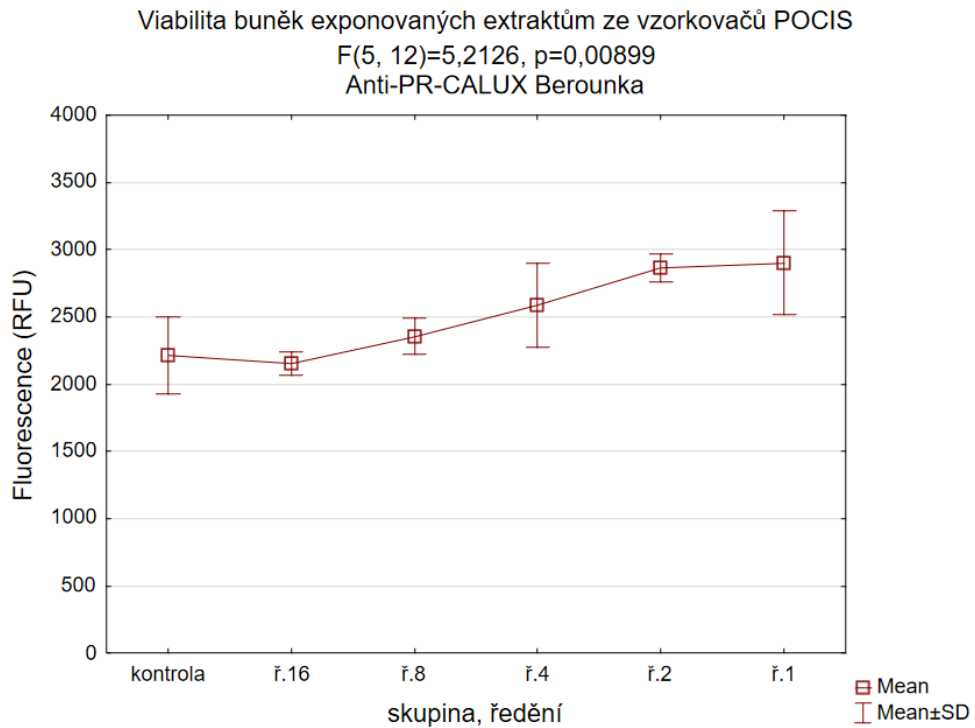
Graf P2-7: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Bílina



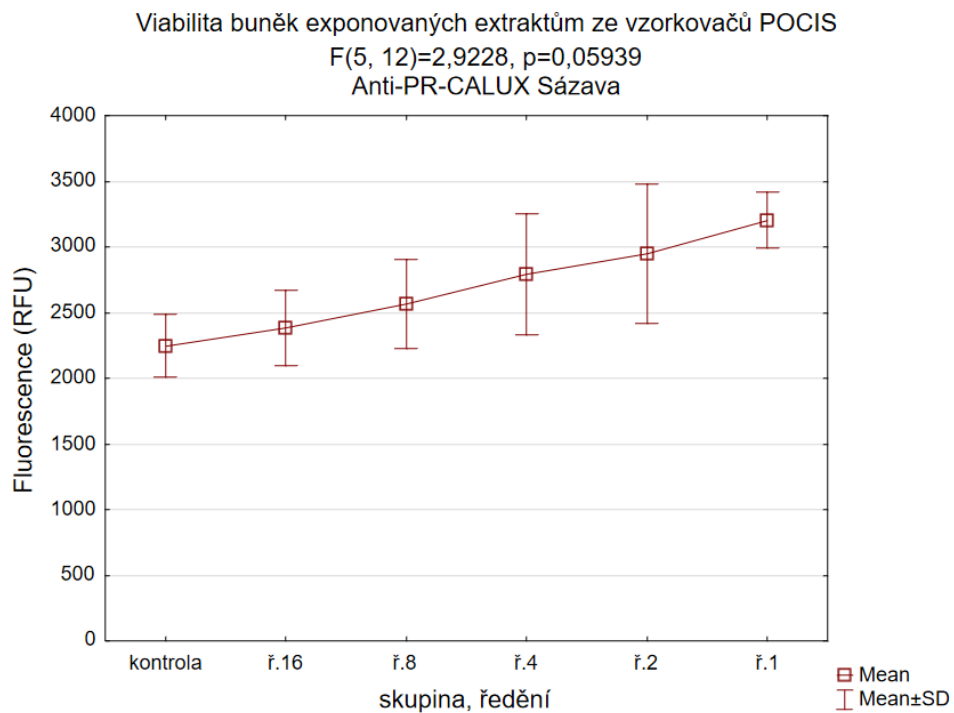
Graf P2-8: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Ohře



