

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Sledování (anti-)progestagenní aktivity
v odpadních vodách pomocí *in vitro* biotestu**

Autor: Bc. Petra Beranová

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Pavel Šauer

Studijní program a obor: Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2. NMgr.

České Budějovice, 2017

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

Datum: 5.5.2017

Podpis studenta:

Petra Beranová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. a Ing. Pavlu Šauerovi za metodické vedení, odbornou pomoc, cenné připomínky a věnovaný čas při vypracování této diplomové práce.

Poděkování patří také Ing. Jiřímu Starovi ze společnosti ČEVAK a.s. za poskytnutí vzorků odpadní vody, které byly použity pro účely této práce.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra BERANOVÁ**
Osobní číslo: **V15N007P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Sledování (anti-)progestagenní aktivity v odpadních vodách pomocí *in vitro* biotestu**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Syntetické progestiny jsou látky, které vykazují stejně jako ženský hormon progesteron progestagenní aktivitu, a proto mají potenciál negativně ovlivňovat endokrinní systém exponovaných organismů. V důsledku velké spotřeby léčiv s obsahem syntetických progestinů se předpokládá, že právě tyto látky jsou hlavními přispěvateli k progestagenní aktivitě odpadních i některých povrchových vod. Navzdory tomu jsou doposud v dostupné literatuře pouze kusé informace o tom, do jaké míry ovlivní proces čištění na čistírnách odpadních vod (ČOV) progestagenní aktivitu odpadních vod. V relativně velkém množství jsou v léčivech konzumovány také anti-progestiny a selektivní modulátory progesteronového receptoru. Tyto látky mají (anti-)progestagenní aktivitu, tedy schopnost blokovat progesteronový receptor, což může rovněž vést k endokrinním poruchám.

Cílem diplomové práce bude detekovat (anti-)progestagenní aktivity *in vitro* pomocí buněčné linie PR-CALUX ve vzorcích odpadních vod odebraných z přítoku a odtoku z několika ČOV a na základě získaných výsledků posoudit účinnost procesu čištění daných ČOV z tohoto hlediska.

Metodický postup: Odpadní voda bude odebrána pomocí kompozitního vzorkovače nebo tam, kde to nebude možné, bodovým odběrem z přítoku a odtoku několika městských ČOV. Vzorky odpadních vod budou extrahovány technikou extrakce na pevné fázi (SPE - solid phase extraction). S extrakty pak budou prováděny PR-CALUX *in vitro* biotesty pro zjištění (anti-)progestagenní aktivity. Jako referenční látka pro progestagenní aktivitu bude použit syntetický progestin ORG 2058 a pro anti-progestagenní aktivitu syntetický anti-progestin mifepriston (RU-486). Získaná data budou statisticky vyhodnocena pomocí nelineární regrese. Následně bude posouzena účinnost ČOV eliminovat látky vykazující (anti-)progestagenní aktivitu. Extrakty OV budou otestovány na cytotoxicitu pomocí testu redukce resazurinu, aby byl vyloučen toxický vliv extraktů na životnost buněk.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 20 stran)**
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: **Ing. Pavel Šauer**
Datum zadání diplomové práce: **15. prosince 2016**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2017**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 15. prosince 2016

Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné 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(7), 636-652.
- Bain, P. A., Williams, M., & Kumar, A., 2014. Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(10), 2297-2307.
- Besse, J. P., & Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 157(12), 3485-3494.
- Kumar, V., Johnson, A. C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas W., Tanaka H., & Kroupová, H. K., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environmental Science & Technology*, 49(5), 2625-2638.
- Leusch, F. D., Khan, S. J., Laingam, S., Prochazka, E., Froschio, S., Trinh, T., Chapman H. F., & Humpage, A., 2014. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*, 49, 300-315.
- 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.
- Philibert, D., Bouchoux, F., Degryse, M., Lecaque, D., Petit, F., & Gaillard, M., 1999. The pharmacological profile of a novel norpregnane progestin (trimegestone). *Gynecological Endocrinology*, 13(5), 316-326.
- Schriks, M., Heringa, M. B., & van der Linden, S. C., 2009. Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. *Association of Rhine Waterworks - RIWA, The Netherlands*, pp. 24.
- Sonneveld, E., Pieterse, B., Schoonen, W. G., & van der Burg, B., 2011. Validation of in vitro screening models for progestagenic activities: inter-assay comparison and correlation with in vivo activity in rabbits. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 545-554.
- Van der Linden, S. C., Heringa, M. B., Man, H. Y., Sonneveld, E., Puijker, L. M., Brouwer, A., & Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5814-5820.
- Viswanath, G., Halder, S., Divya, G., Majumder, C. B., & Roy, P., 2008. Detection of potential (anti)-progestagenic endocrine disruptors using a recombinant human progesterone receptor binding and transactivation assay. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 295(1), 1-9.

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	<i>In vitro</i> testy používané k testování toxicity	10
2.2	Detekce hormonální aktivity pomocí <i>in vitro</i> testů.....	10
2.3	<i>In vitro</i> testy založené na expresi reportérového genu	11
2.4	<i>In vitro</i> testy pro detekci (anti-)progesteragenní aktivity	11
2.4.1	CALUX (Chemically Activated Luciferase gene eXpression)	11
2.4.1.1.	PR-CALUX.....	14
2.4.2	Yeast progesteron screen (YPS)	15
2.5	Sledování progesteragenní aktivity ve vodách	16
2.6	Látky s progesteragenní aktivitou	18
2.6.1	Progesteron.....	18
2.6.2	Syntetické progestiny.....	20
2.7	Koncentrace progestinů ve vodách.....	24
2.8	Sledování antiprogestagenní aktivity ve vodách.....	26
2.9	Látky s antiprogestagenní aktivitou	27
2.9.1	Syntetické antiprogestiny.....	27
2.10	Koncentrace antiprogestinů ve vodách	28
2.11	Další látky s antiprogestagenní aktivitou	29
2.11.1	Koncentrace UV filtrů, musk sloučenin a bromovaných retardantů hoření na ČOV.....	30
3	Materiál a metodika	32
3.1	Chemikálie.....	32
3.2	Odběr a převoz vzorků a charakteristika sledovaných čistíren odpadních vod.....	32
3.3	Extrakce vzorků odpadní vody	34
3.4	Evaporace eluátů.....	34
3.5	Kultivace buněčných kultur	34
3.6	PR-CALUX <i>in vitro</i> biotest	35
3.7	Nasazení extraktů odpadní vody na 96-jamkovou mikrotitrační destičku	35
3.7.1	Progesteragenní aktivita.....	35

3.7.2	Antiprogestagenní aktivita	37
3.8	Testování cytotoxicity	39
3.9	Vyhodnocování dat	40
3.9.1	Vyhodnocení dat pro detekci hormonální aktivity v programu Excel	40
3.9.2	Vyhodnocení výsledků testu cytotoxicity v programu STATISTICA 12	41
3.10	Výpočet odstranění (anti-)progestagenní aktivity na ČOV	42
4	Výsledky.....	43
4.1	Progestagenní aktivita zjištěná na přítoku a odtoku jednotlivých ČOV	43
4.1.1	ČOV Milevsko	44
4.1.2	ČOV Vodňany	44
4.1.3	ČOV Protivín	44
4.1.4	ČOV Prachatice.....	44
4.1.5	ČOV Písek	44
4.1.6	ČOV České Budějovice.....	44
4.2	Antiprogestagenní aktivita zjištěná na přítoku a odtoku jednotlivých ČOV	46
4.2.1	ČOV Milevsko	47
4.2.2	ČOV Vodňany	47
4.2.3	ČOV Protivín	47
4.2.4	ČOV Prachatice.....	47
4.2.5	ČOV Písek	47
4.2.6	ČOV České Budějovice.....	47
5	Diskuze	49
6	Závěr.....	52
7	Použitá literatura.....	53
8	Přílohy	64
9	Abstrakt	68
10	Abstract	69

1 Úvod

Spotřeba léčiv ve světě neustále roste a jednou z hojně konzumovaných skupin jsou léčiva s obsahem syntetických (anti-)progestinů. Tyto látky se využívají zejména v hormonální antikoncepci, ale i v potratových pilulkách a při léčbě některých patologických stavů. Syntetické (anti-)progestiny jsou vedle přírodního progesteronu pravděpodobně největšími přispěvateli (anti-)progestagenní aktivity odpadních a povrchových vod, jelikož se ve formě splašků dostávají na čistírny odpadních vod, které je nedokáží plně odbourat a skrze ně pak pronikají do vod povrchových. Látky s (anti-)progestagenní aktivitou mohou negativně ovlivňovat endokrinní systém jimi vystavených organismů, řadí se proto mezi tzv. endokrinní disruptory.

Cílem této práce bylo detekovat za pomoci PR-CALUX *in vitro* biotestu (anti-)progestagenní aktivitu odpadních vod z přítoku a odtoku šesti jihočeských čistíren odpadních vod. Na základě výsledků byla odhadnuta účinnost odstranění (anti-)progestagenně aktivních látek na těchto čistírnách.

2 Literární přehled

2.1 *In vitro* testy používané k testování toxicity

Název *in vitro* pochází z latiny a v překladu znamená „ve skle“. Testy *in vitro* jsou prováděny v laboratorních podmínkách, zpravidla v baňkách, Petriho miskách, zkumavkách, mikrotitračních destičkách a podobně. Z tohoto důvodu jsou označovány také jako testy „ve zkumavce“ (Bhanushali a kol., 2010).

Celosvětově se přistupuje k nahrazování *in vivo* testů prováděných na zvířatech, aby nedocházelo k jejich utrpení. Jednou z alternativ jsou testy *in vitro*, k jejichž testování nejsou využívány celé organismy, ale pouze jejich části, např: tkáně, buňky nebo orgány. Jedná se o tzv. princip replacement, patřící do principů 3R (replacement (nahrazení), refinement (zmírňování), reduction (snižování)) (Russel a Burch, 1959). Tato skutečnost představuje nespornou etickou výhodu oproti testům *in vivo*, ve kterých je využito, případně zabito, podstatně více živých organismů. Počet usmrcených zvířat pro účely *in vivo* testů je odhadován na 50-100 miliónů za rok, to má za následek rostoucí tlak na snižování počtu těchto testů (Bhanushali a kol., 2010). *In vitro* testy jsou relativně rychlé, citlivé a jednoduché na provedení. Charakterizuje je vysoká reprodukovatelnost a částečná automatizace vyhodnocování. Finanční nákladnost je pokládána za nízkou vzhledem k velkému počtu vzorků (Pampaloni a kol., 2007). Nevýhodou *in vitro* testů je naopak to, že neposkytují informace o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME) cizorodých látek v organismu (Sonneveld a kol., 2006).

2.2 Detekce hormonální aktivity pomocí *in vitro* testů

V současné době existuje mnoho *in vitro* biotestů, které jsou používány k detekci hormonální aktivity. Většina z nich byla dosud zaměřena na (anti-)estrogenní aktivitu, v menší míře pak na (anti-)androgenní, (anti-)progestagenní, (anti-)glukokortikoidní, (anti-)thyroidní atd. aktivitu. Mezi tyto testy patří například test vazby ligandu na receptor, test proliferace buněk či testy s reportérovými geny (Murk a kol., 2002; Schriks a kol., 2009; Blair a kol., 2000; Soto a kol., 1995). Hormonální aktivita je udávána v ekvivalentních koncentracích vztahujících se k referenční látce (ng/l určitých

ekvivalentů; např. progesteronových, mifepristonových, levonorgestreolových, 17- β estradiolových, dihydrotestosteronových atd.).

2.3 *In vitro* testy založené na expresi reportérového genu

In vitro testy založené na expresi reportérového genu představují relativně jednoduchou a rychlou metodu pro detekci sloučenin, které jsou schopné se vázat na hormonální receptory a stimulují či inhibují jejich transkripční aktivitu (Svobodová a Cajthaml, 2010).

Testování probíhá s geneticky modifikovanými buňkami (savčími nádorovými či kvasinkovými), které jsou transfekované vektorem obsahujícím DNA sekvenci pro receptor, reportérový gen a specifické úseky DNA, které vyvolávají expresi reportérového genu po připojení receptorového komplexu. K expresi reportérového genu (např. gen pro enzym luciferázu či β -galaktosidázu) až na reportérový protein dochází po aktivaci receptoru. Hormonální aktivita je zjišťována buď podle množství vzniklého proteinu či stanovením enzymové aktivity (Lovecká a kol., 2013).

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

2.4.1 CALUX (Chemically Activated LUCiferase gene eXpression)

CALUXy jsou biotesty založené na expresi luciferázového genu. Používají se k detekci specifických chemických látek ve vzorcích. CALUX se skládá z geneticky modifikované buněčné linie, která obsahuje genový konstrukt s luciferázovým reportérovým genem ve spojení s TATA boxem a hormon responzivními elementy, které mohou, v přítomnosti jaderného receptoru, indukovat transkripci vloženého genu kódujícího enzym (luciferázu), která je schopná přeměňovat (oxidovat) substrát (luciferin). Během tohoto procesu se uvolňuje energie ve formě světla. Specifické responzivní elementy jsou schopné vazby na specifické receptory, proto se tyto elementy liší v různých typech CALUXů. CALUX testy podávají informaci o celkovém účinku ligandů (ze vzorku) na určitý receptor (Murk a kol., 1996).

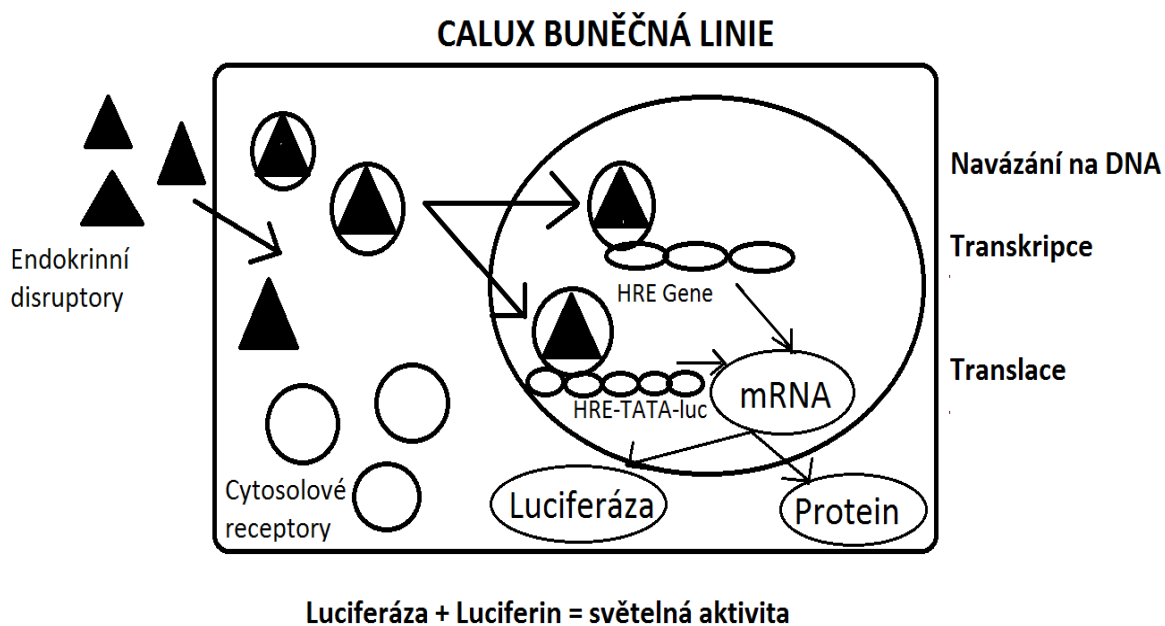
CALUXy jsou vysoce citlivé *in vitro* biotesty, které detekují různé ekologicky škodlivé chemické látky např. dioxiny (DR-CALUX) nebo polycyklické aromatické

uhlovodíky (PAH-CALUX) (BioDetection Systems, b.v.). Pomocí těchto testů je také stanovována hormonální aktivita ve vzorcích odpadních či povrchových vod (Brand a kol., 2013).

CALUXy pro detekci hormonální aktivity lze rozdělit podle hormonálních receptorů, které obsahují: androgenní (AR-CALUX), estrogenní (ER-CALUX), glukokortikoidní (GR-CALUX), progesteronový (PR-CALUX) nebo mineralokortikoidní (MR-CALUX) receptor a jsou vnímavé k látkám, které se na tyto receptory vážou (Schriks a kol., 2009). Dalšími typy CALUX testů jsou např. RAR-CALUX, PPAR-CALUX, TR-CALUX atd. (BioDetection Systems, b.v.).

Princip všech těchto biotestů je poměrně jednotný (Obr. 1). Provádí se na lidské geneticky modifikované buněčné linii U2-OS nádoru kostní dřeně. Tato linie neobsahuje významné množství receptorů, je pro ni typický rychlý růst, relativně snadná manipulace a je vysoce citlivá i k nízkým koncentracím detekovaných látek (Sonneveld a kol., 2011). V případě CALUXů pro detekci hormonální aktivity jsou do buněk vneseny vektory obsahující sekvence komplementární DNA (cDNA) pro lidské hormonální receptory a sekvence tzv. hormon responsivních elementů (HREs), které jsou spojené s reportérovým genem luc (kóduje luciferázu) a TATA boxem (Sonneveld a kol., 2005). Hormony nebo hormonům podobné látky vstoupí do cílových buněk a navážou se na receptory v cytosolu, po dimerizaci migruje komplex ligandů s receptory do jádra. V jádru se naváže komplex hormon-receptor na část DNA. Za normálních fyziologických podmínek se v lidském těle zahájí transkripce genů (tj. syntéza mRNA) a translace (produkce proteinů). V transgenních CALUX biotestech se komplex naváže na HRE-luc gen, dojde k syntéze proteinu (enzym luciferáza), který po přidání substrátu luciferinu produkuje měřitelnou luminiscenční aktivitu. Intenzita luminiscence je měřítkem pro sílu hormonální aktivity zkoumaného vzorku (Schriks a kol., 2009).

V případě testování agonistické aktivity je měřena aktivita látek (agonistů), které se navážou na receptor a mohou ho aktivovat, u antagonistické aktivity je měřena aktivita látek (antagonistů), které se sice na receptor navážou, ale pouze ho blokují (Kinnberg, 2003).



