

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Výskyt (anti-)thyroidní aktivity ve vodním prostředí České republiky

Autor: Tereza Směšná

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

Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.

Studijní program a obor: B1601 Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3. ročník

České Budějovice, 2021

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím literatury a zdrojů 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

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Ing. Pavlu Šauerovi, Ph.D. a konzultantce doc. Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a nejvíce za věnovaný čas při zpracování mé 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: Tereza SMĚŠNÁ
Osobní číslo: V18B032P
Studijní program: B1601 Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Ochrana vod
Téma práce: Výskyt (anti-)thyroidní aktivity ve vodním prostředí České republiky
Zadávající katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Zásady pro vypracování

Komplexní směsi mikropolutantů jsou nepřetržitě vypouštěny člověkem do vodního prostředí. Některé z těchto látek mohou narušovat endokrinní systém exponovaných živočichů. Jednou z fyziologických signálních drah, která může být narušena vnějšími faktory, je osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT). Některé polutanty prostředí mohou být v kompetici s přírodními thyroïdními hormony o vazebná místa na thyroïdních receptorech, přes které je signálování HPT osy zprostředkováváno, a tudíž vykazovat tzv. thyroïdní nebo anti-thyroidní aktivitu. Nicméně, výskyt (anti-)thyroïdních aktivit byl monitorován ve vodním prostředí ve světě pouze zřídka a na území České republiky ještě nikdy.

Cílem bakalářské práce bude provést první monitoring výskytu (anti-)thyroïdních aktivit in vitro v extraktech z pasivních vzorkovačů z povrchové vody na území České republiky a identifikovat rizikové lokality výskytu těchto aktivit.

Metodický postup: Pasivní vzorkovače POCIS byly umístěny v povrchových vodách na 21 lokalitách v České republice po dobu 3 týdnů. Extrakty z pasivních vzorkovačů budou testovány pomocí (anti-)TR – CALUX in vitro biotestů pro detekci (anti-)thyroïdní aktivity. Jako referenční látka pro thyroïdní aktivitu bude použit přírodní hormon trijodthyronin, referenční látka pro anti-thyroidní aktivitu bude mykotoxin deoxynivalenol. Extrakty budou simultánně otestovány na cytotoxicitu pomocí testu redukce resazurinu, aby byl vyloučen toxický vliv extraktů na životnost buněk, které budou použity v in vitro testech. V případě detekce přítomnosti (anti-)thyroïdních aktivit v povrchových vodách bude podle dostupných informací o sledovaných lokalitách zjišťován potenciální zdroj znečištění. Výskyt (anti-)thyroïdních aktivit ve vodním prostředí České republiky bude porovnán s publikovanými informacemi o jejich výskytu v jiných zemích.

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

Seznam doporučené literatury:

- Collet, B., Simon, E., van der Linden, S., el Abdellaoui, N., Naderman, M., Man, H.-Y., et al. 2019. Evaluation of a panel of in vitro methods for assessing thyroid receptor ? and transthyretin transporter disrupting activities. *Reproductive Toxicology* (In Press)
- Escher, B. I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P. A., Balaguer, P., Busch, W., et al. 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays. *Environmental Science & Technology* 48, 1940-1956.
- Hu, X., Shi, W., Zhang, F., Cao, F., Hu, G., Hao, Y., et al. 2013. In vitro assessment of thyroid hormone disrupting activities in drinking water sources along the Yangtze River. *Environmental Pollution* 173, 210-215.
- Jugan, M. L., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J. P., et al. 2009. In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment* 407,

3579-3587. Leusch, F. D., Aneck-Hahn, N. H., Cavanagh, J. A. E., Du Pasquier, D., Hamers, T., Hebert, A., et al. 2018. Comparison of in vitro and in vivo bioassays to measure thyroid hormone disrupting activity in water extracts. *Chemosphere* 191, 868-875.

Li, J., Ma, M., Wang, Z., 2008. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on thyroid hormone-mediated gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 159-167.

Murata, T., Yamauchi, K., 2008. 3, 3',5-Triiodo-L-thyronine-like activity in effluents from domestic sewage treatment plants detected by in vitro and in vivo bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 226, 309-317.

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, 5421-5426.

Shi, W., Wang, X., Hu, W., Sun, H., Shen, O., Liu, H., et al. 2009. Endocrine-disrupting equivalents in industrial effluents discharged into Yangtze River. *Ecotoxicology* 18, 685-692.


Sun, H., Shen, O. X., Xu, X. L., Song, L., Wang, X. R., 2008. Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology* 249, 238-242.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Šauer, Ph.D.**

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

Datum zadání bakalářské práce: **4. února 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2021**



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.



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

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	Štítná žláza.....	9
2.1.1	Hormony štítné žlázy	10
2.1.2	Osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza	12
2.1.3	Thyroidní receptory.....	13
2.1.4	Onemocnění štítné žlázy	14
2.1.5	Syntetické hormony pro léčbu onemocnění štítné žlázy	15
2.2	<i>In vitro</i> testy	15
2.3	<i>In vitro</i> testy pro detekci (anti-)thyroidní aktivity	17
2.3.1	CALUX (Chemically Activated LUciferase gene eXpression).....	17
2.3.2	(Anti-)TR β -CALUX	18
2.4	Pasivní vzorkování	19
2.4.1	POCIS (z angl. polar organic chemical integrative sampler)	20
3	Materiál a metodika.....	21
3.1	Chemikálie.....	21
3.2	Odběr vzorků	21
3.2.1	Odběr vzorků Česká republika	21
3.2.2	Odběr vzorků z povrchových vod ve státě Texas (USA).....	23
3.3	Extrakce odebraných vzorků	25
3.4	Pasážování (subkultivace) buněčných kultur.....	25
3.5	<i>In vitro</i> testy	27
3.5.1	(Anti-)TR β -CALUX <i>in vitro</i> biotesty	27
3.6	Nasazování buněk na 96-jamkovou mikrotitrační destičku	28
3.7	Měření (anti-)thyroidních aktivit	29
3.8	Testování cytotoxicity	32

3.9	Analýza dat	34
3.9.1	Vyhodnocování dat pro detekci hormonální aktivity.....	34
3.9.2	Vyhodnocení výsledků testu cytotoxicity	35
4	Výsledky.....	36
4.1	<i>In vitro</i> CALUX biotesty.....	36
4.1.1	(Anti-)thyroidní aktivita v České republice.....	37
4.1.2	(Anti-)thyroidní aktivita v povrchových vodách státu Texas (USA).40	
4.2	<i>In vitro</i> test redukce resazurinu.....	40
4.2.1	Česká republika.....	40
4.2.2	Texas	42
5	Diskuze	44
6	Závěr.....	51
7	Přehled použité literatury.....	52
8	Abstrakt	59
9	Abstract.....	60

1 Úvod

Lidé produkují a využívají velké množství chemických látek, které se pak dostávají do vodního prostředí. Některé z těchto polutantů vodního prostředí mohou negativně narušovat vývoj a funkce endokrinního systému, a proto se řadí do kategorie tzv. endokrinních disruptorů. Přítomnost endokrinních disruptorů ve vodním prostředí představuje velké riziko pro vodní organismy.

Jednou z fyziologických signálních drah, která může být narušena vnějšími faktory, je osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT). Některé polutanty prostředí mohou být v kompetici s přírodními thyroïdními hormony o vazebná místa na thyroïdních receptorech, přes které je signalizování HPT osy zprostředkováno, a tudíž vykazovat tzv. thyroïdní nebo anti-thyroïdní aktivitu.

Hormony štítné žlázy mají důležitou funkci během nitroděložního vývoje a krátce po narození působí zvláště na vývoj mozku. Jejich funkce je důležitá i pro metabolismus, protože regulují přeměnu látek a spotřebu kyslíku ve většině tkání a účastní se mnoha dalších procesů.

Cílem této práce bylo provedení prvního monitoringu výskytu (anti-)thyroïdních aktivit *in vitro* v extraktech z pasivních vzorkovačů z povrchové vody na území České republiky a identifikování rizikových lokalit výskytu (anti-)thyroïdních aktivit.

Pro detekci (anti-)thyroïdních aktivit na 21 lokalitách po celé České republice byl použit *in vitro* biotest (anti-)TR β -CALUX.

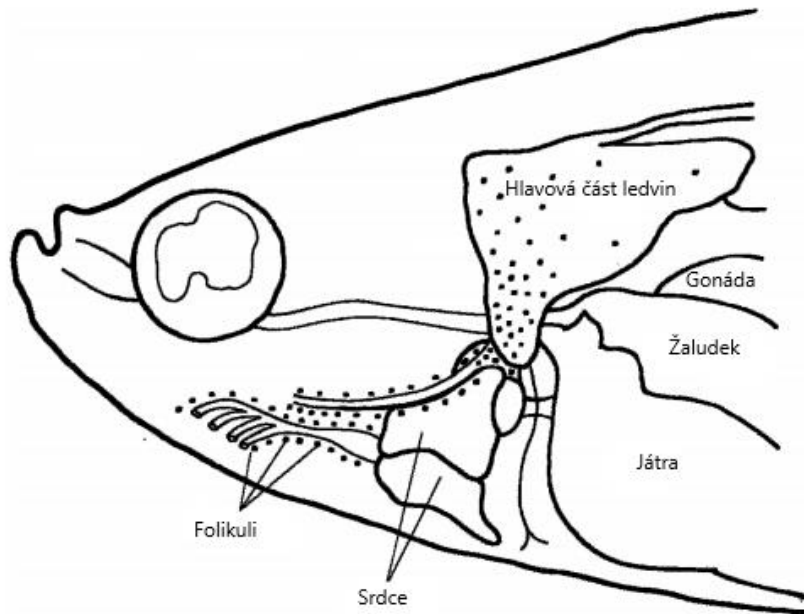
2 Literární přehled

2.1 Štítná žláza

Štítná žláza (*glandula thyreoidea*) se řadí k nejvýznamnějším žlázám s vnitřní sekrecí. Štítná žláza je závislá na přísunu jódu potravou nebo vodou. Jód je z krve aktivně vychytáván jodidovou pumpou jako anorganická sůl (jodid draselný nebo jodid sodný) (Trojan a kol., 2003).

Štítná žláza je uložena v oblasti hrtanu. Její tvar je podkovitý a člení se na dva laloky, které jsou spojené na dolním okraji můstkem. Obsahuje dva páry příštítných tělísek, které jsou umístěné na zadní straně. Úkolem těchto tělísek je regulovat hladinu vápníku v těle (Vávrová, 2012). Štítná žláza může mít různou velikost, která je závislá na řadě faktorů (rasa, věk, zásobení organismu jódem a selenem a jiné) (Jiskra, 2011). Hmotnost štítné žlázy u dospělého člověka je přibližně 15-20 g. Skládá se z folikulů, které mají stěnu tvořenou folikulárními buňkami (tyreocyty). Folikuly jsou vyplněny tekutinou neboli koloidem (Trojan a kol., 2003).

Štítná žláza ryb je rozdílná od lidské především v tom, že může mít folikuly štítné žlázy v jiných orgánech, než je oblast hrtanu. Folikuly jsou u většiny kostnatých ryb (*Teleostei*) rozptýleny v hlavové části (v okolí hrtanu), ale mnoho druhů ryb z tohoto nadřádu má folikuly štítné žlázy rozptýlené i v tělové části, konkrétně v ledvinách, gonádách a játrech (Norris, 2007; Geven a kol., 2007). Tyto folikuly v hlavové a tělové části spolu komunikují, ale u některých druhů ryb (například kapr obecný) jsou folikuly štítné žlázy aktivní pouze v určité tkáni, například v ledvinách (Geven a kol., 2007). Na Obr. č. 1 je názorná ukázka rozptýlené struktury štítné žlázy u ryb. Štítná žláza řídí metabolismus pomocí hormonů (2.1.1), které sama produkuje.



Obr. č. 1 Rozptýlená struktura štítné žlázy u ryb (Norris, 2007)

2.1.1 Hormony štítné žlázy

Mezi hormony štítné žlázy patří tyroxin (tetrajodthyronin) a jeho bioaktivní forma trijodthyronin (Obr. č. 2). Tyto hormony řídí energetickou homeostázu navyšováním bazálního metabolismu působením na syntézu proteinů a metabolismus sacharidů (Shiizaki a kol., 2010). Dále jsou důležité pro duševní stav a pro mnoho fyziologických procesů jako remodelace kostí a srdeční funkce (Brent, 2012). Hormony štítné žlázy jsou důležité pro vývoj člověka hned po narození, protože působí mimo jiné na vývoj mozku (Trojan a kol., 2003).

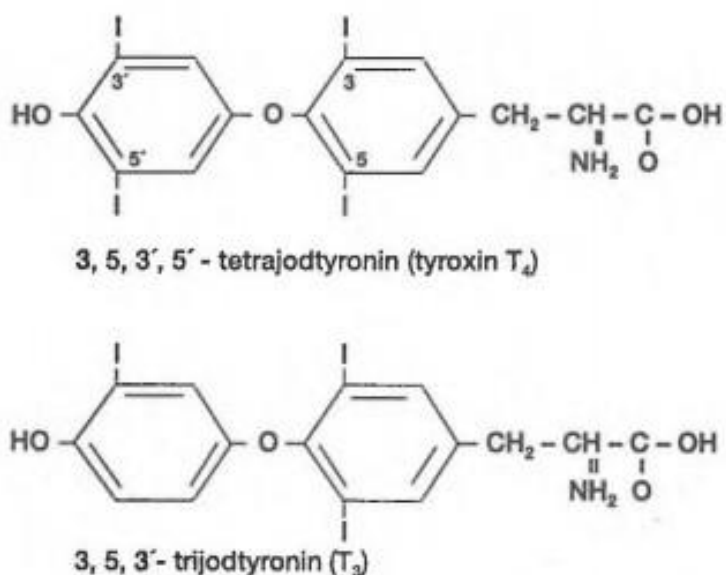
Hormony štítné žlázy a jejich metabolity jako jediné v těle obsahují jód (Hulbert, 2000). Tvorba tyroxinu a trijodthyroninu je závislá na přísunu jódu potravou nebo vodou (Trojan a kol., 2003).

Tyroxin je hlavní hormon produkovaný štítnou žlázou. Štítná žláza denně vyprodukuje zhruba 80 µg tyroxinu (Springer, 2010). Tyroxin stimuluje metabolické procesy včetně oxidací, tím zvyšuje nároky na energetický substrát. Další jeho vlastností je, že zesiluje účinek adrenalinu (Trojan a kol., 2003). Po vstupu do krevního oběhu se naváže na transportní proteiny, kterými jsou: albumin, globulin a transthyretin známý

také jako prealbumin. Následně je tyroxin těmito proteiny transportován do cílových buněk po celém těle (Trojan a kol., 2003; Collet a kol., 2019; Pappa a kol., 2015). Ve tkáních se přeměňuje za pomoci enzymu monodejodáza na účinnější trijodthyronin. V případě, že je trijodthyroninu dostatečné množství, tak se tyroxin přeměňuje na reverzní trijodthyronin, který je méně biologicky účinný (Trojan a kol., 2003).

Trijodthyronin je aktivní intracelulární hormon, který se s vysokou afinitou váže na thyroideální receptory. Receptory pro trijodthyronin váží hormon v jádře, mohou vázat i tyroxin, ale s nižší afinitou (Ganong, 2005). Afinita trijodthyroninu k thyroideálním receptorům je deseti až dvacetinásobně vyšší než u tyroxinu (DeVito a kol., 1999; Shiizaki a kol., 2010). Trijodthyronin vzniká z tyroxinu po odštěpení jedné molekuly jódu. K odštěpení dochází pomocí enzymů, které se nazývají dejodázy. Pro funkci dejodáz je nutný přísun selenu, který se do těla dostává potravou (zdrojem selenu je maso, vnitřnosti, mořské ryby, ořechy a česnek). V lidském těle se trijodthyroninu denně vytvoří přibližně 20 µg (Springer, 2010; Jiskra, 2011).

Tyroxin a trijodthyronin jsou v krvi vázané na bílkovinách. Ve volné formě se vyskytují v desetinách procent (0,4 % tyroxin a 0,4 % trijodthyronin). V této formě jsou fyziologicky účinné. Hladina hormonů štítné žlázy se v krvi pohybuje kolem 1,8 nmol × l⁻¹ trijodthyroninu a 100 nmol × l⁻¹ tyroxinu (Trojan a kol., 2003).



Obr. č. 2 Struktura tyroxinu a trijodthyroninu (Trojan a kol., 2003)

Základním kamenem pro tvorbu hormonů štítné žlázy je dostatečný přísun jódu do tyreocytů. Do těla jód přichází potravou a vodou ve formě jodidu. Jodid se ve střevě redukuje na jodidový ion a z převážné části (přibližně 90 %) je vstřebán v tenkém střevě. Množství přijatého jódu pro správnou funkci štítné žlázy u dospělého člověka by mělo být alespoň kolem 150-200 μg na den (Lüllmann, 2004; Zamrazil a Čeřovská, 2014). Celková koncentrace jódu v krvi je přibližně 40-80 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. V případě že je příjem jódu vyrovnaný, tak je ho asi 90 % vyloučeno močí. Stolicí se vyloučí přibližně 10-30 μg za den. Potem se ho může za normálních podmínek vyloučit až 40 μg za den (Zamrazil a Čeřovská, 2014).

Nástup účinku hormonů štítné žlázy je v řádu hodin až dnů. Jejich účinek pak přetrvává dny až týdny. Doba vylučování hormonů štítné žlázy závisí na rychlosti odbourávání enzymy, které jsou přítomny v krvi a na rychlosti degradace komplexu hormon-receptor v buňce (Trojan a kol., 2003).