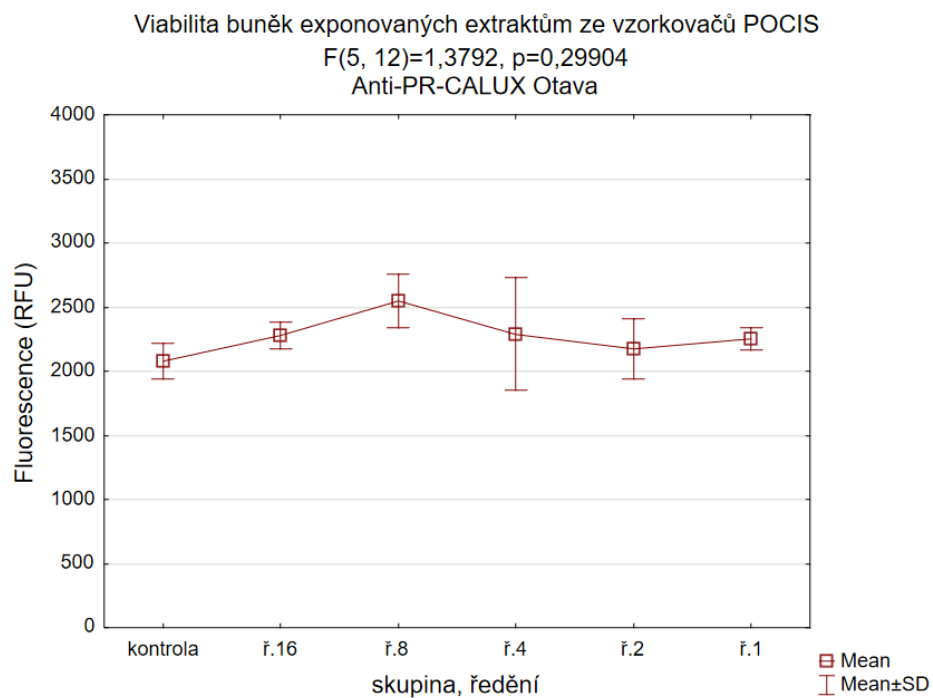
Graf P2-9: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Vltava