Obr. 1: Schématické znázornění CALLUX biotestu (upraveno podle Schriks a kol., 2009)

Vyhodnocování CALUX testu

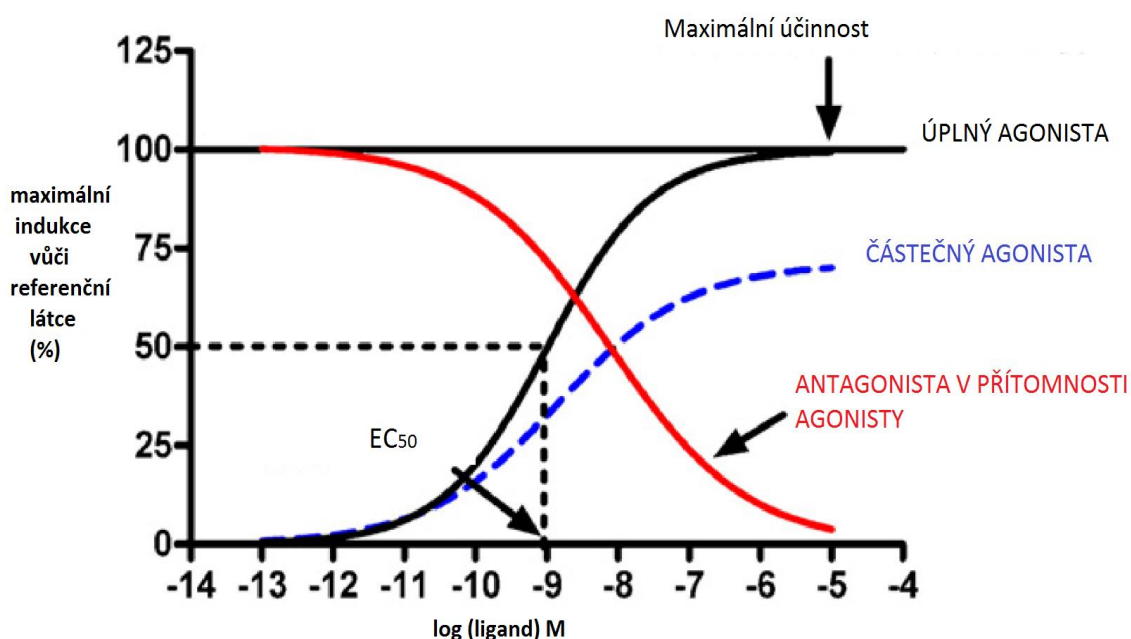
Při každém měření testovaného vzorku je měřena i kalibrační řada referenční látky, pro kterou je vždy vynesena tzv. křivka dávka-odpověď (dose-response curve), která má sigmoidní (esoitý) tvar (Obr. 2). Jako referenční látky pro agonismus progesteronového receptoru se používají: ORG2058, levonorgestrel, progesteron, promegeston a medroxyprogesteron acetát. Pro antagonismus je to RU-486. Křivka pro kalibrační řadu referenční látky musí splňovat následující kritéria, která jsou určena poskytovatelem licence, aby mohla být naměřená data dále vyhodnocována:

- Z faktor: míra statistické velikosti účinku včetně směrodatných odchylek
- indukční faktor: poměr rozsahu relativní indukce luciferázy
- koeficient determinace: míra celkové variability vysvětlená regresním modelem
- EC₅₀: efektivní koncentrace látky, která vyvolá 50% účinek v porovnání s maximálním účinkem (BioDetection Systems, b.v.).

Informaci o tom, zda tato kritéria křivka splňuje, podává protokol vytvořený poskytovatelem licence v programu Excel (Microsoft). Pokud tato kritéria nejsou splněna, tak se daný experiment označí za nevalidní a dále se s daty z tohoto experimentu nepracuje.

Zjištěná hormonální aktivita zahrnuje všechny látky, které jsou v daném testovaném vzorku přítomny a mají daný typ hormonální aktivity, a tudíž stejný mechanismus účinku.

Intenzita luminiscence testovaných vzorků je vyjádřena v relativních světelných jednotkách (RLU). Pro výpočet (anti-)progestagenní aktivity je od RLU testovaných látek odečtena hodnota RLU zjištěná u pozitivní kontroly s 0,1% DMSO. Tyto jednotky jsou přepočítány na ng/l ORG2058 eq (v případě testování agonistické aktivity) nebo RU-486 eq (v případě testování antagonistické aktivity) a udávají ekvivalentní koncentraci referenční látky.



Obr. 2: Schématické znázornění sigmoidních křivek pro agonismus a antagonismus (upraveno podle Africander a kol., 2011)

2.4.1.1. PR-CALUX

PR-CALUX je stabilně transfekovaná linie lidských rakovinných buněk kostní dřeně. Do této linie byl vnesen lidský progesteronový receptor, reportérový gen pro luciferázu a progesteron responzivní elementy (z angl. progesterone response elements; PREs) (Sonneveld a kol., 2011).

PR-CALUX *in vitro* biotest je založený na expresi reportérového genu. Detekuje sloučeniny, které mají podobný mechanismus účinku jako progesteron a působí primárně skrze progesteronový receptor (Sonneveld a kol., 2011).

Výhodou PR-CALUX biotestu je vysoká citlivost i k velmi nízkým koncentracím různých progestinů (Sonneveld a kol., 2011). Dosud byl tento test využit především

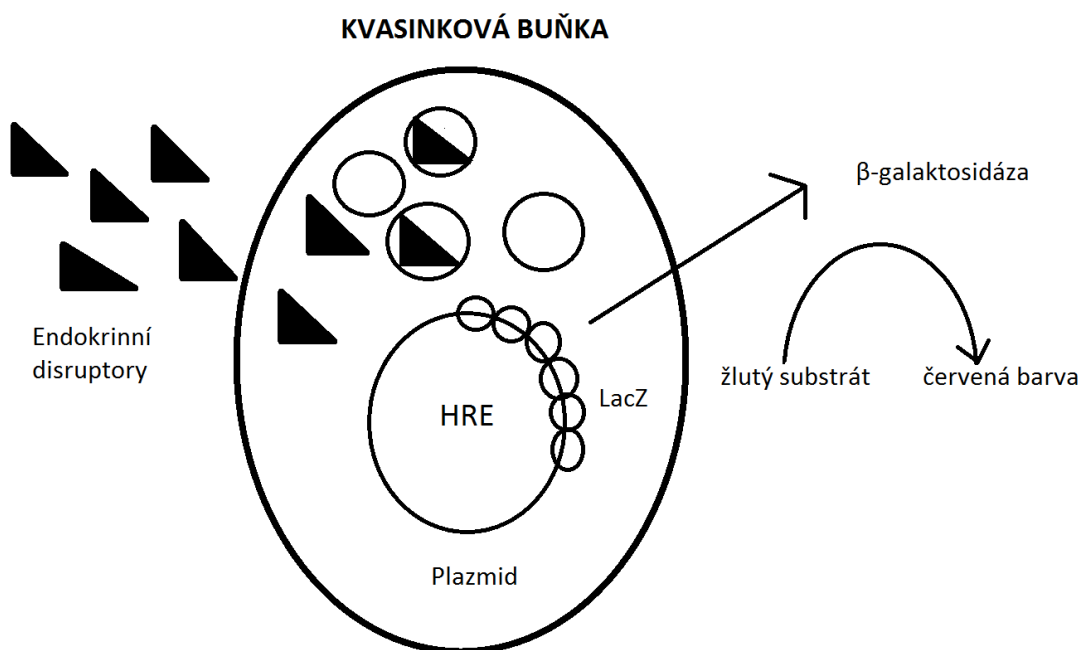
k detekci anti-progestagenní aktivity bromovaných samozhášecích přísad, syntetických analogů pižma a UV filtrů (Schreurs a kol., 2005; Hamers a kol., 2006), progestagenní a anti-progestagenní aktivity odpadních a povrchových vod (van der Linden a kol., 2008) a progestagenní aktivity anabolických androgenních steroidů používaných jako doping při sportu (Houtman a kol., 2009).

2.4.2 Yeast progesteron screen (YPS)

YPS je jedním z *in vitro* testů, které jsou používány ke sledování (anti-) progestagenní aktivity. V tomto testu jsou využívány geneticky modifikované kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Do těchto kvasinek jsou vneseny vektory obsahující sekvence DNA pro lidský progesteronový receptor a sekvence tzv. PREs, které jsou spojené s reportérovým genem LacZ (kóduje β -galaktosidázu) (Chatterjee a kol., 2008).

Do média se přidává chromogenní substrát ONPG (2-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid) nebo CPRG (chlorofenol- β -D-galaktopyranosid). Tento substrát je štěpen enzymem β -galaktosidázou na odpovídající produkty žluté či červené barvy, jejichž absorbance je měřena (Obr. 3). β -galaktosidázová aktivita je poté vyhodnocována v tzv. Millerových jednotkách (Gaido a kol., 1997).

Za nevýhodu kvasinkových *in vitro* testů lze v porovnání se savčími buněčnými *in vitro* testy pokládat menší citlivost. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena špatným transportem hormonálně aktivních látek skrz buněčnou membránu kvasinek (Murk a kol., 2002). Testy s kvasinkami jsou méně finančně náročné a k jejich používání není nutné zakoupení licence, jako je tomu u CALUX testů se savčími buňkami (Leusch a kol., 2010). Kvasinkové testy se také liší tím, že tyto buňky vylučují reportérový protein přímo do kultivačního média, a proto u těchto testů není potřeba lýza buněk, jako u savčích (Blankvoort et al., 2001; Legler et al., 2002). Limit kvantifikace je u testů s kvasinkami vyšší, proto nemusí být úplně vhodné pro analýzu environmentálních vzorků s nízkými koncentracemi hormonálně aktivních látek (Leusch a kol., 2010).



Obr. 3: Schématické znázornění kvasinkového testu (upraveno podle Murk a kol., 2002).

2.5 Sledování progestagenní aktivity ve vodách

Předpokládá se, že k progestagenní aktivitě ve vodách přispívá primárně progesteron a syntetické progestiny (viz. kapitola 2.6.2.). Přírodními progestagenně aktivními látkami ve vodním prostředí jsou progesteron a jeho metabolity (Shore a Shemesh, 2003; Creusot 2014). Progestagenní aktivitu mají také některé flavonoidy nacházející se v ovoci a zelenině, např. apigenin či kaempferol (Scippo a kol., 2004; Willemsen a kol., 2004). Je možné, že by tyto progestagenní flavonoidy mohly být přítomny v komunálních odpadních vodách či v odpadních vodách z potravinářského průmyslu.

Dosud nebylo provedeno mnoho studií, kde by se zkoumalo, jaké látky přispívají k progestagenní aktivitě. Ve Francii byly potvrzeny čtyři progestagenně aktivní látky přispívající k progestagenní aktivitě povrchových vod. Jednalo se o přírodní progestin progesteron, syntetický progestin levonorgestrel, antagonistu mineralokortikoidního receptoru spironolakton a jeho metabolit karnenon. Tyto látky v jednotlivých měsících dohromady přispívaly k progestagenní aktivitě od 0,2 do 57,1 %, přičemž největším přispěvatelem byl levonorgestrel (Creusot a kol., 2014).

Většina dosud publikovaných studií se zaměřovala pouze na detekci progestagenní aktivity bez toho, aby se zkoumalo, jaké látky k této aktivitě přispívají. V Austrálii, kde

byla měřena progestagenní aktivita na přítoku a odtoku tří ČOV, se koncentrace všech progestagenně aktivních sloučenin pohybovaly na přítoku v rozsahu hodnot pod limitem kvantifikace až do 20 ng/l progesteronových ekvivalentů (P4 eq). Na odtoku z ČOV pak v rozsahu pod limitem kvantifikace až do 17 ng/l P4 eq. Míra odstranění progestagenních sloučenin byla značně rozdílná a pohybovala se od 11,8 do 100 % (Bain a kol., 2014). Progestagenní aktivita byla zaznamenána i na dalších australských ČOV. Na přítoku dosahovala více než 5,4 ng/l levonorgestrelových ekvivalentů (LEVO eq), na odtoku většiny ČOV nebyla nalezena aktivita žádná. Na jedné čistírně bylo ultrafiltrací a chlorováním odstraněno 54 % progestagenní aktivity. Je pravděpodobné, že hlavním mechanismem odstranění bylo, vzhledem k velikosti sloučenin, které vykazují progestagenní aktivitu, chlorování (Leusch a kol., 2014). Progestagenní aktivita byla na přítoku další australské ČOV ve všedních dnech $8,35 \pm 2,67$ ng/l ekvivalentů ORG2058 (ORG2058 eq) a o víkendech $10,3 \pm 2,1$ ng/l ORG2058 eq. Na odtoku tato ČOV vykazovala přibližně čtyřnásobně vyšší aktivitu, a to $33,8 \pm 4,5$ ng/l ORG2058 eq ve všedních dnech, o víkendech $45 \pm 11,1$ ng/l ORG2058 eq. Povrchová voda, do které ústil odtok z této ČOV byla i po čtyřech kilometrech progestagenně aktivní (Roberts a kol., 2015). Na přítomnost progestagenně aktivních látek byly v Austrálii testovány také vzorky dalších typů vod: např. srážkové nebo pitné vody (Escher a kol., 2014). Byla zde stanovena hodnota EC₁₀ a vzorky, které tuto prahovou hodnotu nepřekročily, byly vyhodnoceny jako vzorky s negativním nálezem progestagenní aktivity. V žádném z testovaných vzorků však tento 10% prahový účinek překročen nebyl.

V Nizozemsku byla naměřena progestagenní aktivita 0,78-0,86 ng/l ORG2058 eq na odtocích z městských ČOV a $2,2 \pm 0,4$ ng/l ORG2058 eq na odtocích z průmyslových ČOV (van der Linden a kol., 2008). Měřená progestagenní aktivita povrchové vody v Nizozemsku byla pod limitem detekce, či dosahovala velmi nízkých koncentrací: 0,02-0,09 ng/l ORG2058 eq (Schriks a kol., 2009).

Na indických čistírnách odpadních vod se naměřená progestagenní aktivita pohybovala na přítoku od 5,97 do 11,93 ng/l P4 eq a na odtoku od 4,08 do 7,23 ng/l P4 eq (Viswanath a kol., 2008). Progestagenní aktivita byla v Indii detekována také ve vzorcích odpadních vod z kožedělného průmyslu (Chatterjee a kol., 2008).

Také chov hospodářských zvířat významně přispívá k množství progestagenně aktivních látek ve vodním prostředí. Celková emise přírodních steroidních látek, zahrnující androgeny, estrogeny, kortizol a progesteron, vyprodukovaná dohromady zvířaty i lidmi byla v Číně 2486 t/rok. Exkrece těchto látek zvířaty byla 2x větší než u

lidí. 80 % z tohoto množství se dostalo do vodního prostředí, kde byly nejvíce zastoupeny steroidní hormony estriol (přírodní estrogen), androsteron (přírodní androgen) a progesteron (přírodní progestin). Velké množství steroidů se dostane do půdy výkaly aplikovanými jako hnojiva, část se akumuluje a část je zejména atmosférickými splachy dále šířena do vodního prostředí (Zhang a kol. 2014) (Tab. 1).

Tab. 1: Progestagenní aktivita ve vodách

Stát	Místo odběru	Typ testu	Progestagenní aktivita	Zdroj
Austrálie	Přítok ČOV	PR-CALUX	LOQ-20 ng/l P4 eq	(Bain a kol., 2014)
	Odtok ČOV	PR-CALUX	LOQ-17 ng/l P4 eq	(Bain a kol., 2014)
	Přítok ČOV	PR-CALUX	> 5,4 ng/l LEVO eq	(Leusch a kol., 2014)
	Přítok ČOV	PR-CALUX	8,35±2,67 ng/l ORG2058 eq	(Roberts a kol., 2015)
	Přítok ČOV	PR-CALUX	10,3±2,1 ng/l ORG2058 eq	(Roberts a kol., 2015)
	Odtok ČOV	PR-CALUX	33,8±4,5 ng/l ORG2058 eq	(Roberts a kol., 2015)
	Odtok ČOV	PR-CALUX	45±11,1 ng/l ORG2058 eq	(Roberts a kol., 2015)
Indie	Přítok ČOV	HEK 293	5,97-11,93 ng/l P4 eq	(Viswanath a kol., 2008)
	Odtok ČOV	HEK 293	4,08-7,23 ng/l P4 eq	(Viswanath a kol., 2008)
Nizozemsko	Povrchová voda	PR-CALUX	0,02-0,09 ng/l ORG2058 eq	(Schriks a kol., 2009)
	Odtok ČOV	PR-CALUX	0,78-0,86 ng/l ORG2058 eq	(van der Linden a kol., 2008)
	Průmyslové ČOV	PR-CALUX	2,2±0,4 ng/l ORG2058 eq	(van der Linden a kol., 2008)

Vysvětlivky: LOQ = limit kvantifikace

2.6 Látky s progestagenní aktivitou

2.6.1 Progesteron

Progesteron je steroidní hormon (odvozený od cholesterolu), který je syntetizován z cirkulujícího cholesterolu ve vaječnicích, varlatech a nadledvinách. Velká množství jsou také syntetizována a uvolňována během těhotenství placentou (Katzung, 1994). Ve vaječnicích je progesteron produkován žlutým tělískem (*corpus luteum*) v luteální fázi menstruačního cyklu pod vlivem luteinizačního hormonu (Martínková a kol., 2007). Progesteron funguje také jako prekurzor androgenů, estrogenů a steroidů kůry nadledvin. Společně s estrogeny a androgeny je významným reprodukčním hormonem (Katzung, 1994). Receptory pro progesteron se nacházejí na buněčných membránách (Kittnar a kol., 2011) a v buněčném cytosolu (Trojan a kol., 2003).

Hlavní biologickou funkcí progesteronu je příprava a udržení těhotenství, snížení kontrakcí gravidní dělohy, zvýšení viskozity hlenu děložního hrdla, stimulace mléčné žlázy a vyvolání její sekrece, stimulace gonadotropinů či zvýšení bazální teploty (Trojan a kol., 2003).

Progesteron je odbouráván v játrech a jeho metabolity jsou vylučovány primárně močí (Trojan a kol., 2003). Progesteron je vylučován i v nezměněné formě, a to jak lidmi, tak zvířaty, přičemž vyloučené množství závisí na pohlaví a věku (Tab. 2). Největší množství progesteronu za den vylučují prasata (prasnice) a skot (Zhang a kol. 2014).

Tab. 2: Denní exkrece progesteronu u různých skupin živočichů (Zhang a kol., 2014)

Živočich produkující progesteron			Množství vyloučeného progesteronu (µg/den)
Člověk	Ženy	Prepubertální věk	14,5
		Období menstruace	127
		Období menopauzy	37,5
		Období těhotenství	260
	Muži	Prepubertální věk	2,16
		Dospělost	16,1
Prasata		Prasnice	10 684
		Ostatní	1 956
Skot		Skot chovaný pro maso	379
		Skot chovaný pro mléko	379
Ovce		Nespecifikováno	0,303

2.6.2 Syntetické progestiny

V dnešní době je užíváno okolo 20 syntetických progestinů (nazývaných také gestageny, progestogeny nebo progestageny). Syntetické progestiny jsou látky navrženy tak, aby se vážaly na progesteronový receptor a napodobovaly tak přírodní hormon progesteron (Africander a kol., 2011).