Odhaduje se, že metabolismus pracuje přibližně s 90 g tyroxinu za den, ze kterých se 80 % přemění na trijodthyronin a zbylých 20 % se žlučí převážně přemění na konjugát a vyloučí z těla (Talwar a Srivastava, 2006). Ve stolici zdravého člověka se nalézají koncentrace konjugovaného tyroxinu $1,03 \pm 0,64 \text{ nmol} \times \text{g}^{-1}$, zatímco množství nekonjugovaného tyroxinu vyloučeného močí je přibližně 1,41 μg za den a trijodthyroninu je to přibližně 0,63 μg za den (Faber a kol., 1981). Hormony štítné žlázy jsou lidmi vylučovány do kanalizačních sítí a následně se dostávají na čistírny odpadních vod. Předpokládá se, že se mohou přes čistírny odpadních vod dostat až do povrchových vod.

2.1.2 Osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza

Osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza (HPT) je nepostradatelná zpětnovazebná a regulační osa v lidském těle. Důvodem je nezbytná tvorba hormonů štítné žlázy (tyroxin a trijodthyronin). Pro správnou funkci a růst těla je velmi důležité udržovat stálou hladinu hormonů štítné žlázy (Trojan a kol., 2003).

První složkou HPT osy je hypothalamus, který je součástí mezimozku a je tvořen velkým množstvím jader, která jsou vzájemně propojena mezi sebou a okolním nervovým systémem. V hypothalamu se vytváří hormon tyreoliberin, což je hormon, jehož úkolem je zvyšovat hladinu hormonů v hypofýze (Boučková, 2012). Tyreoliberin se vlivem vnějších podnětů (jako jsou například teplota a stres) uvolňuje z hypothalamu a dostává

do hypofýzy. Hypothalamus je s hypofýzou spojen tzv. portálními hypofyzárními cévami. Hypofýza (*glandula pituitaria*) je rozdělena na dvě části, které jsou spolu propojeny. První částí je přední lalok zvaný adenohipofýza, který produkuje tropní hormony. Druhou částí je zadní lalok hypofýzy zvaný neurohipofýza (Trojan a kol., 2003). V adenohipofýze tyreoliberin působí na tzv. tyreotropní buňky a vyvolá uvolňování tyreotropinu, který poté působí na buňky štítné žlázy (Ortiga-Carvalho a kol., 2014; Roelfsema a kol., 2017). Sekrece tyreotropinu je částečně regulovaná inhibiční zpětnou vazbou, která je spuštěna poté co se v krvi zvýší hladina hormonů štítné žlázy (Ganong, 2005). Při inhibiční zpětné vazbě se v hypofýze vytvářejí hormony somatostatin a dopamin, které mají silný inhibiční účinek na vylučování tyreotropinu (Roelfsema a kol., 2017; Ortiga-Carvalho a kol., 2014).

Tyreotropin se skládá z α a β podjednotky, naváže se na buňky štítné žlázy a stimuluje je k tomu, aby prostřednictvím jodidové pumpy, která se nachází na buněčné membráně vychytávaly jód, který koluje v krvi. Jód pak slouží k tvorbě hormonů štítné žlázy, tyroxinu a trijodthyroninu (Dohan a kol., 2003; Chiamolera a Wondisford, 2009; Springer, 2010).

2.1.3 Thyroidní receptory

Receptory hormonů štítné žlázy patří mezi jaderné receptory, které po navázání trijodthyroninu spouštějí genovou expresi. Jsou schopné vázat jak thyroidní hormony, tak i sekvence DNA v promotorové oblasti cílových genů, kde mohou působit vzájemně s represory a koaktivátory (Yen a kol., 2006; Latham a kol., 1976). Receptory hormonů štítné žlázy bez ligandu migrují mezi cytosolem a jádrem (Maruvada a kol., 2003) poté co se naváže ligand na receptor, tak tento komplex putuje do jádra (Cao a kol., 2009). V mitochondriích hormony štítné žlázy stimulují energetický metabolismus (Trojan a kol., 2003).

Thyroidní receptory jsou kódovány geny TR α a TR β . Jednotlivé receptory se liší afinitou k trijodthyroninu a expresí v různých tkáních. Expresie zmíněných genů vede ve výsledku ke vzniku pěti izoforem thyroidních receptorů (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3) (Janosek a kol., 2006; Trojan a kol., 2003). Hlavními receptory jsou TR α 1, TR β 1 a TR β 2, které váží hormon trijodthyronin s vysokou afinitou a zprostředkovávají transkripci, která je regulovaná hormony štítné žlázy (Yen a kol., 2006).

Přes receptor TR α 1 je řízen vývoj mozku po narození, dále vývoj kostí, střev a funkce srdce. Receptor TR α 2 se od ostatních receptorů liší tím, že neváže trijodthyronin a celkově jeho funkce v organismu není jasná. TR β 1 kontroluje metabolismus jater, vývoj vnitřního ucha a sítnice (Jugan a kol., 2007; Ganong, 2005). Receptor TR β 2 se vyskytuje pouze v mozku, na rozdíl od ostatních receptorů štítné žlázy, protože ty jsou široce distribuovány (Ganong, 2005). V roce 2014 bylo prokázáno, že pacienti, kteří mají rezistenci k beta receptoru, mají významně omezenou funkci osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza a tím i velice zvýšené hladiny hormonů štítné žlázy (Ortiga-Carvalho a kol., 2014).

2.1.4 Onemocnění štítné žlázy

Při nedostatku hormonů dochází k hypotyreóze a při nadbytku k hypertyreóze (Vávrová, 2012).

Hypertyreóza je stav, během kterého štítná žláza produkuje více hormonů než organismus potřebuje. Klinické příznaky se projevují například poklesem hmotnosti, nespavostí, neklidem, svalovou slabostí a dalšími obtížemi. Při tomto onemocnění dochází ke zvětšení štítné žlázy, které nazýváme struma (Zamrazil a Čeřovská, 2014).

Hypotyreóza se projevuje zánětem, který vede k poškození štítné žlázy s následným poklesem její funkce. Klinické příznaky jsou oproti hypertyreóze opačné. Projevují se například únavou, ospalostí, zimomřivostí. Dochází k otokům víček a jazyka (Zamrazil a Čeřovská, 2014). Léčba hypotyreózy spočívá v dodání chybějícího hormonu tyroxinu do organismu (Jiskra, 2011), čímž se štítná žláza vrací do původního stavu (Hennessey, 2003). Hypotyreóze a problémům, které způsobuje lze předcházet přijímáním jódu obsaženého díky jóduvání v kuchyňské soli (Singh a kol., 2019).

V České republice trpí hypotyreózou až 5 % populace a hypertyreózou kolem 0,2-1 % populace. Přítomnost onemocnění štítné žlázy se častěji vyskytuje u žen než u mužů (Jiskra, 2011). Onemocnění štítné žlázy je ve většině případů celoživotní záležitostí. Rozpoznání, o jaký druh onemocnění štítné žlázy se jedná, se určuje na základě etiologie a podle toho se provádí následná léčba (Límanová a kol., 2011).

Rakovina štítné žlázy patří celosvětově k nádorům, které mají nejrychleji rostoucí incidenci (Nováková a kol., 2015). V České republice je také zaznamenáno, že výskyt rakoviny štítné žlázy neustále roste. Uvádí se, že od roku 1980 do roku 2015 se výskyt

4krát zvýšil (Nováková a kol., 2015). V roce 2015 bylo diagnostikováno přibližně 1 143 nových případů rakoviny štítné žlázy (Vlček a kol., 2017). Mezi faktory, které mohou způsobovat rakovinu štítné žlázy se řadí vystavení ionizujícímu záření neboli radiaci, nedostatečný příjem jódu, život v sopečných oblastech, kouření, expozice xenobiotikům, infekce viry a mnoho dalších (Nováková a kol., 2015).

2.1.5 Syntetické hormony pro léčbu onemocnění štítné žlázy

Mezi synteticky vyráběné hormony používané k léčbě onemocnění štítné žlázy patří levothyroxin, který je náhradou přirozeného hormonu tyroxinu. Náhrada přirozeného trijodthyroninu je syntetický liothyronin (Marek a kol., 2010). Uměle vyráběné hormony se používají převážně při léčbě hypotyreózy, která se projevuje nedostatkem hormonů štítné žlázy. V České republice se používá syntetický levothyroxin ve formě sodné soli zejména v přípravcích zvaných Letrox a Euthyrox (Jiskra, 2011).

Na veřejně dostupných stránkách státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL; www.sukl.cz) se můžeme dozvědět, že dalšími léčivy, ve kterých je obsažen levothyroxin ve formě sodné soli jsou například: Eltroxin, Althyxin, Levosintsol, Levothyroxin Abdi, Levothyroxine Accord, Syntroxine, Jodthyrox. Přípravek Jodthyrox v sobě obsahuje levothyroxin sodný a s ním i další účinnou látku, kterou je jodid draselný. Přípravkem obsahující liothyronin sodný je Cynomel. Dostupnost Cynomelu na českém trhu je od roku 2017 neustále přerušována a znovu obnovována (SÚKL; www.sukl.cz).

2.2 *In vitro* testy

In vitro testy získaly svůj název z latiny, který v překladu znamená „ve skle“. Tyto testy jsou prováděny v laboratorních podmínkách v Petriho miskách, Erlenmeyerových baňkách, ve zkumavkách, mikrotitračních destičkách a dalších laboratorních nádobách vyrobených z různého materiálu (Bhanushali a kol., 2010).

Stále se hojně využívají testy *in vivo*, které jsou prováděny přímo na zvířatech, dochází k jejich utrpení a možné následné smrti. Snahou je tyto testy částečně nahrazovat, aby nedocházelo, k již zmíněnému utrpení a usmrcování zvířat. Jednou z možností mohou být testy *in vitro*, k těmto testům nejsou za potřebí celé organismy nýbrž pouze jejich

části, kterými mohou být např. buňky, orgány nebo tkáně (Linhart, 2012; Bhanushali a kol., 2010).

Zásady principů 3R navrhli v roce 1959 Russel a Burch. Principy 3R jsou široce přijímány jako nejlepší způsob k dosažení vysoce kvalitních vědeckých výsledků při současném zajištění nejvyššího etického standardu, kterým se rozumí regulace používání zvířat při vědeckých postupech (Kirk, 2018). Principy 3R zahrnují skupiny Reduction, Refinement a Replacement (Russel a Burch, 1959).

Princip Replacement má za cíl používání metod nahrazujících testování na zvířatech. Do této skupiny patří *in vitro* testy, které využívají tkáňové kultury, bílé krvinky, jaterní buňky, testy na nižších organismech (bakterie, prvoci, bičíkovci, řasy, červi, houby, kvasinky, hmyz, semena rostlin). Dalšími skupinami jsou Reduction (dochází ke snížení spotřeby laboratorních zvířat) a Refinement (dochází ke zjemnění, pracují na takovém principu, aby nedocházelo k utrpení zvířat) (Russel a Burch, 1959). Vzhledem k vysokému počtu využitých případně usmrcených zvířat je toto nahrazení vítanou možností. Počet usmrcených zvířat pro účely *in vivo* testů byl odhadnut na několik miliónů za rok (Bhanushali a kol., 2010).

V porovnání s *in vivo* testy jsou *in vitro* testy výhodné pro jejich nižší časovou náročnost, jednoduchou proveditelnost a vysokou reprodukovatelnost. Finanční náklady se zdají být relativně nízké vzhledem k velkému počtu vzorků, které je možné zanalyzovat (Pampaloni a kol., 2007). Nevýhodou *in vitro* testů je, že neposkytují informace o adsorpci, distribuci, metabolismu a exkreci cizorodých látek v organismu tak jako výsledky testů *in vivo*, které sice také neposkytují výše uvedené informace, ale může v nich dojít k zmetabolizování látky, která už výše zmíněné informace poskytnout může (Sonneveld a kol., 2006). Za pomoci těchto testů jsme schopni odhalit přítomnost všech látek ve vzorku se stejným mechanismem účinku (Hilscherova a kol., 2000).

Tyto metody slouží ke studiu toxikologických interakcí, získání lepšího pohledu na působení chemických látek na živý organismus na molekulární úrovni i na vyšších úrovních biologické komplexity (Linhart, 2012).

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

2.3.1 CALUX (Chemically Activated LUCiferase gene eXpression)

CALUX testy jsou druhem biotestů založených na expresi luciferázového genu, které jsou hojně využívány ve výzkumu pro charakterizaci biologické aktivity chemických látek v environmentálních vzorcích. Tyto testy jsou založeny na expresi reportérového genu v geneticky modifikovaných buňkách, které senzitivně a selektivně reagují na chemikálie aktivující určitý vložený receptor (Sonneveld a kol., 2005; Van der Linden a kol., 2008). *In vitro* biotesty nejsou schopny identifikovat jednotlivé sloučeniny způsobující odpověď. Díky nim jsme schopni pouze posoudit, zda sloučenina působí skrze použitý receptor (Gillesby a Zacharewski, 1998).

CALUX testy jsou rozděleny dle steroidních receptorů, které obsahují na: thyroidní (TR-CALUX), progesteronový (PR-CALUX), androgenní (AR-CALUX), estrogení (ER-CALUX), glukokortikoidní (GR-CALUX). Existuje řada dalších CALUX *in vitro* biotestů (BioDetection Systems, b.v.).

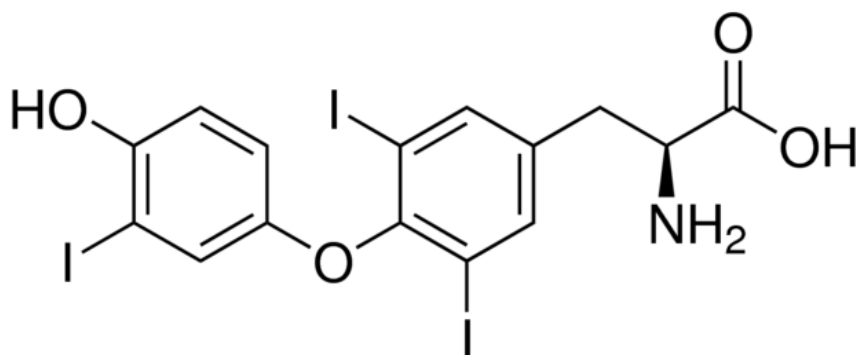
Pro tyto biotesty se používají lidské geneticky modifikované linie U2-OS. Jedná se o rakovinné buňky kostní dřeně. Výhodou těchto buněk je, že neobsahují pro tyto testy významné množství receptorů a je pro ně typický rychlý růst a snadná manipulace (Sonneveld a kol., 2011). Pro detekci hormonální aktivity je do buněk vložen vektor, který obsahuje sekvence komplementární DNA (cDNA) pro daný lidský hormonální receptor a pak také vektor nesoucí hormon responsivní elementy, které jsou spojené s genem, který kóduje luciferázu a TATA boxem (Sonneveld a kol., 2005). Hormony, popřípadě sloučeniny, které napodobují biologickou aktivitu hormonů vstupují do cytosolu cílových buněk a naváží se tam na receptory, které jsou v monomerní formě a po navázání ligandu na receptor se vytvoří aktivní dimerní formy. Následně dochází k přesunu komplexu ligand-receptor do jádra. V jádru dochází k interakci komplexu ligand-receptor a hormon responsivních elementů, čímž dojde ke spuštění genové exprese (výsledkem je produkce proteinů). V CALUX biotestech v agonistickém módu dochází k navázání ligandu (testované chemické látky nebo látky v extraktu environmentálního vzorku) na receptor. Hormon responsivní elementy jsou v CALUX testech specifické pro každý receptor (například thyroidní responsivní elementy). Ligandy vstupují do buněk a naváží se na receptor v cytosolu, pak tento komplex putuje do jádra, kde se naváže na

hormon responzivní elementy. Za normálních okolností jsou hormon responzivní elementy předřazené před geny kódující proteiny, které mají v buňce různé funkce. Po navázání komplexu receptor-ligand na tyto hormon responzivní elementy dochází pak ke spuštění exprese těchto genů, což v důsledku vede k produkci proteinů a následným účinkům v organismu. V těchto *in vitro* testech jsou však hormon responzivní elementy spojené s genem pro luciferázu, takže po nasednutí komplexu receptor-ligand dojde ke spuštění exprese genu pro luciferázu a následně k produkci enzymu luciferázy. Enzym luciferáza po přidání substrátu (D-luciferinu) produkuje luminiscenci, jejíž intenzita je měřena luminometrem. Kvantifikovaná luminiscence je ekvivalentní hormonální aktivitě ve zkoumaném vzorku (Schriks a kol., 2009).