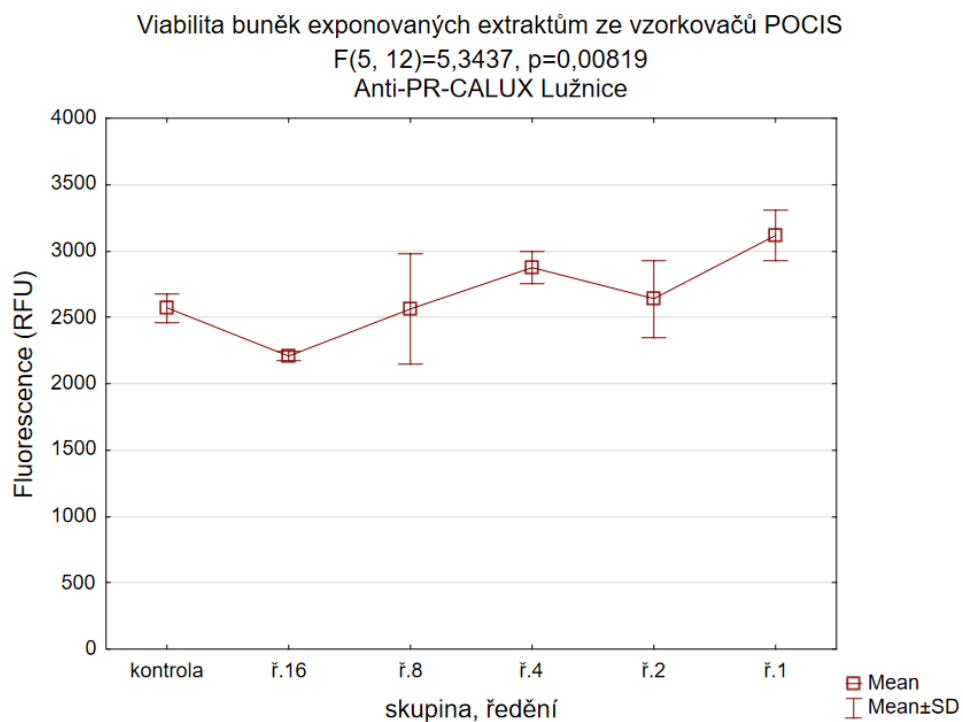
Graf P2-10: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Berounka



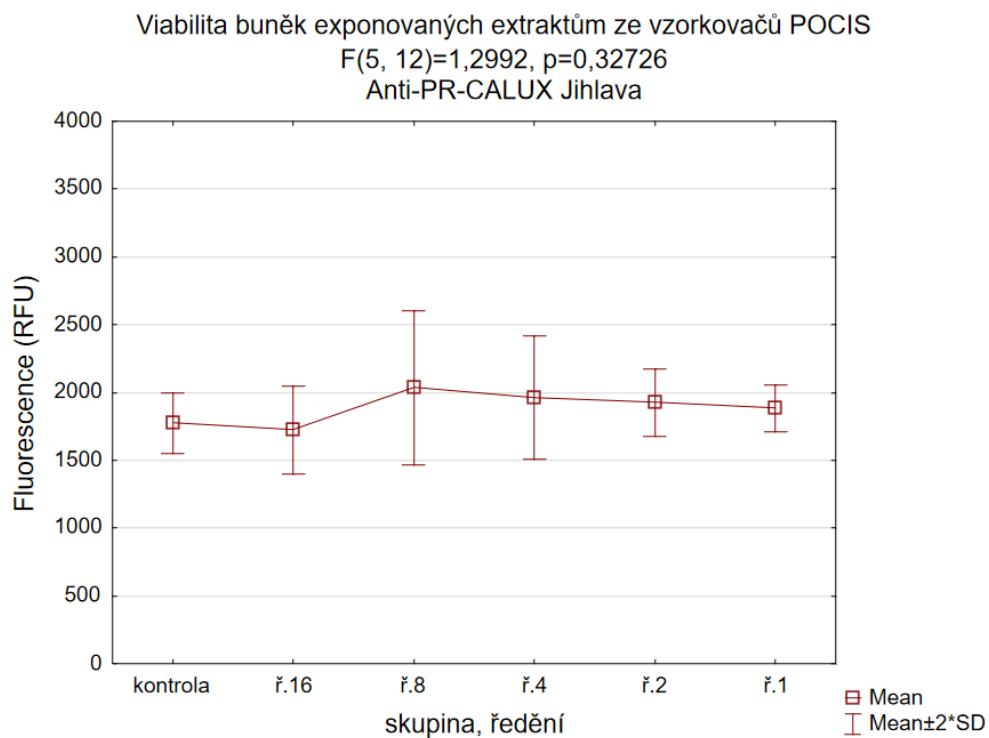
Graf P2-11: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Sázava



