VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZPŮSOBY ZPRACOVÁNÍ VODY PRO IN VITRO DETEKCI ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ

METHODS OF WATER SAMPLES PROCESSING WITH SUBSEQUENT IN VITRO DETECTION OF ENDOCRINE DISRUPTERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Romain Oliver Daniel
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — RNDr. Mgr. Michal Bittner, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2018

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1270/2017
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student:	**Romain Oliver Daniel**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Biotechnologie
Vedoucí práce:	**RNDr. Mgr. Michal Bittner, Ph.D.**
Akademický rok:	2017/18

Název bakalářské práce:

Způsoby zpracování vody pro in vitro detekci endokrinních disruptorů

Zadání bakalářské práce:

V rámci teoretické práce BP budou splněny následující cíle:
1) Rešerše aktuálních postupů zpracování estrogenních a androgenních hormonů ve vodě (např. povrchové či odpadní).
2) Detailní charakterizace nejčastěji používaných technik, a to extrakce na tuhou fázi (SPE), kapalinová extrakce (LLE – liquid liquid extraction), vakuová evaporace, lyofilizace, reverzní osmóza a nanofiltrace.
V rámci praktické části BP budou splněny následující cíle:
1) Provedena úprava vodných vzorků obsahujících endokrinní disruptory dvěma vybranými metodami
2) Otestování upravených vodných vzorků vhodnými in vitro metodami (na bázi transgenních buněčných linií) a srovnání účinnosti zvolených metod úpravy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Romain Oliver Daniel student(ka)	RNDr. Mgr. Michal Bittner, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu
V Brně dne 31.1.2018		prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D. děkan

ABSTRAKT

V uplynulých letech vzrostl zájem o sledování estrogenních látek ve vodním prostředí kvůli jejich nepříznivým účinkům na zdraví lidí a dalších obratlovců. Zvláštní pozornost je věnována analytickým metodám používaným ke kvantifikaci těchto látek ve vzorcích vody. Tyto metody jsou instrumentální nebo biologické (*in vitro*, *in vivo*). Kvůli velmi nízkému množství estrogenů ve vodě ($ng \cdot l^{-1}$) a nízké mezi detekce analytických metod je potřeba tyto vzorky zakoncentrovat. K zakoncentrování vodných vzorků se dnes běžně používá extrakce na tuhou fázi (SPE) nebo kapalinová extrakce (LLE).

Tato bakalářská práce představuje reverzní osmózu (RO) a nanofiltraci jako další možnou metodu prekoncentrace vodných vzorků. Práce je zaměřena na prekoncentraci obohacených vzorků vodovodní vody čtyřmi estrogeny – estronem (E1), 17β-estradiolem (E2), estriolem (E3) a 17α-ethynylestradiolem (EE2) – i vzorků povrchové vody ze tří brněnských toků pomocí RO a SPE a porovnání jejich účinnosti pomocí biotestu estrogenity na stabilně transfekované buněčné linii hERα-HeLa-9903. Využitím RO byly estrogeny zakoncentrovány s různou výtěžností – nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo u EE2 129,29 %, nejnižší u E2 38,53 %. Ve vzorcích povrchové vody nebylo naměřené detekovatelné množství estrogenů.

RO se jeví jako metoda použitelná pro prekoncentraci vodných vzorků před *in vitro* analýzou endokrinních disruptorů, je ovšem zapotřebí další optimalizace této metody. Vzorky zpracované metodou SPE nebyly do termínu odevzdání bakalářské práce změřeny, srovnání účinnosti RO a SPE tedy provedeno nebylo.

ABSTRACT

In recent years, interest in monitoring of estrogenic compounds in water environment due to their adverse effects on human and animal health has been increased. Partiucular attention is paid to analytical techniques used to quantify estrogens in water samples, such as instrumental and biological techniques (*in vitro, in vivo*). Water samples need to be concentrated due to very low estrogen levels ($ng \cdot L^{-1}$) and low limit of detection of used analytical methods. Solid phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) are comonly used to concentrate water samples.

This bachelor thesis represents reverse osmosis (RO) and nanofiltration (NF) as another possible methods for this purpose. This thesis is focused on the preconcentration of water samples spiked with four estrogens (estrone E1, 17β-estradiol E2, estriol E3 and 17α-ethynylestradiol EE2) and surface water samples taken from three watercourses in city of Brno using RO and SPE and its comparison of their effeciency. This was evaluated by *in vitro* estrogenicity assay on the stably transfected cell line hERα-HeLa-9903.

By using RO, estrogens were concentrated with different recovery – the highest recovery was reached for EE2 129.29%, lowest for E2 38.53%. No detectable amount of estrogen has been detected in surface water samples.

RO appears to be a suitable method to the water samples preconcentration prior to *in vitro* analysis of endocrine disrupting compounds. Water samples treated by the SPE method were not measured untill the sunbmission of bachelor thesis, so the RO and SPE efficiency was not performed.

KLÍČOVÁ SLOVA

endokrinní disruptory, endokrinní disrupce, estrogeny, extrakce na tuhou fázi, reverzní osmóza, *in vitro* test, prekoncentrace vzorků, hERα-HeLa-9903

KEY WORDS

endocrine disrupting compounds, endocrine disruption, estrogens, solid phase extraction, reverse osmosis, in vitro analysis, water samples preconcentration, hERα-HeLa-9903

DANIEL, R. O. *Způsoby zpracování vody pro in vitro detekci endokrinních disruptorů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 61 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mgr. Michal Bittner, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

……………………………

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Těmito několika řádky bych rád poděkoval pár lidem, kteří stáli u zrodu této bakalářské práce. Na prvním místě celým srdcem děkuji svému vedoucímu práce, panu RNDr. Mgr. Michalu Bittnerovi za možnost pracovat v jeho týmu na tomto tématu na pracovišti RECETOX, za nekonečnou trpělivost a jeho vřelý přátelský přístup. Rovněž děkuji svému konzultantovi Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za projevenou trpělivost a podporu. Na druhém místě děkuji Chimi Wangmo za čas, který se mnou strávila v laboratoři a její ochotu mi pomoci i přes menší jazykovou bariéru. A také děkuji Bc. Barboře Taszkové za pomoc při práci v buněčné laboratoři při provádění in vitro biotestu.

OBSAH

ÚVOD **8**
TEORETICKÁ ČÁST **9**
1 Problematika endokrinní disrupce **9**
1.1 Definice endokrinních disruptorů 9
1.2 Klasifikace endokrinních disruptorů 10
1.2.1 Estrogenní látky 11
1.2.2 Androgenní látky 13
1.3 Molekulární mechanismus endokrinní disrupce 14
1.3.1 Estrogenita 14
1.3.2 Androgenita 15
2 Metody zpracování vzorků vody pro detekci endokrinních disruptorů **16**
2.1 Vzorkování vody 16
2.1.1 Aktivní vzorkování 16
2.1.2 Pasivní vzorkování 16
2.2 Filtrace vodných vzorků 17
2.3 Aktuální metody prekoncentrace vodných vzorků estrogenů 17
2.3.1 Extrakce na tuhou fázi 17
2.3.2 Kapalinová extrakce 18
2.3.3 Vakuové odpařování 19
2.3.4 Lyofilizace 20
2.4 Membránové tlakové procesy 21
2.4.1 Reverzní osmóza 21
2.4.2 Nanofiltrace 23
3 Metody detekce endokrinních disruptorů **23**
3.1 Instrumentální metody 23
3.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 23
3.1.2 Plynová chromatografie 24
3.1.3 Hmotnostní spektrometrie 24
3.2 *In vitro* metody 24
3.2.1 Proliferace buněk 24
3.2.2 Exprese reportérových genů 25
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **26**
4 Materiál **26**
4.1 Chemikálie 26
4.1.1 Příprava roztoků, pufrů a médií 27
4.2 Buněčná kultura hERα-HeLa-9903 28
4.3 Analyzované vzorky 29
4.3.1 Vzorek 1 – Ponávka 29
4.3.2 Vzorek 2 – Svitava 29
4.3.3 Vzorek 3 – Kohoutovický potok 30

5 Experimentální zařízení **31**
5.1 Zařízení pro reverzní osmózu 31
5.2 Zařízení pro extrakci na tuhou fázi 32
5.3 Zařízení pro *in vitro* biotest 32
6 Metody **33**
6.1 Příprava a zpracování vzorků vody 33
6.1.1 Příprava vzorků vodovodní vody obohacených estrogeny 33
6.1.2 Zpracování environmentálních vzorků 34
6.2 Prekoncentrace vzorků vody vybranými metodami 35
6.2.1 Metodika reverzní osmózy 35
6.2.2 Metodika extrakce na tuhou fázi 35
6.3 Metodika *in vitro* biotest 36
6.3.1 Práce s buněčnou linií hERα-HeLa-9903 36
6.3.2 Provedení biotestu 36
VÝSLEDKY A DISKUZE **38**
7 Prekoncentrace vodných vzorků pomocí reverzní osmózy **38**
7.1 Metoda vyhodnocení dat *in vitro* analýzy 38
7.2 Vzorky vodovodní vody 38
8.1.1 Estron 39
8.1.2 17β-estradiol 40
8.1.3 Estriol 41
8.1.4 17α-ethynylestradiol 42
8.2 Vzorky povrchové vody 43
8.2.1 Vzorek 1 – Ponávka 43
8.2.2 Vzorek 2 – Svitava 43
8.2.3 Vzorek 3 – Kohoutovický potok 44
8.3 Zhodnocení prekoncentrace pomocí reverzní osmózy 45
9 Diskuze **46**
ZÁVĚR **48**
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ **49**
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ **57**
SEZNAM PŘÍLOH **58**
PŘÍLOHY **59**