2.3.2 (Anti-)TR β -CALUX

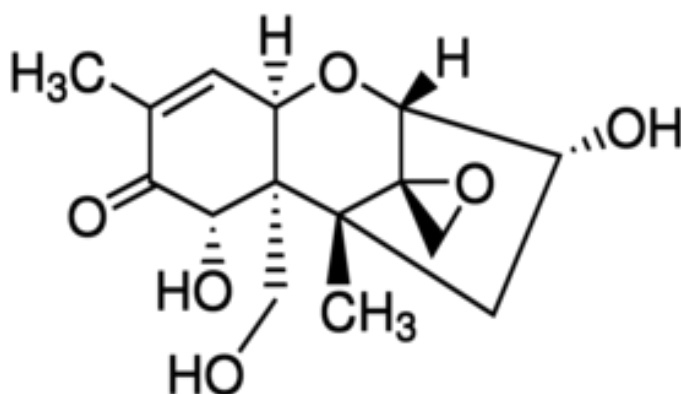
(Anti-)TR β -CALUX jsou biotesty s TR β -CALUX buňkami, které detekují aktivaci nebo blokaci receptoru štítné žlázy, tzn. mohou být použité v agonistickém (TR β -CALUX biotest) či antagonistickém módu (anti-TR β -CALUX). Rakovinné buňky U2-OS byly transfekovány plazmidem nesoucím TR β a také plazmidem s thyroidními responzivními elementy a genem kódujícím luciferázu (Collet a kol., 2019). Dále test probíhá stejným způsobem, jak je popsáno v kapitole výše (2.3.1). V těchto *in vitro* biotestech se používají referenční látky, které odpovídají daným aktivitám. Pro tyto testy byl použit trijodthyronin a deoxynivalenol (popsáno níže).

Trijodthyronin (Obr. č. 3) se používá jako referenční látka pro testování thyroidní aktivity. Trijodthyronin je přírodní hormon produkovaný štítnou žlázou. Bližší charakteristika v kapitole výše (2.1.1).



Obr. č. 3 Strukturální vzorec trijodthyroninu (od: www.sigmaaldrich.com)

Deoxynivalenol (Obr. č. 4) je antagonist a izoformy beta thyroidního receptoru (Demaegdt a kol., 2016) a používá se jako referenční látka pro testování anti-thyroidní aktivity (Collet a kol., 2019). Deoxynivalenol je jedním z vysoce toxických mykotoxinů, který je produkován některými druhy plísní rodu *Fusarium*, které často napadají obiloviny. Riziko působení na člověka je buď přímo prostřednictvím potravin rostlinného původu (obiloviny a produkty z nich připravené) nebo nepřímo konzumací potravin živočišného původu (ledviny, mléko, vejce, játra). Deoxynivalenol má negativní vliv na zdraví zvířat a lidí. Mezi klinické příznaky otravy deoxynivalenolem patří nevolnost, zvracení, bolesti břicha a hlavy, závratě a horečka. (Sobrova a kol., 2010). Deoxynivalenol je tepelně stabilní, čímž může při výskytu v potravinách způsobovat riziko pro zvířata i pro člověka, protože se nedá odstranit tepelnou úpravou (Hughes a kol., 1999).



Obr. č. 4 Strukturní vzorec deoxynivalenolu (od: www.sigmaaldrich.com)

2.4 Pasivní vzorkování

Pasivní vzorkování je metoda pro odběr vzorků, které se následně používají pro chemické analýzy. Metoda je to poměrně jednoduchá a levná z důvodu toho, že odběr vzorků ze vzorkovačů probíhá nepřetržitě bez potřeby jakéhokoliv zdroje energie na rozdíl od jiných metod vzorkování (odběr sedimentů, vodních organismů, a jiné). Používá se například pro monitoring kontaminantů vyskytujících se ve vodním prostředí (Grabic a kol., 2015; Vrana a kol., 2005).

Existuje velké množství různých typů pasivních vzorkovačů. Konstrukce vzorkovačů je spojená s fyzikálně-chemickými charakteristikami monitorovaných látek. Pro

vzorkování nepolárních látek se používají rozdělovací vzorkovače, jejichž základem jsou hydrofobní polymerní materiály s vysokou afinitou k nepolárním látkám. Pro vzorkování polárních látek se používají adsorpční pasivní vzorkovače, pro které je základem, že obsahují adsorbenty, které jsou běžně používané při extrakci na pevné fázi používané při stanovení hydrofilních látek obsažených ve vodě (Alvarez a kol., 2007). Mezi společné konstrukční charakteristiky patří: bariéra mezi vzorkovaným médiem a přijímací fází (Vrana a kol., 2005). Pasivní vzorkovače se dají rozdělit na: integrační vzorkovač polárních organických látek (POCIS), semipermeabilní membránové zařízení (SPMD) a zařízení založené na difúzním gradientu v tenkém filtru (DGT) (Alvarez a kol., 2004).

2.4.1 POCIS (z angl. polar organic chemical integrative sampler)

Jedná se o pasivní zařízení pro odběr vzorků *in situ* polární organický chemický integrativní vzorkovač (POCIS). Je to zařízení, které se skládá ze sorbentu, který je uzavřený v mikroporézní membráně pro integraci vzorkování polárních organických látek vyvinuté Alvarezem a kol. (2004). POCIS vzorkovače vzorkují zejména polární organické látky, tzn. látky, které jsou dobře rozpustné ve vodě. Jedná se například o pesticidy, léčiva, drogy a jejich metabolity.

Vzorkovač je složený ze dvou membrán, které jsou vyrobené z polyethersulfonového materiálu. Mezi membránami se nachází adsorpční materiál neboli sorbent, který je různého charakteru podle cílených látek (Fedorova a kol., 2014). POCIS vzorkovače jsou rozděleny na dva typy. Prvním typem jsou pesticidní POCISy a vzorkují se jimi pesticidy. Tyto vzorkovače mají třífázový sorbent. Druhým typem jsou farmaceutické POCISy jimiž se vzorkují léčiva. Tyto POCIS vzorkovače se vyznačují použitím sorbentu Oasis HLB – polymer s hydrofilně-lipofilní rovnováhou (Kočí a Grabic, 2008).

3 Materiál a metodika

3.1 Chemikálie

Byly použity následující chemikálie: lýžní směs (roztok rozvolňující buněčné membrány, díky němuž může být luminiscence vyzařována ven z buněk s větší intenzitou), referenční látka pro anti-thyroidní aktivitu – mykotoxin deoxynivalenol, illuminate mix (roztok mající v sobě D-luciferin, který se přidává do buněk za účelem, aby vyzařovaly luminiscenci) (vše od BioDetection Systems b. v., Amsterdam, Nizozemí), dimethylsulfoxid (DMSO), referenční látka pro thyroidní aktivitu – přírodní hormon trijodthyronin, penicilin-streptomycin, Dulbeccovo fosfátový pufovaný fyziologický roztok (PBS), kyselina octová (99,99%) (vše od Sigma-Aldrich), Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM), Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium obsahující fenolovou červeň (DMEM – používané jako růstové médium), trypsin, směs neesenciálních aminokyselin (vše od Life - Technologies), fetální bovinní sérum (od Biosera).

3.2 Odběr vzorků

3.2.1 Odběr vzorků Česká republika

Pro odběr vzorků v povrchových vodách byly použity pasivní vzorkovače typu POCIS (z ang. Polar organic chemical integrative samplers) pro léčiva. Odběr vzorků byl proveden v roce 2017 pracovníky Laboratoře environmentální chemie a biochemie Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Tyto vzorkovače byly umístěny v hloubce od 0,3 do 0,5 metru v povrchových vodách v České republice. Pro sledování bylo vybráno 21 lokalit v 17-ti řekách (Obr. č. 5). Sledované lokality byly vybrány tak, že se jednalo o všechny tzv. uzávěrové profily (neboli konce povodí) v České republice a další důležitá odběrová místa na řece Labi. Pro všechny lokality byly vyhledány možné zdroje znečištění (viz Tab. č. 1).

Pasivní vzorkovače byly v povrchových vodách umístěny po dobu 21 dní a vzorky byly poté uskladněny při stálé teplotě, která činila $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby extrakce a následných analýz.



Obr. č. 5 Mapa lokalit pro Českou republiku. (Zdroj: www.mapy.cz, upraveno v programu malování)

Tab. č. 1 Seznam lokalit s možnými zdroji znečištění (Zdroj: www.mapy.cz; Fedorova a kol., 2014)

Lokalita	Možné zdroje znečištění
Otava – Topělec	ČOV Písek; odpadní vody z jaderné elektrárny Temelín
Lužnice – Bechyně	ČOV Bechyně; malé zdroje komunálního znečištění
Sázava – Nespeky	Malé zdroje komunálního znečištění
Berounka – Srbsko	ČOV Beroun; malé zdroje komunálního znečištění
Vltava – Zelčín	město Praha; malé zdroje komunálního znečištění
Ohře – Terezín	Malé zdroje komunálního znečištění
Labe – Vestřev	Malé zdroje komunálního znečištění; KRPA PAPER – výroba nepromastitelných, silikonovaných a bariérových papírů
Labe – Valy	Chemický závod Synthesia Pardubice; ČOV Pardubice; Paramo – producent asfaltérských výrobků a mazacích a procesních olejů
Labe – Lysá nad Labem	ČOV Přerov nad Labem; ČOV Lysá nad Labem; chemická výroba; olejová rafinérie
Labe – Obříství	ČOV Mělník; ČOV Obříství; SPOLANA s.r.o. – výroba PVC; Czechiachem s.r.o – výroba farmaceutických látek

Tab. č. 1 – pokračování: Seznam lokalit s možnými zdroji znečištění (Zdroj: www.mapy.cz; Fedorova a kol., 2014)

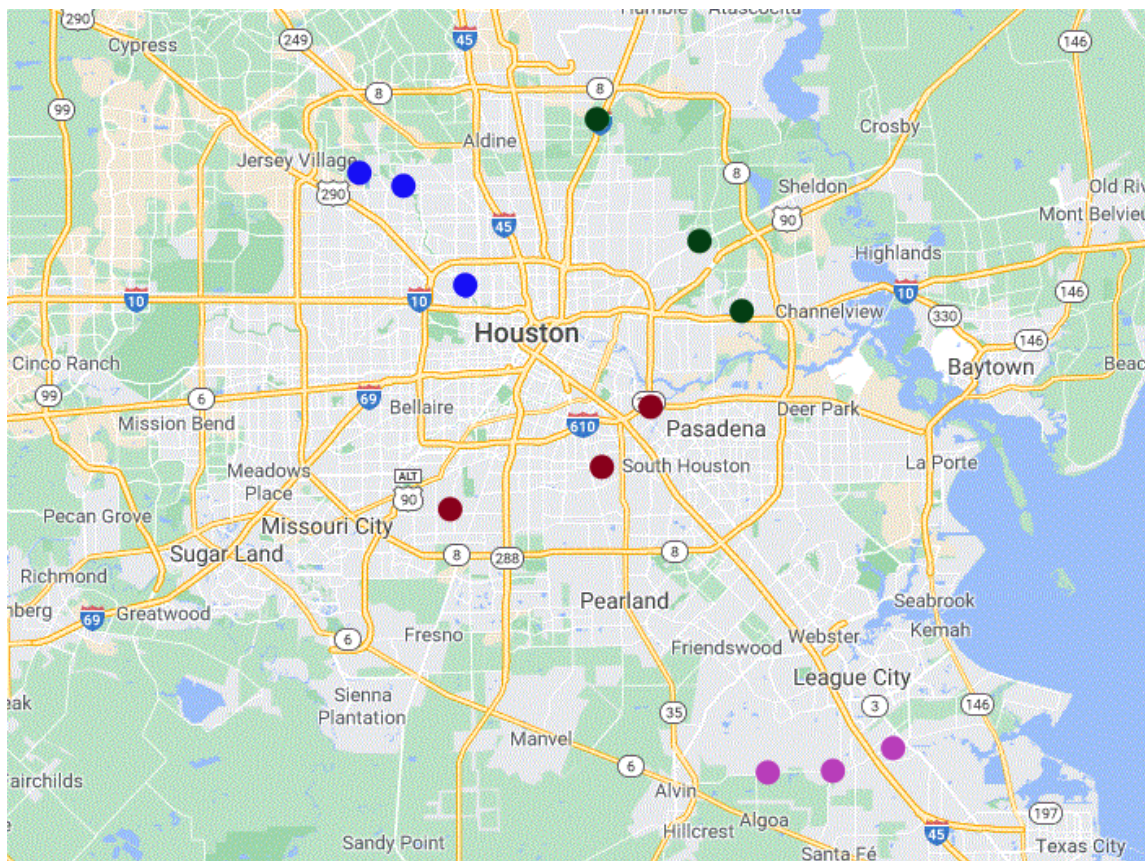
Lokalita	Možné zdroje znečištění
Labe – Schmilka	ČOV Děčín; ČOV Hřensko; ZINKPOWER Promptus s.r.o. – žárové zinkování, práškové lakování
Bílina – Ústí nad Labem	SPOLCHEMIE – chemická a hutní výroba; Chempark Záluží – Unipetrol RPA; odpadní vody z povrchové těžby hnědého uhlí; malé zdroje komunálního znečištění
Lužická Nisa – Hrádek nad Nisou	ČOV Hrádek nad Nisou; Severochema – výroba podpalovačů, čistících prostředků a ředidel
Jizera – Předměřice	ČOV Benátky nad Jizerou; ČOV Předměřice nad Jizerou
Svratka – Židlochovice	ČOV Židlochovice; malé zdroje komunálního znečištění
Odra – Bohumín	ČOV Ostrava; BorsodChem – výroba produktů organické chemie; odpadní vody z těžby černého uhlí
Opava – Děhylov	ČOV Hlučín; Moravskoslezské cukrovarny – odštěpný závod Opava
Bečva – Troubky	ČOV Přerov; PRECHEZA a.s. – titanová běloba, železité pigmenty, kyselina sírová a sádrovec (síran vápenatý)
Morava – Lanžhot	ČOV Lanžhot; tepelná elektrárna Hodonín
Dyje – Pohansko	ČOV Břeclav; FOSA a.s. – výroba detergentů, kyseliny fosforečné a fosforečnanů
Jihlava – Ivančice	ČOV Ivančice; malé zdroje komunálního znečištění

Zkratky: ČOV – čistírna odpadních vod

3.2.2 Odběr vzorků z povrchových vod ve státě Texas (USA)

Pro odběr vzorků z Texasu byly použity taktéž pasivní vzorkovače typu POCIS pro léčiva. Vzorkovače byly umístěny na čtyřech řekách: Sims Bayou, Dickenson Bayou, Greens Bayou a White Oak Bayou. Vzorkovače byly v řekách umístěny po dobu 11-ti dní. Odběr probíhal od 16.3.2018 do 27.3.2018.

V oblasti, ve které se řeky nacházejí došlo v době odběrů k povodním. Řeky Sims Bayou a Diskenson Bayou nebyly tolik postihnuty záplavami. Řeka Greens Bayou byla silně zasažena záplavami. Řeka White Oak Bayou byla silně zasažena povodněmi a bylo na ní přiváděno větší množství odpadní vody z odlehčení kanalizace. Odběrová místa byla po proudu od čistíren odpadních vod. Všechny testované řeky se nacházejí nedaleko nejlidnatějšího města Houstonu v Texasu, a tudíž je i toto velké město největším zdrojem znečištění. Dochází zde k průmyslovému znečištění z kovovýroby a chemické výroby. Dalším zdrojem znečištění je energetický průmysl (těžba ropy a zemního plynu). V období dešťů jsou do vodních toků vyplavovány chemikálie z ulic z celého města, protože jsou ve městě vybudovány odlehčení kanalizací, tak se splachy vyplavují přímo do toků (Houston Industries dostupné online). Pro odběr vzorků byly na každé řece vybrány tři lokality (viz Obr. č. 6).



Obr. č. 6 Mapa lokalit USA Texas (zdroj: Google maps, upraveno v malování) barevné odlišení: fialová – Dickenson Bayou, vínová – Sims Bayou, tmavě zelená – Greens Bayou, modrá – White Oak Bayou

3.3 Extrakce odebraných vzorků

Extrakce byla použita podle vzoru Fedorova a kol., 2014 a Alvarez a kol., 2004. Vzorky z POCIS vzorkovačů byly rozděleny a sorbent byl přenesen do gravitačních chromatografických kolon, které byly ucpané skleněnou vatou. Směs dichlormethanu, methanolu a toluenu byla použita pro izolaci při které došlo k oddělení analytu ze sorbentu. Extrakty byly rotačním odpařováním zkoncentrovány na přibližně 1 ml. Vzorek byl uchován při -20 °C až do doby analýz.

3.4 Pasážování (subkultivace) buněčných kultur

Procesem nazývaným kultivace buněk se rozumí množení buněčné kultury. V této práci bylo použito médium obohacené o fenolovou červeň. Buňky byly pravidelně kontrolovány pod mikroskopem. Byl sledován jejich růst, vzhled a procentuální pokrytí dna kultivační lahve buňkami. Kontrola se provádí pod mikroskopem (Olympus), čímž se vyloučí i potenciální kontaminace kultury.

Buňky potřebují více prostoru k růstu. Je nutné odstranit mrtvé buňky a ty živé přisedlé ke dnu kultivační lahve přenést, jakmile dosáhnou pokrytí 70-80 % dna kultivační lahve také do dalších kultivačních lahví a do čerstvého růstového média. Tento proces se nazývá pasážování. Pasážování probíhalo dvakrát týdně a bylo vždy prováděno ve sterilních podmínkách v laminárním kabinetu (flowboxu) (Obr. č. 7), jehož povrch byl pravidelně ošetřován 70%ním roztokem ethanolu a jednou týdně byl laminární kabinet vysvěcován vnitřní UV lampou.



Obr. č. 7 Laminární kabinet (flowbox) (foto: Tereza Směšná)

Pasážování bylo prováděno podle protokolu BioDetection Systems b.v. (Nizozemí). Po pasážování jsou buňky v kultivačních lahvích inkubovány v CO₂ inkubátoru při stálé teplotě, která činí 37 °C, s atmosférou 5 % CO₂ a se 100% ní vlhkostí (Sonneveld a kol., 2005).

