

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Hormonální aktivita v odpadních vodách

Hormonal activity in wastewater

Bc. Tereza Čermáková

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2018

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a že všechny použité zdroje a literatura jsou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného vysokoškolského titulu.

V Praze dne

.....

Tereza Čermáková

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za ochotu vést mou diplomovou práci, za cenné rady ohledně směřování projektu a revizi písemné podoby práce. Poděkovat bych chtěla také RNDr. Martinu Ezechiášovi, Ph.D. za praktické zaškolení a teorii ohledně ekotoxikologických testů s kvasinkami. Dále pak RNDr. Janě Holecové, Mgr. Lucii Linhartové, PharmDr. Kláře Michalíkové, Ph.D. a Mgr. Janě Zloté za předání zkušeností ke zpracování, extrakce a vyhodnocení dat reálných vzorků a za věcné a praktické rady. Mgr. Kamile Šředlové děkuji za pomoc s překladem abstraktu. RNDr. Zdeně Škrob, Ph.D. děkuji za změření vzorků týkajících se rozpustnosti a celému kolektivu Laboratoře environmentální biotechnologie AV ČR za trpělivost a vstřícný přístup. Poděkovat bych chtěla také zaměstnancům společnosti DEKONTA a.s. za odběr vzorků ze dvou lokalit a Ing. Heleně Maternové, Ph.D. za kontakty na kompetentní osoby z čistíren odpadních vod. Za pomoc se statistickým zpracováním dat děkuji RNDr. Zdeňkovi Janovskému, Ph.D. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mi po celou dobu zpracování byli oporou ve všech ohledech.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratek.....	6
1 Úvod	8
2 Teoretický úvod	9
2.1 Endokrinní disruptory.....	9
2.2 Estrogenně aktivní látky	13
2.2.1 Přirozené steroidní hormony: mechanismus působení a výskyt v prostředí	14
2.2.2 Xenoestrogeny.....	16
2.2.2.1 Syntetické hormony.....	16
2.2.2.2 Fytoestrogeny	16
2.2.2.3 Bisfenol A.....	17
2.3 Výskyt estrogenních disruptorů v ČOV.....	21
2.4 Stanovení estrogenně aktivních látek	23
2.4.1 Případové studie porovnání metodických přístupů	24
2.5 Predikce účinku a empirická data.....	25
2.5.1 Koncept křivky dávka-odpověď	26
2.5.2 Matematické modely pro směšné vzorky	27
2.5.3 Modelování vs. empirická měření	28
3 Cíle práce	29
4 Experimentální část	30
4.1 Standardy	30
4.2 Rozpouštědla a další chemikálie.....	30
4.3 Materiál a organismy.....	31
4.4 Přístroje	31
4.5 Bioluminiscenční test	32
4.6 B-galaktozidázový test.....	34
4.7 Testy rozpustnosti 4-nonylfenolu.....	35
4.8 Úprava a extrakce odpadních vod.....	36
4.9 Úprava a extrakce sedimentů.....	37
4.10 Chromatografická analýza extraktů sedimentů a odpadních vod.....	38
4.11 Predikční modely	39
5 Výsledky.....	40
5.1 Testy rozpustnosti	40
5.2 Bioluminiscenční test	41

5.3	β -galaktozidázového testu	45
5.4	Reálné vzorky	51
6	Diskuze.....	54
7	Závěr	57
8	Citovaná literatura.....	58
9	Bibliografie k Tabulce 1	64

Abstrakt

Endokrinní disruptory jsou látky přírodního i syntetického původu, které působí na hormonální systém organismů. Jsou běžně detekovány v životním prostředí v environmentálně relevantních koncentracích. Sekundárním zdrojem jsou odtoky z čistíren odpadních vod. Vzhledem k jejich četnosti je v současnosti akcentován jejich vliv ve směsích. Pro stanovení celkového efektu byly použity ekotoxikologické testy s kulturou geneticky modifikovaných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, s jejichž pomocí byla ověřována spolehlivost matematických predikcí pro směsi standardů (estron, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, estriol, bisfenol A, irgasan, 4-nonylfenol). Na reálné vzorky odtoků z čistíren odpadních vod a sedimentů byla aplikována cílená chromatografická analýza spolu s kvasinkovými testy.

Schindlerův predikční model a FLM (Full logistic model) byly spolehlivější při predikci celé křivky dávka-odpověď oproti modelu GCA (Generalized concentration addition). Pro parametr EC₅₀ byly predikované hodnoty pomocí všech modelů srovnatelné a ve většině případů se blížily empirickým hodnotám. U tří ze čtyř vzorků odpadních vod byla detekována estrogenní aktivita 0,65 – 1,70 ng/L 17 β -estradiol ekvivalent (EEQ) nad limitem detekce testu 0,13 – 0,33 ng/L EEQ. Jeden vzorek vykazoval antiestrogenní aktivitu. V sedimentech byla celková estrogenní aktivita 27,30 \pm 6,35 ng/g EEQ. Pouze v případě sedimentů bylo možné sestavit predikci křivky. Ve vodách totiž nebyla většina ze sedmi analytů vůbec detekována, a pokud ano, tak v příliš malém množství na to, aby vykazovala odezvu v testu s kvasinkami (75 \pm 16 – 312 \pm 67 ng/L bisfenolu A). Predikce pro sediment však výrazně nadhodnotila celkovou odezvu. Sediment byl odebrán z recipientu čistírny, kde byla zjištěna antiestrogenní aktivita, která prozatím není do predikčních modelů zahrnuta.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, xenoestrogeny, modely ekotoxicity, FLM, GCA, odpadní vody

Abstract

Endocrine disruptors are natural or manmade substances which affect hormonal systems of organisms. Biologically relevant concentrations are commonly being detected in the environment. The effluents of wastewater treatment plant present their significant secondary source. Due to their occurrence and quantity the interest in mixtures increases. Ecotoxicological assays with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* were applied to verify reliability of predictive mathematical models for mixtures of standards (estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, estriol, bisphenol A, irgasan, 4-nonylphenol). Chromatographic analysis along with yeast assays were used for the evaluation of real samples of wastewater treatment plant effluents and sediments.

Schindler's predictive model and Full logistic model (FLM) were more reliable for predicting the whole dose-response curve compared to Generalized concentration addition (GCA). Predicted values of a parameter EC₅₀ from all three models were comparable to empirical measurements. Three out of four samples exhibited estrogenic activity 0.65 – 1.70 ng/L 17 β -estradiol equivalent (EEQ) above the limit of detection 0.13 – 0.33 ng/L EEQ. Antiestrogenic activity was detected in one of the samples. Prediction could be carried out only in the case of the sediments 27.30 \pm 6.35 ng/g EEQ. This was caused by no or negligible amounts of seven analytes in the wastewater treatment plant effluents. The concentration were too low to show any response by the yeast assay (75 \pm 16 – 312 \pm 67 ng/L bisphenol A). Prediction overestimated the measured total effect in sediment which was sampled in a recipient of wastewater treatment where the antiestrogenic response was detected.

Key words: endocrine disruptors, xenoestrogens, ecotoxicity models, FLM, GCA, wastewater

Seznam zkratek

4-NF	4-nonylfenol
ACN	acetonitril
ADI	akceptovatelný denní příjem (z angl. acceptable daily intake)
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (z angl. aryl hydrocarbon receptor)
AR	androgenní receptor
ASE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (z angl. accelerated solvent extraction)
BCF	biokoncentrační faktor
BPA (BPF)	bisfenol A (bisfenol F)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
CA	koncentrační přídavek (z angl. concentration addition)
CCL	kandidátní seznam kontaminantů (z angl. contaminant candidate List)
CPRG	chlorfenol red- β -D-galaktopyranosidáza (z angl. chlorophenol Red- β -D-galactopyranoside)
CW	umělé mokřady (z angl. constructed wetlands)
ČOV	čistírna odpadních vod
DCM	dichlormethan
DES	diethylstilbestrol
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl) ethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECs	do budoucna obávané kontaminanty (z angl. emerging contaminants)
ECx	efektivní koncentrace, při které je x procent jedinců dosaženo sledovaného efektu
EDs	endokrinní disruptory (z angl. endocrine disruptors)
EDCs	endokrinně disruptivní chemikálie (z angl. endocrine disrupting chemicals)
EEF	estrogenní ekvivalentní faktor (z angl. estrogenic Equivalency Factor)
EEQ	17 β -estradiol ekvivalent
EE2	17 α -ethinylestradiol
EI	elektronová ionizace
EO	ekvivalentní obyvatel
ER β , ER α a ERR γ	subtypy estrogenních receptorů
EtOAc	ethylacetát, ethylester kyseliny octové
EtOH	ethanol
EU	Evropská Unie
E1	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FLM	plný logistický model (z angl. full logistic model)
GCA	zobecněný koncentrační přídavek (z angl. generalized concentration addition)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (z angl. gas chromatography mass spectrometry)
GMO	geneticky modifikováno (z angl. genetically modified)

GPC	gelová permeační chromatografie (z angl. gel permeation chromatography)
HCB	hexachlorbenzen
HDP	hrubý domácí produkt
HPLC-PDA	vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem (z angl. high performance liquid chromatography with photodiode array detector)
IA	nezávislé působení (z angl. independent action)
IRG	irgasan (triclosan)
K_{ow}	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (z angl. liquid chromatography mass spectrometry)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (z angl. liquid chromatography tandem-mass spectrometry)
LOD	limit detekce
MeEE2	mestranol
MeOH	methanol
MBR	membránový bioreaktor (z angl. membrane bioreactor)
MSM	multiplikativní model zbytku (z angl. multiplicative Survival model)
N/A	nedostupná data (z angl. not available)
NOAEL	dávka, při které nebyl pozorován škodlivý účinek
NOEC	koncentrace, kdy nebyly pozorovány škodlivé účinky
p	tlak
p.a.	pro analýzu
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenylly
PCPs	produkty denní potřeby (z angl. personal care products)
PNEC	předpokládaná koncentrace, kdy nebudou pozorovány škodlivé účinky
PPAR γ	receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory
PPCPs	farmaceutika a produkty denní potřeby (z angl. pharmaceuticals and personal care products)
RLU	relativní světelná jednotka (relative light unit)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
R^2	koeficient determinace
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SIM	měření vybraných iontů (z angl. selected ion monitoring)
SPE	extrakce pevnou fází (z angl. solid-phase extraction)
T	teplota
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin
TEF	faktor ekvivalentní toxicity (z angl. toxic equivalency factor)
TMCS	trimethylchlorosilan
TOC	celkový organický uhlík (z angl. total organic carbon)
USA	Spojené státy americké
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států amerických
WHO	Světová zdravotnická organizace
λ	vlnová délka
ρ	specifický elektrický odpor (rezistivita)

1 Úvod

Endokrinní disruptory (EDs) jsou látky, které působí změny hormonálního systému jinak zdravého organismu a to i při koncentracích v řádu $\mu\text{g/L}$. Byly detekovány v mnoha matricích od odpadní po pitnou vodu, přes sedimenty po půdu (Luo, 2014; Li, 2013; Pojana, 2007). Jedná se sice o relativně nízké koncentrace, i ty jsou však environmentálně relevantní (Windsor, 2018). Především při výskytu estrogenně aktivních látek (ng/L) již byly pozorovány změny u volně žijících živočichů (Jobling, 2006; Solé, 2000) ale i v experimentální nádrži (Kidd, 2007). Z dosavadních studií vyplývá, že hlavními přispěvateli k celkové estrogenní aktivitě jsou přírodní hormony a účinné látky hormonální antikoncepce (Ting, 2017; Salste, 2007; Desbrow, 1998). Žádné z těchto látek v Evropské unii dosud nepodléhají legislativním opatřením a nejsou pro ně stanoveny limity (Wangmo, 2018). S úmyslem snížení rizik jsou prokázané syntetické disruptory nahrazovány novými analogy, které se však často projevují stejnými účinky (Caballero-Casero, 2016; Žalmanová, 2016).

Zásadním zdrojem endokrinních disruptorů v životním prostředí jsou odtoky z čistíren odpadních vod. Účinnost odstranění polutantů se při nejčastěji využívané mechanicko-biologické technologii jen výjimečně blíží 100 % (Ahmed, 2017; Jarošová, 2014a). To v důsledku znamená expozici volně žijících živočichů a expanzi rizika i na oblast úpravy pitných vod. Není vyloučeno, že kvůli nedostatečnému odstraňování endokrinních disruptorů budou hormonální aktivity prostředí neustále vzrůstat (Yang, 2014; Lim, 2017). Pro člověka je významným zdrojem též potrava (Giulivo, 2016). Z populačních studií zatím nevplývají jasné kauzality mezi výskytem disruptorů a některým z onemocnění (Sifakis, 2017; Rubin, 2011). Často jsou ale pozorovány korelace, na základě kterých byl pro státy Evropské Unie vyčíslen odhad nákladů na léčbu a prevenci nemocí spojených s EDs na 1,28 % HDP (Attina, 2016).

Z hlediska hodnocení rizik pro životní prostředí je důležité znát, jaký efekt vyvolají látky přítomné ve směsích. I když se ve vzorku nevyskytuje žádná látka v množství, které indukuje estrogenní aktivitu, při jejich vzájemné kombinaci nemusí být celkový efekt zanedbatelný (Schlotz, 2017; Silva, 2002). Aby nedocházelo k podhodnocování účinku látek, musí být sledovány celé směsi, které na organismy v prostředí působí.

Každá látka se liší svou afinitou ke konkrétnímu receptoru a vyskytuje se v různých koncentracích, což má zásadní vliv na celkový efekt (Yang, 2014; Ezechiáš, 2016a). K odhadnutí celkového efektu směsných vzorků slouží matematické modely vycházející z chování jednotlivých látek. Cílem této práce je ověřit přesnost predikce těchto modelů a jejich aplikace na reálné vzorky odtoků z čistíren za použití ekotoxikologických testů s GMO kvasinkami, preparativních a chromatografických metod.

2 Teoretický úvod

2.1 Endokrinní disruptory

Jedná se obvykle o látky ze skupiny mikropolutantů, které jsou strukturně velice odlišné. Patří mezi ně farmaka a produkty osobní péče (PPCPs; zubní pasty, deodoranty, hydratační krémy a další kosmetika, líčidla), průmyslové chemikálie, nedovolené drogy, pesticidy a v neposlední řadě i přírodní steroidní hormony, fytohormony, některé syntetické látky ovlivňující hormonální systém (Luo, 2014) a některé metabolity zmíněných skupin (Solé, 2000). Společným rysem je jejich výskyt v relativně nízkých koncentracích (ng/L – µg/L) avšak v rozsáhlé škále matric (Luo, 2014). Pro velice hrubou představu, kde bude převládat výskyt polutantu a kde ho tedy vzorkovat s nejvyšší výtěžností lze použít rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (K_{ow}). Látky s $\log K_{ow} < 1,5$ budou spíše rozpuštěné a látky s $\log K_{ow} > 3$ spíše podléhají sorpci (Dougherty, 2010). Celková estrogenní aktivita například signifikantně pozitivně korelovala s obsahem organických látek (TOC), což by mohlo nasvědčovat adsorpci estrogenně aktivních látek na sediment¹ (Wang, 2011). Některé z EDs jsou perzistentní: 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (DDT) a dioxiny; a jiné setrvávají v prostředí krátce: ftaláty, bisfenol A. Jejich všudypřítomnost je příčinou neustálé expozice organismů včetně lidí. Nejcitlivější jsou těhotné ženy a děti (Giulivo, 2016). Přes nízké koncentrace jednotlivých komponent může jejich směs vyvolat měřitelnou potažmo biologicky relevantní odezvu (Silva, 2002).

Již v roce 1996 se konala konference ve Weybridge o endokrinních disruptorech. Zde byl jasně definován termín endokrinní disruptor a potenciální endokrinní disruptor: „Endokrinní disruptor je exogenní látka, která nepříznivě působí na zdraví intaktního organismu nebo jeho potomstva následkem sekundárních změn v endokrinním systému“ (Andersson, 2012). V současnosti je používán spíše pojem chemikálie narušující endokrinní systém (EDCs), což jsou exogenní chemické látky či směsi zasahující do hormonálních dějů zodpovědných za udržování homeostázy a za regulaci vývojových procesů (Sifakis, 2017). Termíny jsou používány významově téměř paralelně. Endokrinní disruptory jsou řazeny i do skupiny tzv. emerging contaminants (ECs), což jsou primárně syntetické organické sloučeniny nepodléhající zákonným regulacím s rizikem škodlivého efektu v životním prostředí (Ahmed, 2017).

Zpráva z Weybridge 15+ (1996 – 2011) uvádí, že kvalita spermatu je narušena až u 40 % mužů z některých zemí EU a poškození endokrinního systému je sledováno i u volně žijících druhů zejména v prostředí, které je kontaminováno každodenně užívanými chemikáliemi. Zpráva vychází z do té doby

¹ Podmínky jako celkový obsah uhlíku (TOC) a jílových částic ovlivňují adsorpci hydrofobních látek na sediment (Wang, 2011).

publikovaných vědeckých prací a shrnuje hlavní body pro další výzkum (Andersson, 2012). První náznaky budoucích legislativních opatření nastínila US EPA v tzv. kandidátním seznamu kontaminantů pro pitnou vodu (CCL) a dalších regulačních stanovení² (US EPA, 2018). Zatím nebyla vytvořena žádná regulace v podobě limitů pro koncentrace silných estrogenně aktivních látek v povrchové ani pitné vodě (Wangmo, 2018).

Princip působení EDCs, díky kterému jsou zodpovědné především za reprodukční a vývojové změny, je interference s hormony. Mohou vyvolat nebo inhibovat reakci hormonálního systému, pak hovoříme o agonistech, resp. antagonistech (Zava, 1997). V mnoha *in vitro* studiích byl prokázán vliv jednotlivých polutantů na konkrétní mechanismy (Ezechiáš, 2016a; Jarošová, 2014b; Takayanagi, 2006). Kromě přímé aktivace receptorů mohou také narušovat syntézu hormonů, inhibici nebo aktivaci metabolických enzymů atd. (Giulivo, 2016). S vývojem molekulární biologie se ukázalo, že narušení některými xenobiotiky se může projevovat změnami v buněčném cyklu, apoptických drahách nebo epigenetických regulačních mechanismech sledované buňky. Příklad konkrétních látek a jejich působení: endosulfan (soutěží o receptorová místa), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD – inhibice syntézy hormonů), ftaláty (inhibice konkrétních enzymů) nebo organofosfátová hnojiva (vliv na cytochrom P450) (Sifakis, 2017).

Jedna látka někdy interaguje i s více hormonálními drahami a nebo je její účinek duální v závislosti na dalších přítomných agens (Adams, 1998; Pop, 2014). Například DDT se projevuje jako agonista estrogenního receptoru, zatímco jeho metabolit je antiandrogen. BPA je antagonist thyroideálních hormonů štítné žlázy a zároveň je estrogenně a androgenně aktivní (Sifakis, 2017).

Epidemiologické studie zaměřené na lidské zdraví, jež cílí na prokázání vztahu mezi expozicí EDCs a poruchami jako je infertilita a problémy s početím, endometrióza, rakovina prsu a varlat, obezita, malformace genitálií a snižující se kvalita spermatu, nemají jednotné závěry. Přímou kauzalitu mezi zmíněnými poruchami a expozicí specifickými toxikanty se prozatím nepodařilo v lidské populaci jednoznačně prokázat. Z celkového závěru však vyplývá, že je zde pozitivní souvislost mezi expozicí některými EDCs a poruchami reprodukčního systému a vývoje člověka (Sifakis, 2017; Rubin, 2011). Existují například korelativní studie, mezi výskytem EDCs a zvýšenou incidencí diabetes, obezity, rakoviny, narušení homeostázy, poruchy reprodukčních orgánů, rezistenci vůči inzulínu, spontánními potraty a posunutím počátku puberty pozorovaného zvláště v rozvinutých zemích (Giulivo, 2016; Rubin, 2011).

² Zatím se jedná pouze o seznamy látek, které by bylo vhodné sledovat a které bude možná do budoucna nutné regulovat. Na listě č. 3 (CCL3) se vyskytují jak steroidní hormony, tak syntetické látky jako menastrol apod.

Náklady vynaložené na léčbu a prevenci onemocnění spojovaných s EDCs byly pomocí metody Monte Carlo vyčísleny na 1,28 % HDP pro EU a na 2,33 % HDP pro USA. Příčina rozdílů dle autorů spočívá v odlišné legislativě z hlediska restrikce používání určitých skupin látek. Z porovnání zákonných opatření vyplývá, že lidé v USA jsou pravděpodobně více exponováni polybromovanými difenylethery, v EU je zátěž způsobena zejména organofosfátovými pesticidy a ftaláty (Attina, 2016).

Identifikace a hodnocení rizik je obecně pro EDCs velmi obtížné (Giulivo, 2016). Rozpory v epidemiologických studiích mohou být vyvolány například rozdíly v délce expozice a nebo tzv. efektem malých dávek (low-dose effect), který je v souvislosti s některými EDCs popisován. Látky mohou působit i ve velmi nízkých koncentracích (stejně jako endogenní hormony) a pozorované účinky nelze předpovědět pomocí účinků ve vysokých dávkách (Vandenberg, 2012). Zjištění vyvrací představu, že účinky, které se objeví při vysokých úrovních expozice, se nevyskytnou ani při nízké expoziční úrovni. To se projeví na nemonotonním průběhu křivky dávka-odpověď (Andersson, 2012; Welshons, 2003). Zatímco vysoké koncentrace některých chemikálií jsou příčinou ztráty váhy, nízké koncentrace mohou vyvolávat obezitu (Baillie-Hamilton, 2002). Perinatální³ expozice myši diethylstilbestrolem (DES) způsobila obezitu dospělců. Lze tedy hledat příčinnou souvislost chorob dospělé populace s expozicí v době prenatální a neonatální (Newbold, 2009).

Jedním z převažujících sekundárních zdrojů mikropolutantů v životním prostředí jsou odtoky z městských a průmyslových čistíren odpadních vod (ČOV). Nedostatečné přečišťování městských odpadních vod v kombinaci s perzistencí a neustálým přítokem mikropolutantů vede ke kontaminaci povrchových vod. V důsledku jsou pak ohroženy volně žijící druhy a tento problém se přesouvá do oblasti úpravy pitné vody (Luo, 2014; Kasprzyk-Hordern, 2009; Liu, 2009; Lintemann, 2003; Chevolleau, 2016). Důležitým zdrojem EDCs pro člověka je často také potrava, hygienické přípravky (např. parabeny) atd. (Giulivo, 2016). Množství detekovaných polutantů v některých případech koreluje s jejich produkcí a spotřebou (Kasprzyk-Hordern, 2009). Procentuální odstranění se mimo jiné odvíjí od aplikované technologie čištění vod a vlastnostech polutantu (Luo, 2014; Liu, 2009; Ahmed, 2017). Konečná koncentrace EDCs v přečištěných vodách je ovlivněna koeficientem naředění v recipientu (Jarošová, 2014b; Jálková, 2013; Wang, 2011) a sorpcí na pevné částice. Některé zdroje uvádějí, že tyto procesy jsou v toku důležitější než samotná biodegradace. Proto jsou v tomto ohledu důležité i klimatické podmínky, především množství srážek (Yu, 2011). To je vhodné zohlednit při odběru reálných vzorků. Není vyloučeno, že celková zamořenost prostředí EDCs se v průběhu let zvláště na některých lokalitách zvyšuje (Lim, 2017).