ÚVOD

Endokrinní systém řídí nespočet životně důležitých funkcí organismu prostřednictvím signálních molekul zvaných hormony. Endokrinní disrupce je jev, při kterém dochází k narušení endokrinního systému člověka nebo ostatních živočichů, a může vést k nežádoucím zdravotním efektům, jako jsou změny v chování, vývojové a reprodukční poruchy nebo vznik nádorových onemocnění. V roce 1997 proběhlo zasedání Evropské komise na téma využití a regulaci látek podezřelých z endokrinní disrupce, které nazvala endokrinní disruptory (ED).[1]

ED jsou často přítomné v různých složkách životního prostředí což z nich činí globální environmentální problém. Odhaduje se, že téměř 1 000 chemických látek (přírodních i syntetických) může vykazovat endokrinně-disrupční aktivitu. Podle Endocrine Society, což je celosvětová organizace zabývající se výzkumem hormonů od roku 1916, se v téměř 100 % lidské populace vyskytuje detekovatelné množství těchto látek v tělních tekutinách a tkáních.[2]

Mezi ED se dnes řadí aditiva plastů jako bisfenol A (BPA, ftaláty, alkylfenoly, konzervační látky v kosmetice a farmakách (parabeny), polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), retardanty hoření na bázi bromu, insekticidy jako DDT a jejich metabolity, dioxiny a mnoho dalších.[3,4] Do popředí pozornosti se dostaly především estrogeny, což jsou jak přirozené pohlavní hormony produkovány v tělech obratlovců (např. estron, 17β- estradiol), tak i látky syntetické (např. 17α-ethynylestradiol). Tyto látky disponují vysokou disrupční aktivitou, tzn. že jsou již při velmi nízké koncentraci biologicky aktivní.[5,6] Tato aktivita se projevuje např. ovlivněním sexuální diferenciace u vodních živočichů, převážně ryb (feminizaci populace nebo úplnou eliminaci samčího pohlaví v populaci).[5–7]

Výskyt ED v životním prostředí, respektive ve vodě, se pohybuje ve velmi nízkých koncentracích ($ng \cdot l^{-1}$), často pod mezí detekce, proto je nutné vzorky vody pro následnou analýzu zakoncentrovat, například použitím extrakce na tuhou fázi (SPE), kapalinové extrakce (LLE) aj. Pro detekci takto nízkých koncentrací ED v životním prostředí již bylo vyvinuto několik instrumentálních a biologických metod (např. *in vitro, in vivo,* instrumentální analýza), které mají své výhody i nevýhody. *In vitro* testy nabízejí opakovatelnou citlivou analýzu celkové hormonální aktivity ED s ohledem na etický kodex spojeným s testováním na živých organismech.[8]

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX) při Masarykově Univerzitě v Brně v posledních letech vyvíjí a optimalizuje metody na principu membránových separací, konkrétně nanofiltraci (NF) a reverzní osmózy (RO). Dle předběžných výsledků by RO mohla být použita pro zakoncentrování vzorků vody pro *in vitro* analýzu estrogenních a androgenních látek s využitím biotestů na transgenních buněčných liniích.

Cílem této práce je provést literární rešerši o aktuálně používaných metodách úpravy vzorků vody před *in vitro* analýzou a dále ve spolupráci s RECETOX porovnat účinnost dvou vybraných prekoncentračních metod – hojně využívané SPE a RO na následnou *in vitro* analýzu estrogenů na transgenní buněčné linii hERα-HeLa-9903.

TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této práce předkládá základ v oblasti endokrinní disrupce – krátkou historii, definice, klasifikaci ED a stručné vysvětlení mechanismu jejich účinku. Důraz je kladen na současné metody zpracování vzorků vody pro následnou *in vitro* detekci, jejich charakterizaci a reálné využívání v domácím i zahraničním výzkumu.

1 Problematika endokrinní disrupce

Colborn a kol. (1993) poukázali na to, že se od druhé světové války do životního prostředí dostávají ve větším množství látky schopné narušovat endokrinní systém. Taktéž vyslovili hypotézu, že vystavení těmto látkám v prenatálním období nebo v období brzy po narození může vyústit v trvalé a nevratné poškození volně žijících živočichů a lidí.[4]

Poprvé se o účincích ED na lidské zdraví zmínil Singer (1949) u pilotů práškovacích letadel používající pesticid DDT, u nichž byl zjištěn snížený počet spermií.[9]
Guzelian (1982) pozoroval ztrátu libida, impotenci a malé množství spermií u dělníků pracujících na plantážích, na kterých byl používán insekticid chlordekon.[10] Následně byla experimentálně prokázána estrogenní aktivita obou látek.

Silnou podporou pro hypotézy v oblasti endokrinních disruptorů (tj. látek schopných narušovat vývoj a funkci reprodukční soustavy lidí a živočichů) se staly laboratorní studie (zejména *in vivo*), ve kterých se řada syntetických chemických látek, zejména pesticidů, ukázala být estrogenně nebo androgenně aktivních.[11] Tyto hypotézy podnítily vědecké studie, [4] kterými se vědci zabývají do dnes.

1.1 Definice endokrinních disruptorů

V roce 1996 Mezinárodní program pro chemickou bezpečnost (*IPCS – Internatiomal Programme for Chemical Safety*), který zahrnuje Světovou zdravotnickou organizaci (*WHO – World Health Organization*), Program Organizace spojených národů pro životní prostředí (*UNEP – The United Nations Environment Programme*) a Mezinárodní organizaci práce (*ILO – International Labour Organization*) společně s ostatními státy světa a experty Evropské unie definoval endokrinní disruptory takto:

„*Endokrinní disruptor je exogenní chemická látka či směs, která mění funkci endokrinního systému a následně vyvolává nepříznivé účinky u intaktního organismu, jeho potomstva nebo subpopulaci.*“

„*Potenciální endokrinní disruptor je exogenní chemická látka nebo směs, která má vlastnosti, které by mohly vést k endokrinní disrupci u intaktního organismu, jeho potomstva nebo subpopulaci.*“[1]

V květnu 1997 definovala americká Agentura pro ochranu životního prostředí (*EPA – U.S. Evinronmental Protection Agency*) endokrinní disruptory následovně:

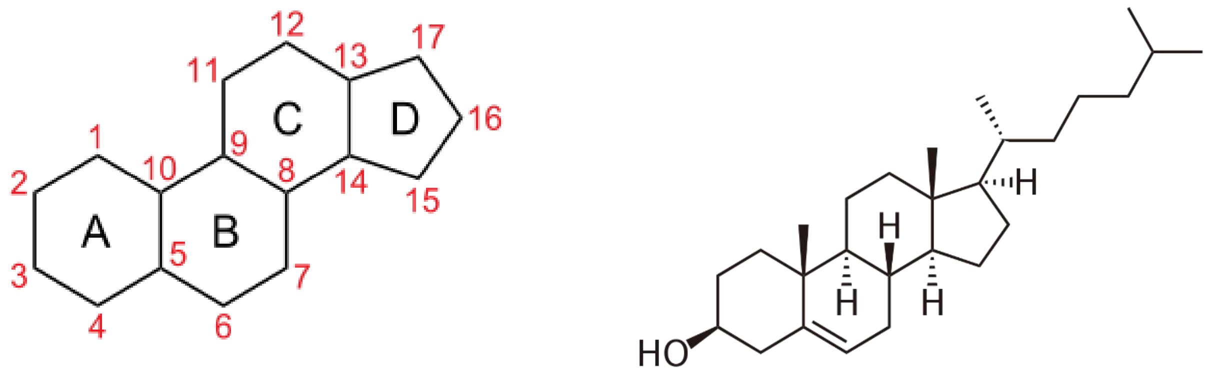
„*Endokrinní disruptor je exogenní chemická látka nebo směs, která mění strukturu nebo funkci/e endokrinního systému a následně způsobuje nepříznivé účinky na úrovni organismu, jeho potomstva, populace nebo subpopulace organismů, na základě vědeckých zásad, naměřených údajů, závažnosti důkazů a zásad předběžné opatrnosti.*“[12]

1.2 Klasifikace endokrinních disruptorů

Z chemického hlediska se ED řadí mezi hydrofobní organické látky, ty jsou však různých struktur a vlastností, takže lze říci, že jsou heterogenní skupinou látek postrádajících obecnou molekulární strukturu. Dnes je známo téměř 1 000 látek s endokrinně-disrupčním účinkem,[13] které byly nalezeny ve vzduchu, půdě, pitné vodě, potravinách rostlinného i živočišného původu,[2] pohonných hmotách, spotřebním zboží zahrnující farmaka a synteticky připravené hormony (antikoncepční preparáty).[3] Většina z nich je perzistentních, což jim umožňuje setrvat v životním prostředí po značně dlouho dobu; konkrétně se jedná o pesticidy, organofosfáty, organochlorované látky včetně PCB, dioxinů aj.[12,14]

Pokud se na ED díváme z pohledu jejich produkce či výroby, můžeme je rozdělit na látky exogenní a endogenní. Exogenní látky jsou syntetické látky produkovány jako hlavní nebo vedlejší produkty průmyslových výrob; sem patří všechny ED vyjma přirozených hormonů. Mezi endogenní ED patří přirozené steroidní hormony – pohlavní, kortikoidní a thyreotropní hormony (hormony štítné žlázy) většiny obratlovců.