Postup pasážování:

- 1) Z kultivační lahve bylo odstraněno všechno růstové médium (s indikátorem pH – fenolovou červení), cca 10 ml.
- 2) Buňky byly opláchnuty 2 × 5 ml PBS.
- 3) Pro rozvolnění peptidové vazby mezi buňkami a jejich uvolnění ode dna kultivační lahve bylo použito 2-3 ml trypsinu, který byl po přibližně 25 sec odstraněn.
- 4) Uzavřená láhev byla umístěna dnem vzhůru do inkubátoru po dobu 1-3 min. Po uplynutí této doby bylo zkontrolováno, zda se buňky uvolňují ode dna a oddělují od sebe.

- 5) Následně byly buňky spláchnuty 10 ml čerstvého růstového média. Tato buněčná suspenze byla zhomogenizována pipetováním.
- 6) Buněčná suspenze byla rozdělena do nových lahví a doplněna na objem 10 ml a navrácena do inkubátoru.

3.5 *In vitro* testy

3.5.1 (Anti-)TR β -CALUX *in vitro* biotesty

Za pomoci *in vitro* reportérových testů je možno změřit celkovou specifickou biologickou aktivitu všech látek, které jsou přítomné ve vzorku.

Pro detekci thyroidních a anti-thyroidních aktivit u extrahovaných vzorků z pasivních vzorkovačů typu POCIS byly použity *in vitro* biotesty TR β -CALUX a anti-TR β -CALUX.

CALUX je typ *in vitro* biotestů založených na expresi reportérového genu. Pro testování byly použity U2-OS buňky, což jsou rakovinotvorné buňky. Do těchto buněk byly vneseny dva plazmidy. První plazmid byl pro luciferázu a thyroidní responzivní elementy a druhý byl pro thyroidní receptor v izoformě beta. Tyto testy jsou používané pro jejich vysokou citlivost (tzn., že jsou schopné detekovat aktivity již v nízkých koncentracích) a pro jejich selektivitu (tzn., že mají schopnost selektivně odpovídat na ligandy receptoru, který byl vložen do buněk).

Biotesty trvají 3 dny. První den byly TR β -CALUX buňky nasazeny na mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Po 24 hodinách inkubace byly buňky exponovány po dobu 24 hodin kalibrační řadě referenční látky (trijodthyronin pro thyroidní aktivitu nebo deoxynivalenol pro anti-thyroidní aktivitu) a extraktům z pasivních vzorkovačů z povrchových vod v sérii ředění (Obr. č. 8). Následně byla provedena detekce luminiscence. Před začátkem detekce luminiscence byly buňkám rozvolněny buněčné membrány za pomoci lyzního mixu. Luminiscence byla měřena spektrofotometrem s luminiscenčním modulem. Do každé jamky na 96-jamkové destičce byl injikován illuminate mix.



Obr. č. 8 Exponování buněk kalibrační řadě referenčních látek a extraktům (foto: Tereza Směšná)

3.6 Nasazování buněk na 96-jamkovou mikrotitrační destičku

K nasazování buněk na mikrotitrační destičku bylo přistoupeno ve chvíli, kdy buňky pokrývaly dno kultivační lahve z 90-100 %.

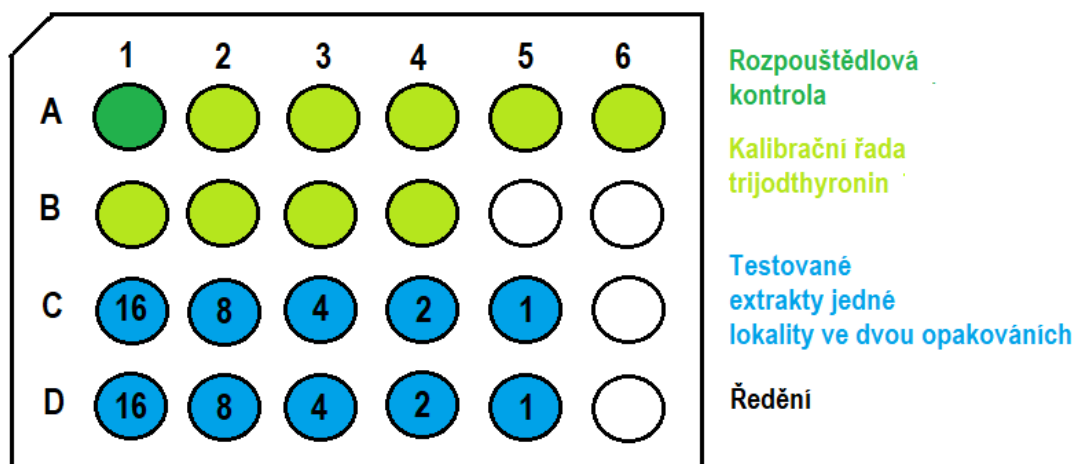
Postup pro nasazování buněk na 96-jamkovou mikrotitrační destičku (1. den *in vitro* testu):

- 1) Z kultivační láhve bylo odsáto všechno růstové médium.
- 2) Buňky byla opláchnuty 2×5 ml PBS.
- 3) Pro rozvolnění peptidové vazby mezi buňkami bylo použito 2-3 ml trypsinu, který byl po přibližně 25 sec odsát.
- 4) Uzavřená kultivační lahev byla dnem vzhůru vložena do inkubátoru na 1-3 min. Po uplynutí doby bylo zkontrolováno, zda se buňky pouštějí dna a oddělují od sebe.
- 5) Buňky byly spláchnuty 10 ml testového média bez fenolové červeně.

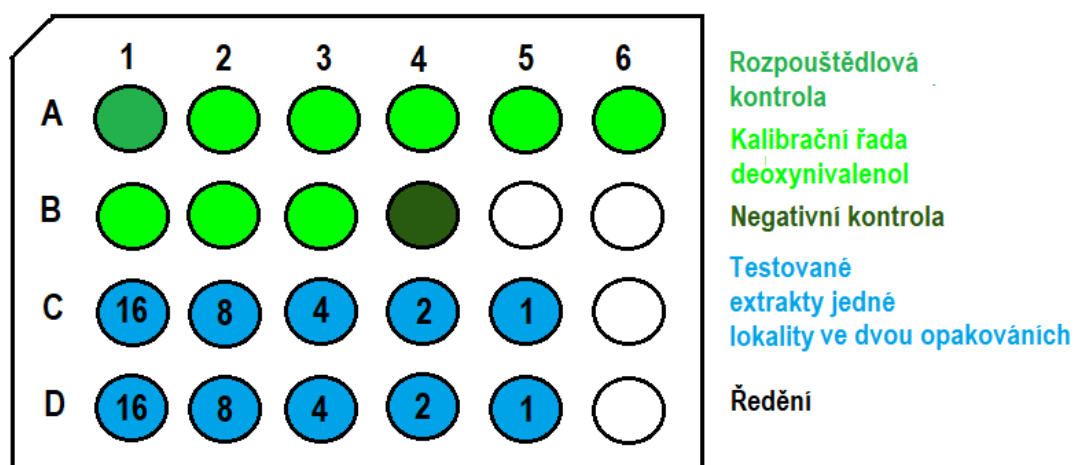
- 6) Buněčná suspenze byla následně zhomogenizována pipetováním a bylo přidáno 10 ml média.
- 7) Poté byla spočítána hustota buněk v Bürkerově komůrce.
- 8) Podle hustoty buněk byla část buněčné suspenze naředěna s testovacím médiem a tato směs pak byla použita k nasazování buněk na destičku a vždy obsahovala takový počet buněk, aby se dosáhlo v jamkách na destičce hustoty 10 000 buněk na jamku.
- 9) Do krajních jamek 96-jamkové destičky bylo přidáno 200 μ l PBS, aby se ve vnitřních jamkách destičky vytvořilo stejné teplotní prostředí a do ostatních (středových) jamek bylo přidáno po 100 μ l buněčné suspenze. Následně byly destičky vloženy do inkubátoru na 24 hodin.

3.7 Měření (anti-)thyroidních aktivit

1. Z připraveného neředěného extraktu z pasivních vzorkovačů POCIS z povrchových vod byla pro každou lokalitu připravena ředící řada v DMSO. Ředilo se lineárně 16 \times , 8 \times , 4 \times , 2 \times , 1 \times .
2. Na mikrotitrační destičku s 24 jamkami byl napipetován 1 ml média do každé jamky a následně byl do tohoto objemu napipetován 1 μ l následujících chemikálií/extraktů po sobě jdoucích: DMSO (jako rozpouštědlová kontrola), kalibrační řada pro thyroïdní aktivitu trijodthyronin a pro anti-thyroidní aktivitu deoxynivalenol (pro thyroïdní aktivitu bylo použito 9 kalibračních bodů a pro anti-thyroidní aktivitu 8 kalibračních bodů) poté testované extrakty povrchových vod v 5-ti ředících bodech (Obr. č. 9 a Obr. č. 10).

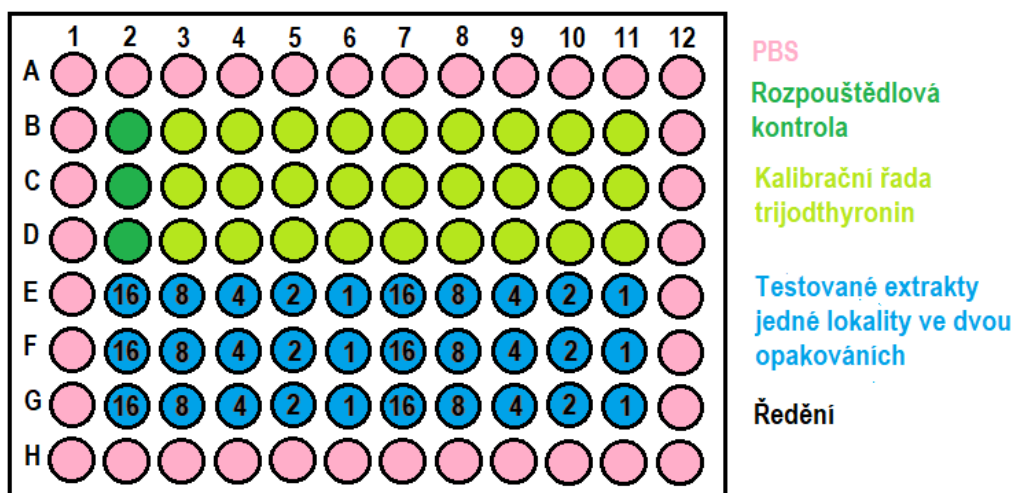


Obr. č. 9 Schéma přípravy ředících roztoků v dávkovací 24-jamkové mikrotitrační destičce pro testování thyroïdní aktivity

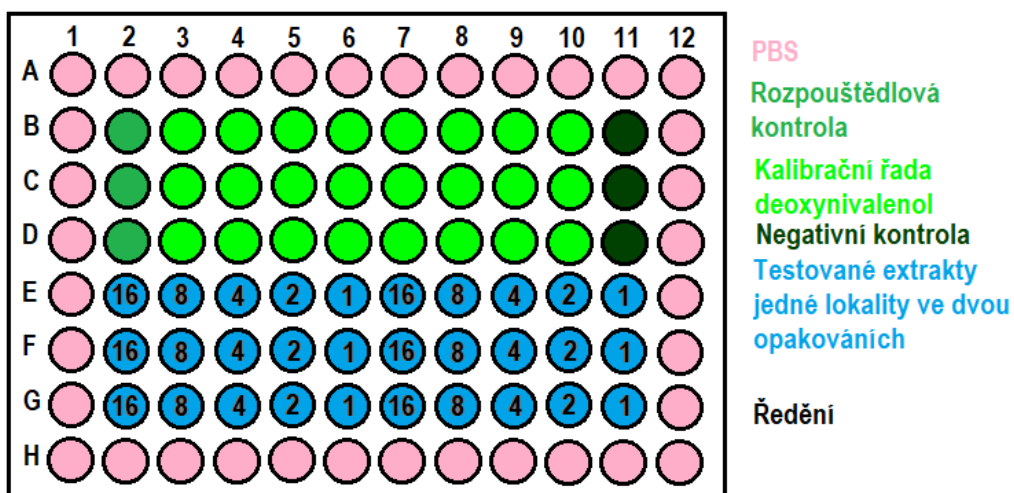


Obr. č. 10 Schéma přípravy ředících roztoků v dávkovací 24-jamkové mikrotitrační destičce pro testování anti-thyroidní aktivity

3. Tato 24 jamková destička byla na 10 minut vložena do třepačky na 300 otáček za minutu.
4. Po uplynutí třepací doby bylo z 96-jamkové destičky v laminárním kabinetu odebráno 100 μ l. Do každé jamky bylo přidáno 200 μ l z 24 jamkové dávkovací destičky. Najednou bylo vždy přemísťováno médium maximálně z jamek ve třech řadách a třech sloupcích náležícím těmto řadám (Obr. č. 11 pro thyroïdní aktivitu a Obr. č. 12 pro antithyroidní aktivitu).



Obr. č. 11 Schéma nasazení 96-jamkové mikrotitrační destičky pro testování thyroïdní aktivity



Obr. č. 12 Schéma nasazení 96-jamkové mikrotitrační destičky pro testování anti-thyroidní aktivity

- Po uplynutí inkubační doby (24 hodin) bylo z každé jamky odebráno 200 μ l a přidáno 30 μ l lýzní směsi. Následně byla změřena intenzita luminiscence spektrofotometrem s luminiscenčním modulem (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko) (Obr. č. 13).



Obr. č. 13 Spektrofotometr s luminiscenčním modulem (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko) (foto: Tereza Směšná)

3.8 Testování cytotoxicity

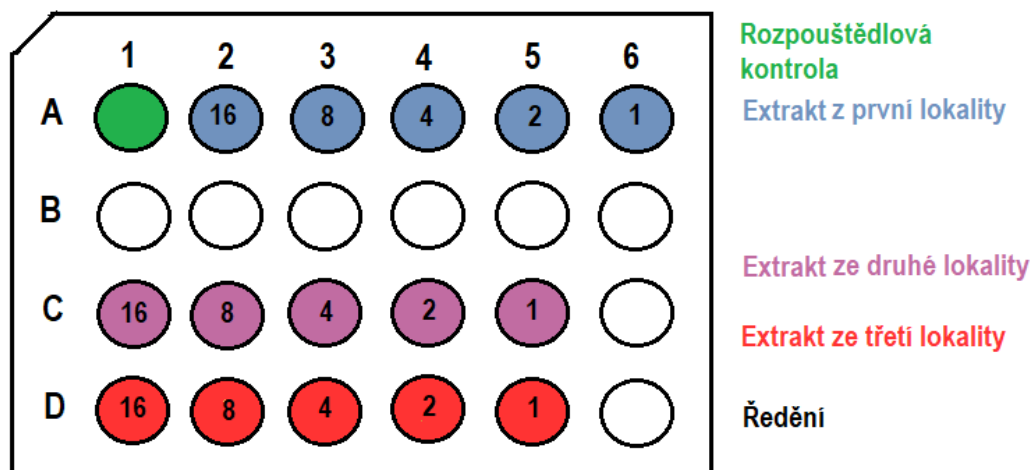
Každý pracovní den byl pracovníky Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie pod mikroskopem (Olympus) kontrolován vzhled buněčných kultur, jejich hustota a zda se u nich neprojeví známky snížení jejich životnosti a kontaminace. Pro vyloučení cytotoxických účinků u testovaných vzorků a pro přesnější stanovení životnosti buněk byl použit test redukce resazurinu podle O'Brien a kol., 2000.

Během tohoto testu dochází k přeměně modrého fluorescenčního barviva resazurinu za pomoci metabolicky aktivních buněk na růžový produkt resorufin. Po uplynutí doby expozice resazurinu, která činí 3 hodiny, byla detekována intenzita fluorescence, která byla měřena spektrofotometrem (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko).

Postup testování životnosti buněk:

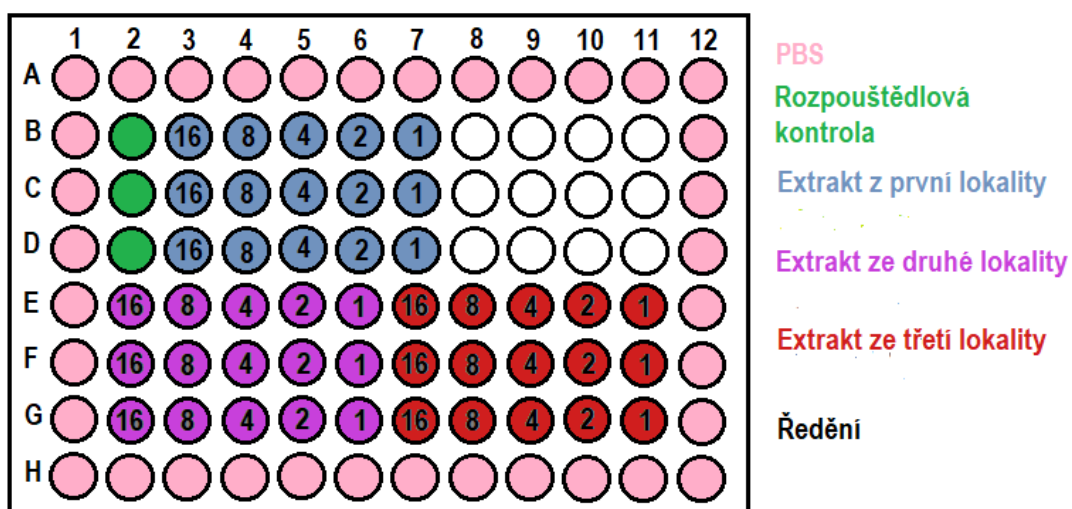
1. Na destičku s 96-ti jamkami byla nasazena buněčná suspenze, která byla obsažena v testovacím médiu (hustota buněk v médiu je 10 000 buněk na jamku) do každé jamky bylo přidáno po 100 μ l této buněčné suspenze. Následně byla destička vložena do inkubátoru, kde byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin.