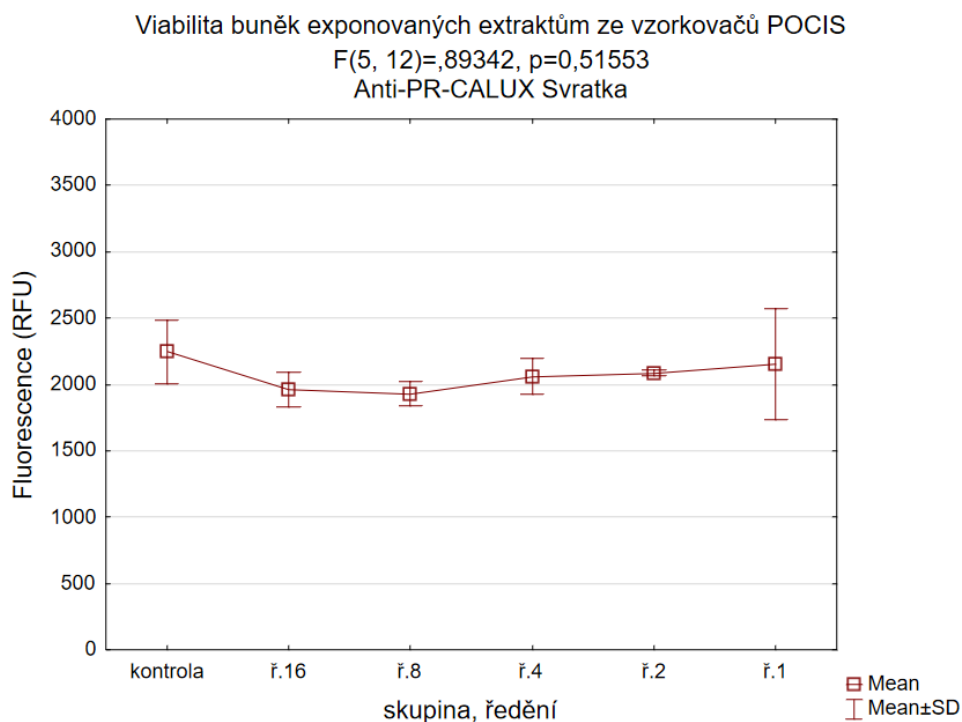
Graf P2-12: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Otava



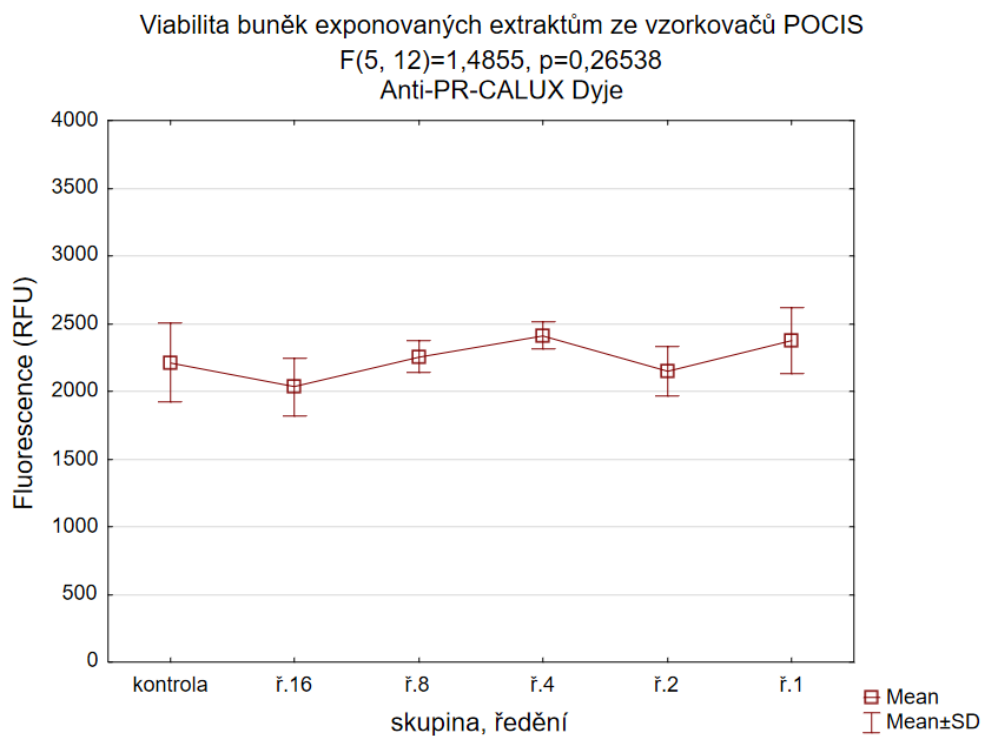
Graf P2-13: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Lužnice