Struktura steroidních hormonů je odvozena od steranu (hexadekahydro-cyklopenta[a]fenantren),[15] což je organická sloučenina složena ze tří šestiuhlíkatých cyklů a jednoho pětiuhlíkatého cyklu označených písmeny A-D.
Prekurzorem všech pohlavních hormonů je cholesterol, který je jednou ze základních stavebních složek fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán.[15,16]



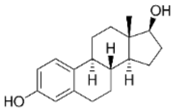
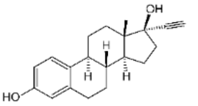
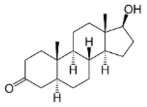
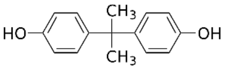
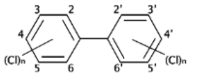
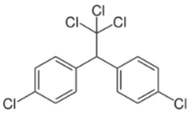
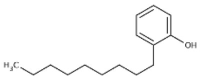
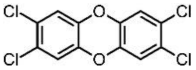
***Obr. 1:** Strukturní vzorec steranu (vlevo) a cholesterolu (vpravo)*[15] *(upraveno)*

V problematice endokrinní disrupce je ovšem nejdůležitějším hlediskem klasifikace ED jejich účinek. Podle účinku se ED dělí na estrogenní, androgenní a progestagenní.[a] Toto dělení vychází z mechanismu, kterým se daná endokrinní disrupce děje na molekulární úrovni, tedy vazbou ED na estrogenní, androgenní nebo progestagenní receptor.[12]

---

[a] Vzhledem k zaměření práce jsou v následujících kapitolách diskutovány pouze estrogenní a androgenní látky.

Tab. 1: Přehled nejvýznamnějších endokrinních diruptorů, jejich struktur a zdrojů v životním prostřed í [13] *(upraveno)*

Endokrinní disruptor	Struktura	Zdroj
17β-estradiol		Přirozený pohlavní hormon
17α-ethynylestradiol		Syntetický hormon používaný v antikoncepci
5α-dihydrotestosteron		Přirozený pohlavní hormon
Bisfenol A		Aditivum plastických hmot
PCB		Dielektrikum, chladící kapalina
DDT		Insekticid, alternativní farmakum
Nonylfenol		Prekurzor tenzidů
TCDD		Kontaminant herbicidů, produkt spalování odpadů

1.2.1 Estrogenní látky

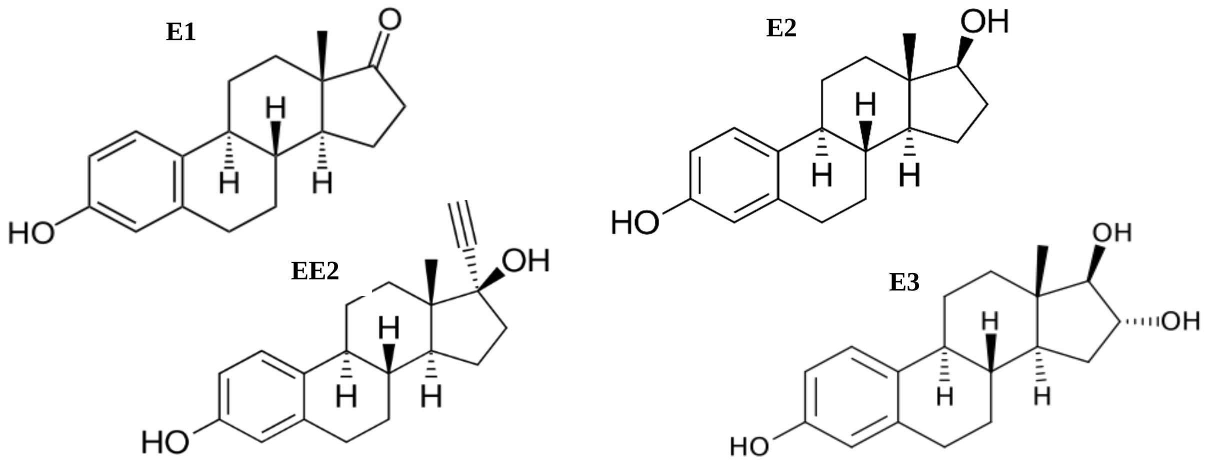
Většina ED, které byly detekovány ve vodním prostředí, byla přiřazena do skupiny estrogenních látek,[17] které jsou podezřelé například z narůstajícího počtu poruch reprodukce a vývoje některých druhů ryb a jiných vodních obratlovců.[18] Například Guillete a kol. (1996) poukázali na redukci velikosti pohlavních orgánů u mladých samců aligátorů žijících v jezeře Apopka na Floridě.[19]

Estrogeny, konkrétně estron (E1), 17β-estradiol (E2) a 17α-ethynylestradiol (EE2), byly prokázány v mnoha odpadních a povrchových vodách a byly označeny jako hlavní příčina estrogenní aktivity ve vodě.[20,21]

Do životního prostředí se dostávají především odpadními vodami,[22] jsou vylučovány močí lidí, hospodářských zvířat a jiných savců.[23] Podle Kim a kol. (2007) není zatím možné estrogenní ED z odpadních vod úplně odstranit.[24]

Navrhované normy průměrných ročních hladin stanovené Rámcovou směrnicí o vodách EU (*WFD – Water Framework Directive)* dosahují pro E1 3,6 $ng \cdot l^{-1}$, pro E2 0,4 $ng \cdot l^{-1}$ a pro EE2 0,035 $ng \cdot l^{-1}$, ačkoli žádná závazná mezní hodnota pro výskyt těchto hormonů v povrchové nebo pitné vodě nastavena nebyla.[8] Sledování těchto látek je náročné; Evropská komise nařídila maximální přípustnou detekční metodou 0,4 $ng \cdot l^{-1}$ pro E1 a E2 a 0,035 $ng \cdot l^{-1}$ pro EE2.

Mezi estrogenní látky nepatří jen estrogeny, ale i syntetické organické látky se schopností se vázat na estrogenní receptor, například Bisfenol A, DDT a řada dalších pesticidů a organochlorovaných látek; tyto látky se dostávají do životního prostředí nejen výpustmi odpadních vod průmyslových zařízení, ale i hojným používáním výše zmíněných látek v zemědělství.[2]



Obr. 2: Strukturní vzorce estrogenů – estronu (E1), 17β-estradiolu (E2), 17α-ethynylestradiolu (EE2) a estriolu (E3)

Estron (E1)

Estron, systematickým názvem 3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-on,[15] je jedním z hlavních samičích hormonů; je produkován zejména pohlavními žlázami a kůrou nadledvin. Většina estronu je v premenopauzálním období vylučována vaječníky, u samců a postmenopauzálních žen je syntetizován z periferních tkání přeměnou androstendionu.[25]

17β-estradiol (E2)

Tento hormon (estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol)[15] je nejsilnější přirozený estrogen, jehož estrogenní potenciál je několikanásobně vyšší než u estronu. 17β-estradiol se podílí na rozvoji reprodukčních orgánů a sekundárních pohlavních znaků. U samců je hlavním prekurzorem E2 testosteron, ve vyšší koncentraci E2 zabraňuje apoptóze spermií.[26]

17α-ethynylestradiol (EE2)

Jde o syntetický derivát 17β-estradiolu – (17α-ethynylestra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol),[15] hojně využíván v hormonální terapii (je hlavní složkou antikoncepčních přípravků). Je perzistentní, tedy je schopen setrvávat v životním prostředí. Ze všech estrogenů má nejvyšší estrogenní potenciál.[27]

Estriol (E3)

Estriol, systematicky estra-1,3,5(10)-trien-3,16α,17β-triol,[15] je nejslabší z estrogenů. Hladina estriolu v těle samic je detekovatelná pouze v období těhotenství, avšak v toto období je hladina estriolu ze všech estrogenů nejvyšší. V přítomnosti estradiolu vykazuje antiestrogenní aktivitu.[28]

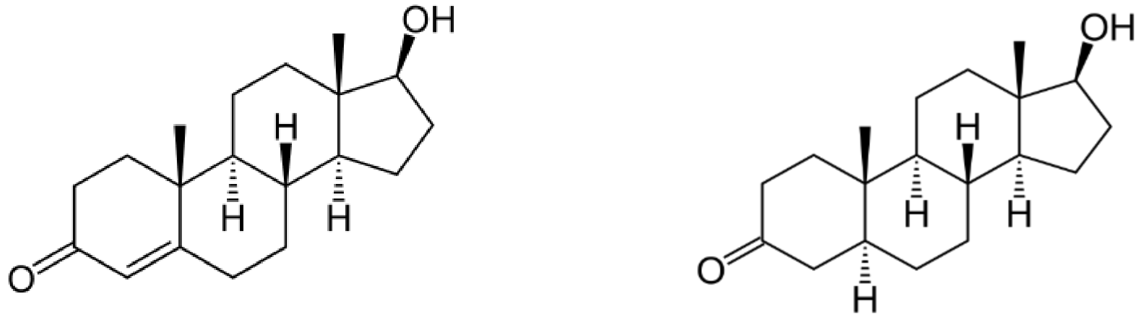
Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) patří mezi nejprostudovanější ED vůbec; je to látka se schopností vázat na estrogenní receptor a aktivovat jej. BPA je složkou obalových hmot určených k uchovávání potravin, plastových příborů, sportovních pomůcek, ale i jízdenek a účtenek. Jeho světová produkce se pohybuje v řádech několika milionů tun ročně a stále se zvyšuje. V roce 2015 dosáhla jeho produkce 5,4 milionů tun.[2]