2. Do 16-ti jamek v 24-jamkové destičce byl napipetován 1 ml testového média a do něj 1 μ l po sobě jdoucích látek: rozpouštědlová kontrola (médium + DMSO) a extrakty testovaných vzorků ze tří lokalit v ředění 16 \times , 8 \times , 4 \times , 2 \times , 1 \times (Obr. č. 14). Vložilo se na 10 minut do třepačky na 300 otáček za minutu.



Obr. č. 14 Schéma přípravy ředících roztoků v dávkovací 24-jamkové mikrotitrační destičce pro testování životnosti buněk

3. Z 96-jamkové destičky, která byla inkubována po dobu 24 hodin v inkubátoru bylo odebráno všechno testovací médium. Následně bylo do těchto jamek napipetováno 200 μ l testovacího média s rozpouštědlovou kontrolou a s extrakty z 24-jamkové destičky ve třech opakováních (triplikáty) (Obr. č. 15). Destičky byly poté inkubovány po dobu 24 hodin.



Obr. č. 15 Schéma nasazení 96-jamkové destičky pro testování životnosti buněk

4. Po uplynutí inkubační doby bylo do každé jamky na 96-jamkové destičce přidáno po 10 μ l resazurinu. Tomuto barvivu byly buňky vystaveny po dobu 3 hodin v inkubátoru (podle doporučení od výrobce Sigma-Aldrich). Po uplynutí doby působení byla změřena intenzita fluorescence barviva. Výsledky testu životnosti buněk byly automaticky převáděny ze spektrofotometru (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko) do programu Excel (Microsoft) jakožto relativní fluorescenční jednotky.

3.9 Analýza dat

3.9.1 Vyhodnocování dat pro detekci hormonální aktivity

Intenzita luminiscence u testovaných vzorků je vyjadřována v relativních světelných jednotkách (RLU). Pro výpočet (anti-)thyroidní aktivity byla od RLU u testovaných vzorků povrchových vod odečtena hodnota RLU, která byla zjištěna u rozpouštědlové kontroly s 0,1% DMSO.

Maximální signál referenční látky byl pro agonismus určen jako 100%ní indukce. Pro stanovení meze kvantifikace byly použity takzvané fixní 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). Při vyhodnocování biologické aktivity vzorků v *in vitro* testech typu CALUX se vzorek považuje za hormonálně aktivní, pokud jeho dva ředící body (testované koncentrace) vyvolají odpověď rovnou nebo vyšší než 10%ní indukce v agonismu a nižší než 80%ní indukce v antagonismu. Takovéto koncentrace referenčních látek z dlouhodobého sledování byly použity jakožto fixní limity kvantifikace. Výsledné hodnoty limitů kvantifikace byly 65 ng \times l⁻¹ ekvivalentů trijodthyroninu pro agonistickou aktivitu a 46 μ g \times l⁻¹ ekvivalentů deoxynivalenolu pro antagonistickou aktivitu.

RLU zjištěné u testovaných extraktů byly převedeny na relativní indukci (RI), která se udává jako procentuální odpověď. U referenčních látek byly jednotlivé body proloženy křivkou dávka-odpověď za pomoci nelineárního regresního modelu se čtyřmi parametry (EC₅₀ nebo IC₅₀, sklon křivky, maximální a minimální indukce trijodthyroninu a deoxynivalenolu). Tuto křivku bylo nutno posoudit dle 4 kritérií, pokud byla kritéria

splněna, tak byl test učen jako validní a data byla použita ke kvantifikaci (anti-)thyroidních aktivit v povrchových vodách v programu Excel (Microsoft).

Kritéria byla nastavena poskytovatelem licence (BioDetection Systems b.v.) na základě dlouhodobého sledování referenčních látek (více než 100 měření).

Jsou to následující kritéria:

1. EC_{50} a IC_{50} referenčních látek (trijodthyronin nebo deoxynivalenol), která byla naměřena v daném experimentu se pohybovala v rozmezí hodnot, ve kterých se nacházela EC_{50} a IC_{50} těchto referenčních látek během více než 100 měření.
2. $R^2 > 0,98$
3. Z-faktor $> 0,6$
4. Minimální indukční faktor $> 2,0$ pro anti-thyroidní aktivitu a $> 5,0$ pro thyroidní aktivitu.

Podle studie Grabic a Vrana (v tisku) byla použita vzorkovací rychlost 0,1 l za 24 hodin, která byla použita pro výpočet ekvivalentní koncentrace sledovaných aktivit v extraktech z pasivních vzorkovačů POCIS. Při expozici pasivních vzorkovačů po dobu 21 dnů bylo odhadnuto, že celkový navzorkovaný objem byl 2,1 litru.

Data byla následně statisticky porovnána v programu STATISTICA za pomoci neparametrického Kruskal-Wallisovo testu.

3.9.2 Vyhodnocení výsledků testu cytotoxicity

Data byla vyhodnocena pomocí jednofaktorové analýzy variace, která se používá pro zjištění statisticky signifikantních odlišností mezi skupinami (na hladině $\alpha = 0,05$).

Následně byl proveden Dunnettův post-hoc test za účelem zjištění rozdílu mezi intenzitou fluorescence u buněk vystavených rozpouštědlové kontrole a buněk vystavených extraktům.

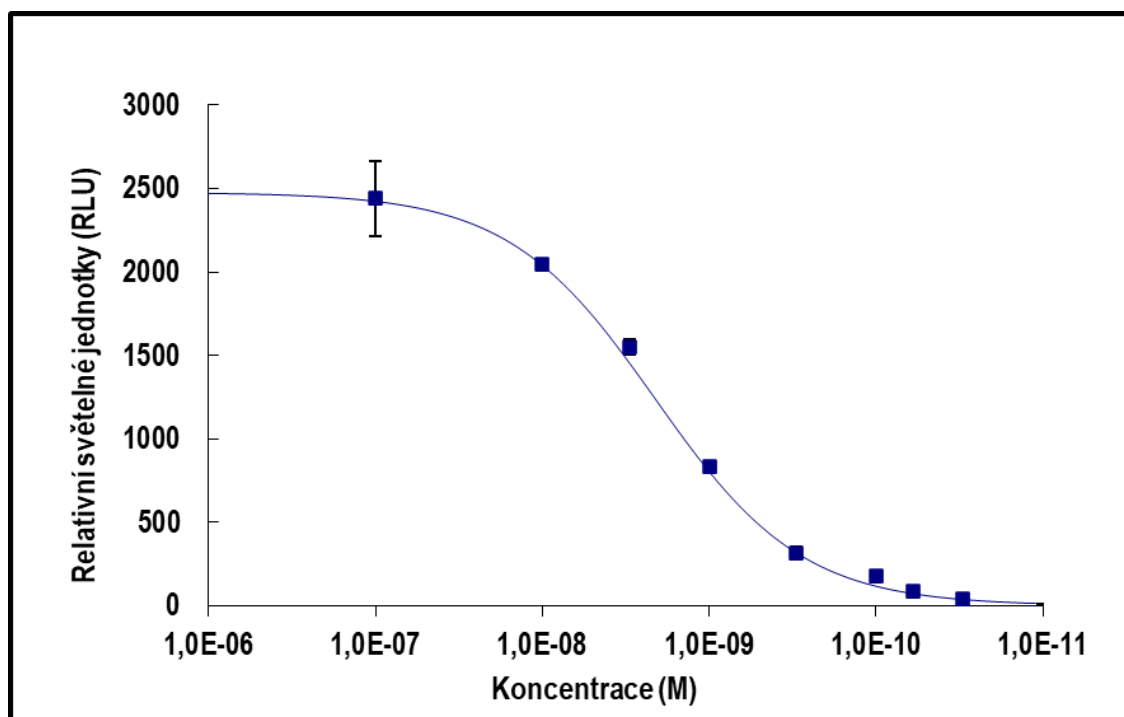
V případě, že byla intenzita fluorescence v extraktech, kterým byly buňky vystaveny statisticky signifikantně odlišná ($p < 0,05$) od intenzity, která byla naměřena u rozpouštědlové kontroly, tak v tomto případě byly tyto extrakty z povrchových vod označeny za cytotoxické, kvůli snížení životaschopnosti buněk. Tyto cytotoxické extrakty nebyly použity pro vyhodnocování analýzy (anti-)thyroidních aktivit.

4 Výsledky

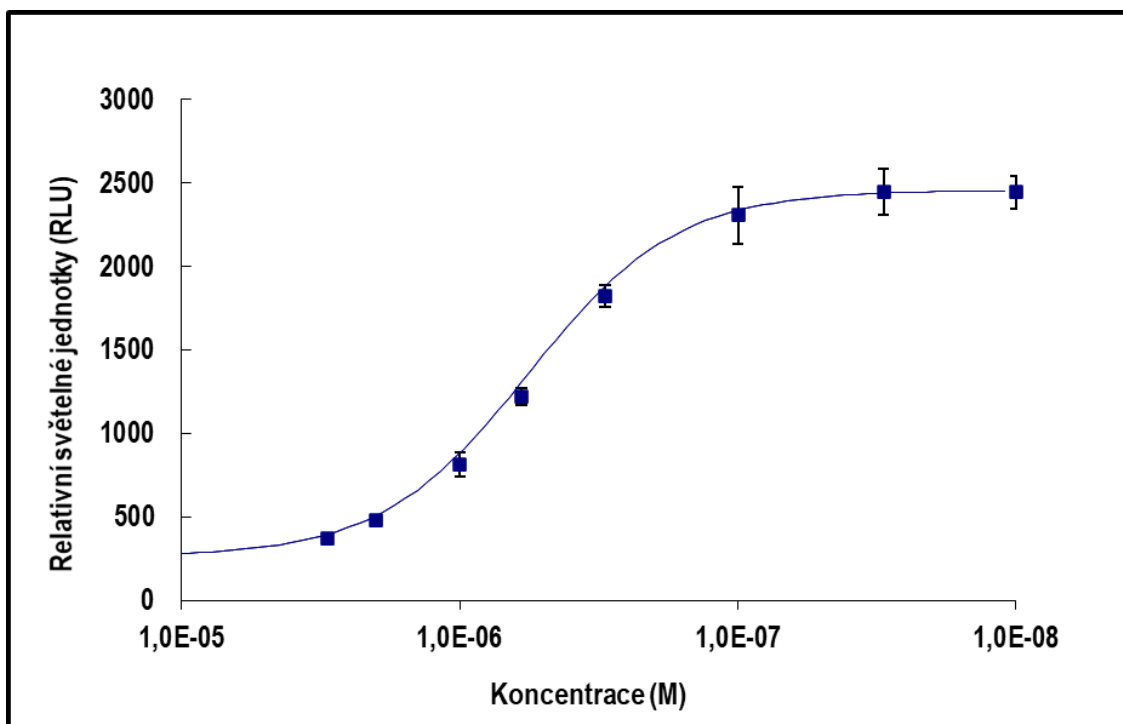
4.1 *In vitro* CALUX biotesty

Nejprve byla vynesena sigmoidní křivka referenčních látek (trijodthyronin a deoxynivalenol) pro jednotlivé aktivity (Obr. č.16 pro trijodthyronin a Obr. č. 17 pro deoxynivalenol). Pokud byla splněna všechna kritéria validity testu (uvedená v kapitole 3.8.1) byla data použita ke kvantifikaci thyroidních a anti-thyroidních aktivit.

Průměrná hodnota EC_{50} trijodthyroninu, která byla naměřena ve více než 20-ti analýzách, byla EC_{50} $643,5 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ (EC_{50} v molární koncentraci byla $988,5 \text{ pM}$ a molární hmotnost trijodthyroninu je $650,97 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$). Pro referenční látku pro anti-thyroidní aktivitu deoxynivalenol byla vypočtena průměrná hodnota IC_{50} , která byla naměřena ve více než 30-ti měřeních, v hodnotě $184,6 \text{ } \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ (IC_{50} v molární koncentraci byla $622,9 \text{ nM}$ a molární hmotnost deoxynivalenolu je $296,31 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$).



Obr. č. 16 Sigmoidní křivka referenční látky trijodthyronin



Obr. č. 17 Sigmoidní křivka referenční látky deoxynivalenol

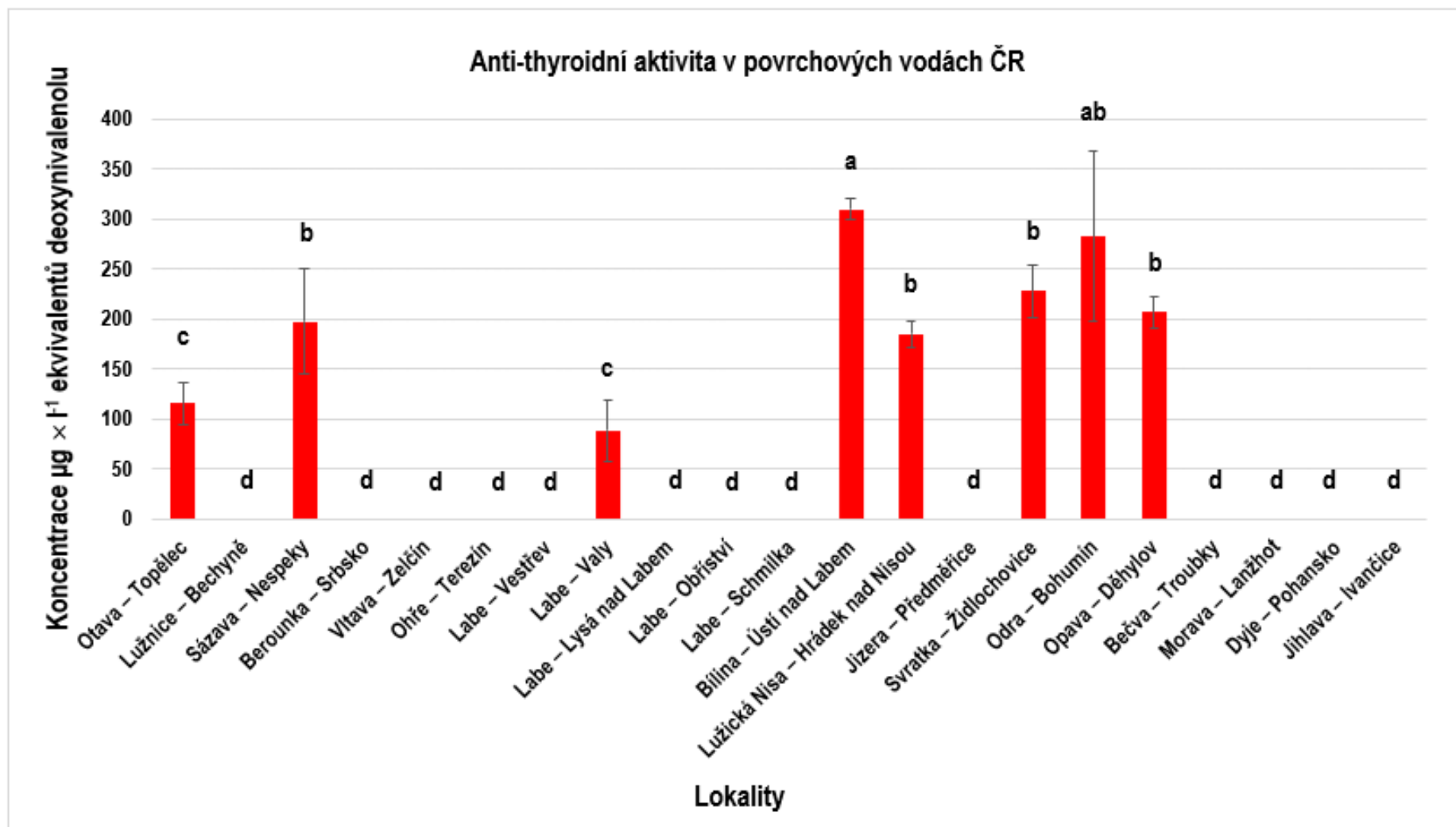
4.1.1 (Anti-)thyroidní aktivita v České republice

Thyroidní aktivita byla na všech 21 lokalitách pod limitem kvantifikace ($<65 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů trijodthyroninu). Anti-thyroidní aktivita byla detekována v 38 % vzorků z pasivních vzorkovačů. Anti-thyroidní aktivita se pohybovala v rozmezí hodnot 89 (Labe – Valy) – 310 (Bílina – Ústí nad Labem) $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu. Anti-thyroidní aktivita byla nalezena také na řece Otavě na odběrovém místě Topělec (116 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu), na řece Lužická Nisa na odběrovém místě Hrádek nad Nisou (185 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu), na řece Sázavě na odběrovém místě Nespeky (198 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu), na řece Opavě v Děhylově (207 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu), na řece Svatce na odběrovém místě Židlochovice (228 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu) a na řece Odře v Bohumíně (283 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu).

Na zbylých 13 lokalitách (Ohře – Terezín, Bečva – Troubky, Vltava – Zelčín, Lužnice – Bechyně, Jihlava – Ivančice, Morava – Lanžhot, Dyje – Pohansko, Jizera – Předměřice, Labe – Obříství, Labe – Vestřev, Labe – Lysá nad Labem, Labe – Schmilka,

Berounka – Srbsko) byla anti-thyroidní aktivita pod limitem kvantifikace ($<46 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu).

