

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

Diplomová práce

**Zjišťování potenciálu chemických látek používaných
k ochraně proti ultrafialovému záření (UV filtrů) způsobovat
anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí**

Autor: Bc. Tereza Směšná

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

Konzultanti diplomové práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.
M.Sc. Beatrice Kyei Amankwah

Studijní program a obor: N4106, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2. ročník

České Budějovice, 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Datum:

.....

Bc. Tereza Směšná

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Ing. Pavlu Šauerovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a za strávený čas při zpracování diplomové práce. Mé další poděkování patří mým konzultantkám M.Sc. Beatrice Kyei Amankwah za pomoc při testování a vyhodnocování výsledků a doc. Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. za odborné rady. Ráda bych též touto formou poděkovala Ing., Bc. Kateřině Grabicové, Ph.D. za provedení chemické analýzy a její vyhodnocení.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza SMĚŠNÁ**
Osobní číslo: **V21N010P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Téma práce: **Zjišťování potenciálu chemických látek používaných k ochraně proti ultrafialovému záření (UV filtrů) způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Chemické látky sloužící k ochraně proti ultrafialovému (UV) záření, známé také jako UV filtry, jsou celosvětově produkovány ve velkém množství. UV filtry nalézají široké využití v mnoha produktech denní potřeby (například v opalovacích krémech), ale jsou také využívány v průmyslu a jsou přítomny v mnoha různých výrobcích (například plasty, hračky či nábytek). Studie z různých částí světa ukazují, že se UV filtry v důsledku jejich používání dostávají do vodního prostředí ve vysokých koncentracích. Tyto látky se mohou do vodního prostředí dostávat z městských a průmyslových čistíren odpadních vod, se splachy z městských oblastí a z venkovních plováren). Některé z těchto chemikálií mohou představovat riziko pro vodní organismy kvůli jejich potenciálu negativně narušit endokrinní systém. U několika organických UV filtrů již bylo zjištěno, že mají anti-progestagenní aktivitu, tzn. blokují progesteronový receptor. Anti-progestagenní aktivita byla detekována i v povrchových vodách v různých zemích světa, ale látky způsobující tuto aktivitu nebyly dosud identifikovány. UV filtry by mohly patřit mezi významné přispěvatele.

Cílem diplomové práce bude charakterizovat potenciál environmentálně relevantních organických UV filtrů způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí.

Metodický postup: Budou odebrány vzorky odpadní (přítok a odtok ze dvou čistíren odpadních vod) a povrchové vody (recipient zaústění odtoku z čistíren odpadních vod a čtyři přírodní koupaliště). Tyto vzorky vody budou extrahovány pomocí extrakce na pevné fázi. Environmentální extrakty vzorků vody a spektrum UV filtrů bude testováno pomocí anti-PR-CALUX in vitro biotestu pro detekci antagonistů progesteronového receptoru. Jako referenční látka bude použit syntetický anti-progestagen mifepriston. Vzorky budou vždy otestovány na cytotoxicitu pomocí MTT testu, aby byl vyloučen toxický vliv vzorků na životnost buněk použitých v anti-PR-CALUX in vitro testu. Tato data budou dána do souvislosti s výsledky chemických analýz prováděných na FROV JU v laboratoři environmentální chemie a biochemie v simultánně odebíraných vzorcích na těchto lokalitách. V případě detekce přítomnosti aktivit indukujících výskyt antagonistů progesteronového receptoru v odpadních a povrchových vodách bude zjišťován: 1) potenciální zdroj znečištění podle dostupných informací o sledovaných lokalitách a 2) potenciál UV filtrů způsobovat anti-progestagenní aktivitu (změřenou na daných lokalitách) na základě jejich relativní síly (podle výsledků měření čistých látek) a jejich koncentrací (data získaná chemickou analýzou).

Rozsah pracovní zprávy: **40-90 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), pp.708-717.

Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kroupova, H.K., Grabic, R., Randak, T., 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, pp.41-47.

Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L., 2016. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environment International*, 86, pp.24-44.

Schreurs, R.H., Sonneveld, E., Jansen, J.H., Seinen, W., van der Burg, B., 2005. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences*, 83, pp.264-272.

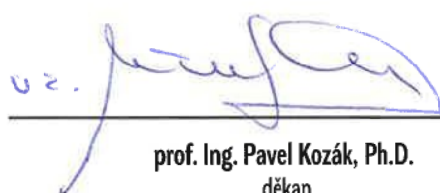
Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kroupová, H.K., 2018. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water Research*,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

Thia, E., Chou, P.H., Chen, P.J., 2020. In vitro and in vivo screening for environmentally friendly benzophenone-type UV filters with beneficial tyrosinase inhibition activity. *Water Research*, 185, p.116208.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Šauer, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultanti diplomové práce: **doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
MSc. Beatrice Kyei Amankwah

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2023**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSKÁ A OCHRANY VOD
Záběhčí 728/II
389 25 Vodňany (2)


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

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	Znečištění vodního prostředí biologicky aktivními mikropolutanty.....	9
2.1.1	Látky s progestagenní aktivitou	10
2.1.2	Anti-progestageny	11
2.1.2.1	UV filtry	12
2.1.2.2	UV filtry v kosmetice.....	13
2.1.2.3	UV filtry v průmyslu.....	13
2.1.2.4	UV filtry ve vodním prostředí	14
2.1.2.5	Odstranění UV filtrů z vodního prostředí	16
2.1.2.6	UV filtry s anti-progestagenní aktivitou	16
2.2	<i>In vitro</i> testy	22
2.3	<i>In vitro</i> testy pro detekci anti-progestagenní aktivity	22
2.3.1	CALUX	22
2.3.1.1	(Anti-)PR-CALUX	23
2.4	Chemické analýzy pro detekci UV filtrů.....	25
3	Materiál a metodika.....	26
3.1	Chemikálie a materiál.....	26
3.2	Odběr a převoz vzorků	26
3.3	Popis vzorkovaných lokalit	27
3.3.1	Odběr vzorků povrchové vody z rybníků.....	27
3.3.2	Odběr vzorků odpadních a povrchových vod na ČOV v Táboře	28
3.4	Extrakce vzorků	29
3.5	Pasážování buněčných kultur	31
3.6	<i>In vitro</i> testy	33
3.6.1	(Anti-)PR-CALUX <i>in vitro</i> biotest	33

3.7	Nasazování buněk na mikrotitrační destičku.....	34
3.8	Měření (anti-)progestagenních aktivit.....	35
3.9	Testování cytotoxicity	37
3.10	Analýza dat	38
3.10.1	Vyhodnocování dat pro detekci hormonální aktivity	38
3.10.2	Vyhodnocování výsledků testu cytotoxicity	38
3.10.3	Příspěvní UV filtrů k anti-PR aktivitě ve vodním prostředí.....	39
4	Výsledky	41
4.1	Testování cytotoxicity	41
4.2	Anti-progestagenní aktivita UV filtrů	41
4.3	(Anti-)progestagenní aktivita v odpadních a povrchových vodách	43
4.4	Chemická analýza UV filtrů v odpadních a povrchových vodách	44
4.5	Příspěvní UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě ve vodním prostředí	46
5	Diskuse	48
6	Závěr.....	57
7	Přehled použité literatury.....	59
8	Přílohy	69
9	Abstrakt	83
10	Abstract.....	85

1 Úvod

V posledních letech je předmětem intenzivního výzkumu znečišťování vodního prostředí chemickými látkami. Vzniklé znečištění může ohrožovat vodní ekosystém a také člověka jako vrchol potravního řetězce.

Jedny z mnoha chemických látek, které se dostávají do vodního prostředí jsou látky sloužící k ochraně proti ultrafialovému záření (UV) a jsou známé také jako UV filtry. UV filtry jsou celosvětově produkovány ve velkém množství díky jejich širokému spektru využití. Používají se v prostředcích denní péče (například opalovací krémy, šampony a další), ale jsou také rozsáhle využívány v průmyslu, což vede k jejich přítomnosti v mnoha různých výrobcích jako jsou například plasty, hračky a nábytek. Studie z různých částí světa ukazují, že se UV filtry v důsledku jejich využívání dostávají do vodního prostředí někdy i ve vysokých koncentracích. Do vodního prostředí se mohou tyto látky dostávat se splachy z městských oblastí, z městských a průmyslových čistíren odpadních vod a z venkovních plováren.

Některé z těchto UV filtrů mohou představovat riziko pro vodní organismy, díky jejich potenciálu negativně narušovat endokrinní systém. U některých organických UV filtrů byla prokázána anti-progestagenní aktivita, tzn. blokace progesteronového receptoru. Tato anti-progestagenní aktivita byla detekována v povrchových vodách v různých zemích světa, ale doposud nebyly identifikovány látky zodpovědné za tuto aktivitu, což indikuje, že by UV filtry mohly patřit mezi významné přispěvatele k této aktivitě.

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat potenciál environmentálně relevantních organických UV filtrů způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí.

2 Literární přehled

2.1 Znečištění vodního prostředí biologicky aktivními mikropolutanty

Jedním z klíčových environmentálních problémů, kterému lidstvo v dnešní době čelí, je rostoucí celosvětová kontaminace sladkovodních i slanovodních systémů tisíci průmyslových a přírodních chemických látek (Schwarzenbach a kol., 2006). Tyto sloučeniny mohou působit jako endokrinní disruptory, tedy látky s potenciálem narušit endokrinní systém. Předpokládá se, že endokrinní systém dokáže narušit široká škála látek, jak přírodního, tak antropogenního původu. Patří mezi ně například přírodní a syntetické hormony, léčiva, dioxiny, polychlorované bifenyly, pesticidy, látky přítomné v plastech a mnoho dalších látek (Schug a kol., 2011; Tabb a Blumberg, 2006). Do skupiny endokrinních disruptorů se řadí i přírodní chemikálie, přirozeně se vyskytující v životním prostředí, které se mohou nacházet například v lidské i zvířecí potravě (například fytoestrogeny) (Kuiper a kol., 1998; Dickerson a Gore, 2007).

Endokrinní disruptory mohou působit na různých úrovních endokrinního systému například prostřednictvím jaderných receptorů, nejaderných receptorů steroidních hormonů, nesteroidních receptorů (mezi které patří například receptory neurotransmiterů – serotoninový a dopaminový receptor), dále to mohou být dráhy zapojené do biosyntézy nebo metabolismu steroidů a mnoho dalších mechanismů, které působí na endokrinní a reprodukční systém (Diamanti-Kandarakis a kol., 2009).

Některé látky z kategorie endokrinních disruptorů byly navrženy tak, aby měly dlouhé poločasy rozpadu, což je prospěšné pro jejich průmyslové využití, ale je to nežádoucí, pokud se dostanou do životního prostředí a mohou negativně působit na exponované živočichy. Tyto látky se v prostředí nerozkládají snadno a může docházet k jejich rozkladu na metabolity, které mohou být toxičtější než byla původní mateřská sloučenina (Calafat a Needham, 2007).

Jedním ze způsobů narušení endokrinního systému může být napodobení hormonů a jejich vazba na receptor (agonistická aktivita) nebo zablokování receptoru (antagonistická aktivita) a tím může dojít k narušení normální funkce hormonů v těle. Endokrinní

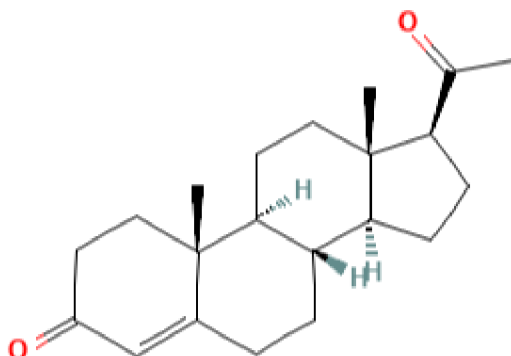
disruptory mohou působit prostřednictvím jaderných hormonálních receptorů, jakými jsou: estrogenní receptory (ER), androgenní receptory (AR), thyroïdní receptory (TR), progesteronové receptory (PR) a další receptory (Diamanti-Kandarakis a kol., 2009).

2.1.1 Látky s progestagenní aktivitou

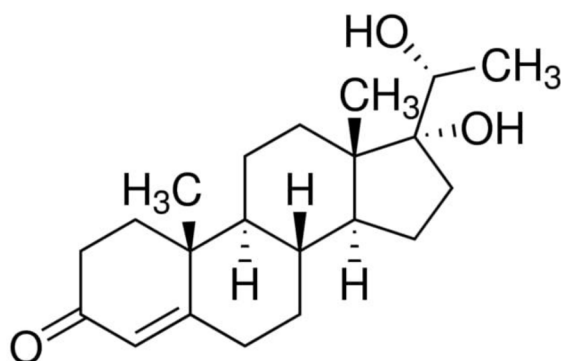
Přítomnost progestagenních látek v povrchových vodách může snižovat celkovou anti-progestagenní aktivitu směsi, pokud není měřena ve frakcích v rámci efektem řízené analýzy (Šauer a kol., 2018a).

Přírodní progestagenní látky

Do kategorie přírodních látek s progestagenní aktivitou se na první místo řadí progesteron a jeho metabolity. Progesteron (Obr. č. 1) je lipofilní steroidní hormon (Graham a Clarke, 1997). U lidí reguluje zrání oocytů, menstruační cyklus a uplatňuje se při udržení těhotenství prostřednictvím vazby a aktivace na progesteronovém receptoru (Elger a kol., 2003; Mangelsdorf a kol., 1995). Progesteron je produkován zejména ve vaječnicích, ale také v určité míře v kůře nadledvin či ve varlatech (Spitz a Chwalisz, 2000). U ryb se místo progesteronu uplatňuje jako hlavní přírodní ligand progesteronového receptoru především hormon $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy progesteron (DHP) (Obr. č. 2). Tento hormon u ryb reguluje spermiaci, zvyšuje pohyblivost spermií a působí jako feromon u samců kaprovitých ryb (Scott a kol., 2010).



Obr. č. 1 Strukturní vzorec progesteronu (zdroj: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Obr. č. 2 Strukturní vzorec 17 α ,20 β -dihydroxy progesteronu (zdroj: www.sigmaaldrich.com)

Syntetické progestagenní látky

Syntetické progestiny byly navrženy tak, aby napodobovaly funkci přirozeného progesteronu a fungují jako agonisté progesteronového receptoru (Stanczyk a kol., 2013). Používají se v antikoncepčních přípravcích, protože jsou schopny inhibovat ovulaci a proliferaci endometria, dále také nacházejí využití v jiných hormonálních přípravcích (Elger a kol., 2003; Sitruk-Ware, 2008; Zeilinger a kol., 2009). Syntetické progestiny mají schopnost inhibovat ovulaci a proliferaci endometria. Syntetické progestiny jsou strukturálně odvozené buď od progesteronu, testosteronu nebo spironolaktону (Africander a kol., 2011; Kumar a kol., 2015), ale většina syntetických progestinů může svou silou konkurovat přirozeným progestagenním látkám a některé z nich jsou i výrazně silnější agonisté progesteronového receptoru (Besse a Garric, 2009).

2.1.2 Anti-progestageny

Anti-progestageny jsou látky schopné se navázat a poté blokovat progesteronový receptor, a tudíž mít anti-progestagenní aktivitu. Na rozdíl od progestagenů nedochází po vazbě těchto látek na progesteronový receptor k iniciaci genové exprese, ale vazebná místa na tomto receptoru jsou blokována a může docházet k narušení funkce přirozených progestagenních hormonů, jako jsou progesteron a pregnenolon. U některých chemických látek se v medicíně využívá jejich anti-progestagenní aktivity (Knutson a Lange, 2014).

Příkladem může být nejsilnější anti-progestagenní látka mifepriston (značen také jako RU-486) (Cadepond a kol., 1997). Určité látky vykazují v některých tkáních progestagenní aktivitu, ale v jiných tkáních zase anti-progestagenní aktivitu a nazývají se selektivní modulátory progesteronového receptoru (SPRM). Nejznámějším SPRM je ulipristal acetát, který má na buněčné linii PR-CALUX téměř stejnou relativní sílu v testu na antagonismus progesteronového receptoru, jako má mifepriston (Šauer a kol., 2018a).

Řada různých látek má anti-progestagenní aktivitu, ale nebyly vyvíjeny s cílem ji vykazovat. Jedná se převážně o různé syntetické látky (například bromované retardanty hoření, UV filtry, polycyklické mošusové sloučeniny) (Schreurs a kol., 2005; Hamers a kol., 2006), které se dostávají do vodního prostředí a také některé látky přírodního původu (steroidní látky) a dochází tak k expozici vodním organismům.

2.1.2.1 UV filtry

UV filtry jsou chemické látky, které své uplatnění našly v kosmetice, přípravcích denní potřeby a jsou také obsaženy v široké škále produktů jako jsou plasty, lepidla, barvy. Jejich funkce je zpomalení či zabránění degradace způsobované UV zářením (Brooke a kol., 2008; Gackowska a kol., 2014). UV filtry je možno rozdělit na základě jejich mechanismu účinku na anorganické (fyzikální účinek – odraz a rozptyl záření) a organické (chemický účinek – absorpce, zejména UV-B záření) (Stiefel a Schwack, 2015).

Organické UV filtry mohou být řazené do různých skupin podle jejich chemické struktury. Jedná se o deriváty benzofenonu, salicyláty, cinnamáty, deriváty kafru, kyselina p-aminobenzoová a její deriváty. Vlastností organických UV filtrů je absorpce specifické vlnové délky (Giokas a kol., 2007). Organické UV filtry nejsou fotostabilní, působením UV záření dochází k jejich inaktivaci (Maier a kol., 2001), a tím ztrácejí své ochranné vlastnosti (Diffey a kol., 2000). Jejich fotostabilitu lze zvýšit kombinací dvou a více organických UV filtrů (Nash a Tanner, 2014). Ve výzkumech probíhajících na pokusných zvířatech bylo prokázáno, že některé organické UV filtry (4-MBC, benzofenon-3, homosalat, ethylhexyl methoxycinnamát, octyl-dimetyl-PABA) mají estrogení (Schlumpf a kol., 2001; Tinwell a kol., 2002) a anti-thyroidní aktivitu (Schmutzler a kol., 2004).

Anorganické UV filtry existují pouze dva, oxid titaničitý (TiO_2) a oxid zinečnatý (ZnO) (Osterwalder a kol., 2014). Vlastností anorganických UV filtrů je poskytnutí ochrany širokého spektra, díky jejich vlastnostem jako jsou odrážet, rozptylovat a absorbovat UV záření (Manaiia a kol., 2013). Desítky let probíhající výzkumy ukázaly, že jsou tyto anorganické UV filtry bezpečné pro jejich použití a účinné při odrážení UV záření (Smijs a Pavel, 2011). Nicméně chemické UV filtry absorbují malé spektrum UV záření a přeměňují UV záření na tepelnou energii prostřednictvím chemické reakce, z tohoto důvodu musí být různé chemické UV filtry kombinovány, aby byla zajištěna dostatečná ochrana proti slunečnímu záření (Siller a kol., 2018).

Další možné dělení těchto látek je na základě toho, které UV záření jsou schopné absorbovat. Existuje celá řada organických i anorganických UV filtrů, které při jejich kombinaci umožňují vyváženou ochranu proti UV-A a UV-B záření. Důležité vlastnosti UV filtrů jsou tepelná stabilita i fotostabilita a voděodolnost (Stiefel a Schwack, 2015).

2.1.2.2 UV filtry v kosmetice

Škodlivé účinky UV záření na kůži jsou obecně známé. Hlavním rizikovým faktorem je zvýšená pravděpodobnost výskytu karcinomu kůže. Proti tomuto záření je možné použití přípravků s UV filtry (Miletín, 2011). Kromě opalovacích krémů se UV filtry vyskytují i v řadě dalších produktů denní péče. Patří mezi ně produkty pro péči o pleť (jako jsou líčidla a krémy, vody po holení), péče o rty a krémy na ruce. Toto jsou přípravky, které se používají většinou současně a pravidelně (Manová a kol., 2013). Vzniká tak riziko dlouhodobých účinků těchto látek, které mohou být užívány řádově v desítkách let a jejich účinky se mohou projevit až po chronické expozici těmto látkám.

Nejdůležitější složkou opalovacích krémů jsou UV filtry s rozsahem absorpce světla pro UV-A (400-320 nm) a pro UV-B (320-280 nm) (Díaz-Cruz a Barceló, 2009). Tyto vlnové délky jsou totiž dostatečně silné na to, aby poškodily DNA a přispívaly tím k predispozici rakoviny lidské kůže (Osterwalder a kol., 2014).

2.1.2.3 UV filtry v průmyslu

V průmyslovém odvětví se používají UV stabilizátory a absorbéry, které zpomalují fotodegradaci a prodlužují životnost produktu. Vzhledem k jejich velmi podobné funkci

(s UV filtry používanými v kosmetice) se pro tyto látky používá souhrnný název UV filtry (Carve a kol., 2021). UV filtry obsahují heterogenní skupinu molekul charakterizovanou konjugovanými aromatickými systémy, které mohou absorbovat UV-A a UV-B záření. Díky této vlastnosti jsou vhodné jako přísady do polymerů a pigmentů používaných při výrobě mnoha průmyslových produktů. Používají se například při výrobě obalových materiálů, barev, skel, lepidel a dalších produktů, které potřebují ochranu před UV světlem (Gago-Ferrero a kol., 2012).

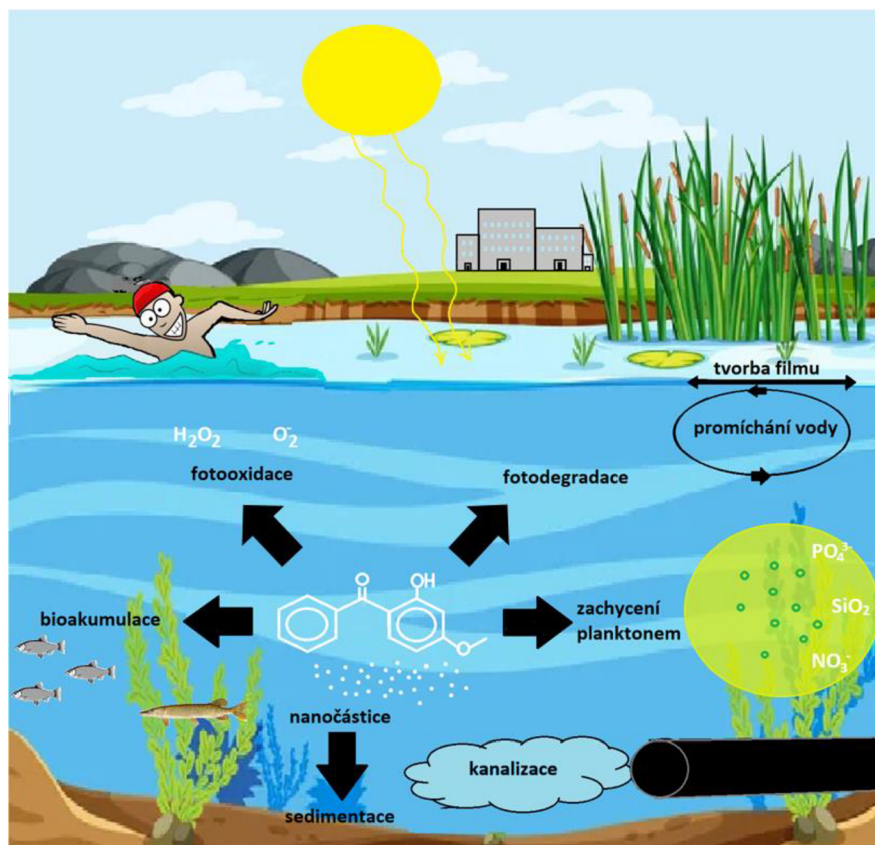
Nejrozšířenějšími UV filtry používanými v průmyslovém odvětví jsou benzofenolové UV filtry, používající se jako přísady do plastových materiálů, aby došlo k zabránění degradace jejich plastového polymeru fotooxidací (Runde a kol., 2022).