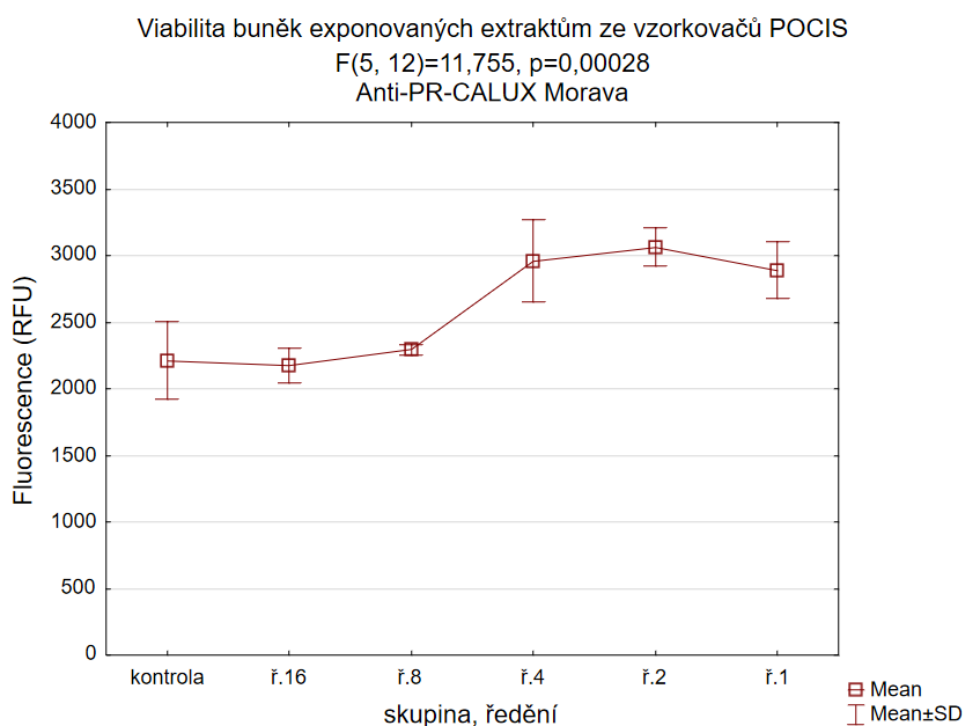
Graf P2-14: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Jihlava