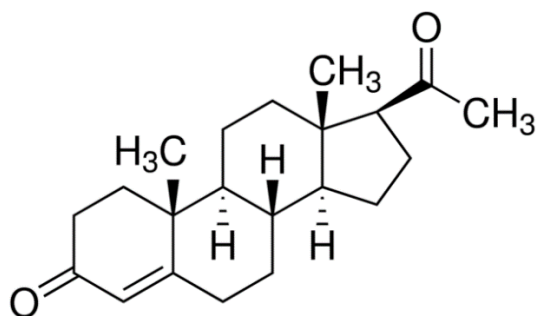
Syntetické progestiny mají široké spektrum užití, představují nedílnou a důležitou součást řady léčiv. Používají se především v hormonální antikoncepci, jejíž jsou součástí od roku 1960, kdy byla v USA uvedena na trh první antikoncepční pilulka pod názvem Enovid. Tato antikoncepce obsahovala progestin norethynodrel a estrogen mestranol (Junod a Marks, 2002). Od té doby se objevila na světovém trhu řada progestinů, které jsou společně s estrogenem (nejčastěji 17α ethinyl-estradiolem) mnohdy užívány jako aktivní složky orální hormonální antikoncepce. Obsah progestinů je obvykle vyšší (až stonásobně) než u estrogenu (Roztočil, 2011). Pro klinické použití je k dispozici velké množství perorálních kontraceptiv, které obsahují buď estrogenu, progestiny nebo oba typy těchto hormonů (Kaztung, 1994).

Progestiny se používají také k léčbě rakoviny děložní sliznice a děložního krvácení (Weiss a kol., 2010), k léčbě řady reprodukčních poruch, jako je endometrióza či děložní adenomyóza (Spitz a Chwalisz, 2000) nebo k léčbě hirsutismu (nadměrného ochlupení) (Becker a kol., 2001) či rakoviny prostaty (Green a kol., 2002). Progestiny tlumí ovulaci a menstruační cyklus a také mění vlastnosti cervikálního hlenu. Podporují vývoj sekrečních žláz v prsu a zrání endometria (Martínková a kol., 2007). Některé syntetické progestiny (megestrol acetát a medroxyprogesteron acetát) jsou využívány například při léčbě syndromu nádorové anorexie a kachexie, který způsobuje velké hmotnostní ztráty onkologicky nemocných pacientů. Progestiny u těchto pacientů podporují chuť k jídlu a nárůst tělesné hmotnosti (Maltoni a kol., 2011).

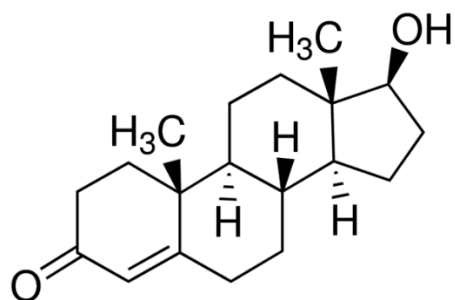
Syntetické progestiny mají také řadu nežádoucích účinků, které jsou způsobeny schopností vazby i na jiné receptory než jen progesteronový (Besse a Garric, 2009). Tyto látky se mohou vázat například i na androgenní, glukokortikoidní či mineralokortikoidní receptor (Kumar a kol., 2015).

Syntetické progestiny se dělí na progestiny odvozené od progesteronu (Obr. 4) nebo testosteronu (Obr. 5) a derivát spironolaktonu (Obr. 6). Progesteronové deriváty zahrnují deriváty $17\text{-}\alpha$ -hydroxyprogesteronu a deriváty 19-norprogesteronu. Testosteronové

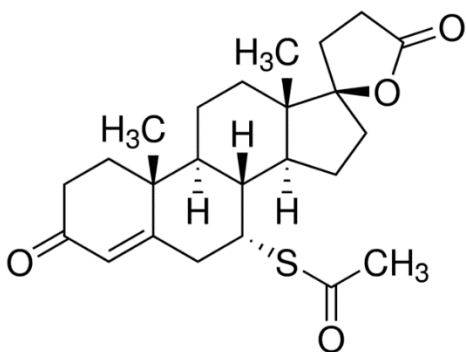
deriváty jsou deriváty 19-nortestosteronu (nandrolonu) a dělí se na estrany a gonany (Kumar a kol., 2015) (Tab. 3).



Obr. 4: Strukturní vzorec progesteronu



Obr. 5: Strukturní vzorec testosteronu



Obr. 6: Strukturní vzorec spironolaktonu

Tab. 3 : Rozdělení progestinů

Strukturální odvození		Progestin	Molekulový vzorec	CAS	
Progesteron	17 α -Hydroxyprogesteron	Progesteron	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	57-83-0	
		Medroxyprogesteron acetát	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	71-58-9	
		Megestrol acetát	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	595-33-5	
		Medroxyprogesteron	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	520-85-4	
		Melengestrol acetát	C ₂₅ H ₃₂ O ₄	2919-66-6	
		Retroprogesteron	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	2755-10-4	
		Chlormadinon	C ₂₁ H ₂₇ ClO ₃	1961-77-9	
		Chlormadinon acetát	C ₂₃ H ₂₉ ClO ₄	302-22-7	
	19-Norprogesteron	Cyproteron	C ₂₂ H ₂₇ ClO ₃	2098-66-0	
		Cyproteron acetát	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄	427-51-0	
		Proligeston	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	23873-85-0	
		Dydrogesteron	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	152-62-5	
		Nomegestrol acetát	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	58652-20-3	
		Nestoron	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	7759-35-5	
		Trimegeston	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	74513-62-5	
Testosteron	19-Nortestosteron	Estrany	Ethisteron	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	434-03-7
			Norethisteron	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	68-22-4
			Norethisteron acetát	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	51-98-9
		Gonany	Ethinodiol diacetát	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	297-76-7
			Dienogest	C ₂₀ H ₂₅ NO ₂	65928-58-7
			Lynestrenol	C ₂₀ H ₂₈ O	52-76-6
	Altrenogest		C ₂₁ H ₂₆ O ₂	850-52-2	
	Levonorgestrel		C ₂₁ H ₂₈ O ₂	797-63-7	
	Etonogestrel		C ₂₂ H ₂₈ O ₂	54048-10-1	
	Norelgestromin		C ₂₁ H ₂₉ NO ₂	53016-31-2	
	Spirolakton	Drospirenon	Desogestrel	C ₂₂ H ₃₀ O	54024-22-5
			Norgestimát	C ₂₂ H ₃₀ O	35189-28-7
			Gestoden	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	60282-87-3
Drospirenon			C ₂₄ H ₃₀ O ₃	67392-87-4	

Vysvětlivky: CAS je mezinárodní číselný kód užívaný pro chemické látky

Vazba progestinů na progesteronový receptor

Afinitu progestinů k progesteronovému receptoru charakterizuje tzv. relativní vazebná afinita (RBA z angl.: relative binding affinity) vztahená k referenční látce. Síla progestagenní aktivity jednotlivých syntetických progestinů je podle různých studií rozdílná. Nejsilnější progestagenní aktivitu ze syntetických progestinů má gestoden, (Philibert a kol., 1999), alternogest (McRobb a kol., 2008) a norgestimát (Sonneveld a kol., 2011). Naopak nejslabší afinitu k progesteronovému receptoru mají, z těch progestinů, které jsou momentálně na trhu, dienogest (McRobb a kol., 2008) a drospirenon (Kumar a kol., 2015; Africander a kol., 2011), (Tab. 4).

Pro výpočet RBA je potřeba znát EC_x (efektivní koncentrace látky, která vyvolá x % maximálního účinku) referenční a testované látky (Heikinheimo a kol., 2003).

$$RBA = (EC_x \text{ referenční látky} / EC_x \text{ testované látky}) * 100 [\%]$$

Tab. 4: Relativní vazebná afinita vybraných syntetických progestinů k lidskému progesteronovému receptoru

Progestin	RBA (%)	Zdroj
Progesteron	100	(Krattenmacher, 2000)
Alternogest	1300*	(McRobb a kol., 2008)
Dienogest	1,2*	(McRobb a kol., 2008)
Drospirenon	19	(Krattenmacher, 2000)
Dydrogesteron	53*	(McRobb a kol., 2008)
Gestoden	864	(Philibert a kol., 1999)
Levonorgestrel	323	(Philibert a kol., 1999)
Medroxyprogesteron acetát	298	(Philibert a kol., 1999)
Megestrol acetát	81*	(McRobb a kol., 2008)
Norelgestromin	18	(Kuhnz a kol., 1995)
Norethisteron	134	(Philibert a kol., 1999)
Norgestimát	1720	(Sonneveld a kol., 2011)
Trimegeston	588	(Philibert a kol., 1999)

Pozn.: Uvedené hodnoty RBA byly získány na savčích buňkách, s výjimkou hodnot označených *, které byly získány na kvasinkách

2.7 Koncentrace progestinů ve vodách

Koncentrace v odpadních vodách jsou v současné době známe pouze pro několik syntetických progestinů (drospirenon, levonorgestrel, medroxyprogesteron, medroxyprogesteron acetát, megestrol acetát, norethisteron) a pro přírodní hormon progesteron.

Na přítoku ČOV byly naměřeny koncentrace progestinů v rozsahu od desetin po stovky ng/l. Nejvyšší koncentrace byly detekovány v Kanadě u norethisteronu (205 a 70 ng/l) a levonorgestrelu (150 a 170 ng/l). Takto vysoké koncentrace mohou mít spojitost s množstvím předepisovaných léčiv obsahujících tyto látky. Na odtoku ČOV dosahovaly naměřené koncentrace progestinů převážně desetin až desítek ng/l. Výjimkou byl norethisteron v Malajsii, u kterého byla zaznamenána koncentrace dosahující až 188 ng/l. V povrchových vodách se progestiny vyskytují zpravidla v koncentracích dosahujících desetin až desítek ng/l. Výjimku tvoří progesteron, jehož nejvyšší naměřená koncentrace dosáhla 100 ng/l, a to v USA (Tab. 5).

Tab. 5: Koncentrace progesteronu a syntetických progestinů v odpadních a povrchových vodách

Progestiny	Přítok na ČOV (ng/l)	Odtok z ČOV (ng/l)	Povrchové vody (ng/l)	Stát	Zdroj
Drospirenon	-	-	0,26-4,3	Maďarsko	(Avar a kol., 2016)
Levonorgestrel	-	-	38	Malajsie	(Todo a kol., 2000)
	28,6; 59	6,7; 9,2	3,7; 22,2	Čína	(Liu a kol., 2011)
	74,3	8,1	7,5		(Hanna a kol., 2010)
	5,6	1,1	-		(Lutz a kol., 1999)
	150; 170	30	-	Kanada	(Kastner a kol., 1990)
	-	--	3,6	Francie	(Bayaa a kol., 2000)
	-	0,9-17,9			(Liu a kol., 2005)
	-	-	5,3;7		(Tian a kol., 2000)
	-	1	-	Švédsko	(Africander a kol., 2011)
	<0,2-16,1	<0,2-4		Španělsko	(Ikeuchi a kol., 2002)
	-	-	0,85-3,4	Maďarsko	(Avar a kol., 2016)
Medroxyprogesteron	5	-	-	Kanada	(Tian a kol., 2000)
	-	14,9	-		(Ellestad a kol., 2014)

Tab. 5: Koncentrace progesteronu a syntetických progestinů v odpadních a povrchových vodách-
pokračování

Progestiny	Přítok na ČOV (ng/l)	Odtok z ČOV (ng/l)	Povrchové vody (ng/l)	Stát	Zdroj
Medroxyprogesteron acetát	0,21-2,42	0,03; 0,42	-	Japonsko	(Runnalls a kol., 2010)
	-	<0,4-15	-	Francie	(Kolodziej a kol., 2003)
Megestrol acetát	1,9±1,6 - 9,3±3,3	0,1±0,1 – 0,7±0,7	-	Čína	(Chang a kol., 2011)
Norethisteron	-	188	-	Malajsie	(Todo a kol., 2000)
	205;70	53	-	Kanada	(Kastner a kol., 1990)
	-	-	2	Francie	(Bayaa a kol., 2000)
	-	5,2-41	-		(Liu a kol., 2005)
	-	-	2,7; 2,8		(Tian a kol., 2000)
	-	-	48	USA	(Chen a kol., 2010)
	6,5±3,3	-	-	Čína	(Chen a kol., 2011)
	<0,2-8,9	<0,2-17,4	-	Španělsko	(Ikeuchi a kol., 2002)
Progesteron	10; 3,1	0,37; 0,31	0,06-0,09	Japonsko	(Runnalls a kol., 2010)
	<0,2-1,9	<0,2-1,5	-	Španělsko	(Ikeuchi a kol., 2002)
	5,4; 6,1	-	0,5; 2,5	Čína	(Liu a kol., 2011)
	66±36	2,3	-		(Chen a kol., 2011)
	35±14- 108±89	0,8±0,1- 2,3±0,5	-		(Chang a kol., 2011)
	-	-	9,4	USA	(Birkett a lester, 2002)
	-	-	110		(Chen a kol., 2010)
	-	-	3	Kanada	(Kastner a kol.,1990)
	-	-	1,6	Francie	(Bayaa a kol., 2000)
	-	8-16,9	-		(Liu a kol., 2005)
	-	-	1,7; 3,5		(Tian a kol., 2000)
	-	-	0,23-13,67		Maďarsko

2.8 Sledování antiprogestagenní aktivity ve vodách

V současné době není k dispozici mnoho studií, které by identifikovaly látky, které jsou ve vodách zodpovědné za antiprogestagenní aktivitu. Předpokládá se, že k antiprogestagenní aktivitě ve vodním prostředí mohou přispívat syntetické antiprogestiny. Pravděpodobně velký podíl na antiprogestagenní aktivitě mohou mít i UV filtry, musk sloučeniny a bromované retardanty hoření. Antiprogestagenně působí v menší míře ve vodním prostředí i androgeny. Androgeny, konkrétně androstany se podílely na antiprogestagenní aktivitě u testovaných vzorků odpadních vod z méně než 0,1 % (Bellet a kol., 2012).

Za pomoci CALUX biotestů byly v Austrálii testovány povrchové vody na výskyt endokrinních disruptorů. Antiprogestagenní aktivita byla detekována v 16 % vzorků (ve 45 z 285). Limit kvantifikace byl 8 ng/l mifepristonových ekvivalentů (MIF eq). 50 % vzorků s antiprogestagenní aktivitou pocházelo z průmyslových zón. V jedné řece z průmyslové oblasti bylo naměřeno 32 µg/l MIF eq (Scott a kol., 2014). Podobná koncentrace látek s antiprogestagenním účinkem byla zjištěna na odtoku z jedné čínské ČOV (29 µg/l MIF eq) (Liu a kol., 2011). Antiprogestagenní aktivita se pohybovala ve vzorcích z různých druhů čistírenských procesů na ČOV v Číně od 31,5 do 270 µg/l MIF eq. Tyto čistírenské procesy zahrnující sekundární čištění, koagulaci a pískové filtry dokázaly odstranit až 88,4 % všech antiprogestagenních kontaminantů (Rao a kol., 2014) (Tab. 6).

Tab. 6: Antiprogestagenní aktivita ve vodách

Stát	Místo odběru	Typ testu	Antiprogestagenní aktivita	Zdroj
Austrálie	Řeka v průmyslové oblasti	PR-CALUX	32 µg/l MIF eq	(Scott a kol., 2014)
Čína	Odtok ČOV	YPS	29 µg/l MIF eq	(Liu a kol., 2011)
	Čistírenské procesy ČOV	YPS	31,5 - 270 µg/l MIF eq	(Rao a kol., 2014)

2.9 Látky s antiprogestagenní aktivitou

2.9.1 Syntetické antiprogestiny

Antiprogestiny (nazývané také antigestageny či antiprogesterony) jsou receptorové blokátory progestinů, jedná se tedy o antagonisty progesteronového receptoru. Primárně působí jako tzv. abortiva (látky, které vyvolají potrat), využívají se v postkoitálních kontraceptivech. Tyto látky mají velký klinický potenciál, ovšem jeho plnému uplatnění brání eticko-ideologické problémy (Roztočil, 2011). Antiprogestiny jsou také používány k léčbě děložních myomů, při endometrióze, rakovině endometria a inhibují nebo zpožďují ovulaci (Tang, 2006). Tyto látky se využívají i při léčbě rakoviny prsu či fibróze močového měchýře (Attardi a kol., 2003; Knutson a Lange, 2014).

Prototypem antiprogestinů je Mifepriston (označován taktéž jako RU-486), který jako první z této třídy léčiv vykazoval vysokou afinitu k progesteronovému receptoru, která byla ve vztahu k progesteronu více jak dvojnásobná (Heikinheimo a kol., 2013). Schopnost vazby i na jiné receptory, hlavně na glukokortikoidový receptor způsobuje vedlejší nežádoucí účinky (Attardi a kol., 2014).

Mifepriston je schválen v USA, Izraeli, Číně a zemích Evropské unie. Zakázán je například v Japonsku, kam je ovšem i přes varování vlády nelegálně dovážen a užíván (Ishii a kol., 2015).

Existují i další syntetické progestiny, ovšem jejich aktivita je výrazně nižší než u Mifepristonu. Mezi tyto látky patří např.: Ulipristal acetát, Lonaprisan či Telapriston (Knutson a Lange, 2014). (Tab. 7)

Tab. 7: Zástupci syntetických antiprogestinů a jejich léčebné využití

Antiprogestiny	Molekulový vzorec	CAS	Léčebné využití	Zdroj
Asoprisnil (J867)	$C_{28}H_{35}NO_4$	199396-76-4	Fibróza močového měchýře	(Chwalisz a kol., 2007)
Lonaprisan (ZK230211, BAY86- 5044)	$C_{28}H_{29}F_5O_3$	211254-73-8	Rakovina prsu	(Jonat a kol., 2013)
Mifepriston (RU- 486, RU38486)	$C_{29}H_{35}NO_2$	84371-65-3		(Romieu a kol., 1987; Perrault a kol., 1996; Klijn a kol., 1989)
Onapriston (ZK98299)	$C_{29}H_{39}NO_3$	96346-61-1		(Robertson a kol., 1999; Helle a kol., 1998)
Org31710	$C_{30}H_{39}NO_2$	118968-41-5		(Klijn a kol., 2000)
Telapriston (Proellex, CDB- 4124)	$C_{31}H_{39}NO_5$	198414-31-2	Endometrióza, fibróza močového měchýře	(Ioffe a kol., 2009)
Ulipristal acetát (CDB-2914)	$C_{30}H_{37}NO_4$	126784-99-4	Fibróza močového měchýře	(Levens a kol., 2008)
WAY-255348	$C_{16}H_{14}FN_3O$	872141-23-6	Rakovina prsu	(Yudt a kol., 2011)

2.10 Koncentrace antiprogestinů ve vodách

Koncentrace antiprogestinů v odpadních vodách jsou momentálně v odborné literatuře dostupné pouze pro antiprogestin mifepriston v Číně. Na přítoku ČOV se tento antiprogestin vyskytoval ve všech třech vzorcích, které byly analyzovány, a dosahoval hodnot od desetin ng/l do dvou ng/l. Na odtoku z ČOV se vyskytoval v obou testovaných vzorcích a jeho hodnota nepřekročila jeden ng/l. Pro tuto látku jsou dostupné i hodnoty z OV pocházejících z čínských nemocnic. Mifepriston se vyskytoval téměř ve třetině (17) testovaných vzorků (63) a zároveň vykazoval nejvyšší hodnoty ze všech testovaných látek (antagonisté androgenního, progesteronového a estrogenního receptoru), a to až 195

ng/l. Tato skutečnost ukazuje na velkou spotřebu této látky v nemocnicích (Liu a kol., 2010). Vysoké koncentrace mifepristonu v OV z nemocnic mohou ukazovat na množství prováděných potratů s přihlédnutím k tomu, že se jedná o nejlidnatější stát světa, který v době provádění této studie prosazoval politiku plánování porodnosti (politiku jednoho dítěte) (Tab. 8).