2.1.2.4 UV filtry ve vodním prostředí

UV filtry jsou produkovány ve velkém množství (více než 100 000 tun ročně) (Shaath, 2005). Bylo zjištěno, že dochází k uvolňování těchto látek z používaných produktů a v důsledku toho se dostávají do vodního prostředí. Tyto chemikálie mohou mít potenciál bioakumulace a biomagnifikace ve vodních ekosystémech i v potravních sítích (Diaz-Cruz a kol., 2008). V roce 2007 byly tyto látky uznané orgány EU jako důležité organické kontaminanty vodního prostředí (European Parliament, 2007) a některé z nich (butyl methoxydibenzoylmetan znám také jako avobenzon, oktokrylen, benzofenon-3) byly v roce 2022 zařazeny na tzv. watch list látek, (budou v budoucnu pravidelně sledovány ve vodním prostředí v rámci EU Water Framework) (Water News Europe – online).

UV filtry se mohou do vodního prostředí dostávat prostřednictvím různých zdrojů. Jedním z možných způsobů kontaminace vodního prostředí je jejich smývání při koupání ve veřejných koupalištích (UV filtry obsažené v kosmetice), dále pak vypouštění čištěných odpadních vod a z odtoků z čistíren odpadních vod, které obsahují průmyslové odpadní vody (výroba a použití UV filtrů) (Daughton a Ternes, 1999; Poiger a kol., 2004) a komunální odpadní vody (např. z praní prádla, smývání z pokožky během sprchování) (Balmer a kol., 2005; Poiger a kol., 2004). V povrchových vodách dochází k rozdělení mezi vodním sloupcem a sedimentem (Obr. č. 3) v závislosti na jejich hydrofobicitě, která se odhaduje pomocí hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol-voda ($\log K_{ow}$). Většina UV filtrů je pouze mírně až středně rozpustných ve vodě a kvůli tomu mají tendenci se

kumulovat v sedimentech a v organismech (Ramos a kol., 2015; Fent a kol., 2010, Gago-Ferrero a kol., 2012). Tyto látky jsou zároveň schopny se bioakumulovat v živých organismech a biomagnifikovat do vyšších trofických úrovní v rámci potravního řetězce (Sánchez-Quiles a Tovar-Sánchez, 2015).



Obr. č. 3 UV filtry ve vodním prostředí (autor: Ing. Milan Závorka)

UV filtry organického i anorganického původu mohou být slunečním zářením přeměněny do excitovaného stavu. Vlivem excitace dochází ke vzniku zvýšené koncentrace reaktivních forem kyslíku, které mohou mít toxické účinky na fytoplankton (Sánchez-Quiles a Tovar-Sánchez, 2015).

Přítomnost UV filtrů byla zjištěna i ve vodních organismech. Ve Švýcarsku byly na přítomnost UV filtrů testovány druhy jako: jelec (*Coregonus sp.*), plotice obecná (*Rutilus rutilus*), okoun obecný (*Perca fluviatilis*). Koncentrace UV filtrů v těchto rybách byly nízké, ale přesto detekovatelné, zejména 4-methylbenzyliden kafr v koncentraci $166 \text{ ng} \times \text{g}^{-1}$ tuku (Balmer a kol., 2005). O rok později probíhalo testování na pstruzích obecných (*Salmo trutta*). V jejich svalovině byl naměřen 4-methylbenzyliden kafr v koncentraci

1800 ng × g⁻¹ a oktokrylen v koncentraci 2 400 ng × g⁻¹ (Buser a kol., 2006). Akumulace těchto látek v rybách je znepokojivá, bylo prokázáno, že organické UV filtry a jejich metabolity ovlivňují endokrinní systém, převážně mají vliv na estrogény (Schlumpf a kol., 2001, Kunz a Fent, 2006) u kterých bylo prokázáno, že způsobují zvýšený výskyt intersexu nebo feminizaci samců ryb (Jobling a kol., 2009; Kidd a kol., 2007).

2.1.2.5 Odstranění UV filtrů z vodního prostředí

UV filtry jsou z hlediska výroby a používání relativně nové, to znamená, že biota a zejména mikroorganismy zatím nepřizpůsobily své metabolické dráhy tak, aby tyto látky zmetabolizovaly a snížily tak jejich koncentrace v prostředí, nicméně mohou vznikat i toxičtější metabolity (Janssen a kol., 2005). UV filtry podléhají degradaci způsobené vystavením slunečnímu záření a reakcí s dezinfekčními přípravky jako je například chlór, ale vznikají tím chlorované vedlejší produkty, které jsou často toxičtější než původní UV filtry (Santos a kol., 2012).

2.1.2.6 UV filtry s anti-progestagenní aktivitou

Doposud byla zjištěna anti-progestagenní aktivita UV filtrů uvedených v tabulce Tab. č. 2. V této diplomové práci bylo testováno, zda mohou i další látky ze skupiny UV filtrů vykazovat anti-progestagenní aktivitu a jednalo se o UV filtry uvedené v Tab. č. 1.

Charakterizace jednotlivých UV filtrů:

Benzofenon-3

Benzofenon-3, také známý jako oxybenzon, je pevná látka používaná v kosmetice. Jedná se o látku dobře rozpustnou ve většině organických rozpouštědel (www.encyklopedie.bioooo.cz). Používá se i jako světelný stabilizátor v plastech, nátěrech (Pfaendner, 2006) a v obalech na potraviny (Suzuki a kol., 2005). Několik studií prokázalo, že tento UV filtr vykazuje tendenci pronikat lidskou kůží a byl nalezen v moči, a dokonce i v mateřském mléce (Gonzalez a kol., 2006; Janjua a kol., 2008). U benzofenonu-3 bylo prokázáno, že může mít potenciál narušovat endokrinní systém (Schlumpf a kol., 2001; Kunz a kol., 2006; Krause a kol., 2012). Nařízením Evropského

parlamentu a rady č. 1223/2009 Sb. je povolena koncentrace v přípravcích denní péče 10 %.

Benzofenon-8

Benzofenon-8 je derivát benzofenonu a používá se v opalovacích přípravcích proti UV-B a UV-A záření (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). U benzofenonu-8 byla prokázána extrémní reaktivita při vystavení volnému aktivnímu chlóru a byla dokázána jeho fotostabilita při vystavení umělému slunečnímu záření (Santos a Esteves da Silva, 2019). Nejvyšší povolená koncentrace v opalovacích přípravcích činí 3 % (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Benzyl salicylát

Benzyl salicylát je látka synteticky vyrobená esterifikací benzyl alkoholu a kyseliny salicylové. Je to bezbarvá látka charakteristická sladkou bylinnou až květinovou vůní. Na pokožce může vyvolat alergickou reakci, silné podráždění pokožky i očí a může přispívat k tvorbě pigmentových skvrn (www.encyklopedie.biooo.cz). Celosvětové využívání této látky je větší než 1 000 tun za rok (Lapczynski a kol, 2007).

Ethylhexyl salicylát

Ethylhexyl salicylát je látka, která se vyrábí kondenzací kyseliny salicylové s 2-ethylhexanolem. Používá se v přípravcích určených na ochranu proti UV-B záření, zároveň je využívána jako stabilizátor avobenzonu. V přípravcích na ochranu proti UV záření je používána v nízkých koncentracích, přibližně 5 % z celkového objemu přípravku (www.encyklopedie.biooo.cz).

Homosalát

Homosalát je sloučenina salicylátu neboli kyseliny salicylové, používá se v přípravcích na ochranu proti slunečnímu záření, konkrétně proti UV-B záření (Serpone a kol., 2007; Shaath, 2010). Maximální povolená koncentrace této látky v přípravcích je 15 % (Caswell, 2001).

Ethylhexyl methoxycinamát

Ethylhexyl methoxycinamát je derivát kyseliny skořicové, používaný za účelem zvýšení ochranného faktoru před slunečním zářením a voděodolnosti v opalovacích krémech, dále se používá v lacích na vlasy a nehty, přípravcích na vlasy, parfémeh a dalších přípravcích. Tento UV filtr poskytuje ochranu proti UV-B záření, proti UV-A záření je neúčinný (www.encyklopedie.biooo.cz). Studie ukázaly, že tento UV filtr může mít negativní vliv na endokrinní systém organismů (Ramos a kol., 2015).

Isoamyl methoxycinamát

Isoamyl methoxycinamát je sloučenina vytvořená z kyseliny skořicové, vyskytuje se i v přírodě v kořenech indické rostliny Galangal (www.encyklopedie.biooo.cz). Do kosmetických přípravků se může přidávat v 10% koncentraci (Stiefel a Schwack, 2015; www.pubchem.ncbi.nih.gov). U citlivějších jedinců může tato látka vyvolávat alergickou a fotoalergickou reakci (Heurung a kol., 2014).

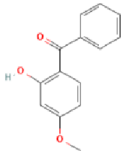
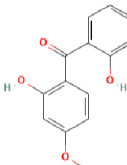
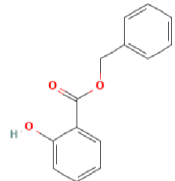
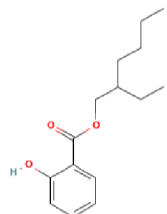
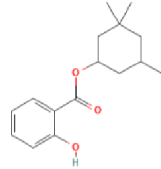
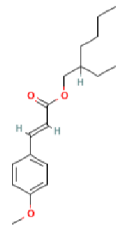
Oktokrylen (OCT)

Oktokrylen je UV filtr řazený do skupiny derivátů kyseliny skořicové. Po použití může pronikat do kůže a působit v ní jako fotosenzibilátor, což může vyvolávat zvýšenou produkci volných radikálů, které mohou napadat zdravé buňky, tím vyvolat poškození DNA a přispívat k výskytu melanomu (www.encyklopedie.biooo.cz). Nejvyšší přípustná koncentrace v produktech denní péče činí 10 % (Nařízení vlády č. 174/1998).

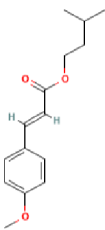
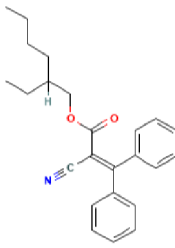
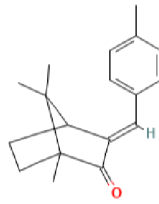
4-methylbenzyliden kafr (4-MBC)

4-methylbenzyliden kafr je organický derivát kafru, který se používá v kosmetice převážně proti UV-B záření. Disponuje dobrou rozpustností v olejích a tucích. Podle Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1223/2009 Sb. je povolena koncentrace v kosmetických přípravcích kolem 4 %. (Kratochvíl – online; Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1223/2009 Sb.; Sánchez-Quiles a Tovar-Sánchez, 2015).

Tab. č. 1 Fyzikálně-chemické charakteristiky testovaných UV filtrů

Název UV filtru	Zkratka	Molární hmotnost (g × mol ⁻¹)	Sumární vzorec	Strukturální vzorec (zdroj: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
Benzofenon-3	BP-3	228,2	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	
Benzofenon-8	BP-8	244,3	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	
Benzyl salicylát	BZS	228,2	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	
Ethylhexyl salicylát	EHS	250,3	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	
Homosalát	HMS	262,3	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	
Ethylhexyl methoxycinnamát	EHMC	290,4	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	

Tab. č. 1 – pokračování: Fyzikálně-chemické charakteristiky testovaných UV filtrů

Název UV filtru	Zkratka	Molární hmotnost (g × mol ⁻¹)	Sumární vzorec	Strukturální vzorec (zdroj: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
Isoamyl methoxycinnamát	IAMC	248,3	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	
Oktokrylen	OCT	361,5	C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	
4-methylbenzyliden kafr	4-MBC	254,4	C ₁₈ H ₂₂ O	

Tab. č. 2 Fyzikálně-chemické vlastnosti UV filtrů s anti-progestagenní aktivitou uváděné v literatuře

Název UV filtru	Zkratka	Molární hmotnost (g × mol ⁻¹)	Sumární vzorec	Log Kow	<i>In vitro</i> biotest	IC ₅₀ (μM)	Citace
3-Benzyliden kafr	3-BC	240,4	C ₁₇ H ₂₀ O	5,37	Anti-PR-CALUX	0,4	Schreurs a kol. (2005)
4-Methylbenzyliden kafr	4-MBC	254,4	C ₁₈ H ₂₂ O	5,92	Anti-PR-CALUX	0,9	Schreurs a kol. (2005)
Ethylhexyl methoxycinnamát	EHMC	290,4	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	6,1	Anti-PR-CALUX	0,5	Schreurs a kol. (2005)
Homosalát	HMS	262,3	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	6,16	Anti-PR-CALUX	3,0	Schreurs a kol. (2005)
Benzofenon-3	BP-3	228,2	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	3,79	Anti-PR-CALUX	5,2	Schreurs a kol. (2005)
					YPS	11,8	Thia a kol. (2020)
Benzofenon-8	BP-8	244,3	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	3,82	YPS	15,9	Thia a kol. (2020)

YPS = Yeast progesterone screen (reportérový test na kvasinkách)

2.2 *In vitro* testy

V roce 1959 byly Russelem a Burchem navrženy zásady principů 3R do nichž se tyto *in vitro* testy řadí. Principy jsou široce přijímány a brány jako nejlepší způsob k dosažení kvalitních vědeckých výsledků. Principy 3R v sobě zahrnují skupiny Replacement, Refinement a Reduction (Russel a Burch, 1959).

Replacement je princip, který má za cíl používání metod, kterými se nahrazují testy na zvířatech. Do této skupiny testů patří již zmíněné *in vitro* testy, které používají pouze části živých organismů jako jsou např.: bílé krvinky, tkáňové kultury, jaterní buňky a testy na nižších organismech (bakterie, houby, prvoci, semena rostlin). **Refinement** je skupina testů pracující na takovém principu, aby nedocházelo k utrpení zvířat či bylo sníženo na nejnižší možnou úroveň. **Reduction** je princip podle kterého, má být při pokusech použit co nejnižší možný počet laboratorních zvířat (Russel a Burch, 1959).

Opakem *in vitro* testů jsou *in vivo* testy. *In vivo* testy jsou prováděné přímo na zvířatech, v převážné většině v nich je zvíře usmrceno. *In vitro* testy jsou v porovnání s *in vivo* testy rychlejší, jednodušší na provedení a z finančního hlediska jsou výhodnější pro jejich nižší náklady a potřebě laboratorního vybavení, vzhledem k vysokému počtu zanalyzovaných vzorků a v neposlední řadě při nich nedochází k utrpení zvířat (Kirkland a kol., 2005; Pampaloni a kol., 2007).

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

2.3.1 CALUX

CALUX z anglického Chemically Activated LUCiferase gene eXpression jsou druhem biotestů, které jsou založené na expresi luciferázového genu. Tyto testy jsou používány ve výzkumu pro charakterizaci biologické aktivity chemických kontaminantů v environmentálních vzorcích (Sonneveld a kol., 2005). Analýzy pomocí CALUX biotestů poskytují informace o specifické biologické odpovědi látek vázajících se na testovaný receptor.

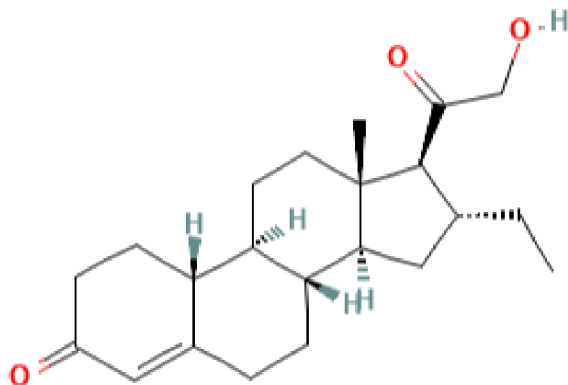
CALUX testy lze rozdělit podle steroidních receptorů, které obsahují: estrogení (ER-CALUX), androgení (AR-CALUX), progesteronový (PR-CALUX), glukokortikoidní (GR-CALUX), mineralokortikoidní (MR-CALUX) a thyroïdní (TR-CALUX). Tyto CALUX *in vitro* biotesty jsou dostupné pod licenci poskytovanou společností BioDetection Systems, b.v. (Amsterdam, Nizozemí).

CALUX biotesty využívají lidské geneticky modifikované linie U2-OS (rakovinné buňky kostní dřeně). Výhodou U2-OS buněk pro použití v *in vitro* testech je, že neobsahují významné množství steroidních receptorů a je pro ně typická snadná manipulace a rychlý růst (Sonneveld a kol., 2011; Suzuki a kol., 2013). Do U2-OS buněk je vložen vektor obsahující sekvence komplementární DNA (cDNA), která odpovídá danému lidskému receptoru (například progesteronovému v testu PR-CALUX), dále pak je vložen vektor nesoucí hormon responzivní elementy (specifické pro daný receptor, například progesteron responzivní elementy v testu PR-CALUX), TATA box a gen kódující enzym luciferázu a takto byly vyvinuty testy CALUX (Sonneveld a kol., 2005). Při testování jsou buňky exponovány látkám, a pokud jsou tyto látky ligandy daného receptoru, tak se navážou na receptor v cytosolu buněk. Tento vzniklý komplex ligand-receptor migruje do jádra buňky, v němž dochází k interakci hormon responzivních elementů s vníklým komplexem, tímto dojde k iniciaci exprese genu pro luciferázu. Aktivita luciferázy je následně měřena po reakci s D-luciferinem (přidává se k buňkám spolu s adenosintrifosfátem) a výsledkem je emitace světla, která je kvantifikována v luminometru (Schriks a kol., 2009).

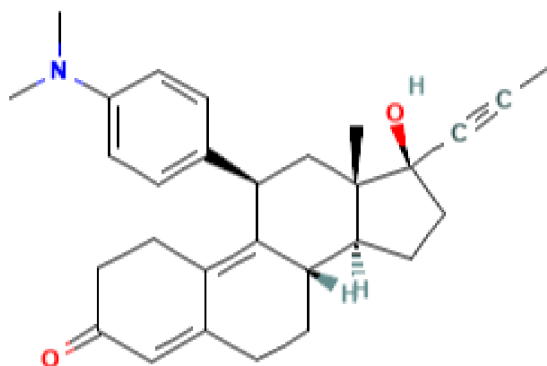
2.3.1.1 (Anti-)PR-CALUX

Tyto testy jsou schopny detekovat aktivaci nebo blokaci progesteronového receptoru, to znamená, že mohou být použité v agonistickém (PR-CALUX biotest) nebo antagonistickém módu (anti-PR-CALUX). Pro (anti-)PR-CALUX byly U2-OS buňky transfekovány plazmidem, který nese progesteronový receptor a také plazmidem s progesteronovými responzivními elementy a genem kódujícím luciferázu (Sonneveld a kol., 2011). Pro tyto *in vitro* biotesty se používají referenční látky, které odpovídají dané aktivitě v agonismu progesteronového receptoru (ORG 2058 – Obr. č. 4, progesteron –

Obr. č. 1, promegeston, medroxyprogesteron acetát, levonorgestrel) a antagonismu progesteronového receptoru (mifepriston – Obr. č. 5).



Obr. č. 4 Strukturní vzorec ORG 2058 (zdroj: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Obr. č. 5 Strukturní vzorec mifepristonu (zdroj: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.4 Chemické analýzy pro detekci UV filtrů

Analytické metody používané pro identifikaci a kvantifikaci organických UV jsou nezbytným nástrojem pro průzkumy v nichž je sledován environmentální výskyt UV filtrů v komplexních matricích. Nejpoužívanější metodou je kapalinová chromatografie (Giokas a kol., 2004; Oliveira a kol., 2010) kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (Díaz-Cruz a Barceló, 2009).

Při výběru analytické metody je nutné brát v úvahu fyzikálně-chemické vlastnosti analytů. Ve studiích zabývajících se detekcí organických UV filtrů ve vodním prostředí jsou používány různé metody analýz. Například může jít o kapalinovou chromatografickou-elektroionizační-tandemovou hmotnostní spektrometrii (HPLC-ESI-MS/MS) (Tsui a kol., 2014), kapalinovou chromatografickou-ultrafialovou spektrometrii (LC/UV) (Vidal a kol., 2010), dvourozměrnou kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/LC-MS/MS) (Grabicová a kol., 2013) a další metody.

3 Materiál a metodika

3.1 Chemikálie a materiál

Pro testování (anti-)progestagenní aktivity ve vodním prostředí a testování čistých látek byly použity následující chemikálie: lýžní roztok (k rozvolnění buněčné membrány, jehož pomocí může být intenzita vyzařována s větší intenzitou), iluminační roztok (obsahující D-luciferin a adenositriřofát), syntetický progestin (ORG 2058) – pro progestagenní aktivitu (od BioDetection Systems b.v., Amsterdam, Nizozemí); dimethylsulfoxid (DMSO), penicilin-streptomycin, Dulbeccovo fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS), kyselina octová (99,99%), mifepriston – pro anti-progestagenní aktivitu (od Sigma-Aldrich); Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM), Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium obohacené o fenolovou červeň (DMEM – jako růstové médium), trypsin, směs neesenciálních aminokyselin (od Life-Technologies); fetální bovinní sérum (od Biosera).

Pro testování anti-progestagenní aktivity u čistých látek (UV filtrů) byly použity následující standarty, které měly analytickou čistotu: mifepriston (RU-486; $\geq 98\%$), ethylhexyl methoxycinnamát, oktokrylen, 4-methylbenzyliden kafr, homosalát, ethylhexyl salicylát, benzofenon, benzofenon-1, benzofenon-12 ($\geq 99\%$; Sigma-Aldrich), benzofenon-2 ($\geq 97\%$; Sigma-Aldrich), benzofenon-3, benzofenon-4, benzofenon-8, benzofenon-12 (Merck, Česká republika), isoamyl methoxycinnamát ($\geq 99\%$; Tokyo Chemical Industry), UV-P ($\geq 99\%$; Tokyo Chemical Industry), UV-320 ($\geq 99\%$; Chem-Cruz), UV-327, UV-328, ($\geq 98\%$; Sigma-Aldrich), benzyl salicylát ($\geq 98\%$; Sigma-Aldrich), UV-350 (100%; AccuStandard).

3.2 Odběr a převoz vzorků

Vzorky odpadní a povrchové vody o objemu 1 litr byly odebrány v září 2022 na vybraných lokalitách v Jižních Čechách (detailní popis je uveden v kapitolách 3.3.1 a 3.3.2). Vzorkování bylo provedeno pomocí odběrové tyče (Obr. č. 6), která byla mezi odběry na jiných lokalitách vždy propláchnuta na nové lokalitě danou vodou. Vzorky

byly po převozu umístěny do lednice při teplotě 4 °C. Následně byla u vzorků do 48 hodin provedena extrakce na pevné fázi (kapitola 3.4).