Dle studie Cafalat a kol. (2004) byl u 92,6 % populace Spojených států amerických detekován BPA v moči, krvi a dalších tělních tekutinách v rozsahu 0,4-149,0 $\mu g \cdot l^{-1}$.[29] Dostupné studie ukazují, že vystavení se BPA v prenatálním období může ovlivnit citlivost mozkové tkáně na přirozený estrogen a tím narušit následný vývoj organismu (testováno na myších).[30]

1.2.2 Androgenní látky

Vedle estrogenů jsou považovány za další významné ED ve vodním prostředí androgeny. Hlavními zástupci androgenních látek jsou testosteron a dihydrotestosteron. Vyznačují se androgenní a anabolickou aktivitou. Androgenní aktivita zahrnuje řízení vývoje primárních i sekundárních samčích pohlavních znaků – diferenciaci pohlavních buněk, vývoj samčích pohlavních orgánů atd. Anabolická aktivita zajišťuje zejména růst svalové hmoty a hustotu kostní hmoty.[12]



Obr. 3: *Strukturní vzorec testosteronu (vlevo) a 5α-dihydrotestosteronu (vpravo)*

Testosteron

Testosteron, 17β-hydroxyandrost-4-en-3-on,[15] je hlavní mužský/samčí pohlavní hormon. U samců je produkován varlaty, u samic v malé míře vaječníky. Testosteron je metabolizován zejména v játrech a dále v periferních tkáních. Testosteron se také podílí na celkové odolnosti a síle organismu. Odpadní produkty po jeho metabolizaci jsou vylučovány močí.[31]

5α-dihydrotestosteron

5α-dihydrotestosteron (DHT) je redukovaná forma testosteronu s vyšší androgenní aktivitou. Redukce je katalyzována enzymem 5α-reduktázou. K této redukci dochází v cílových orgánech (prostata, kůže, játra aj). Na rozdíl od testosteronu neslouží DHT jako prekurzor pro estrogeny.[31]

1.3 Molekulární mechanismus endokrinní disrupce

Mechanismus endokrinní disrupce je velmi složitý a komplexní proces, který může probíhat mnoha způsoby, při čemž některé z nich jsou stále tématem diskuzí. Vzhledem k použitému *in vitro* testu v experimentální části práce je tedy stručně diskutován pouze mechanismus zprostředkován vazbou ligandu na receptor, konkrétně v případě genomické signální dráhy.

Mechanismus zprostředkován vazbou ligandu (ED) na estrogenní (ER) nebo androgenní receptor (AR) je nejlépe prostudovaným mechanismem endokrinní disrupce. Účinek tvorby komplexu ligand-receptor může být dvojího druhu, a to agonistický či antagonistický. V případě agonistického účinku reaguje receptor na ED jako na přirozený hormon, aktivuje se a spustí signální dráhu vedoucí k expresi určitého genu. U antagonistického účinku ED zablokuje receptor i pro přítomný přirozený hormon, nemůže tedy dojít k jeho aktivaci a následně ke genové expresi.[16,32]

Oba tyto receptory – ER i AR patří do skupiny a jaderných receptorů, do které spadají receptory pro steroidní hormony – pohlavní hormony, glukokortikoidy, mineralokortikoidy aj.[16,33]

1.3.1 Estrogenita

Schopnost ED vázat se na ER se nazývá estrogenita. Jako referenční hodnota estrogenity se používá estrogenní aktivita 17β-estradiolu jako silného přirozeného estrogenu, jehož aktivita odpovídá 1. Čím je estrogenita látky vyšší, tedy vyšší než referenční hodnota, tím snadněji se ED váže k receptoru a naopak.

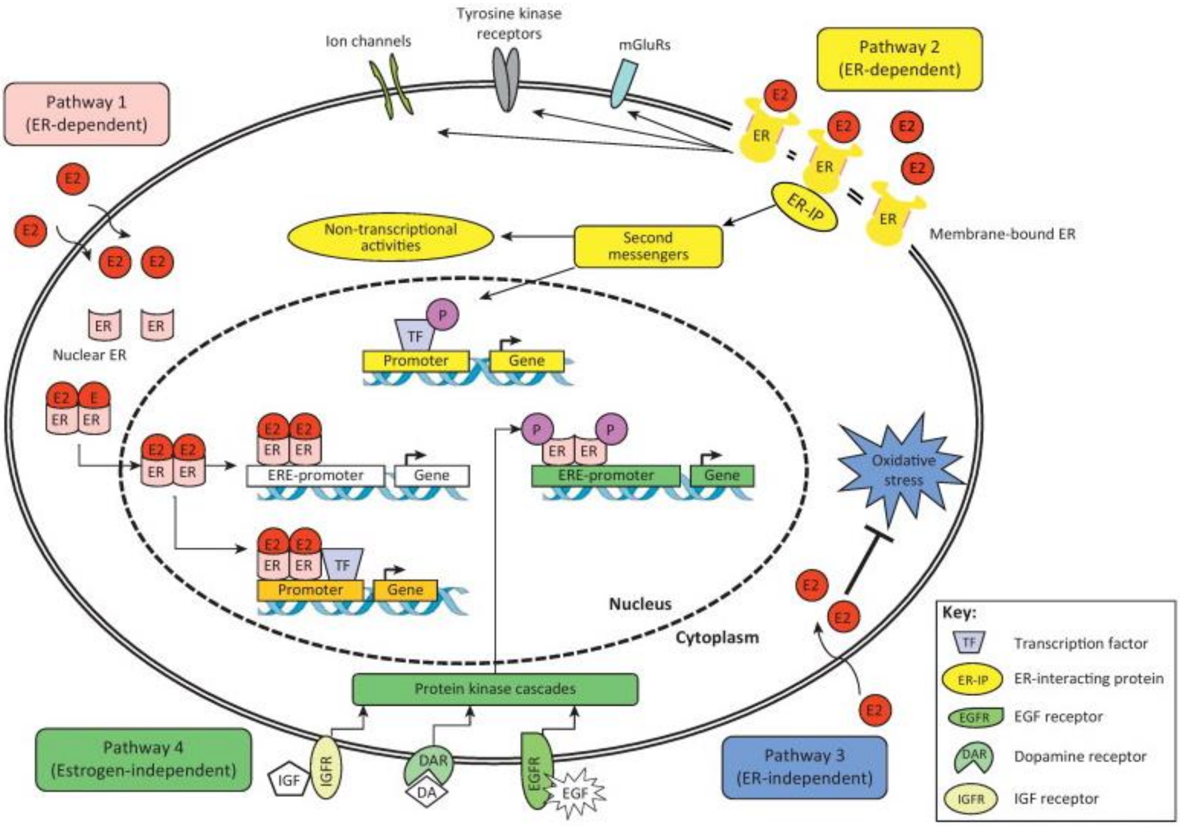
Estrogenní receptor

Drtivou většinu estrogenních signálních drah v reprodukčních i nereprodukčních tkáních zprostředkovávají ER. Existují dva typy ER – ERα a ERβ. Ty se od sebe liší jak strukturou, tak i funkcí. Oba typy ER se nachází v mozku, plicích, děloze, kostech, tlustém střevě a prsou. Typ alfa vykazuje svou činnost především v jaterních buňkách, hipokampu a tukové tkáni, zatímco typ beta má výhradní funkci v prostatě, vagíně a mozečku.[32]

Nejsou-li ER aktivované, z větší části se nacházejí v buněčné cytoplazmě s proteinem tepelného šoku HSP 90 (*Heat Shock Protein*) společně s jeho chaperonem p23.[32,34]

Vazba ligandu na estrogenní receptor a jeho signální dráha

V případě vazby ED na receptor dojde k alosterické změně prostorového uspořádání receptoru za tvorby komplexu ER-ED. Vzniklé komplexy tvoří homodimery schopné translokace do buněčného jádra, kde se vážou na estrogen responzivní jednotku (*ERE – Estrogen Responsive Element*), tj. specifická sekvence nukleotidů na DNA kódující transkripci cílových genů, a to buď přímo anebo prostřednictvím specifických proteinů. Tato transkripce je regulována transkripčními faktory (TF). Výsledná fyziologická odpověď je dána afinitou ED k receptoru a afinitou homodimeru k *ERE* v přítomností TF.[32]



Obr. 4: Schéma čtyř mechanismů estrogenní disrupce

1.3.2 Androgenita

Androgenita (analogicky k estrogenitě) je definována jako schopnost ED se vázat na AR. Pro tento receptor existují dva přirozené ligandy – testostereon a 5α-dihydrotestosteron, který je referenčním androgenem pro vyjádření androgenity ligandu. [35]