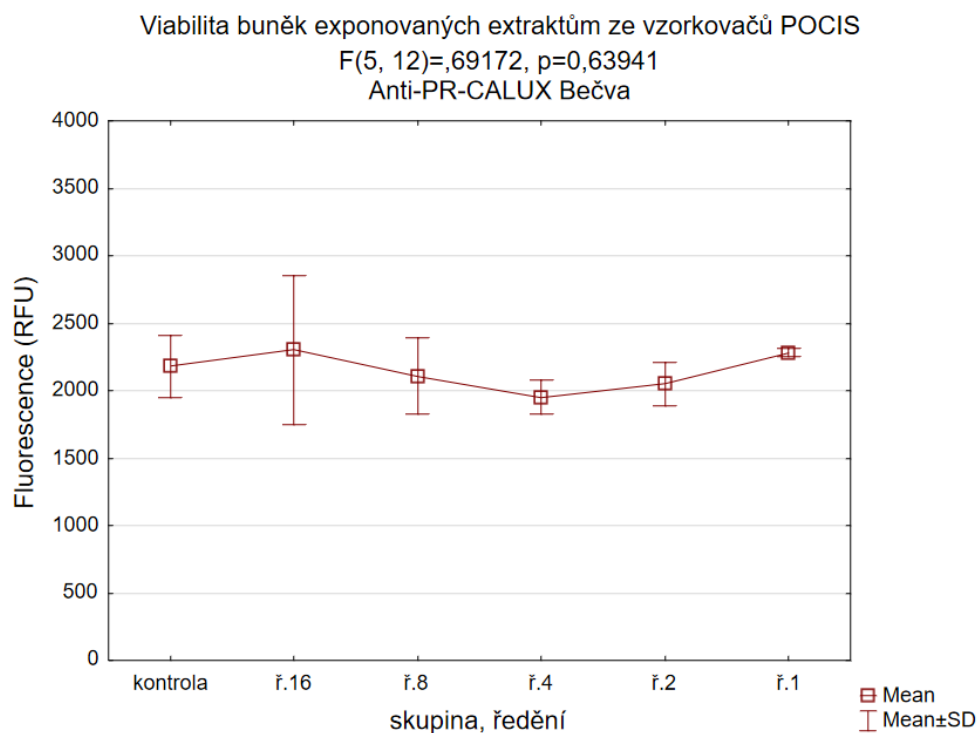
Graf P2-15: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Svratka



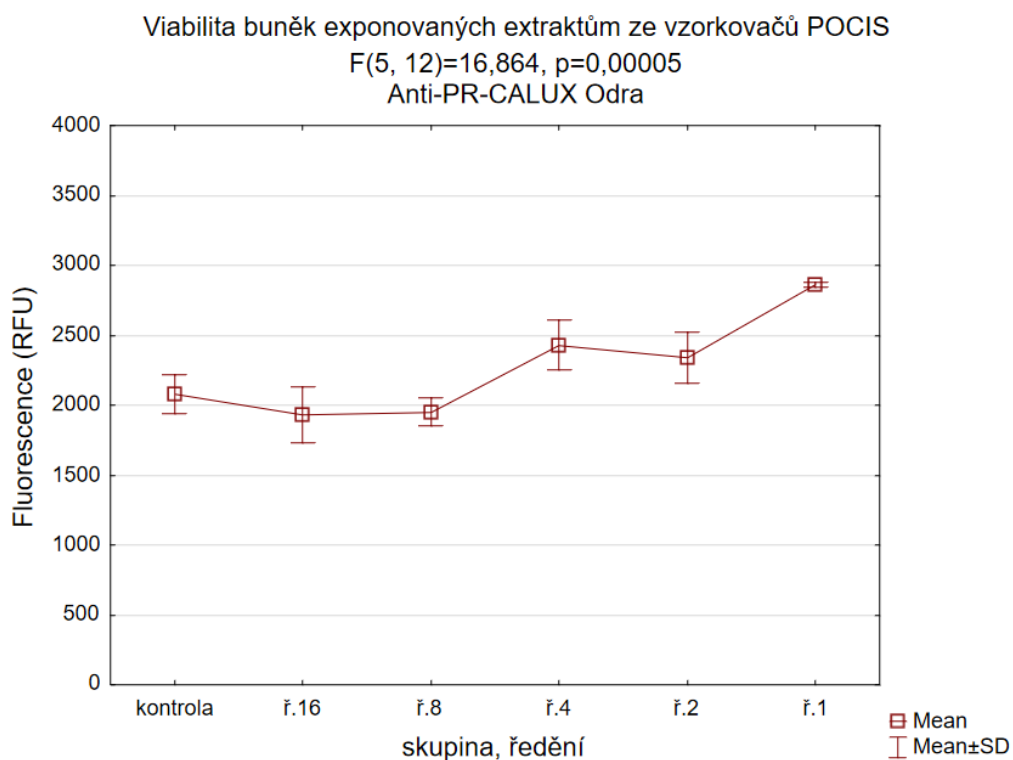
Graf P2-16: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Dyje