Tab. 8: Koncentrace antiprogestinů v odpadních vodách

Antiprogestin	Přítok na ČOV (ng/l)	Odtok z ČOV (ng/l)	OV z nemocnice (ng/l)	Stát	Zdroj
Mifepriston	0,4-1,62	0,7; 0,75	0,64-195	Čína	(Liu a kol., 2010)

2.11 Další látky s antiprogestagenní aktivitou

K antiprogestagenní aktivitě pravděpodobně přispívají také UV filtry (organické sloučeniny schopné absorpce UV-A a UV-B záření používané v opalovacích krémech a dalších kosmetických přípravcích), musk sloučeniny (vonné látky používané v čistících a pracích prostředcích, kosmetice a parfémeh) (Schreurs a kol., 2005) a bromované retardanty hoření (sloučeniny používané ke snížení hořlavosti výrobků např. z plastu, elektroniky a oblečení) (Hamers a kol., 2006). Jako látky s nejsilnější antiprogestagenní aktivitou se jeví UV filtr 3-benzyliden camphor; musk sloučeniny Phantolid a Tonalid a bromované retardanty hoření označované jako BDE-19 a BDE-183. (Tab. 9)

Tab. 9: Antiprogestagenní aktivita jednotlivých vybraných sloučenin v PR-CALUX

	Sloučenina	Zkratka	IC ₅₀ PR [μmol/l]	Zdroj
UV filtry	3-benzyliden camphor	3-BC	0,4	(Schreurs a kol., 2005)
	Octyl-methoxycinamát	OMC	0,5	
	4-methylbenzyliden camphor	4-MBC	0,9	
	Homosalát	HMS	3	
	Benzofenon-3	BP-3	5,2	
Musk sloučeniny	Phantolid	AHMI	0,02	
	Tonalid	AHTN	0,02	
	Galaxolid	HHCB	0,2	
	Versalid	AETT	0,3	
	Celestolid	ADBI	4,7	
Bromované retardanty hoření	BDE-19		0,8 ± 0,4	(Hamers a kol., 2006)
	BDE-183		2,6	
	BDE-100		3,4 ± 2,4	
	BDE-181		3,6 ± 1,4	
	BDE-185		3,6 ± 0,2	
	BDE-155		3,8 ± 2,4	
	BDE-190		4,8	
	BDE-153		5,7 ± 1,8	
	BDE-49		6,1	
	BDE-28;38;39		>15	

Vysvětlivky: IC₅₀ je střední inhibiční koncentrace

2.11.1 Koncentrace UV filtrů, musk sloučenin a bromovaných retardantů hoření na ČOV

Koncentrace UV filtrů se pohybují na přítocích ČOV od desítek ng/l po setiny mg/l. Na odtocích ČOV se koncentrace běžně pohybují ve stovkách ng/l. Musk sloučeniny byly nalezeny na přítocích ČOV většinou v jednotkách μg/l a na odtocích ČOV ve stovkách ng/l. Bromované retardaty hoření se na přítoku ČOV objevují v koncentracích dosahujících jednotek μg/l (Tab. 10). Vzhledem k vysokým koncentracím těchto látek,

kteře jsou přítomny na ČOV, můžeme předpokládat jejich velký podíl na antiprogestagenní aktivitě odpadních vod.

Tab. 10: Koncentrace UV filtrů, musk sloučenin a bromovaných retardantů hoření na ČOV

	Sloučenina	Přítok na ČOV [ng/l]	Odtok z ČOV [ng/l]	Stát	Zdroj
UV filtry	Octyl-methoxycinamát	20 070	-	Švýcarsko	(Kupper a kol., 2006)
	4-methylbenzyliden camphor	960	-		(Kupper a kol., 2006)
		600-6500	200-2300		(Balmer a kol., 2005)
	Benzofenon-3	75-127	<LOQ	Španělsko	(Pedrouzo a kol., 2010)
		-	81-598	Norsko	(Langford a kol., 2015)
		32±5-551±10	5±15-21±3	Itálie	(Magi a kol., 2012)
		700-7800	10-700	Švýcarsko	(Balmer a kol., 2005)
	Octocrylene	129	<LOQ	Španělsko	(Pedrouzo a kol., 2010)
		1680	-	Švýcarsko	(Kupper a kol., 2006)
		-	181-538	Norsko	(Langford a kol., 2015)
		28±3-463±6	13±3	Itálie	(Magi a kol., 2012)
	Musk sloučeniny	Galaxolid	4420	-	Švýcarsko
3500			1800	Německo	(Klaschka a kol., 2013)
-			730		(Ternes a kol., 2003)
43-7032			28-98	USA	(Horii a kol., 2007)
390			173	Kanada	(Yang a Metcalfe, 2006)
Tonalid		1430	-	Švýcarsko	(Kupper a kol., 2006)
		-	100	Německo	(Ternes a kol., 2003)
		112-5396	13-225	USA	(Horii a kol., 2007)
Bromované retardanty hoření	Polybromované difenylethery	13-2496	0,9-4,4	Čína	(Peng a kol., 2009)

3 Materiál a metodika

3.1 Chemikálie

Byly použity následující chemikálie: illuminate mix (roztok obsahující D-luciferin, který se přidává k buňkám, aby emitovaly luminiscenci), lysis mix (roztok, kterým se rozvolňují buněčné membrány, aby mohla být luminiscence vyzařována ven z buněk, obsahuje účinnou látku Triton-X100), referenční látka pro agonistickou aktivitu - syntetický progestin ORG2058 (vše od BioDetection Systems b.v.), referenční látka pro antagonistickou aktivitu mifepriston (RU-486), dimethylsulfoxid (DMSO), roztok penicilinu-streptomycinu (Pen-Strep), Dulbeccův fosfáty pufrovaný fyziologický roztok bez Mg^{2+} a Ca^{2+} (D-PBSA), 99% kyselina octová, aktivní uhlí a dextran z *Leuconostoc ssp.* (vše od Sigma-Aldrich), Dulbeccem modifikované Eaglovo médium s fenolovou červení a obohacené o Hamovo F12 médium (DMEM – růstové médium), Dulbeccem modifikované Eaglovo médium bez fenolové červení obohacené o Hamovo F12 médium (DMEM – testovací médium), trypsin, EDTA 0,5% bez fenolové červení, neesenciální aminokyseliny (NEAA 100x) (vše od Life-Technologies), fetální bovinní sérum (FBS) (Biosera 2014).

3.2 Odběr a převoz vzorků a charakteristika sledovaných čistíren odpadních vod

Vzorky odpadní vody byly odebrány bodovým odběrem, nebo, pokud to bylo možné, pomocí kompozitního vzorkovače v průběhu 24 hodin z přítoku a odtoku šesti jihočeských čistíren odpadních vod (ČOV) provozovaných firmou ČEVAK a.s. (Tab. 11). Během převozu z ČOV do laboratoře byly vzorky uloženy na ledu a v temnu. Po přivezení byly uskladněny v lednici při 4°C a do 24 hodin byly analyzovány (PR-CALUX).

Tab. 11: Specifikace testovaných ČOV

Aglomerace ^a	Ekvivalentní obyvatelé ^b	Průmysl a zdravotnictví v aglomeraci	Způsob odběru odpadní vody (přítok/odtok) ^c ČOV	BSK ₅ ^d na přítoku/odtoku ČOV (mg/l)
Milevsko	14 500	Kovozpracující průmysl, výroba a montáž vzduchotechniky, menší zdravotnická zařízení	kompozitní vzorkovač	197 / 6,4
Vodňany	28 500	Drůbežářský závod, potravinářský průmysl, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, menší zdravotnická zařízení	bodový odběr	293,5 / 3,54
Protivín	33 000	Pivovar, menší zdravotnická zařízení, autoservisy	bodový odběr	728,7 / 6,84
Prachatice	49 200	Automobilový a elektrotechnický průmysl, hospic, nemocnice,	kompozitní vzorkovač / bodový odběr	451 / 15,6
Písek	62 833	Strojírenský a elektrotechnický průmysl, nemocnice	kompozitní vzorkovač	244 / 10
České Budějovice	375 000	Automobilový, potravinářský, zdravotnický, strojírenský průmysl, pivovar, nemocnice	kompozitní vzorkovač	306 / 3,8

Vysvětlivky:

- a- Aglomerace, ze které přitékají odpadní vody (OV) na danou ČOV
- b- Ekvivalentní obyvatel je jednotka představující průměrného obyvatele, který vyprodukuje za den 150 l OV a 60 g BSK₅ (Pitter, 2009).
- c- V případě uvedení pouze jednoho způsobu odběru byl tento odběr shodný na přítoku i odtoku
- d- BSK₅ je biochemická spotřeba kyslíku za 5 dní. Ukazatel celkového obsahu organických biologicky rozložitelných látek ve vodě.(Pitter, 2009).

3.3 Extrakce vzorků odpadní vody

Jako extrakční metoda byla použita extrakce na pevné fázi (SPE – z angl.- Solid Phase Extraction). Extrakce byla provedena pomocí automatického extraktoru SPE-DEX 4790 (Horizon Technology). Jako sorbent byly použity Atlantic C-18 SPE disky (Horizon Technology). Předfiltry a SPE disky byly propláchnuty demineralizovanou vodou a nakondicionovány methanolem. Vzorky (1 l) byly přefiltrovány nejprve přes filtr o velikosti pórů 5 μm a poté přes filtr o velikosti pórů 1 μm . Následně byly analyty ((anti-)progestageně aktivní látky) zachyceny na SPE disku. Zachycené látky byly eluovány (promyty) z SPE disku rozpouštědlem (methanol) do skleněných sběrníků na eluáty.

3.4 Evaporace eluátů

Eluované vzorky odpadní vody byly ze sběrné zkumavky přemístěny do zkumavek s kónickým dnem a odpařeny na odparce (Thermovap TV10+, ECOM) za použití mírného proudu dusíku. Následně byly rozpuštěny ve 30 μl DMSO, uskladněny v mrazicím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nasazeny do PR-CALUX testu nejpozději 1 týden po evaporaci.

3.5 Kultivace buněčných kultur

Buňky byly kultivovány v médiu v kultivační lahvi. Živé buňky se po určité době přichytily ke dnu kultivační lahve. Část těchto buněk byla 2x týdně přemístěna (pasážována neboli subkultivována) do nových lahví s čerstvým médiem, ve kterých měly více prostoru k růstu. Během tohoto procesu byly zároveň odstraňovány buňky odumřelé.

Při kultivaci buněk byly dodržovány zásady sterilní práce. Pasážování probíhalo v laminárním kabinetu (flowboxu) a bylo prováděno za pomoci serologických pipet a 15 ml kónických zkumavek (KRD). Buňky kultivované v 75cm² kultivačních lahvích (Jet Biofil) byly nejprve prohlédnuty pod inverzním mikroskopem (Olympus), čímž byla vyloučena potenciální kontaminace a bylo zjištěno procentuální pokrytí povrchu dna kultivační lahve (přichycení) těmito buňkami. Pokud buňky pokrývaly 90-100 % dna kultivační lahve, tak byly dále využity k pasážování. Pasážování probíhalo podle protokolu BioDetection Systems b.v. Buňky byly po pasážování inkubovány v CO₂ inkubátoru při 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ a 100 % vlhkosti (Sonneveld et al., 2005).

3.6 PR-CALUX *in vitro* biotest

K detekci (anti-)progestagenní aktivity byl použit *in vitro* biotest PR-CALUX. Test probíhal následovně: Buňky PR-CALUX byly nasazeny na 96-jamkovou mikrotitrační destičku v hustotě 10 000 buněk na jamku v médiu bez fenolové červeni a inkubovány po dobu 24 hodin. Následně byly buňky po dobu 24 hodin exponovány kalibrační řadě referenční látky (ORG2058 či RU-486) a řadě ředěných extraktů odpadní vody (viz. následující podkapitola). Poté bylo přistoupeno k detekci luminiscence buněk. Před detekcí luminiscence byly buňkám rozvolněny buněčné membrány pomocí lysis mixu, aby mohla být luminiscence emitována i vně buněk.

Luminiscence byla měřena pomocí spektrofotometru s luminiscenčním modulem (Infinite M200 Plus, Tecan). Nejprve byl do každé jamky injikován illuminate mix, vzápětí byla měřena luminiscence a následně byla injikována 25% kyselina octová, kterou byla luminiscence zhasena. Tento postup byl opakován u všech měřených jamek na destičce. Data z luminometru byla automaticky přenášena do počítače a následně vyhodnocována v programu Excel (Microsoft).

Celý PR-CALUX test se vzorky odpadní vody z 1 ČOV trval 3 dny.

3.7 Nasazení extraktů odpadní vody na 96-jamkovou mikrotitrační destičku

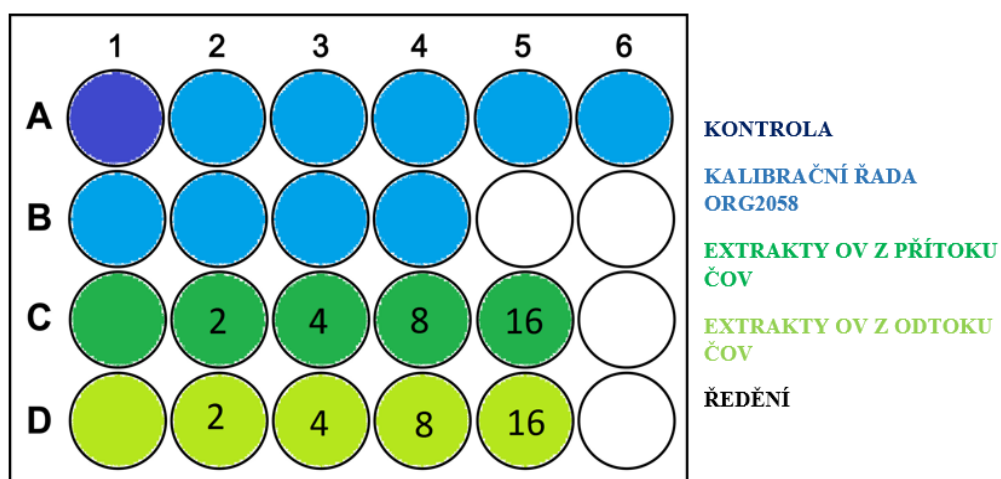
(začátek 24 hodinové expozice buněk testovaným extraktům odpadní vody)

3.7.1 Progestagenní aktivita

- 1) Byl připraven jeden neředěný (čistý) extrakt a ředěné extrakty odpadní vody z přítoku i odtoku ČOV v DMSO (ředění 2x, 4x, 8x a 16x).
- 2) Byla provedena homogenizace vzorků pomocí vortexu (IKA MS3 digital).
- 3) Na 24-jamkovou mikrotitrační destičku (Obr. 7) byl napipetován 1 ml testovacího média a do tohoto objemu byl napipetován 1 μ l následujících chemikálií/extraktů: DMSO (kontrolní skupina), kalibrační řada ORG2058 (Tab. 12) a testované extrakty odpadní vody.

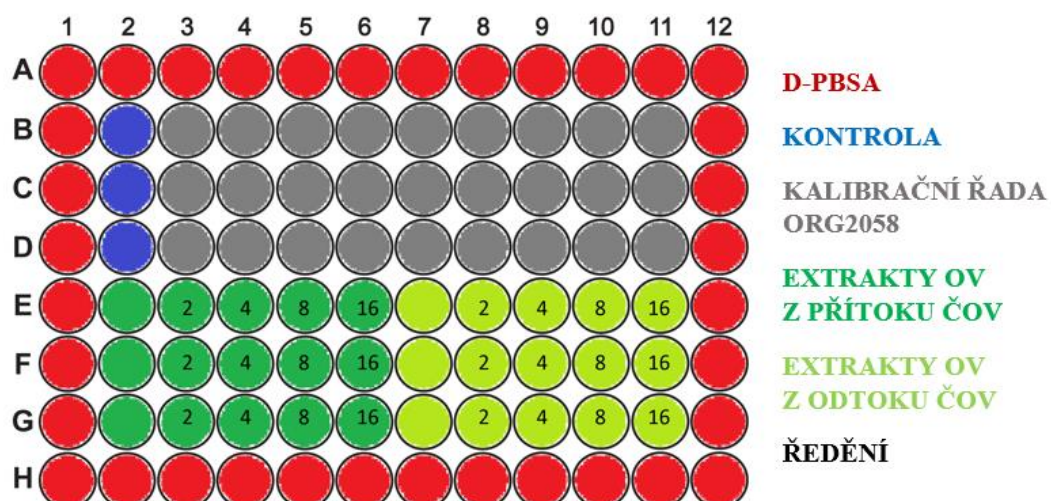
Tab 12: Koncentrace kalibrační řady ORG2058

	koncentrace v jamce c (M)	koncentrace v jamce p (ng/L)
1	$3 \cdot 10^{-12}$	1
2	$1 \cdot 10^{-11}$	3
3	$3 \cdot 10^{-11}$	10
4	$6 \cdot 10^{-11}$	21
5	$1 \cdot 10^{-10}$	34
6	$2 \cdot 10^{-10}$	69
7	$3 \cdot 10^{-10}$	103
8	$1 \cdot 10^{-9}$	344
9	$1 \cdot 10^{-8}$	3444



Obr. 7: Schéma nasazení 24-jamkové mikrotitrační destičky pro testování progestagenní aktivity

4) Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byly nasazeny chemikálie za účelem 24 hodinové expozice buněk těmto extraktům (vždy s kalibrační řadou referenční látky – ORG2058). Z jednotlivých jamek 24-jamkové mikrotitrační destičky bylo postupně odpipetováno celkem 600 μ l a rozděleno do třech jamek (představujících tři replikáty, každý po 200 μ l na jamku) na 96-jamkovou mikrotitrační destičku (Obr. 8). Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin.



Obr. 8: Schéma nasazení 96-jamkové mikrotitrační destičky pro testování progesteragenní aktivity

3.7.2 Antiprogestagenní aktivita

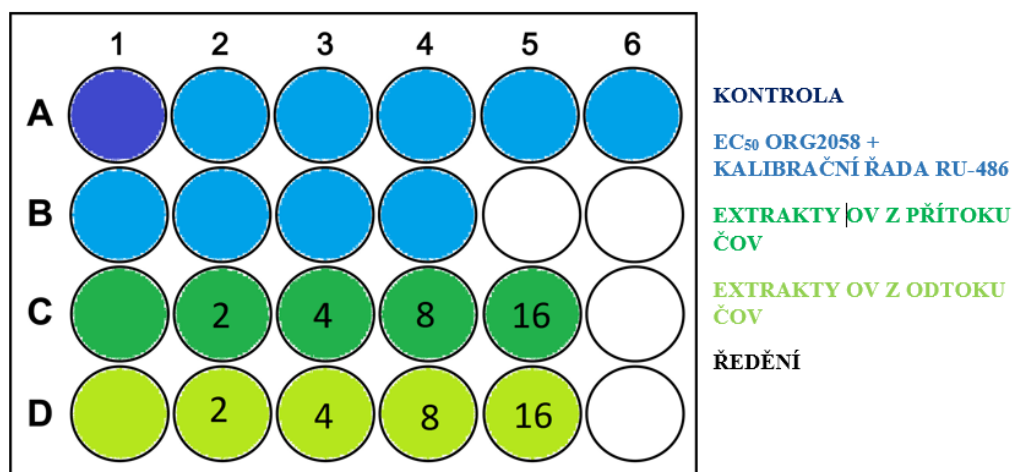
1) Byl připraven jeden neředěný (čistý) extrakt a ředěné extrakty odpadní vody z přítoku i odtoku ČOV v DMSO (ředění 2x, 4x, 8x a 16x).