³ Období před porodem a těsně po porodu.

Často studované látky vykazující endokrinní disruptivitu jsou shrnuty v Tabulce 1. Uvedeny jsou koncentrace na přítocích a odtocích z ČOV, K_{ow} , podle kterého lze zhruba odvodit chování látky v prostředí a typy receptorů, na které působí.

Tabulka 1: Výčet některých EDs, které působí narušení na různých hormonálních drahách (AR^4 – androgenní receptor, ER^5 – estrogenní receptor a TR – thyroidní receptor), a jejich výskyt v odpadních vodách. Dalšími disruptory narušujícími estrogenní dráhu jsou například: propyl paraben, benzyl butyl ftalát, oxybenzon, fenhexamid, fludioxonil, cyprodinil, penconazole, matairesinol, thymol, kaempferol, β -sitosterol, polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany, metabolity polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) a určité kongenery polychlorovaných bifenyliů (PCB). Androgenní dráhu ovlivňují také například: chloropyren, oxybenzon, apigenin, flavon, 17 β -trenbolon, 17 α -trenbolon, tributyl cín, indomethacin a další. Cypermetrin, triallat, některé ftaláty a malathion narušují thyroidní dráhu. Na arylhydrokarbon receptor (AhR) se má vliv 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, některé kongenery PCB, galagin a diindolymethan (zdroje [1 – 25]). ND značí, že látka nebyla ve vzorku detekována. Látky p,p'-DDD a p,p'-DDE jsou degradační produkty p,p'-DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl) ethan).

využití	název	přítok [$\mu\text{g/L}$]	odtok [$\mu\text{g/L}$]	K_{ow}	typ disrupce	reference
LÉČIVA						
analgetika a protizánětlivá léčiva	aspirin	1,32–5,45	<3x10 ⁻³ –0,07		AR	10, 11
	diclofenac	<1x10 ⁻³ –94,20	<1x10 ⁻³ –0,69	0,70	ER, AR	16, 25, 3
	ibuprofen	<4x10 ⁻³ –603	ND–55	3,97	ER, AR	16, 25, 10, 3
	ketoprofen	<4x10 ⁻³ –8,56	<3x10 ⁻³ –3,92		AR, ER	16, 3
	mefenamová kyselina	<1,7x10 ⁻² –1,27	<5x10 ⁻³ –0,39		TR	16, 10, 5
	naproxen	<2x10 ⁻³ –52,90	<2x10 ⁻³ –5,09	3,18	AR, ER	16, 25, 3
	paracetamol	108,38–246,64	<0,08–1,58		AR, ER	11, 10, 8
antilipidemika	kyselina klofibrová	ND–0,74	ND–0,33		ER	16, 3
	bezafibrát	0,05–1,39	0,03–0,67		ER	16, 24, 8
antibiotika	erythromycin	0,14–10,00	0,02–2,84	3,06	ER	16, 25, 8
Produkty denní potřeby (PCPs)						
dezinficiencia	triclosan (irgasan)	0,03–23,90	0,01–6,88	4,76	TR, ER, AR	16, 25, 9, 18
STEROIDNÍ HORMONY						
přírodní	estron	ND–0,17	ND–0,15	3,13	ER	16, 13, 25
	17 β -estradiol	ND–0,05	ND–7x10 ⁻³	4,01	ER	16, 13, 25
	estriol	0,13–0,80	ND	2,45	ER	16, 13, 25
	testosteron	ND–0,14	ND–0,02	3,32	AR	13, 25, 14
	androsteron	<1x10 ⁻³ –2,40	ND–0,03	3,69	AR	13, 14
	androstenedion	0,02–1,0	ND	2,75	AR	25, 14
	progesteron	ND–0,01	ND–4x10 ⁻⁴	3,87	ER	13, 25, 14, 26
syntetické	17 α -ethinylestradiol	<1x10 ⁻³ – 3x10 ⁻³	ND–2x10 ⁻³	3,67	ER	16
	mestranol		0,04		ER	13
	diethylstilbestrol			5,07	ER	13
SURFAKTANTY						
	nonylfenol	<0,03–101,60	<0,03–7,80	4,17– 5,99	ER, AR	16, 13, 18
	oktylfenol	<0,20–8,70	4x10 ⁻³ –1,30	3,90– 5,50	ER	16

⁴ Další disruptory androgenní hormonální dráhy jsou uvedeny v databázi PubChem dostupné z:

<https://jcheminf.springeropen.com/articles/10.1186/s13321-016-0150-6>.

⁵ Další disruptory estrogenní hormonální dráhy jsou uvedeny v databázi US EPA dostupné z:

<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-estrogen-receptor-bioactivity>.

PRŮMYSLOVÉ CHEMIKÁLIE						
plasticizéry	bisfenol A	<0,01–2,14	<0,03–1,10	2,50–3,20	ER, TR, AR	16, 13, 20, 23, 18
	dibutyl ftalát	ND–11,80	ND–4,13		ER	16, 23, 12
aditiva	PCB	spíš na sedimentu		4,5–10,00	ER, TR, AR	13
PESTICIDY						
herbicidy	atrazin	0,02–28,00	4×10^{-3} –0,73	2,61	TR	16, 13, 25, 5
	diuron	0,03–1,96	2×10^{-3} –2,53	2,68	TR	16, 13, 5
	linuron			3,20	AR	13
insekticidy	diazinon	$<6,84 \times 10^{-1}$	7×10^{-4} –4,16		potenciální ED	13, 16
	methoxychlor			4,68	ER	13, 25
	p,p'-DDT	ND	ND	6,02	ER, TR	13, 25, 26, 5, 19, 22
	p,p'-DDD	ND–20	ND–2	5,86	potenciální ED	13, 25, 22
	p,p'-DDE	121,0–2250	550–21	5,76	TR	13, 25, 26, 5, 22
fungicidy	clotrimazol	0,01–0,08	$ND-5 \times 10^{-3}$		potenciální ED	16
	hexachlorbenzen (α , β , γ , δ)			3,72–4,14	ER, TR	25, 26, 5
	tebuconazol	ND–1,89	5×10^{-4} –0,69		potenciální ED	16
FYTOESTROGENY						
	daidzein	0,02–12,00	ND–0,08		ER	14, 15
	genistein	0,01–13,10	0,00–10,10	2,84	ER, AR	14, 15
	kumestrol	$0,01-2,3 \times 10^{-3}$	ND–0,02		ER	14

2.2 Estrogenně aktivní látky

Látky můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich původu. Mezi přírodní estrogény patří steroidní ženské hormony estron (E1), 17β -estradiol (E2)⁶ a estriol (E3)⁷, fytoestrogény (např. genistein, kumestrol a kumarol) a mykoestrogény (zearalenony). Těmto endogenním látkám jsou organismy vystavovány po celou dobu evoluce. Zatímco druhá skupina syntetických estrogenně působících látek se do životního prostředí začala uvolňovat až poměrně nedávno v podobě léčiv, antikoncepce, pesticidů, plasticizérů atd. (Zava, 1997). Dělení je možné provést i podle vztahu ke studovanému organismu. Pak mluvíme o endogenních a exogenních estrogenech (tzv. xenoestrogenech).

⁶ 17α -estradiol má nižší feminizační účinek (Moos, 2009).

⁷ Nejvíce estrogenů produkuje žena v průběhu těhotenství (Johnson, 2000).

Jednotlivé estrogenně aktivní látky se liší svou afinitou k receptoru; mají různou potenci. Stejná koncentrace dvou EDCs nemusí pro exponovaný organismus znamenat stejný efekt, a proto tyto látky znamenají rozdílné riziko pro životní prostředí. Většina exogenních hormonálně aktivních látek má menší relativní potenciál – vykazují nižší afinitu k danému typu receptoru – než endogenní hormony. I přesto, že například účinné látky léčiv (diclofenac, ketoprofen atd.) byly syntetizovány především jako bioaktivní molekuly (Ezechiáš, 2016a; Zava, 1997). Přes nízký potenciál xenoestrogenů, je při jejich sledování nutné uvažovat o možnostech bioakumulace v koncových orgánech a tukových tkáních a jejich perzistenci (Zava, 1997).

Potenciál látek vázat se na receptor je pro estrogenně působící látky popsán pomocí parametru estrogenní ekvivalentní faktor (EEF). Ten je vyjádřen podílem hodnoty EC_{50} dané látky vůči EC_{50} referenční látky, což je nejčastěji steroidní hormon 17β -estradiol. Hodnota EC_{50} je efektivní koncentrace, při které je dosaženo u 50-ti procent jedinců sledovaného efektu. EEF popisuje, kolikrát je látka méně toxická neboli účinná při vazbě na receptor. Hodnoty se liší v závislosti na testu (Jarošová, 2014b; Thorpe, 2006). EEF je někdy též označován jako relativní potenciál (Salste, 2007).

Vzhledem k potenciálu látek a jejich výskytu v efluentech z ČOV je často největší podíl estrogenní aktivity tvořen estronem, 17β -estradiolem, 17α -ethinylestradiolem a někdy též estriolem (Jarošová, 2014b; Thorpe, 2006; Aerni, 2004). Hojně je v efluentech detekován také méně účinný 4-nonylfenol a bisfenol A (Vandenberg, 2007; Rubin, 2011; Solé, 2000). Alkylfenoly jsou sice minimálně tisíckrát slabší než přírodní estrogény, ale zvláště v oblastech s textilním a koželužným průmyslem jsou jejich koncentrace tak vysoké, že mohou být hlavním zdrojem estrogenní aktivity. Koncentrace alkylfenolů korelovaly s indukcí vitelogeninu v odchycených kaprech obecných. Vitelogenin je žlutkový protein přirozeně produkován výhradně samicemi a jeho zvýšená hladina u samců je biomarkerem estrogenní disrupce (Solé, 2000). Oproti USA však v EU podléhají legislativním opatřením, což má v posledních letech za následek snížení jejich koncentrací v prostředí (Lim, 2017).

2.2.1 Přirozené steroidní hormony: mechanismus působení a výskyt v prostředí

Lidské steroidní hormony jsou odvozeny od cholesterolu a jsou tedy lipofilní. Kromě jiných mezi přírodní steroidní hormony patří tři skupiny pohlavních hormonů: progestageny (progesteron – prekursor pro vznik dalších dvou skupin), androgeny (testosteron a dihydrotestosteron) a estrogény (estron, 17β -estradiol a estriol). Ovlivňují transkripci specifických genů, čímž je zvyšována nebo inhibována biosyntéza specifických proteinů (např. enzymů) vedoucích k odpovědi příslušné hormonální dráhy. K tomu je zapotřebí intracelulárních receptorů specifických pro jednotlivé skupiny

hormonů (estrogenní, androgenní). Zatímco struktura hormonů je mezi jednotlivými skupinami podobná, struktura receptorů nikoli (Lintelmann, 2003).

Konkrétní průběh hormonální dráhy bude demonstrován na estrogenním receptoru (ER)⁸, mechanismus se příliš neliší od androgenů a progestagenů. Ženský pohlavní hormon je produkován gonádami a transportován pomocí transportního proteinu k cílovému orgánu či tkáni. Zde difúzně prochází přes cytoplasmatickou membránu a váže se na estrogenní receptor lokalizovaný v buněčném cytosolu. Následně se odpojí asociované proteiny (heat shock proteiny), které udržují receptor v inaktivním stavu, což je provázeno změnou konformace. Aktivní receptorový komplex se dále přesouvá do jádra, kde zformuje homodimér. Ten obsadí steroidní responzibilní element (specifický motiv deoxyribonukleové kyseliny – DNA), což vede až k represi nebo naopak aktivaci daného genu. U estrogenů je výsledkem například růst reprodukčních orgánů a mléčných žláz (Lintelmann, 2003).

Steroidní hormony se běžně vyskytují v odtocích z městských i průmyslových čistíren odpadních vod, není výjimkou ani jejich výskyt v podzemních a povrchových vodách (Liu, 2009). Riziko pro životní prostředí se odvíjí od celkového obsahu a účinnosti odstranění při čistírenských procesech.

V některých oblastech převažovaly estrogény, obzvláště estron a estriol, které se vyskytovaly v až o řád vyšších koncentracích než ostatní hormony (Kim, 2007; Salste, 2007). Podle čínské studie androgény tvořili až 96 % všech sledovaných přírodních a syntetických hormonů, po vyčištění stále tvořily 60 % všech hormonů. Procentuální odstranění androgenů dosahovalo někdy až 100% účinnosti, zatímco estrogény byly odstraněny v průměru s maximální účinností 80 % (Chang, 2011). Podobný trend v odstraňování potvrzuje Jáhlová (2013). Procentuální odstranění estrogenně aktivních látek se pohybovalo mezi 80 a 99 %, pro androgenní látky to bylo více jak 96 %. Estrogény ve své struktuře mají aromatické jádro, což je pravděpodobně činí odolnější vůči degradaci oproti ostatním pohlavním hormonům (Chang, 2011).

V důsledku znečištění estrogenně působícími látkami byly pozorovány změny v populačních parametrech živočichů (Jobling, 2006; Solé, 2000), také proto je na ně zacílen současný výzkum. Steroidní ženské hormony mají vysoký potenciál vázat se na estrogenní receptor a zároveň jsou hojně detekovány v environmentálních vzorcích (Conley, 2017; Salste, 2007; Desbrow, 1998).

⁸ Pro ER jsou rozlišeny subtypy ER α a ER β . Zdá se, že jsou skrze ně vyvolány rozdílné akce. U pohlavních hormonů nebyla objevena preference. Naříklad fytoestrogény dávají přednost ER β (Lintelmann, 2003).

2.2.2 Xenoestrogeny

Xenoestrogeny jsou širokou skupinou látek, kam patří estrogenně nebo antiestrogenně působící látky používané v hormonální antikoncepci, hojně průmyslově produkované chemikálie (fenoly a ftaláty), farmaka (diclofenac, ketoprofen) PCPs (triclosan), fytoestrogeny, mykoestrogeny a mnoho dalších.

V následujících kapitolách budou popsány vybrané xenoestrogeny. Syntetické hormony jsou jedny z nejsilnějších EDCs, fytoestrogeny jsou případem xenoestrogenů přírodního původu a bisfenol A je jednou z nejvíce produkováných a nejvíce studovaných chemikálií.

2.2.2.1 Syntetické hormony

Syntetické steroidní estrogény používané v antikoncepčních pilulkách se začaly vyrábět, protože přírodní hormony jako E2 nebo progesteron by bylo z důvodu rychlého metabolismu a následné exkrece nutné podávat pouze ve velmi vysokých dávkách. Jejich ethinylace nebo alkylace však zbrzdí či zastaví jejich metabolismus a vede k požadovanému efektu (Lintelmann, 2003). Tak vznikly například hojně využívaný mestranol (MeEE2) a 17 α -ethinylestradiolu (EE2), které jsou ve vodách méně rozpustné oproti přírodním estrogenním steroidům. EE2 je oproti přírodním estrogenům o jeden řád méně rozpustný, MeEE2 dokonce o dva (Ying, 2002). Právě EE2 je výjimkou mezi xenoestrogeny z hlediska afinity k estrogennímu receptoru. Váže se na ER téměř stejně účinně jako E2 (Ezechiáš, 2016a; Thorpe, 2006). Jejich výskyt v odpadních vodách je shrnut v Tabulce 1.

Bylo prokázáno, že koncentrace 17 α -ethinylestradiolu relevantní pro současný stav evropských povrchových vod mohou ovlivnit rybí reprodukci. Studie s organismem *Danio rerio* ukázala, že koncentrace v jednotkách ng/l vykazuje signifikantní snížení schopnosti oplodnění (Segner, 2003). Koncentrace 5–6 ng/L EE2 při dlouhodobé expozici rybí populace v experimentálním jezeru v severním Kanadě způsobila na tolik závažné změny v reprodukčních systémech samců a samic, které by vedly k vyhynutí populace (Kidd, 2007).

2.2.2.2 Fytoestrogeny

Hlavní skupinou rostlinných estrogenně působících látek jsou flavonoidy, kam patří isoflavonoidy jako například daidzein, genistein atd. Typicky se jedná o látky s fenolovou strukturou s primární funkcí ochrany rostlin proti UV záření a zeslabení aktivní složky viditelného záření. Látky jsou

v traktu savců transformovány na formy (enterodiol a enterolakton), které se mohou projevit estrogenní aktivitou (Lintelmann, 2003). Oproti xenoestrogenům mají výrazně kratší poločas rozpadu, ale mají často vyšší afinitu k estrogennímu receptoru (Zava, 1997). Jejich zvýšený příjem nastává například na monokulturních pastvinách, kde byla pozorována infertilita ovcí po konzumaci jetele. U jiných savců nebyl tento efekt pozorován (Adams, 1998).

Vysoký obsah fytoestrogenů je prokázán ve chmelu, běžných druzích koření a především sójových bobech a produktech z nich. U tří ze čtyř dobrovolníků byla do jedné hodiny po konzumaci sójového mléka obsahujícího velké množství genisteinu a daidzeinu pozorována zvýšená hodnota těchto estrogenů ve slinách. Vysoký příjem fytoestrogenů je vzhledem k surovinám spojován především s asijskými pokrmy (Zava, 1997).

Fytoestrogeny z potravin se neřídka vyskytují v lidské moči a následně se tedy dostávají i do čistíren odpadních vod. Zde nejsou zcela odstraněny a vzhledem k detekovatelnému množství a jejich příspěvkům k celkové estrogenní aktivitě vzorků, by neměly být opomenuty (Liu, 2010). Zvláště pak, pokud čistírna přijímá vody z agrárních oblastí, kde se pěstuje sója apod. (Jarošová, 2014a).

2.2.2.3 Bisfenol A

Bisfenol A (4,4-isopropylidenedifenol) je krystalická látka výhradně syntetického původu (Tsai, 2006). Je málo těkavý, středně rozpustný ve vodě (120 – 300 mg/l při pH=7) a může se adsorbovat na sedimenty. US EPA uvádí, že patří mezi perzistentní látky a zároveň, že jeho potenciál k bioakumulaci je nízký (EPA, 2010). Naopak v jiných studiích je uváděn vysoký potenciál k biokoncentraci (BCF > 998) (Wu, 2016). V játrech je rychle transformován na konjugáty jako BPA-glukuronid, čímž se zvýší jeho rozpustnost a možnost vyloučení močí. Není tedy příliš perzistentní zvláště v akvatických systémech (Staples, 1998; Tsai, 2006). Připravuje se kondenzací fenolu a acetonu (Kang, 2006). Je považován za toxický z hlediska reprodukce a vývoje (EPA, 2010). Vzhledem k jeho nepříznivým účinkům je v posledních letech nahrazován strukturně podobnými látkami jako bisfenol F a bisfenol S, které ale mohou na prostředí a lidské zdraví působit stejně nepříznivě a již byly detekovány v prostředí (Žalmanová, 2016; Caballero-Casero, 2016).

Váže se na ER β a ER α receptory (Vandenberg, 2007) a vykazuje 10⁴ krát nižší estrogenní aktivitu oproti E2 (Welshons, 2003). Má více cest působení, silně se váže i na estrogenní jaderný receptor ERR γ (Takayanagi, 2006). Interaguje také s androgenním (Lee, 2003), thyroïdním a glukokortikoidním receptorem (Sosovorova, 2017). Jedinci v prenatálním a novorozeneckém období jsou nejzranitelnější. Publikované účinky jsou například: posunutí puberty, změny v estrálním cyklu a vývoji mléčné žlázy,

změny v mozku a hladinách mozkových steroidních receptorů, změna tělesné hmotnosti a homeostázy atd. (Rubin, 2011). BPA podávaný těhotným potkanům sice neovlivňuje například poměr pohlaví v daném vrhu, ale prenatální expozice samců naruší diferenciaci Leydigových buněk⁹ (vliv na proliferaci a sekreci hormonů), což v konečném důsledku ovlivňuje vývoj varlat (Nanjappa, 2012). Na dospělých se chronická osmi týdenní expozice projevila poruchami DNA mozkových buněk, což by mohlo snížit schopnost učení a paměť (Zhou, 2017). Byly zaznamenány korelace mezi vysokými hladinami BPA a cukrovkou, kardiovaskulárními onemocněními, změnami hladin jaterních enzymů, opakovanými potraty, předčasnými porody, sníženou kvalitou spermatu a poškozením DNA spermií atd. Nejsou zatím prokázány kauzality (Rubin, 2011).

Díky svému komerčnímu a průmyslovému využití je produkován ve velkém množství (Tsai, 2006) a je považován za jednu z nejvíce vyráběných látek na světě (Vandenberg, 2010). Dle čínské studie byla v roce 2007 celosvětová produkce BPA 4,7 milionů tun a jeho spotřeba se rovnala 4,4 milionům tun (Jiao, 2008). Evropská Unie uvádí, že celkový objem výroby a využití mezi lety 2005 a 2006 v západní Evropě je 1,15 milionů tun BPA za rok (European Union, 2008). Za rok 2010 bylo vyprodukováno více než 3,6 milionů tun a více jak 100 tun bylo údajně uvolněno do atmosféry (Vandenberg, 2010).

Bisfenol A je součástí mnoha předmětů našeho každodenního života (Staples, 1998). Látka je polymerizována nejčastěji za vzniku epoxydových pryskyřic a polykarbonátového plastu (Welshons, 2006). Z celkové produkce v roce 2007 bylo 68 % použito na výrobu polykarbonátových a 28 % na výrobu epoxydových pryskyřic (Jiao, 2008). V Evropské Unii podléhá označování plastových výrobků podle typu materiálu směrnici 97/129/ES. Je obsažen v polyvinylchloridu (pracovní rukavice), termografickém papíru (účtenky) (European Union, 2008) a bromovaný BPA (tetrabromobisfenolu-A) se využívá jako zhasič hoření, který je obsažen například v textiliích (Meerts, 2001). Také se vyskytuje ve fenolformaldehydových pryskyřicích neboli fenoplastech, které se používají jako pojiva, lepidla, lamináty, bakelit a lisovací hmoty (European Union, 2008). Může ho obsahovat vodovodní potrubí nebo některé zubní výplně (Welshons, 2006). Polykarbonáty jsou součástí papírových a kartonových obalů na jídlo (Lopez-Espinosa, 2007). Používají se například pro výrobu některých dětských lahví nebo opakovaně použitelných lahví na nápoje a boxů na potraviny (Vandenberg, 2007), dále je mohou obsahovat kompaktní disky (CD a DVD), pneumatiky automobilů, sportovní ochranné pomůcky nebo některé dětské hračky (Staples, 1998). Přestože se na trhu v poslední době objevily tzv. BPA-free produkty, mnohé z nich stále představují riziko pro lidi i prostředí jako zdroj estrogenní aktivity (Bittner,

⁹ Buňky se nachází ve varlatech. Vyplňují intersticiální prostor mezi semenotvornými kanálky a produkují mužské pohlavní hormony, zejména testosteron.