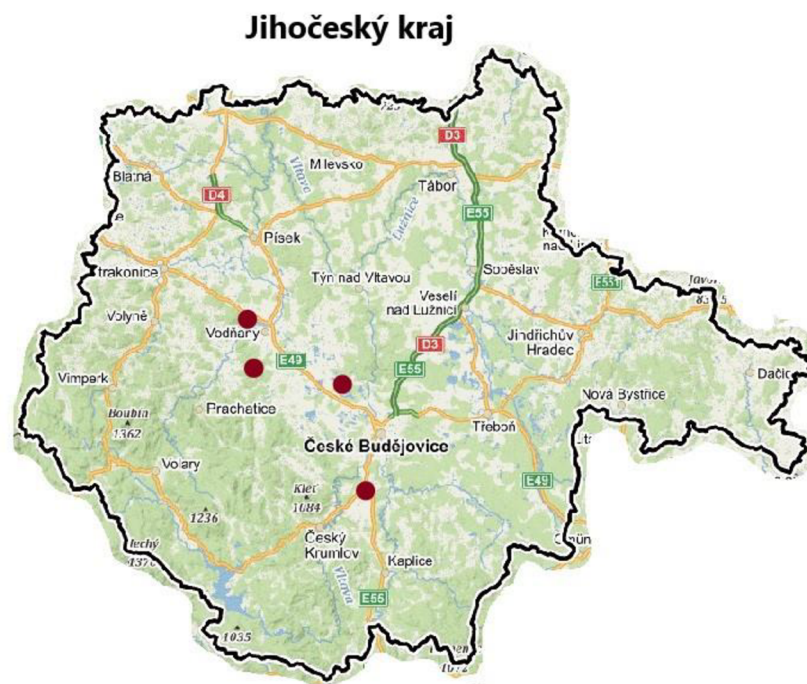


Obr. č. 6 Odběr vzorků odběrnou tyčí (vlevo: veřejné koupaliště, vpravo: čistírna odpadních vod)
(foto: Tereza Směšná)

3.3 Popis vzorkovaných lokalit

3.3.1 Odběr vzorků povrchové vody z rybníků

Vzorky povrchové vody byly odebrány na veřejných koupalištích sloužících též jako rybníky určené k rybolovu a jako kontrolní lokalita byla vybrána sádka. Konkrétně se jednalo o následující lokality: rybník Štílec (GPS: 48.8866775N, 14.4362672E), Mydlovarský rybník (GPS: 49.0736475N, 14.3593922E), rybník Podroužek (GPS: 49.0356753N, 14.1851611E) a sádka č. 65 na Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví ve Vodňanech (GPS: 49.1548536N, 14.1666467E) (Obr. č. 7).

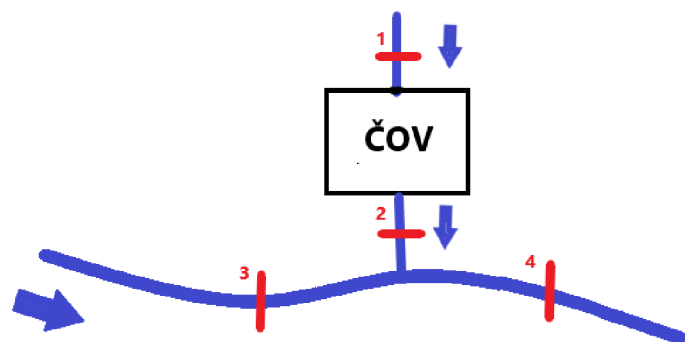


Obr. č. 7 Mapa odběrných míst (zdroj: mapy.cz) (upraveno: malování)

3.3.2 Odběr vzorků odpadních a povrchových vod na čistírně odpadních vod v Táboře

Vzorky odpadní vody byly odebrány z Areálové čistírny odpadních vod (AČOV) v Táboře. Dle kanalizačního řádu (zveřejněného na www.cevak.cz) na AČOV Tábor přitékají odpadní vody průmyslovým přivaděčem z potravinářského, textilního, strojírenského a ostatního průmyslu a komunální odpadní vody ze aglomerace města Sezimovo Ústí a sídliště Lužnice (Tábor).

Vzorky byly odebrány z přítoku a odtoku z ČOV a z řeky Lužnice (z recipientu 50 m nad a pod zaústěním odtoků z těchto ČOV) viz Obr. č. 8.



Obr. č. 8 Schéma odběrných míst na ČOV (1 – přítok na ČOV, 2 – odtok z ČOV, 3 – nad zaústěním, 4 – pod zaústěním)

3.4 Extrakce vzorků

Pro extrakci vzorků byla použita metoda extrakce na pevné fázi – SPE (z anglického solid-phase extraction). Extrakce byla provedena za pomoci automatického extraktoru SPE-DEX 4790 (od Horizon Technology, USA) (Obr. č. 9) a detailní popis metody je uveden v Golovko a kol. (2018). Odebraný objem vzorku (1 litr) byl nejprve přefiltrován přes 5 μm a následně přes 1 μm filtry Fast Flow (Biotage, Sweden). Poté byl vzorek přefiltrován přes Atlantic C18 SPE disk (Bioatge, Sweden), který sorbuje zejména lipofilní látky. Z tohoto SPE disku byly zachycené látky eluovány (vymyty) rozpouštědlem (acetonitrilem) do skleněných zkumavek na sběr eluátů.



Obr. č. 9 Automatický extraktor SPE-DEX 4790 (Horizon Technology, USA) (foto: Ing. Pavel Šauer, Ph.D.)

Dalším krokem byla evaporace eluátů. Z lahviček byly eluáty přepipetovány do tlustostěnných skleněných zkumavek, které měly kónické dno a poté byly odpařeny na koncentrátoru vzorků (Termovap TV10+, ECOM) (Obr. č. 10) za pomoci mírného proudu dusíku téměř do sucha při 37 °C. Vzorky byly rozpuštěny v 50 μ L DMSO pro biologickou analýzu, a ve 2 \times 30 μ L acetonitrilu a 2 \times 30 μ L demineralizované vody pro chemickou analýzu následně byly uskladněny v mrazicím boxu při -20 °C.



Obr. č. 10 Koncentrátor vzorků (Termovap TV10+, ECOM) (Foto: Tereza Směšná)

3.5 Pasážování buněčných kultur

Pasážování znamená obměnění starého růstového média za čerstvé, bohaté na nutrienty, které jsou důležité pro růst buněk a obvykle jsou při něm buňky přemísťovány do nových kultivačních lahví. Pro pasážování bylo použito médium s fenolovou červení. Pravidelně byla prováděna kontrola buněk pod mikroskopem (CKX53, Olympus). U buněk bylo kontrolováno jejich procentuální pokrytí, vzhled a růst a také bylo sledováno, zda kultury nevykazují známky kontaminace.

S postupem času, jak buňky rostou a množí se, tak potřebují dostatečný prostor a také je nutné odstranit neživé buňky a odpadní látky z jejich metabolismu. Proto je důležité po čase (zpravidla 2x týdně) přenést živé buňky do nového média a nových kultivačních lahví. Tato metoda se nazývá pasážování buněk a přistupuje se k ní v případě, že bylo dosaženo 70-80% pokrytí dna kultivační lahve buňkami. Pasážování bylo prováděno ve sterilních podmínkách v laminárním kabinetu (flowboxu) (Obr. č. 11), jehož povrch bylo

nutné pravidelně ošetřovat 70% roztokem ethanolu a jednou týdně docházelo k vysvěcování flowboxu vnitřní UV lampou.



Obr. č. 11 Laminární kabinet – flowbox (Foto: Tereza Směšná)

Pasážování buněk bylo prováděno na základě protokolu od BioDetection Systems b.v. (Nizozemí) následujícím postupem.

Postup pasážování:

- 1) Z láhve určené ke kultivaci bylo odstraněno médium, které v sobě obsahovalo živiny pro růst buněk (s fenolovou červení), tento odebíraný objem byl přibližně 10 ml.
- 2) Buňky byly opláchnuty 10 ml PBS (2×5 ml).
- 3) Následně byl použit trypsin, což je látka, která je používána k rozvolnění peptidové vazby mezi buňkami a jejich uvolnění ode dna láhve. Bylo použito přibližně 3 ml trypsinu a po 25 sekundách byl odstraněn.

- 4) Po odsátí trypsinu byla uzavřená láhev umístěna dnem vzhůru do inkubátoru na 1-3 minuty. Po odebrání láhve z inkubátoru bylo zkontrolováno, zda se buňky uvolňují ode dna a zároveň od sebe.
- 5) Po kontrole byly buňky spláchnuty 10 ml čerstvého růstového média s fenolovou červení.
- 6) Vzniklá buněčná suspenze byla rozdělena do nových lahví a doplněna na objem 10 ml a navracena zpět do inkubátoru.

Buňky, u kterých proběhlo pasážování byly inkubovány v kultivačních lahvích v CO₂ inkubátoru při stálé teplotě, která byla 37 °C, s 5% CO₂ a se 100% vlhkostí (Sonneveld a kol., 2005).

3.6 *In vitro* testy

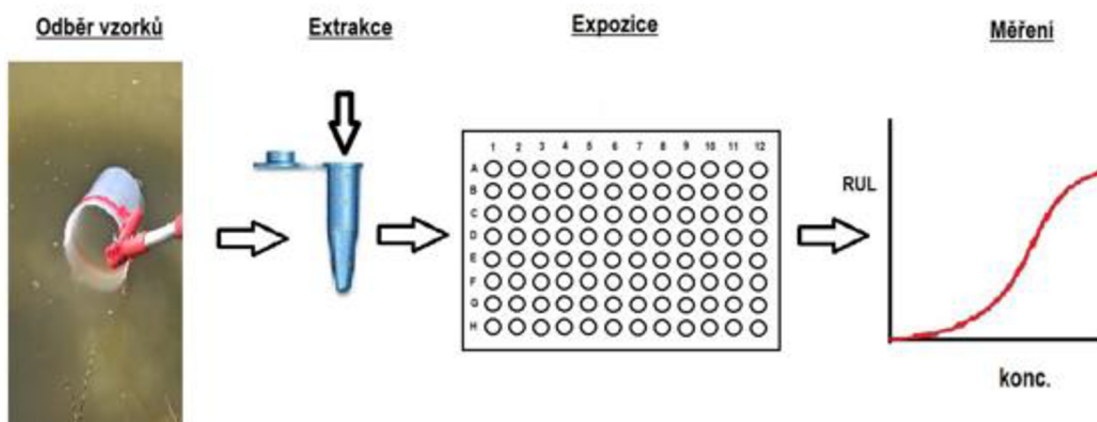
3.6.1 (Anti-)PR-CALUX *in vitro* biotest

Při použití *in vitro* reportérových testů je možno změřit pouze celkovou biologickou aktivitu všech látek, které jsou obsažené ve vzorku. Pro detekci anti-progestagenní aktivity u testovaných UV filtrů a pro detekci (anti-)progestagenní aktivity u testovaných lokalit byl použit *in vitro* biotest (Anti-)PR-CALUX.

CALUX *in vitro* biotest je založen na expresi reportérového genu. Pro testování aktivit byly použity rakovinotvorné buňky U2-OS. Do buněk byly vneseny dva plazmidy. První pro luciferázu a pro progestagenní responzivní elementy a druhý pro progesteronový receptor (Sonneveld a kol., 2011).

CALUX biotesty trvají 3 dny. Den č. 1 byly (anti-)PR-CALUX buňky nasazeny na mikrotitrační destičky (96 jamek). Po uplynutí 24 hodin inkubace (den č. 2) byly buňky vystaveny po dobu 24 hodin testovaným látkám (testování jednotlivých UV filtrů na případnou anti-progestagenní aktivitu) nebo referenčním látce (pro progestagenní aktivitu byl použit ORG 2058 a pro anti-progestagenní aktivitu byl použit mifepriston RU-486) a extraktům testovaných lokalit v sérii ředění. Den č. 3 byly buňkám rozvolněny buněčné membrány přidáním lyzního mixu. Následně byla provedena detekce luminescence za pomoci spektrofotometru s luminescenčním modulem. Ve spektrofotometru byl do každé

jamky na destičce nainjikován illuminate mix. Souhrnné schéma CALUX biotestu znázorněno na Obr. č. 12.



Obr. č. 12 Schéma metodického postupu CALUX biotestu

3.7 Nasazování buněk na mikrotitrační destičku

Nasazování buněk na destičku s 96 jamkami bylo prováděno ve chvíli, kdy buňky pokrývaly převážně celé dno kultivační láhve (90-100 %). Postup nasazování buněk na mikrotitrační destičku byl následující:

- Postup 1) až 4) shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.5 Pasážování buněčných kultur.
- 5) Po kontrole byly buňky spláchnuty 10 ml čerstvého DMEM média bez fenolové červeně. U buněk bylo nutné spočítat hustotu v Bürkerově komůrce.
- 6) Po spočítání hustoty byla buněčná suspenze naředěna s patřičným množstvím testovacího média, tak aby výsledná hustota v každé jamce odpovídala 10 000 buněk na jamku.
- 7) Do 96jamkové mikrotitrační destičky bylo na její okraje přidáno 200 μ l PBS, aby došlo k vytvoření stejného teplotního prostředí. Do ostatních jamek na destičce bylo přidáno 100 μ l buněčné suspenze poté byla destička vložena do inkubátoru na 24hodinovou inkubaci.

3.8 Měření (anti-)progestagenních aktivit

Měření anti-progestagenní aktivity u čistých látek (UV filtrů)

- 1) Pro přípravu expozičního média byly použity mikrotitrační destičky s 24-mi jamkami. Do každé jamky byl přidán 1 ml transparentního DMEM média. Do média byl následně napipetován 1 μ l chemikálií po sobě jdoucích: DMSO (rozpuštědlová kontrola), kalibrační řada mifepristonu RU-486, ředící řada jednotlivých testovaných UV filtrů.
- 2) Následně byla destička vložena na 10 minut do třepačky na 350 otáček za minutu.
- 3) Po 10 minutách bylo z destiček (96jamkové), které obsahovaly buňky odebráno 100 μ l média, tak aby nedošlo k poškození buněk přichycených na dně jamek a zároveň se odebralo veškeré médium (potenciálně obsahující nepřichycené buňky). Následně bylo do každé jamky přidáno 200 μ l expozičního média z destičky s 24-mi jamkami.
- 4) Po dokončení byly destičky navráceny do inkubátoru a exponovány testovaným látkám po dobu 24 hodin.
- 5) Po 24 hodinách bylo z každé jamky odebráno 200 μ l expozičního média a přidáno 30 μ l lýzní směsi (na bázi Tritonu X100; BioDetection Systems, b.v., Amsterdam, Nizozemí) pro rozvolnění buněčných membrán. Následně byla měřena intenzita luminiscence spektrofotometrem s luminiscenčním modulem a injektory pro dávkování na destičku (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko) (Obr. č. 13).



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

Měření (anti-)progestagenní aktivity u testovaných lokalit (veřejná koupaliště a ČOV)

- 1) Do mikrotitračních destiček s 24-mi jamkami bylo napipetováno 1 ml média a následně byl do tohoto objemu napipetován 1 μ l DMSO (rozpuštědlová kontrola), kalibrační řada ORG 2058 (progestagenní aktivita) nebo mifepristonu (anti-progestagenní aktivita) extraktů z testovaných lokalit v sérii ředění (16 \times , 8 \times , 4 \times , 2 \times , 1 \times).
- 2) Dále postup stejný jako u měření anti-progestagenní aktivity u čistých látek (UV filtrů) zmíněný výše.

3.9 Testování cytotoxicity

Pracovníci laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie, a já v rámci mé diplomové práce, jsme pravidelně kontrolovali vzhled buněčných kultur, jejich hustotu a zda nevykazují známky kontaminace pod inverzním mikroskopem (Olympus CKX53).

Pro zjištění cytotoxických účinků u testovaných vzorků a pro přesnější stanovení životnosti buněk byl použit test redukce resazurinu podle protokolu od O'Brien a kol., 2000.

Tento test byl využit k měření metabolické aktivity jako indikátoru životaschopnosti, proliferace a cytotoxicity. Test je založen na přeměně modrého fluorescenčního barviva resazurinu na růžový produkt resorufin za pomoci metabolicky aktivních buněk. Po tříhodinové expozici došlo k detekci intenzity fluorescence, která byla měřena spektrofotometrem (M200 Infinite PRO, Tecan, Švýcarsko).

Postup testování:

1. První den: Buňky byly nasazeny na 96-ti jamkovou destičku se shodnou hustotou, která byla použita v CALUXu. Tato destička byla vložena do inkubátoru.
2. Druhý den: Do 24jamkové destičky byl přidán 1 ml média do 16-ti jamek. Do tohoto objemu byl následně napipetován 1 μ l (první jamka DMSO, zbylé jamky 3 lokality v sérii ředění 16 \times , 8 \times , 4 \times , 2 \times , 1 \times). Následně byla destička vložena do třepačky na 350 otáček za minutu na 10 minut.
3. Z 96jamkové destičky inkubované 24 hodin v inkubátoru bylo odebráno 100 μ l testovacího média a následně bylo napipetováno 200 μ l testovacího média s DMSO a s extrakty z 24 jamkové destičky. Destičky byly vloženy do inkubátoru na 24 hodin.
4. Třetí den: Po uplynutí 24 hodin bylo ve flowboxu bez zapnutého osvětlení přidáno 10 μ l resazurinu do každé jamky. Dle doporučení od výrobce testu redukce resazurinu (Sigma-Aldrich) byla dodržena doba expozice (zminěna výše) v inkubátoru, po které byla změřena intenzita fluorescence barviva.

3.10 Analýza dat

3.10.1 Vyhodnocování dat pro detekci hormonální aktivity

Míra intenzity luminiscence byla u testovaných vzorků a látek vyjádřena v relativních světelných jednotkách neboli RLU. Pro zjištění hodnoty anti-progestagenní aktivity byla od RLU u testovaných vzorků odečtena hodnota RLU naměřená u rozpouštědlové kontroly, která obsahovala 0,1% DMSO. Naměřená data byla vyhodnocena v programu Excel (Microsoft) a v případě čistých látek (UV filtrů) byly vyneseny křivky koncentrace-odpověď v programu Prism 7 (GraphPad, USA).

Změřené hodnoty luminiscence luminometrem (M200 Infinite PRO, TECAN, Švýcarsko) byly přeneseny do počítače a zaznamenány jako tzv. relativní světelné jednotky. Tyto relativní světelné jednotky byly převedeny na relativní indukci (RI), což je procentuální vyjádření biologické odpovědi vůči standardní referenční látce (ORG 2058 pro progestagenní aktivitu a mifepriston pro anti-progestagenní aktivitu). Data odpovědi referenčních látek byly proloženy křivkou koncentrace-odpověď nelineárním regresním modelem se čtyřmi parametry (IC_{50} , sklon křivky, maximální a minimální indukce ORGu 2058 a mifepristonu). Výsledné hodnoty anti-progestagenních aktivit testovaných extraktů odpadní a povrchové vody byly mezi sebou porovnány v programu Minitab za pomoci neparametrického Kruskal-Wallisovo testu. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny za statisticky signifikantně odlišné na hladině $\alpha = 0,05$.

3.10.2 Vyhodnocování výsledků testu cytotoxicity

Potenciální cytotoxický účinek testovaných čistých chemických látek a také environmentálních extraktů byl měřen pomocí testu redukce resazurinu. Bylo sledováno, zda životnost buněk exponovaných čistým látkám (UV filtrům) či environmentálním extraktům klesne pod 80 % v porovnání životnosti pozorované v rozpouštědlové kontrole (DMSO) a v takovém případě byl tento efekt vyhodnocen jako snížení životnosti buněk. Jednotlivé ředící body environmentálních vzorků a čistých látek, které způsobovaly snížení životnosti buněk nebyly zahrnuty do testování anti-progestagenní aktivity.

3.10.3 Přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě ve vodním prostředí

Pro výpočet přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě bylo nutné nejdříve vypočítat anti-progestagenní aktivitu (Rovnice č. 1), relativní efektivní sílu látky (Rovnice č. 2) a predikovanou anti-progestagenní aktivitu (Rovnice č. 3), z těchto údajů bylo vypočítáno již zmíněné přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě (Rovnice č. 4).

Anti-progestagenní aktivita byla vypočtena pomocí rovnice č. 1 jako podíl inhibiční koncentrace referenční látky a testované látky i na stejné úrovni odpovědi (účinnosti).

$$BEQ_{\text{bio}} = \frac{IC_y(\text{referenční látka})}{IC_y(i)} \quad (\text{Rovnice č. 1})$$

Dále byla vypočtena **relativní efektivní síla látky** jako podíl inhibičních koncentrací referenční látky a testované látky v jednotkách $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ (Rovnice č. 2).

$$\text{Relativní efektivní síla}_i = \frac{IC_{20}(\text{referenční látky})}{PC_{20}(i)} \quad (\text{Rovnice č. 2})$$

kde relativní síla látky i se rovná podílu koncentrace referenční látky způsobující 20-procentní inhibici (IC_{20}) a koncentrace látky i způsobující inhibici odpovídající 20-procentní inhibici způsobované referenční látkou (PC_{20}).

Predikovaná anti-progestagenní aktivita (BEQ_{chem}) je odhadnutá anti-progestagenní aktivita, kterou by způsobovaly látky ve smíšeném vzorku (například environmentálním vzorku vody), jež byly detekovány a vykazují tuto aktivitu. Anti-progestagenní BEQ_{chem} byla vypočtena pomocí rovnice č. 3.

$$BEQ_{\text{chem}} = \sum_{i=1}^n \text{relativní efektivní síla}_i \times \text{koncentrace látky}_i \quad (\text{ng} \times \text{l}^{-1}) \quad (\text{Rovnice č. 3})$$

Příspěvní látek k celkové anti-progestagenní aktivitě v procentech bylo ve vzorcích odpadních nebo povrchových vod vypočteno pomocí rovnice č. 4.

$$\text{Příspěvní látek k anti-progestagenní aktivitě (\%)} = \frac{\text{BEQ}_{\text{chem}}}{\text{BEQ}_{\text{bio}}} \times 100 \quad (\text{Rovnice č. 4})$$

Kde BEQ_{chem} je predikovaná anti-progestagenní aktivita v $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu a BEQ_{bio} je měřená anti-progestagenní aktivita v $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu.

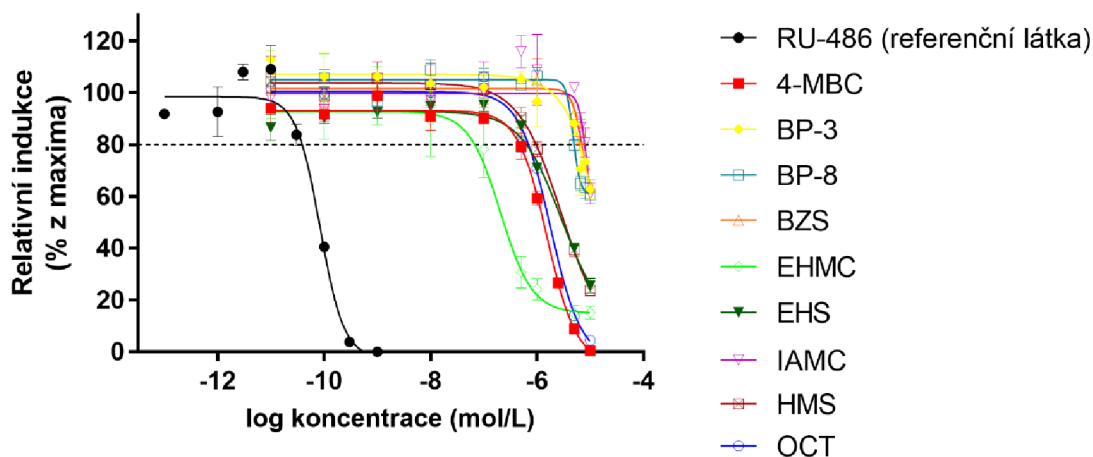
4 Výsledky

4.1 Testování cytotoxicity

Vyhodnocení testu redukce resazurinu bylo provedeno způsobem, který je uveden v kapitole 3.10.2. Testováno bylo 20 čistých látek (UV filtrů) a 8 lokalit (viz kapitola 3.3). Testování probíhalo v antagonistickém módu. U žádné z testovaných čistých látek ani extraktů odpadní či povrchové vody nebyla prokázána snížená životaschopnost buněk (Příloha č. 1 pro čisté látky a Příloha č. 2 pro extrakty odpadní a povrchové vody).