2) Byla provedena homogenizace vzorků pomocí vortexu (IKA MS3 digital).

3) Na 24-jamkovou mikrotitrační destičku (Obr. 9) byl napipetován 1 ml testovacího média a do tohoto objemu byl napipetován 1 μ l následujících chemikálií/extraktů: DMSO (kontrolní skupina), EC₅₀ ORG2058 a kalibrační řada RU-486 (Tab. 13) a testované extrakty odpadní vody.

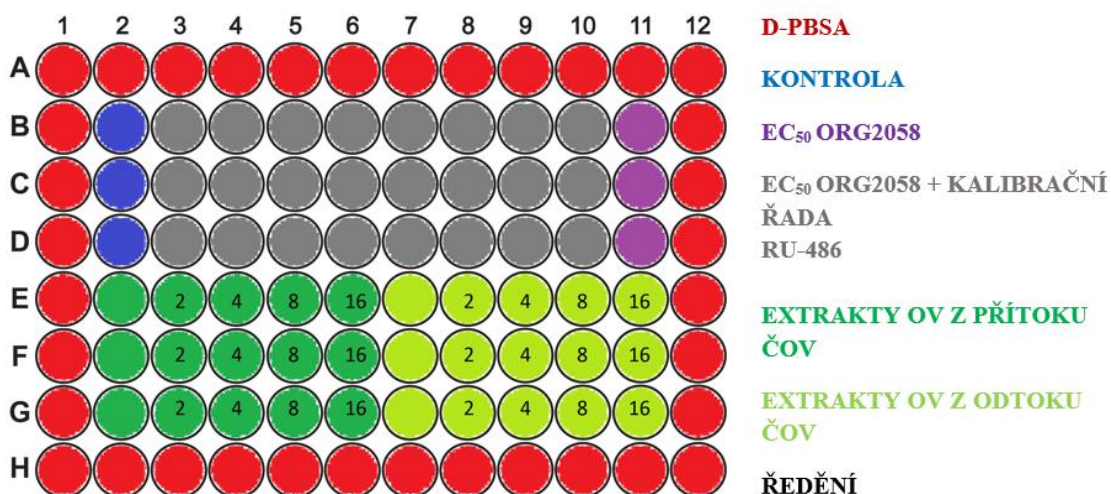
Tab 13: Koncentrace kalibrační řady RU-486

	koncentrace v jamce c (M)	koncentrace v jamce p (ng/L)
1	$1 \cdot 10^{-13}$	0,04
2	$1 \cdot 10^{-12}$	0,4
3	$3 \cdot 10^{-12}$	1
4	$1 \cdot 10^{-11}$	4
5	$3 \cdot 10^{-11}$	13
6	$1 \cdot 10^{-10}$	43
7	$3 \cdot 10^{-10}$	129
8	$1 \cdot 10^{-9}$	430
9	$1 \cdot 10^{-8}$	4296



Obr. 9: Schéma nasazení 24-jamkové mikrotitrační destičky pro testování antiprogestagenní aktivity

4) Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byly nasazeny chemikálie za účelem 24 hodinové expozice buněk těmto extraktům (vždy s kalibrační řadou referenční látky – RU-486). Z jednotlivých jamek 24-jamkové mikrotitrační destičky bylo postupně odpipetováno celkem 600 μ l a rozděleno do třech jamek (představujících tři replikáty, každý po 200 μ l na jamku) na 96-jamkovou mikrotitrační destičku (Obr. 10). Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin.



Obr. 10: Schéma nasazení 96-jamkové mikrotitrační destičky pro testování antiprogestagenní aktivity

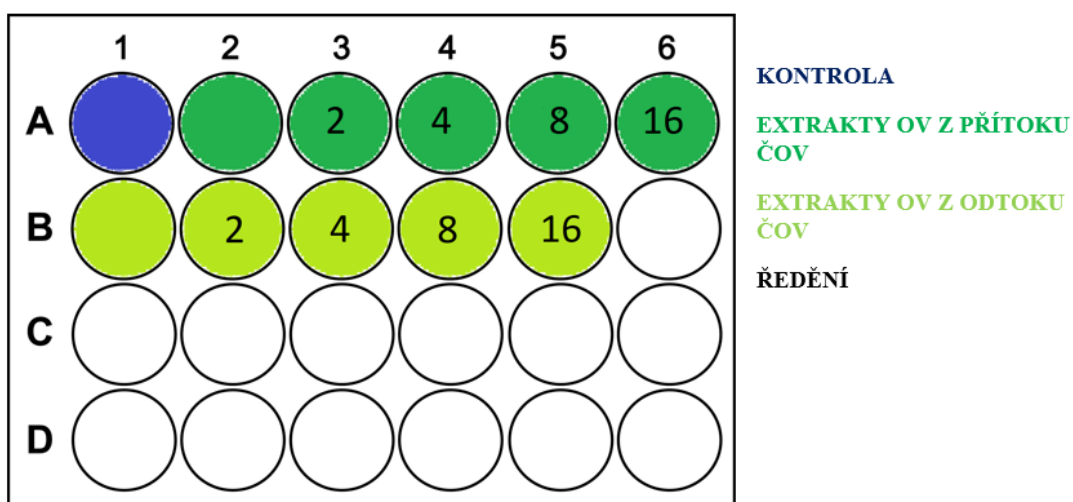
3.8 Testování cytotoxicity

Vzorky odpadní vody byly testovány na cytotoxicitu pro buněčnou linii PR-CALUX pomocí testu redukce resazurinu (O'Brien a kol., 2000). Resazurin je modré indikátorové barvivo, které je živými buňkami metabolizováno na růžový fluorescentní resorufin. Tento *in vitro* test byl zvolen, protože se jedná o citlivou, přesnou a reprodukovatelnou metodu detekce cytotoxicity (Borra a kol., 2009; O'Brien a kol., 2000). Buňky byly v průběhu testu v testovacím médiu, do kterého byl přidán roztok resazurinu v 10% objemu vůči původnímu celkovému objemu testovacího média.

Fluorescence byla detekována ve spektrofotometru s fluorescenčním modulem (Infinite M200 Plus, Tecan), při vlnové délce 590 nm, excitační záření mělo vlnovou délku 560 nm.

Testování cytotoxicity probíhalo následujícím způsobem:

- 1) Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byla nasazena suspenze buněk (o hustotě 10 000 buněk na jamku) ve 100 μ l testovacího média ve třech opakováních na skupinu. Následně byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin.
- 2) Kontrolní skupina (testovací médium + DMSO) a extrakty odpadní vody byly ředěny ve 24-jamkové mikrotitrační destičce (Obr. 11), stejně jako při testování (anti-)progestagenní aktivity.



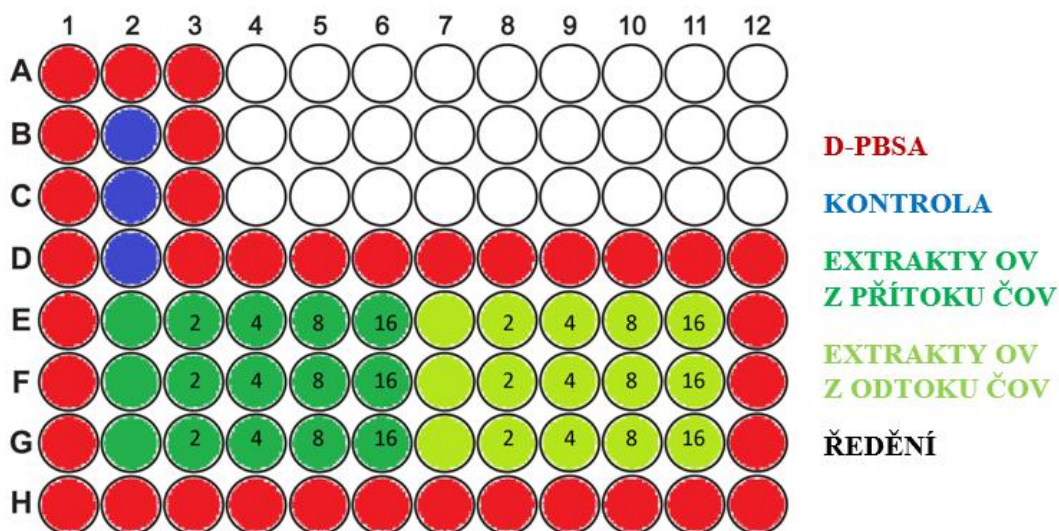
Obr. 11: Schéma nasazení 24-jamkové mikrotitrační destičky pro testování cytotoxicity

3) Po 24 hodinách bylo odstraněno testovací médium z jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. Do těchto jamek bylo následně napipetováno 200 µl testovacího média v případě kontrolní (neexponované) skupiny anebo 200 µl testovacího média obsahujícího extrakty odpadní vody v ředěních odpovídajících ředěním použitým k detekci progesteronové aktivity v PR-CALUX testu (Obr. 12).

Všechny buňky byly vystaveny 20 µl resazurinu po dobu 3 hodin (podle doporučení výrobce Sigma-Aldrich).

Po inkubaci byla změřena intenzita fluorescence konvertovaného barviva.

Výsledky testu redukce resazurinu byly přeneseny ze spektrofotometru do programu Excel (Microsoft) a statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA 12 (StatSoft).



Obr. 12: Schéma nasazení 96-jamkové mikrotitrační destičky pro testování cytotoxicity

3.9 Vyhodnocování dat

3.9.1 Vyhodnocení dat pro detekci hormonální aktivity v programu Excel

Luciferázová aktivita kalibračních řad (agonistické nebo antagonistické) a testovaných extraktů odpadní vody byla změřena v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU). Tato data byla vyhodnocena v programu Excel (Microsoft) a byla pro ně vynesena sigmoidní křivka pomocí nelineárního regresního modelu se čtyřmi parametry (sklon, EC_{50} , minimální a maximální indukce ORG2058). Tato křivka byla

posuzována podle 4 kritérií, pokud je splňovala, tak byla shledána za validní a data byla dále použita k vyhodnocování hormonální aktivity v odpadních vodách.

Zmíněná 4 kritéria byla nastavena poskytovatelem licence (BioDetection Systems b.v.) na základě průměru z dlouhodobého sledování referenčních látek (>100 měření). Jednalo se o následující kritéria: 1) $R^2 < 0.98$; 2) EC_{50} referenční látky (ORG2058 nebo RU-486) zjištěná v daném experimentu se pohybovala v rozmezí hodnot, v němž byla nacházena EC_{50} této látky během více než 100 zmíněných měření (vyjma odlehlých hodnot). Rozmezí pro ORG2058 bylo 0,1 – 1 nM a rozmezí pro RU-486 bylo nastaveno na 0,031-0,31 nM; 3) minimální indukční faktor > 300 pro agonistickou a > 50 pro antagonistickou aktivitu; 4) Z-faktor >0,6.

Hormonální aktivita byla přepočtena na ng/l ekvivalentního hormonu (EQs), kterým byl v případě agonistické aktivity syntetický progestin ORG2058 a v případě antagonistické aktivity mifeprieston (RU-486).

3.9.2 Vyhodnocení výsledků testu cytotoxicity v programu STATISTICA 12

K testování normality dat byl použit Shapirův-Wilkův test. Homoskedasticita byla ověřena pomocí Cochran-Hartley-Bartlettova testu. Následně byla data vyhodnocena pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA) pro zjištění statisticky signifikantního rozdílu nastaveného na hladinu $\alpha = 0,05$. Poté byl proveden Dunnettův post-hoc test za účelem zjistit rozdíl mezi intenzitou fluorescence (jamky s neexponovanými buňkami) a v exponovaných jamkách. Rozdíly byly zjišťovány mezi průměry kontrolní skupiny a exponovaných skupin. Pokud byla intenzita fluorescence v exponovaných jamkách statisticky signifikantně odlišná ($p < 0,05$) od intenzity v kontrole, byly tyto jamky (extrakty odpadní vody) označeny za cytotoxické. Cytotoxické vzorky byly vyřazeny z analýzy PR-CALUX (Příloha č. 1).

3.10 Výpočet odstranění (anti-)progestagenní aktivity na ČOV

Míra odstranění (anti-)progestagenní aktivity na testovaných ČOV byla vypočítána podle vzorce (Roberts a kol., 2015):

$$\% \text{ odstranění aktivity} = [(c_{\text{přítok}} - c_{\text{odtok}}) / c_{\text{přítok}}] * 100$$

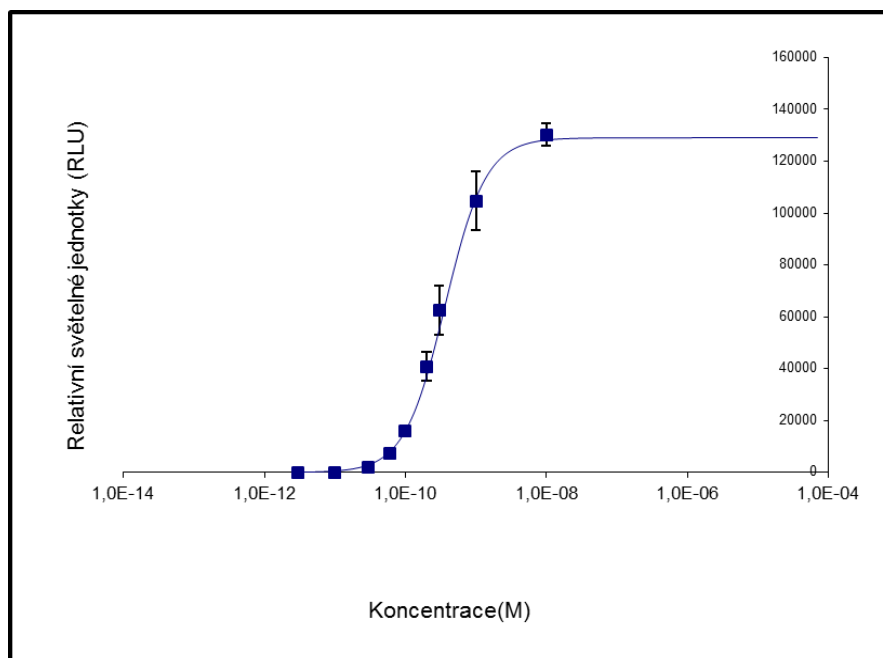
Kde: $c_{\text{přítok}}$ je koncentrace analytu v odpadní vodě z přítoku ČOV

c_{odtok} je koncentrace analytu ve vodě z odtoku ČOV

4 Výsledky

4.1 Progestagenní aktivita zjištěná na přítoku a odtoku jednotlivých ČOV

Nejprve byla vynesena sigmoidní křivka referenční látky ORG2058 (Obr. 13). Pokud splnila všechna kritéria ($R^2 < 0.98$; EC_{50} ORG2058 se pohybovala v rozmezí 0,1 - 1 nM; minimální indukční faktor > 300 ; Z-faktor $> 0,6$) byla vyhodnocována hormonální aktivita v odpadních vodách jednotlivých ČOV.



Obr. 13: Sigmoidní křivka referenční látky ORG2058

4.1.1 ČOV Milevsko

Na přítoku ČOV Milevsko byla zjištěna progestagenní aktivita $0,5 \pm 0,25$ ng/1 ORG2058 eq, na odtoku byla pod limitem kvantifikace ($0,05$ ng/1 ORG2058 eq) (Obr. 14). Míra odstranění progestagenní aktivity na této ČOV dosahovala 100 %.

4.1.2 ČOV Vodňany

Na přítoku ČOV Vodňany byla zjištěna progestagenní aktivita $0,5 \pm 0,06$ ng/1 ORG2058 eq, na odtoku byla pod limitem kvantifikace ($0,05$ ng/1 ORG2058 eq) (Obr. 14). Míra odstranění progestagenní aktivity na této ČOV dosahovala 100 %.

4.1.3 ČOV Protivín

Na přítoku ČOV Protivín byla zjištěna progestagenní aktivita $0,1 \pm 0,009$ ng/1 ORG2058 eq a na odtoku $0,07 \pm 0,001$ ng/1 ORG2058 eq (Obr. 14). Míra odstranění progestagenní aktivity na této ČOV dosahovala 30 %.

4.1.4 ČOV Prachatice

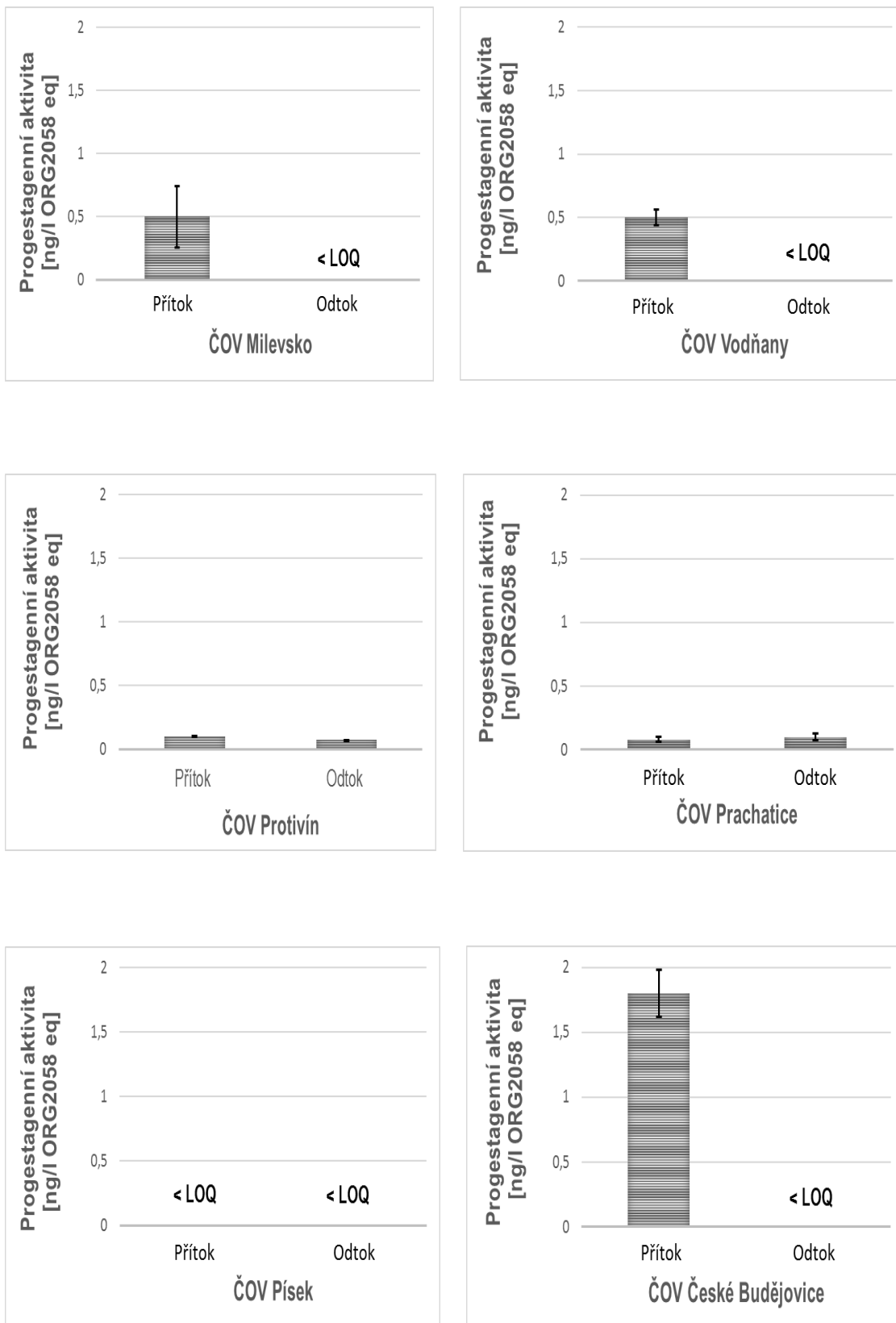
Na přítoku ČOV Prachatice byla zjištěna progestagenní aktivita $0,08 \pm 0,03$ ng/1 ORG2058 eq a na odtoku $0,1 \pm 0,03$ ng/1 ORG2058 eq (Obr. 14). Míra odstranění progestagenní aktivity na této ČOV byla záporná a dosahovala -25 %.