Graf P2-17: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Morava

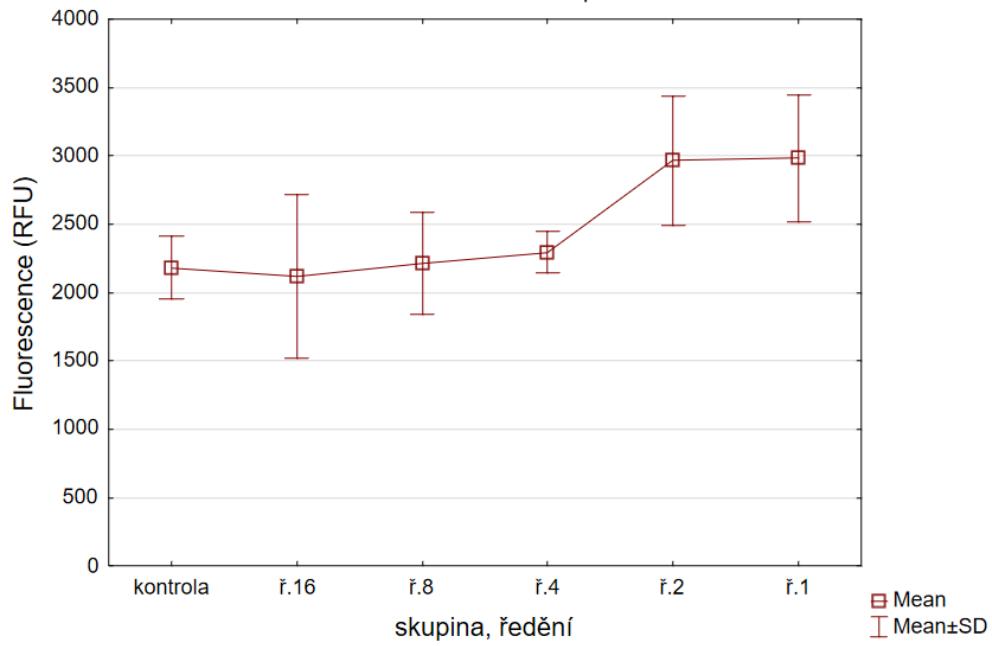


Graf P2-18: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Bečva



Graf P2-19: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Odra

Viabilita buněk exponovaných extraktům ze vzorkovačů POCIS
F(5, 12)=2,8857, p=0,06153
Anti-PR-CALUX Opava



Graf P2-20: Viabilita buněk exponovaných extraktům z lokality Opava

9 Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo zmapovat výskyt látek s (anti-)progestagenní aktivitou v povrchových vodách České republiky. Vzorky byly odebrány pomocí POCIS vzorkovačů na 21 lokalitách a jednalo se o tzv. uzávěrové profily (konec povodí) nebo významná vzorkovací místa podél profilu řeky Labe. Vzorky byly převezeny do laboratoře, kde byly extrahovány. Pro detekci (anti-)progestagenní aktivity byl použit (Anti-)PR-CALUX *in vitro* biotest. Nejprve byly buňky nasazeny na mikrotitrační destičku a po 24 hodinové inkubaci byly vystaveny kalibrační řadě referenční látky ORG 2058 pro detekci progestagenní aktivity nebo referenční látce mifepristonu pro testování anti-progestagenní aktivity a řadě ředěných extraktů povrchových vod. Po 24 hodinové expozici byla měřena luminiscence buněk v relativních světelných jednotkách. Výsledná hormonální aktivita byla vyjádřena v $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekvivalentu referenční látky (ORG 2058 či mifepristonu).