4.2 Anti-progestagenní aktivita UV filtrů

Bylo testováno 20 UV filtrů na anti-progestagenní aktivitu v anti-PR-CALUX *in vitro* testu. Devět látek vykazovalo tuto aktivitu (Obrázek 14). Z křivek koncentrace-odpověď byly vypočteny různé toxikologické parametry (IC₅₀, PC₂₀, relativní síla; Tab. č. 3). Třemi nejsilnějšími látkami ze skupiny UV filtrů, měřených, v rámci analýz a experimentů v této diplomové práci byly ethylhexyl methoxycinamát, 4-methylbenzyliden kafr a oktokrylen (Tab. č. 3, Obr. č. 14).



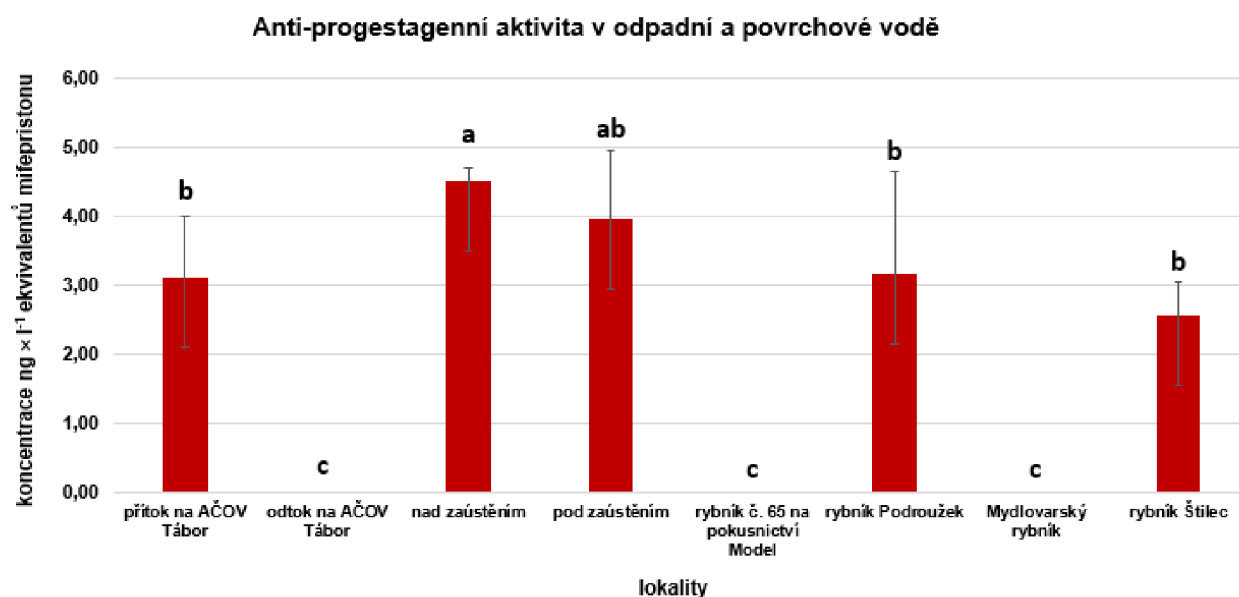
Obr. č. 14 Anti-progestagenní aktivita UV filtrů v anti-PR-CALUX *in vitro* testu. Zkratky chemických látek: RU-486 = mifepriston, 4-MBC = 4-methylbenzyliden kafr, BP-3 = benzofenon-3, BP-8 = benzofenon-8, BZS = benzyl salicylát, EHMC = ethylhexyl methoxycinamát, EHS = ethylhexyl salicylát, IAMC = izoamyl methoxycinamát, HMS = homosalát, OCT = oktokrylen.

Tab. č. 3 Anti-progestagenní aktivita UV filtrů v anti-PR-CALUX *in vitro* testu. IC_{50} = koncentrace způsobující 50procentní inhibici (vzhledem k minimu a maximu křivky koncentrace-odpověď jednotlivých látek) v měření anti-progestagenní aktivity. PC_{20} = koncentrace látky způsobující inhibici odpovídající 20procentní inhibici způsobenou referenční látkou. Relativní efektivní síla látek (REP- PC_{20}) vůči mifepristonu byla vypočítána z hodnot PC_{20} v jednotkách $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$. Látky jsou seřazeny sestupně od nejsilnější po nejslabší podle hodnoty jejich REP- PC_{20} .

Látka	Molární hmotnost ($\text{g} \times \text{mol}^{-1}$)	PC_{20} ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$)	REP- PC_{20}	IC_{50} ($\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$)
mifepriston (referenční látka)	429,60	0,02	1.0	0,04
ethylhexyl methoxycinamát	290,40	20	8.5×10^{-4}	60
4-methylbenzyliden kafr	254,37	121	1.4×10^{-4}	390
ethylhexyl salicylát	250,33	157	1.1×10^{-4}	726
oktokrylen	361,48	250	6.7×10^{-5}	636
homosalát	262,34	252	6.6×10^{-5}	753
benzofenon-8	244,24	1 217	1.4×10^{-5}	1 169
benzofenon-3	228,24	1 456	1.1×10^{-5}	9 010 915
benzyl salicylát	228,24	1 576	1.1×10^{-5}	1 613
isoamyl methoxycinamát	248,32	1 947	8.6×10^{-6}	2 101

4.3 (Anti-)progestagenní aktivita v odpadních a povrchových vodách

Progestagenní aktivita nebyla detekována v odpadní ani v povrchové vodě na žádné ze sledovaných lokalit. Anti-progestagenní aktivita (Graf č. 1) se vyskytovala v přibližně 60-ti % vzorků. Nejvyšší hodnoty anti-progestagenní aktivity ($4,5 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu) byly zjištěny nad zaústěním odtoku z Areálové čistírny odpadních vod v Táboře (AČOV Tábor). Další dominantní hodnoty byly naměřené pod zaústěním odtoku z AČOV ($4,0 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu), u rybníku Podroužek ($3,2 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu) a na přítoku na čistírnu odpadních vod ($3,1 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu). Anti-progestagenní aktivita byla nalezena v rybníce Štílec ($2,6 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu). Na zbylých třech lokalitách (odtok z areálové čistírny odpadních vod, Mydlovarský rybník a rybník č. 65 na Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví ve Vodňanech) nebyla anti-progestagenní aktivita detekována.



Graf č. 1 Anti-progestagenní aktivita v odpadní a povrchové vodě. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka. Písmena (a, ab, b, c) indikují statisticky významné rozdíly mezi lokalitami ($p < 0,05$) dle neparametrického Kruskal-Wallisovo testu.

4.4 Chemická analýza UV filtrů v odpadních a povrchových vodách

V odpadních a povrchových vodách bylo analyzováno celkem třináct látek používaných k ochraně proti UV záření. Jejich kumulativní koncentrace se na vzorkovacích lokalitách v povrchových vodách pohybovaly v rozmezí 27–474 ng × l⁻¹.

V surové odpadní vodě přitékající na AČOV Tábor bylo detekováno devět ze třinácti sledovaných UV filtrů (Tab. č. 4). Koncentrace UV filtrů se v přítoku na ČOV pohybovaly v rozmezí 4100 – 4,1 ng × l⁻¹. Třemi dominantními UV filtry na přítoku na AČOV Tábor byly oktokrylen (4100 ng × l⁻¹), ethylhexyl methoxycinamát (1200 ng × l⁻¹) a benzofenon-3 (870 ng × l⁻¹). Dvě látky (benzofenon a benzofenon-2) byly úplně odstraněny během procesu čištění odpadních vod. Pět látek bylo na AČOV Tábor do určité míry odstraněno a jejich míra odstranění byla následující: ethylhexyl methoxycinamát (99,7 %), oktokrylen (98,1 %), benzofenon-3 (73,6 %), fenol benzimidazol kyselina sulfonová (50,8 %) a UV-P (30 %). Dva UV filtry (benzofenon-1 a benzofenon-4) vykazovaly tzv. negativní míru odstranění, což znamená, že se jejich koncentrace na odtoku z AČOV Tábor zvýšily v porovnání s jejich koncentracemi na přítoku. Negativní míra odstranění benzofenonu-1 byla -20,3 % a u benzofenonu-4 dokonce -660,0 %. Na odtoku z AČOV Tábor bylo detekováno sedm ze třinácti analyzovaných UV filtrů v rozmezí koncentrací od 0,2 do 230 ng × l⁻¹ (Tab. č. 4).

Tab. č. 4. Koncentrace UV filtrů v odpadní a povrchové vodě. AČOV = areálová čistírna odpadních vod v Táboře.

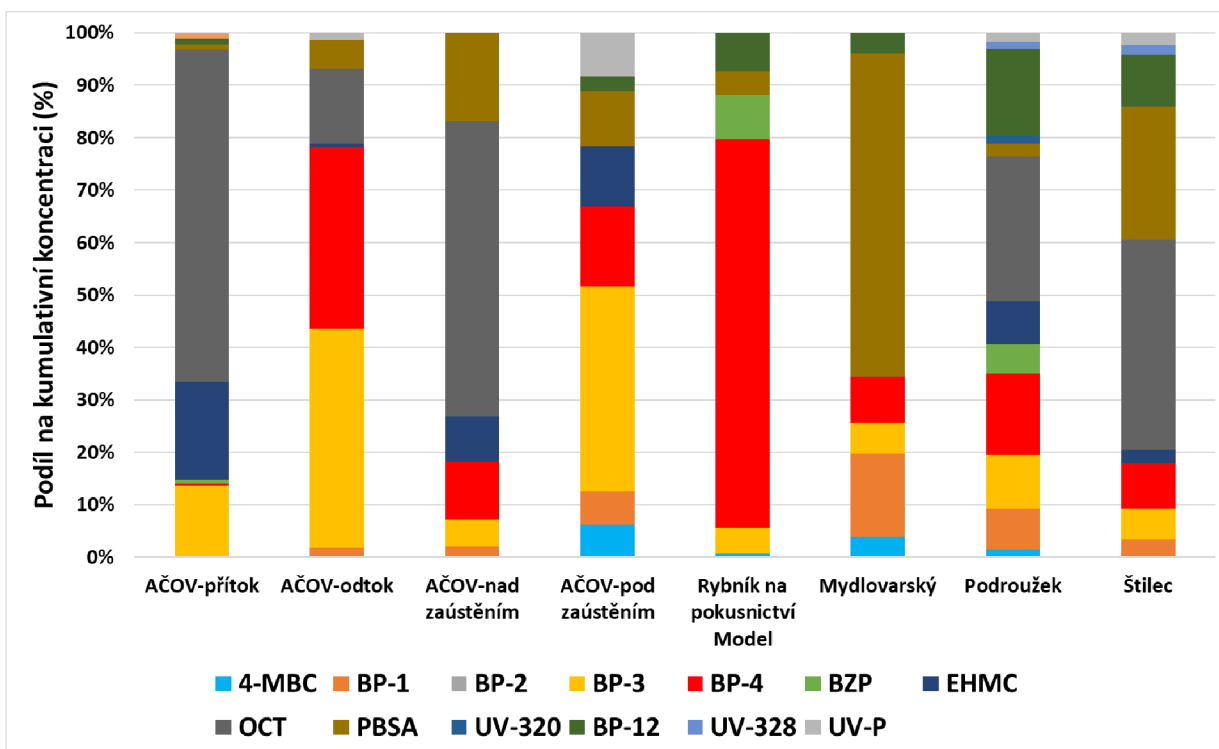
látky	Koncentrace (ng × l ⁻¹)							
	Odpadní voda		Povrchová voda					
	AČOV-přítok	AČOV-odtok	AČOV-nad zaústěním	AČOV-pod zaústěním	Rybník č. 65 na pokusnictví Model	Mydlovarský rybník	rybník Podroužek	rybník Štílec
4-MBC	<1,1	<0,37	<0,21	3,8	0,22	1,2	1,2	<1,1
BP-1	7,9	9,5	0,48	3,9	<3,1	4,9	6,5	16
BP-2	4,1	<0,94	<1,4	<2,7	<6,7	<7,6	<10	<23

Tab. č. 4. – pokračování: Koncentrace UV filtrů v odpadní a povrchové vodě

BP-3	870	230	1,2	24	1,3	1,8	8,5	28
BP-4	25	190	2,5	9,3	20	2,7	13	41
BP-12	67	<0,9	<0,61	1,7	2	1,2	14	47
BZP	47	<4	<2,8	<5,7	2,3	<3,7	4,7	<16
EHMC	1200	3,6	2	7,1	<1,4	<2,6	6,8	12
OCT	4100	78	13	<26	<16	<27	23	190
PBSA	63	31	3,9	6,4	1,2	19	2,0	120
UV-320	<0,21	<0,22	<0,23	<0,32	<0,14	<0,37	1,2	<0,93
UV-328	0,77	<9,4	<4,5	<9,2	<1,2	<11	1	8,9
UV-P	10	7	<2,6	5,1	<1,1	<3,8	1,5	11

V povrchové vodě bylo kvantifikováno celkem deset ze třinácti analyzovaných UV filtrů (Tab. č. 4). Koncentrace UV filtrů v povrchové vodě se pohybovaly v rozmezí 0,22-190 ng × l⁻¹, což bylo průměrně 21krát méně než v odpadní vodě. Oktokrylen byl UV filtrem s nejvyšší naměřenou koncentrací v povrchové vodě, a to v rybníku Štílec, v němž se vyskytoval v koncentraci 190 ng × l⁻¹ (Tab. č. 4).

UV filtry byly analyzovány v povrchových vodách ve čtyřech rybnících a dvou lokalitách v řece Lužnici. Cílem této práce nebylo přímé porovnávání koncentrací a výskytu UV filtrů mezi rybníky a řekami, ale jedná se doposud o jednu z prvních studií, v níž byly tyto látky analyzovány v obou těchto typech vod (rybníky a řeky). Nicméně, obecně lze shrnout, že koncentrace UV filtrů v řekách (medián kumulativní koncentrace byl 39 ng × l⁻¹) a rybnících (medián kumulativní koncentrace byl 48 ng × l⁻¹) jsou porovnatelné. Největší průměrný podíl na kumulativní koncentraci UV filtrů v povrchových vodách měli tyto látky: oktokrylen (41 %), benzofenon-4 (22 %) a fenol benzimidazol kyselina sulfonová (20 %) (Obr. č. 15).



Obr. č. 15 Procentuální podíl jednotlivých UV filtrů na jejich kumulativní koncentraci na vzorkovacích lokalitách. 4-MBC = 4-methylbenzyliden kafr, BP-1 = benzofenon-1, BP-2 = benzofenon-2, BP-3 = benzofenon-3, BP-4 = benzofenon-4, BZP = benzofenon, EHMC = ethylhexyl methoxycinamát, OCT = oktocyrylen, PBSA = fenol benzimidazol kyselina sulfonová, BP-12 = benzofenon-12, UV-320 = 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylfenyl) benzotriazol, UV-328 = 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-ditertpentylphenol, UV-P = 2-(2-hydroxy-5-methylfenyl)benzotriazol

4.5 Přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě ve vodním prostředí

Přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě bylo vypočítáno na základě rovnic uvedených v kapitole 3.10 a údajů uvedených v kapitolách 4.2, 4.3 a 4.4.

Celkové přispění všech UV filtrů vykazujících anti-progestagenní aktivitu a přítomných na přítoku na AČOV Tábor bylo 49,3 %. Největším přispěvatelem k anti-progestagenní aktivitě byl mezi sledovanými látkami UV filtr ethylhexyl methoxycinamát, jenž se na ní podílel z 38,7 %. Dále přispěl k anti-progestagenní aktivitě na přítoku UV filtr oktocyrylen (10,6 %). Na odtoku z této ČOV již nebyla anti-progestagenní aktivita detekována.

V povrchových vodách bylo přispění UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě velmi nízké, konkrétně se na ní podílely z 0,07 – 1,08 %. Největší příspěvek k celkové anti-progestagenní aktivitě v povrchových vodách měla mezi UV filtry látka oktokrylen na lokalitě rybník Štílec, avšak její přispění bylo zanedbatelné (0,6 %).

5 Diskuse

Anti-progestagenní aktivita UV filtrů

V posledních desítkách let se stává předmětem stále intenzivnějšího výzkumu sledování výskytu hormonálních aktivit ve vodním prostředí a identifikace látek za ně zodpovědných. Jednou z těchto aktivit je anti-progestagenní aktivita, jejíž konkrétní dopad na exponované organismy doposud nebyl zcela objasněn, ale takovéto látky mají potenciál narušit rozmnožování živočichů (Kocour Kroupová a kol., 2023). Nejsilnější látkou vykazující anti-progestagenní aktivitu je mifepriston, který je obsažen v potratové pilulce (DeHart a Morehead, 2001). Je to látka, která byla vytvořena s cílem vykazovat anti-progestagenní aktivitu. Tuto aktivitu může způsobovat řada různých látek, které nebyly vytvořeny s cílem tuto aktivitu vykazovat. Jedná se například o bromované retardanty hoření, polycyklické mošusové sloučeniny, UV filtry a další látky, které se dostávají do vodního prostředí (Schreurs a kol., 2005; Hamers a kol., 2006).

V této diplomové práci došlo k potvrzení anti-progestagenní aktivity pěti organických UV filtrů (ethylhexyl methoxycinamát, 4-methylbenzyliden kafr, homosalát, benzofenon-3, benzofenon-8), která byla již uvedena v literatuře (Schreurs a kol., 2005; Thia a kol., 2020). Nově byla v této studii identifikována anti-progestagenní aktivita čtyř UV filtrů (ethylhexyl salicylát, oktokrylen, benzyl salicylát a isoamyl methoxycinamát). V porovnání s referenční látkou pro anti-progestagenní aktivitu (mifepriston) se obecně o skupině UV filtrů dá říci, že vykazují slabou anti-progestagenní aktivitu (Obr. č. 14). Nejsilnějšími anti-progestageny byly ve skupině UV filtrů ethylhexyl metoxycinamát, 4-methylbenzyliden kafr a oktokrylen.

Ve studii, kterou provedli Schreurs a kol. v roce 2005 byla testována anti-progestagenní aktivita organických UV filtrů (benzofenon-3, 3-benzyliden kafr, 4-methylbenzyliden kafr, homosalát, ethylhexyl methoxycinamát) anti-PR-CALUX *in vitro* biotestem. U UV filtrů se tato aktivita vyskytovala v rozmezí koncentrací IC_{50} od 96 do 1186,6 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. Nejvyšší IC_{50} byla naměřena u benzofenonu-3 (1186,6 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$). V této diplomové práci byla zjištěna IC_{50} benzofenonu-3 v koncentraci 9 010 915 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$, což je hodnota mnohonásobně vyšší. Dalším dominantním UV filtrem ve studii Schreurs a kol. (2015) byl homosalát, jehož IC_{50} dosahovala koncentrace 787 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$, což je hodnota

IC₅₀ porovnatelná s hodnotou pro homosalát zjištěnou v této diplomové práci, která činila 753 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. Dalším UV filtrem, u kterého byla zjištěna anti-progestagenní aktivita ve studii Schreus a kol. (2005) byl 4-methylbenzyliden kafr jehož IC₅₀ byla 228,9 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. V mé diplomové práci byla naměřena koncentrace IC₅₀ pro 4-methylbenzyliden kafr 390 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$, což je hodnota 1,7krát vyšší než ve studii Schreus a kol. (2005). Dalšími UV filtry, u kterých byla prokázána anti-progestagenní aktivita byl ethylhexyl methoxycinamát u něhož byla zjištěna IC₅₀ v koncentraci 145,2 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. V této diplomové práci byla koncentrace IC₅₀ 60 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$, což je přibližně 2,4krát menší koncentrace než pro ethylhexyl methoxycinamát zjištěnou ve studii Schreus a kol. (2005). UV filtr s nejnižší naměřenou hodnotou IC₅₀ ve studii Schreus a kol. (2005) byl 3-benzyliden kafr, u kterého byla zjištěna IC₅₀ v koncentraci 96 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ (Schreus a kol., 2005). Ve studii Thia a kol. (2020) byl proveden reportérový test na kvasinkách, ve kterém došlo k detekování anti-progestagenní aktivity u benzofenon-3 a bezofenon-8. Jejich IC₅₀ byla pro benzofenon-3 2693 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ a pro benzofenon-8 3883 $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$. V mé diplomové práci byla zjištěná IC₅₀ pro benzofenon-3 několika-řádově vyšší než ve studii Thia a kol. (2020) naopak IC₅₀ pro benzofenon-8 byla 3krát nižší než ve studii Thia a kol. (2020). Obecně lze říct, že dané výsledky testování anti-progestagenní aktivity UV filtrů jsou mezi danými studii a touto diplomovou prací většinou porovnatelné. Nově identifikované anti-progestagenní aktivity u některých UV filtrů v této studii mohou v budoucnu přispět k řešení problematiky ekologických dopadů UV filtrů na vodní prostředí a také pro vyhodnocování jejich rizik pro člověka.

Anti-progestagenní aktivita ve vodním prostředí

Podle informací z literatury, byla anti-progestagenní aktivita ve vodním prostředí České republiky analyzována za pomoci *in vitro* biotestu anti-PR-CALUX s lidským progesteronovým receptorem (Beranová, 2017; Krulová, 2021; Kocour Kroupová a kol., 2023; Šauer a kol., 2018a,b) a také testem U2OS-zfPR s progesteronovým receptorem z dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (Kocour Kroupová a kol., 2023). Jednalo se o sledování této aktivity v povrchových vodách (Krulová, 2021; Kocour Kroupová a kol., 2023; Šauer a kol., 2018a,b) a odpadních vodách na čistírnách odpadních vod (Beranová, 2017; Šauer a kol., 2018a,b; Kocour Kroupová a kol., 2023). V této diplomové práci byla anti-progestagenní aktivita detekována v řece Lužnici, ve dvou rybnících a na přítoku

odpadní vody na čistírnu odpadních vod. Tato práce přináší nové informace o výskytu anti-progestagenní aktivity i v dalších vodních tělesech, konkrétně v rybních, které slouží jako venkovní koupaliště a zároveň jako produkční rybníky pro chov ryb (rybníky Podroužek, Štílec a Mydlovarský). Výsledky této práce (viz kapitola 4.2) a informace z literatury ukazují, že přítomnost látek schopných se vázat na progesteronový receptor a blokovat jej pravděpodobně není ojedinělým jevem omezujícím se pouze na tekoucí vody a jejich zdroj zřejmě nejsou pouze městské ČOV.