4.1.5 ČOV Písek

Na přítoku i odtoku ČOV Písek byla progestagenní aktivita pod limitem kvantifikace ($0,05$ ng/1 ORG2058 eq) (Obr. 14).

4.1.6 ČOV České Budějovice

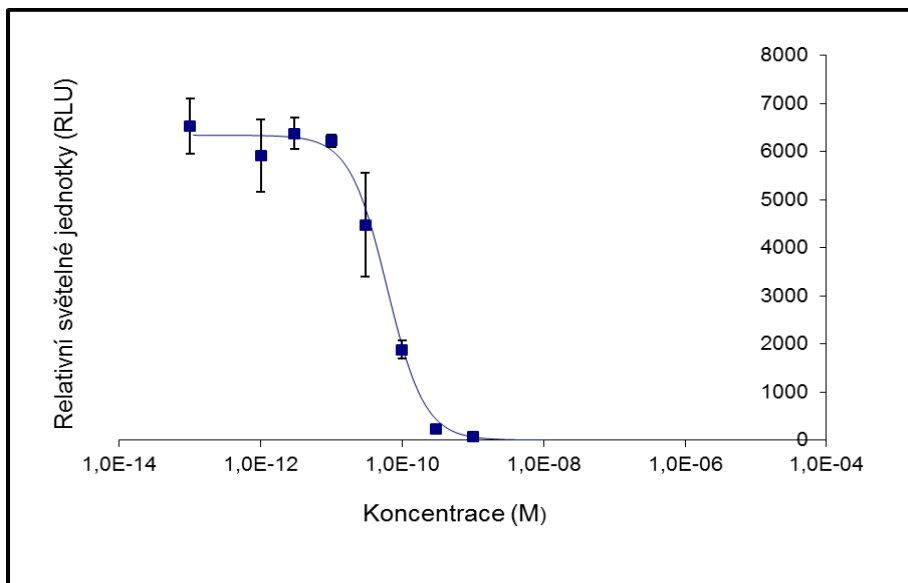
Na přítoku ČOV České Budějovice byla zjištěna progestagenní aktivita $1,8 \pm 0,23$ ng/1 ORG2058 eq, na odtoku byla pod limitem kvantifikace ($0,1$ ng/1 ORG2058 eq) (Obr. 14). Míra odstranění progestagenní aktivity na této ČOV dosahovala 100 %.



Obr. 14: Progesteragenní aktivita v ng/l ORG2058 eq na ČOV v jižních Čechách

4.2 Antiprogestagenní aktivita zjištěná na přítoku a odtoku jednotlivých ČOV

Nejprve byla vynesena sigmoidní křivka referenční látky RU-486 (Obr. 15). Pokud splnila všechna kritéria ($R^2 < 0.98$; EC_{50} RU-486 se pohybovala v rozmezí hodnot 0,031 - 0,31 nM,; minimální indukční faktor > 50 ; Z-faktor $> 0,6$) byla vyhodnocována hormonální aktivita v odpadních vodách jednotlivých ČOV.



Obr. 15: Sigmoidní křivka referenční látky RU-486

4.2.1 ČOV Milevsko

Na přítoku ČOV Milevsko byla zjištěna antiprogestagenní aktivita $0,4 \pm 0,004$ ng/l RU-486 eq a na odtoku $0,6 \pm 0,03$ ng/l RU-486 eq (Obr. 16). Míra odstranění antiprogestagenní aktivity na této ČOV byla záporná a dosahovala -50 %.

4.2.2 ČOV Vodňany

Na přítoku ČOV Vodňany byla zjištěna antiprogestagenní aktivita $1 \pm 0,16$ ng/l RU-486 eq, na odtoku byla pod limitem kvantifikace (0,2 ng/l RU-486 eq) (Obr. 16). Míra odstranění antiprogestagenní aktivity na této ČOV doahovala 100 %.

4.2.3 ČOV Protivín

Na přítoku ČOV Protivín byla antiprogestagenní aktivita pod limitem kvantifikace (0,4 ng/l RU-486 eq), na odtoku byla $4,7 \pm 0,3$ ng/l RU-486 eq (Obr. 16). Míra odstranění antiprogestagenní aktivity na této ČOV byla záporná.

4.2.4 ČOV Prachatice

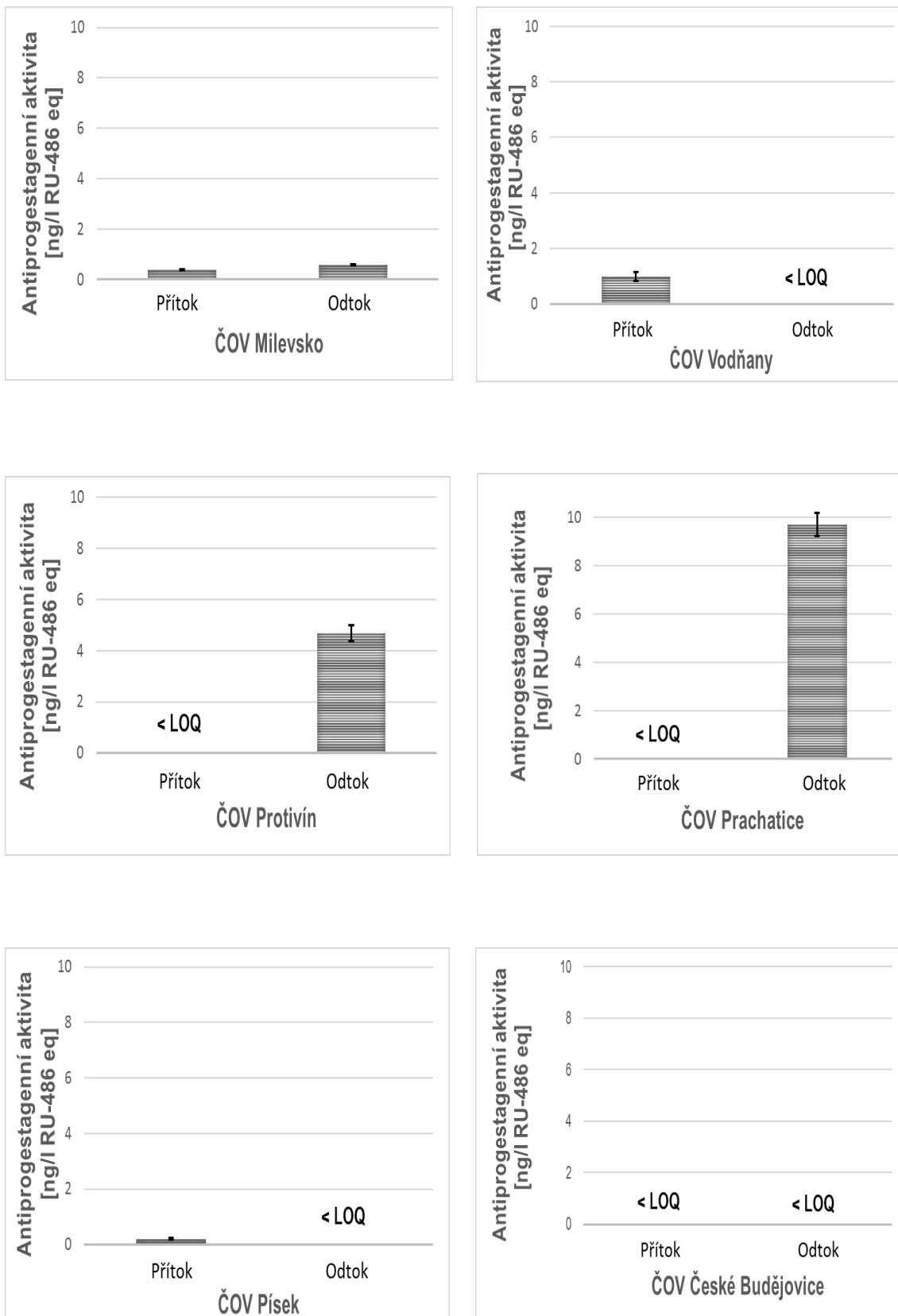
Na přítoku ČOV Prachatice byla antiprogestagenní aktivita pod limitem kvantifikace (1,2 ng/l RU-486 eq), na odtoku byla $9,7 \pm 0,5$ ng/l RU-486 eq (Obr. 16). Míra odstranění antiprogestagenní aktivity na této ČOV byla záporná.

4.2.5 ČOV Písek

Na přítoku ČOV Písek byla zjištěna antiprogestagenní aktivita $0,2 \pm 0,03$ ng/l RU-486 eq, na odtoku byla pod limitem kvantifikace (0,07 ng/l RU-486 eq) (Obr. 16). Míra odstranění antiprogestagenní aktivity na této ČOV dosahovala 100 %.

4.2.6 ČOV České Budějovice

Na přítoku i odtoku ČOV České Budějovice byla antiprogestagenní aktivita pod limitem kvantifikace (0,6 ng/l RU-486 eq) (Obr. 16).



Obr. 16: Antiprogestagenní aktivita v ng/l RU-486 eq na ČOV v jižních Čechách

5 Diskuze

Dosud bylo publikováno pouze několik málo článků, které se zabývají progestagenní aktivitou na přítoku a odtoku z ČOV. V odborné literatuře byla dokumentována tato aktivita v Austrálii (Bain a kol., 2014; Leusch a kol., 2014; Roberts a kol., 2015), v Indii (Viswanath a kol., 2008) a v Nizozemsku (van der Linden a kol., 2008). Na přítoku dosud studovaných ČOV se progestagenní aktivita pohybovala v koncentracích pod limitem kvantifikace až po několik desítek ng/l (P4; LEVO; ORG2058) eq. Na odtoku z ČOV se progestagenní aktivita pohybovala pod limitem kvantifikace až po desítky ng/l (P4; ORG2058) eq. Progestagenní aktivita bývá tedy na ČOV částečně či zcela odstraněna. Ovšem na odtoku jedné australské ČOV byla aktivita dokonce přibližně čtyřnásobná oproti přítoku.

V mé práci byla naměřená aktivita na přítoku ČOV pod limitem kvantifikace či dosahovala desetin nebo jednotek ng/l ORG2058 eq. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny na ČOV Milevsko, Vodňany a České Budějovice. Tyto výsledky by mohly ukazovat na vysoký počet žen užívajících antikoncepci. Podle údajů z Českého statistického úřadu (www.czso.cz) však představují, ve všech městech zmíněných v této práci, ženy v reprodukčním věku (tzn. od 15 do 49 let) z celkového počtu obyvatel 21-23 %. Navíc nejvíce dětí se rodí mezi 25.-34. rokem věku ženy. V tomto věkovém rozmezí reprezentují ženy, z celkového počtu reprodukčně aktivních, v jednotlivých městech 25-30 %. Největší podíl těchto žen je v Milevsku a Českých Budějovicích, následují Prachatice, Písek, Protivín a Vodňany (www.czso.cz). Gravidní ženy vyloučí denně nemalé množství progesteronu (Zhang a kol., 2014), mohly by tak mít pravděpodobně podíl na progestagenní aktivitě v odpadních vodách. V Českých Budějovicích se také nachází největší nemocnice v Jihočeském kraji, jejíž součástí je např. gynekologicko-porodnické nebo onkologické oddělení. Je známo, že některé léky proti rakovině např. děložní sliznice či prostaty, obsahují syntetické progestiny, které jsou progestagenně aktivní (Weiss a kol., 2010; Green a kol., 2002). Všechny tyto aspekty mohou vysvětlovat vyšší koncentrace progestagenní aktivity na přítocích ČOV. Na odtoku většiny ČOV byla aktivita částečně či zcela odstraněna. V jednom případě, na ČOV Prachatice, aktivita o čtvrtinu vzrostla oproti přítoku. Odpadní voda na přítoku této ČOV byla získána pomocí kompozitního vzorkovače a na odtoku bodovým odběrem. Bodový vzorek není tak reprezentativní, rozdíl mezi přítokem a odtokem tedy mohl být způsoben typem odběru.

Roberts a kol. (2015) ve své studii zmiňují, že ačkoli jsou k dispozici pouze omezené informace o chování a osudu progestagenních léčiv během čištění odpadních vod, existuje mnoho případů, kdy se i ostatní farmaka vyskytovala na odtoku ČOV ve vyšších koncentracích než v surové odpadní vodě na přítoku. Jedná se především o tyto skupiny léčiv: kardiovaskulární, antibiotika, antidepresiva či neurologická a psychoaktivní farmaka. Tento dobře známý jev bývá vysvětlován částečnou degradací metabolitů v různých stupních čištění na ČOV. Roberts a kol. (2015) zároveň uvádí příklad dvou nejčastěji předepisovaných progestinů v Austrálii – levonorgestrelu a norethisteronu. Tyto dva progestiny jsou v lidském těle téměř úplně absorbovány a z velké části metabolizovány zejména na glukuronové konjugáty, které odcházejí z těla močí a výkaly. Glukuronové konjugáty mohou být obvykle snadno dekonjugovány aktivovaným kalem. To znamená, že v případě, kdy bude velká část progestinů přitékat na ČOV ve formě konjugátů, je pravděpodobné, že budou biologicky aktivní mateřské sloučeniny regenerovány během čištění odpadních vod. Pokud bude navíc na ČOV relativně nízká hydraulická doba zdržení, znamená to, že zde může být omezená příležitost k odstranění těchto matečných sloučenin. Můžeme se tedy domnívat, že zvýšená aktivita na odtocích ČOV souvisí s druhem a formou látek, ve které se na ČOV dostávají. Výsledkem je poté záporná (negativní) účinnost čištění na ČOV, v literatuře označována jako „negative removal efficiency“. Ta může být způsobena právě výše zmíněnými konjugáty, které se dekonjugují až během procesu čištění (Vieno a kol., 2007; Radjenovic a kol., 2009; Sui a kol. 2010). Dalším důvodem záporné účinnosti čištění na ČOV může být biotransformace, tzn. některé látky, které (anti-)progestagenní aktivitu nevykazují se působením mikroorganismů mohou přeměnit v jiné látky (Peng a kol., 2014; Sripalakit a kol., 2006), které tuto aktivitu již mohou vykazovat

Antiprogestagenní aktivitou se v odpadních vodách zabývá nepoměrně méně vědeckých článků než aktivitou progestagenní. V současné době jsou navíc zaměřené spíše na aktivitu vod povrchových, zejména pak v Austrálii. Vzhledem k tomu, že více než šestina testovaných vzorků australských povrchových vod byla antiprogestagenně aktivní (Scott a kol., 2014), lze usuzovat na výskyt antiprogestagenních látek, a to v nezměněné formě, či ve formě metabolitů, na ČOV a zároveň na nedostatečnou schopnost čistíren tyto látky odbourat. Tuto skutečnost potvrzují i Liu a kol. (2006), kteří na odtoku ČOV v Číně naměřili téměř tři destíky $\mu\text{g/l}$ MIF eq a Rao a kol. (2014), kteří se zabývali analýzou antiprogestagenní aktivity odpadních vod z různých čistírenských

procesů, a ta se pohybovala od tří desítek po téměř tři stovky $\mu\text{g/l}$ MIF eq. Žádný ze studovaných čistírenských procesů tedy nebyl schopen antiprogestagenní aktivitu zcela odstranit.

Nedostatečná účinnost odbourání antiprogestagenních látek na některých ČOV byla dokázána i v mé práci. Na odtoku ČOV Milevsko antiprogestagenní aktivita stoupla o polovinu oproti přítoku. Na ČOV Protivín i ČOV Prachatice byla na přítoku aktivita pod limitem kvantifikace, zatímco na odtoku významně stoupla a dosáhla jednotek ng/l MIF eq. Je tedy možné, že na tyto čistírny přitékaly antiprogestagenní látky v konjugované formě, ve které nebyly na přítoku detekovány, v procesu čištění byly pak dekonjugovány a na odtoku již mohla být změřena jejich aktivita. Tato skutečnost by se mohla týkat syntetických antiprogestinů, avšak o osudu UV filtrů, musk sloučenin a bromovaných retardantů hoření, které rovněž vykazují antiprogestagenní aktivitu, na ČOV není v dostupné literatuře dostatek informací. Můžeme se ale domnívat, že se na výši antiprogestagenní aktivity mohly na všech testovaných ČOV podílet UV filtry, a to proto, že vzorky vody byly odebírány v létě, kdy se například kosmetické přípravky obsahující UV filtry používají v České republice v daleko větší míře než v jiném období roku.

Výši antiprogestagenní aktivity na ČOV Prachatice by mohl ovlivnit i fakt, že do prachatické nemocnice jezdí ženy s diagnózou rakoviny prsu a bývají zde i hospitalizovány. Ženám s touto diagnózou jsou podávány syntetické antiprogestiny, např. Mifepriston, Onapriston nebo Lonaprisan (Jonat a kol., 2013; Romieu a kol., 1987; Perrault a kol., 1996; Klijn a kol., 1989; Robertson a kol., 1999; Helle a kol., 1998). Na dalších třech testovaných ČOV byla změřená antiprogestagenní aktivita na přítoku v koncentracích do 1 ng/l MIF eq a na odtoku pod limitem kvantifikace. Domnívám se tedy, že ne na každé ČOV je s antiprogestagenní aktivitou problém.