2014). Z hlediska biodegradace se uvažuje o náhradě BPA v produktech za BPS nebo BPF, který by mohl představovat menší environmentální riziko (Ike, 2006).

Jak bylo zmíněno, používá se mimo jiné k přípravě epoxydových pryskyřic. Pro průmyslové účely se jako zdroj reaktivní epoxydové skupiny používá epichlorohydrin, který se substitučně vázán k dalším molekulám. Vznikají tak glycidylové skupiny. Nejčastější skupina epoxidových pryskyřic se skládá z glycidyletherů bisfenolu A. Tvrzené epoxidové pryskyřice jsou používány na vnitřním povrchu konzerv a plechovek, kde je vyžadována excelentní rezistence vůči hydrolytickým reakcím. Jejich nevýhodou je náchylnost aromatických éterových vazeb k fotooxidaci, nízká rezistence vůči UV záření (Meyer, 2005), vysokým teplotám a zásaditým podmínkám ve vnějším prostředí (EPA, 2010).

Nedostatečně polymerizovaná rezidua BPA se mohou vyluhovat do potravin a unikat do prostředí. Vyšší teplota nebo kyselé či bazické prostředí může vyluhování podpořit, i když proběhla úplná polymerizace (Huang, 2012). Vazby jsou za vysokých teplot náchylné k hydrolytickému ataku. Hydrolyza je urychlena při alkalickém pH a omezena při pH 5 a nižším (Krishnan, 1993). US EPA uvádí, že efekt hydrolyzy je v environmentálních podmínkách zanedbatelný, protože BPA neobsahuje reaktivní funkční skupiny (EPA, 2010).

Nezreagované epoxidové sloučeniny jsou považovány za toxické kvůli jejich alkylačním vlastnostem a BPA vykazuje již zmíněnou estrogenní aktivitu. Ve studii, zda se BPA vyluhuje z laku uvnitř konzerv, dosáhly některé hodnoty až 33 µg na jednu konzervu. Porovnáním s kontrolami vyloučilo vlivy jiných estrogenně aktivních látek. Ve všech vzorcích s prokázanou estrogenní aktivitou byl pomocí hmotnostního spektrometru detekován BPA. Estrogenní aktivitu vykazovala i čistá voda sterilizovaná v konzervách v autoklávu. BPA se z nich tedy uvolňuje pravděpodobně v důsledku sterilizačních procesů a závisí například na typu potraviny. Skladování pravděpodobně vede ke kumulaci (Brotons, 1995). Množství BPA koreluje například také s obsahem kofeinu v plechovkovém nápoji (Kang, 2002). U potravinových krabic je loužení zvýšeno mastnotou a teplotou jídel (Lopez-Espinosa, 2007). U pitné vody je očekávána zvýšená expozice během letních měsíců v důsledku vyšších teplot (Bae, 2002). Bisfenol A se oproti jiným estrogenním látkám jako je například E2 nebo 4-nonylfenol významně vyluhuje též ze skládek (Kawagoshi, 2003).

Významným zdrojem expozice pro lidi, kteří s ním nepřicházejí do styku během pracovní doby, jsou především potraviny a balené nápoje (Huang, 2012; Kang, 2006). Například ve Spojených státech je méně než 5 % produkce BPA spotřebováno na potravinové obaly a nádoby (EPA, 2010). Denní příjem BPA dle několika studií nepřekročil 1 µg/kg tělesné hmotnosti/den (Kang, 2006). V prosinci 2014 Evropský úřad pro bezpečnost potravin snížil tolerovanou denní dávku na 4 µg/kg tělesné hmotnosti/den (EFSA, 2016).

V čínském Guangzhou provedli třítydenní pokus, kde 12 studentů pilo první týden pouze balenou vodu z keramických hrnků a obsah BPA v moči byl 7,16 µg/g kreatinu. Druzí pili převařenou kohoutkovou vodu opět z keramických hrnků a obsah BPA signifikantně klesl na hodnotu 3,49 µg/g kreatinu. Následně pili převařenou kohoutkovou vodu výhradně z polykarbonátových lahví a obsah BPA se zvýšil na 4,15 µg/g kreatinu. V rámci této studie byla zjištěna průměrná koncentrace BPA v moči dětí 2,75 µg/g kreatinu, resp. 3,00 µg/l moči (Li, 2013).

BPA byl detekován ve 40 % vzorků plasmy mužů. Medián koncentrací BPA byl 0,09 ng/mL plazmy. Zde by ovšem bylo vhodné upozornit na třikrát větší koncentraci BPF (medián 0,28 ng/mL plazmy), celkově byl BPF detekován ve 45 % vzorků. To je zapříčiněno pravděpodobně restrikcemi BPA a jeho nahrazením právě BPF (Sosovorova, 2017).

Ve studii z Hong Kongu detekovali BPA a jeho glukuronidové a sulfátové konjugáty v krevní plasmě a moči. V 96 % vzorků krevní plasmy (geometrický průměr byl 0,53 ng/mL s maximem 19,69 ng/mL) a 99 % vzorků moči (geometrický průměr 0,24 µg/g kreatinu) byl detekován BPA. V moči byly naměřeny o tři řády vyšší koncentrace konjugátů (geometrický průměr 2,79 µg/g kreatinu) než v plasmě. Pouze u konjugátů byl statisticky významný rozdíl koncentrací v závislosti na pohlaví (Ho, 2017). Vysvětlení mohou být dvě – stimulace produkce testosteronu nebo potlačení metabolismu testosteronu v důsledku expozice bisfenolem A. Enzym zodpovědný za katalýzu vzniku glukuronidových konjugátů může být ovlivněn androgeny (Takeuchi, 2002).

Byla testována degradace BPA v přirozených podmínkách a ukazuje se, že jeho setrvání v prostředí je spíše krátkodobé (EPA, 2010). BPA byl přesto detekován ve vzorcích půdy a vody, vnitřního i venkovního vzduchu a prachu a přečištěných odpadních vodách (Vandenberg, 2007). V ČOV není plně odstraňován (Kang, 2006; Staples, 1998). BPA se rozkládá výrazně lépe v aerobních podmínkách. V říčních vodách jsou bakterie rozkládající BPA poměrně běžné a některé kmeny mají účinnost až 91 % (Kang, 2002). Poločas rozpadu je v řece v průměru 3–5 dní, to ale neznamená, že neprobíhá jeho bioakumulace v akvatických organismech (Kang, 2006). V čínské řece Xin'an bylo naměřeno 38,8 ng/L BPA a rybí žluč obsahovala 38,7 µg/L BPA (Wu, 2016). Ve vodě a sedimentu jezera Taihu se průměrná koncentrace rovnala 92,57 ng/L BPA (Liu, 2016).

Spotřeba elektroniky, automobilů, stavebního materiálu a komunikačních zařízení s obsahem BPA jsou hnací silou rostoucí poptávky po BPA v Číně. Rostoucí ekonomika vede k popularitě a dosažitelnosti balených nápojů, což může do budoucna znamenat i větší problém z hlediska efektů na populaci (Huang, 2012).

2.3 Výskyt estrogenních disruptorů v ČOV

V této kapitole bude podrobněji rozveden osud hlavních estrogenně aktivních látek v čistírnách odpadních vod. Doposud nejčastěji používaná metoda je mechanicko-biologické přečištění s využitím aktivovaného kalu. Někdy v kombinaci s nitrifikací a/nebo denitrifikací a chemickým vysrážením fosforu (Jarošová, 2014a). Na odtocích z čistíren bývá častěji detekován estron oproti jiným přírodním hormonům. E2 a EE2 ve vodách podléhají oxidaci na E1, který je zároveň v relativně vysokých koncentracích oproti ostatním estrogenům exkretován lidmi a hospodářskými zvířaty (Conley, 2017). Poločas transformačních procesů při teplotě 20 °C trvá až 9 dní (Lim, 2017). E1 pomalu degraduje na E3 (Chen, 2007). Vysoké koncentrace E2 oproti EE2 přímo na odtoku z ČOV nemusí znamenat expozici pro říční organismy, protože E2 může být v řece mineralizován. EE2 má navíc vyšší K_{ow} , proto snáze podléhá sorpci na kal a jeho koncentrace v odtoku se tím sníží (Ting, 2017).

Hlavní procesy, které se uplatňují při odstraňování estrogenů v konvenčních ČOV s aktivovaným kalem, jsou adsorpce na kal a biodegradace. Mechanismus biodegradace probíhá dekonjugací a následnou degradací heterotrofními bakteriemi. Rozmezí procentuálního odstranění se může pohybovat v řádu desítek procent (pro E3 od 18 do 100 %) (Lim, 2017). Degradace může vést k aktivaci látek, což může zvýšit biologickou aktivitu na výstupu z ČOV (Jálová, 2013). Maximálního odstranění v konvenčních čistírnách je většinou dosaženo pouze tehdy, pokud ČOV není na přítoku přetížena a pokud je retenční čas delší než 10 dní (Lim, 2017). Efektivita sorpce estrogenů na kal obvykle probíhá v této souslednosti $E2 > E1 > EE2 > E3$. Sorpce na kal je často považována za méně důležitou z hlediska odstranění. Je jí připisováno méně než 30 % z celkového množství odstraněných polutantů (Racz, 2010). Jedná se o exotermní proces, který nabývá na významu s klesající teplotou. Snížení rizika pro životní prostředí by mohlo být dosaženo integrací více přístupů (Lim, 2017). Základem hybridních systémů je často právě biologické čištění následované chemickými či fyzikálními procesy. Konkrétně použití aktivovaného kalu a ultrafiltrace nebo γ -záření se zdá být pro některé EDCs rentabilní oproti jiným hybridním systémům (Ahmed, 2017). Pro malé objemy odpadních vod je efektivní odstranění na aktivním uhlí nebo s pomocí oxidačního činidla (syntetický MnO_2 , $pH=4$). Ty by také bylo možné kombinovat s konvenčním mechanicko-biologickým čištěním (Lim, 2017). Podrobněji je účinnost odstranění čistírenskými technologiemi uvedena v Tabulce 2.

Jak bylo zmíněno výše: nedostatečné odstranění látek interagujících s estrogenním receptorem z odpadních vod ohrožuje volně žijící živočichy a přenáší tento problém na oblast úpravy pitné vody (Chen, 2007). V rozsáhlé studii na dvou řekách ve Velké Británii byla sledována sada látek – mimo jiné farmaka jako naproxen, ibuprofen, ketoprofen a diclofenac (Kasprzyk-Hordern, 2009), které patří mezi

Tabulka 2: Přehled čistírenských technologií a jejich účinnosti při odstranění EDCs. V prvním řádku je uvedena koncentrace na přítoku do čistírny [µg/L] a ve druhém je procentuální odstranění. Zkratky znamenají X pro mikrokosmos, Y pro mesokosmos, Z pro pilotní studii, M pro čistírnu. Dále AS pro aktivovaný kal, RO pro reverzní osmózu, MF pro mikrofiltraci, UF pro ultrafiltraci a NA pro nanofiltraci. Umělé mokřady (CW, z angl. constructed wetlands) je možné rozlišit podle směru průtoku vody (SF = surfaceflow, HF = horizontal flow a VF = vertical flow). E1 značí estron, E2 je 17β-estradiol, E3 je estriol a EE2 17α-ethinylestradiol. Upraveno podle (Ahmed, 2017).

Technologie	Androsteron	Bisphenol A	Diclofenac	E1	E2	E3	EE2	Ibuprofen	Ketoprofen	Naproxen	Nonylfenol	Oktylfenol	Progesteron	Triclosan
biologické metody	nádrž (řasy)		0,03-2,16	1	1		1	0,03-2,16	0,03-2,16	0,03-2,16				0,03-2,16
	houbový reaktor		0,01-0,21					0,01-0,21	0,01-0,21	0,01-0,21				70
	mikroskopické řasy		0,0-2,4					0,0-9	0,0-2,4	0,0-2,4		0,0-2,4		0,0-2,4
biosorpce	živé houby		85	92				99	95	89		93		95
	inaktivované houby		50	50	50	50	50	50	100					50
			65	97	72	61	5	62	100					79
membránový bioreaktor (MBR)			1,50; 2,10	50	50	50	1,50; 2,10	50	50					50
			1,24; 2,59	43	32	30	13	1,38; 2,76	27					97
		2	5	5; 1,1	5	5	5	5	5					99
umělé mokřady	umělé mokřady		0,05-0,3	0,003-12,8	0,39-10,5	1,35-9,05	0,59-6,56	0,04-56,5	2,10-0,70	0,3-4,3				99,1-90,2
	HF CW		80-100	80-100	67,8-95,8	84-99	75,3-94	71-96	97-98	50-100				
			Z, 0,1-56	Y, 25				X, 1000	Y, 25	Y, 25	Y, 25			
			Z, 99	Y, 55				X, 82-96	Y, 95	Y, 91				
pokročilé oxidační procesy (AOPs)	VF CW		M, 4,06	Z, 0,48-64	0,39-1,00	0,39-1,00	X, 0,39-1,00	Z, 0,48-64		Z, 0,48-64				5
			M, 47,78	Z, 53-73	X, 68	X, 84	X, 75	Z, 55-99		Z, 62-89				
	SFCW		1	X, 2-3				X, 2-3	0,20-64,90	X, 2-3				
agamma radiace			100	X, 99,00				X, 44-77	Y, 00-95	X, 40-53				
			1	5				5		7				90
			85	90				90		98				90
hybridní systémy	MBR + UF		5		5	5	5				5			5
			99		99	100	98	96			97			99
	MBR + RO		5		5	5	5	5			5			5
flokulanty + AS + UF			91		100	99	96	94			100			99
			1		0	0	0	0			15			1
			95		96	97	95	95			97			98
MBR+NF			5		5	5	5	5			5			5
			89			99	98	94			97			99

antiestrogeny (Ezechiáš, 2016a). Ty byly detekovány jak na přítocích a odtocích z ČOV, tak v povrchových vodách v environmentálně relevantních koncentracích jednotek $\mu\text{g/L}$.

To je zapříčiněno právě jejich částečným odstraněním během čistírenských procesů (v jednom případě se jednalo o aktivovaný kal a ve druhém o skrápěné filtrační lože s biofilmem). Zde byl aktivovaný kal u všech látek účinnější, přesto například pro naproxen a ketoprofen odstranění nepřesáhlo 74 % (Kasprzyk-Hordern, 2009). Účinnost aktivovaného kalu je vyšší oproti účinnosti biologických filtrů, což je pravděpodobně způsobeno delším hydraulickým retenčním časem v nádrži s aktivovaným kalem. Doba setrvání vody v nádrži s aktivovaným kalem či na loži s biofiltrem je zásadní pro míru odstranění EDCs (Lim, 2017).

2.4 Stanovení estrogenně aktivních látek

Existují dva hlavní přístupy jak stanovovat estrogenně působící látky a celkovou aktivitu. K hodnocení environmentálního vzorku je možné přistupovat pomocí analytických metod nebo ekotoxikologických testů na živých organismech. Oba tyto postupy se vzájemně vyrovnají svou citlivostí (Wangmo, 2018). Analytické stanovení je vhodné pro kvantitativní a kvalitativní analýzu známých látek. Kdežto pomocí biotestů je možné určit celkovou aktivitu vzorku. Ve druhém případě je ještě vhodné zvážit, zda použít *in vitro* či *in vivo* testy. Podle zvolené metody následně pak správně zvážit relevanci pro ekosystém (Thorpe, 2006; Conley, 2017). Je obecně známo, že *in vitro* testy neposkytují informace o osudu látky v prostředí a bioakumulaci v organismech (Zava, 1997; Thorpe, 2006; Giulivo, 2016). *In vivo* testy jsou dražší a jsou diskutabilní z hlediska etiky (Wangmo, 2018). Na základě výsledků analytických metod lze uvažovat predikce pomocí matematických modelů, kterým bude věnována samostatná kapitola.

Stanovení oběma přístupy má své limitace. Biotesty nejsou vždy dostatečně citlivé a u chromatografické analýzy může interference s maticí zamezit přesné kvantifikaci analytů. Zatím neexistuje celosvětově uznávaný standard pro determinaci estrogenních sloučenin analytickými metodami. Liší se extrakční metody i koncové analýzy (Lim, 2017). Navíc látky, které samostatně nevykazují žádný nebo jen malý efekt, se mohou ve směsi projevit estrogenní aktivitou. Testována byla například směs, kde komponenty byly pod jejich EC_{01} nebo pod hodnotou koncentrace, kdy nebyly pozorovány nepříznivé účinky (NOEC). Výsledkem byla signifikantní estrogenní aktivita oproti pozadí (Silva, 2002; Schlotz, 2017; Kortenkamp, 1999).

Nejrelevantnější s ohledem na celkový efekt vzorku se zdají být *in situ* a *in vivo* testy, které jsou zároveň nejdražší a vyžadují vhodnou živočišnou kulturu. Předpokládané koncentrace, kdy nebudou

pozorovány škodlivé účinky (PNEC) v *in vitro* testech nemohou být totiž považovány za relevantní *in vivo* (Jarošová, 2014b).

Jako výsledek ekotoxikologických testů se pro vyjádření množství celkové estrogenní aktivity bez zacílení na konkrétní látky používá tzv. 17β-estradiol ekvivalent. Ten lépe slouží pro porovnání výsledků z jednotlivých lokalit a jeho výpočet vychází z předpisu pro logistickou křivku (Jarošová, 2014b). Světová zdravotnická organizace (WHO) ve spolupráci s Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) v roce 2000 stanovila přijatelnou denní dávku (ADI) EEQ na jednotku tělesné hmotnosti člověka na 0-50 ng/kg.den (WHO, 2018). Předpis logistické křivky je následující:

$$E_{mix} = \frac{\text{minimum}_{E2} - \text{maximum}_{E2}}{1 + \left(\frac{EEQ}{EC_{50E2}}\right)^{p_{E2}}} + \text{maximum}_{E2},$$

kde E_{mix} značí efekt směsi látek, EC_{50E2} značí inflexní bod křivky dávka-odpověď pro 17β-estradiol a minimum_{E2} , resp. maximum_{E2} značí minimum, resp. maximum křivky dávka-odpověď pro 17β-estradiol.

Pokud máme směsi o známém složení, můžeme uvažovat o zjištění příspěvku jedné látky k celkové estrogenní aktivitě směsi (Jarošová, 2014b; Ezechiáš, 2016b) dle následující rovnice.

$$EEQ = ([E1] \times EEF_{E1}) + ([E2] \times EEF_{E2}) + ([E3] \times EEF_{E3}) + ([EE2] \times EEF_{EE2}),$$

kde EEQ značí celkovou estrogenní aktivitu, [E1 – EE2] je koncentrace látek E1 – EE2 a EEF_x je Estrogenic Equivalency Factor.

2.4.1 Případové studie porovnání metodických přístupů

V celoevropské studii byla pomocí *in vitro* testů asi u třetiny vzorků odtoků z čistíren odpadních vod zjištěna vyšší odezva než 0,5 ng/L EEQ (v rozmezí 0,5 – 17,9 ng/L). Zatímco při měření analytickými metodami se žádný ze steroidních hormonů nevyskytoval nad limitem detekce (LOD) 10 ng/L. Byla proto hledána korelace mezi zjištěným EEQ a výskytem jednotlivých skupin látek jako jsou farmaka, zřehče hoření, pesticidy a jejich metabolity atd. Žádná korelace mezi sumou koncentrací polutantů a EEQ nebyla nalezena. To indikuje potřebu používání bioanalytických přístupů ruku v ruce spolu s chemickými analýzami. *In vitro* a *in vivo* biotesty však mívají různou citlivost, což vyžaduje jejich standardizaci, aby mohly být využity jako nástroj monitoringu (Jarošová, 2014a).

Ve 20 z 25 vzorků pitných vod z USA nebyly žádné estrogény včetně EE2 detekovány za použití analytických metod. Po přečištění na pitnou vodu nebyl překročen detekční limit u žádného vzorku.

V 5-ti vzorcích nepřečištěných vod se vyskytoval pouze estron. Výsledky z kapalinové chromatografie se však zcela neshodovaly s výsledky z *in vitro* testů. Ze 24 vzorků byla estrogení aktivita změřena u 16 vzorků zdrojových vod a u 3 vzorků přečištěných pitných vod. Redukce estrogenů přečištěním na pitnou vodu byla signifikantní, ale nepřekročila 84 %. Pro vzorky bylo doporučeno kromě analytických metod aplikovat i *in vitro* testy. Především v případě, že očekáváme neznámé EDCs (Conley, 2017).

Ve dvou kompositních vzorcích z finské ČOV byly za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC–MS/MS) sledovány estrogení hormony a EE2. Kromě estronu, který se vyskytoval v koncentracích vyšších než 60 ng/L (odpovídá přibližně 6,5 ng/L EEQ), byly všechny analyty pod limitem kvantifikace (desetiny až jednotky ng/L). Největší příspěvek k celkové estrogení aktivitě byl tedy připisován estronu. Před *in vitro* testem byly vzorky podrobeny preparativní kapalinové chromatografii a některé frakce pak vykázaly při testu aktivitu až 125 ng/L EEQ (Salste, 2007).

Další nesrovnalosti mohou vyvstat při extrapolaci efektů z *in vitro* na testy *in vivo*. Při testování vzorků, které na kvasinkách vykazovaly pozitivní estrogení aktivitu, indukce vitelogeninu neproběhla. Což značí, že efekt vyvolaný danou koncentrací v *in vitro* testech se nemusí nutně prokázat *in vivo*. Predikce účinku v ekosystému je tedy o to složitější (Aerni, 2004). Výsledky z *in vitro* a *in vivo* testů se někdy liší jen rozsahem hodnot (Wehmas, 2011).

2.5 Predikce účinku a empirická data

Jedna z nejdůležitějších aplikací predikcí účinku je hodnocení směsných vzorků. V životním prostředí jsou organismy včetně člověka vždy vystaveny více xenobiotikům, která je mohou ovlivňovat i ve velmi nízkých koncentracích. Environmentálně relevantní je tedy sledování expozice směsí estrogeně aktivních látek (Howard, 2009; Schlotz, 2017). I v případě, že se látky jednotlivě nevyskytují nad hodnotami NOEC, EC₀₁ nebo v dávkách, při kterých nebyl pozorován škodlivý účinek (NOAEL) (Silva, 2002; Seeger, 2016; Kortenkamp, 1999; Ghisari, 2009).

Další aplikace modelů navazuje na údaje z předchozí kapitoly. Data získaná z ekotoxikologických testů a analytických metod se mezi sebou často liší. Z dosavadních výsledků vyvstává otázka, zda je tomu tak z důvodů instrumentálních (rozdíly ve výtěžnosti při extrakčních postupech, omezená detekce a kvantifikace analytů atd.), dochází k interakci mezi látkami nebo se v prostředí vyskytují estrogeně aktivní látky, na které zatím není cílená detekce analytickými metodami. K řešení tohoto problému by mohlo přispět právě matematické modelování účinku směsných vzorků.