V této studii probíhalo odebírání vzorků aktivním (bodovým) odběrem, stejně jako tomu bylo na některých lokalitách ve studii Šauer a kol. (2018b), v níž byla detekována anti-progestagenní aktivita vyskytující se v odpadní vodě v rozmezí koncentrací 0,26-2,1 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Šauer a kol., 2018b). Detekci anti-progestagenní aktivity na přítoku surové odpadní vody na čistírnu odpadních vod a na odtoku odpadní vody z čistírny se zabývaly studie Beranová (2017), Šauer a kol. (2018a), Kocour Kroupová a kol. (2023). V diplomové práci Beranová (2017) se anti-progestagenní aktivita na přítoku pohybovala v rozmezí hodnot 0,2-1 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Beranová, 2017). Ve studii Šauer a kol. (2018a) byla anti-progestagenní aktivita detekována u šesti přítoků na čistírnu odpadních vod v koncentracích od 2,63 do 83 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Šauer a kol., 2018a). Ve studii Kocour Kroupová a kol. (2023) byla anti-progestagenní aktivita zjištěná na přítocích odpadní vody na čistírny v koncentracích od 5 do 18 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Kocour Kroupová a kol., 2023). V mé diplomové práci byla naměřena anti-progestagenní aktivita v koncentraci 3,1 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu. V diplomové práci Beranová (2017) se anti-progestagenní aktivita na odtoku vody z čistírny odpadních vod vyskytovala v rozmezí koncentrací 0,2-9,7 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Beranová, 2017). Ve studii Šauer a kol. (2018a) byla detekována anti-progestagenní aktivita u tří odtoků z čistírny odpadních vod v koncentracích od 0,77 do 1 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Šauer a kol., 2018a). Ve studii Kocour Kroupová a kol. (2023) byla anti-progestagenní aktivita naměřená v rozmezí koncentrací 0,55-1,4 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Kocour Kroupová a kol., 2023). V mé diplomové práci nebyla anti-progestagenní aktivita na odtoku z čistírny odpadních vod detekována. V bakalářské práci Krulová (2021) byl proveden rozsáhlý monitoring anti-progestagenních aktivit v povrchových vodách České republiky z pasivních vzorkovačů typu POCIS. Testovalo se 21 lokalit, anti-progestagenní aktivita byla naměřena na 6-ti lokalitách v rozmezí hodnot 12-33 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$

ekvivalentů mifepristonu (Krulová, 2021). Ve studii Kocour Kroupová a kol. (2023) byla detekována anti-progestagenní aktivita v recipientu nad a pod zaústěním vody z čistírny odpadních vod v Brně v koncentraci 1,1 (nad zaústěním) a 3,8 (pod zaústěním) $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Kocour Kroupová a kol., 2023). V mé diplomové práci byla naměřena koncentrace anti-progestagenní aktivity v recipientu nad zaústěním $4,5 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu a pod zaústěním $4 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu.

Detekce anti-progestagenní aktivity v odpadní vodě probíhala ve Francii (Bellet a kol., 2012), Austrálii (Scott a kol., 2014), Číně (Rao a kol., 2014) a v povrchové vodě probíhala v Austrálii (Scott a kol., 2014) a Nizozemí (De Baat a kol., 2020).

Ve Francii v roce 2012 byla provedena studie věnovaná výskytu hormonálních aktivit v odpadní vodě, mimo jiné zde byla nalezena i anti-progestagenní aktivita (Bellet a kol., 2012). V Číně byla v roce 2014 provedena studie zabývající se sledováním hormonálních aktivit v odpadních vodách z čistíren odpadních vod. Testování bylo prováděno za pomoci *in vitro* biotestů na kvasinkách. Anti-progestagenní aktivita dosahovala koncentrace v rozmezí hodnot $31\,500 - 271\,000 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Rao a kol., 2014). V Austrálii byla anti-progestagenní aktivita detekována v odpadní vodě. Nejvyšší koncentrace této aktivity dosahovala hodnoty $32 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Scott a kol., 2014). Ve studii Scott a kol. (2014) byla detekována anti-progestagenní aktivita i v povrchové vodě. Nejvyšší koncentrace této aktivity byla nalezena v povrchové vodě ze zastavěné oblasti a dosahovala hodnoty přibližně $64 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (Scott a kol., 2014). Ve studii De Baat a kol. (2020) probíhající v Nizozemsku v povrchových vodách byla měřena anti-progestagenní aktivita ve vzorcích z pasivních vzorkovačů, které byly na lokalitách umístěny 46 dní. Nejvyšší naměřená koncentrace anti-progestagenní aktivity činila $13 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu (De Baat a kol., 2020).

Anti-progestagenní aktivita může být způsobována i látkami z emisí ze spalování ve vozidlech majících naftový pohon a ze spalování v uhelných kamnech. Jedná se o polycyklické aromatické uhlovodíky, ty se mohou ve formě imisí dostávat do vodního prostředí (Wang a kol., 2005). Dále by anti-progestagenní aktivitu mohly způsobovat látky, které byly často nalézány v odpadních vodách vykazujících tuto aktivitu, jsou to látky jako dichlordifenyltrichlormetan (znám pod zkratkou DDT), pentachlorfenol (Li a

kol., 2008; Li a kol., 2010) a bisfenoly (Šauer a kol., 2021). Anti-progestagenní polutanty mohou přispívat i k estrogenní aktivitě (Rao a kol., 2014).

Výskyt UV filtrů v odpadní a povrchové vodě

Analýzy výskytu organických UV filtrů ve vodním prostředí jsou prováděny ve velkém množství v zemích jako je například: **Česká republika** (Grabicova a kol., 2013), **Německo** (Fisch a kol., 2017), **Švýcarsko** (Balmer a kol., 2005), **Itálie** (Magi a kol., 2012), **Norsko** (Langford a kol., 2015), **Španělsko** (Benedé a kol., 2016; Vidal a kol., 2010), **Katalánsko** (Pedrouzo a kol., 2010), **Čína** (Tsui a kol., 2014) a další.

V České republice byly vzorky odebrány v roce 2011 v polovině července z venkovních bazénů, přírodních koupališť a řek. Ve venkovních bazénech byly obsaženy následující UV filtry: PBSA v koncentraci $240\text{--}13000 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$, BP-4 v koncentraci $3,3\text{--}35 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$, BP-3 v koncentraci $26\text{--}620 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$. Vzorování přírodních koupališť probíhalo například na lokalitách rybník Podroužek, Štílec a Mydlovarský rybník. Koncentrace zjištěných UV filtrů byly v rozmezí koncentrací $24\text{--}930 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ PBSA, $21\text{--}550 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ BP-3, $4\text{--}46 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ BP-4 (Grabicova a kol., 2013). V porovnání výsledků rozsahů koncentrací, které byly u výše zmíněných UV filtrů zjištěny v této diplomové práci, můžeme říci, že koncentrace UV filtrů analyzovaných ve studii Grabicova a kol. (2013) byly několikanásobně vyšší než v této diplomové práci, kromě benzofenonu-4, který dosahoval velice podobných výsledků jako ve studii Grabicova a kol. (2013). Nižší koncentrace analyzovaných UV filtrů (PBSA a BP-3) v porovnání se studií Grabicova a kol. (2013) mohly být způsobené rozdílným obdobím odběru. Ve studii Grabicova a kol. (2013) byl proveden odběr vzorků v období vrcholné letní sezóny (červenec), kdežto v této diplomové práci až po této sezóně (září). Ve vrcholné letní sezóně jsou v intenzivně používané přípravky na ochranu proti slunečnímu záření, a to je důvod proč se mohly tyto UV filtry vyskytovat ve studii Grabicova a kol. (2013) ve vyšších koncentracích než v této diplomové práci, pro kterou byly vzorky odebírány až po letní sezóně.

V Německu byla v roce 2017 provedena studie zabývající se výskytem UV filtrů v řekách. Detekovány byly čtyři UV filtry (benzofenon-1, benzofenon-3, PBSA a oktokrylen). UV filtr s nejvyšší naměřenou koncentrací byl PBSA, jehož koncentrace dosahovala hodnoty $836,3 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$. Nejvyšší naměřené koncentrace oktokrylenu $30,8 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$, benzofenonu-3 $11,4 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a benzofenonu-1 $2,8 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ (Fisch a kol., 2017). Ve

Švýcarsku byly za pomoci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie analyzovány čtyři organické UV filtry (benzofenon-3, 4-methylbenzyliden kafr, ethylhexyl methoxycinamát, oktokrylen) v surové odpadní vodě. Největší koncentraci měl ethylhexyl methoxycinamát $19 \mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ (Balmer a kol., 2005), jehož koncentrace byla přibližně 15krát vyšší než v surové vodě v této diplomové práci. Ve studii Balmer a kol. (2005) prokázali i jistou sezónnost výskytu UV filtrů, která stoupá s příchodem teplejšího období (Balmer a kol., 2005). V Itálii v roce 2012 probíhalo analyzování výskytu UV filtrů v řece a v odpadní vodě. Mezi analyzovanými UV filtry se vyskytl benzofenon-3 a oktokrylen, jejichž koncentrace byla spíše na nízké úrovni (Magi a kol., 2012). V Norsku Langford a kol. (2015) testovali přítoky a odtoky vody z čistíren odpadních vod. Na přítocích surové odpadní vody na ČOV byly nalezeny tři UV filtry: benzofenon-3 v rozmezí koncentrací $<10\text{-}2116 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$, ethylhexyl methoxycinamát $551\text{-}4689 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a oktokrylen $3448\text{-}41610 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$. Na odtocích z čistíren odpadních vod byly detekovány UV filtry zmíněné výše: benzofenon-3 v rozmezí koncentrací $10\text{-}1915 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$, ethylhexyl methoxycinamát $4,3\text{-}37 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a oktokrylen $181\text{-}538 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$. Z naměřených koncentrací je patrné, že čistírny odpadních vod byly do jisté míry schopny koncentrace UV filtrů snížit (Langford a kol., 2015). Ve Španělsku bylo testováno 8 UV filtrů u nichž se předpokládá možný výskyt v říční vodě, avšak u 50 % UV filtrů byla hodnota koncentrace pod limitem detekce. U zbylých čtyř UV filtrů byla nejvyšší zjištěná koncentrace u ethylhexyl methoxycinamátu $220 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a dalším dominantním UV filtrem byl homosalát v koncentraci $219 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ (Benedé a kol., 2016). Další studií probíhající ve Španělsku byla studie Vidal a kol. (2010), v níž byl analyzován výskyt organických UV filtrů na veřejném koupališti a v řece. UV filtry byly nalezeny ve vodě z veřejného koupaliště. Nalezen byl isoamyl methoxycinamát v koncentraci $700 \pm 300 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ a methylbenzyliden kafr, jehož koncentrace byla na hranici kvantifikace (Vidal a kol., 2010). Ve studii Tsui a kol. (2014) byla provedena rozsáhlá analýza výskytu UV filtrů (4-methylbenzyliden kafr, ethylhexyl methoxycinamát, isoamyl methoxycinamát, oktokrylen, benzofenon-3, ethylhexyl salicylát, benzofenon-8, benzofenon-4, benzofenon-1) na lokalitách v Číně (Hongkong, Shantou a Chaozhou), Japonsku (Tokijský záliv), Thajsku (Bangkok) a ve Spojených státech (New York a Los Angeles). Vzorky byly odebrány z mořské vody s výjimkou Bangkoku, tam byla odebrána říční voda. Analyzování výskytu UV filtrů probíhalo vysoce-účinnou kapalinovou chromatografickou tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací

(HPLC-ESI-MS/MS). V Hongkongu se UV filtry vyskytovaly v nejvyšších naměřených koncentracích z testovaných lokalit. 4-MBC se zde vyskytoval v koncentracích od 173 do 379 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$, koncentrace ethylhexyl methoxycinamátu byla naměřena v rozmezí hodnot 89-4043 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$, isoamyl methoxycinamát v koncentracích od 63 do 173 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$, oktokrylen v rozmezí koncentrací 103-6812 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$, benzofenon-3 v koncentracích od 61 do 1030 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$ a homosalát v rozmezí koncentrací 66-2812 $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$. Na ostatních lokalitách se UV filtry vyskytovali v minimálně 10krát nižších koncentracích (Tsui a kol., 2014). V Japonsku došlo k analyzování 22 vzorků z řek a 3 vzorky z jezer. Vzorky byly analyzovány za pomoci plynového chromatografu propojeného s hmotnostním spektrometrem. V povrchové vodě bylo detekováno 13 z 18 UV filtrů. Nejvíce zastoupený byl UV-328, který se vyskytoval v rozmezí koncentrací 149-4780 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$. Dalším dominantním UV filterem byl ethylhexyl methoxycinamát, jehož koncentrace byla v rozmezí 125-1040 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ (Kameda a kol., 2011). V Katalánsku byl testován výskyt UV filtrů v říční a odpadní vodě. V říční vodě byl nalezen benzofenon-3 v koncentraci 6-28 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ a v odpadní vodě se vyskytoval v koncentraci 75-127 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$ (Pedrouzo a kol., 2010).

Největší počet naměřených UV filtrů v mé diplomové práci byl na rybníce Štílec, u kterého bylo detekováno devět UV filtrů v koncentracích větších než 10 $\text{ng} \times \text{l}^{-1}$. Limitací bodového odběru, provedeného v rámci této diplomové práce, je nižší reprezentativnost odběru, například v porovnání s odběry kompozitními vzorkovači či pasivním vzorkováním. Tyto typy odběru by bylo vhodné použít v budoucím výzkumu zaměřeném na podobné téma, aby bylo vyhodnoceno, zda jsou výsledky této práce dostatečně reprezentativní. Dále by bylo přínosné zjistit, zda se UV filtry mohou kumulovat v tkáních živočichů, zejména ryb v daných rybnících, na nichž byla detekována anti-progestagenní aktivita. Nejvhodnější by bylo sledování UV filtrů v rybách, které se do rybníku nevysazují v lovných velikostech. U nich existuje vyšší pravděpodobnost, že by v sobě mohly mít naakumulované větší množství UV filtrů.

Výskyt organických UV filtrů ve vodním prostředí může mít negativní vliv na endokrinní systém živočichů. U benzofenonu-3 a ethylhexyl methoxycinamátu bylo v experimentálních modelech *in vitro* a *in vivo* prokázáno, že mohou narušovat funkci estrogenních receptorů a ovlivňovat tak regulační změny v ose hypotalamus-hypofýza-gonáda (Carve a kol., 2021). Změny ve fyziologickém fungování endokrinního systému

mohou mít za následek například snížení reprodukční schopnosti živočichů a tím ovlivnit udržitelnost celého vodního ekosystému. Z tohoto důvodu je zapotřebí věnovat výskytu biologicky aktivních polutantů ve vodním prostředí náležitou pozornost a mělo by se přistoupit k intenzivnějšímu hodnocení rizik výskytu těchto polutantů a omezení jejich přísunu do vodního prostředí.

Příspěvní UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě

Anti-progestagenní aktivita byla detekována na přítoku na AČOV Tábor a ve čtyřech povrchových vodách (kapitola 4.3). Simultánně byl na těchto lokalitách sledován výskyt a byla měřena koncentrace řady UV filtrů (kapitola 4.4). Následně bylo testováno, zda tyto UV filtry vykazují anti-progestagenní aktivitu (kapitola 4.2). Na základě těchto tří informací (celková anti-progestagenní aktivita v environmentálním vzorku, koncentrace UV filtrů a anti-progestagenní aktivita UV filtrů) bylo možné odhadnout míru příspěvní UV filtrů k celkové anti-progestagenní aktivitě na sledovaných lokalitách.

Výsledky této studie (kapitola 4.5) indukují, že UV filtry jsou zodpovědné za téměř polovinu celkové anti-progestagenní aktivity (49,3 %) na přítoku na AČOV Tábor. Tato aktivita však byla na studované čistírně odstraněna a na odtoku již nebyla detekována. Jedná se však pouze o jednu ČOV a jak je známo, různé ČOV v České republice, a i jinde ve světě využívají různé technologie a míra odstranění UV filtrů se může výrazně lišit. Pokud by proces čištění odpadních na daných ČOV fungoval tak odlišně, že by UV filtry nebyly odstraněny v podobném množství jako na AČOV Tábor nebo pokud by nefungoval proces čištění na určité ČOV vůbec (například v důsledku havárie), představovaly by pravděpodobně UV filtry významného příspěvatele k anti-progestagenní aktivitě v povrchové vodě a tato aktivita by zřejmě významně vzrostla.

Anti-progestagenní aktivita se vyskytovala v recipientu odpadních vod z AČOV Tábor, kterým je řeka Lužnice, a to nad i pod zaústěním odtoku. Toto zjištění ukazuje na výskyt anti-progestagenních látek, jejichž zdrojem nejsou odpadní vody. Na rozdíl od odpadních vod bylo příspěvní UV filtrů k celkové anti-progestagenní aktivitě v řece Lužnici pouze velmi nízké, konkrétně 0,14 – 0,20 %. Anti-progestagenní aktivita byla v rámci této diplomové práce sledována také v dalších povrchových vodách, kterými byly rybníky v Jižních Čechách. Anti-progestagenní aktivita byla detekována ve dvou ze čtyř rybníků (Podroužek a Štílec). UV filtry byly podobně jako v řece Lužnici zodpovědné

pouze za zanedbatelnou část celkové anti-progestagenní aktivity 0,01 – 1,1 %. Z těchto výsledků dohromady vyplývá, že anti-progestagenní aktivita v českých povrchových vodách je způsobována do značné míry jinými látkami, než tomu bylo v surové odpadní vodě na AČOV v Táboře, kde tato aktivita byla do vysoké míry způsobována UV filtry. Jelikož podle mých informací nejsou do daných rybníků vypouštěny odpadní vody (alespoň ne v takové míře, jako je přijímají povrchové vody pod čistírnami odpadních vod), lze detekci anti-progestagenní aktivity v rybnících považovat za výsledek potvrzující hypotézu, že tato aktivita v povrchových vodách není významně způsobována látkami z odpadních vod.

Přestože byla významná část anti-progestagenní aktivity v odpadních vodách vysvětlena přítomností UV filtrů, látky zodpovědné za tuto aktivitu v povrchových vodách a jejich zdroj zůstávají nejasné. Nicméně, v této studii byla testována pouze jedna ČOV a další výzkum zahrnující větší množství odpadních vod a z různých zemí by měl rozšířit dané znalosti v problematice identifikace látek zodpovědných za anti-progestagenní aktivitu. Doposud existuje pouze jedna studie Houtman a kol. (2021), v níž byly identifikovány látky způsobující většinu detekované anti-progestagenní aktivity v povrchových vodách. Jednalo se o pesticidy metolachlor a cyazofamid (Houtman a kol., 2021). V různých zemích, a i na různých lokalitách mohou být odlišné zdroje látek způsobujících anti-progestagenní aktivitu. Zatím není jasné a mělo by být předmětem budoucího výzkumu zjišťování, jaké látky jsou zodpovědné za anti-progestagenní aktivity vyskytující se v povrchových vodách v různých zemích, včetně České republiky.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat potenciál environmentálně relevantních organických UV filtrů způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí. V této práci bylo analyzováno 20 organických UV filtrů pomocí anti-PR-CALUX *in vitro* biotestu. Podařilo se nám prokázat anti-progestagenní aktivitu u 9 organických UV filtrů, avšak v porovnání s nejsilnější látkou vykazující anti-progestagenní aktivitu se ukázalo, že síla této aktivity u testovaných UV filtrů je mnohonásobně slabší než u referenční látky mifepristonu. Třemi nejsilnějšími látkami ze skupiny organických UV filtrů byly ethylhexyl methoxycinamát, 4-methylbenzyliden kafr a oktokrylen.

Dále byly v této práci analyzovány (anti-)progestagenní aktivity ve vzorcích odpadní a povrchové vody. Progestagenní aktivita nebyla v testovaných vzorcích detekována. Anti-progestagenní aktivita byla nalezena v 60-ti % vzorků. Koncentrace anti-progestagenní aktivity v odpadní vodě byla $3,1 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu a v povrchové vodě se pohybovala v rozmezí od 2,6 do $4,5 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ ekvivalentů mifepristonu. Anti-progestagenní aktivita byla detekována v surové odpadní vodě přitékající na čistírnu odpadních vod, v řece Lužnici a v rybnících, které slouží pro chov ryb, ale také jako přírodní veřejná koupaliště. U těchto rybníků se předpokládá, že by neměly být zatížené komunálními odpadními vodami, z čehož lze usuzovat, že čistírny odpadních vod nebudou jediným zdrojem znečištění vodního prostředí anti-progestagenními látkami.

Pro posouzení přispění organických UV filtrů k anti-progestagenní aktivitě ve vodním prostředí jsme dostali k dispozici výsledky chemické analýzy, při které bylo detekováno třináct látek používaných k ochraně proti UV záření. UV filtry byly nalezeny na všech lokalitách (odpadní i povrchové vody). Kumulativní koncentrace UV filtrů se na vzorkovacích lokalitách pohybovaly v rozmezí $27\text{-}474 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$. Nejvíce zatížená výskytem organických UV filtrů byla surová odpadní voda v přítoku na areálovou čistírnu odpadních vod Tábor. Koncentrace UV filtrů na přítoku odpadní vody se pohybovaly v rozmezí $4,1\text{-}4100 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$ s největším zastoupením okrokrylenu ($4100 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$) a ethylhexyl methoxycinamátu ($1200 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$). V povrchové vodě bylo kvantifikováno deset UV filtrů, jejichž koncentrace se pohybovaly v rozmezí hodnot $0,22\text{-}190 \text{ ng} \times \text{l}^{-1}$.

Celkové přispění organických UV filtrů (u kterých byla prokázána anti-progestagenní aktivita) k anti-progestagenní aktivitě na testovaných lokalitách bylo nejvyšší na přítoku na AČOV Tábor, kde UV filtry přispěly k aktivitě z 49,3 % a největším přispěvatelem byl ethylhexyl methoxycinamát, jenž se podílel na aktivitě z 38,7 %. Ve vzorcích z řeky Lužnice a veřejných koupališť se UV filtry na aktivitě podílely pouze z přibližně 1 %, což značí, že UV filtry nejsou hlavními látkami vykazující anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí veřejných koupališť a látky způsobující tuto aktivitu nám zůstávají stále neznámé. Z tohoto důvodu by bylo vhodné se v budoucím výzkumu zaměřit na identifikaci látek způsobujících anti-progestagenní aktivitu v povrchové vodě a jejich dopad na vodní organismy, u kterých může docházet k narušení endokrinního systému a akumulaci těchto látek s rizikem následné biomagnifikace do vyšších trofických úrovní.

7 Přehled použité literatury

- Africander, D., Verhoog, N., Hapgood, J.P., 2011. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*. 76, 636-652.
- Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., Poiger, T., 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science & Technology* 39, 953-962.
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, Ch., Fent, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J. P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research* 46, 1912-1922.
- Benedé, J. L., Chisvert, A., Giokas, D. L., Salvador, A., 2016. Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 147, 246-252
- Beranová, P., 2017. Sledování (anti-)progestagenní aktivity v odpadních vodách pomocí *in vitro* biotestu. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. Vedoucí práce doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.
- Besse, J. P., Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution* 157, 3485-3494.
- Brooke, D., Burns, J. S., Crookes, M. J., 2008. Using science to create a better place: UV-filters in cosmetics-prioritisation for environmental assessment. Environment Agency.
- Buser, H. R., Balmer, M. E., Schmid, P., Kohler, M., 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 40, 1427-1431.
- Cadepond, F., Ulmann, A., Baulieu, E. E., 1997. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annual Review of Medicine* 48, 129-156.
- Calafat, A. M., Needham, L. L., 2007. Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice* 253-268.
- Carve, M., Nugegoda, D., Allinson, G., Shimeta, J., 2021. A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments. *Environmental Pollution* 268, 115-894.