Vzhledem k vysokým koncentracím na odtoku, v porovnání s progestagenní aktivitou, však může způsobovat antiprogestagenní aktivita problémy ve vodách povrchových, a to negativním působením na organismy v této vodě žijící. Nicméně riziko agonistické aktivity může být obecně podceňováno z důvodu tzv. „masking effect“. Aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků pro posouzení rizika, měla by být vždy testována aktivita agonistická (progestagenní) i antagonistická (antiprogestagenní), protože v případě měření pouze agonistické aktivity může dojít k jejímu „zamaskování“ aktivitou antagonistickou (Weiss a kol., 2009).

6 Závěr

Za pomoci PR-CALUX *in vitro* biotestu byla potvrzena (anti-)progestagenní aktivita v odpadních vodách.

Progestagenní aktivita se na přítoku testovaných čistíren odpadních vod (ČOV) pohybovala nejčastěji v koncentracích desetin nebo setin ng/l ORG2058 eq. Většina ČOV také dokázala tuto aktivitu zcela či částečně odbourat.

Antiprogestagenní aktivita se na přítoku testovaných ČOV pohybovala nejčastěji v koncentracích pod limitem kvantifikace či v desetinách ng/l RU-486 eq. Pouze dvě ČOV dokázaly tuto aktivitu zcela odbourat. Na polovině testovaných ČOV antiprogestagenní aktivita na odtoku stoupla. Tímto byla prokázána záporná účinnost čištění na některých ČOV, která mohla být způsobena biotransformací nebo dekonjugací metabolitů účinných látek.

Na odtoku některých ČOV byla zjištěna poměrně vysoká antiprogestagenní aktivita oproti aktivitě progestagenní. Tyto odpadní vody by proto mohly způsobit větší zatížení vod povrchových a antiprogestagenní aktivita by tak mohla představovat potenciálně větší riziko pro organismy žijící ve vodním prostředí než aktivita progestagenní. Avšak ani tato aktivita by neměla být obecně podceňována, a to z důvodu tzv. „masking effect“, kdy může být „zamaskována“ aktivitou antiprogestagenní.

7 Použitá literatura

- Africander, D., Verhoog, N., Hapgood, J.P., 2011. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*. 76, 636-652.
- Attardi, B.J., Burgenson, J., Hild, S.A., Reel, J.R., 2004. In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 88, 277-288.
- Avar, P., Maasz, G., Takács, P., Lovas, S., Zrinyi, Z., Svigruha, R., Takátsy, A., Tóth, L.G., Pirgerb, Z., 2016. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Testing and Analysis*. 8, 123-127.
- Bain, P.A., Williams, M., Kumar, A., 2014. Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33, 2297-2307.
- Balmer, M., Buser, H.R., Müller, M., 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.
- Bayaa, M., Booth, R. A., Sheng, Y., Liu, X. J., 2000. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (23), 12607-12612.
- Becker, K.L., 2001. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 957 s.
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Sonia Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, CH., Fenet, H., Creusot, N., A1t-A1ssa, S., Vincent Cavailles, V., Budzinski, Antignac, J.P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research*. 46, 1912-1922.
- Besse, J.P., Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*. 157, 3485-3494.
- Bhanushali, M., Bagale, V., Shirole, A., Joshi, Y., & Kadam, V., 2010. An in-vitro toxicity testing-a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 1, 15-31.
- BioDetection Systems (<http://www.biodetectionsystems.com>)

- Birkett, J.W., Lester, J.N., 2002. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*, Taylor&Francis: Boca Raton, FL, USA.
- Blair R.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*. 54, 138-153.
- Borra, R.C., Lotufo, M.A., Gagiotti, S.M., Mesquita Barros, F., Andrade, P.M., 2009. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*. 23 (3), 255-262.
- Brand, W., de Jongh C.M., van der Linden, S.C., Mennes, W., Puijker, L.M., van Leeuwen, C.J., van Wezel, A.P., Schriks, M., Heringa, M.B., 2013. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment International*. 55, 109-118.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology*. 48, 3649-3657.
- Ellestad, L.E., Cardon, M., Chambers, I.G., Farmer, J.L., Hartig, P., Stevens, K., Villeneuve, D.L., Wilson, V., Orlando, E.F., 2014. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environmental Science & Technology*. 48 (14), 8179-8187.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Wibke Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Marina Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch F.D.L., 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays. *Environmental Science & Technology*. 48, 1940-1956.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, C., Babai, D., Portier, CH.J., McDonell, D.P., 1997. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 143, 205-212.

- Green, H.J., Pakenham, K.I., Headley, B.C., Yaxely, J., Nicol, D.L., Mactaggart, P.N., Swanson, C., Watson, R.B., Gardiner, R.A., 2002. Altered cognitive function in men treated for prostate cancer with luteinizing hormone-releasing hormone analogues and cyproterone acetate: a randomized controlled trial. *BJU International Journal*. 90 (4), 427-432.
- Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J., Brouwer, A., 2006. In Vitro Profiling of the Endocrine-Disrupting Potency of Brominated Flame Retardants. *Toxicological Sciences*. 92(1), 157-173.
- Hanna, R. N., Daly, S. C. J., Pang, Y., Anglade, I., Kah, O., Thomas, P., Zhu, Y., 2010. Characterization and expression of the nuclear progesterone receptor in zebrafish gonads and brain. *Biology of Reproduction*. 82 (1), 112-122.
- Heikinheimo, O., Kekkonen, R., Lähteenmäki, P., 2003. The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action. *Contraception*. 68, 421-426.
- Helle, S. I., Jonat, W., Giurescu, M., Ekse, D., Holly, J. M., Lonning, P. E., 1998. Influence of treatment with onapristone on the IGF-system in breast cancer patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 66, 159-163.
- Horii, Y., Reiner, J.L., Loganathan, B.G., Kumar, K.S., Sajwan, K., Kannan, K., 2007. Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA. *Chemosphere*. 68, 2011-2020.
- Houtman, C.J., Sterk, S.S., van de Heijning, M.P.M., Brouwer, A., Stephany, R.W., van der Burgh, B., Sonneveld, E., 2009. Detection of anabolic androgenic steroid abuse in doping control using mammalian reporter gene bioassays. *Analytica Chimica Acta*. 637, 247–258.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*. 45, 732-740.
- Chatterjee, S., Kumar, V., Majumder, CH.B., Roy, P., 2008. Screening of some anti-progestin endocrine disruptors using a recombinant yeast based in vitro bioassay. *Toxicology in Vitro*. 22, 788-798.
- Chen, S.X., Bogerd, J., Andersson, E., Almeida, F.F.L., Taranger, G.L., Schulz, R.W., 2011. Cloning, pharmacological characterization, and expression analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) nuclear progesterone receptor. *Reproduction*. 141 (4), 491-500.

- Chen, S.X., Bogerd, J., García-López, Á., de Jonge, H., de Waal, P.P., Hong, W.S., Schulz, R.W., 2010. Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor. *Biology of Reproduction*. 82 (1), 171-181.
- Chwalisz, K., Larsen, L., Mattia-Goldberg, C., Edmonds, A., Elger, W., Winkel, C. A., 2007. A randomized, controlled trial of asoprisnil, a novel selective progesterone receptor modulator, in women with uterine leiomyomata. *Fertility and Sterility*. 87, 1399-1412.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2002. A novel progesterone receptor subtype in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *FEBS Letters*. 510 (1-2), 77-82.
- Ioffe, O. B., Zaino, R. J., Mutter, G. L., 2009. Endometrial changes from short-term therapy with CDB-4124, a selective progesterone receptor modulator. *Modern Pathology*. 22, 450-459.
- Ishii, A., Zaitzu, K., Kusano, M., Asano, T., Ogawa, T., Hattori, H., Seno, H., 2015. Identification and quantitation of mifepristone and its N-demethyl metabolite in the plasma of an aborted fetus by liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight–mass spectrometry (LC–Q–TOFMS) and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS–MS). *Forensic Toxicology*. 33, 409-412.
- Jonat, W., Bachelot, T., Ruhstaller, T., Kuss, I., Reimann, U., Robertson, J. F., 2013. Randomized phase II study of lonaprisan as second-line therapy for progesterone receptor-positive breast cancer. *Annals of Oncology*. 24 (10), 2543-2548.
- Junod, S.W., Marks, L., 2002. Women's trials: The approval of the first oral contraceptive pill in the United States and Great Britain. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. 57 (2), 117-160.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO Journal*. 9 (5), 1603-1614.
- Katzung, B.G., 1994. *Základní & klinická farmakologie*. H & H, Jinočany, 1072 s.
- Kinnberg, K., 2003. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. University of Southern Denmark.
- Kittnar, O., 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha, 800 s.
- Klaschka, U., Carsten von der Ohe, P., Bschorer, A., Krezmer, S., Sengl, M., Letzel, M., 2013. Occurrences and potential risks of 16 fragrances in five German sewage treatment plants and their receiving waters. *Environmental Science and Pollution Research*. 20, 2456-247.

- Klijn, J. G., de Jong, F. H., Bakker, G. H., Lamberts, S. W., Rodenburg, C. J., Alexieva-Figusch, J., 1989. Antiproggestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer. *Cancer Research*. 49, 2851-2856.
- Klijn, J. G., Setyono-Han, B., Foekens, J. A., 2000. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids* 65, 825-830.
- Knutson, T.P., Lange, C.A., 2014. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 142, 114-125.
- Kolodziej, E.P., Gray, J.L., Sedlak, D.L., 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 2622-2629.
- Krattenmacher, R., 2000. Drospirenone: Pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception*. 62 (1), 29-38.
- Kuhn, W., Fritzemeier, K. H., Hegele-Hartung, C., Krattenmacher, R., 1995. Comparative progestational activity of norgestimate, levonorgestrel-oxime and levonorgestrel in the rat and binding of these compounds to the progesterone receptor. *Contraception*. 51 (2), 131-139.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H., 2015. The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research: A Critical Review. *Environmental Science & Technology*. 49 (5), 2625-2638.
- Kupper, T., Plagellat, C., Brändli, R.C., de Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2006. Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Research*. 40, 2603-2612.
- 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.
- Legler, J., Dennekamp, M., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Koeman, J.H., van der Burg, B., Murk, A.J., 2002. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *The Science of the Total Environment*. 293, 69-83.
- Leusch, F.D.L., de Jager, C.H., Levi, Y., Lim, R., Puijker, L., Sacher, F., Tremblay, L.A., Wilson, V.S., Chapman, H.F., 2010. Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters. *Environmental Science & Technology*. 44, 3853-3860.

- Leusch, F.D.L., Khan, S.J., Laingam, S., Prochazka, E., Froscio, S., Trinh, T., Chapman, H.F., Humpage, A., 2014. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*. 49, 300-3015.
- Levens, E. D., Potlog-Nahari, C., Armstrong, A. Y., Wesley, R., Premkumar, A., Blithe, D. L., 2008. CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: a randomized controlled trial. *Obstetrics & Gynecology*. 111, 1129-1136.
- Liu, X. S., Ma, C., Hamam, A.W., Liu, X. J., 2005. Transcriptiondependent and transcription-independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries. *Developmental Biology*. 283 (1), 180-190.
- Liu, X., Zhang, J., Jie Yin, J., Duan, H., Wu, Y., Shao, B., 2010. Analysis of hormone antagonists in clinical and municipal wastewater by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 39, 2977-2985.
- Liu, Z., Ogejo, J.A., Pruden, A., Knowlton, K.F., 2011. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Science of the Total Environment*. 409, 5149-5161.
- Lovecká, P., Thimová, M., Demnerová, K., 2014. Potenciální endokrinní aktivita benzonitrilových herbicidů. *Chemické listy* 108, 471-474.
- Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrinedisruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Science of the Total Environment*. 225 (1-2), 49-57.
- 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.
- Maltoni, M., Nanni, O., Scarpi, E., Rossi, D., Serra, P., Amadori, D., 2001. High-dose progestins for the treatment of cancer anorexia-cachexia syndrome: systematic review of randomised clinical trials. *Annals of Oncology*. 12, 289-300.
- Martínková, J., 2007. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada, Praha, 397 s.
- McRobb, L., Handelsman, D.J., Kazlauskas, R., S. Wilkinson, S., McLeode, M.D., Heather, A.K., 2008. Structure-activity relationships of synthetic progestins in a yeast-based in vitro androgen bioassay. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 110, 39-47.

- Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., van de Guchte, C., Brouwer, A. 1996. Chemical-Activated Luciferase Gene Expression (CALUX): A Novel in-Vitro Bioassay for Ah Receptor Active Compounds in Sediments and Pore Water. *Fundamental and Applied Toxicology*. 33 (2), 149-160.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkelnik, A., van den Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (1), 16-23.
- 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.
- 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., Eva 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.
- Peng, F.Q., Guang-Guo Ying, G.Q., Yang, B., Liu, S., Lai, H.J., Liu, Y.S., Chen, Z.F., Zhou, G.J., 2014. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*. 95, 581-588.
- Peng, X., Tang, C., Yu, Y., Tan, J., Huang, Q., Wu, J., Chen, S., Mai, B., 2009. Concentrations, transport, fate, and releases of polybrominated diphenyl ethers in sewage treatment plants in the Pearl River Delta, South China. *Environment International*. 35, 303-309.
- Perrault, D., Eisenhauer, E. A., Pritchard, K. I., Panasci, L., Norris, B., Vandenberg, T., 1996. Phase II study of the progesterone antagonist mifepristone in patients with untreated metastatic breast carcinoma: a National Cancer Institute of Canada ClinicalTrials Group study. *Journal of Clinical Oncology*. 14, 2709-2712.
- Philibert, D., Bouchoux, F., Degryse, M., Lecaque, D., Petit, F., Gaillard, M., 1999. The pharmacological profile of a novel norpregnane progestin (trimegestone). *Gynecological Endocrinology*. 13 (5), 316–326.

- Radjenovic J., Petrovic M., Barcelo D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*. 43, 831-841.
- Rao, K., Li, N., Ma, M., Wang, Z., 2014. In vitro agonistic and antagonistic endocrine disrupting effects of organic extracts from waste water of different treatment processes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 8(1), 69-78.
- Roberts, J., Bain, P.A., Kumar, A., Hepplewhite, CH., Ellis, D.J., Christy, A.G., Beavis, S.G., 2015. Tracking multiple modes of endocrine activity in Australia's largest inland sewage treatment plant and effluent-receiving environment using a panel of in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34, 2271-2281.
- Robertson, J. F., Willsher, P. C., Winterbottom, L., Blamey, R. W., Thorpe, S., 1999. Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *European Journal of Cancer*. 35, 214-218.
- Romieu, G., Maudelonde, T., Ulmann, A., Pujol, H., Grenier, J., Cavalie, G., 1987. The antiprogestin RU486 in advanced breast cancer: preliminary clinical trial. *Bulletin Cancer*. 74, 455-461.
- Roztočil, A., 2011. *Moderní gynekologie*. Grada, Praha, 528 s.
- Runnalls, T.J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., Sumpter, J.P. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Human and Ecological Risk Assessment*. 16 (6), 1318-1338.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 238 s.
- Scippo, M.L., Argiris, C., VanDeWeerd, C., Muller, M., Willemsen, P., Martial, J., Maghuin-Rogister, G., 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378, 664-669.
- Scott, P.D., Bartkow, M., Blockwell, S.J., Coleman, H.M., Khan, S.J., Lim, R., McDonald, J.A., Nice, H., Nugegoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L.A., Warne M.S.J., Leusch, F.D.L., 2014. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 12951-12967.

- Scott, P.D., Bartkow, M., Blockwell, S.J., Coleman, H.M., Khan, S.J., Lim, R., McDonald, J.A., Nice, H., Nugegoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L.A., Warne, M.S.J., Leusch, F.D.L., 2014. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 12951-12967.
- Shore, L.S., Shemesh, M., 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry*. 75, 1859-187.
- Schreurs, R.H.M.M., Sonneveld, E., Jansen, J.H.J., Seinen, W., van der Burg, B., 2005. Interaction of Polycyclic Musks and UV Filters with the Estrogen Receptor (ER), Androgen Receptor (AR), and Progesterone Receptor (PR) in Reporter Gene Bioassays. *Toxicological Sciences*. 83, 264-272.
- Schriks, M., Heringa, M.B., van der Linden, S.C., 2009. Temporal variation in multiple hormonal activities of surface waters located in the Dutch part of the Rhine basin. *RIWA*. 25 s.
- Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A.C., Brouwer, A., van der Burg, B., 2005. Development of Androgen-and Estrogen-Responsive Bioassays, Members of a Panel of Human Cell Line-Based Highly Selective Steroid-Responsive Bioassays. *Toxicological Sciences*. 83, 136-148.
- Sonneveld, E., Pieterse B., Schoonen, W.G., van der Burg, B., 2011. Validation of in vitro screening models for progestagenic activities: Inter-assay comparison and correlation with in vivo activity in rabbits. *Toxicology in Vitro*. 25, 545-554.
- Sonneveld, E., Riteco, J.A.C., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G., van der Burg, B., 2006. Comparison of In Vitro and In Vivo Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities. *Toxicological Sciences*. 89 (1), 173-187.
- Soto, A.M., Maffini, M.V., Schaeberle, C.H.M., Sonnenschein, C., 2006. Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 20 (1), 15-33.
- Spitz, I.M., Chwalisz, K., 2000. Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids*. 65, 807-815.
- Sripalakit, P., Wichai, U., Saraphanchotiwitthaya, A., 2006. Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 41, 49-54.
- Sui Q., Huang J., Deng S., Yu G., Fan Q., 2010. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Research*. 44, 417-426.