Nejprve je třeba se ujistit, že existuje spolehlivý model pro predikci efektu. Pak by porovnáním výsledků z ekotoxikologických testů a predikcí založených na analytických datech bylo možné zjistit, zda se v reálném vzorku vyskytuje ještě nějaká další estrogeně nebo antiestrogeně působící látka. Pokud například predikce podhodnotí odpovědi z ekotoxikologických testů, bude zřejmé, že jsou ve směsi přítomny další estrogény. S použitím frakcionačních metod a necílené kvalitativní analýzy lze odhadnout, která konkrétní látka je zodpovědná za estrogení aktivitu v reálném vzorku (Desbrow, 1998).

2.5.1 Koncept křivky dávka-odpověď

Matematické predikce se opírají o koncept křivky dávka-odpověď (z angl. dose-response curve). Nejrozšířenější vyjádření vztahu mezi koncentrací a účinkem v *in vitro* testech s endokrinními disruptory je v současnosti založeno na sigmoidální (logistické) závislosti. Ta je do grafu vynesena jako efekt neboli účinek závislý na logaritmu dávky či koncentrace (Lagarde, 2015; Ezechiáš, 2016a; Jálová, 2013; Zava, 1997; Schlotz, 2017). Logistická závislost (s parametry: minimum, maximum, směrnice a inflexní bod = EC_{50}) je též typická při popisu populační dynamiky, enzymatické kinetiky nebo titračních analýz (Schindler, 2017). Komplikace při predikci mohou vyvstat, pokud se ve směsi vyskytují antiestrogení látky, které prozatím nejsou součástí predikčních modelů (Schindler, 2017; Ezechiáš, 2016b; Howard, 2009). Nebo pokud nemohou být například z důvodu omezené rozpustnosti změřeny křivky jednotlivých substancí (Schlotz, 2017).

Koncept křivky dávka-odpověď lze aplikovat na více úrovních. Lze sledovat například vztah mezi dávkou a obsazením receptoru nebo mezi dávkou a odpovědí celého organismu. Je třeba brát v potaz, že vztah mezi koncentrací v prostředí a odpovědí buňky, potažmo organismu ovlivňuje mnoho faktorů. Těmi jsou například vstup látky do organismu a následně příjem buňkou, distribuce a transport v plasmě, metabolismus, afinita ke specifickému subtypu receptoru atd. To je třeba zohlednit při interpretaci výsledků dané křivky (Welshons, 2003).

V posledních letech jsou publikované i případy tzv. nemonotónní křivky dávka-odpověď (nonmonotonic dose-response curve), která popisuje případ, kdy směrnice křivky změní směr v závislosti na testované dávce. Tento jev může nastat z několika důvodů s původem v molekulárním působení. Například pokud se EDCs váže na více než jeden receptor, ztrátou citlivosti receptoru atd. Vše se odvíjí od velikosti dávky a je propojeno s výše zmíněným low-dose efektem (Kapitola 6.1) (Lagarde, 2015; Vandenberg, 2012).

2.5.2 Matematické modely pro směsné vzorky

Některé modely používají jako vstupní parametry pro kvantifikaci přírodních estrogenů a EE2 vstupujících do čistíren odpadních vod demografické studie a data ze sčítání lidu (Johnson, 2000). Jiné modely pro predikci účinku směsných vzorků jsou založeny na znalosti parametrů monotónního průběhu sigmoidy dávka-odpověď pro jednotlivé komponenty směsi.

V současnosti jsou uplatňovány dva hlavní přístupy pro predikce s nulovou interakcí (null models). Prvním je tzv. concentration addition (CA) model. A druhým je tzv. Multiplicative Survival model (MSM), kam patří i model jednoduché interakce (simple interaction, SI) nebo nezávislého působení (independent action, IA) používaný v toxikologii. Každý z nich je založen na jiných předpokladech o působení látek a s drobnými úpravami je aplikují různé vědní obory od farmacie po zemědělství (Schindler, 2017; Howard, 2009; Silva, 2002).

První typ modelů je vhodný pro směsi, kde je mechanismus působení stejný pro všechny komponenty směsi, tedy i pro EDCs a jejich interakce s cílových receptorem. To má u CA modelu za následek paralelní křivky se stejnou směrnici. Základní koncept předpokládá, že ekvipotentní dávky dvou různých látek mohou být zaměnitelné, což nepřímou vyjadřuje, že celkový efekt nemůže být větší než jeho nejpotentnější složka (Schindler, 2017). Na podobném základě, avšak s menším počtem aproximací, byly vyvinuty také modely jako zobecněný koncentrační přídavek (GCA) (Howard, 2009), faktor ekvivalentní toxicity (TEF) (Birnbaum, 1995), plný logistický model (FLM) (Ezechiáš, 2016b) a Schindlerův „Hill response surface ansatz“ (Schindler, 2017).

Při predikci hraje roli také to, zda je mezi komponentami směsi parciální agonista. Zatímco plný agonista pouze aditivně přispívá k účinku směsi, parciální agonista zvyšuje účinek směsi, pokud je pod úrovní svého maximálního účinku. Při vysokých koncentracích působí jako antagonist (Watt, 2016; Howard, 2010). Novější vztahy pro predikci jako FLM a Schindlerův model operují s více jak třemi parametry křivky dávka-odpověď jednotlivých komponent. Nejsou tím pádem omezeny jen na plné agonisty a křivky nemusí mít stejnou směrnici v inflexním bodě (Ezechiáš, 2016b; Schindler, 2017).

2.5.3 Modelování vs. empirická měření

Verifikace modelů jsou zpravidla prováděny na čistých chemických standardech a až následně s reálnými vzorky, u kterých je provedena cílená kvalitativní a kvantitativní analýza (Thorpe, 2006). Při testování směsí standardů vázajících se na arylhydrokarbon receptor (AhR) byla predikce GCA spolehlivější než TEF (Howard, 2010). Stejně tak se GCA ukázal lepší pro predikci vyšších koncentrací ftalátů účinkujících na receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory (PPAR γ) než TEF a IA. Při nižších koncentracích se modely chovaly podobně (Watt, 2016).

Byly testovány binární směsi složené celkem z osmi xenoestrogenů ze skupiny parabenů, fytohormonů a bisfenolu A. Predikce modelem CA a TEF byly výrazně přesnější než IA přístupem, který směsi podhodnocoval. Autoři považují zejména CA model vhodný pro predikci směsí estrogenů. Je ale nutné zdůraznit, že křivky jednotlivých komponent zde byly paralelní a dosahovaly stejných směrnicevých a maximálních hodnot (Silva, 2002). Pro směsi přírodních hormonů byl pomocí CA modelu dobře predikovaný parametr EC₅₀, ostatní parametry křivky dávka-odpověď autoři nehodnotí (Yang, 2014). V nejnovější *in vitro* studii s ekvipotentními a ekvimolárními směsmi pesticidů, PCPs, fytohormonů a dalších chemikálií vázajícími se na estrogenní receptory byl aplikován jak model GCA, CA, tak i FLM. Autoři hodnotí výsledky tak, že FLM v případě použitých látek vhodně integruje výhody GCA a CA modelů a dobře predikuje křivky dávka-odpověď (Schlotz, 2017). Více studií s predikcemi pomocí FLM a Schindlerova modelu nebylo publikováno.

Na reálné vzorky byl doposud výjimečně aplikován přístup vykreslování celých křivek, posuzování probíhá spíše porovnáním celkového 17 β -estradiol ekvivalent (Kapitola 6.4). Binární směsi přírodních estrogenů, EE2 a 4-NF byly celkem obstojně predikovány pomocí CA modelu. Predikce podle analytických stanovení látek E1, E2, EE2 a 4-NF pro 47 reálných vzorků odtoků z ČOV však nebyly zcela tak přesné při porovnání s *in vitro* výsledky. To autoři připisují spíše vysokému limitu detekce pro jednotlivé analyty a obecně jejich obtížnému kvantitativnímu stanovení (jednotky až desítky $\mu\text{g/L}$) než špatně vytvořenému modelu. Během extrakčních kroků nebyl pozorován úbytek v celkové estrogenní aktivitě. Empirické hodnoty byly ve většině případů nižší než predikované (Thorpe, 2006).

Opačný trend byl pozorován na vzorcích povrchové vody a sedimentu z povodí řeky Liao, kde byly pro většinu vzorků vypočítané hodnoty EEQ vyšší než naměřené. To by nasvědčovalo přítomnosti antiestrogenů. Mezi hodnotami byla pozorována signifikantní korelace s koeficientem determinance $R^2=0,9$ pro povrchovou vodu a $R^2=0,7$ pro sediment (Wang, 2011). Ve starší studii s 5-ti reálnými vzorky odpadních vod obdobně srovnávali EEQ vypočtené podle analyticky změřených hodnot s výsledky z testu na kvasinkách. Vypočtené a naměřené hodnoty EEQ pozitivně korelovaly s $R^2=0,6$, ale lišily se (Aerni, 2004).

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zhodnotit efekt endokrinních disruptorů ve směsích, což je z hlediska hodnocení rizik pro životní prostředí zcela zásadní. Environmentálně relevantní jsou totiž spíše efekty směsí EDs, z nichž se každý vyskytuje v nízkých koncentracích. EDs mohou být stanoveny pomocí chromatografických metod a ekotoxikologických testů nebo může být celkový efekt predikován matematickými modely. Protože účinnost přečištění odpadních vod není s ohledem na endokrinní disruptory dostatečné, odtoky z čistíren jsou jedním z hlavních zdrojů těchto látek v prostředí. Na základě těchto zjištění byly formulovány následující specifické cíle pro tuto diplomovou práci:

- Ověřit matematický model FLM (Full logistic model) pro predikci účinků směsí.
- Zhodnotit vhodnost jednotlivých predikčních modelů (např. FLM, GCA, Schindlerův model).
- Na základě výsledků chromatografické analýzy predikovat estrogenní aktivitu pomocí modelů ve vzorcích odtoků z čistíren odpadních vod. Výsledky porovnat s celkovou estrogenní aktivitou experimentálně stanovenou ekotoxikologickými testy.

4 Experimentální část

4.1 Standardy

17 α -ethinylestradiol (98%)	Sigma-Aldrich, ČR
17 β -estradiol (\geq 98%)	Sigma-Aldrich, ČR
4-nonylphenol (99,9%)	Sigma-Aldrich, ČR
bisphenol A (99+%)	Sigma-Aldrich, ČR
estriol (\geq 97%)	Sigma-Aldrich, ČR
estrone (\geq 97%)	Sigma-Aldrich, ČR
irgasan (\geq 97%)	Sigma-Aldrich, ČR
hexachlorobenzen (99,8%)	Sigma-Aldrich, ČR

4.2 Rozpouštědla a další chemikálie

acetonitril pro HPLC (99,95%)	VWR, ČR
adenin (\geq 99%, HPLC)	Fluka, ČR
adenin hemisulfát (\geq 99%)	Sigma-Aldrich, ČR
ammonium hydroxide solution (28 – 30%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-arginin HCl (\geq 98%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-aspartová kyselina (\geq 98%)	Sigma-Aldrich, ČR
biotin (\geq 99%)	Lachema, ČR
BSTFA + TMCS (99:1)	Supelco, ČR
citrát trisodný	Sigma-Aldrich, ČR
dichlormethan pro HPLC, 99,9 %	Riedel-de Haën
dihydrogenfosforečnan draselný (>99%)	Sigma-Aldrich, ČR
dimethylformamid (\geq 99,9%)	Sigma-Aldrich, ČR
dimethylsulfoxid (\geq 99,9%)	Sigma-Aldrich, ČR
dusík (99,99%)	Linde, ČR
ethanol (96%)	VWR, ČR
ethylacetát pro HPLC	VWR, ČR
L-fenylalanin	Roth, ČR
D-glukóza monohydrát, p.a.	Lechner, ČR
L-glutamová kyselina (\geq 99%)	Sigma-Aldrich, ČR
glycerol	Lachner, ČR
inositol (\geq 99%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-iso-leucin (\geq 98,5%)	Roth, ČR
L-histidin (\geq 98,5%)	Roth, ČR
hydroxid draselný, p.a.	Penta, ČR
kyselina citronová bezvodá, p.a.	Lachema, ČR
kyselina chlorovodíková (35%, p.a.)	Lachner, ČR
kyselina octová ledová (100%, p.a.)	Merck, ČR
L-leucin (\geq 98,5%)	Roth, ČR
D-luciferin (synthetic) (\geq 99,4%)	Duchefa Biochemie, Dánsko
L-lysin HCl (\geq 99%)	Fluka, ČR
methanol pro HPLC	VWR, ČR

L-methionin (≥99%)	Roth, ČR
pantothemová kyselina (N/A)	Sigma-Aldrich, ČR
pyridoxin HCl (≥98%)	Sigma-Aldrich, ČR
red-β-D-galactopyranoside (96%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-serin (≥99%)	Fluka, ČR
síran amonný, p.a.	Penta, ČR
síran hořečnatý (N/A)	Sigma-Aldrich, ČR
síran měďnatý (N/A)	Sigma-Aldrich, ČR
síran sodný bezvodý, p.a.	Lachner, ČR
síran železitý (N/A)	Lechner, ČR
thiamin (N/A)	Fluka, ČR
L-threonin (≥98%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-tryptofan (≥98%)	Sigma-Aldrich, ČR
L-tyrosin	Sigma-Aldrich, ČR
L-valin (≥98%)	Sigma-Aldrich, ČR
yeast nitrogen base	Sigma-Aldrich, ČR

4.3 Materiál a organismy

Chromabond C18 skleněné kolonky, 6 mL	Macherey-Nagel, Německo
Hamiltonova stříkačka (1mL)	Hamilton®, USA
Membránové filtry na bázi celulózy (0,45 μm)	Whatman, Německo
Oasis MAX, 6cc (150 mg) Extraction Cartridges	Waters, ČR
Papírové filtry (0,5 μm)	Macherey-Nagel, Německo
Parafilm PM – 996	Sigma-Aldrich, USA
Písek mořský	Lachner, ČR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (β–galaktozidázový test)	Laboratoř molekulární buněčné fyziologie a endokrinologie, Dresden Univerzity of Technology, Německo.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> kmeny BMAEReluc/ERα a BMA64luc	Piia Leskinen, oddělení biochemie University of Turku, Finsko
Stacionární fáze GPC BioBeads® S-X12	BioRad, USA
Stříkačkové nylonové filtry na GPC (0,22 μm)	Chromatoservis, ČR
Stříkačkové filtry na sterilizaci Rotilabo (0,22 μm)	Roth, ČR

4.4 Přístroje

Analytické váhy AE 240	Mettler, Švýcarsko
Analytické váhy AdventurePro	Ohaus, USA
ASE 200 Accelerated Solvent Extraction System	Dionex, USA
Autokláv AUT26/II	N/A
Automatický sběrač frakcí Fraction collector frac-100	Pharmacia, Švédsko
Centrifuga EBA 20	Hettich, Německo
Derivatizační pec	N/A
Detektor Waters 2996 PDA	Waters, USA
Extrakční manifold	Waters, USA

Flow – box s klimatizačním systémem Fatran	N/A
GC autosampler CP 8400	Bruker, USA
GC kolona DB-5ms (0,25 µm, 30 m x 0,25 µm)	Agilent Technologies, USA
GPC kolona Omnifit® Glass Column 10 x 500 mm	Chromservis, ČR
HPLC kolona XBridge C18	Waters, USA
Inkubátor Raven 2	LTE Scientific, VB
Kapalinový chromatograf Waters Alliance 2695	Waters, USA
Luminometr Lumino M90a	ZD Dolní Újezd, ČR
Lyofilizátor	Labio, ČR
Magnetická míchačka MS-H-S	Dlab, Čína
Mrazák MDF – U333	Sanyo, Japonsko
Orbitální třepačka PSU – 10i	Biosan, Litva
Pipety	Biohit a Brand
pH – metr: pH 7110 set	Inolab s.r.o., ČR
Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí SCION SQ	Bruker, USA
Pumpa deltachrom™ (GPC)	Watrex (ČR)
Purifikační systém Direct-Q®	Merck Millipore, Německo
Spektrofotometr Infinite M200 PRO NanoQuant	Tecan, Švýcarsko
Spektrofotometr Lambda 3 UV/VIS Spectrophotometr	Perkin-Elmer, USA
Ultrazvuková lázeň K-12	Kraintek, ČR
Vakuová pumpa (SPE)	Labicom s.r.o., ČR
Váhy PM460	Mettler, Švýcarsko
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Itálie

4.5 Bioluminiscenční test

Princip. Testovým organismem byla geneticky modifikovaná kvasinka pивní (*Saccharomyces cerevisiae*), do které byla vložena lidská sekvence DNA kódující estrogenní receptor a plasmid pro tvorbu luciferázy. V přítomnosti látky, která se naváže na estrogenní receptor, je syntetizován enzym luciferáza, která štěpí přítomný luciferin. Intenzita bioluminiscence odpovídá koncentraci estrogenně aktivní látky. V testu byly používány dva kmeny kvasinek BMA64/luc (Luc) a BMAEReluc/Erα (ER). BMA64/luc sloužil jako kontrolní kmen pro zjištění případné nežádoucí akutní toxicity, BMAEReluc/Erα detekuje estrogenní aktivitu. Test byl proveden podle Leskinen (2005).

Kultura. Dlouhodobě byly kvasinky uchovávány při teplotě -80 °C ve směsi glycerolu a média (1:1). Reakční směs obsahovala 100 µL směsi a 400 µL kultury kvasinek o optické denzitě 0,8 – 1. Pěstovány byly na Petriho miskách s agarem a médiem (4 g agaru na 200 mL média). Každých 14 dní byly kvasinky přeočkovány na nové misky. Vše bylo provedeno ve sterilním flow-boxu a odpad kontaminovaný GMO byl sterilizován při 121 °C po dobu 30 minut nebo pečlivě zneškodněn 96% ethanolem.

Médium. Kmen ER a Luc vyžaduje rozdílné médium (Tabulka 3). Základ, do kterého byly přidány jednotlivé komponenty, byl pro obě stejný tzv. Synthetic dextrose médium. To bylo připraveno

rozpuštěním 6,7 g Yeast nitrogen base v 1 L destilované vody. Všechny roztoky byly sterilizovány při 121 °C po dobu 30 minut nebo filtrací (0,22 µm) podle jejich citlivosti vůči vysokým teplotám.

Tabulka 3: Média pro kultivaci kvasinek (kmeny Luc a ER) na luminiscenční test.

komponenty	koncentrace roztoku	kvasinkový kmen	koncentrace v médiu
glukóza	40 % (w/v)	Luc+ER	5 %
histidin	2 g/L	Luc+ER	1 %
adenin hemisulfát	5 g/L	Luc+ER	1 %
leucin	10 g/L	Luc+ER	1 %
tryptofan	2 g/L	Luc	1 %

Průběh. Ředící řady vzorků a standardů byly rozpuštěny v 30% dimethylsulfoxidu (DMSO) kvůli viabilitě kvasinek, ve vyšších koncentracích DMSO kvasinky umírají. Test byl proveden ve třech paralelách pro každou koncentraci. Test trvá dva dny. První den bylo třeba napěstovat kvasinkové kultury ER a Luc v tekutém médiu příslušném pro daný kmen. Přes noc byly kvasinky inkubovány při teplotě 28 °C a stálého třepání (220 rpm).

Druhý den byly kvasinky zředěny na optickou denzitu 0,4 při vlnové délce $\lambda = 620$ nm. Do testu musí kvasinky dorůst na optickou denzitu 0,6 – 0,7 při $\lambda = 620$ nm. Zkumavky, ve kterých byl pokus proveden, byly sterilizovány 96% ethanolem. Ke 100 µl suspenze kontrolního kmenu Luc bylo přidáno 10 µl vzorku v 30% DMSO, pro ER kmen byly objemy dvojnásobné. Jako blank sloužil 30% DMSO a pozitivní kontrola, podle které bylo možné porovnat testy mezi sebou a ověřit správnost provedení, byl 17β-estradiol. Každá zkumavka byla z vrchu opatřena parafilmovým víčkem, aby nedošlo ke kontaminaci. Expozice kvasinek trvala 2,5 hodiny ve 28 °C za stálého třepání (220 rpm). Vždy těsně před měřením byl do zkumavky pipetován čerstvě připravený substrát v podobě 0,1mM roztoku luciferinu v 0,1mM citrátovém pufru. Luminiscence byla měřena na přístroji LUMINO m90a, každý vzorek byl snímán 60 sekund.

Vyhodnocení. Úroveň emitovaného světla byla měřena pomocí luminometru a vyjádřena v tzv. relativních světelných jednotkách (RLU), které proporcionálně vyjadřují proud světelného záření daného vzorku. Od každého vzorku byl odečten průměr nejméně tří měření prázdné zkumavky, které bylo provedeno rovnoměrně v průběhu testu. Z kontrolního kmene BMA64/luc byl vypočten korekční faktor, který byl podílem odezvy blanku ke vzorku. Pokud se hodnota korekčního faktoru nenachází mezi hodnotami 0,5 – 2, znamená to, že došlo pravděpodobně k inhibici efektu vlivem toxicity vzorku a bylo nezbytné opakovat měření s naředěným vzorkem. Výsledek byl vyjádřen jako podíl odezvy

vzorku ku blanku (tzv. fold induction) vynásobený korekčním faktorem v intervalu 0,5 – 2 pro konkrétní vzorek. Tímto výpočtem je získán výsledný efekt. Výsledné grafy, tabulky a výpočty byly vyhotoveny v programech RStudio, OriginPro 8.5 a MS Excel. Naměřené hodnoty ekotoxikologických testů byly prokládány logistickou funkcí. Limit detekce byl vypočten jako 15 % maxima křivky E2. Pro souhrnné grafické zobrazení jedné směsi nebo více látek z více měření v rámci několika dní byla provedena transformace dat na maximální a minimální odezvu E2 v daném testu, čímž bylo dosaženo sjednocení hodnot na souřadnicích. Vztah pro normalizaci:

$$odezva_{Anormalizovaná} = \frac{odezva_{Anaměřená} - min_{E2}}{max_{E2} - min_{E2}}$$

4.6 B-galaktozidázový test

Princip. Testovým organismem byly geneticky modifikované kvasinky pивní (*S. cerevisiae*), do jejichž genomu byla vložena lidská sekvence DNA kódující estrogenní receptor a plasmid s reportérovým genem *lac-Z*, po jehož aktivaci je exprimován enzym β-galaktozidáza. V přítomnosti látky interagující s receptorem je enzym syntetizován a sekretován do média, kde štěpí přítomný chromogenní substrát chlorfenol red-β-D-galaktopyranosidáza (CPRG). Zbarvení roztoku se tak změní ze žlutého na červené, intenzita je úměrná koncentraci estrogenně aktivního analytu. Absorbance červeného substrátu CPRG je měřena při λ = 540 nm. Test byl proveden podle Routledge (1996).