Pro každou lokalitu byla provedena nejméně tři měření. Pokud se u některé z lokalit nevyskytla (anti-)thyroidní aktivita, tak už další měření nebyla provedena. Ze zjištěných hodnot (anti-)thyroidních aktivit z nezávislých experimentů byly vypočteny průměry. Výsledky byly statisticky porovnány a vyneseny do grafu (Graf č. 1).



Graf č. 1 Výsledky anti-thyroidních aktivit v České republice. Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka. Různá písmena (a, b, c, d) indikují statisticky významné rozdíly mezi lokalitami ($p < 0,05$).

4.1.2 (Anti-)thyroidní aktivita v povrchových vodách státu Texas (USA)

Pro porovnání (anti-)thyroidních aktivit byly k dispozici vzorky povrchové vody z USA z Texasu. Vzorky byly odebrány z řek: Dickenson Bayou, Sims Bayou, Greens Bayou a White Oak Bayou.

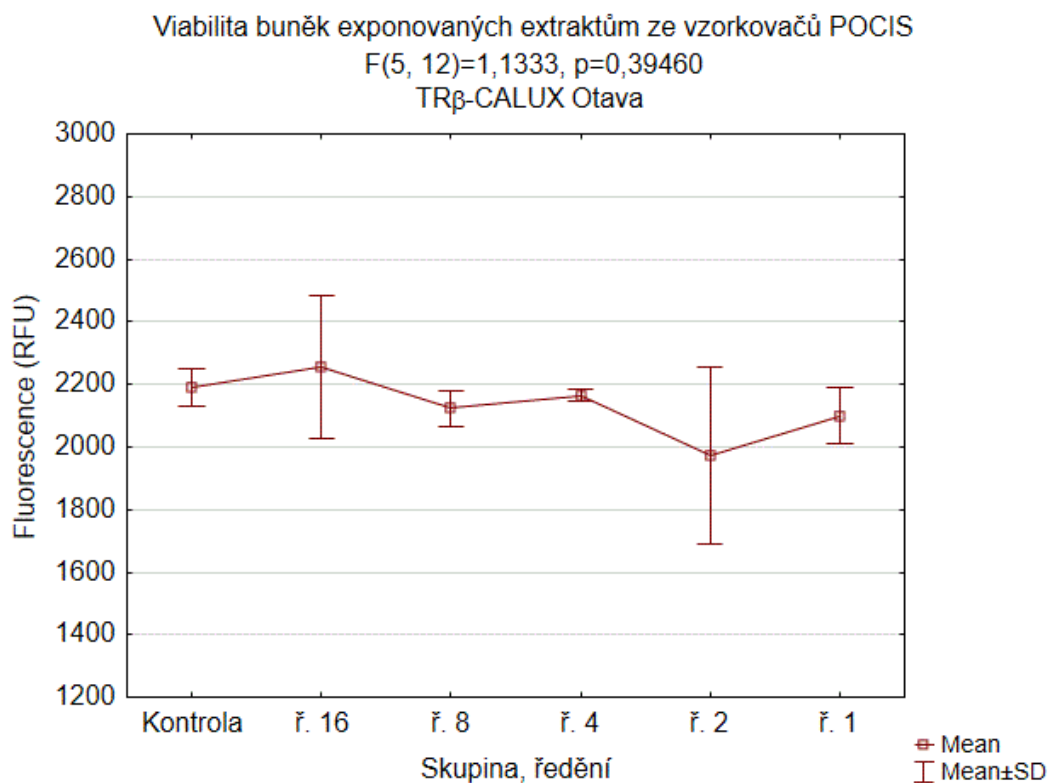
Thyroidní i anti-thyroidní aktivita byla u všech lokalit pod limitem kvantifikace. Pro thyroidní aktivitu byla hodnota meze kvantifikace $65 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů trijodthyroninu. Pro anti-thyroidní aktivitu byla hodnota meze kvantifikace $46 \text{ } \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu.

4.2 *In vitro* test redukce resazurinu

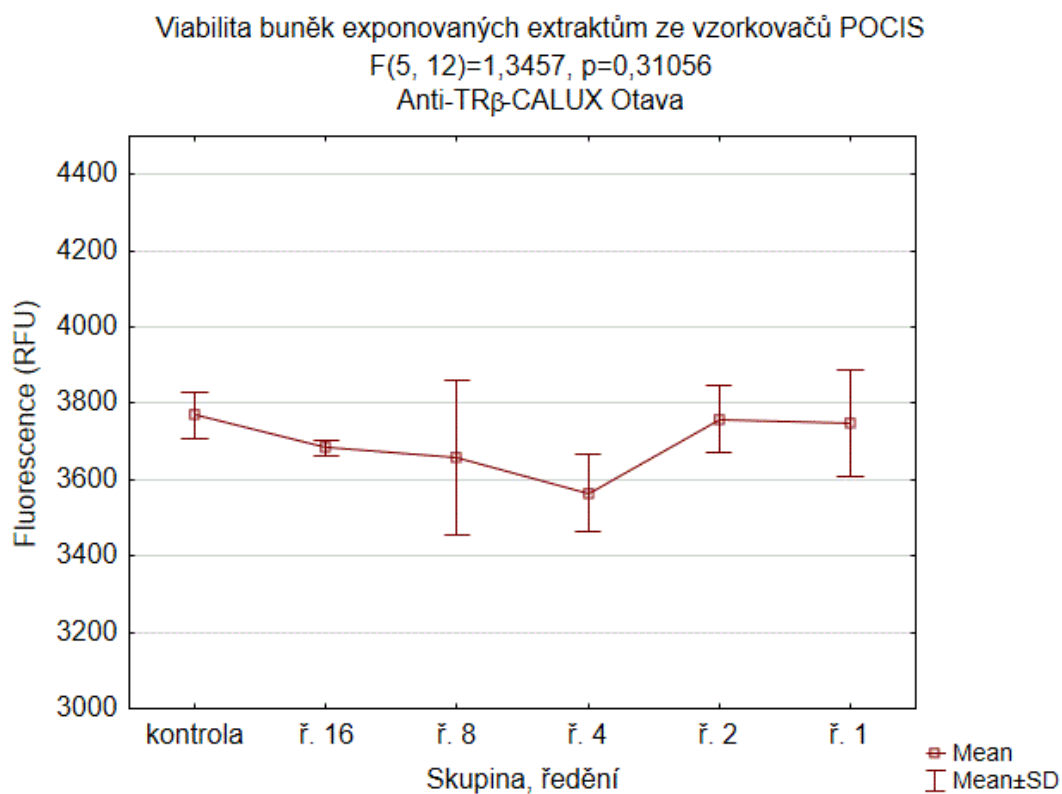
Vyhodnocení testu redukce resazurinu bylo popsáno výše v kapitole 3.9.2. Test redukce resazurinu byl proveden v agonismu i antagonismu pro lokality v České republice a Texasu.

4.2.1 Česká republika

U žádné z 21 lokalit z České republiky nebyla prokázána statisticky významně ($\alpha = 0,05$) snížená životaschopnost buněk způsobená testovanými extrakty. Níže je uveden příklad vyhodnocení testu redukce resazurinu (graf č. 2 pro agonismus a graf č. 3 pro antagonismus).



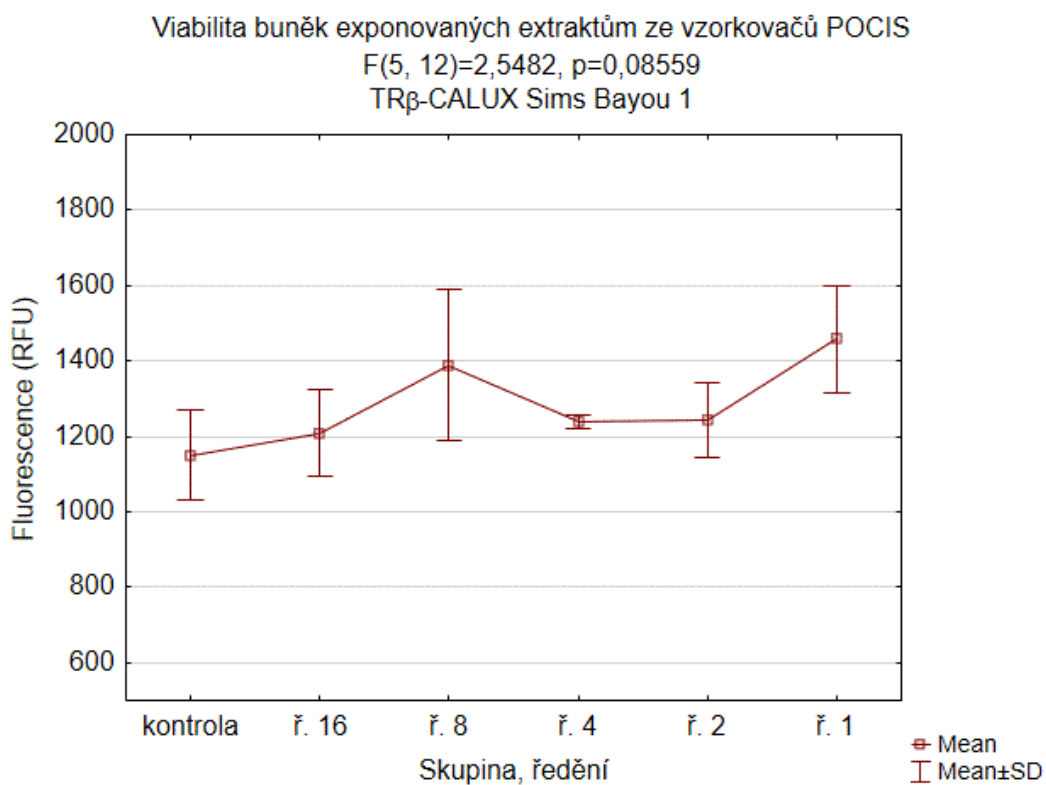
Graf č. 2 Viabilita buněk exponovaných extraktům pro thyroïdní aktivitu – Česká republika. Nebyly zjišřeny řadné statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami.



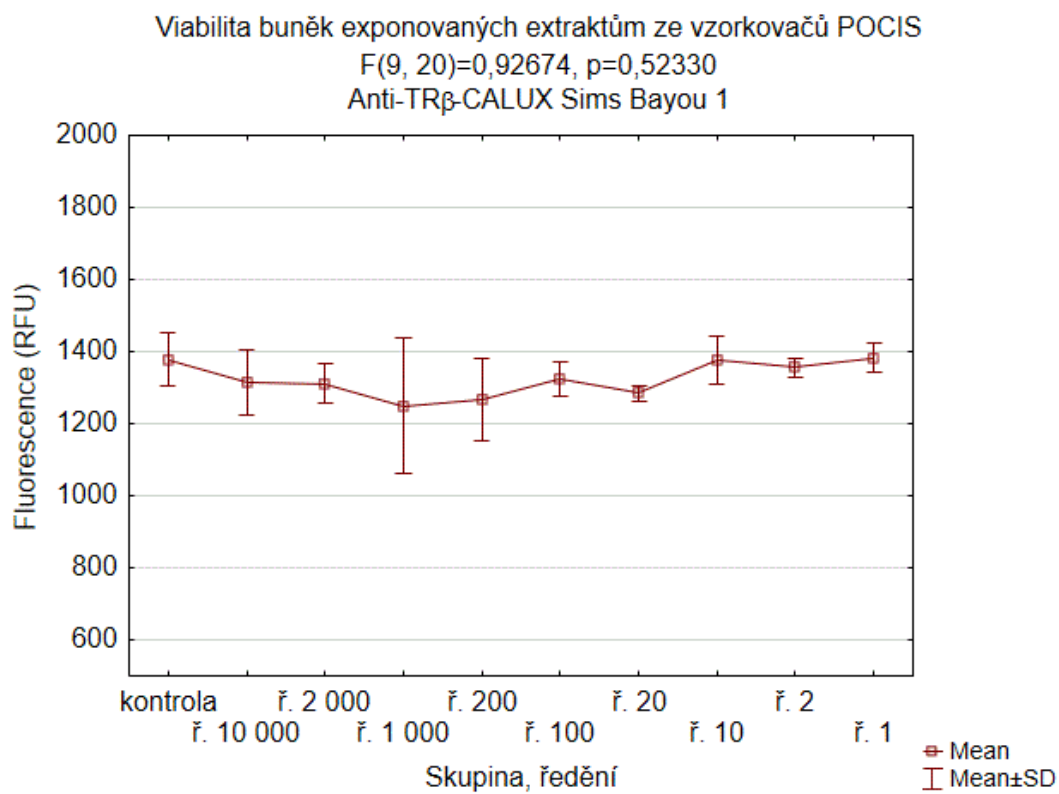
Graf č. 3 Viabilita buněk exponovaných extraktům pro anti-thyroidní aktivitu – Česká republika. Nebyly zjišřeny řadné statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami.

4.2.2 Texas

Pro testování případného snížení životaschopnosti buněk exponovaných extraktům ze 12-ti lokalit ze čtyř řek v Texasu byl použit stejný test jako pro testování extraktů z České republiky. Na žádné lokalitě nebyla prokázána snížená životaschopnost. Níže je uveden příklad vyhodnocení testu redukce resazurinu pro Texas (graf č. 4 pro agonismus a graf č. 5 pro antagonismus).



Graf č. 4 Viabilita buněk exponovaných extraktům pro thyroidní aktivitu – Texas. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami.



Graf č. 5 Viabilita buněk exponovaných extraktům pro anti-thyroidní aktivitu – Texas. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami.

5 Diskuze

Doposud nebyly publikovány žádné výsledky o výskytu (anti-)thyroidní aktivity ve vodním prostředí České republiky. V jiných zemích bylo zveřejněno velmi málo výsledků o výskytu (anti-)thyroidní aktivity ve vodním prostředí. Studie zabývající se testováním výskytu thyroïdní aktivity probíhaly například v Číně (Li a kol., 2010a, 2011; Shi a kol., 2011,2012), Austrálii (Leusch a kol., 2014), Nizozemí (Gutleb a kol., 2005; Schriks a kol., 2009) a Francii (Jugan a kol., 2009). Testování anti-thyroidní aktivity ve vodním prostředí probíhalo pouze v Číně (Li a kol., 2010a; Shi a kol., 2016; Hu a kol., 2013; Li a kol., 2014; Shi a kol., 2011, 2012) a Nizozemí (Gutleb a kol., 2005).

Důsledkem výskytu thyroïdních aktivit ve vodním prostředí mohou být mimo jiné přírodní a synteticky vytvořené hormony štítné žlázy. Zdravý člověk vyloučí denně močí a stolicí nezanedbatelné množství přírodních hormonů štítné žlázy. Přibližně 5 % obyvatel České republiky trpí nějakým typem onemocnění štítné žlázy (Jiskra, 2011) a toto onemocnění se léčí převážně synteticky vyráběnými léčivými, které v sobě obsahují sodnou sůl levothyroxinu či liothyroninu, která se v těle mění na tyroxin a trijodthyronin. Tato léčiva by měla napodobovat přirozenou funkci hormonů štítné žlázy. Zatím byla provedena pouze jedna studie ve světě (Svanfelt a kol., 2010) a jedna studie v České republice (Pech, 2017), které se zabývaly množstvím vyloučeného syntetického hormonu štítné žlázy do odpadních vod a následně do povrchových vod. Ve studii, kterou se zabývali Svanfelt a kol. v roce 2010 ve Finsku byl pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie sledován výskyt hormonů štítné žlázy (tyroxinu, trijodthyroninu, reverzní trijodthyroninu, 3,5-dijodthyroninu a 3,3'-dijodthyroninu) v odpadní a povrchové vodě. Jediným hormonem, který se ve vodním prostředí podařilo naměřit byl tyroxin. Nejvyšší hodnoty tyroxinu se vyskytovaly v přítoku na čistírnu odpadních vod v koncentraci 10,5-84,9 ng × l⁻¹ a na odtoku z čistírny odpadních vod byla naměřena nejvyšší hodnota tyroxinu 22 ng × l⁻¹. V povrchové vodě se naměřit koncentraci tyroxinu nepodařilo. Tato studie dále poukázala na problematiku spojenou s léčbou onemocněním štítné žlázy a následné léčby pomocí uměle vyrobených medikamentů, neboť během léčby nedochází k jejich úplnému metabolickému rozkladu a Svanfelt a kol. (2010) uvádějí, že se přibližně 66 % odstraní během léčby a zbylá část přechází do vodního prostředí. V České republice se Michal Pech v roce 2017 ve své bakalářské práci zabýval predikovanými environmentálními koncentracemi hormonů štítné žlázy v povrchové vodě, které byly

vypočítány na základě průměrného denního vyloučení syntetických i přirozených hormonů štítné žlázy zdravým člověkem do odpadních vod. Další látky s thyroïdní aktivitou, které by se mohly v povrchových vodách vyskytovat jsou například: 2-acetamidofluoren a kyselina all-trans-retinová (Collet a kol., 2019).

V Nizozemí probíhalo testování thyroïdní a anti-thyroïdní aktivity v sedimentu z řek Dommel, Terneuzen a Hoogeveen za pomoci T-screen *in vitro* biotestu, který je založený na proliferaci buněk stimulovaných trijodthyroninem. V tomto testu byly použity buňky krysí hypofýzy (GH3). Z výsledků vyplývá, že extrakty sedimentů z Dommel a Terneuzen snížily růst buněk v přítomnosti 0,25 nM trijodthyroninu a v případě vzorků z Hoogeveen se zvýšil růst buněk (Gutleb a kol., 2005).