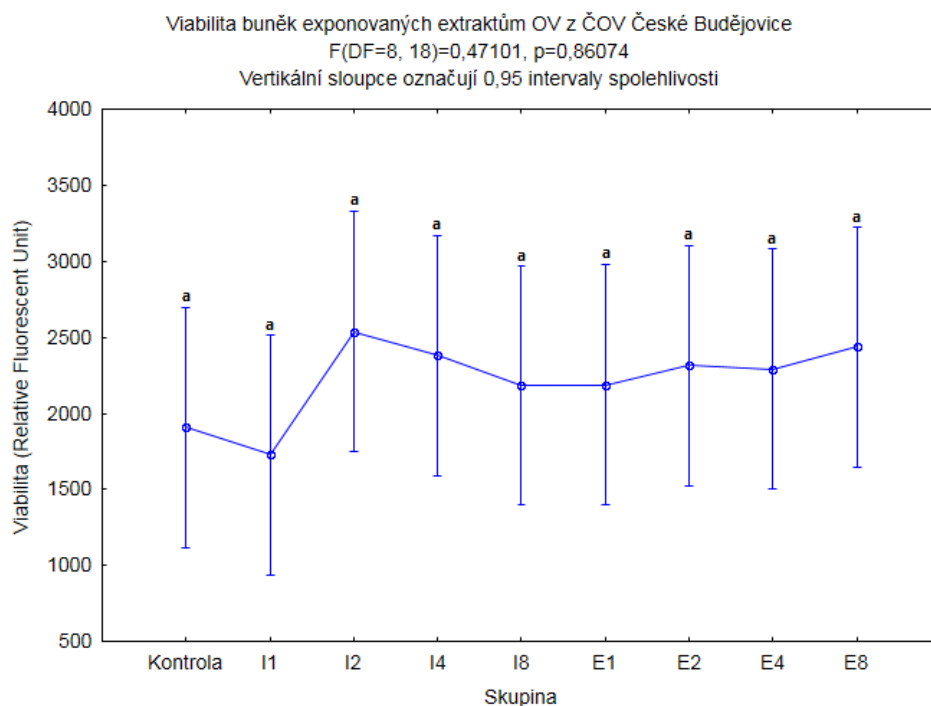
- Svobodová, K., Cajthaml, T., 2010. New in vitro reporter gene bioassays for screening of hormonal active compounds in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88, 839-847.
- Tang, O.S., Ho, P.CH., 2006. Clinical applications of mifepristone. *Gynecological Endocrinology*. 22, 655-659.
- Tian, J., Kim, S., Heilig, E., Ruderman, J. V., 2000. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (26), 14358-14363.
- Todo, T., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, K., Yoshikuni, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 2000. Characterization of a testicular $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4 pregnen-3-one (a spermiation inducing steroid in fish) receptor from a teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *FEBS Letters*. 465 (1), 12-17.
- Trojan, S., 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha, 771 s.
- van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology*. 42 (15), 5814-5820.
- Vieno, N., Tuhkanenb, T., Kronberga, L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*. 41, 1001-1012.
- Viswanath, G., Haldera, S., Divya, G., Majumder, CH.B., Roy, P., 2008. Detection of potential (anti)progestagenic endocrine disruptors using a recombinant human progesterone receptor binding and transactivation assay. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 295, 1-9.
- Weiss, J.A., Hamers, T., Thomas, K.V., van der Linden, S., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., 2009. Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 394, 1385-1397.
- Weiss, P., 2010. *Sexuologie*. Grada, Praha, 744 s.
- Willemsen, P., Scippo, M.L., Kausel, G., Figueroa, J., Maghuin-Rogister, G., Martial, J.A., Muller, M., 2004. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378, 655-663.

- Yang, J.J., Metcalfe, C.D., 2006. Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Science of the Total Environment*. 363,149- 165.
- Yudt, M. R., Russo, L. A., Berrodin, T. J., Jelinsky, S. A., Ellis, D., Cohen, J. C., 2011. Discovery of a novel mechanism of steroid receptor antagonism: WAY-255348 modulates progesterone receptor cellular localization and promoter interactions. *Biochemical Pharmacology*. 82, 1709-1719.
- Zhang, Q.Q., Zhao, J.L., Ying, G.G., Liu, Y.S., Pan, CH.G., 2014. Emission Estimation and Multimedia Fate Modeling of Seven Steroids at the River Basin Scale in China. *Environmental Science & Technology*. 48, 7982-7992.

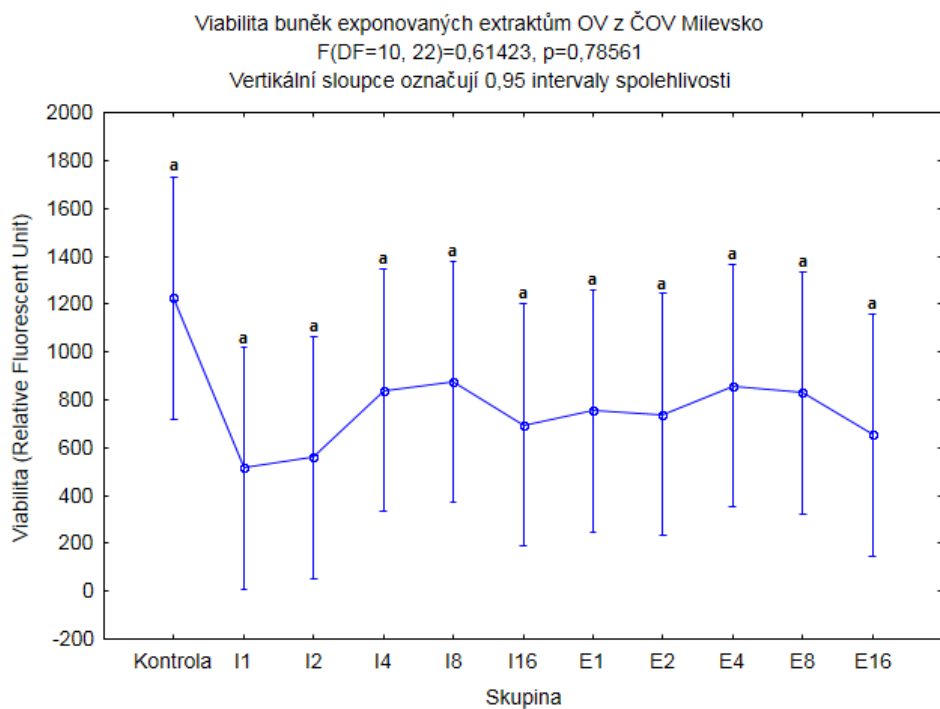
8 Přílohy

Příloha č. 1: Testování extraktů odpadní vody na cytotoxicitu pro buněčnou linii PR-CALUX

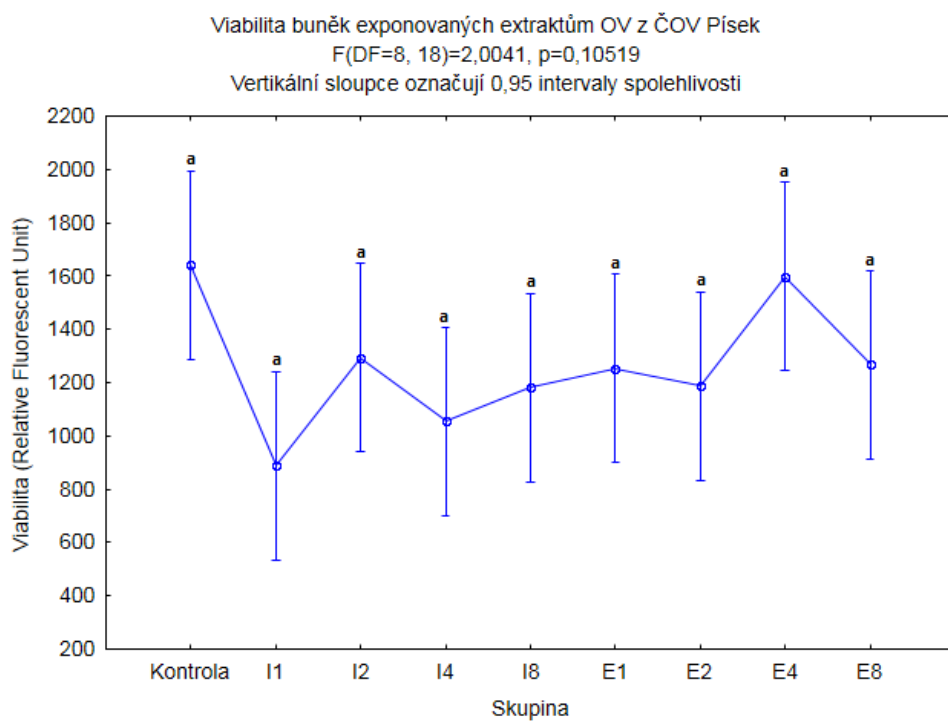
Testované extrakty z přítoku a odtoku jednotlivých ČOV (Obr. P1-1 – P1-6) nevykazovaly toxický vliv na životnost buněk, výjimkou byl neředitelný extrakt odpadní vody z přítoku ČOV Protivín (Obr. P1-5) a neředitelný extrakt z odtoku ČOV Vodňany (Obr. P1-6). Oba tyto vzorky byly cytotoxické a byly vyloučeny z analýzy PR-CALUX.



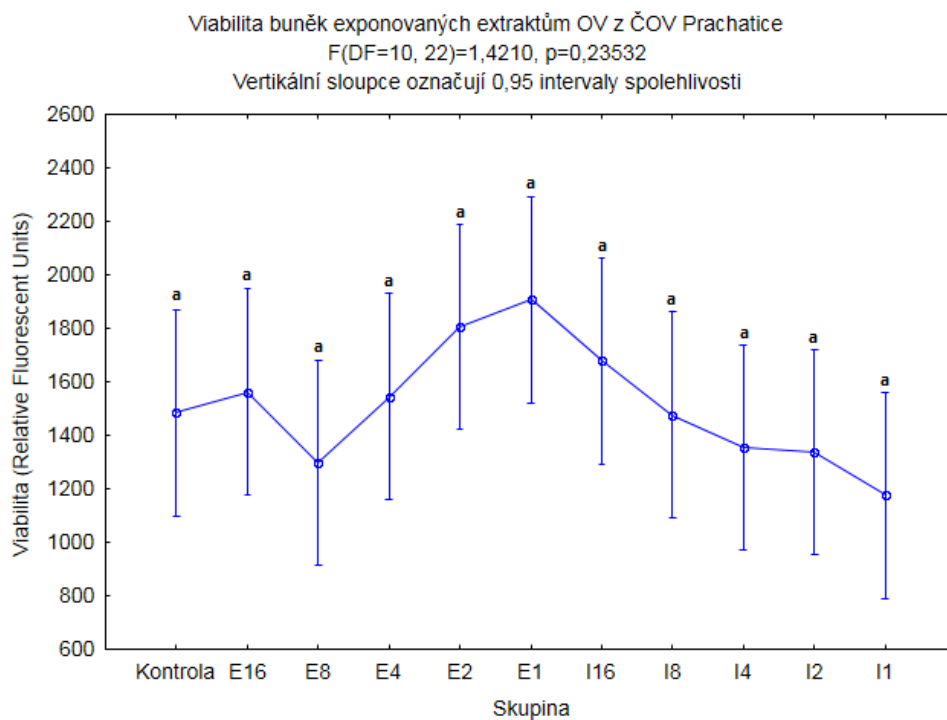
Obr. P1-1: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV České Budějovice



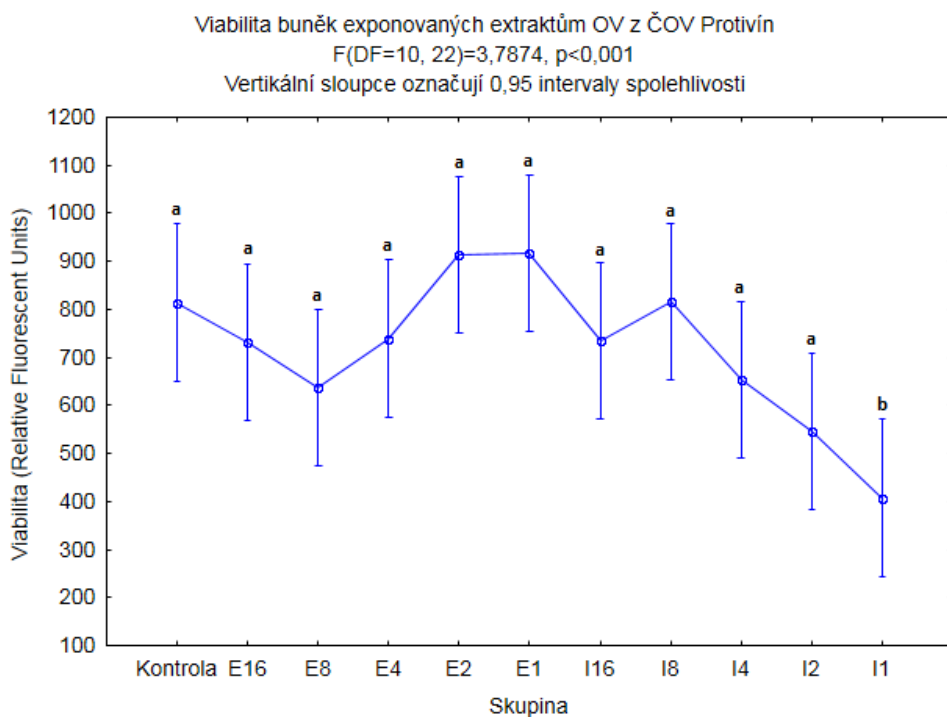
Obr. P1-2: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV Milevsko



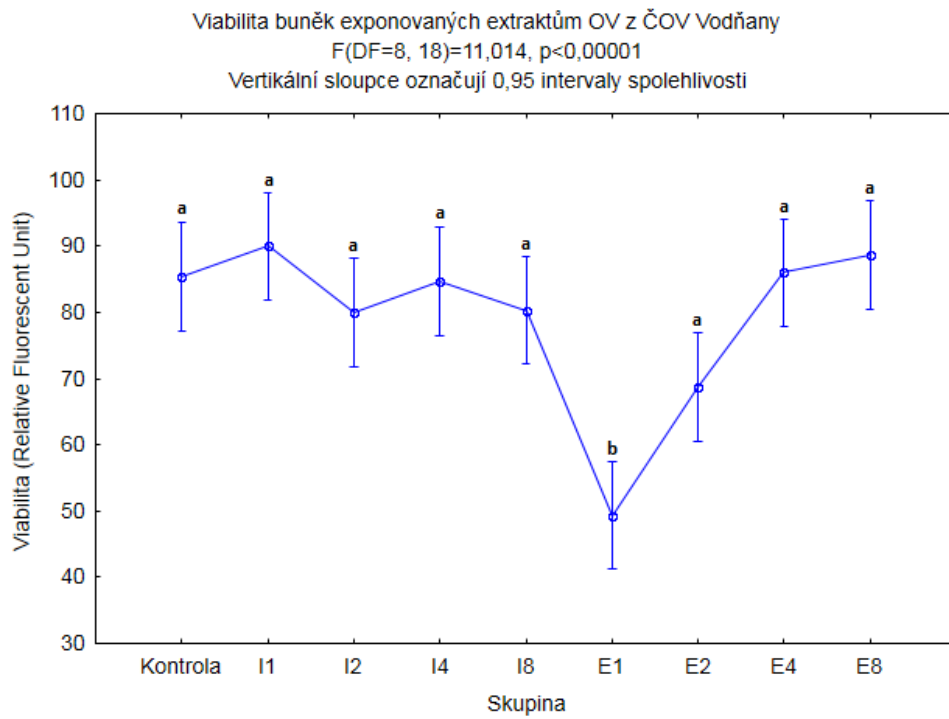
Obr. P1-3: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV Písek



Obr. P1-4: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV Prachatice



Obr. P1-5: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV Protivín



Obr. P1-6: Testování cytotoxicity extraktů odpadní vody z přítoku (I) a odtoku (E) ČOV Vodňany

9 Abstrakt

Cílem práce bylo detekovat (anti-)progestagenní aktivitu ve vzorcích vody z přítoku a odtoku šesti čistíren odpadních vod (ČOV) nacházejících se v jihočeském kraji. Následně byla posouzena účinnost procesu čištění daných ČOV z tohoto hlediska.

Odebraná odpadní voda byla převezena do laboratoře a extrahována technikou extrakce na pevné fázi. Zachycené látky byly promyty, odpařeny a rozpuštěny v DMSO. Vlastní detekce (anti-)progestagenní aktivity byla provedena za pomoci PR-CALUX *in vitro* biotestu. Buňky byly nasazeny na mikrotitrační destičku a po inkubaci byly vystaveny referenční látce ORG2058 v případě detekce progestagenní aktivity či referenční látce RU-486 pro detekci aktivity antiprogestagenní a také řadě řaděných extraktů odpadní vody. Poté byla měřena luminiscence buněk, která byla vyjádřena v relativních světelných jednotkách a představovala měřítko pro (anti-)progestagenní aktivitu.

(Anti-)progestagenní aktivita byla udávána v ekvivalentních koncentracích vztahujících se k referenční látce Progestagenní aktivita se na přítoku ČOV pohybovala v koncentracích pod LOQ až po 1,8 ng/l ORG2058 eq. Na odtoku byla tato aktivita naměřena v koncentracích pod LOQ až po 0,5 ng/l ORG2058 eq. Míra odstranění progestagenní aktivity se pohybovala v rozmezí od -25 % do 100 %. Antiprogestagenní aktivita se na přítoku ČOV pohybovala v koncentracích pod LOQ až po 1 ng/l RU-486 eq. Na odtoku byla tato aktivita naměřena v koncentracích pod LOQ až po 9,7 ng/l RU-486 eq. Míra odstranění antiprogestagenní aktivity se pohybovala v rozmezí od -50 % do 100 %.

Za pomoci PR-CALUX *in vitro* biotestu byla prokázána (anti-)progestagenní aktivita v odpadních vodách. Zároveň byla prokázána záporná účinnost čištění na některých ČOV, která by mohla být způsobena pravděpodobně biotransformací některých látek, které nemají (anti-)progestagenní aktivitu, na látky, které tuto aktivitu naopak vykazují nebo dekonjugací metabolitů účinných látek s (anti-)progestagenní aktivitou.

Antiprogestagenní aktivita by se mohla jevit, z důvodu koncentrací na odtoku z ČOV, jako rizikovější pro organismy žijící ve vodním prostředí než aktivita progestagenní. Avšak ani tato aktivita by neměla být podceňována.

Klíčová slova: antiprogestagenní látky, CALUX, ČOV, *in vitro*, koncentrace, LOQ, progesteron, progestagenní látky

10 Abstract

The aim of this diploma thesis was to detect (anti-)progestagenic activity in wastewater samples from the influent and effluent of six wastewater treatment plants (WWTPs) located in South Bohemia. Subsequently, the efficiency of the treatment process of this WWTPs was assessed from this point of view.

The wastewater from WWTPs was transported to the laboratory and extracted by solid phase extraction. The eluates were washed, evaporated and dissolved in DMSO. Detection of (anti-)progestagenic activity was performed by using the PR-CALUX *in vitro* bioassay. Transgenic cells were seeded on well plates and were exposed to ORG2058, reference substance for progestagenic activity, or RU-486, reference substance for antiprogestagenic activity, as well as a number of diluted wastewater extracts. After that, luminescence of the cells was measured and it was expressed in relative light units which were a measure of (anti-)progestagenic activity.

(Anti-)progestagenic activity was reported in equivalent concentrations of the reference substance. Progestagenic activity in WWTPs influent ranged from below LOQ up to 1.8 ng/l ORG2058 eq. In effluent this activity ranged from below LOQ up to 0.5 ng/l ORG2058 eq. The elimination rate of progestagenic activity ranged from -25% to 100%. Antiprogestagenic activity in WWTPs influent was below the LOQ up to 1 ng/l RU-486 eq. In effluent this activity was below LOQ up to 9.7 ng/l RU-486 eq. The elimination rate of antiprogestagenic activity ranged from -50% to 100%.

(Anti-)progestagenic activity in waste water has been demonstrated by using the PR-CALUX *in vitro* bioassay. Negative removal efficiency of some WWTPs was also documented. This is probably caused by biotransformation of some substances which don't have (anti-)progestagenic activity to substances which have this activity or it is caused by deconjugation of metabolites of compounds with (anti-)progestagenic activity.

Antiprogestagenic activity may be more hazardous for organisms living in the aquatic environment than progestagenic activity because of concentrations in WWTPs effluent. However this activity should not be underestimated.

Keywords: antiprogestagenic compounds, CALUX, WWTPs, *in vitro*, concentration, LOQ, progesterone, progestagenic compounds