Kultura. Kvasinky byly uchovávány při teplotě -80 °C ve směsi glycerolu a kultivačního média (1:1). Před testem byly rozmrazeny a převedeny do tekutého média. Vše je prováděno ve sterilním flow-boxu a odpad kontaminovaný GMO byl likvidován při 121 °C po dobu 30 minut nebo pečlivě zneškodněn 96% ethanolem.

Kultivační médium. Médium pro tento test je vhodné připravovat vždy čerstvé z následujících komponent, které jsou jednotlivě sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut nebo filtrací (0,22 μm) ve flow-boxu:

- 1) 0,5 mL roztoku vitamínů (8 mg thiaminu, 8 mg pyridoxinu, 8 mg kyseliny pantothenové, 40 mg inositolu, 20 mL roztoku biotinu o koncentraci 2 mg/100 mL a 180 mL destilované vody) – filtr
- 2) 0,125 mL síranu měďnatého (20 mM) – filtr
- 3) 1,25 mL kyseliny L-aspartové (4 mg/mL) – autokláv
- 4) 0,4 mL L-threoninu (24 mg/mL) – autokláv
- 5) 5 mL glukózy (20 % w/v) – autokláv
- 6) 45 mL minimálního média (13,61 g KH₂PO₄, 1,98 g (NH₄)₂SO₄, 4,2 g KOH, 0,2 g MgSO₄, 1 mL Fe₂(SO₄)₃ o koncentraci 40 mg/50 mL, 50 mg leucinu, 50 mg histidinu, 50 mg adeninu, 20 mg argininu – HCl, 20 mg methioninu, 30 mg tyrosinu, 30 mg isoleucinu, 30 mg lysinu – HCl, 25 mg

fenylalaninu, 100 mg kyseliny glutamové, 150 mg valinu, 375 mg serinu a 1 L destilovaná voda)
– autokláv

Experimentální médium. Médium bylo připraveno z kultivačního média s přidavkem substrátu CPRG (1%).

Průběh. Ředící řady vzorků a standardů byly převedeny, resp. rozpuštěny ve 30% DMSO kvůli viabilitě kvasinek. Testy byly provedeny v tripletu. Test trvá pět dní. První den bylo připraveno kultivační médium a v něm rozpěstovány zmražené kvasinky. Přes noc byl roztok kvasinek inkubován při teplotě 28 °C za stálého míchání (140 rpm). Druhý den byl pokus založen v 96 jamkové destičce. Do každé jamky bylo pipetováno 20 µL vzorku a 180 µL inokulovaného média. To bylo připraveno z roztoku kvasinek s optickou densitou přibližně 1 při vlnové délce $\lambda = 640$ nm a testového média (2 mL roztoku kvasinek a 50,5 mL testového média). Jako blank sloužilo 30% DMSO a pozitivní kontrola, podle které bylo možné porovnat testy mezi sebou a ověřit správnost provedení, byl 17 β -estradiol. Desky byly zalepeny páskou, aby nedošlo ke kontaminaci a obsah opatrně promíchán. Následující dva dny probíhala expozice kvasinek v inkubátoru při teplotě 28 °C. Pátý den probíhala měření na spektrofotometru. Hodnota absorbance pro každou jamku byla výsledkem měření v pěti bodech. Pro stanovení intenzity červeného zbarvení bylo provedeno měření absorbance při vlnové délce $\lambda = 540$ nm a pro stanovení pozadí při vlnové délce $\lambda = 620$ nm.

Vyhodnocení. Od absorbance při $\lambda = 540$ nm byla odečtena absorbance při $\lambda = 620$ nm a průměr absorbance tří blanků. Výsledný efekt byl v tomto testu definován tímto výpočtem, pro každou koncentraci analytu byly průměrovány hodnoty ze tří opakování. Pro reálné vzorky byl výsledek převeden na 17 β -estradiol ekvivalent podle rovnice logistické křivky. Limit detekce byl vždy stanoven pro konkrétní měření na 15 % maxima odezvy 17 β -estradiolu. Výsledné grafy, tabulky a výpočty byly vyhotoveny v programech RStudio, OriginPro 8.5 a MS Excel. Naměřené hodnoty ekotoxikologických testů byly prokládány logistickou funkcí. Limit detekce byl stanoven na 15 % maxima křivky E2. Shodnost naměřených parametrů EC₂₀ s predikovanými byla testována pomocí Tukeyho testu mnohonásobného porovnání v programu RStudio. Pro souhrnné grafy z více měření byla použita normalizace dat na odezvu E2 (výpočet viz předchozí kapitola *Vyhodnocení*).

4.7 Testy rozpustnosti 4-nonylfenolu

Aby bylo možné přidat do testování směsí standardů další analyty, bylo třeba zjistit jejich hranici rozpustnosti v 30 % DMSO. V testech ekotoxicity by totiž mohlo docházet k podhodnocení estrogenní aktivity v důsledku nerozpuštěného analytu.

4-nonylfenol byl rozpuštěn v 30% a 60% DMSO v koncentracích 5 – 100 mg/L. Po centrifugaci (5 minut, 5000 rpm) byly do inzertu ve 2 mL vialkách odebrány pouze čiré supernatanty. Analýza byla

provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem (HPLC–PDA detektor). Byla použita kolona XBridge C18 (3,5 µm, 4,6 x 250 mm) a teplota na koloně byla 35 °C. Eluce probíhala v isokratickém režimu (90 % 100% ACN a 10 % 10% ACN) s průtokem 0,8 mL/min. Dávkovací objem vzorků byl 10 µl a vlnová délka detekce byla $\lambda = 210 - 400$ nm. Koncentrace 4-nonylfenolu byly stanoveny z plochy píku. Pro sestavení kalibrační přímky byl 4-nonylfenolu rozpuštěn ve 100% DMSO.

4.8 Úprava a extrakce odpadních vod

Do skleněných nádob byly odebrány čtyři vzorky odtoků z čistíren odpadních vod v České Republice (Tabulka 4). Odpadní vody pocházely převážně z domácností a občansko-technické vybavenosti, část tvořily též srážkové vody. Ve všech čistírnách probíhá pouze mechanicko-biologická úprava odpadních vod.

Vzorky byly mezi odběrem a zpracováním uchovávány při 4 °C. Každý z nich byl analyzován ve třech paralelách. Extrakce a chromatografická analýza sedimentů a odtoků z čistíren odpadních vod byla provedena podle zavedených postupů v Laboratoři environmentální biotechnologie Akademie Věd ČR. Výtěžnosti a další specifikace extrakčních a derivatizačních metod byly testovány v diplomové práci Jany Langové (Langová, 2013).

Vzorky byly homogenizovány třepáním nebo proudem vzduchu. Dále byl odebrán 1 L vzorku a okyselen na pH = 2,5 za použití koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Pro odstranění nečistot byla provedena filtrace pod vakuem přes papírový filtr (0,5 µm) a následně přes membránový filtr na bázi celulózy (0,45 µm).

Tabulka 4: Specifikace čistíren odpadních vod, kde byly odebírány vzorky odtoků.

vzorek	počet ekvivalentních obyvatel [tis]	kapacita [tis m ³ /den]	datum odběru
čov-01-out	50 – 200	15 – 100	31.1.2018
čov-02-out	<50	<15	31.1.2018
čov-03-out	>200	> 100	15.3.2018
čov-04-out	50 – 200	15 – 100	22.3.2018

Dalším krokem bylo zakoncentrování vzorku pomocí extrakce pevnou fází (SPE – solid phase extraction). Skleněné kolonky CHROMABOND C₁₈ byly kondicionovány nejprve 3x2 mL ethylacetátu (EtOAc), 3x2 mL methanolu (MeOH), 3x2 mL milli-Q vody (ultra čistá voda; $\rho = 18,2$ M Ω -cm při 25 °C) a nakonec 4 mL okyselené milli-Q vody (pH = 2,5). Dále byl nanesen 1 L vzorku a opět 4 mL okyselené milli-Q vody. Kolonky byly vysušeny (podtlak 5 – 7 kPa, 20 – 30 minut). Poté byl analyt ze sorbentu eluován 3x2 mL EtOAc. V dalším kroku byl extrakt zbaven vody za použití bezvodého síranu sodného.

Po aplikaci vzorku na síranovou kolonku byla původní vialka ještě 3x vypláchnuta EtOAc pro kvantitativní převedení. Následovalo zakoncentrování extraktu odparem rozpouštědla pod proudem dusíku a teplotě 35 °C.

4.9 Úprava a extrakce sedimentů

Na základě výsledků chemických analýz byl vytipován vzorek sedimentu s vysokým obsahem estrogeně aktivních látek. Zároveň se jednalo o potok, kam proudila voda z odtoku ČOV pod kódovým označením čov-02-out. Jeho analýza probíhala celkem v pěti opakováních.

Vzorky byly nejprve lyofilizovány a homogenizovány. Bylo odváženo přibližně přesně 2–5 g vzorku sedimentu. Extrahovány byly EtOAc s použitím vysokotlaké extrakce pevných matric (ASE) v kovových patronách o objemu 30 mL. Do nich byly nejprve vloženy 2 papírové filtry, následovány cca 2 g mořského písku a přesně naváženého vzorku. Patrona byla na závěr vyplněna opět mořským pískem a 2 papírovými filtry. Extrakce probíhala za teploty $T = 160$ °C a tlaku $p = 11,7$ MPa, celkem ve 3 cyklech. Pomocí odpařování byl snížen objem extraktu a bylo odebráno 0,5 mL na ekotoxikologické testy. Na chromatografickou analýzu bylo třeba vzorky dále přečistit.

Extrakt o objemu 1 mL byl odpařen na přídavek 100 μ L dimethylformamidu (DMF), bylo přidáno 900 μ L dichlormethanu (DCM) a vzorek byl promíchán. Následně byl extrakt přefiltrován přes nylonový filtr (0,22 μ m) a skleněnou stříkačkou Hamilton byl přenesen objem 750 μ L do šesticestného ventilu. Při jeho otevření byl vzorek vpuštěn na kolonu promytou DCM. Mobilní fází bylo DCM, stacionární fáze byla tvořena sorbentem BioBeads® S-X12. Sbírána byla frakce 16 – 24 minut, interval vycházel z optimalizace. Před sběrem byla kolona promyta 16 mL DCM a po sběru 8 mL. Eluát byl pod proudem dusíku odpařen na přídavek 100 μ L DMF.

Před filtrací byl vzorek naředěn na 5 mL 2% vodného roztoku amoniaku a promíchán. Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně (10 minut, pokojová teplota) a centrifugován (3500 rpm, 10 minut). Ve vzorcích nebyla pozorována sraženina, ale přesto byly přefiltrovány přes nylonové stříkačkové filtry (0,22 μ m).

Následně byly vzorky extrahovány na pevné fázi (SPE, Oasis MAX). Kondicionace byla provedena bez podtlaku 2x2 mL MeOH, 2x3 mL milli-Q vody a 2x3 mL 2% amoniaku. Vzorky byly nanесeny ve 2% amoniaku opět bez podtlaku. Oplach byl proveden 3x1 mL 2% amoniaku, poté byly kolony vysušeny (podtlak 5 – 7 kPa, 20 – 30 minut). První eluce do samostatných vialek byla provedena 3x2 mL EtOAc a kyselá eluce do dalších vialek byla provedena 4x1 mL kyselým EtOAc (1% kys. octovou v EtOAc). Pro odstranění zbytku vody z extraktu byly použity síranové kolonky s bezvodým síranem sodným. Vzorek byl kvantitativně převeden. Posledním krokem před koncovou analýzou bylo zakoncentrování extraktu odparem rozpouštědla pod proudem dusíku a teplotě 35 °C.

4.10 Chromatografická analýza extraktů sedimentů a odpadních vod

Extrakt o objemu 1 mL byl odebrán na kvantitativní chromatografickou analýzu sledovaných EDCs. Extrakt byl odpařen (N_2 , $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$) na 100 μL DMF a derivatizován přídatkem 200 μL *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorosilanu (BSTFA + TMCS, 99:1, 30 min, $70\text{ }^\circ\text{C}$). Následovalo odpaření na přítomných 100 μL DMF. Byl přidán vnitřní standard v podobě 100 μL HCB (10 mg/L v zásobním roztoku) a objem doplněn EtOAc znovu na 1 mL. V případě přítomnosti vysrážených nečistot ve vzorku proběhla centrifugace a odběr supernatantu do inzertu, popř. ředění vzorku dle potřeby.

Konečná analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu s hmotnostní detekcí (GC-MS) SCION SQ s použitím separační kolony DB-5ms (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm). Nosným plynem bylo He s průtokem 1,2 mL/min. Objem nástřiku činil 1 μL a teplota injektoru byla $240\text{ }^\circ\text{C}$. Metoda běžela v teplotním gradientu. První minutu byla teplota konstantní $60\text{ }^\circ\text{C}$, poté byl otevřen dělič (split ratio 1:50). Teplota dále vzrůstala na $120\text{ }^\circ\text{C}$ rychlostí $25\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, při dosažení této hladiny se rychlost nárůstu zpomalila na $2,5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, až teplota dosáhla $240\text{ }^\circ\text{C}$, kde setrvala 28 minut. Celá analýza jednoho vzorku trvala 80 minut. Snímány byly pouze některé ionty (SIM s rozsahem hmot $208 - 555\text{ m/z}$) a byla použita elektronová ionizace (EI, 70 eV). Identifikace jednotlivých EDCs ve vzorku proběhla porovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů se standardy. Kalibrační přímka obsahovala 7 bodů s koncentracemi 1–1000 ng/mL od každého analytu v programu MS workstation 8.

Limit detekce analytů v extraktu byl vypočítán jako trojnásobek šumu (Tabulka 5).

Tabulka 5: Limity detekce (LOD) metody pro jednotlivé analyty stanovované v reálných vzorcích odtoků z čistíren odpadních vod a sedimentů pomocí GC-MS.

LOD metody (v matrici)		
analyt	voda [ng/L]	sediment [ng/g]
E1	0,010	2,073
E2	0,007	1,433
E3	0,048	1,274
EE2	0,035	7,061
BPA	0,002	1,027
NF	0,003	3,932
IRG	0,004	4,004

4.11 Predikční modely

Na základě vlastností použitých ekotoxikologických testů, kde je měřen počet aktivovaných receptorů, byla vyloučena predikce vycházející z modelů nezávislého působení (Yang, 2014). Testované látky zde působí stejným mechanismem. Ověřovány tedy byly pouze nejnovější modely vycházející z CA, na které ještě nebyla aplikována reálná data (FLM a Schindlerův model) nebo které se v dosavadních výzkumech ukázaly jako nejspolehlivější (GCA). Pro účel práce bylo sjednoceno značení jednotlivých parametrů: E_{mix} je celkový efekt směsi, MAX je maximum křivky, MIN je minimum křivky, c je koncentrace, EC_{50} je inflexní bod křivky a p je směrnice v inflexním bodě. Číselné indexy jsou použity pro rozlišení komponent směsi.

Rovnice použitá pro výpočet FLM (Ezechiáš, 2016b)

$$E_{mix} = \left(MAX_1 + \frac{MIN_1 - MAX_1}{1 + \left(\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}} \right)^{p_1}} \right) \cdot \left(\frac{\frac{c_1}{EC_{501}}}{\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}}} \right) + \left(MAX_2 + \frac{MIN_2 - MAX_2}{1 + \left(\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}} \right)^{p_2}} \right) \cdot \left(\frac{\frac{c_2}{EC_{502}}}{\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}}} \right)$$

Rovnice použitá pro výpočet GCA (Howard, 2009):

$$E_{mix} = \frac{MAX_1 \cdot \frac{c_1}{EC_{501}} + MAX_2 \cdot \frac{c_2}{EC_{502}}}{\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}}}$$

Rovnice použitá pro výpočet Schindlerova modelu (Schindler, 2017):

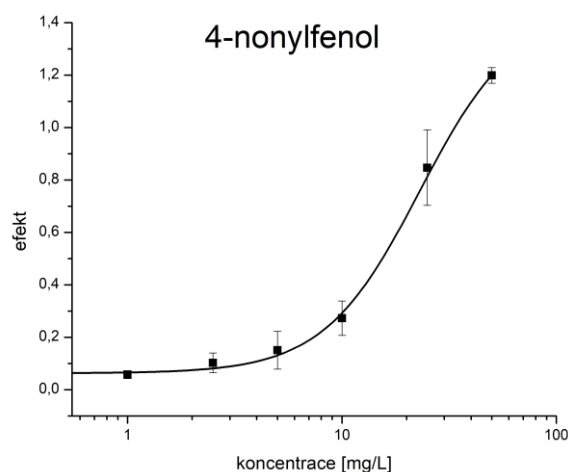
$$E_{mix} = \left(max_1 \cdot \frac{c_1}{EC_{501}} + max_2 \cdot \frac{c_2}{EC_{502}} \right) \cdot \left(\frac{\left(\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}} \right) \frac{p_1 \cdot \frac{c_1}{EC_{501}} + p_2 \cdot \frac{c_2}{EC_{502}}}{\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}}}}{1 + \left(\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}} \right) \frac{p_1 \cdot \frac{c_1}{EC_{501}} + p_2 \cdot \frac{c_2}{EC_{502}}}{\frac{c_1}{EC_{501}} + \frac{c_2}{EC_{502}}}} \right)$$

5 Výsledky

Pro naplnění prvních dvou cílů bylo nutné se zaměřit na to, jak jednotlivé modely dokáží predikovat efekty vzorků o více komponentách. Zjištěna měla být především spolehlivost. Bylo zvoleno pět standardů hojně se vyskytujících a silně se projevujících syntetických a přírodních estrogenů (E1, E2, E3, EE2, BPA), které jsou podle literárních zdrojů zodpovědné za estrogení aktivitu v odtocích z ČOV. Surfaktant 4-nonylfenol, který je též detekovaný v odpadních vodách, nebylo možné zahrnout do testů s čistými chemickými standardy (Kapitola 9.1). Třetí cíl o aplikaci predikčních modelů na reálné vzorky je naplněn v Kapitole 9.4, kde jsou popsány výsledky analýz čtyř vzorků odtoků z ČOV a jednoho vzorku sedimentu.

5.1 Testy rozpustnosti

Při ověřování modelů bylo převážně testováno pouze pět nejsilnějších a nejčastěji detekovaných látek, i když existuje více ekologicky relevantních estrogenních disruptorů. Citlivost testu a nízká rozpustnost některých látek však neumožňovala změřit jejich celé křivky dávka-odpověď (Graf 1). Byl proveden pokus s rozpustností 4-nonylfenolu. Maximum křivky nebylo dosaženo, protože se příslušné koncentrace pohybují na hranici rozpustnosti v 30% DMSO. Koncentrace DMSO je limitována mortalitou kvasinek. Byl zvažován i postup rozpustit 4-nonylfenol v 60% DMSO a přidat do testu pouze poloviční dávku. Ovšem z výsledků kapalinové chromatografie vyplývá, že rozpuštěné množství se významně nezvýší (Tabulka 6).

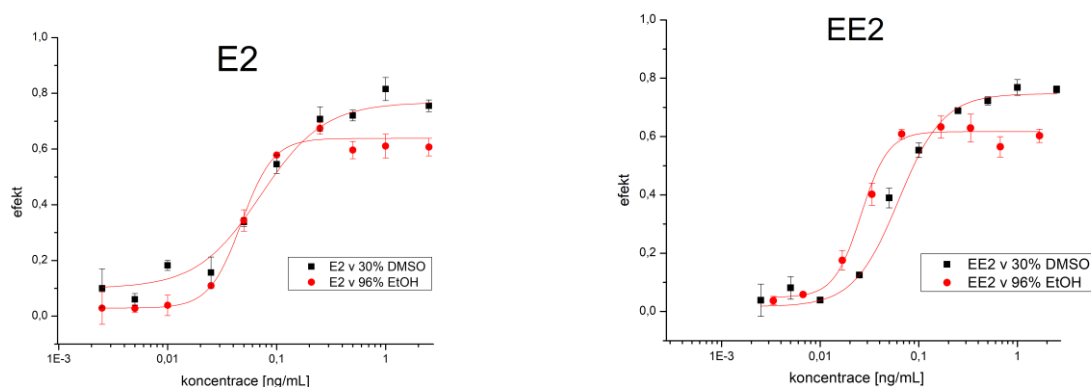


Graf 1: Křivka látky 4-nonylfenol. Není možné s citlivostí β -galaktozidázového testu zachytit její maximum, protože se pohybuje na hranici rozpustnosti látky v 30% DMSO. Efekt je rozdílem absorbancí při $\lambda = 540$ nm a $\lambda = 620$ nm, od kterého byl odečten průměr hodnoty blanků.

Tabulka 6: Výsledky z kapalinové chromatografie, kde byla testována rozpustnost 4-nonylfenolu v 30% a 60% DMSO. Červeně jsou vyznačeny hraniční hodnoty rozpustnosti.

koncentrace [mg/L]	4-NF v 30% DMSO [mg/L]	4-NF v 60% DMSO [mg/L]
5	3,63 ± 0,37	4,22 ± 0,17
10	10,00 ± 0,65	10,86 ± 0,84
25	19,58 ± 1,41	28,53 ± 1,12
50	27,17 ± 0,39	37,01 ± 0,95
100	40,27 ± 2,36	27,43 ± 2,15

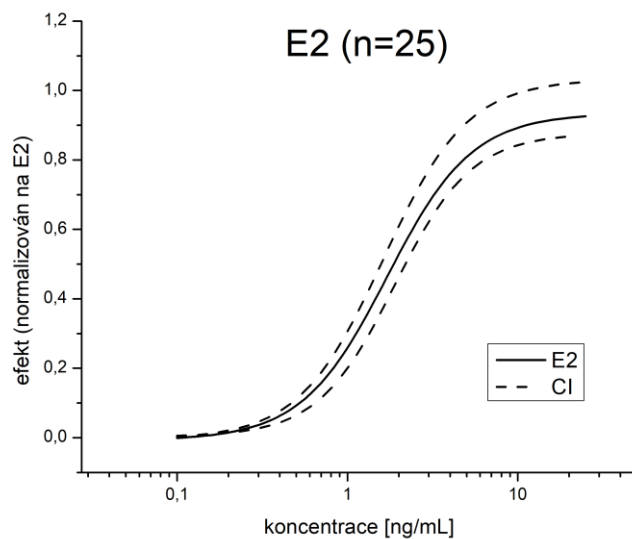
V protokolu β -galaktozidázového testu je uvedena možnost rozpouštět testované analyty v 96% ethanolu s následným odpařením rozpouštědla z jamky 96-jamkové destičky a aplikace média s kvasinkami a substrátem. Tento postup byl tedy testován se standardy, u kterých lze výsledek porovnat s rozpustností v 30% DMSO (Graf 2), aby mohl být případně aplikován i na 4-nonylfenol. Vzhledem k tomu, že ani křivky E2 a EE2 nebylo možné spolehlivě zachytit při rozpuštění analytu v 96% EtOH a následném odpaření, nedá se na výsledek spolehnout ani pro 4-nonylfenol.