Progestagenní aktivita byla ve vzorcích z roku 2017 na všech 21 lokalitách pod limitem kvantifikace ($<6\text{-}11 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekvivalentů ORG 2058). Anti-progestagenní aktivita byla detekována na 6 lokalitách, a to v rozsahu od 12 do 33 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu. Pro srovnání byly analyzovány 3 vzorky z roku 2016. Anti-progestagenní aktivita byla detekována v rozsahu od 14 do 48 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ekv. mifepristonu. Progestagenní aktivita byla na všech 3 lokalitách pod limitem kvantifikace. Výskyt anti-progestagenní aktivity byl prokázán převážně na lokalitách, kde se v okolí nachází podniky chemického průmyslu. Sídli zde společnosti, které při výrobě svých produktů mohou používat některé látky vykazující anti-progestagenní aktivitu jako jsou například polycyklické mošusové sloučeniny, bromované zpomalovače hoření či bisfenoly. Výskyt anti-progestagenní aktivity na těchto lokalitách by mohl indikovat nedostatečnou schopnost průmyslových čistíren odpadních vod odbourat látky vykazující anti-progestagenní aktivitu.

Výskyt anti-progestagenní aktivity v povrchových vodách by mohl mít negativní dopad na vodní organismy, zejména obratlovce. Expozice těchto organismů látkám s anti-progestagenní aktivitou by mohla vést ke snížení plodnosti a poruchám vývoje pohlavních orgánů.

Klíčová slova: anti-progestagenní aktivita, *in vitro* testy, POCIS, povrchové vody, progestagenní aktivita, progesteron

10 Abstract

The aim of the bachelor thesis was to map the occurrence of substances with (anti-) progestagenic activity in surface waters of the Czech Republic. Samples were taken at 21 localities using POCIS samplers. Localities included the so-called closure profiles (end of the river basin) and significant sampling points along the profile of the river Elbe. The samples were transported to the laboratory, where they were extracted. (Anti-)PR-CALUX *in vitro* bioassay was used to detect (anti-)progestagenic activity. First, the cells were plated on a microtiter plate and, after 24 hours of incubation, exposed to a calibration series of the reference substance ORG 2058 for progestagenic activity or the reference substance mifepristone for anti-progestagenic activity and a series of diluted surface water extracts. After 24 hours of exposure, cell luminescence was measured in relative light units. The resulting hormonal activity was expressed in $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ equivalents of the reference substance (ORG 2058 or mifepristone).

Progestagenic activity was below the limit of quantification in the samples from all 21 sampling sites ($<6\text{-}11 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ORG 2058 equivalents) sampled in the year 2017. Anti-progestagenic activity was detected at 6 localities, ranging from 12 to $33 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ mifepristone equivalents. For comparison, 3 samples from the year 2016 were analysed. Anti-progestagenic activity was detected in the range from 14 to $48 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ mifepristone equivalents. Progestagenic activity was below the limit of quantification at all 3 localities. The occurrence of anti-progestagenic activity was detected mainly at localities where the chemical industry is in the vicinity. There are companies that can use certain substances with anti-progestagenic activity in the production of their products, such as polycyclic musk compounds, brominated flame retardants or bisphenols. The occurrence of anti-progestagenic activity in these localities could indicate the insufficient ability of industrial wastewater treatment plants to degrade substances exhibiting anti-progestagenic activity.

The occurrence of anti-progestagenic activity in surface waters may have a negative impact on aquatic organisms, especially vertebrates. Exposure of these organisms to substances with anti-progestagenic activity could lead to reduced fertility and impaired gonad development.

Key words: anti-progestagenic activity, *in vitro* tests, POCIS, surface water, progestagenic activity, progesterone