Androgenní receptor

Kromě reprodukčních orgánů jsou AR obsaženy v kůži, kostech, svalech a mozku.[36] Primárně se AR nachází v cytoplazmě, kde je asociován s proteiny tepelného šoku HSP.[37] Cardoza a kol. (2003) se předpokládají, že jsou HSP proteiny vázány na AR prostřednictvím cytoskeletálních proteinů, například filaminu a dalších chaperonů,[38] Dnes jsou známy dva izomery AR – izomer A (87 kDa) a B (110 kDa).[36]

Vazba ligandu na androgenní receptor a jeho signální dráha

Vazba ligand-AR je zprostředkována ligand vázající doménou (*LBD – Ligand Binding Domain*). Po navázání ligandu dochází ke konformačním změnám receptoru, při kterém jsou disociovány *HSP*. Za účasti proteinu ARA70 a importinu-α je stabilizován vzniklý komplex proteinů, který rovněž umožňuje přesun receptoru do buněčného jádra. Tam vzniká homodimer, který je schopen interagovat s DNA prostřednictvím androgen responzivní jednotky (*ARE – Androgen Responsive Element*), která je uložena v regulační oblasti cílových genů. Navázání homodimeru AR na *ARE* za účasti TF spouští transkripci cílových (reportérových) genů.[36–38]

2 Metody zpracování vzorků vody pro detekci endokrinních disruptorů

Způsob zpracování vzorku vody, tedy vzorkování a následná úprava prekoncentračními metodami, je klíčovým faktorem ovlivňující výsledek stanovení estrogenty či androgenity *in vitro* testy.[39] Zvolená metoda by měla zajistit reprezentativní vzorek s ohledem na reálné prostorové a časové změny kontaminantů ve sledovaném prostředí. Nicméně, Wehmas a kol. (2011) dokázali, že analýza celého vzorku vody (*whole water sample*), tedy bez filtrace a extrakce rozpuštěných, vede ke spolehlivějším výsledkům.[40] U nezpracovaných vzorků, zejména u odpadních vod, však hrozí kontaminace vysokým množstvím organického odpadu, která může zkreslit výsledky *in vitro* analýzy nebo ji dokonce znemožnit.

V této kapitole jsou pro úplnost uvedeny nejčastější způsoby zpracování vzorku pro *in vitro* i instrumentální analýzu.

2.1 Vzorkování vody

Množství odebraného a zakoncentrovaného vzorku záleží na citlivosti a detekčním rozsahu následně použité analytické metody, a standardně se pohybuje v rozmezí 50 ml až 20 l. Ingerslev a kol. (2003) doporučují vyhnout se objemu vyššímu než 5 l z důvodů narůstající koncentrace huminových látek, které zkreslují výsledky *in vitro* testů.[41]

Sacher a kol. (2001) a Matejíček a kol. (2008) se shodují na optimálním objemu 250 ml až 1 l pro instrumentální analýzu za použití HPLC-MS a GC-MS.[42]

2.1.1 Aktivní vzorkování

Pro odebírání vzorků vody se zpravidla používají lahve z hnědého skla (kvůli nižší afinitě ED ke sklu než k plastům a kovům)[43] vypláchnuté metanolem,[42,44]. Doporučováno je stabilizování, tedy eliminace mikrobiální kontaminace, vzorku kyselinou sírovou[45] nebo kyselinou chlorovodíkovou.[20] Surový vzorek je podle studie Citulského a Farahbakhshe (2012) možné stabilizovat i formaldehydem (1%,v/v).[42]

Formaldehyd ovšem zvyšuje toxicitu pevných biologických extraktů,[46] což není pro *in vitro* testy žádoucí. Vzorky se doporučuje skladovat ve tmě při teplotě do 4 °C a zpracovat do 24-48 hodin.[41,44]

2.1.2 Pasivní vzorkování

Tato metoda používá vzorkovače *POCIS* (*Polar Organic Integrative Sampler*) s *Oasis HLB* (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) sorbentem.

POCIS se skládá ze dvou vrstev mikroporézní polyethersulfonové membrány o velikosti pórů 0,1 μm, které obalují sorbent v pevné fázi (nejčastěji *Oasis HLB*). *Oasis HLB* je univerzální extrakční sorbent, který je široce používán pro odběr velkého množství hydrofilních až lipofilních organických chemikálií z vody. Tento vzorkovač se ponechává ve vodě v časovém horizontu jednoho až deseti týdnů; pohlavní steroidy jsou absorbovány na membráně a eluovány vhodným organickým rozpouštědlem. [49]

2.2 Filtrace vodných vzorků

Dle požadavků WFD by nasbírané vzorky měly být analyzovány bez předchozí filtrace [43] Tento surový vzorek (obzvláště u odpadních vod) ale obvykle obsahuje vysoký podíl nerozpustných částic a organických materiálů, které mohou způsobovat problém při následných prekoncentračních úpravách, jako například ucpání kazet pro SPE.[42] Filtrace efektivně snižuje mikrobiální kontaminaci, která by mohla znehodnotit výsledky *in vitro* analýzy.[50]

K filtraci surového vzorku vody se používají materiály jako nylon,[51] celulóza,[14] nitrát celulózy [34] nebo skleněné vlákno,[41,45] které se k filtraci pohlavních steroidních sloučenin používá nejčastěji z důvodu minimálních ztrát prostřednictví sorpce na filtr.[52]

2.3 Aktuální metody prekoncentrace vodných vzorků estrogenů

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, koncentrace ED ve vodních matricích je velmi nízká, řádově v jednotkách nanogramů na litr, což je na úrovni limitu detekce analytických metod. Pro dosažení detekovatelné úrovně se vzorek podrobuje prekoncentračním metodám.

U aktivně sbíraných vzorků se pro *in vitro* i instrumentální analýzu nejčastěji používá extrakce na pevnou fázi, dále kapalinová extrakce a další.

2.3.1 Extrakce na tuhou fázi

Nejhojněji používanou metodou separace organických hydrofobních látek z vodních vzorků je extrakce na tuhou fázi (*SPE – Solid Phase Extraction*).[53]

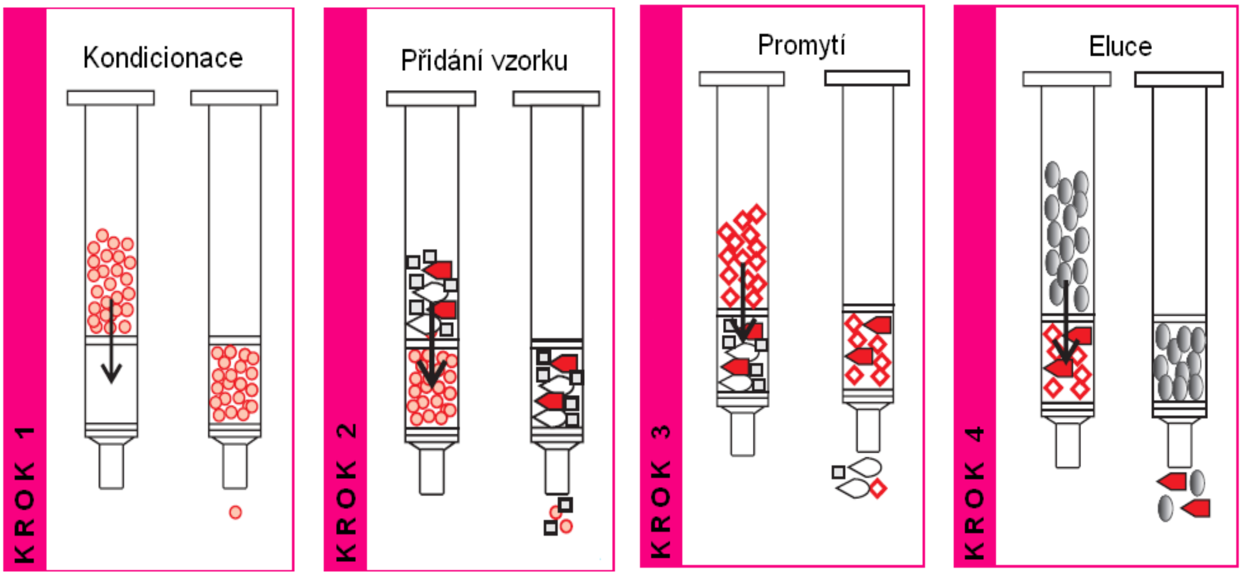
SPE je vhodná pro vzorky povrchové vody, neboť neobsahují takové množství pevných částic a organických materiálů jako voda odpadní, které by mohly ucpat nebo poškodit sorbent. Výběr vhodného sorbentu a rozpouštědla pro eluci je důležitým parametrem pro efektivní extrakci vzorku.[54] Nejčastěji používaným sorbentem pro SPE estrogenů a dalších pohlavních steroidů je Oasis HLB.

Princip

Principem SPE je adsorpce separovaných látek na tuhém povrchu (ad)sorbentu a jeho následném vymytí elučním činidlem.[42] Adsorpce se dá chápat jako zvyšování koncentrace látky na fázovém rozhraní vícefázového systému (kapalina-pevná látka); rozeznáváme dva typy – adsorpci fyzikální a chemickou.