- Caswell, M., 2001. Sunscreen formulation and testing. *Cosmetics and Toiletries* 116, 49-60.
- Cosmeticsinfo.org. [online]. Copyright © 2023 All Rights Reserved. [citace: 07.02.2023].
Dostupné z: <https://www.cosmeticsinfo.org/ingredients/>
- Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107, 907-938.
- De Baat, M. L., Van der Oost, R., Van der Lee, G. H., Wieringa, N., Hamers, T., Verdonschot, P. F. M., De Voogt, P., Kraak, M. H. S., 2020. Advancements in effect-based surface water quality assessment. *Water Research* 183, 116017.
- DeHart, R. M., Morehead, M. S., 2001. Mifepristone. *Annals of Pharmacotherapy* 35, 707-719.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 293-342.
- Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 708-717.
- Dickerson, S. M., Gore, A. C., 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8, 143-159.
- Diffey, B. L., Stokes, R. P., Forestier, S., Mazilier, C., Rougier, A., 2000. Suncare product photostability: a key parameter for a more realistic *in vitro* efficacy evaluation. *European Journal of Dermatology* 7, 226-228.
- Elger, W., Beier, S., Pollow, K., Garfield, R., Shi, S. Q., Hillisch, A., 2003. Conception and pharmacodynamic profile of drospirenone. *Steroids* 68, 891-905.
- Encyklopedie.biooo.cz. [online]. [citace: 06.02.2023]. Dostupné z: encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/
- European Parliament, 2007. European Parliament legislative resolution of 22 May 2007 on the proposal for a directive of the European Parliament and of the council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC (COM(2006)0397 – C6-0243/2006 – 2006/0129(COD)). Annex X. Line 33.
- Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution* 158, 1817-1824.

- Gackowska, A., Przybyłek, M., Studziński, W., Gaca, J., 2014. Experimental and theoretical studies on the photodegradation of 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in the presence of reactive oxygen and chlorine species. *Central European Journal of Chemistry* 12, 612-623.
- Gago-Ferrero, P., Diaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2012. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2597-2610.
- Giokas, D. L., Sakkas, V. A., Albanis, T. A., 2004. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1026, 289-293.
- Giokas, D. L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 360-374.
- Golovko, O., Šauer, P., Fedorova, G., Kroupová, H. K., Grabic, R., 2018. Determination of progestogens in surface and wastewater using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Science of The Total Environment*, 621, 1066-1073.
- Gonzalez, H., Farbrot, A., Larkö, O., Wennberg, A. M., 2006. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *British Journal of Dermatology* 154, 337-340.
- Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, Ch., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kroupova, H. K., Grabic, R., 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96, 41-47.
- Graham, J. D., Clarke, C. L., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 18, 502-519.
- Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J., Brouwer, A., 2006. *In Vitro* profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Sciences* 92, 157-173.
- Heurung, A. R., Raju, S. I., Warshaw, E. M., 2014. Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. *Dermatitis* 25, 289-326.
- Houtman, C. J., Brewster, K., Broek, R. t., Duijve, B., Oorschot, Y. v., Rosielle, M., Lamoree, M. H., Steen, R. J. C. A., 2021. Characterisation of (anti-)progestogenic and (anti-)androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis. *Environment International* 153, 106536.

- Janjua, N. R., Kongshoj, B., Andersson, A. M., Wulf, H. C., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology* 22, 456-461.
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J., Poelarends, G. J., Terpstra, P., 2005. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental microbiology* 7, 1868-1882.
- Jobling, S., Burn, R. W., Thorpe, K., Williams, R., Tyler, C., 2009. Statistical modelling suggests that antiandrogens in effluents from wastewater treatment works contribute to widespread sexual disruption in fish living in English rivers. *Environmental Health Perspectives* 117, 797-802.
- Fisch, K., Waniek, J. J., Schulz-Bull, D., 2017. Occurrence of pharmaceuticals and UV-filters in riverine run-offs and waters of the German Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 124, 388-399.
- Kameda, Y., Kimura, K., Mijazaki, M., 2011. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution* 159, 1570-1576.
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R. W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 104, 8897-8901.
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., Müller, L., 2005. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 584, 1-256.
- Knutson, T.P., Lange, C.A., 2014. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 142, 114-125.
- Kocour Kroupová, H., Grimaldi, M., Šauer, P., Bořík, A., Zálhová, K., Balaguer, P., 2023. Environmental water extracts differentially activate zebrafish and human nuclear progesterone receptors. *Science of The Total Environment* 859, 160232.
- Kratochvíl, F., 4-methylbenzilidene camphor. [online]. [citace: 06.02.2023]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/pasports/M%20024%20B.pdf>
- Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Søeborg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Skakkebaek, N. E., Drzewiecki, K. T., 2012. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International Journal of Andrology* 35, 424-436.

- Krulová, J., 2021. Mapování výskytu (anti-)progestagenních aktivit v povrchových vodách České republiky. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. Vedoucí práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B. O., Corton, J. C., Safe, S. H., Van Der Saag, P. T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J. A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H., 2015. The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research: A Critical Review. *Environmental Science & Technology* 49, 2625-2638.
- Kunz, P. Y., Fent, K., 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 86-99.
- Kunz, P. Y., Galicia, H. F., Fent, K., 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences* 90, 349-361.
- Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., Thomas, K. V., 2015. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International* 80, 1-7.
- Lapczynski, A., McGinty, D., Jones, L., Bhatia, S., Letizia, C. S., Api, A. M., 2007. Fragrance material review on benzyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology* 45, 362-380.
- Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J. P., Wang, Z., 2008. *In vitro* profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicology Letters* 183, 65-71.
- Li, J., Ma, M., Wang, Z., 2010. *In vitro* profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicology in Vitro* 24, 201-207.
- Maier, H., Hönigsmann, H., Schaubeger, G., Brunnhofer, K., 2001. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 256-262.
- Magi, E., Di Carro, M., Scapolla, C., Nguyen, K. T. N., 2012. Stir bar sorptive extraction and LC-MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices. *Chromatographia* 75, 973-982.
- Manaiá, E. B., Kaminski, R. C. K., Corrêa, M. A., Chiavacci, L. A., 2013. Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49, 201-209.

- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835.
- Manová, E., von Goetz, N., Hauri, U., Bogdal, C., Hungerbühler, K., 2013. Organic UV filters in personal care products in Switzerland: a survey of occurrence and concentrations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216, 508-514.
- Mapy.cz. [online]. © Seznam.cz, a.s.. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=15.6250752&y=49.8825590&z=7>
- Miletín, M., 2011. Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. *Praktika lékáren* 7, 34-38.
- Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích [online]. [citace: 06.02.2023]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=CS>
- Nařízení vlády č. 174/1998 Sb. Nařízení vlády o technických požadavcích na kosmetické prostředky a o změně nařízení vlády č. 173/19. *Sbírka zákonů ČR v aktuálním konsolidovaném znění* [online]. Copyright © AION CS, s.r.o. 2010 [citace: 12.02.2023]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1998-174>
- Nash, J. F., Tanner, P. R., 2014. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 30, 88-95.
- 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.
- Oliveira, H. M., Segundo, M. A., Lima, J. L., Miró, M., Cerdá, V., 2010. On-line renewable solid-phase extraction hyphenated to liquid chromatography for the determination of UV filters using bead injection and multisyringe-lab-on-valve approach. *Journal of Chromatography A* 1217, 3575-3582.
- Osterwalder, U., Sohn, M., Herzog, B., 2014. Global state of sunscreens. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 30, 62-80.
- 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.

- Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M., Pocurull, E., 2010. Stir-bar-sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agents in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 2833-2839.
- Pfaendner, R., 2006. How will additives shape the future of plastics? *Polymer Degradation and Stability* 91, 2249-2256.
- Poiger, T., Buser, H. R., Balmer, M. E., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55, 951-963.
- PubChem. PubChem [online]. Copyright © 2021 Denis Pushkarev [cit. 15.03.2023]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L., 2015. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment-a review. *Science of The Total Environment* 526, 278-311.
- Rao, K., Li, N., Ma, M., Wang, Z., 2014. *In vitro* agonistic and antagonistic endocrine disrupting effects of organic extracts from wastewater of different treatment processes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 8, 69-78.
- Runde, K., Castro, G., Vike-Jonas, K., González, S. V., Asimakopoulos, A. G., Arp, H. P. H., 2022. Occurrence and sorption behaviour of bisphenols and benzophenone UV-filters in e-waste plastic and vehicle fluff. *Journal of Hazardous Materials* 426, 127814.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 238 s.
- Sánchez-Quiles, D., Tovar-Sánchez, A., 2015. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? *Environment International* 83, 158-170.
- Santos, A. J. M., Esteves da Silva, J. C. G., 2019. Environmental fate and behaviour of benzophenone-8 in aqueous solution. *Environmental Technology & Innovation* 13, 48-61.
- Santos, A. J. M., Margarida, S. M., Esteves da Silva, J. C.G., 2012. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research* 46, 3167-3176.
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives* 109, 239-244.

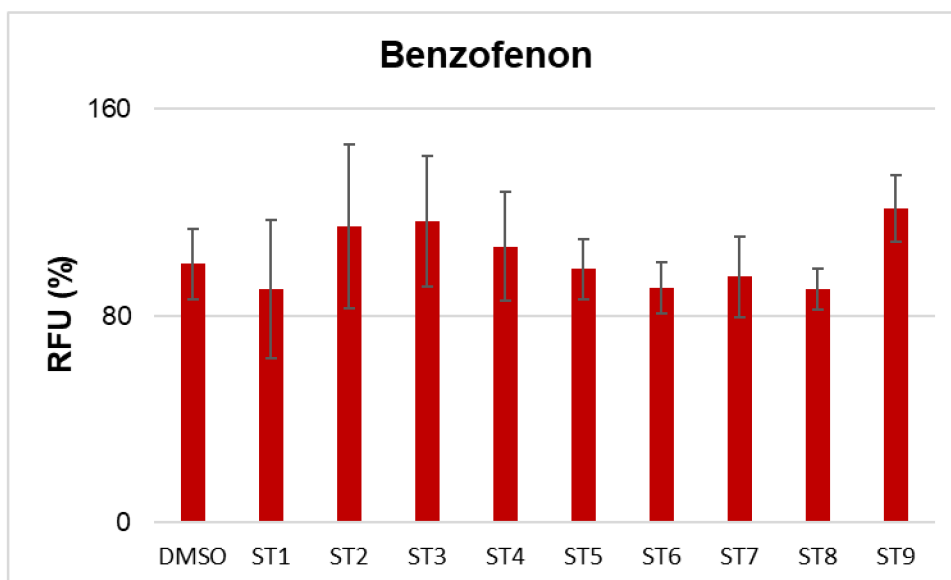
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P. J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., Köhrle, J., 2004. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205, 95-102.
- Schreurs, R. H. M. M., Sonneveld, E., Jansen, J. H. J., Seinen, W., van der Burg, B., 2005. Interaction of Polycyclic Musks and UV Filters with the Estrogen Receptor (ER), Androgen Receptor (AR), and Progesterone Receptor (PR) in Reporter Gene Bioassays. *Toxicological Sciences* 83, 264-272.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Linden, S. C., 2009. Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. *RIWA*. 25.
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., Heindel, J. J., 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 204-215.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313, 1072-1077.
- Scott, A. P., Sumpter, J. P., Stacey, N., 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology* 76, 183-224.
- Scott, P. D., Bartkow, M., Blockwell, S. J., Coleman, H. M., Khan, S. J., Lim, R., McDonald, J. A., Nice, H., Nuggeoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L. A., Warne, M. St. J., Leusch, F. D. L., 2014. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and *in vitro* analyses. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 12951-12967.
- Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare product. *Inorganica Chimica Acta* 360, 794-802.
- Shaath, N. A., 2005. *Sunscreens: Regulations and commercial development*. CRC Press, 976.
- Shaath, N. A., 2010. Ultraviolet filters. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 464-469.
- Sigmaaldrich.com. [online]. [citace: 18.10.2022]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>

- Siller, A., Blaszkak, S. C., Lazar, M., Harken, E. O., 2018. Update about the effects of the sunscreen ingredients oxybenzone and octinoxate on humans and the environment. *Plastic and Aesthetic Nursing* 38, 158-161.
- Sitruk-Ware, R., 2008. Reprint of pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 61, 151-157.
- Smijs, T. G., Pavel, S., 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, 95-112.
- 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.
- Spitz, I. M., Chwalisz, K., 2000. Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids* 65, 807-815.
- Stanczyk, F. Z., Hapgood, J. P., Winer, S., Mishell Jr, D. R., 2013. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects. *Endocrine Reviews* 34, 171-208.
- Stiefel, C., Schwack, W., 2015. Photoprotection in changing times—UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *International Journal of Cosmetic Science* 37, 2-30.
- Suzuki, G., Tue, N. M., Malarvannan, G., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Tanabe, S., Sakai, S., Briuwer, A., Uramaru, N., Kitamura, S., Takigami, H., 2013. Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays. *Environmental Science & Technology* 47, 2898-2908.
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S., 2005. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 9-17.
- Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kocour Kroupová, H., 2018a. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water Research* 137, 64-71.

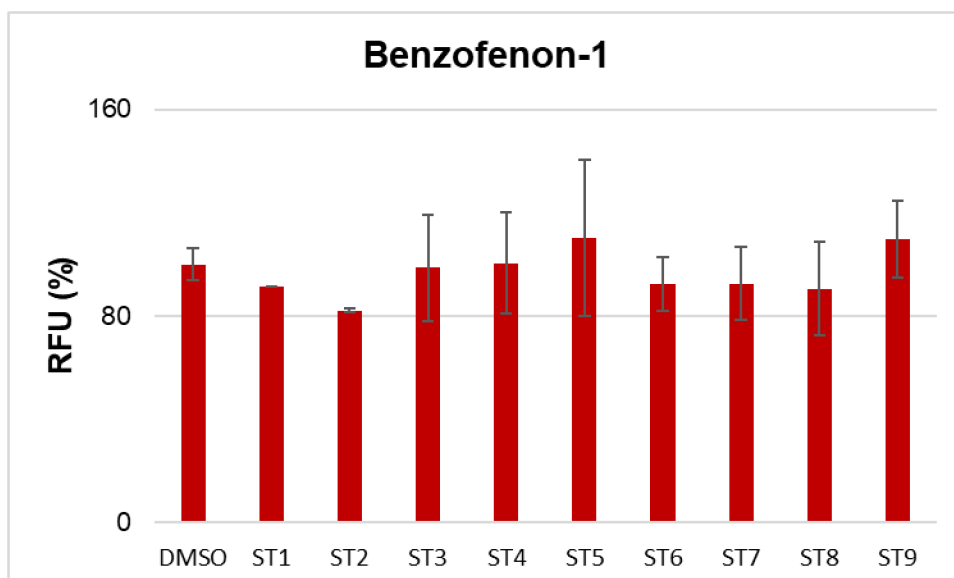
- Šauer, P., Bořík, A., Golovko, O., Grabic, R., Vojs Staňová, A., Valentová, O., Stará, A., Šandová, M., Kocour Kroupová, H., 2018b. Do progestins contribute to (anti-)androgenic activities in aquatic environments? *Environmental Pollution* 242, 417-425.
- Šauer, P., Švecová, H., Grabicová, K., Aydin, F. G., Mackuřák, T., Kodeš, V., Blytt, L. D., Henninge, B., Grabic, R., Kocour Kroupová, H., 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, 1-11.
- Tabb, M. M., Blumberg, B., 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology* 20, 475-482.
- Thia, E., Chou, P. H., Chen, P. J., 2020. *In vitro* and *in vivo* screening for environmentally friendly benzophenone-type UV filters with beneficial tyrosinase inhibition activity. *Water Research* 185, 116208.
- Tinwell, H., Lefevre, P. A., Moffat, G. J., Burns, A., Odum, J., Spurway, T. D., Orphanides, G., Ashby, J., 2002. Confirmation of uterotrophic activity of 3-(4-methylbenzylidene) camphor in the immature rat. *Environmental Health Perspectives* 110, 533-536.
- Tsui, M. M. P., Leung, H. W., Wai, T. Ch., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P. K. S., Murphy, M. B., 2014. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Research* 67, 55-65.
- Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., Salvador, A., 2010. Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta* 81, 549-555.
- Wang, J., Xie, P., Kettrup, A., Schramm, K. W., 2005. Inhibition of progesterone receptor activity in recombinant yeast by soot from fossil fuel combustion emissions and air particulate materials. *Science of The Total environment* 349, 120-128.
- Water News Europe. [online]. Three sunscreen agents feature in 2022 surface water watch list. Copyright © 2020 [citace: 11.3.2023]. Dostupné z: <https://www.waternewseurope.com/surface-water-watch-list/#:~:text=Three%20sunscreen%20agents%20feature%20in%202022%20surface%20water,Microplastics%20...%207%20Plastics%20in%20drinking%20water%20>
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2663-2670.

8 Přílohy

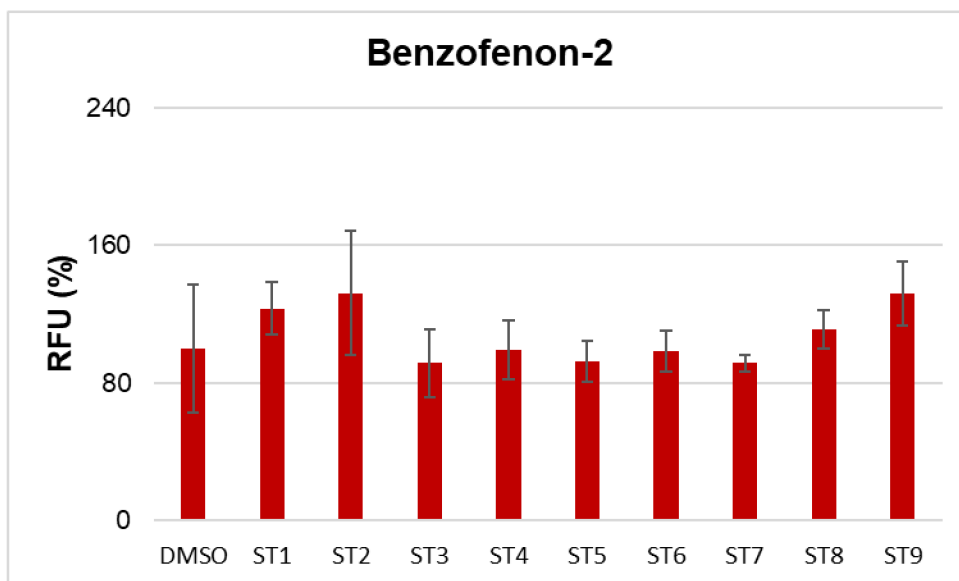
Příloha č. 1: Testování organických UV filtrů na cytotoxicitu pro anti-progestagenní aktivitu



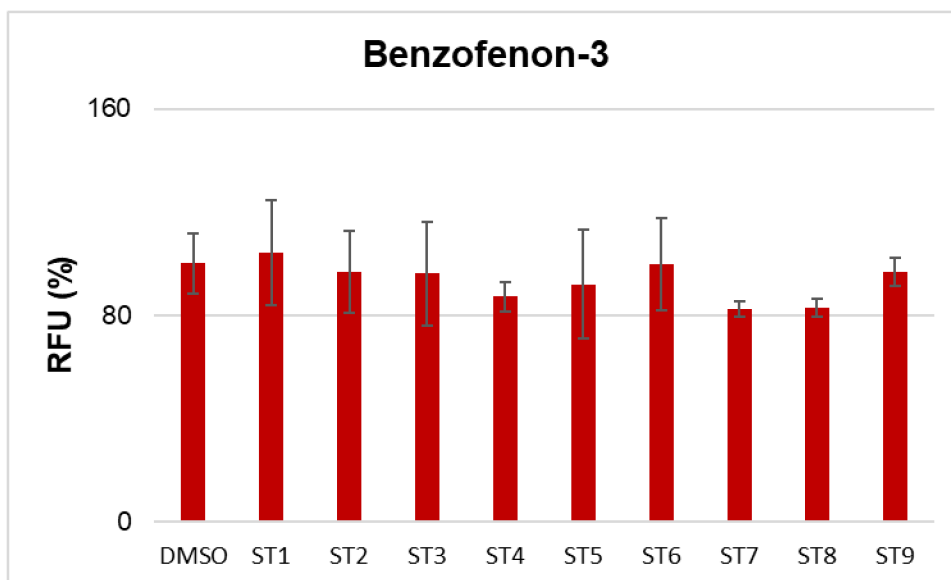
Graf č. 2 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu



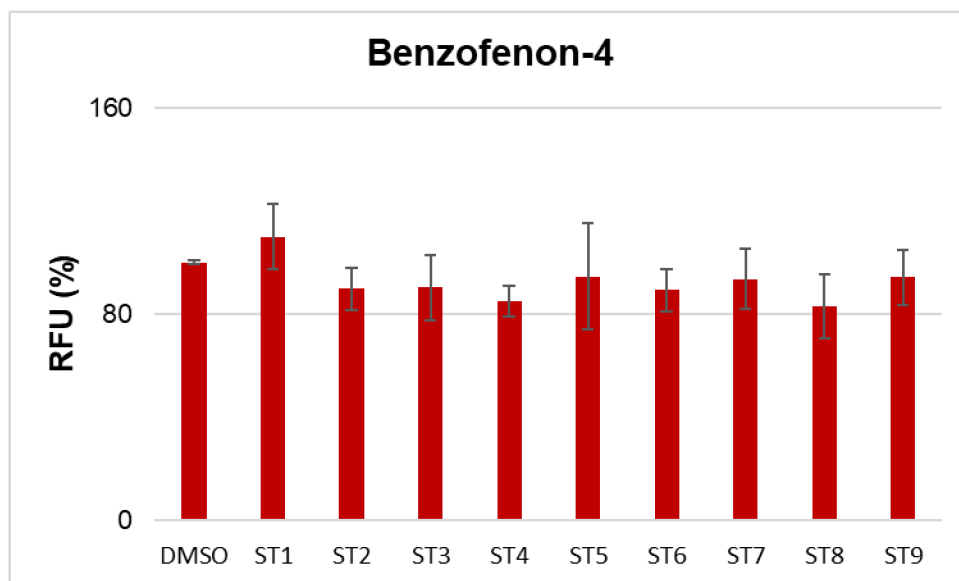
Graf č. 3 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-1



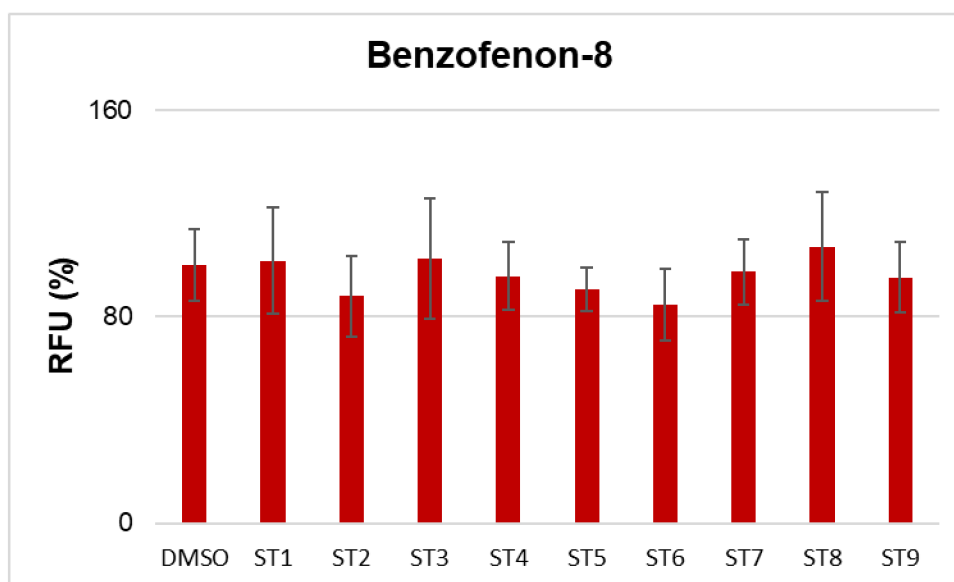
Graf č. 4 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-2