Graf 2: Grafy zobrazují rozdíly v odpovědích mezi standardy rozpuštěnými v 30% DMSO a 96% EtOH, který byl v jamkách odpařen před aplikací média s kvasinkami. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku ($n=3$). Efekt je rozdílem absorbancí při $\lambda = 540 \text{ nm}$ a $\lambda = 620 \text{ nm}$, od kterého byl odečten průměr hodnoty blanků.

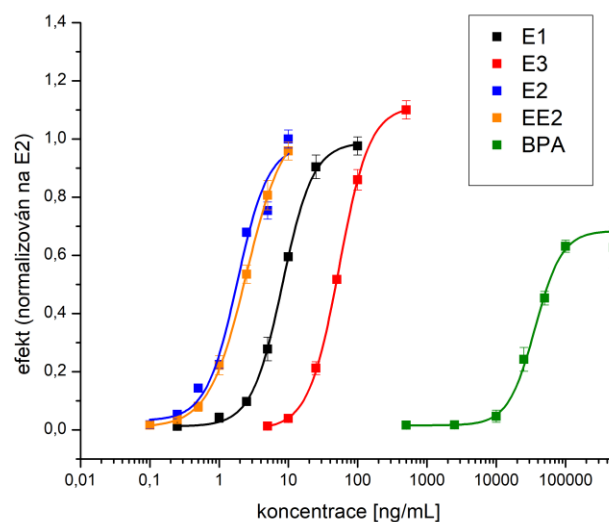
5.2 Bioluminiscenční test

Výsledky testů měřených v různých dnech se vzájemně lišily. Proto byla v každém testu spolu s testovanou látkou či směsí měřena i křivka 17β -estradiolu. Ta sloužila jako referenční, ke které mohly být vztahovány odezvy ostatních testovaných látek. Graf 3 ukazuje rozdíly efektů pro jednotlivé testy. Kvůli zobrazení v souhrnném grafu musela být data normalizována na minimální a maximální odezvu E2 v daném měření (Kapitola 8.5, vyhodnocení).



Graf 3: Výsledky měření 17 β -estradiolu, který sloužil jako srovnávací standard. Zobrazeno je 25 měření z jednotlivých dní. CI je konfidenční interval na 95% hladině.

Aby mohla být provedena predikce, bylo nejprve nutné znát potenciály samostatných látek v daném testu. Výsledky byly vynášeny do grafu zobrazujícího závislost dávka-odpověď. Potence analytů v bioluminiscenčním testu je následující: v nejnižších koncentracích se vázal 17 β -estradiol, téměř stejný efekt při daných koncentracích byl pozorován u 17 α -ethinylestradiolu, následoval estriol, estriol a nejslabší testovanou látkou byl bisfenol A (Graf 2). Data byla opět normalizována.



Graf 4: Křivky dávka-odpověď pro jednotlivé látky měřené bioluminiscenčním testem. Variabilita byla vypočítána jako směrodatná odchylka ze dvou paralel.

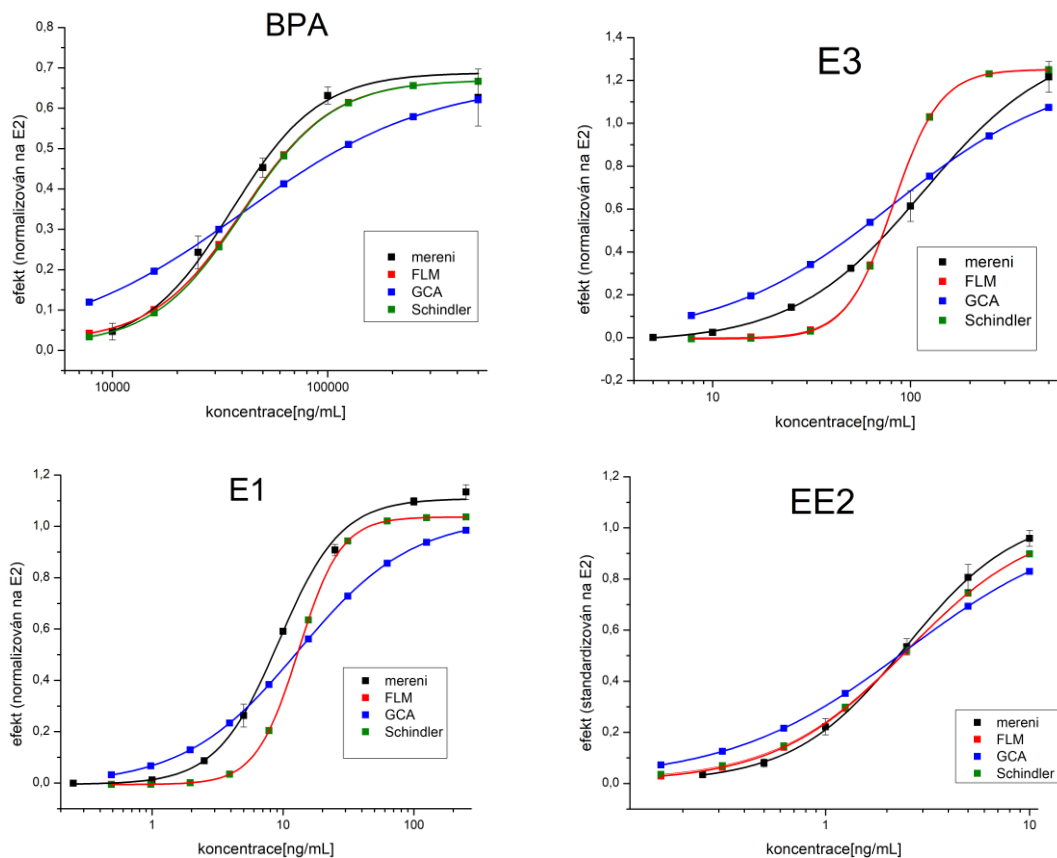
Parametry křivek dávka-odpověď samostatných látek byly vztaženy k E2. Z instrumentálních důvodů totiž nebylo možné měřit křivky samostatných komponent vždy s konkrétní směsí v jeden den v rámci jednoho měření, což, jak se později ukázalo, by bylo ideální z hlediska přesnosti predikcí. Opakovaným měřením čistých standardů jednotlivých látek byly zjištěny empirické standardizační faktory pro vztah dané látky vůči 17 β -estradiolu. Tento přístup vychází z konceptu EEF, faktor vyjadřuje potenci látky a je podílem parametrů EC₅₀ jedné látky vůči referenčnímu E2 (Kapitola 6.2). Zde byl přístup aplikován na všechny čtyři parametry logistické závislosti (Tabulka 7).

Tabulka 7: Experimentálně zjištěné standardizační faktory (podle výpočtu EEF) pro čtyři parametry logistických křivek jednotlivých látek v bioluminiscenčním testu (n = počet opakování).

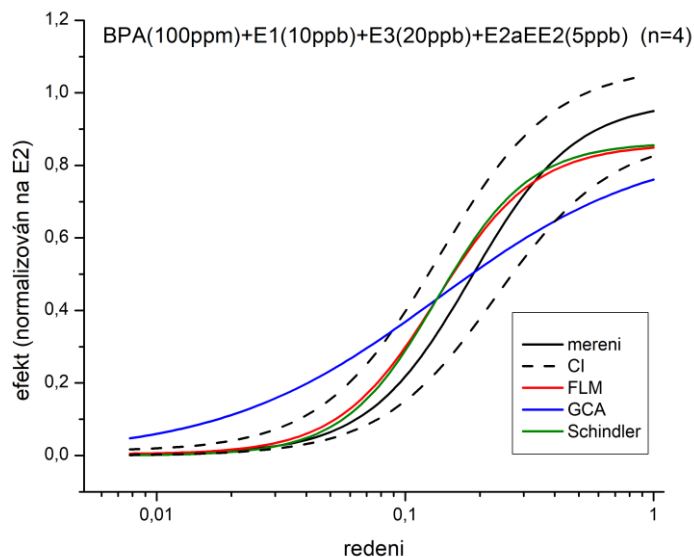
průměry	EE2/E2 (n=4)	E1/E2 (n=4)	BPA/E2 (n=4)	E3/E2 (n=5)
min	0,54	0,15	-0,73	-1
max	1,04	1,04	0,67	1,25
EC50	0,95	6,67	19865,11	39,1
slope	1,08	0,89	1,66	1,22

Při predikci bylo postupováno tak, že parametry křivky referenčního E2 byly vynásobeny experimentálně zjištěnými faktory pro konkrétní analyt. Tak byly získány teoretické parametry křivek jednotlivých složek směsi. Pro validaci a ověření přesnosti takto získaných parametrů bylo provedeno porovnání naměřených křivek jednotlivých látek s jejich predikcemi podle empirických standardizačních faktorů (Graf 5). Z výsledků je zřejmé, že tímto postupem je do predikce vnesena chyba, kterou by bylo možné odstranit pouze použitím destičkového luminometru, který umožňuje měření vzorků i standardů najednou v jednom dni.

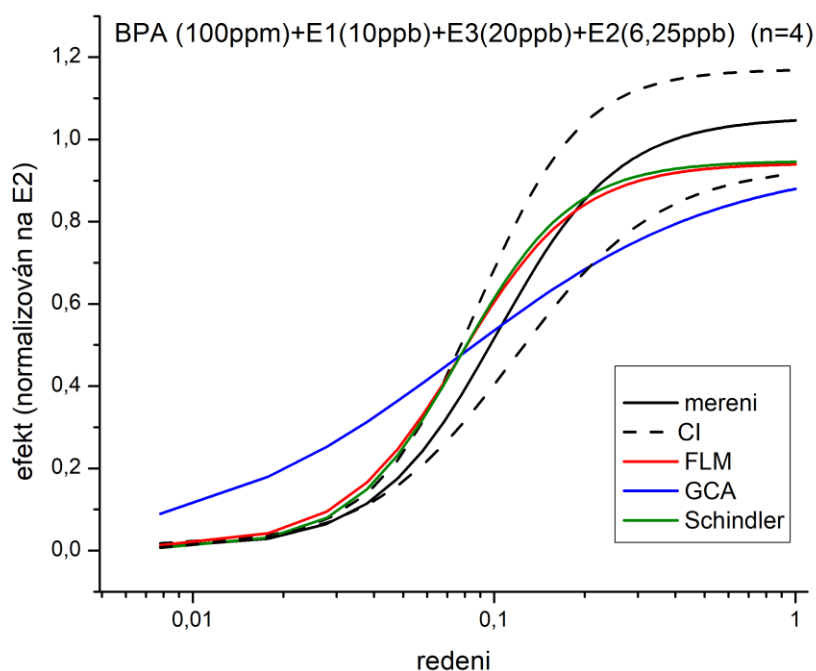
Dále bylo přistoupeno k proměňování směsných vzorků chemických standardů pro ověření predikční schopnosti jednotlivých modelů. Prezentovány jsou zde dvě téměř ekvipotentní směsi o čtyřech a pěti komponentách. Predikce byly provedeny s použitím empirických faktorů, přestože se příliš neosvědčily. Nebylo však vzhledem k omezenému počtu vzorků v jednom měření možné postupovat jinak. Vypočítané odezvy byly porovnány s efekty vyvolanými danou směsí v bioluminiscenčním testu (Graf 6 a 7). Pro naměřené hodnoty byl vypočten konfidenční interval s 95% hladinou spolehlivosti. Na základě toho, zda je predikce obsažena v intervalu, byla hodnocena spolehlivost modelů. Predikce Schindlerovým modelem a FLM se součástí konfidenčního intervalu téměř v celém průběhu křivky na rozdíl od predikcí vypočtenou podle GCA.



Graf 5: Srovnání naměřených (mereni) a vypočítaných křivek jednotlivých látek. K výpočtu byly použity průměry empirických standardizačních faktorů, které jsou uvedeny v Tabulce 7. Schindlerův model a FLM se překrývají. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku (n=2).



Graf 6: Souhrnný graf pětičlenné ekvipotentní směsi (E1, E2, E3, EE2, BPA) ukazuje průměr změřených křivek (mereni) a predikcí pro jednotlivá měření (GCA, FLM, Schindlerův model). Byla provedena 4 opakování, která byla pro účely zobrazení normalizována na odezvu E2 v konkrétním měření. Konfidenční interval (CI) byl sestrojen na 95% hladině spolehlivosti

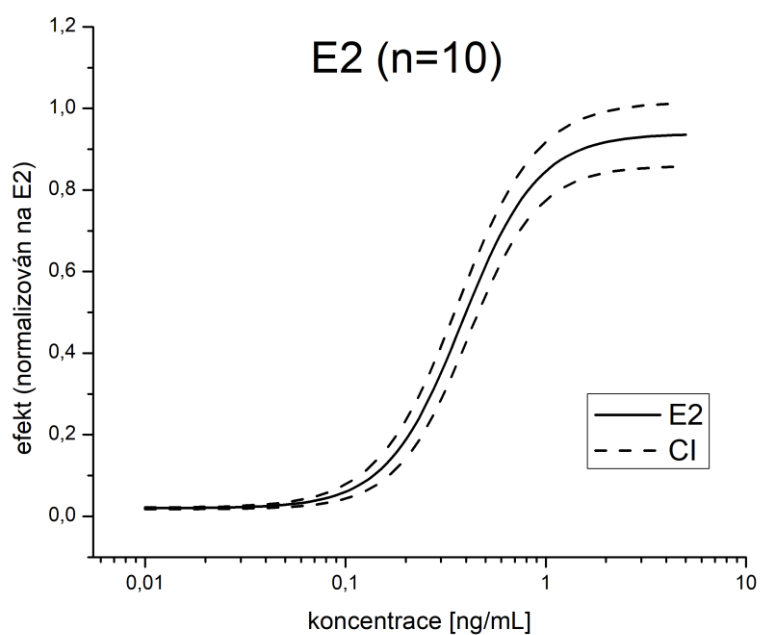


Graf 7: Souhrnný graf čtyřčetné ekvipotentní směsi (E1, E2, E3, BPA) ukazuje průměr změřených křivek (mereni) a predikcí pro jednotlivá měření (GCA, FLM, Schindlerův model). Byla provedena 4 opakování, která byla pro účely zobrazení normalizována na odezvu E2 v konkrétním měření. Konfidenční interval (CI) byl sestaven na 95% hladině spolehlivosti.

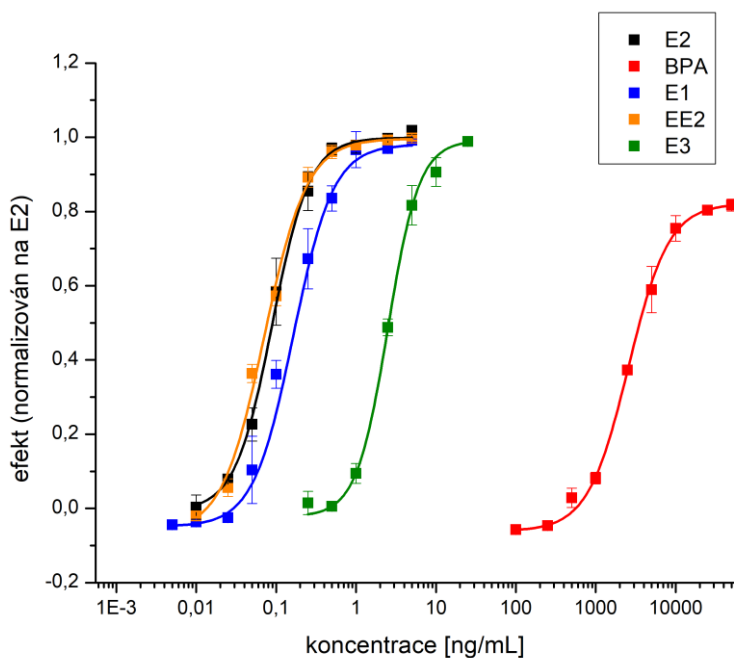
5.3 β -galaktozidázového testu

U β -galaktozidázového testu bylo postupováno naprosto stejně jako u výše prezentovaných výsledků z bioluminiscenčního testu (Kapitola 9.2). Jednotlivá měření se mezi sebou lišily v odpovědi na danou koncentraci analytu. Aby mohla být data porovnána v rámci jednotlivých měření, výsledky byly vždy vztaženy k referenčnímu E2. Graf 8 ukazuje rozdíly efektů E2 pro jednotlivé testy, data byla normalizována vždy na minimální a maximální odezvu E2 pro dané měření (Kapitola 8.5, *vyhodnocení*).

V β -galaktozidázovém testu měly látky z hlediska jejich potence stejné pořadí jako v bioluminiscenčním testu $E2 > EE2 > E1 > E3 > BPA$ (Graf 9). Opakováním jednotlivých měření byly zjištěny empirické standardizační faktory pro vztah dané látky vůči 17β -estradiolu. Faktor pro parametr EC_{50} je vyjádřením potence látky, v literatuře uváděné jako EEF, zde byl tento přístup aplikován na všechny čtyři parametry logistické závislosti jednotlivých látek (Tabulka 8).



Graf 8: Graf zobrazuje křivku 17 β -estradiolu z deseti měření s konfidenčními intervaly s 95% hladinou spolehlivosti.

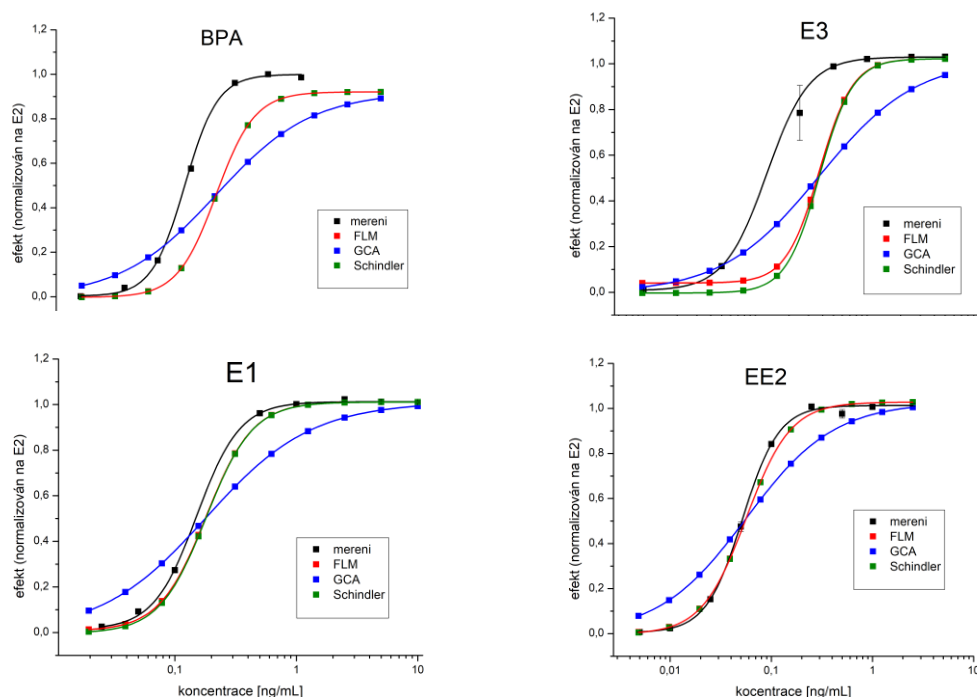


Graf 9: Křivky dávka-odpověď pro jednotlivé látky. Chybové úsečky jsou vypočítány jako směrodatné odchylky ze tří paralel.

Tabulka 8: Experimentálně zjištěné standardizační faktory (vychází z konceptu EEF) pro čtyři parametry logistických křivek jednotlivých látek v β -galaktozidázovém testu (n = počet opakování).

průměry	EE2/E2 (n=6)	E1/E2 (n=8)	BPA/E2 (n=7)	E3/E2 (n=5)
max	1,03	1,01	0,92	1,02
min	0,57	3,21	0,42	14,64
slope	0,84	0,96	1,05	1,23
EC ₅₀	1,09	3,81	42299,24	74,08

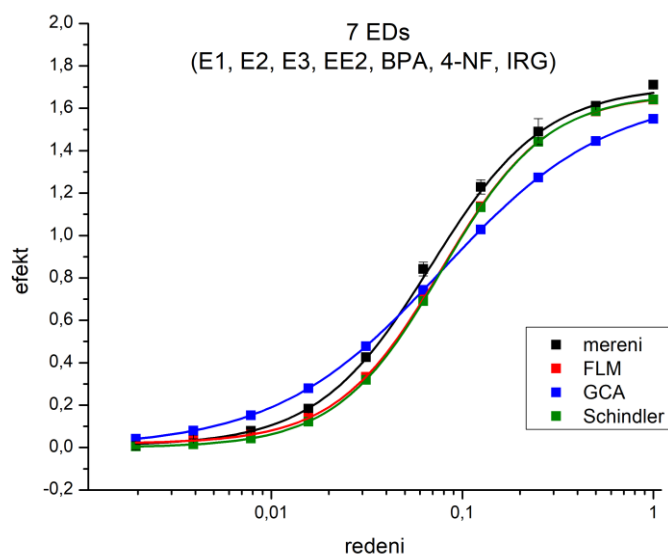
Tento test není z hlediska instrumentace tak úzce limitován počtem vzorků v rámci jednoho měření. Přesto byl proveden stejný postup při predikci pomocí empirických faktorů jako u bioluminiscenčního testu, především za účelem možné úspory materiálu. Nejprve proběhlo zjištění empirických faktorů a jejich následné použití pro predikci křivek jednotlivých látek. Predikce pro některé látky nebyly zdaleka tak přesné ani pro parametr EC₅₀ (Graf 10) a tento přístup opět vnášel do predikce celkového účinku chybu. Proto bylo nakonec při ověřování modelů na směsích přistoupeno k nákladnějšímu ale přesnějšímu měření křivek jednotlivých komponent vždy společně s křivkou směsi.



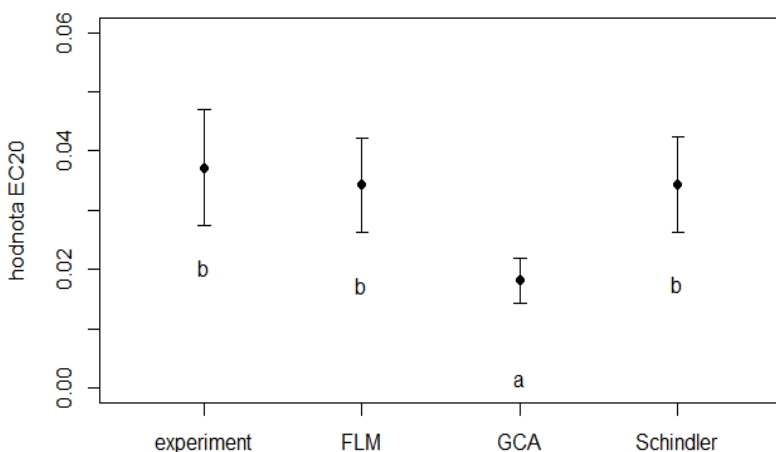
Graf 10: Srovnání naměřených (mereni) a vypočítaných křivek (FLM, GCA, Schindlerův model) jednotlivých látek. K výpočtu byly použity průměry empirických standardizačních faktorů, které jsou uvedeny v Tabulce 8. Schindlerův model a FLM se překrývají. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou ($n=3$).