V případě fyzikální adsorpce vznikají mezi sorbentem a sorbovanou látkou slabé nekovalentní vazby. Chemická adsorpce, nebo-li chemisorpce, je zprostředkována chemickou reakcí mezi sorbentem a sorbovanou látku za vzniku vazby. Pro tento druh sorpce je charakteristický vznik monomolekulární vrstvy.[55]

Extrakční kolona pro SPE má většinou tvar injekční stříkačky. Samotný proces extrakce zahrnuje čtyři kroky dle následujícího schématu:



Obr. 5: *Schéma SPE ve 4 krocích – kondicionace, přidání vzorku, promytí a eluce* [56]

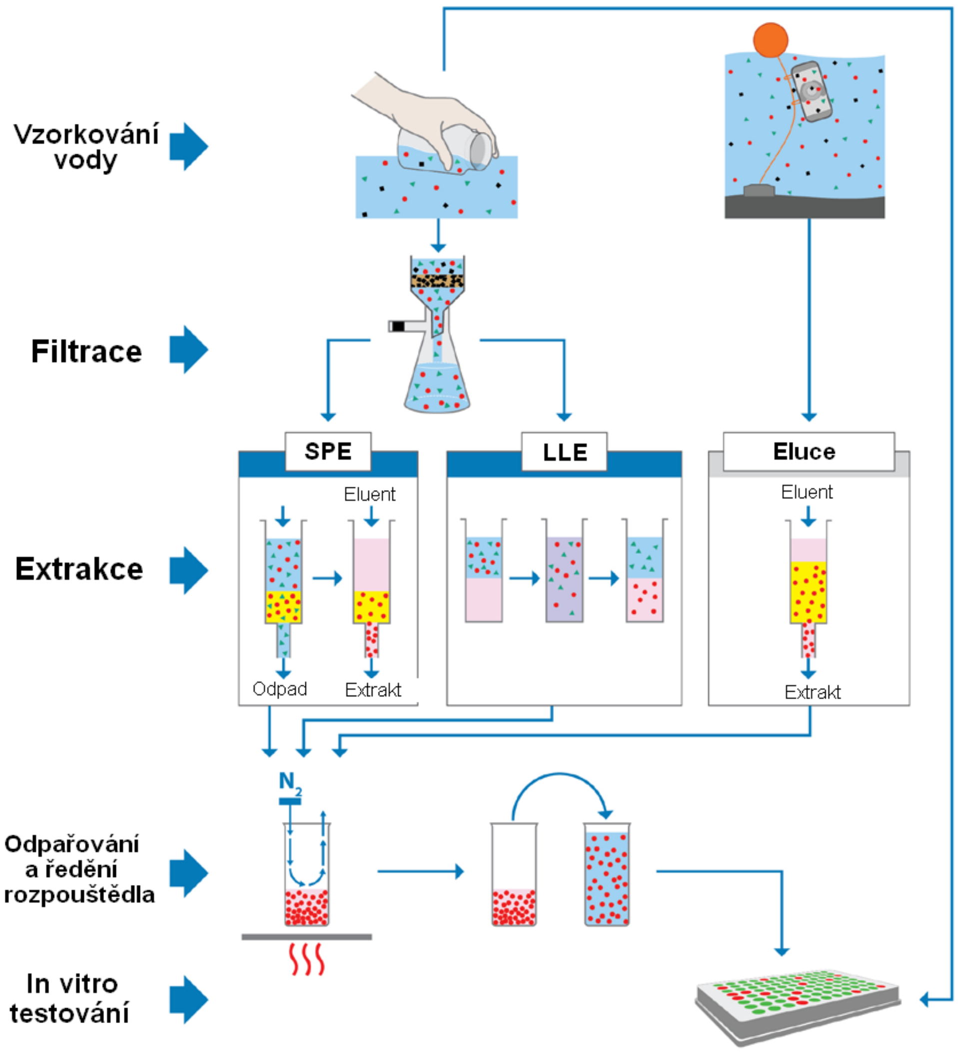
Prvním krokem extrakce je kondicionace – předúprava kolony, kdy se kolona se sorbentem naplní mírně polárním rozpouštědlem. Rozpouštědlo poruší vazby sorbentu a zajistí tím následnou interakci se vzorkem. Do aktivované kolony se přidá vzorek;je nutné však zaručit čas potřebný k dostatečnému kontaktu vzorku se sorbentem, který zachycuje sorbovanou látku, zatímco zbytek vzorku prochází kolonou. Třetí krok je promytí kolony destilovanou vodou nebo pufračním roztokem k odstranění zbývajících nečistot tak. Posledním krokem je eluce adsorbované látky nepolárním rozpouštědlem ze sorbentu.[56]

2.3.2 Kapalinová extrakce

Na rozdíl od SPE je kapalinová extrakce (*LLE – Liquid Liquid Extraction*) výhodná pro extrakci mírně hydrofobních látek, jako jsou pohlavní steroidní hormony, u vzorků odpadní vody, které obsahují vyšší množství silně hydrofobních organických látek a materiálů. Obecně se ale od této metody opouští z důvodu vysoké spotřeby organických rozpouštědel, jako například ethylacetát,[34] hexan nebo směs hexanu a metanolu (1:1, v/v),[57,58] která mohou být toxická pro buněčné linie při *in vitro* analýze.[58]

Princip

LLE je založena na distribuci rozpuštěné látky mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Jednou z těchto kapalin je zpravidla vodný roztok, druhá je organické rozpouštědlo. Separovaná látka, které je rozpustná v obou kapalinách, je distribuována mezi oběma fázemi v určitém poměru. Celková koncentrace A rozpuštěné látky ve všech formách je v organické fázi opatřena indexem o. Tato koncentrace se stanoví experimentálně. Pokud je distribuční poměr dostatečně velký, je možné kvantifikovat úplnost (účinnost) extrakce. Úplnost extrakce závisí na distribučním poměru, na objemu kapalných fází a také na počtu provedených extrakcí.



***Obr. 6:** Souhrnné schéma aktuálního zpracování vody od vzorkování pro in vitro analýzu*[8] *(upraveno)*

2.3.3 Vakuové odpařování

Vakuové odpařování (VO), též známá jako vakuová evaporace, je v České republice poměrně málo používaná technologie, která má ovšem velký potenciál pro budoucí rozšíření. Tato technologie nachází využití v povrchových úpravách, chemickém, strojírenském, potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Pomocí VO lze zvýšit koncentraci látek rozpuštěných ve vodě při zmenšení objemu roztoku i o více než 90 %. Toho se využívá například v čistírnách vod. Proces VO nevyžaduje žádné přidané chemikálie, zakoncentrování roztoku se dosáhne odpařením vody. Aby se voda z roztoku efektivně vypařovala v celém objemu, je nutné, aby roztok dosáhl bodu varu.[59]

Princip

Při VO se sníží tlak ve varné komoře a dojde k varu při mnohem nižší teplotě, než je bod varu při atmosférickém tlaku. Vakuové odparky mohou pracovat s tlakem až 6 kPa, při kterém vodný roztok může vařit již při 35 °C. Výstupem VO je destilát a koncentrát.

Destilát je roztok zbavený všech rozpuštěných látek, jde tedy o téměř čisté rozpouštědlo, většinou vodu. Koncentrát je silně koncentrovaný roztok, do obsahující většinou rozpuštěných látek. Této separace je docíleno rozdílnou teplotou varu, podobně jako u klasické destilace. Pro efektivní separaci je důležité správné nastavení teploty a tlaku uvnitř varné komory vakuové odparky.[59]

2.3.4 Lyofilizace

Podle studie Chevolleau a kol. (2016) je tato metoda také vhodná k zakocentrování vodných vzorků netěkavých ED, např. BPA před *in vitro* analýzou s až 91% výtěžností.[60]

Lyofilizace představuje šetrné sušení látek ve zmraženém stavu za využití vakuové sublimace a umožňuje tak zachovat původní strukturu a biologickou aktivitu sušeného vzorku. Tato metoda je v současnosti hojně využívána v biotechnologiích při výrobě a zpracování potravin, kosmetických a farmaceutických výrobků.[61]

Proces lyofilizace se skládá ze tří fází – zamražování, primární a sekundární fáze sušení. Důležitým faktorem lyofilizace je i výběr vhodného kryoprotektivního činidla zajišťující stabilitu vzorku vystaveným podmínkám.[61–63]

Princip

Zamražování

Při zamražování se lyofilizovaný roztok zmrazí pod teplotu, při které nemůže existovat v kapalném skupenství. Tato teplota je dána eutektickým bodem, který lze získat z fázového diagramu pro daný materiál. V této fázi lyofilizace je zamraženo 65-90 % vody, zbylé množství je absorbováno na produkt. Rychlým vykrystalováním vody v roztoku prudce vzroste koncentrace rozpuštěné látky. Koncentrace je v této fázi závislá pouze na teplotě.[61]

Primární a sekundární fáze sušení

Primární fáze sušení představuje sublimaci ledu ze zmraženého produktu za využití vakua. Hnací silou procesu je rozdíl tenzí vodních par v sublimačním rozhraní a nad kondenzátem. Tenze par jsou závislé teplotě. Délka primární fáze je dána rychlostí sublimace ledu, charakteristikou lyofilizované směsi a jejím objemem.[61,64]

Po ukončení primární fáze obsahuje lyofilizát cca 5-35 % vody.[61] Tato voda je absorbována na povrchu nebo je obsažena ve formě hydrátů. Při přechodu z primární fáze do sekundární není nutné měnit tlak, ale je nutné udržovat teplotu lyofilizátu pod teplotou skelného přechodu, přičemž je tato teplota vysoce závislá právě na obsahu vody. Stabilita produktů je v této fázi závislá na teplotě a obsahu vody.[63] Koncentrace vody i teplota se v během fáze mění v čase. Protože je profil obsahu vody závislý právě na teplotě, je hlavním sledovaným parametrem teplota sekundární fáze, která nesmí překročit termolabilitu lyofilizované aktivní látky. [61]

2.4 Membránové tlakové procesy

Membránové procesy jsou v posledních letech vyvíjeny jako moderní a energeticky účinné separační metody založené na molekulárních vlastnostech separovaných látek. Cílem vývoje těchto procesů je dosažení dokonalého oddělení složek za co nejnižší spotřeby energie s ohledem k životnímu prostředí. Při úpravách vody a vodných vzorků hrají membránové (tlakové) procesy výhradní roli.