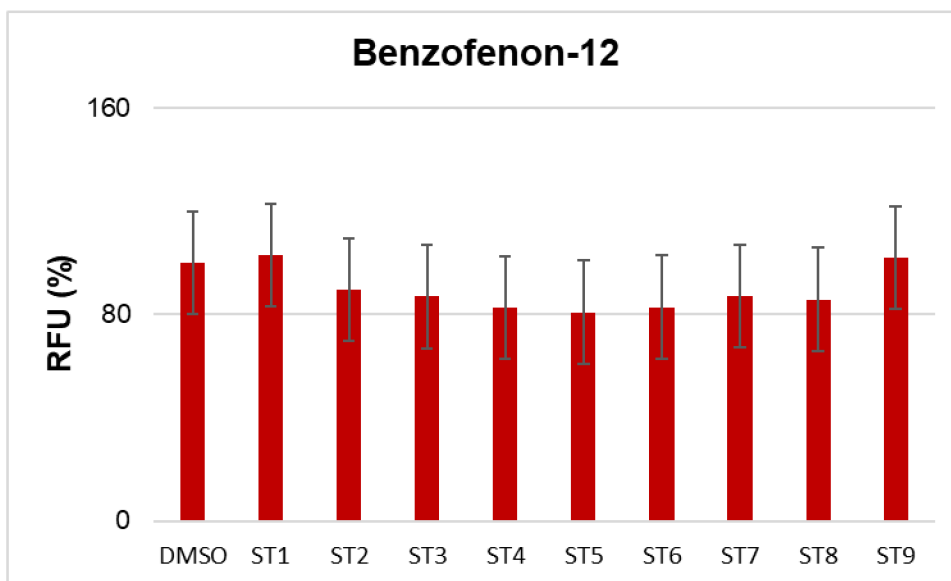
Graf č. 5 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-3



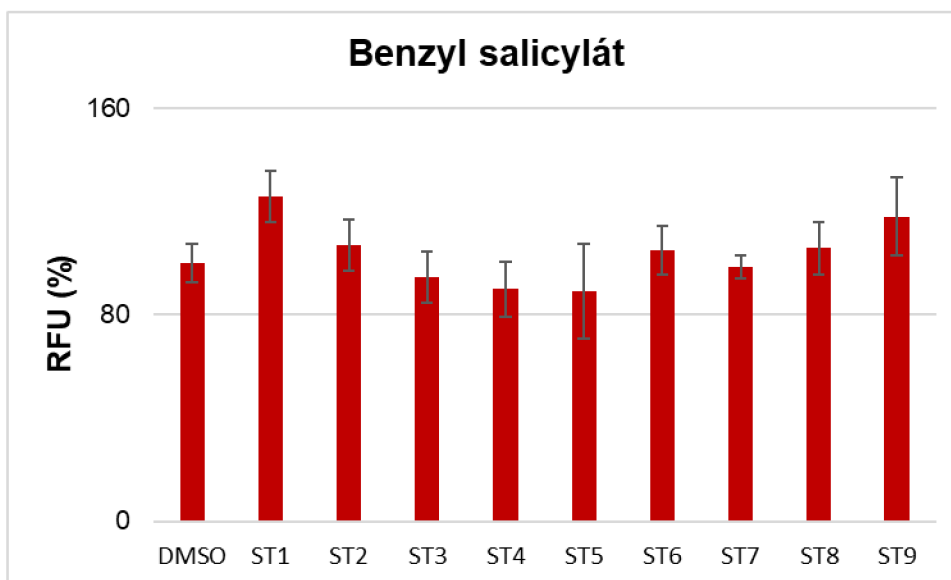
Graf č. 6 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-4



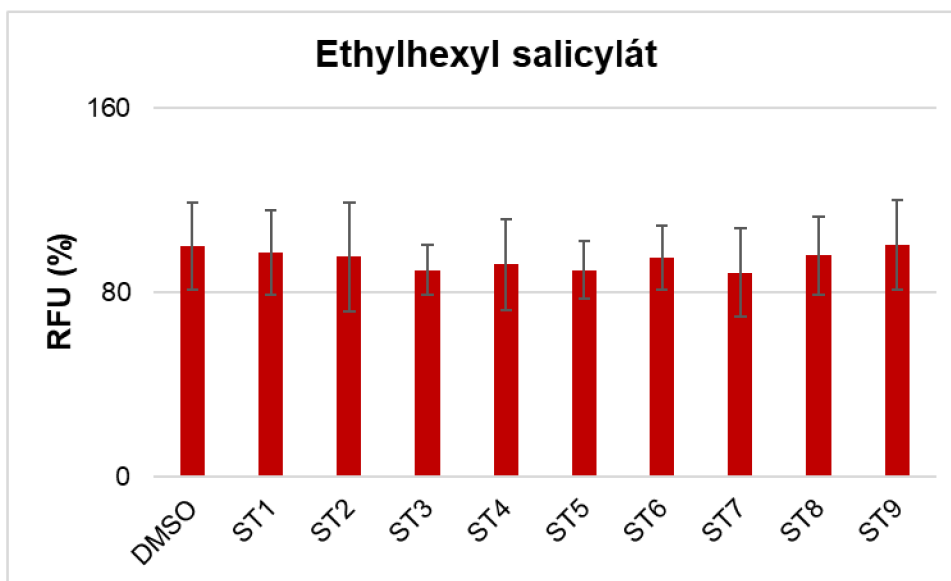
Graf č. 7 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-8



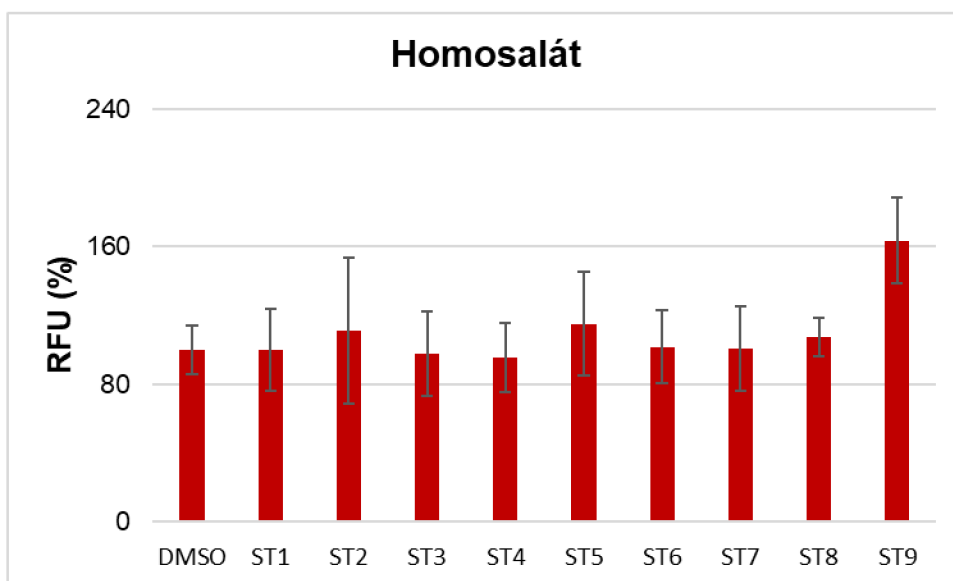
Graf č. 8 Viabilita buněk exponovaných benzofenonu-12



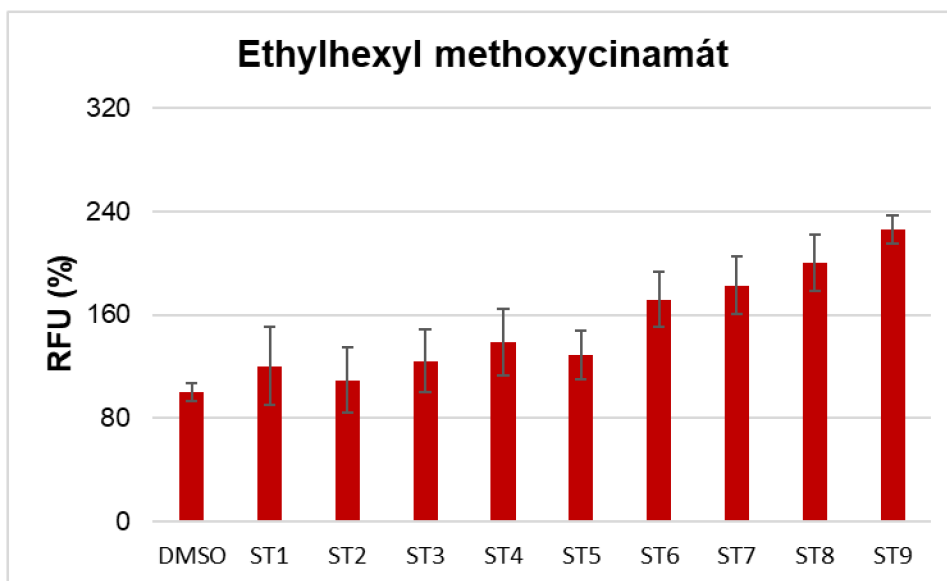
Graf č. 9 Viabilita buněk exponovaných benzyl salicylátu



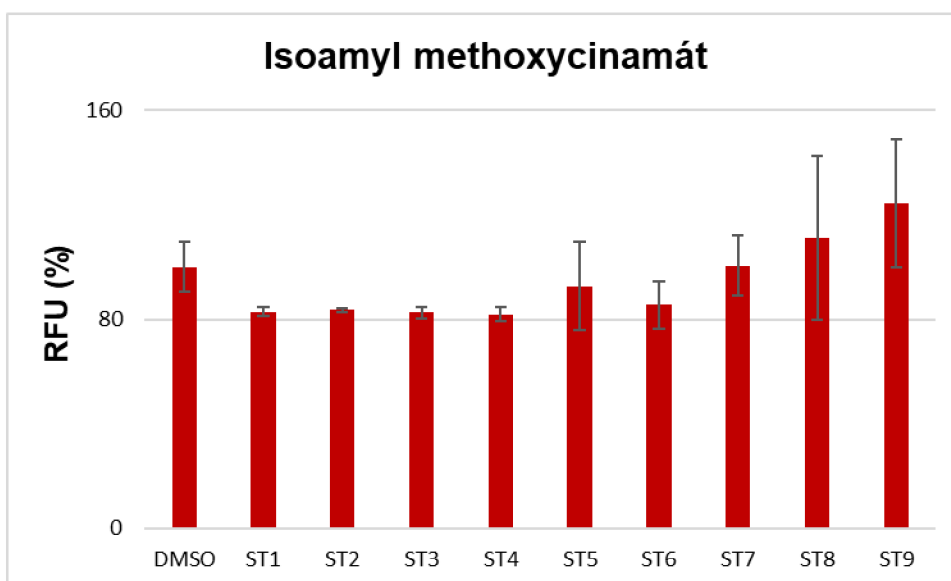
Graf č. 10 Viabilita buněk exponovaných ethylhexyl salicylátu



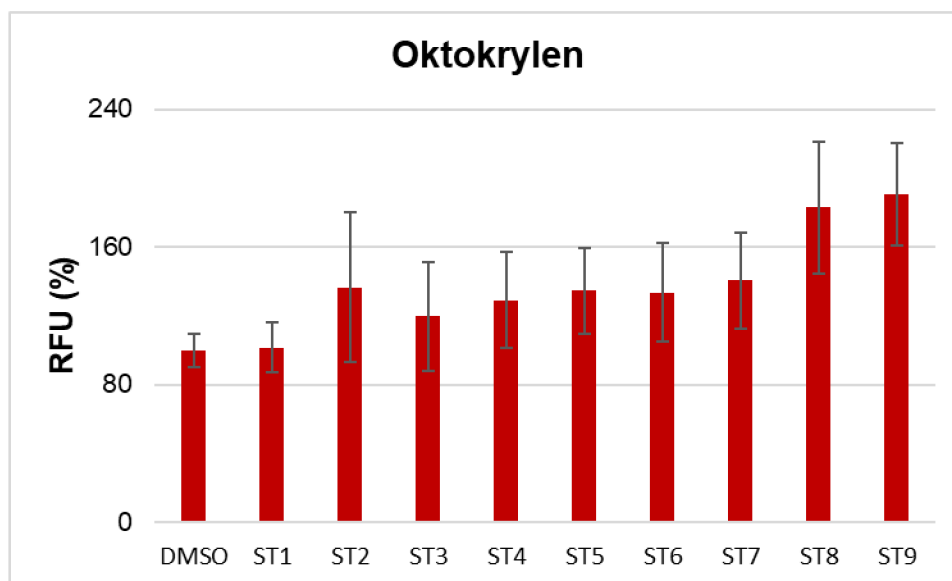
Graf č. 11 Viabilita buněk exponovaných homosalátu



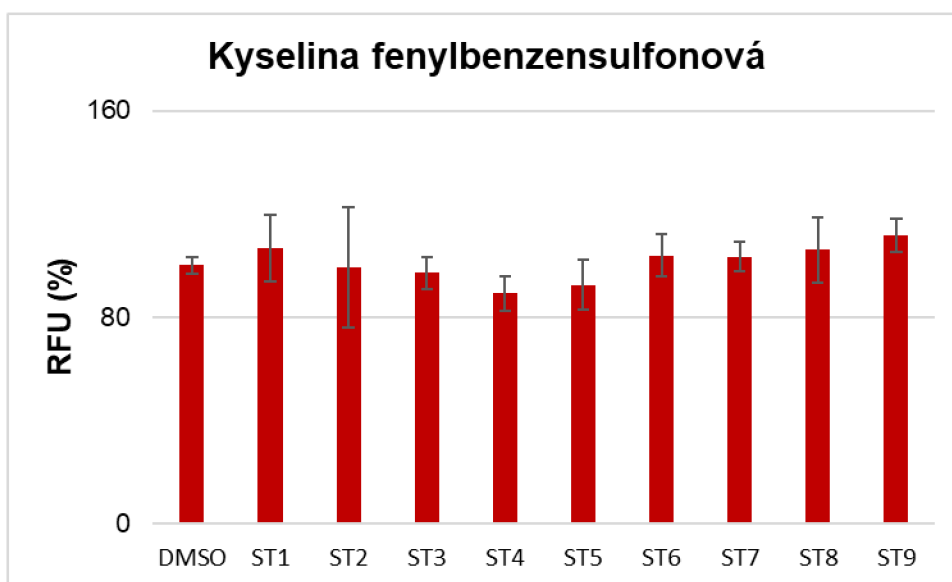
Graf č. 12 Viabilita buněk exponovaných ethylhexyl methoxycinamátu



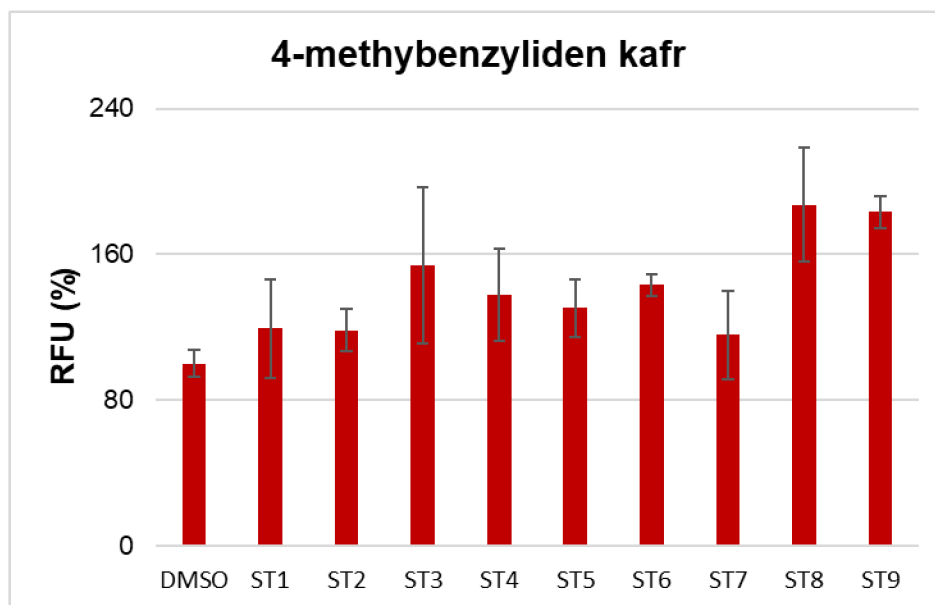
Graf č. 13 Viabilita buněk exponovaných isoamyl methoxycinamátu



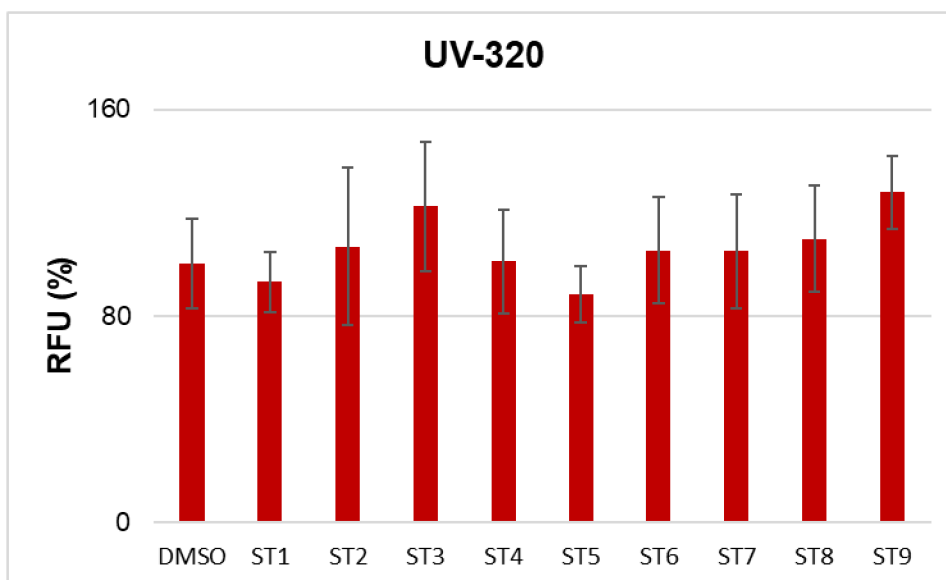
Graf č. 14 Viabilita buněk exponovaných oktokrylenu



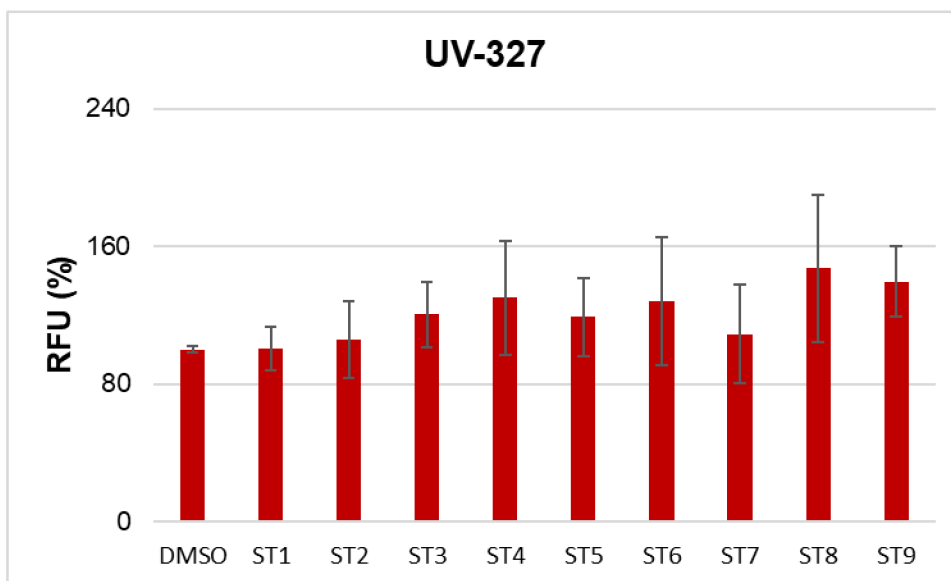
Graf č. 15 Viabilita buněk exponovaných kyselině fenybenzensulfonové



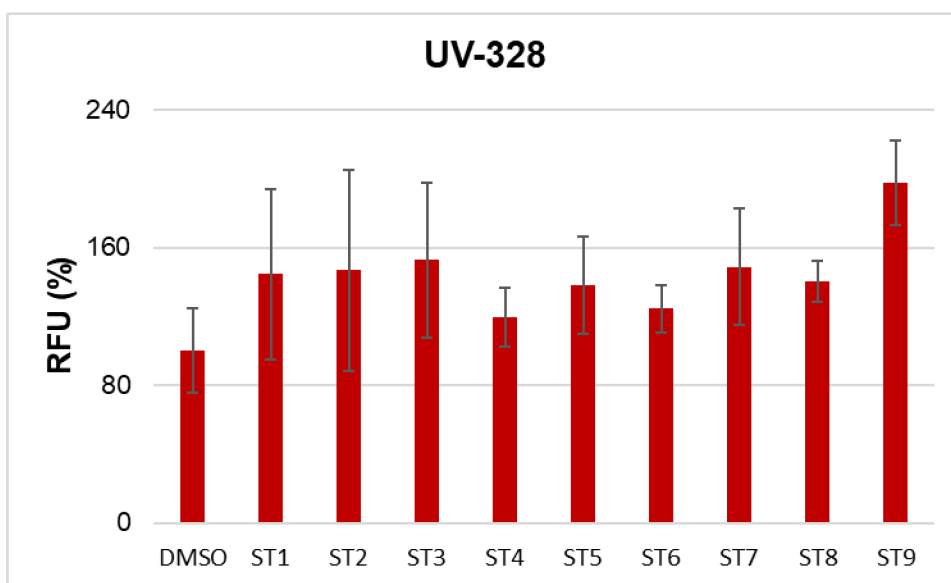
Graf č. 16 Viabilita buněk exponovaných 4-methylbenzyliden kafru



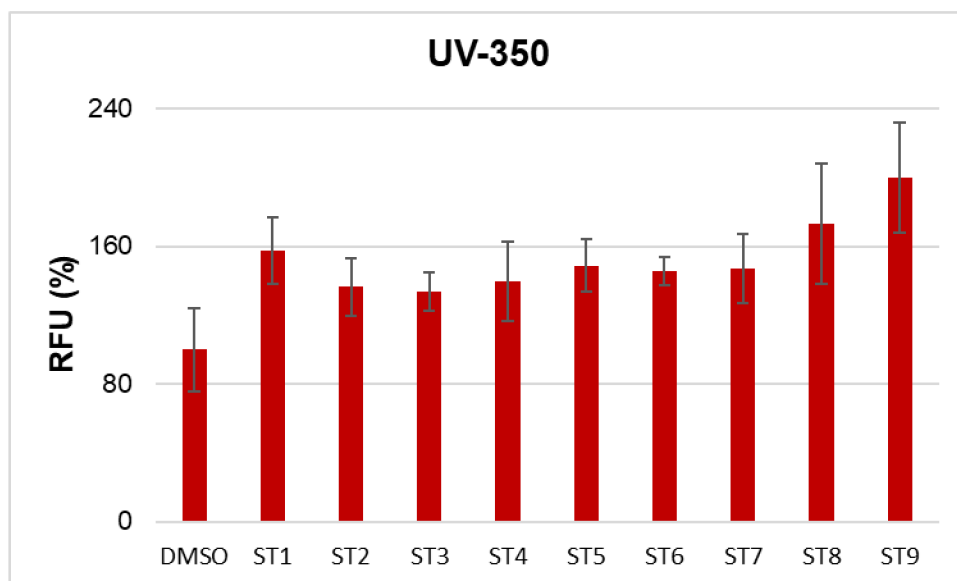
Graf č. 17 Viabilita buněk exponovaných UV-320