Predikce byly vypočítány vždy s použitím parametrů křivek z příslušného měření, jak bylo nastíněno v předchozím odstavci. Ty byly porovnány s výsledky z měření pomocí *in vitro* testu (Tabulka 9, Graf 11). Souhrnná Tabulka 9 ukazuje porovnání měření směsí vůči predikcím. Hodnoty EC₅₀ jsou dobře predikovány všemi třemi modely. Avšak relevantnější z hlediska životního prostředí je sledování nižších hodnot jako například EC₂₀. Hodnoty EC₂₀ byly tedy testovány pomocí Tukeyova testu mnohonásobného porovnání. Z výsledků vyplývá, že EC₂₀ predikovaná pomocí GCA se na 95% hladině spolehlivosti liší od ostatních testovaných predikcí a empirického měření (Graf 12).

Graf 11: Ilustrační graf sedmičlenné směsi (měření) s predikcemi (FLM a Schindlerův model jsou téměř totožné) z β -galaktozidázového testu. Každý analyt byl ve směsi v koncentraci 0,5 ng/mL. Chybové úsečky jsou vyjádřeny směrodatné odchylky ze 3 paralel. Vzhledem k potenci irgasanu a 4-nonylfenolu v daném testu, nebyly tyto látky v predikci uvažovány. Efekt je rozdílem absorbancí při $\lambda = 540$ nm a $\lambda = 620$ nm, od kterého byl odečten průměr hodnoty blanků.



Porovnání predikcí pomocí Tukeyho testu



Graf 12: Tukeyho test mnohonásobného porovnání pro hodnotu EC₂₀ na 95% hladině spolehlivosti prokázal odlišnost mezi predikcemi GCA (skupina „a“) a ostatními predikcemi a empirickým měřením (skupina „b“). Chybové úsečky zobrazují konfidenční interval. Experiment značí měření reálných směsí standardů, FLM, GCA a Schindler jsou jednotlivé predikční modely.

Tabulka 9: Souhrnná tabulka porovnání predikcí pomocí Schindlerova modelu, FLM a GCA s naměřenými měřeními z β -galaktozidázového testu. Uvedeny jsou predikované a neměřené parametry křivek. Parametry pro predikci křivek byly získány z křivek měřených v tom samém testu jako byla měřena směs látek. Hodnoty EC_{50} a EC_{20} vychází z ředění, jsou tedy na škále od 0 do 1.

směs	parametr	naměřené hodnoty	FLM	GCA	Schindler
E2 (1 ng/mL) +BPA (100 mg/L)	max	1,0016	1,0909	1,0910	1,0910
	EC50	0,0592	0,0649	0,0649	0,0649
	slope	1,5121	1,7088	1,0000	1,7103
	EC20	0,0237	0,0288	0,0162	0,0289
E2 (2,7 ng/mL) +E3 (4,2 ng/mL) +BPA (66,7 mg/L)	max	1,1501	1,1217	1,1218	1,1218
	EC50	0,0495	0,0535	0,0535	0,0535
	slope	1,4038	1,6857	1,0000	1,6876
	EC20	0,0184	0,0235	0,0134	0,0235
E2 (4 ng/mL) +BPA (25 mg/L)	max	1,2289	1,1450	1,1451	1,1451
	EC50	0,0577	0,0527	0,0527	0,0527
	slope	1,0023	1,6615	1,0000	1,6624
	EC20	0,0145	0,0229	0,0132	0,0229
E1 (5 ng/mL) +BPA (25 mg/L)	max	1,1302	1,1908	1,1909	1,1909
	EC50	0,0894	0,0612	0,0612	0,0612
	slope	1,1315	1,6202	1,0000	1,6229
	EC20	0,0262	0,0260	0,0153	0,0261
EE2 (5 ng/mL) +BPA (5 mg/L)	max	1,2410	1,1825	1,1825	1,1825
	EC50	0,0741	0,0566	0,0566	0,0566
	slope	1,1991	1,4850	1,0000	1,4850
	EC20	0,0233	0,0222	0,0141	0,0222
E2 (1,25ng/mL) +EE2 (1,25ng/mL)	max	1,1787	1,1679	1,1468	1,1684
	EC50	0,0885	0,1034	0,0955	0,1035
	slope	1,3422	1,5680	1,0427	1,5696
	EC20	0,0315	0,0427	0,0253	0,0428
E2 (1,25ng/mL) +EE2 (1,25ng/mL)	max	1,3162	1,3754	1,3762	1,3762
	EC50	0,0783	0,0608	0,0608	0,0608
	slope	1,5000	1,3027	1,0000	1,3026
	EC20	0,0311	0,0210	0,0152	0,0210
E2 (0,5 ng/mL) +EE2 (0,5 ng/mL)	max	1,4713	1,4916	1,4916	1,4916
	EC50	0,0786	0,0754	0,0754	0,0754
	slope	1,6936	1,9514	1,0000	1,9515
	EC20	0,0347	0,0370	0,0188	0,0370
E3 (10 ng/mL) +BPA (25 mg/L)	max	1,4004	1,4179	1,4183	1,4183
	EC50	0,0929	0,0681	0,0681	0,0681
	slope	2,0838	2,0666	1,0000	2,0722
	EC20	0,0478	0,0348	0,0170	0,0349
E3 (10 ng/mL) +BPA (25 mg/L)	max	1,1617	1,1709	1,1728	1,1728
	EC50	0,0901	0,0805	0,0806	0,0806
	slope	1,7431	1,9363	1,0000	1,9421
	EC20	0,0407	0,0394	0,0202	0,0395
E3 (10 ng/mL) +BPA (25 mg/L)	max	1,2306	1,1809	1,1815	1,1815
	EC50	0,0760	0,0724	0,0724	0,0724
	slope	1,8026	1,7952	1,0000	1,7891
	EC20	0,0352	0,0334	0,0181	0,0334
EE2 (5 ng/mL) +E2 (5 ng/mL)	max	1,3223	1,2571	1,2597	1,2597
	EC50	0,0125	0,0091	0,0090	0,0090
	slope	1,3650	1,8003	1,0000	1,8325
	EC20	0,0045	0,0042	0,0023	0,0042

EE2 (0,33 ng/mL) +E3 (1,67 ng/mL) +BPA (16,67 mg/L)	max	1,2356	1,2160	1,2163	1,2163
	EC50	0,0956	0,0842	0,0843	0,0843
	slope	2,0349	1,6915	1,0000	1,6950
	EC20	0,0484	0,0371	0,0211	0,0372
EE2 (0,33 ng/mL) +E3 (1,67 ng/mL) +BPA (16,67 mg/L)	max	1,5199	1,5022	1,5026	1,5026
	EC50	0,0426	0,0381	0,0381	0,0381
	slope	2,5878	2,5737	1,0000	2,5947
	EC20	0,0250	0,0222	0,0095	0,0223
EE2 (0,33 ng/mL) +E3 (1,67 ng/mL) +BPA (16,67 mg/L)	max	1,4320	1,4355	1,4358	1,4358
	EC50	0,1130	0,0777	0,0777	0,0777
	slope	1,9464	2,0640	1,0000	2,0672
	EC20	0,0554	0,0397	0,0194	0,0397
EE2 (5 ng/mL) +E1 (5 ng/mL)	max	1,3655	1,3367	1,3372	1,3372
	EC50	0,0128	0,0099	0,0099	0,0099
	slope	1,7814	1,5611	1,0000	1,5620
	EC20	0,0059	0,0041	0,0025	0,0041
EE2 (0,5 ng/mL) +E3 (50 ng/mL)	max	1,5056	1,5096	1,5098	1,5098
	EC50	0,0390	0,0451	0,0451	0,0451
	slope	1,8786	1,8898	1,0000	1,8909
	EC20	0,0186	0,0217	0,0113	0,0217
EE2 (0,1 ng/mL) +E2 (0,1 ng/mL) +BPA (5 mg/L)	max	1,5191	1,5039	1,5041	1,5041
	EC50	0,0969	0,1024	0,1024	0,1024
	slope	2,6825	2,4990	1,0000	2,5024
	EC20	0,0578	0,0588	0,0256	0,0588
BPA (8,33 mg/L) +EE2aE2 (0,83 ng/mL)	max	1,6456	1,6597	1,6604	1,6604
	EC50	0,1745	0,1267	0,1268	0,1268
	slope	2,0048	1,9893	1,0000	1,9954
	EC20	0,0874	0,0631	0,0317	0,0633
BPA (12,5 mg/L) +E2aEE2 (0,63 ng/mL) +E3 (2,5 ng/mL)	max	1,8748	1,7090	1,7097	1,7097
	EC50	0,0567	0,0406	0,0406	0,0406
	slope	1,7375	1,9015	1,0000	1,9102
	EC20	0,0255	0,0196	0,0102	0,0197
E2aEE2 (0,06 ng/mL) +E3 (0,06 ng/mL) +BPA (6,25 mg/L)	max	1,4526	1,6610	1,6619	1,6619
	EC50	0,1791	0,1664	0,1664	0,1664
	slope	2,0711	1,9956	1,0000	2,0020
	EC20	0,0917	0,0831	0,0416	0,0833
EE2 (0,08 ng/mL) +E3 (0,83 ng/mL) +BPA (8,33 mg/L)	max	1,6899	1,6548	1,6555	1,6555
	EC50	0,1638	0,1418	0,1419	0,1419
	slope	1,9402	2,0065	1,0000	2,0122
	EC20	0,0802	0,0711	0,0355	0,0712
7 EDs (0,5 ng/mL)	max	1,7052	1,6687	1,6705	1,6705
	EC50	0,0684	0,0780	0,0780	0,0780
	slope	1,4614	1,5779	1,0000	1,5791
	EC20	0,0265	0,0324	0,0195	0,0324
IRG + 4-NF + BPA (0,1mg/L)	max	<LOD			
	EC50				
	slope				
	EC20				

5.4 Reálné vzorky

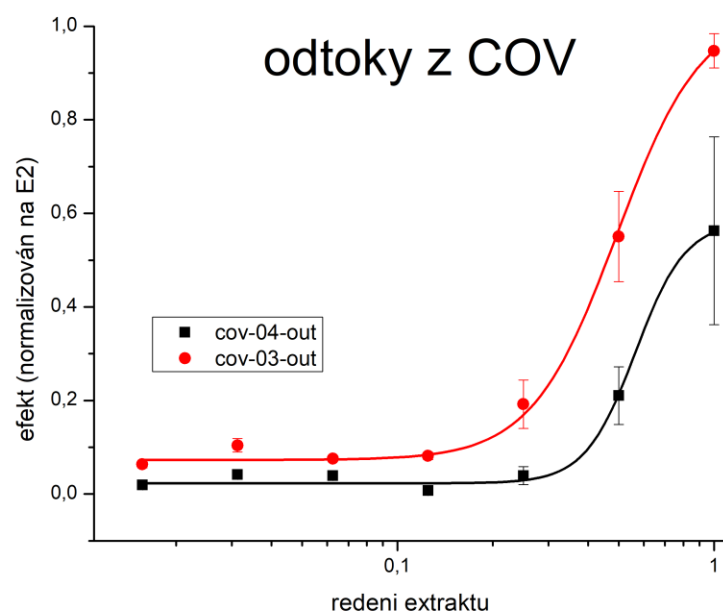
Byly analyzovány 4 vzorky odpadních vod a jeden vzorek sedimentu z recipientu pod jednou z čistíren (čov-02-out). Výsledky z chemické analýzy pomocí plynové chromatografie ukazují, že bisfenol A se vyskytuje skutečně hojně. Byl detekován ve všech vzorcích. Často se vyskytoval také irgasan. Přírodní estrogény a EE2 byly nad limitem detekce pouze v sedimentech (Tabulka 10), což byl zároveň jediný reálný vzorek, který obsahoval dostatek estrogenně aktivních látek, aby pro něj mohla být provedena predikce celé křivky dávka-odpověď.

Estrogenní aktivita nad limitem detekce byla pomocí testu s kvasinkami zjištěna u tří vzorků odtoků z čistíren odpadních vod (čov-01-out, čov-03-out a čov-04-out, Graf 13). U vzorku vod čov-02-out nebyl zjištěn estrogenní efekt. Byla však detekována antiestrogenní odezva (Graf 14). Nejvyšší estrogenní aktivita $27,30 \pm 6,35$ ng/mL EEQ byla naměřena ve vzorcích sedimentů (Tabulka 11).

Predikce podle dat z chromatografické analýzy silně nadhodnotila celkovou estrogenní aktivitu sedimentů (Graf 15). Naopak pro všechny odpadní vody byla kalkulace predikce nemožná, protože chemická analýza nedetekovala silné EDs a ostatní se vyskytovaly pouze v nepatrném množství vzhledem k citlivosti kvasinkového testu a jejich potenci látek.

Tabulka 10: Zde je souhrn výsledků z plynové chromatografie. Koncentrace analytů v sedimentu jsou uvedeny v ng/g, koncentrace ve vodách jsou uvedeny v ng/L. Limit detekce pro jednotlivé analyty a matrice je uveden v metodice (Tabulka 5).

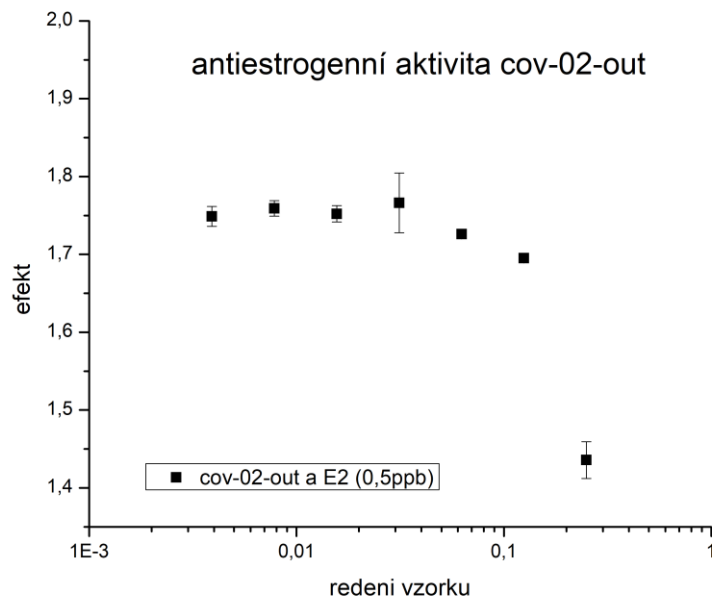
vzorek	analyt	koncentrace v matrici [ng/L, ng/g]
čov-01-out	BPA	75 ± 16
	ostatní	<LOD
čov-02-out	BPA	236 ± 57
	IRG	202 ± 20
	ostatní	<LOD
čov-03-out	4-nph	24 ± 7
	BPA	232 ± 3
	IRG	147 ± 8
	ostatní	<LOD
čov-04-out	BPA	312 ± 67
	IRG	164 ± 37
	ostatní	<LOD
sediment v recipientu (čov-02-out)	4-nph	3 ± 3
	IRG	229 ± 63
	BPA	47 ± 9
	E1	72 ± 8
	EE2	1 ± 2
	E3	7 ± 13



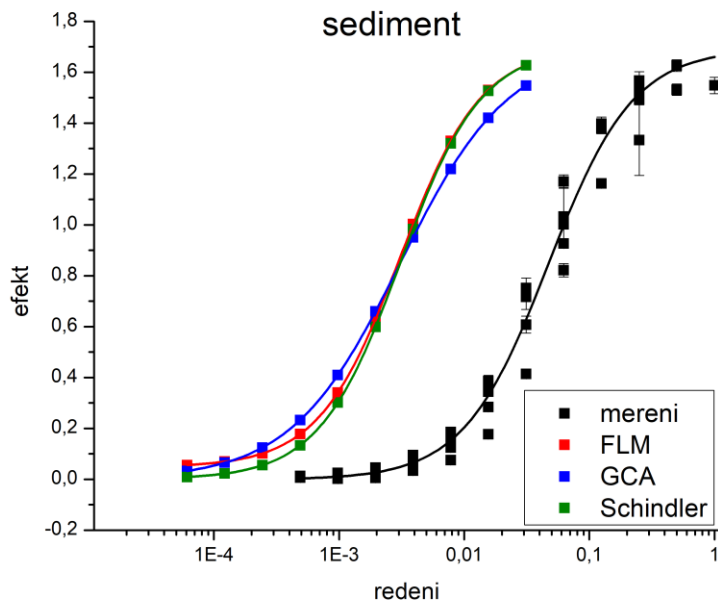
Graf 13: Výsledky estrogenní aktivity ve dvou vzorcích odtoků z ČOV čov-03-out a čov-04-out z β -galaktázidázového testu. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku ze tří opakování. Vzorek čov-02-out není zobrazen, protože dvě z pěti paralel nevykázaly estrogenní aktivitu a je tím pádem obtížné vyobrazit průměry celých křivek (Tabulka 11).

Tabulka 10: Výsledky z měření estrogenní aktivity reálných vzorků vod a sedimentů.

vzorek	aktivita	EEQ \pm SD v matrici [ng/L, ng/g]	limit detekce testu [ng/mL EEQ]
ČOV-01-OUT	estrogenita	<LOD (n=2)	0,13
		1,03 \pm 0,15 (n=3)	
ČOV-02-OUT	estrogenita	nedetekována	0,33
	antiestrogenita	detekována	
ČOV-03-OUT	estrogenita	1,70 \pm 0,23	0,17
ČOV-04-OUT	estrogenita	0,65 \pm 0,28	0,17
sediment v recipientu	estrogenita	27,30 \pm 6,35	0,31



Graf 14: Zobrazení antiestrogenní aktivity vzorku odpadních vod z β -galaktázidázového testu. Vzorek byl v různých ředěních měřen s konstantním přídatkem 0,5ng/mL 17 β -estradiolu. Čím více byl vzorek čov-02-out ředěný, tím vyšší byla celková odezva směsi a nabyla hodnoty odezvy samotného E2 (0,5ng/mL). Chybové úsečky byly sestrojeny jako směrodatná odchylka ze tří paralel.



Graf 15: Zobrazení predikce podle chromatografické analýzy (FLM, GCA a Schindlerův model) a výsledků kvasinkového testu (mereni). Sediment byl extrahován a testován celkem v pěti opakováních. Směrodatné odchylky vycházejí ze třech paralel v testu na kvasinkách.

6 Diskuze

První cílem této práce bylo ověřit a porovnat modely pro predikci směsí endokrinních disruptorů působících stejným mechanismem přímo na receptorové místo. Proměřením křivek dávka-odpověď jednotlivých komponent byly zjištěny potenciály jednotlivých látek. Ty se liší v závislosti na aplikovaném testu (Jarošová, 2014b). Zatímco pro luciferázový i β -galaktozidázový test byl nejpotentnější látkou 17 β -estradiol (Graf 4 a 9). V jiných studiích též s rekombinantními kvasinkami a juvenilní pstruha duhového vykazoval nejsilnější afinitu k estrogenímu receptoru 17 α -ethinylestradiol (Thorpe, 2006; Salste, 2007), EE2 vykazoval vyšší potenci než E2 i při použití β -galaktozidázového testu (Yang, 2014). Látka 17 β -estradiol byl používán ve všech testech jako standard, stejně jako v jiných studiích se jeho odezvy mezi jednotlivými měřeními lišily (Conley, 2017).

V některých protokolech jsou standardy estrogeních látek rozpouštěny v 96% ethanolu jako alternativa k dimethylsulfoxidu (Thorpe, 2006; Leskinen, 2005; Routledge, 1996). Z důvodu přežívání kvasinek musí být EtOH odpařen do sucha, DMSO by zase nemělo v průběhu testu přesáhnout 3 % celkového objemu. Testováním 17 β -estradiolu a 17 α -ethinylestradiolu bylo zjištěno, že pravděpodobně nedochází ke zpětnému kvantitativnímu rozpuštění analytu v médiu po odpaření ethanolu. Na výsledky, kdy je analyt rozpuštěn v 96% EtOH, se tedy nedá příliš spolehnout. Z tohoto důvodu a kvůli nízké rozpustnosti ve 30% DMSO (maximálně 25 mg/L) nemohl být 4-nonylfenol zahrnut do predikcí (Kapitola 9.1).

Pro ověření predikcí byly testovány téměř ekvipotentní směsi čistých chemických standardů. Snaha používat experimentálně zjištěné standardizační faktory (Tabulka 7 a 8) pro výpočet teoretických parametrů křivek jednotlivých komponent a následně podle nich sestojit predikci se neosvědčila. Tyto faktory byly testovány především z důvodu snížení počtu vzorků a standardů při testování bez destičkového uspořádání. Cílem bylo zjistit, zdali je možné jednou naměřené standardizační faktory používat opakovaně i pro predikci směsí změřených v následujících experimentech. Už při jejich validaci pro křivky samostatných látek však predikce podle faktorů neodpovídala naměřeným hodnotám a selhávala, což vnáší do celého výsledku značné chyby zvláště u β -galaktozidázového testu (Graf 5 a 10). Pro dosažení co největší přesnosti se tedy osvědčilo měřit křivky jednotlivých komponent směsného vzorku vždy v rámci daného měření a pro výpočet predikcí používat tyto parametry křivek. To vzhledem k instrumentaci umožňoval pouze β -galaktozidázový test, který se provádí v 96 jamkové destičce.

Z výsledků bioluminiscenčního i β -galaktozidázového testu vychází ze tří aplikovaných modelů GCA jako nejméně vhodný pro predikci celého průběhu logistické křivky. V bioluminiscenčním testu

jsou křivky predikcí dvou spolehlivějších modelů téměř celé obsaženy v konfidenčním intervalu (Graf 6 a 7). Výsledky z β -galaktozidázového testu byly vyhodnoceny pomocí Tukeyho testu mnohonásobného porovnání, který na 95% hladině spolehlivosti určil predikce EC_{20} pomocí GCA jako odlišné od ostatních predikcí a naměřených hodnot (Graf 12). Přestože GCA spolehlivě predikuje parametr EC_{50} , je podle výsledků prezentovaných v této diplomové práci nedostatečný pro predikci působení v rozsahu celé logistické křivky. Pravděpodobně je tomu tak proto, že je při výpočtu používán nejmenší počet parametrů v porovnání s ostatními modely (Kapitola 8.11). Čím více parametrů je do výpočtu zahrnuto, tím přesněji jsou křivky predikovány (Ting, 2017). GCA se osvědčil pro predikci standardů, které měly podobné maximum a směrnici křivky (Thorpe, 2006). A pro predikci samotného parametru EC_{50} (Yang, 2014). Při porovnání modelů CA, GCA a FLM pro ekvipotentní a ekvimolární směsi fytoestrogenů, kosmetiky a průmyslových chemikálií nejlépe predikoval FLM. Přestože křivka většinou nespádala do konfidenčního intervalu měřených hodnot (Schlotz, 2017).