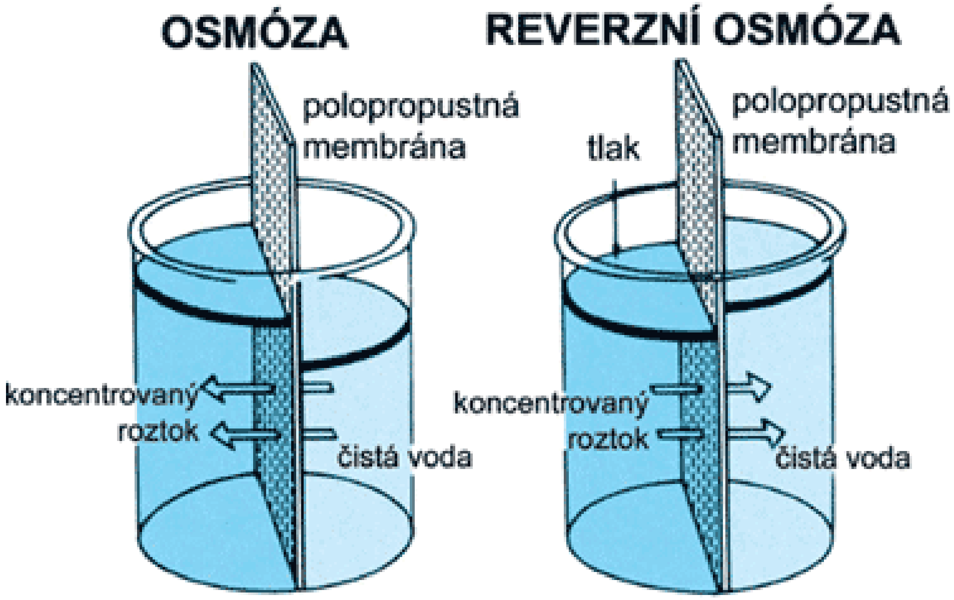
V této kapitole se autor zaměřuje na RO a NF jako na potenciálně vhodné metody prekoncentrace vodných vzorků ED bez použití organických ředitel a jiných potenciálně toxických látek, v současné době vyvíjených na pracovišti RECETOX.

2.4.1 Reverzní osmóza

Princip

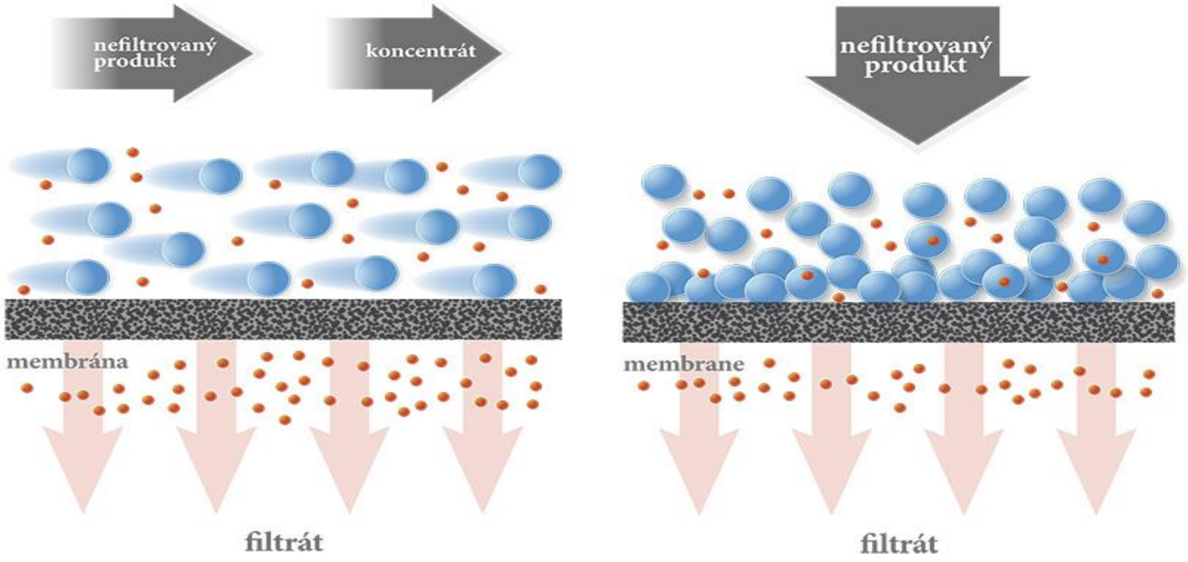
RO je membránová separační technika schopná oddělit nízkomolekulární látky z převážně vodných roztoků. RO využívá neporézní polopropustné kompozitní membrány s vysokým hydrodynamickým odporem odolávající vysokému tlaku 1,5-15,0 MPa. Polopropustná membrána je propustná pro vodu. Tlak vyvíjený na membránu musí být vyšší než osmotický tlak roztoku.[65] Osmotický tlak je tlak potřebný k zabránění přirozené osmózy – samovolnému pronikání rozpouštědla přes polopropustnou membránu oddělující dva roztoky o různé koncentraci vlivem koncentračního gradientu.[66]

V případě RO je na roztok aplikován vnější tlak, který způsobuje pronikání molekul rozpouštědla přes membránu ve směru tlakového gradientu; separace molekul je založena na rozdílné rozpustnosti a difuzivitě v membráně. Separované molekuly (většinou vody) se v materiálu membrány rozpouštějí, membránou difundují a následně desorbují z membrány do permeátu. Přes membránu tedy prochází pouze molekuly rozpouštědla.[65]



Obr. 7: *Grafické znázornění osmózy a reverzní osmózy*[92]

V praxi se RO nejčastěji používá v režimu „*cross-flow*“, tedy v režimu tangenciálního proudění, někdy označen jako dynamická filtrace. Roztok v *cross-flow* režimu proudí systémem RO pod vysokým tlakem rovnoběžně s plochou membrány, přes membránu tedy prochází čisté rozpouštědlo (permeát, filtrát), zatímco membránou zadržené látky prochází systémem dál (retentát, koncentrát). Vlivem proudu rozpouštědla unášejícího zadržené částice na membráně pod vysokým tlakem je značně snížena tvorba filtračního koláče a tedy ucpání membrány, jako je tomu v režimu statické filtrace, tzv.„*dead-end*“[67]



Obr. 8: *Grafické znázornění cross-flow a dead-end režimu filtrace*[93] *(upraveno)*

Membrána

Polopropustná kompozitní membrána je základní funkční jednotkou RO. Nejčastěji se skládá ze tří vrstev, tj. polyamidu, polysulfanu a netkané polyesterové textilie. Podle uspořádání jednotlivých vrstev se rozlišují membrány deskové a vinuté. [68]

Vinuté uspořádání zajišťuje větší filtrační plochu, vyšší tok permeátu přes membránu a tím i kratší dobu procesu RO.[68,69] Nevýhodou je skutečnost, že se vinutá membrána snadněji zanáší a poskytuje relativně vysoký mrtvý objem, což není pro nízké objemy filtrovaných roztoků žádoucí.

U deskového uspořádání je aktivní plocha menší, tím je i tok permeátu nižší a proces zakocentrování vyžaduje delší dobu.[68,69] Ve srovnání s vinutou membránou se ale desková membrána nezanáší tak rychle a poskytuje menší mrtvý objem.

Pro úspěšnou prekoncentraci pomocí RO je nutné zvolit vhodnou membránu. Membrána je charakterizována technickými parametry, jako jsou složení membrány, velikost maximální operační teplota a tlak, rozsah pH pro dlouhé i krátké operace, maximální rychlost průtoku kapaliny apod.[67]

2.4.2 Nanofiltrace

Princip

Nízkotlaká reverzní osmóza, nebo-li nanofiltrace, je další membránovou separační technikou sloužící k oddělení nízkomolekulárních látek z vodních roztoků. Na rozdíl od RO využívá polopropustné porézní membrány s pracovním rozsahem tlaků 0,5-3,5 MPa. Velikost pórů membrány se pohybuje v rozmezí 1-2 nm, z čehož vyplývá, že NF pracuje na principu sítového efektu (molekuly větší než póry membrány neprojdou), dále se uplatňuje částečný efekt rozpouštění v membráně následovaný difúzí jako u RO.