V této práci byla thyroïdní aktivita testována pomocí TR β -CALUX *in vitro* biotestu ve vzorcích z 21 lokalit České republiky a ze 4 řek (Sims Bayou, Dickenson Bayou, Greens Bayou a White Oak Bayou) ve státě Texas (USA) ze vzorkovačů typu POCIS. Thyroïdní aktivity nebyly nalezeny na žádné z lokalit. V jiných zemích testování thyroïdních aktivit pro thyroïdní receptor beta probíhalo také pomocí TR β -CALUX v Austrálii na odtoku z čistírny odpadních vod (Leusch a kol., 2014) a v Nizozemí v povrchové vodě v povodí řeky Rýn (Schriks a kol., 2009). Za pomoci dvouhybridního kvasinkového testu probíhalo testování thyroïdních aktivit v Číně (Li a kol., 2010a, 2011) ve vzorcích přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod a ve vzorcích vody z řeky Zhujiang (Perlová řeka). Ve výše zmíněných studiích nebyla thyroïdní aktivita nalezena. Testování thyroïdní aktivity za pomoci reportérového genu s použitím CV-1 buněk probíhalo v Číně podél řeky Jang-c. Thyroïdní aktivita se pohybovala v rozmezí hodnot 286-293 ng \times l⁻¹ ekvivalentů trijodthyroninu (Shi a kol., 2011). Dalšími lokalitami v Číně, ve kterých byly měřeny thyroïdní aktivity tímto testem byly: řeky Yangtze a Huaihe a jezero Taihu. Nejvyšší naměřená hodnota thyroïdní aktivity byla 291 ng \times l⁻¹ ekvivalentů trijodthyroninu, tato hodnota byla naměřena v jezeře Taihu (Shi a kol., 2012). Ve Francii byla testována thyroïdní aktivita pro thyroïdní receptor alfa pomocí bioluminiscenčního buněčného testu (PC-DR-luc) na přítoku a odtoku čistírny odpadních vod a v povrchové vodě. Nejvyšší naměřená hodnota thyroïdní aktivity na přítoku čistírny odpadních vod byla 5,7 ng \times l⁻¹ ekvivalentů trijodthyroninu a na odtoku z čistírny odpadních vod byla nejvyšší naměřená hodnota 1,3 ng \times l⁻¹ ekvivalentů trijodthyroninu (Jugan a kol., 2009). Thyroïdní aktivita byla měřena ve vzorcích odpadní a povrchové vody (odebraných aktivním vzorkováním – bodovým odběrem).

Anti-thyroidní aktivita se v této práci prokázala na 8-mi lokalitách. Z pozitivních lokalit jsou 4 lokality (Otava, Sázava, Labe – Valy, Bílina) z povodí Labe, které se v Německu vlévá do Severního moře a další 3 lokality (Lužická Nisa, Odra, Opava) z povodí Odry, jejíž tok směřuje do Baltského moře a poslední lokalita (Svratka) je z povodí Moravy odtékající přes Dunaj do Černého moře. V České republice se anti-thyroidní aktivity pohybovaly v rozmezí hodnot $89\text{--}310 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu. Nejvyšší aktivita byla naměřena v řece Bílině (viz. Graf č. 1), o této řece je známo, že je velice znečištěná chemickými látkami různého původu, zejména z chemického a těžebního průmyslu (Kohušová a kol., 2011). Společným zdrojem znečištění byly u všech lokalit čistírny komunálních odpadních vod. Některé lokality mohou být znečištěny odpadními vodami z chemických závodů. Týká se to zejména lokalit: Labe – Valy, Bílina, Lužická Nisa, Odra, Opava (viz. Tab. č. 1). Průmyslové odpadní vody jsou považovány za hlavní zdroj anti-thyroidní aktivity ve vodním prostředí (Li a kol., 2008; Li a kol., 2011; Sun a kol., 2008). Dále byl v této práci sledován výskyt anti-thyroidní aktivity ve vzorcích ze 4 řek (Sims Bayou, Dickenson Bayou, Greens Bayou a White Oak Bayou) ve státě Texas (USA). Na každé řece byla 3 odběrová místa. Na žádné z výše zmíněných řek nebyla nalezena anti-thyroidní aktivita, hodnoty se pohybovaly pod limitem kvantifikace. Nепrokázání anti-thyroidních aktivit mohlo být způsobeno kratší dobou po kterou byly pasivní vzorkovače typu POCIS umístěny na odběrových místech. U vzorků ze státu Texas (USA) byly vzorkovače v povrchové vodě umístěny 11 dní. To znamená, že v porovnání se vzorkováním v České republice činil rozdíl doby expozice 10 dní.

Pro sledování výskytu anti-thyroidní aktivity ve vodním prostředí se v různých studiích používaly různé referenční látky. Jednou z nich byl amiodaron hydrochlorid. Amiodaron je přibližně $5\times$ slabší než deoxynivalenol (Collet a kol., 2019), který byl použit jako referenční látka v této bakalářské práci. Stanovením anti-thyroidní aktivity pro thyroïdní receptor beta použitím dvouhybridního kvasinkového testu se zabývaly studie prováděné v Číně. Testování probíhalo na přítoku a odtoku z čistíren odpadních vod. Ve studii, kterou provedli Li a kol. v roce 2010a byly zjištěny koncentrace ve vodě přítékající na čistírnu odpadních vod $170 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů amiodaron hydrochloridu. Na odtoku z čistíren odpadních vod se aktivity pohybovaly pod mezí kvantifikace až po $46 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů amiodaron hydrochloridu. Ve studii Li a kol., 2014 zabývající se

stanovením anti-thyroidní aktivity v povrchové vodě v nádrži Guanting se aktivity pohybovaly v rozmezí $34\text{-}309 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů amiodaron hydrochloridu.

Další látkou používanou jako referenční látka v *in vitro* testech při sledování anti-thyroidní aktivity ve vodním prostředí je dibutyl ftalát, který je běžným environmentálním kontaminantem. Pouze studie Demaegdt a kol. z roku 2016 poskytuje data z měření anti-thyroidní aktivity dibutyl ftalátu a deoxynivalenolu ve stejném *in vitro* testu. Tito autoři uvádějí pro anti-thyroidní aktivitu dibutyl ftalátu hodnotu IC_{50} $150 \mu\text{M}$ a pro deoxynivalenol hodnotu $0,33 \mu\text{M}$, což znamená, že dibutyl ftalát je $455\times$ slabší než deoxynivalenol. V Číně byla u vodních toků podél řeky Jang-c testována anti-thyroidní aktivita za pomoci reportérového genu s použitím CV-1 buněk. Testováno bylo 11 vodních zdrojů, ze kterých 3 vykazovaly anti-thyroidní aktivitu, která se pohybovala v rozmezí hodnot $52\text{-}555 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů dibutyl ftalátu (Shi a kol., 2011). Dalšími lokalitami v Číně, ve kterých byly zkoumány anti-thyroidní aktivity tímto testem byly řeky Yangtze a Huaihe a jezero Taihu. Anti-thyroidní aktivita se vyskytovala v jezeře a řekách v rozmezí $28\text{-}1600 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů dibutyl ftalátu. (Shi a kol., 2012). Na řece Yangtze (zminěné výše) bylo testováno 11 vzorků také pomocí reportérového genu s použitím CV-1 buněk. Anti-thyroidní aktivita byla zjištěna v rozmezí $1600\text{-}6000 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů dibutyl ftalátu. Z výsledků této studie vyplývá, že procentuální frekvence pozitivní detekce anti-thyroidní aktivity byla 82 % (Hu a kol., 2013). V roce 2016 probíhalo testování lokalit z Číny, které jsou zminěné výše (řeky Huaihe a Yangtze, jezero Taihu). Anti-thyroidní aktivity se vyskytovaly v rozmezí hodnot $3,6\text{-}76 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů dibutyl ftalátu, z nichž nejvyšší hodnota byla naměřena na řece Yangtze (Shi a kol., 2016). Anti-thyroidní aktivita byla měřena ve vzorcích odpadní a povrchové vody (odebraných aktivním vzorkováním – bodovým odběrem).

V této práci byla prokázána anti-thyroidní aktivita z pasivních vzorkovačů typu POCIS na 8-mi lokalitách, ale nebylo zjišťováno jaká látka nebo látky tuto aktivitu ve vzorcích z pasivních vzorkovačů způsobují. V dalších analýzách by bylo možné za použití kombinace *in vitro* testů a chemické analýzy zjistit, jaké látky by anti-thyroidní aktivitu mohly způsobovat. Mezi látkami zodpovědnými za anti-thyroidní aktivitu ve vodním prostředí mohou být látky, u kterých byla anti-thyroidní aktivita již prokázána. Těmi jsou například: environmentální polutanty: bisfenol AF (Šauer a kol., 2021), dibutyl ftalát (Shi a kol., 2011), 4-nonylfenol, bisfenol A a amiodaron (Collet a kol., 2019). Například amiodaron hydrochlorid způsobil snížení hladiny tyroxinu ve folikulech štítné

žlázy v larvách dánia pruhovaného (*Danio rerio*) po 3denní expozici (Raldúa a Babin, 2009). Tato sloučenina byla vyhodnocena jako nejrizikovější sloučenina ze 100 léčiv, které se vyskytují v odpadní vodě z nemocnic (Escher a kol., 2011). Dalšími anti-thyroidními látkami jsou tetrabromobisfenol A, tetrachlorobisfenol A (Kitamura a kol., 2002), které jsou používány v průmyslu a existuje zde možnost, že by se také mohly dostávat do vodního prostředí. Mezi další látky, které jsou používány v průmyslu a způsobují anti-thyroidní aktivitu patří celá řada ftalátů například: dibutyl ftalát, diizobutyl ftalát, diethylhexyl ftalát, dimethyl ftalát, diethyl ftalát a další (Shi a kol., 2016). Ftaláty (neboli estery kyseliny ftalové) jsou používány jako změkčovadla plastů, jako přísady do insekticidů a kosmetiky (Boas a kol., 2006). U určitých průmyslových látek jako je dibutyl ftalát a diethylhexyl ftalát bylo zjištěno, jak velký podíl mají na anti-thyroidní aktivitě ve vodním prostředí. Dibutyl ftalát přispíval k anti-thyroidní aktivitě přibližně ze 17 až 144 % na dvou lokalitách v povrchové vodě v Číně (Shi a kol., 2012), zatímco diethylhexyl ftalát k anti-thyroidní aktivitě přispívá z necelého 1 % (Li a kol., 2010b). Nicméně, anti-thyroidní aktivita byla v této bakalářské práci nalezena také na určitých lokalitách bez předpokládaného výrazného zatížení průmyslovými a komunálními odpadními vodami (lokality Otava a Sázava). Existují také látky přírodního původu s anti-thyroidní aktivitou, jako jsou mykotoxiny (deoxynivalenol, ochratoxin A, α -zearalenol a 3-acetyl-deoxynivalenol) (Demaegdt a kol., 2016) a dosud nejsilnější anti-thyroidní látka T2 toxin (známý také jako fusariotoxin) je také mykotoxinem (Collet a kol., 2019). Mykotoxiny bývají často analyzovány například v obilovinách a potravinách z nich připravených, ale byly již detekovány i ve vodním prostředí. Například silný antagonistu thyroïdního receptoru deoxynivalenol se vyskytoval v povrchových vodách Švýcarska v koncentracích až do $22 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a jako zdroj znečištění byly zjištěny splachy ze zemědělsky obdělávané půdy (Bucheli a kol., 2008). Doposud neexistuje žádná studie o potenciálu mykotoxinů způsobovat anti-thyroidní aktivity a je potřeba provést další výzkum na toto téma.

Ze zjištěných informací o koncentracích chemických látek a jejich potenciálu způsobovat anti-thyroidní aktivitu lze vypočítat, do jaké míry tyto chemické látky v těch koncentracích, v nichž jsou přítomny přispívají k celkové anti-thyroidní aktivitě ve vzorku. Anti-thyroidní aktivita byla doposud nacházena ve vodním prostředí častěji, než thyroïdní aktivita (Hu a kol., 2013, Li a kol., 2010a, Shi a kol., 2012), což může být způsobeno tím, že je doposud známo jen velmi málo látek vykazujících thyroïdní aktivitu

(Collet a kol., 2019; Gutleb a kol., 2005). Nicméně, jak thyroidní, tak anti-thyroidní aktivita byla doposud analyzována pouze ve vzorcích vody, které byly odebrány aktivním vzorkováním (bodový odběr), a tudíž tato bakalářská práce přináší novou informaci, že anti-thyroidní aktivita může být ve vodním prostředí detekována i při použití pasivního odběru vzorků.

Existuje systematický přístup tzv. Adverse Outcome Pathways (AOPs) pomocí něhož lze popsané molekulární a buněčné události, které jsou potřebné k vyvolání toxického účinku látky, identifikovat a dále se zaměřovat na studium dané popsané signální dráhy (AOP), které vede k toxickému účinku (Ankley a kol., 2010). V současnosti existují AOP pro inhibici tyreoperoxidázy a iodothyronin deiodinázy I, když dojde ke změně hladiny thyroidních hormonů, což má za následek poruchu naplňování plynového měchýře u Dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (Stinckens a kol., 2016), ale zatím nebyla popsána žádná AOP pro antagonismus thyroidního receptoru.

Vzhledem k nedostatečnému probádání problematiky výskytu (anti-)thyroidní aktivity ve vodním prostředí, lze jen diskutovat o tom, jak může tato aktivita a látky, které jí způsobují ovlivňovat organismy ve vodě. Dalo by se však předpokládat, že anti-thyroidní aktivita bude mít negativní vliv, protože antagonistická aktivita blokuje přirozenou hormonální funkci a tím může způsobovat značné riziko pro živočichy vázané na vodní prostředí. Anti-thyroidní aktivitou může být narušena signální osa hypothalamus-hypofýza-štítná žláza zablokováním vazebných míst na receptoru, kam by se měly vázat hormony štítné žlázy a tím by mohlo potenciálně být zabráněno správnému fungování hormonů štítné žlázy, které jsou nezbytné například pro: vývoj mozku (Trojan a kol., 2003), remodelaci kostí a srdeční funkci (Brent, 2012). Celkově je problematika účinků chemických látek na osu štítné žlázy daleko složitější na rozdíl od jiných endokrinních drah, protože chemikálie narušují signalizaci štítné žlázy několika různými mechanismy, nejen přes interakci s thyroidním receptorem (Capen a Martin, 1989; Capen, 1997; DeVito a kol., 1999; Hurley, 1998).

V několika studiích bylo zkoumáno, jaký vliv může mít na ryby podávání tyroxinu. Ukázalo se, že při podávání nízkých koncentrací může tyroxin urychlovat růst ryb, protože z hypofýzy uvolňuje růstový hormon (Higgs a kol., 1982, 1992), a naopak vysoké koncentrace mohou způsobovat inhibici růstu nebo i smrt (Srivastava a kol., 2013). Na toto téma bychom mohli spekulovat o tom, jaký účinek na ryby by mohl mít nedostatek

tyroxinu. S největší pravděpodobností by nedostatečné množství tyroxinu mohlo u ryb způsobovat minimálně pomalejší růst.

6 Závěr

Cílem této práce bylo provedení prvního monitoringu výskytu (anti-)thyroidních aktivit pomocí *in vitro* testů v extraktech z pasivních vzorkovačů typu POCIS, které byly uloženy v povrchových vodách na území České republiky, a identifikování rizikových lokalit výskytu (anti-)thyroidních aktivit.

V této práci bylo provedeno analyzování thyroïdních a anti-thyroidních aktivit za pomoci *in vitro* biotestů TR β -CALUX (pro thyroïdní aktivitu) a anti-TR β -CALUX (pro anti-thyroidní aktivitu) v povrchových vodách. Thyroïdní aktivita se v povrchových vodách z České republiky nevyskytovala na žádné z lokalit. Anti-thyroidní aktivita se v povrchových vodách pohybovala v koncentracích 89-310 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu. Tato aktivita byla kvantifikována u 38 % vzorků. V rámci této práce došlo k odhalení 8-mi lokalit v povrchových vodách na území České republiky s výskytem anti-thyroidní aktivity. Nejvíce zatíženou lokalitou je řeka Bílina, ve které byla zjištěna nejvyšší anti-thyroidní aktivita.

Dále bylo v této práci provedeno testování (anti-)thyroidních aktivit v povrchových vodách ve státě Texas (USA) s využitím pasivních vzorkovačů typu POCIS. Thyroïdní ani anti-thyroidní aktivita nebyla nalezena v žádném vzorku.

Doposud nebylo provedeno dostatečné množství studií sledující tyto aktivity ve vodním prostředí a jejich dopad na vodní organismy (konkrétně interakce s thyroïdním receptorem vedoucí k negativním účinkům *in vivo*) zatím studován nebyl, aby bylo možné s jistotou konstatovat, jaký je jejich výsledný vliv.

Poznatky zjištěné v této bakalářské práci mohou být výchozím bodem pro další případný výzkum rizik spojených s výskytem anti-thyroidní aktivity ve vodním prostředí. Dále lze předpokládat, že lokalit zatížených anti-thyroidní aktivitou může být více, a to i v rámci menších vodních toků. Další výzkum by mohl být zaměřený na odhalování látek, které mohou být za anti-thyroidní aktivitu na daných lokalitách zodpovědné.