Pro směsi fytohormonů byla predikce pomocí FLM méně přesná oproti industriálním chemikáliím a látkám z kosmetických přípravků (Schlotz, 2017). V této diplomové práci převažovalo testování ekvipotentních směsí přirozených estrogenů s průmyslovými chemikáliemi, které v použitých testech působí přímo na estrogení receptor. Pokud jsou testovány ekvimolární směsi nebo směsi o stejné koncentraci jednotlivých složek, není nutné látky s výrazně slabším potenciálem do predikce zahrnovat, protože jejich příspěvek k celkové aktivitě je v dané koncentraci naprosto zanedbatelný. Směs 7 EDs, kde se každá komponenta nacházela v koncentraci 0,5 ng/mL, byla plnohodnotně predikována pomocí pouze pěti nejsilnějších estrogeně aktivních látek (Graf 11). Směs tří méně silných estrogeně aktivních látek (BPA, IRG,4-NF) o koncentraci 0,1 mg/L každé látky nevykázala vyšší odpověď, než byl limit detekce β -galaktozidázového testu (Tabulka 9).

Někteří autoři při sestrojování predikcí uvažují minimum limitní k nule nebo přímo volí hodnotu nula jako výchozí (Conley, 2017). Při odečtení blanku nebo při prokládání křivek se může minimum dostat i do oboru záporných čísel. Tomu se vyhýbá Schindlerův model, který s minimem nepočítá (Schindler, 2017). V některých případech je také nutné odstranit body křivky s nejvyšší koncentrací, která je pro testované organismy toxická, mohly by narušit správné proložení křivek (Schlotz, 2017). Zvláště u reálných vzorků je třeba zvažovat vyhodnocení takového výsledku. Nespecifická toxicita totiž může maskovat estrogení nebo méně častou antiestrogení aktivitu (Jarošová, 2014a).

V žádném ze čtyř vzorků odtoků z čistíren odpadních vod nebyl nalezen jediný z nejsilnějších estrogeních disruptorů jako 17β -estradiol, estron nebo 17α -ethinylestradiol nad limitem detekce chromatografické metody (Tabulka 5). Zvláště estron, jakožto produkt rozpadu estradiolu, bývá nezdědk detekován v odpadních, povrchových i pitných vodách (Conley, 2017; Luo, 2014; Salste, 2007).

Bisfenol A byl naopak kvantifikován ve všech vzorcích. Což potvrzuje, že se jedná o velice rozšířený mikropolutant (Vandenberg, 2010). Jeho koncentrace byly ovšem vzhledem k jeho potenci příliš nízké ($75 \pm 16 - 312 \pm 67$ ng/L) a nestačily na výpočet ani nejnižšího bodu predikce podle modelů. Stejně tomu bylo i u 4-nonylfenolu (24 ng/L) a irgasanu (147 – 201 ng/L) detekovaného v jednom, resp. ve dvou vzorcích (Tabulka 10). Přestože ve vzorcích nebyl žádný z nejsilnějších estrogenů, byla u tří vzorků vod detekována estrogení aktivita (Tabulka 11, Graf 13). V jednom byla zjištěna antiestrogení aktivita (Graf 14). V celoevropské studii jedna třetina vzorků odpadních vod vykazovala estrogení aktivitu vyšší než limit detekce; 0,5 ng/L EEQ, antiestrogení aktivita je spíše výjimečná (Jarošová, 2014a).

Predikce pomocí modelů podle výsledků chromatografické analýzy zaměřené na známé estrogení disruptory se od celkové estrogení aktivity měřené pomocí ekotoxikologických testů lišila i v předešlých studiích (Thorpe, 2006; Aerni, 2004; Wang, 2011). Autoři vysvětlují rozpory například v rozdílech mezi extrakčními metodami pro vzorky měřené analyticky a testované *in vitro* nebo přítomností estrogeně aktivních látek, na které nebyla zacílena chromatografická analýza. Nabízí se i varianta, že se jednotlivé analyty vyskytovaly pod limitem detekce, ale společně vydaly měřitelnou odpověď (Schlotz, 2017; Silva, 2002). To je vzhledem k relativně nízkým limitům detekce metody a celkové estrogení aktivitě zjištěné ve vzorcích odtoků z ČOV pravděpodobné. V *in vitro* testech byla naměřena i více než 10x vyšší aktivita, než kterou by teoreticky mohly vysvětlit silné estrogény (E1, E2, E3, EE2, BPA), kdyby se ve vzorcích odtoků z ČOV vyskytovaly těsně kolem limitu detekce metody chromatografické analýzy (Tabulka 5 a 11). Limity chromatografické analýzy včetně extrakčních kroků a zakoncentrování jsou uvedeny v Tabulce 5. Pro *in vitro* β -galaktozidázový test byly limity detekce stanoveny jako 15 % maxima odezvy 17β -estradiolu, přesné hodnoty pro každý test jsou uvedeny v Tabulce 11. V celoevropské studii vzorků odpadních vod byl limit detekce *in vitro* testu stanoven na 0,5 ng/mL EEQ (Jarošová, 2014a).

Jak již bylo zmíněno, některé přírodní estrogény se transformují v jiné (E2 na E1), které mají menší estrogení potenciál; afinitu vázat se na receptor (Graf 4 a 9). Při diskuzi rozporů ve výsledcích lze uvažovat o časovém rozpětí mezi odběrem a zpracováním vzorku. Avšak estrogení aktivita vzorků zpracovaných do 48 hodin a po 45 dnech od odběru se signifikantně nelišila (Jarošová, 2014a).

Na odezvu reálných vzorků lze hledět z další perspektivy. Náповědu, které látky jsou zodpovědné za estrogení aktivitu, může poskytnout znalost maxima křivek dávka-odpověď vzorků oproti standardům. Nejsilnější estrogeně aktivní látky E1, E2 a EE2, které byly v minulosti odhaleny jako hlavní přispěvatelé estrogení aktivity v reálných vzorcích (Desbrow, 1998; Salste, 2007), jsou plní agonisté. Pokud křivka měřeného vzorku nedosahuje maxima standardu 17β -estradiol, pak by to

mohlo znamenat, že významný podíl v aktivitě je způsoben i dalšími látkami z řad parciálních agonistů (Graf 13).

U vytipovaného sedimentu, kde bylo v malém množství detekováno všech sedm sledovaných analytů (Tabulka 10), predikce nadhodnotila odezvu oproti kvasinkovému testu (Graf 15). To může být připisováno přítomnosti neznámých antiestrogenů (Wang, 2011). Potok, kde byl sediment odebrán, je recipientem ČOV (čov-02-out), na jejímž odtoku byl odebrán právě vzorek vykazující antiestrogenní aktivitu. Tu způsobují mimo jiné účinné látky farmak (Ezechiáš, 2016a). Nadhodnocení estrogenní aktivity pomocí EEQ bylo pro sedimenty pozorováno i v případové studii na povodí řeky Liao (Wang, 2011).

7 Závěr

Z dat pro testování směsí standardů vyplynulo, že parametr EC_{50} je dobře predikován všemi třemi aplikovanými modely (GCA, FLM a Schindlerův model). Při snaze o predikci celé křivky dávka-odpověď už výsledky pomocí GCA nebyly spolehlivé, proto je zde vhodnější použít FLM nebo Schindlerův model. To bylo potvrzeno Tukeyho testem mnohonásobného porovnání na výsledcích β -galaktozidázového testu a konfidenčním intervalem v bioluminiscenčním testu. Spolehlivě predikovat celý průběh křivky je výhodné například pro vzorky s neznámými látkami, protože stanovení maxima může naznačit, jestli jsou přítomni spíše plní agonisté nebo parciální agonisté.

Estrogenní nebo antiestrogenní aktivita byla detekována ve všech vzorcích odtoků z čistíren odpadních vod. Přestože analyticky nebyl detekován žádný ze silných estrogenů, který by mohl aktivitu způsobit. Dříve bylo prokázáno, že i při výskytu jednotlivých komponent pod limitem detekce, mohou látky společně působit měřitelnou aktivitu. V tomto případě jsou ale limity detekce silných estrogenů natolik nízké, že by ani při výskytu na úrovni limitů detekce nemohly látky společně způsobit tak vysokou estrogenní aktivitu, jaká byla naměřena *in vitro*. To nasvědčuje druhému možnému vysvětlení, že je nezbytné pokračovat v odhalování nových estrogenně aktivních látek z oblasti průmyslu a každodenně využívaných přípravků, které jsou sice v nízkých koncentracích, avšak často detekovány.

U reálného vzorku sedimentu se predikce podle chromatografické analýzy rozchází s výsledky testů celkové estrogenní aktivity. Predikce výrazně nadhodnotila celkovou aktivitu. Jak již bylo zmíněno, jednotlivé látky se vyskytovaly pod limitem detekce a nebo byly přítomny látky, na něž nebyla cílena chromatografická analýza. Poslední úvaha je podpořena detekovanou antiestrogenní aktivitou v odtoku z ČOV. Sediment byl odebrán právě v recipientu této čistírny.

8 Citovaná literatura

- Adams, N. R. (1998). Clover phytoestrogens in sheep in western Australia. *pure and Applied Chemistry*, 70(9), 1855-1862.
- Aerni, H.-R., et al. (2004). Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), stránky 688-696.
- Ahmed, M. B., et al. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. . *Journal of hazardous materials*, 323, stránky 274-298.
- Andersson, A.-M., et al. (2012). *The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments - The Weybridge + 15 (1996-2011) report*. Luxembourg: European Environment Agency.
- Attina, T. M., et al. (2016). Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(12), stránky 996-1003.
- Bae, B., et al. (2002). The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-A leaching from epoxy resin. *Water Science and Technology*, 46(11-12), stránky 381-387.
- Baillie-Hamilton, P. F. (2002). Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 8(2), stránky 185-192.
- Birnbaum, L. S. & DeVito, M. J. (1995). Use of toxic equivalency factors for risk assessment for dioxins and related compounds. *Toxicology*, 105(2-3), stránky 391-401.
- Bittner, G. D., et al. (2014). Estrogenic chemicals often leach from BPA-free plastic products that are replacements for BPA-containing polycarbonate products. *Environmental Health*, 13(1), 41.
- Brotons, J. A., et al. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental health perspectives*, 103(6), 608.
- Caballero-Casero, N., et al. (2016). Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica chimica acta*, 908, stránky 22-53.
- Conley, J. M., et al. (2017). Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 US drinking water treatment plants. *Science of the Total Environment*, 579, stránky 1610-1617.
- Desbrow, C., et al. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science & technology*, 32(11), stránky 1549-1558.
- Dougherty, J. A., et al. (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of environmental quality*, 39(4), stránky 1173-1180.
- EFSA. (13. 10 2016). *Bisphenol A immune system safety to be reviewed*. Načteno z www.efsa.europa.eu: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/161013>

- EPA, US (2010). *Bisphenol A Action Plan*. CASRN 80-05-7.
- European Union. (2008). *European Union Risk Assessment Report: Environment Attendum of April 2008*. CAS: 80-05-7: Joint Research Centre Scientific and Technical Reports.
- Ezechiáš, M., & Cajthaml, T. (2016b). Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures. *Toxicology*, *359*, 58-70.
- Ezechiáš, M., et al. (2016a). Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere*, *152*, stránky 284-291.
- Ghisari, M., & Bonfeld-Jorgensen, E. C. (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicology letters*, *189*(1), 67-77.
- Giulivo, M., et al. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental research*, *151*, 251-264.
- Guerra, P., et al. (2015). Bisphenol-A removal in various wastewater treatment processes: operational conditions, mass balance, and optimization. *Journal of environmental management*, *152*, 192-200.
- Ho, K. L., et al. (2017). Glucuronide and Sulfate Conjugates of Bisphenol A: Chemical Synthesis and Correlation Between Their Urinary Levels and Plasma Bisphenol A Content in Voluntary Human Donors. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *73*(3), 410-420.
- Howard, G. J., & Webster, T. F. (2009). Generalized concentration addition: a method for examining mixtures containing partial agonists. *Journal of theoretical biology*, *259*(3), 469-477.
- Howard, G. J., et al. (2010). Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists. *Environmental health perspectives*, *118*(5), str. 666.
- Huang, Y. Q., et al. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, stránky 91-99.
- Chang, H., et al. (2011). Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *water research*, *45*(2), stránky 732-740.
- Chen, C. Y., et al. (2007). Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, *378*(3), stránky 352-365.
- Chevolleau, S., et al. (2016). A consolidated method for screening the endocrine activity of drinking water. *Food chemistry*, *213*, stránky 274-283.
- Ike, M., et al. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water science and technology*, *53*(6), 153-159.
- Jálová, V., et al. (2013). Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environment international*, *59*, 372-383.

- Jarošová, B., et al. (2014b). What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environment international*, 64, stránky 98-109.
- Jarošová, B., et al. (2014a). Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), stránky 10970-10982.
- Jiao, F. R., et al. (2008). Production and Market Analysis of Bisphenol A. *Chemical Industry*, 26(9), stránky 21-33.
- Jobling, S., et al. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), str. 32.
- Johnson, A. C., et al. (2000). Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment*, 256(2-3), stránky 163-173.
- Kang, J. H., et al. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2-3), stránky 79 - 89.
- Kang, J. H., & Kondo, F. (2002). Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 43(3), 0265-0269.
- Kasprzyk-Hordern, B., et al. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water research*, 43(2), 363-380.
- Kawagoshi, Y., et al. (2003). Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(2), 269-274.
- Kidd, K. A., et al. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), stránky 8897-8901.
- Kim, S. D., et al. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water research*, 41(5), stránky 1013-1021.
- Kortenkamp, A., & Altenburger, R. (1999). Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. *Science of the total environment*, 233(1-3), 131-140.
- Krishnan, A. V., et al. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132(6), 2279-2286.
- Lagarde, F., et al. (2015). Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*, 14(1), str. 13.
- Langová, J. (2013). Diplomová práce. Stanovení zástupců endokrinních disruptorů ve vzorcích odpadních vod v ČR.
- Lee, H. J., et al. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences*, 75(1), 40-46.
- Leskinen, P., et al. (2005). Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere*, 61(2), stránky 259-266.

- Li, J., et al. (2013). Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil–water system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, stránky 3-7.
- Li, X., et al. (2013). 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment international*, 52, 81-86.
- Lim, Y. L., et al. (2017). Estrogenic compounds, an emerging aquatic pollutant: an overview of their measurement and treatment methods. *Waste Recycling Research*, 1(1).
- Lintelmann, J., et al. (2003). Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75(5), stránky 631-681.
- Liu, D., et al. (2016). Occurrence, distribution, and risk assessment of alkylphenols, bisphenol A, and tetrabromobisphenol A in surface water, suspended particulate matter, and sediment in Taihu Lake and its tributaries. *Marine pollution bulletin*, 112(1), 142-150.
- Liu, Z. H., et al. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the total environment*, 407(2), stránky 731-748.
- Liu, Z. H., et al. (2010). A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Research*, 44(2), stránky 567-577.
- Lopez-Espinosa, M. J., et al. (2007). Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food additives and contaminants*, 24(1), 95-102.
- Luo, Y., et al. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473, 619-641.
- Meerts, I. A., et al. (2001). In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives*, 109(4), 399.
- Meyer, T., & Keurentjes, J. (Eds.). (2005). Handbook of polymer reaction engineering. Weinheim: GmbH & Co. KGaA. ISBN: 3-527-31014-2
- Moos, W. H., et al. (2009). Review of the effects of 17 α -estradiol in humans: a less feminizing estrogen with neuroprotective potential. *Drug development research* (70), 1-21.
- Nanjappa, M. K., et al. (2012). The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biology of reproduction*, 86(5), 135-1.
- Newbold, R. R., et al. (2009). Environmental estrogens and obesity. *Molecular and cellular endocrinology*, 304(1-2), 84-89.
- Pojana, G., et al. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33(7), stránky 929 - 936.
- Pop, A., et al. (2014). Endocrine disruptive effect of selected phytoestrogens from soy and green tea in case of individual and combined in vitro exposure. *FARMACIA*, 62(6), stránky 1126-1142.

- Racz, L., & Goel, R. K. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of Environmental Monitoring*, *12*(1), stránky 58-70.
- Rostkowski, P., et al. (2011). Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents. *Environmental science & technology*, *45*(24), stránky 10660-10667.
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental toxicology and chemistry*, *15*(3), 241-248.
- Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *127*(1-2), 27-34.
- Salste, L., et al. (2007). Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. *Science of the total environment*, *378*(3), 343-351.
- Seeger, B., et al. (2016). Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . *PLoS one*, *11*(1), str. e0147490.
- Segner, H., et al. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and environmental safety*, *54*(3), stránky 302-314.
- Schindler, M. (2017). Theory of synergistic effects: Hill-type response surfaces as 'null-interaction' models for mixtures. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, *14*(1), str. 15.
- Schlotz, N., et al. (2017). In vitro observations and in silico predictions of xenoestrogen mixture effects in T47D-based receptor transactivation and proliferation assays. *Toxicology in Vitro*, *45*, stránky 146-157.
- Sifakis, S., et al. (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on the male and female reproductive systems. *Environmental toxicology and pharmacology*, *51*, 56-70.
- Silva, E., et al. (2002). Something from "nothing" – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental science & technology*, *36*(8), stránky 1751-1756.
- Solé, M., et al. (2000). Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology*, *34*(24), stránky 5076-5083.
- Sosvorova, L. K., et al. (2017). Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS. *Talanta*, *174*, 21-28.
- Staples, C. A., et al. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, *36*(10), 2149-2173.
- Takayanagi, S., et al. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology letters*, *167*(2), 95-105.
- Takeuchi, T., & Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and biophysical research communications*, *291*(1), 76-78.

- Thorpe, K. L., et al. (2006). An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents. *Environmental Health Perspectives*, 114, stránky 90-97.
- Ting, Y. F., et al. (2017). Mathematical modeling for estrogenic activity prediction of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol mixtures in wastewater treatment plants effluent. *Ecotoxicology*, 26(10), stránky 1327-1335.
- Tsai, W. T. (2006). Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 24(2), 225-255.
- US EPA. (6. 3 2018). *Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination*. Načteno z <https://www.epa.gov/>: <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-3-ccl-3>
- Vandenberg, L. N., et al. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, 24(2), 139-177.
- Vandenberg, L. N., et al. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental health perspectives*, 118(8), 1055.
- Vandenberg, L. N., et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33(3), stránky 378-455.
- Wang, L., et al. (2011). Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution*, 159(1), stránky 148-156.
- Wangmo, C., et al. (2018). In vitro assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments—a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*.
- Watt, J., et al. (2016). Generalized Concentration Addition Modeling Predicts Mixture Effects of Environmental PPAR γ Agonists. *Toxicological Sciences*, 153(1), stránky 18-27.
- Wehmas, L. C., et al. (2011). Screening complex effluents for estrogenic activity with the T47D-KBluc cell bioassay: Assay optimization and comparison with in vivo responses in fish. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(2), stránky 439-445.
- Welshons, W. V., et al. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental health perspectives*, 111(8), 994.
- Welshons, W. V., et al. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147(6), s56-s69.
- WHO (19.3.2018). *who.int*. Načteno z Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1835>
- Windsor, F. M., et al. (2018). Endocrine disruption in aquatic systems: up-scaling research to address ecological consequences. *Biological Reviews*, 93(1), stránky 626-641.
- Wu, M., et al. (2016). Chemical analysis of fish bile extracts for monitoring endocrine disrupting chemical exposure in water: Bisphenol A, alkylphenols, and norethindrone. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(1), 182-190.

- Yang, R., et al. (2014). Combined effects of estrogenic chemicals with the same mode of action using an estrogen receptor binding bioassay. *Environmental toxicology and pharmacology*, 38(3), stránky 829 - 837.
- Ying, G. G., et al. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment international*, 28(6), 545-551.
- Yu, Y., et al. (2011). Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(4), stránky 871-878.
- Zava, D. T., et al. (1997). Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environmental Health Perspectives*, 105(Suppl 3), stránky 637- 645.
- Zhou, Y., et al. (2017). Neurotoxicity of low bisphenol A (BPA) exposure for young male mice: Implications for children exposed to environmental levels of BPA. *Environmental Pollution*, 229, 40-48.
- Žalmanová, T., et al. (2016). Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution-a review. *Czech Journal of Animal Sciences*, 61, 433-449.

9 Bibliografie k Tabulce 1

- [1] Bitsch, N., et al. (2002). Estrogenic activity of musk fragrances detected by the E-screen assay using human mcf-7 cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(3), 0257-0264.
- [2] Ezechiáš, M. & Cajthaml, T. (2016). Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures. *Toxicology*, 359, stránky 58-70.
- [3] Ezechiáš, M., et al. (2016). Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere*, 152, stránky 284-291.
- [4] Ghisari, M., et al. (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicology letters*, 189(1), stránky 67-77.
- [5] Gutleb, A. C., et al. (2005). T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 231-238.
- [6] Howard, G. J., et al. (2010). Generalized concentration addition predicts joint effects of aryl hydrocarbon receptor agonists with partial agonists and competitive antagonists. *Environmental health perspectives*, 118(5), 666.
- [7] Chang, H. S., et al. (2009). The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of hazardous materials*, 172(1), 1-12.
- [8] Isidori, M., et al. (2009). Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environment international*, 35(5), 826-829.
- [9] Jarošová, B., et al. (2014). Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), stránky 10970-10982.

- [10] Kasprzyk-Hordern, B., et al. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water research*, 43(2), 363-380.
- [11] Kristensen, D., et al. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International journal of andrology*, 35(3), 377-384.
- [12] Lester, J. N., & Birkett, J. W. (2002). *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. CRC Press.
- [13] Lintelmann, J., et al. (2003). *Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 75(5), stránky 631-681.
- [14] Liu, Z. H., et al. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the total environment*, 407(2), 731-748.
- [15] Liu, Z. H., et al. (2010). A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Research*, 44(2), 567-577.
- [16] Luo, Y., et al. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473, 619-641.
- [17] Pillon, A., et al. (2005). Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor- α : application to environmental analysis. *Environmental Health Perspectives*, 113(3), 278.
- [18] Rostkowski, P., et al. (2011). Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents. *Environmental science & technology*, 45(24), 10660-10667.
- [19] Seeger, B., et al. (2016). Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . *PloS one*, 11(1), str. e0147490.
- [20] Schlotz, N., et al. (2017). In vitro observations and in silico predictions of xenoestrogen mixture effects in T47D-based receptor transactivation and proliferation assays. *Toxicology in Vitro*, 45, stránky 146-157.
- [21] Silva, E., et al. (2002). Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental science & technology*, 36(8), stránky 1751-1756.
- [22] Singh, K. P., et al. (2004). Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55(2), 227-255.
- [23] Tijani, J. O., et al. (2013). A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds: sources, effects, removal, and detections. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(11), 1770.
- [24] Velasco-Santamaría, Y. M., et al. (2011). Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 105(1-2), 107-118.