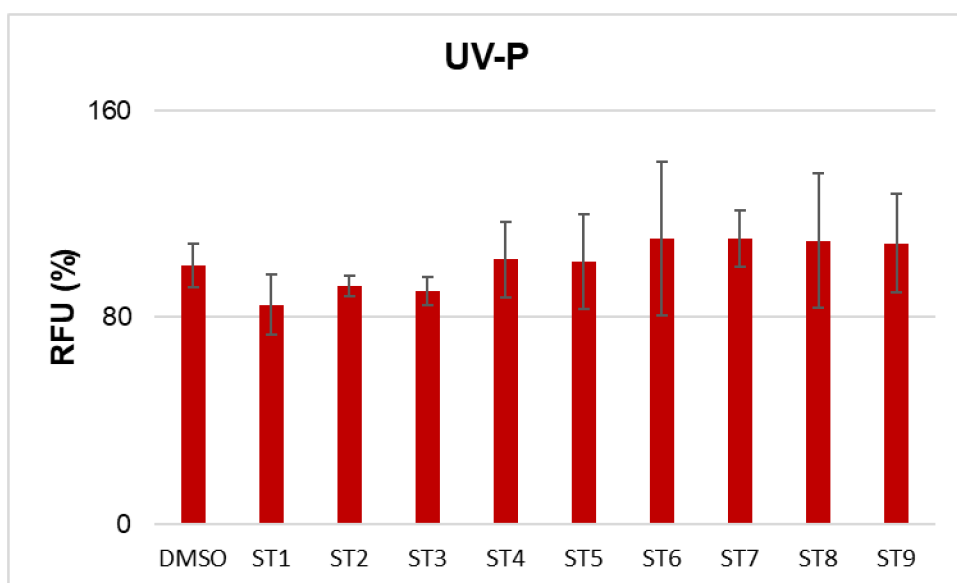
Graf č. 18 Viabilita buněk exponovaných UV-327



Graf č. 19 Viabilita buněk exponovaných UV-328

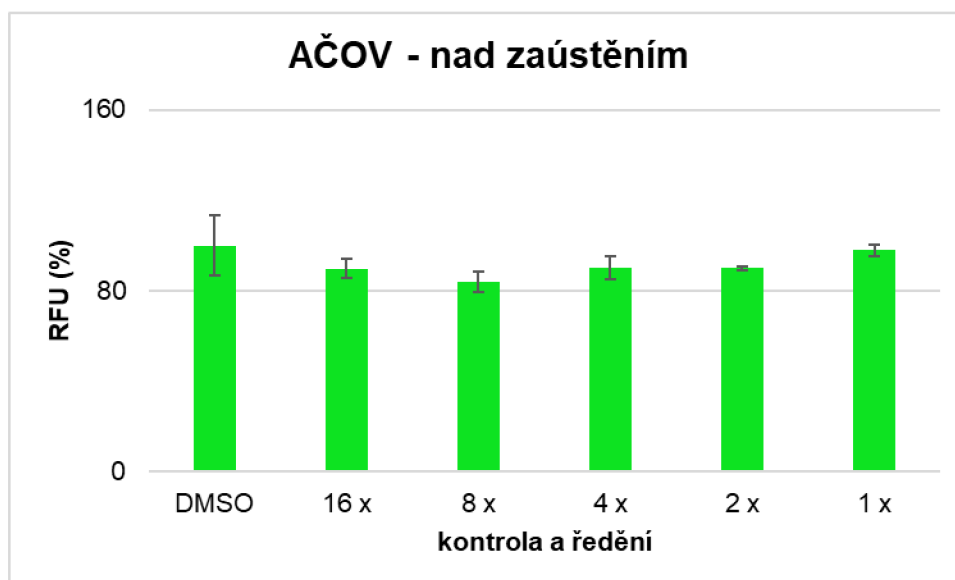


Graf č. 20 Viabilita buněk exponovaných UV-350

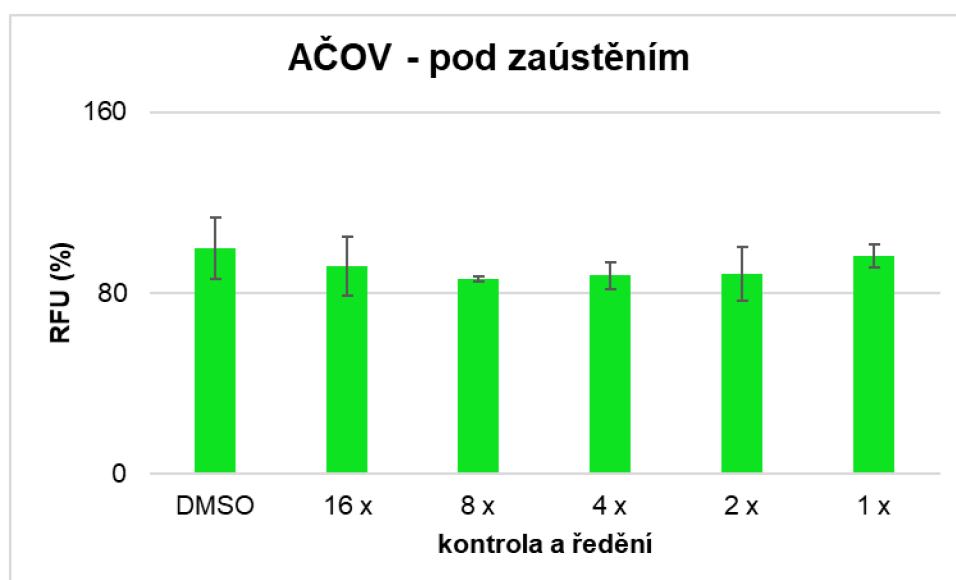


Graf č. 21 Viabilita buněk exponovaných UV-P

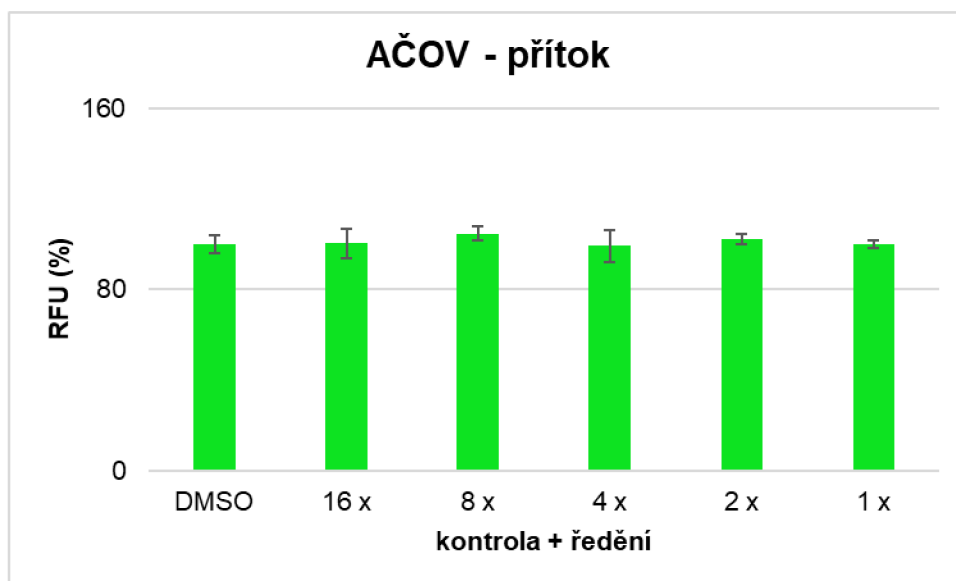
Příloha č. 2: Testování extraktů z čistírny odpadních vod a z povrchových vod na cytotoxicitu pro anti-progestagenní aktivitu



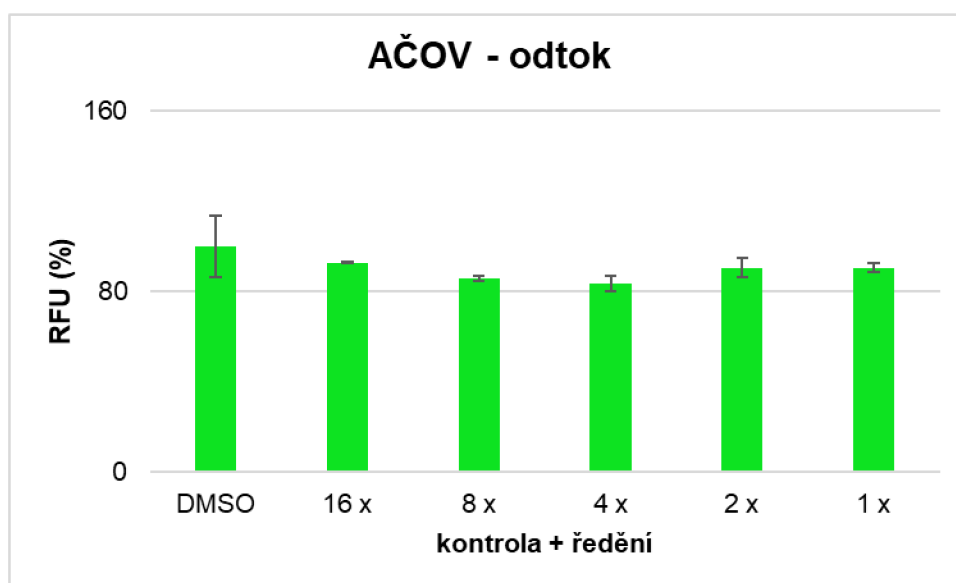
Graf č. 22 Viabilita buněk exponovaných extraktům z AČOV – nad zaústěním



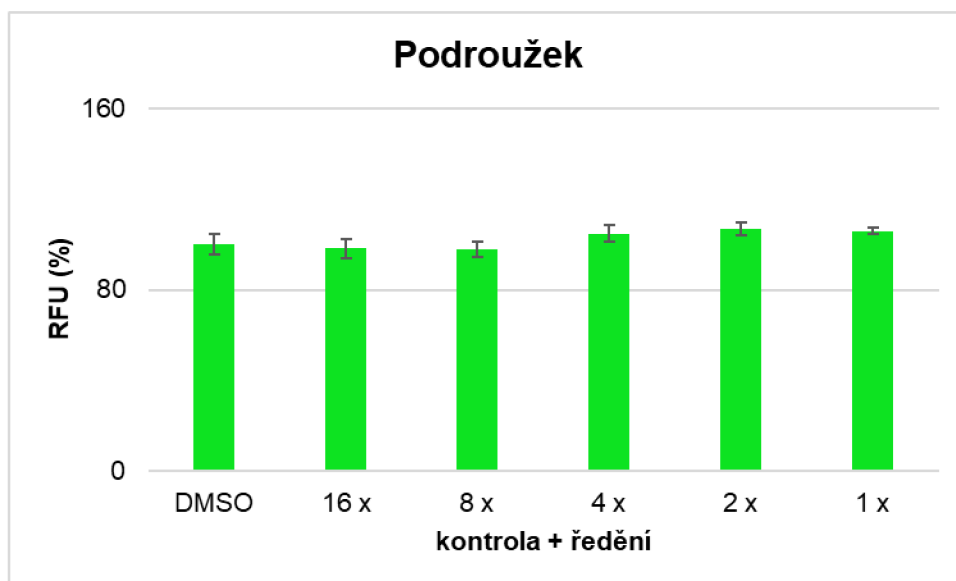
Graf č. 23 Viabilita buněk exponovaných extraktům z AČOV – pod zaústěním



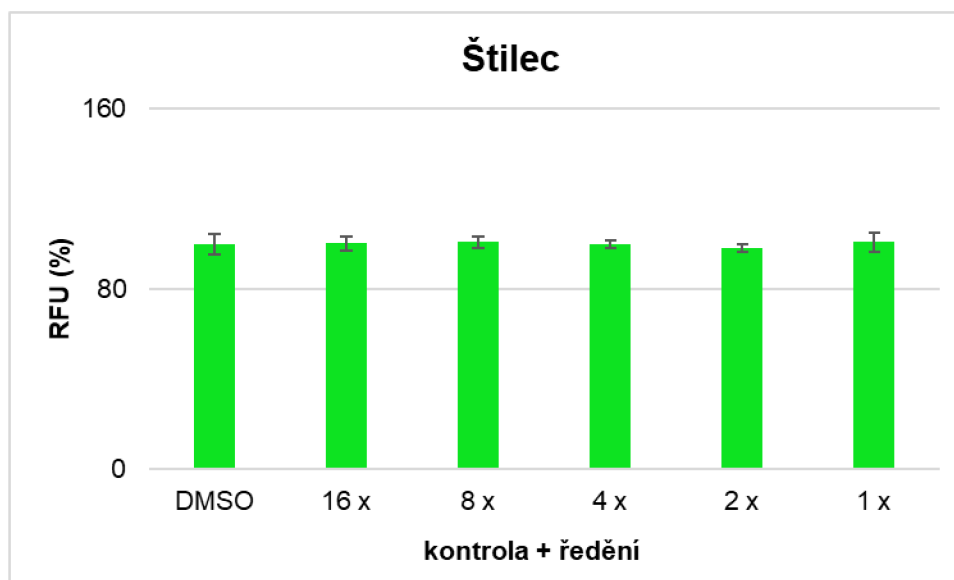
Graf č. 24 Viabilita buněk exponovaných extraktům z AČOV – přítok



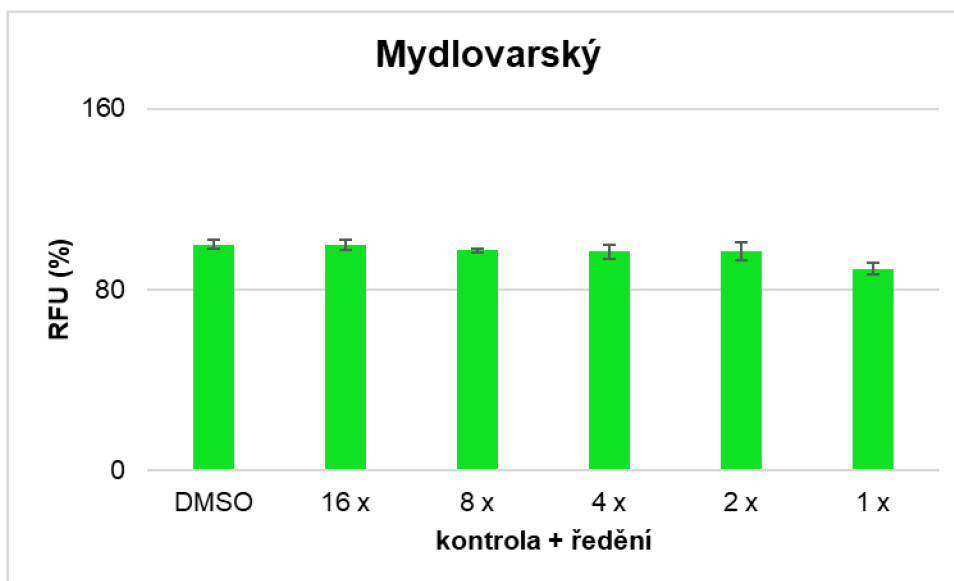
Graf č. 25 Viabilita buněk exponovaných extraktům z AČOV – odtok



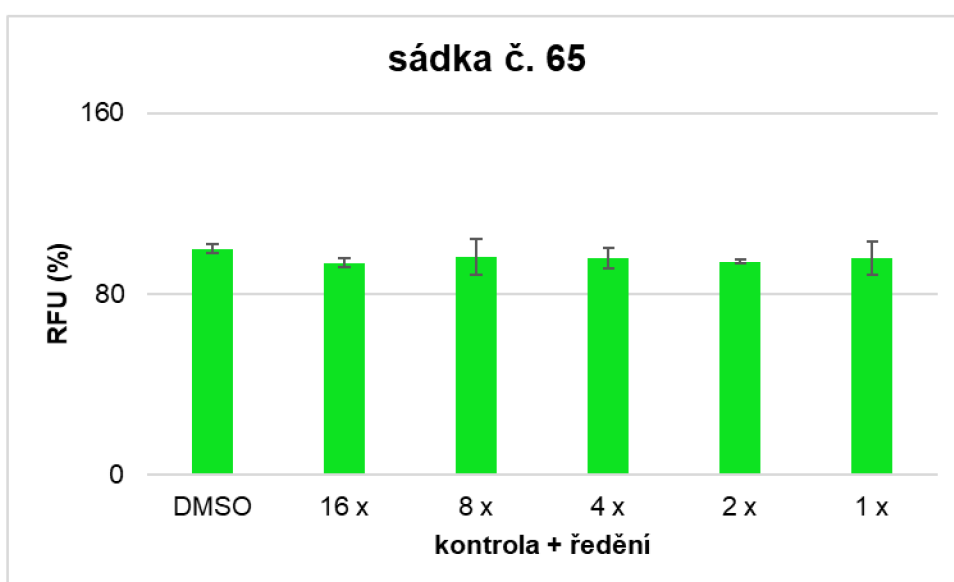
Graf č. 26 Viabilita buněk exponovaných extraktům z rybníku Podroužek



Graf č. 27 Viabilita buněk exponovaných extraktům z rybníku Štílec



Graf č. 29 Viabilita buněk exponovaných extraktům z Mydlovarského rybníku



Graf č. 30 Viabilita buněk exponovaných extraktům ze sádek č. 65 na rybochovném pracovišti Model na pokusnictví ve Vodňanech

9 Abstrakt

Název práce: Zjišťování potenciálu chemických látek používaných k ochraně proti ultrafialovému záření (UV filtrů) způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí

Látky používané k ochraně proti UV záření (UV filtry) jsou široce využívány v průmyslu a také v produktech denní potřeby. V mnoha zemích po celém světě bylo zaznamenáno, že se dostávají do vodního prostředí. Přítomnost UV filtrů v povrchových vodách může představovat riziko pro vodní organismy. Cílem této diplomové práce bylo otestovat řadu látek, ze skupiny UV filtrů na anti-progestagenní aktivitu, detekovat tuto aktivitu ve vodním prostředí, detekovat UV filtry ve vodním prostředí a na základě těchto informací vyhodnotit potenciál organických UV filtrů způsobovat anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí.

V této diplomové práci bylo testováno 20 organických UV filtrů *in vitro* biotestem anti-PR-CALUX. V tomto biotestu byly buňky vystaveny čistým látkám (UV filtrům) a referenční látce mifepristonu. Dále byly odebrány bodovým (aktivním) odběrem vzorky z areálové čistírny odpadních vod v Táboře a z povrchových vod (veřejná koupaliště a řeka Lužnice). Vzorky byly extrahovány pomocí extrakce na pevné fázi. Tyto extrakty odpadní a povrchové vody byly testovány na progestagenní a anti-progestagenní aktivitu biotesty (anti-)PR-CALUX a také v nich byla měřena koncentrace UV filtrů hmotnostní spektrometrií. Vzorky byly také testovány na cytotoxicitu testem redukce resazurinu.

Anti-progestagenní aktivitu vykazovalo 9 organických UV filtrů, ale v porovnání s referenční látkou byly aktivity vykazované UV filtry řádově nižší. Nejsilnější aktivitu zjištěnou u UV filtrů vykazovaly ethylhexyl methoxycinamát, benzofenon-3 a oktokrylen. Progestagenní aktivita nebyla nalezena na žádné z lokalit. Anti-progestagenní aktivita byla nalezena u 60 % vzorků a naměřené koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 2,6 do 4,5 ng × l⁻¹ ekvivalentů mifepristonu. Anti-progestagenní aktivita byla detekována na přítoku odpadní vody na čistírnu, v recipientu řeky Lužnice a na rybochovných rybnících sloužících též jako veřejná koupaliště. Chemickou analýzou bylo identifikováno třináct organických UV filtrů vyskytujících se na testovaných lokalitách. V nejvyšších koncentracích se vyskytovaly UV filtry oktokrylen a ethylhexyl methoxycinamát, zároveň tyto dva UV filtry nejvíce přispěly k celkové anti-

progestagenní aktivitě. Na přítoku vody na čistírnu odpadních vod přispěly UV filtry k celkové anti-progestagenní aktivitě ze 49 %. V recipientu řeky Lužnice a veřejných koupališť bylo přispění UV filtrů k této aktivitě velmi malé což značí, že tato aktivita bude způsobována výskytem jiných látek. U rybníků lze předpokládat, že zdrojem těchto látek nebudou čistírny odpadních vod.

Další výzkum by měl být zaměřený na detekci dopadu výskytu organických UV filtrů ve vodním prostředí na organismy, ale také na identifikaci látek způsobujících anti-progestagenní aktivitu ve vodním prostředí.

Klíčová slova: UV filtry, anti-progestagenní aktivita, in vitro, biotest, CALUX,

10 Abstract

Name of thesis: Determination of the potential of chemical substances used for the protection from ultraviolet rays (UV filters) to cause anti-progestagenic activity in the aquatic environment

The substances used for protection against UV radiation (UV filters) are widely used in industry and also in personal care products. It has been reported from many countries around the world that they enter the aquatic environment. The presence of UV filters in surface waters can pose a risk to aquatic organisms. The aim of this thesis was to test a range of substances from the group of UV filters for anti-progestagenic activity, detect this activity in the aquatic environment, detect UV filters in the aquatic environment, and based on this information, evaluate the potential of organic UV filters to cause anti-progestagenic activity in the aquatic environment.

In this thesis, 20 organic UV filters were tested with *in vitro* bioassay anti-PR-CALUX. In this bioassay cells were exposed to pure substances (UV filters) and reference substance mifepristone. Samples were taken by grab (active) sampling from wastewater treatment plant in Tábor and from surface waters (outdoor swimming pools and Lužnice River). Samples were extracted using solid phase extraction. These extracts from waste and surface waters were tested for progestagenic and anti-progestagenic activity with the (anti-)PR-CALUX bioassay and the concentrations of UV filters were measured using mass spectrometry in the extracts. Samples were also tested for cytotoxicity with the resazurin reduction assay.

Nine organic UV filters have shown anti-progestagenic activity, but compared to the reference substance, the activities exhibited by UV filters were several orders of magnitude lower. Ethylhexyl methoxycinnamate, benzophenone-3, and octocrylene were the most potent anti-progestagens. Progestagenic activity was not found at any of the sites. Anti-progestagenic activity was found in 60% of the environmental extracts, and the concentrations ranged from 2.6 to 4.5 ng × L⁻¹ equivalents of mifepristone. Anti-progestagenic activity was detected in the influent of wastewater into the treatment plant, in the recipient of the Lužnice River, and in ponds used for fish farming and also as outdoor swimming pools, namely the Podroužek and Štílec ponds. Thirteen organic UV filters were identified by chemical analysis at the tested sites. The UV filters octocrylene

and ethylhexyl methoxycinnamate were found in the highest concentrations, these two UV filters contributed the most to the overall anti-progestagenic activity. At the wastewater treatment plant influent, UV filters contributed 49% to the total anti-progestagenic activity. In the recipient of the Lužnice River and outdoor swimming pools, the contribution of UV filters to this activity was very small, which means that this activity in surface waters will be caused by the occurrence of other substances than in wastewater. In ponds, it can be assumed that wastewater treatment plants will not be the source of these substances.

Further research should be aimed at detecting the impact of the occurrence of organic UV filters in the aquatic environment on organisms, but also at identifying substances causing anti-progestagenic activity in the aquatic environment.

Keywords: UV filters, anti-progestagenic activity, *in vitro*, bioassay, CALUX