7 Přehled použité literatury

- Alvarez, D. A., Huckins, J. N., Petty, J. D., Jones-Lepp, T., Stuer-Lauridsen, F., Getting, D. T., Goddard, J. P., Gravell, A., 2007. Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water: polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Comprehensive Analytical Chemistry*, 48, 171-197.
- Alvarez, D. A., Petty, J. D., Huckins, J. N., Jones-Lepp, T. L., Getting, D. T., Goddard, J. P., Manahan, S. E., 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1640-1648.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, Ch. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., Villeneuve, D. L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 730-741.
- Bhanushali, M., Bagale, V., Shirole, A., Joshi, Y., Kadam, V., 2010. An in-vitro toxicity testing-a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1, 15-31.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebæk, N. E., Main, K. M. 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology*, 154, 599-611.
- Boučková, Z., 2012. Nemoci hypothalamu. Medixa.org. [online]. Váš poradce pro lidské zdraví. Copyright © 2021 [cit. 30.03.2021]. Dostupné z: <https://cs.medixa.org/nemoci/nemoci-hypothalamu>
- Brent, G. A., 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 3035-3043.
- Bucheli, T. D., Wettstein, F. E., Hartmann, N., Erbs, M., Vogelgsang, S., Forrer, H. R., & Schwarzenbach, R. P. (2008). Fusarium mycotoxins: overlooked aquatic micropollutants?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1029-1034.
- Capen, C. C., 1997. Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland. *Toxicologic Pathology*, 25, 39-48.
- Capen, C. C., Martin, S. L., 1989. The effects of xenobiotics on the structure and function of thyroid follicular and C-cells. *Toxicologic Pathology*, 17, 266-293.
- Collet, B., Simon, E., van der Linden, S., el Abdellaoui, N., Naderman, M., Man, H. Y., Middelhof, I., van der Burg, B., Besselink, H., Brouwer, A., 2019. Evaluation of a panel of *in vitro* methods for assessing thyroid receptor β and transthyretin transporter disrupting activities. *Reproductive Toxicology*, 96, 432-444.
- Demaegdts, H., Daminet, B., Evrard, A., Scippo, M. L., Muller, M., Pussemier, L., Callebaut, A., Vandermeiren, K., 2016. Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 107-116.

- DeVito, M., Biegel, L., Brouwer, A., Brown, S., Brucker-Davis, F., Cheek, A. O., Christensen, R., Colborn, T., Cooke, P., Crissman, J., Crofton, K., Doerge, D., Gray, E., Hauser, P., Hurley, P., Kohn, M., Lazar, J., McMaster, S., McClain, M., McConnell, E., Meier, C., Miller, R., Tietge, J., Tyl, R., 1999. Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 107, 407-415.
- Dohan, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, Ch. S., Carrasco, N., 2003. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Reviews*, 24, 48-77.
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C. S., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, 45, 75-92.
- Faber, J., H. Francis-Thomsen, I. B. Lumholtz, C. Kirkegaard, K. Sierbach-Nielsen, T. Friis., 1981. Kinetic studies of thyroxine 3,5,3'-triiodothyronine, 3,3',5'-triiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine, 3,3'-diiodothyronine and 3'-monoiodothyronine in patients with liver cirrhosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 53, 978-984.
- 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.
- Ganong, W. F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie*, 20. vyd. Praha: Galén, 890 s. ISBN 8072623117.
- Geven, E.J.W., Nguyen, N.K., van den Boogaart, M., Spanings, F.A.T., Flik, G., Klaren, P.H.M., 2007. Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus Peters*) and common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Journal of Experimental Biology*, 210, 4005–4015.
- Gillesby, B. E., Zacharewski, T. R., 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 3-14.
- Google Maps. [online] Google. [citace: 24.01.2021]. Dostupné z: <https://www.google.cz/maps/@29.8447508,95.3365678,8.5z>
- Grabic, R., Grabicová, K., Fedorova, G., Golovko, O., Randák, T., 2015. Metodika sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů. *Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany*, č. 158, 6-23 s.
- Gutleb, A. C., Meerts, I. A., Bergsma, J. H., Schriks, M., Murk, A. J., 2005. T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 231-238.
- Hennessey, J. V., 2003. Precise thyroxine dosing: Clinical requirements. *The Endocrinologist*, 13, 479-487.
- Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Uin, L. M., Himick, B. A., Eales, J. G., 1992. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine treatment on growth, appetite, food and protein utilization and body composition of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at low temperature. *Aquaculture*, 105, 175-190.

- Higgs, D. A., Fagerlund, U. H., Eales, J. G., McBride, J., 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73, 143-176.
- Hilscherova, K., Machala, M., Kannan, K., Blankenship, A. L., Giesy, J. P., 2000. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 7, 159-171.
- Houston Industries. [online] Greater Houston Partnership. [citace: 22.03.2021]. Dostupné z: <https://www.houston.org/why-houston/industries/all-industries>
- Hu, X., Shi, W., Zhang, F., Cao, F., Hu, G., Hao, Y., Wei, S., Wang, X., Yu, H., 2013. *In vitro* assessment of thyroid hormone disrupting activities in drinking water sources along the Yangtze River. *Environmental pollution*, 173, 210-215.
- Hughes DM, Gahl MJ, Graham CH, Grieb SL., 1999. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of Animal Science*, 77, 693–700.
- Hulbert, A. J., 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological Reviews*, 75, 519-631.
- Hurley, P. M., 1998. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, 106, 437-445.
- Chiamolera, M. L., Wondisford, F. E., 2009. Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*, 150, 1091-1096.
- Jiskra, J., 2011. Poruchy štítné žlázy: praktický přehled nejen pro laickou veřejnost. Praha: Mladá fronta, 46 s. Lékař a pacient. ISBN 978-80-204-2456-3.
- Jugan, M. L., Levy-Bimbot, M., Pomerance, M., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J. P., Levi, Y., 2007. A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicology in Vitro*, 21, 1197-1205.
- Jugan, M. L., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J. P., Levi, Y. (2009). *In vitro* assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 407, 3579-3587.
- Kirk, R. G., 2018. Recovering the principles of humane experimental technique: the 3Rs and the human essence of animal research. *Science, Technology, & Human Values*, 43, 622-648.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N., 2002. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 554-559.
- Kočí, V., Grabic, R., 2008. Vzorování stopových koncentrací rizikových látek ve vodárenské praxi. Sborník konference Pitná voda 2008. W&ET Team, České Budějovice, s. 89-94.

- Kohušová, K., Havel, L., Vlasák, P., Tonika, J., 2011. A long-term survey of heavy metals and specific organic compounds in biofilms, sediments, and surface water in a heavily affected river in the Czech Republic. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174, 555-572.
- Leusch, F. D., Khan, S. J., Laingam, S., Prochazka, E., Froschio, 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.
- Li, J., Ma, M., Wang, Z., 2008. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on thyroid hormone-mediated gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 159-167.
- Li, J., Ren, S., Han, S., Li, N., 2014. A yeast bioassay for direct measurement of thyroid hormone disrupting effects in water without sample extraction, concentration, or sterilization. *Chemosphere*, 100, 139-145.
- Li, J., Wang, Z., Ma, M., Peng, X., 2010a. Analysis of environmental endocrine disrupting activities using recombinant yeast assay in wastewater treatment plant effluents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84, 529-535.
- Li, N., Ma, M., Rao, K., Wang, Z., 2011. *In vitro* thyroid disrupting effects of organic extracts from WWTPs in Beijing. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 671-675.
- Li, N., Wang, D., Zhou, Y., Ma, M., Li, J., Wang, Z. 2010b. Dibutyl phthalate contributes to the thyroid receptor antagonistic activity in drinking water processes. *Environmental Science & Technology*, 44, 6863-6868.
- Límanová, Z., Pikner, R., Springer D., 2011. Doporučení pro laboratorní diagnostiku funkčních a autoimunních onemocnění štítné žlázy. *Česká společnost klinické biochemie*, s. 1-33.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2004. *Farmakologie a toxikologie: 47 tabulek*, 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 728 s. avicenum. ISBN 80-247-0836-1.
- Marek, J., Bartůňková, J., Broulík, P., Češka, R., Dítě, P., Dostál, C., Hradec, J., Holmerová, I., Husa, P., Jindrák, V., Kalvach, P., Kalvach, Z., Kašák, V., Kvasnička, J., Marešová, V., Marková, M., Nyč, O., Pavelka, K., Pelclová, D., Petrutelka, L., Spáčil, J., Skříčková, J., Svačina, Š., Škrha, J., Urbášková, P., Tesař, V., Vinař, O., Widimský, J., Zádák, Z., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 4. vyd. Praha: Grada Publishing, 808 s. ISBN 978-80-247-2639-7.
- Mapy.cz. [online]. © Seznam.cz, a.s.. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=15.6250752&y=49.8825590&z=7>
- Norris, D. O., 2007. *Vertebrate endocrinology*, 4th. Burlington, San Diego, London: Elsevier, 560 s. ISBN 978-0-12-088768-2.
- Nováková, D., Křenek, M., Vošmiková, K., Vlček, P., 2015. Rizikové faktory vzniku karcinomu štítné žlázy. *Vnitřní lékařství*, 61, 655-659.
- 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, 5421-5426.

- Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R., Wondisford, F. E., 2014. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 582.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., Stelzer, E. H. K., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 839-845.
- Pappa, T., Ferrara, A. M., Refetoff, S., 2015. Inherited defects of thyroxine-binding proteins. *Best practice & research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29, 735-747.
- Pech, M., 2017. Odhad rizik spojených s výskytem syntetických hormonů štítné žlázy ve vodě pro ryby – přehledová studie. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. Vedoucí práce doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.
- Raldúa, D., Babin, P. J., 2009. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environmental Science & Technology*, 43, 6844-6850.
- Roelfsema, F., Boelen, A., Kalsbeek, A., Fliers, E., 2017. Regulatory aspects of the human hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31, 487-503.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 238 s.
- Shi, W., Deng, D., Wang, Y., Hu, G., Guo, J., Zhang, X., Wang, X., Giesy, J. P., Yu, H., Wang, Z., 2016. Causes of endocrine disrupting potencies in surface water in East China. *Chemosphere*, 144, 1435-1442.
- Shi, W., Wang, X., Hu, G., Hao, Y., Zhang, X., Liu, H., Wei, S., Wang, X., Yu, H., 2011. Bioanalytical and instrumental analysis of thyroid hormone disrupting compounds in water sources along the Yangtze River. *Environmental Pollution*, 159, 441-448.
- Shi, W., Zhang, F. X., Hu, G. J., Hao, Y. Q., Zhang, X. W., Liu, H. L., Wei, S., Wang, X. R., Giesy, J. P., Yu, H. X., 2012. Thyroid hormone disrupting activities associated with phthalate esters in water sources from Yangtze River Delta. *Environment International*, 42, 117-123.
- Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., Yagi, T., 2010. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors α and β . *Toxicology in Vitro*, 24, 638-644.
- 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.
- Sigmaaldrich.com. [online]. [citace: 10.01.2021]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- Singh, G. R., Davison, B., Ma, G. Y., Eastman, C. J., Mackerras, D. E., 2019. Iodine status of Indigenous and non-Indigenous young adults in the Top End, before and after mandatory fortification. *Medical Journal of Australia*, 210, 121-125.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3, 94-99.

- Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., 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.
- Sonneveld, E., Riteco, J.A.C., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G., van der Burg, B., 2006. Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities. *Toxicological Sciences*. 89, 173-187.
- Springer, D., 2010. Štítná žláza. *Labor Aktuell*, 1, 4-9.
- Srivastava, P. P., Chowdhary, S., Jena, J. K., Raizada, S., Singh, A. K., Kumar, V., 2013. Synergistic effects of thyroxine and feeding regimes on early survival and biomass gain in Asian catfish, magur (*Clarias batrachus*, Linn.). *National Academy Science Letters*, 36, 265-270.
- SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, © 2010 [citace: 24.01.2021]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/>
- Stinckens, E., Vergauwen, L., Schroeder, A. L., Maho, W., Blackwell, B. R., Witters, H., Blust, R., Ankley, G. T., Covaci, A., Villeneuve, D. L., Knapen, D., 2016. Impaired anterior swim bladder inflation following exposure to the thyroid peroxidase inhibitor 2-mercaptobenzothiazole part II: Zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 173, 204-217.
- Sun, H., Shen, O. X., Xu, X. L., Song, L., Wang, X. R., 2008. Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology*, 249, 238-242.
- Svanfelt, J., Eriksson, J., Kronberg, L., 2010. Analysis of thyroid hormones in raw and treated wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6469-6474.
- Šauer, P., Švecová, H., Grabicová, K., Aydın, F. G., Mackuřák, T., Kodeš, V., Blytt, L. D., Henninge, 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.
- Talwar, G.P., Srivastava, L.M., 2006. *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, 3rd edition, Asoke K. Ghosh Prentice-Hall of India Private Limited, New Delhi, p. 847
- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V., Kittnar, O., Koudelová, J., Kuthan, V., Mareš, J., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J., Sedláček, J., Schreiber, M., Trávníčková, E., Wunsch, Z., 2003. *Lékařská fyziologie*, 4. vyd. Praha: Grada Publishing, 772 s. avicenum. ISBN 80-247-0512-5.
- 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, 5814-5820.
- Vávrová H., 2012. *Poruchy štítné žlázy u dětí: Od kolébky až po dospělost*. Praha: Mladá fronta, 46 s. Lékař a pacient. ISBN 978-80-204-2456-3.

- Vlček, P., Nováková, D., Kutra, R., 2017. Karcinomy štítné žlázy: současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Vnitřní Lékařství*, 63, 572-579.
- Vrana, B., Allan, I. J., Greenwood, R., Mills, G. A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 845-868.
- Yen, P. M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P., Xia, X., 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246, 121-127.
- Zamrazil, V., Čerovská, J., 2014. Jod a štítná žláza: optimální přívod jodu a poruchy z jeho nedostatku. Praha: Mladá fronta, 51 s. Edice AESKULAP. ISBN 978-80-204-3302-2.

8 Abstrakt

Xenobiotika vyskytující se ve vodním prostředí mohou mít hormonální aktivitu, a tudíž potenciál narušovat endokrinní systém a představovat tak riziko pro vodní organismy. Cílem této práce bylo provést první monitoring výskytu (anti-)thyroidních aktivit ve vzorcích z povrchových vod v České republice a následně identifikovat rizikové lokality výskytu (anti-)thyroidní aktivity.

Vzorky byly odebrány za pomoci pasivních vzorkovačů typu POCIS z 21 lokalit na 17-ti řekách v České republice. Detekce (anti-)thyroidních aktivit byla provedena za pomoci (anti-)TR β -CALUX *in vitro* biotestu, v němž byly buňky vystaveny referenčním látkám a řadě ředění extraktů z pasivních vzorkovačů. Jako referenční látka pro thyroidní aktivitu byl použit trijodthyronin a pro anti-thyroidní aktivitu byl použit deoxynivalenol.

Thyroidní aktivita nebyla nalezena na žádné ze sledovaných lokalit. Anti-thyroidní aktivita byla zjištěna u 38 % testovaných vzorků a naměřené aktivity se pohybovaly v rozmezí 89-310 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů deoxynivalenolu. V této práci bylo odhaleno 8 lokalit s anti-thyroidní aktivitou v povrchových vodách České republiky. Nejsilnější anti-thyroidní aktivity byly zjištěny na řekách Bílina, Odra a Svratka.

V této práci byly také testovány vzorky ze státu Texas (USA). Vzorky byly odebrány za pomoci pasivních vzorkovačů typu POCIS z 12 lokalit na 4 řekách. Thyroidní ani anti-thyroidní aktivity nebyly nalezeny.

Další výzkum by měl být zaměřen na identifikaci látek zodpovědných za tyto zjištěné anti-thyroidní aktivity v povrchových vodách v České republice a na vyhodnocení případného rizika, které mohou látky způsobující tyto aktivity pro vodní organismy představovat.

Klíčová slova: CALUX, *in vitro*, thyroidní aktivita, anti-thyroidní aktivita, POCIS

9 Abstract

Xenobiotics present in the aquatic environment can exhibit hormonal activity and thus they have potential to disrupt endocrine system of aquatic organisms. The aim of this study was to perform the first monitoring of the occurrence of (anti-)thyroid activity in samples from surface waters from the Czech Republic and subsequently identify potential hot-spots of the occurrence of (anti-)thyroid activity.

Samples were taken using passive samplers of the POCIS type from 21 localities in 17 rivers from the Czech Republic. Detection of (anti-)thyroid activity was performed using the (anti-)TR β -CALUX *in vitro* bioassay in which cells were exposed to reference substances and dilutions of extracts from passive samplers. Triiodothyronine was used as reference compound for thyroid activity, while deoxynivalenol was used as reference compound for anti-thyroid activity.

Thyroid activity was not found in any of the surface water samples. Anti-thyroid activity was found in 38 % of the tested samples and ranged from 89 to 310 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ equivalents of deoxynivalenol. In this study, eight localities with anti-thyroid activity were identified in surface waters of the Czech Republic. The strongest anti-thyroid activities were found in the rivers Břilina, Odra a Svratka.

In addition, samples from Texas (USA) were tested in this study. Samples were collected using passive samplers of the POCIS type from 12 localities in 4 rivers from Texas. Neither thyroid nor anti-thyroid activity was found in any of the surface water samples.

Further research is needed to determine the compounds responsible for the detected anti-thyroid activities in Czech surface waters and to assess potential risk that the compounds responsible for these activities may pose to aquatic organisms.

Keywords: CALUX, *in vitro*, thyroid activity, anti-thyroid activity, POCIS