NF je nejčastěji v praxi využívána k odstraňování vícevalentních iontů (Ca^{2+}, Mg^{2+} aj.), tzv. změkčování vody, a nízkomolekulárních organických látek.[65]

Membrána

Membrána pro NF je kompozitní porézní membrána tvořena třemi vrstvami – sulfonovaným polysulfonem, který tvoří semipermeabilní vrstvu o šířce menší než 1nm, dále polysulfonovou mikroporézní vrstvu o šířce 50-150 μm a netkanou textilií. Svrchní sulfonovaná je díky sulfonovým skupinám opatřena záporným nábojem, což zvyšuje efektivitu zachytávání kovových kationtů.[70]

3 Metody detekce endokrinních disruptorů

V této kapitole jsou uvedeny a stručně popsány nejčastěji používané metody detekce ED ve vodním prostředí – instrumentální metody s využitím chromatografických technik a vybrané *in vitro* biotesty.

3.1 Instrumentální metody

K separaci a detekci endokrinních disruptorů byla vyvinuta a následné optimalizována řada instrumentálních metod, z nichž nejpoužívanější jsou metody chromatografické v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (*MS – mass spectrometry*). Nejhojněji využívanou a nejstarší metodou je plynová chromatografie (*GC – gass chromatography*) s MS detektorem.[13,48]

Pohlavní steroidy se ovšem vyskytují ve velmi malém množství, a to většinou jako směsi, jejich případná koncentrace jako chemických individuí může být tedy ještě nižší. Z toho důvodu se dnes dává přednost vysokoúčinné kapalinové chromatografii (*HPLC – high performance liquid chromatography*) s MS detektorem díky její vyšší citlivosti a schopnosti analyzovat i vzorky bez předchozí derivatizace.[42]

3.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je separační metoda pracující na principu rozdílné afinity analytu k mobilní a stacionární fázi. Mobilní fází je inertní kapalina, stacionární fází kapalina nebo pevná látka. Podle fyzikálně-chemických vlastností analytu je třeba volit vhodné jednotlivé fáze.[71]

Pro stanovení endokrinních dirusptorů se osvědčila kombinace HPLC/MS.[72] Touto metodou byla stanovena většina estrogenů v povrchových vodách a podle dostupné literatury je tato metoda nejrozšířenější kvantitativní metodou vyhodnocení ED.[13,42,48]

3.1.2 Plynová chromatografie

Princip GC je obdobný jako u HPLC, liší se ale mobilní fází a tím i možnostmi použití. Mobilní fází je tedy v tomto případe inertní plyn, většinou N_2, který unáší analyt chromatografickým systémem. Vzorek analytu je nejprve nutno převést do plynné podoby.[71]

V případě ED, konkrétně estrogenů, je třeba vzorek nejprve derivatizovat pro jejich termolabilitu a nízkou těkavost.[42] Tato metoda je ovšem rychlá a disponuje vysokou separační účinností.[13,42,48,72]

3.1.3 Hmotnostní spektrometrie

Po separaci analytu pomocí HPLC nebo GC přichází na řadu samotná kvantifikace obsahu ED pomocí MS. V MS je odpařený vzorek ionizován, je mu tedy předán náboj. V detektoru dojde k rozdělení vzniklých iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Detektor zaznamenává signál úměrný počtů iontů o dané hmotnosti.[73] Často bývá využíváno tandemového uspořádání detektorů, které výrazně zvyšuje citlivost a selektivitu detekce.[48]

3.2 *In vitro* metody

Použití instrumentálních metod ke stanovení ED není jedinou možností. Vedle těchto metod byly vyvinuty i *in vitro,* metody zejména k detekci pohlavních steroidů. Většina těchto biotestů využívá buněčných linií původem z obratlovců nebo z mikroorganismů, jako jsou kvasinka pivní apod.

Hlavním důvodem vývoje těchto metod bylo nalezení vhodné alternativy k *in vivo* metodám, která by byla v souladu s etickým kodexem testování na zvířatech. Dalším a neméně důležitým důvodem je skutečnost, že instrumentální analýza není schopna detekovat míru biologické odpovědi organismu při expozici ED a určit tak jejich minimální koncentraci, při kterých jsou ED stále biologicky aktivní.

Nespornou výhodou *in vitro* biotestů je také jejich schopnost detekce celkové estrogenní aktivity měřeného vzorku jako výsledku interakcí všech přítomných ED. To může být druhou stranu i nevýhodou těchto metod, že nedokáží identifikovat chemická individua ve vzorku zodpovědná za hormonální aktivitu.[8]

3.2.1 Proliferace buněk

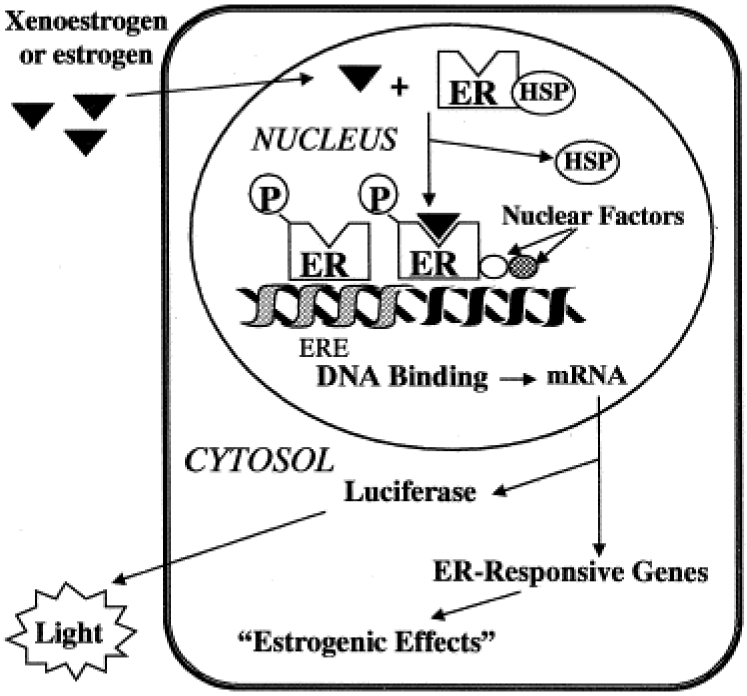
Prvním z použitých testů pro testování estrogenity vodních vzorků a sedimentů byl buněčný proliferační test známý jako *E-screen.*[74] *E-screen* je založen na měření estrogen-responsivní proliferace zejména u estrogen responzivních buněk lidského karcinomu prsou MCF-7.

Buněčný nárůst v odpovědi na přítomný estrogen lze kvantifikovat značkováním buněčných proteinů sulforhodaminem B96[75] nebo použitím kolorimetrického testu např. s krystalovou violetí.[76] Pomocí proliferačního testu je možné detekovat koncentraci E2 10 ng·l^{-1}. Nevýhodou *E-screenu* je časová náročnost 5-7dnů.[74]

3.2.2 Exprese reportérových genů

Biotesty založené na expresi reportérových genů jsou dnes nejrozšířenější *in vitro* testy estrogenity a androgenity.[77] Využívají genetické modifikace savčích a rybích buněk, dále také kvasinek apod. Do kategorie biotestů estrogenity prováděných na savčích buňkách spadají biotesty s využitím buněčných linií MCF-7,[57] T47D,[78] HELN-hERα,[60] hERα-HeLa-9903[79] a dalších. V případě kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se jedná především o test estrogenity YES (*Yeast Estrogen Screen*)[80] a androgenity *YAS* (*Yeast Androgen Screen*).[81] MDA-kb2 a U2-OS savčí (lidské) buněčné linie jsou používány k testování androgenity.[82,83]

Obecným principem těchto testů je využití geneticky modifikovaného organismu nebo buněčné linie. Genetická modifikace spočívá v transfekci hER (*human estrogen receptor*) nebo hAR (*human androgen receptor*)[77] s příslušným konstruktem umožňujícím jeho expresi. Transfekce může být stálá nebo přechodná. Tato transfekce umožňuje transkripci reportérových genů (genů, jejíchž expresi můžeme lehce kvantifikovat).[84] Nejčastěji využívaným reportérem bývá enzym luciferáza či β-galaktosidáza v případě YAS/YES testů. [80,81]



Obr. 9: *Mechanismus in vitro biotestu estrogenity zprostředkovaného expresí reportérových genů luciferázy*[38]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části předložené bakalářské práce byla prekoncentrace vzorků vody obsahujících endokrinní disruptory (estrogeny) dvěma vybranými metodami a srovnání jejich účinnosti. Použitými metodami byly zavedená metoda SPE a nová metoda RO vyvíjená na pracovišti RECETOX.

Takto upravené vzorky byly otestovány *in vitro* biotestem na transgenní buněčné linii hERα-HeLa-9903, jehož vyhodnocení sloužilo jako srovnávací kritérium výše jmenovaných metod.

4 Materiál

4.1 Chemikálie

Níže uvedené chemikálie byly zakoupeny od spolčnosti Sigma-Aldrich Co (Česko), není-li uvedeno jinak.

Rozpouštědla
70% Etanol
100% Metanol

Hormony
Estron
Estriol
17β-estradiol
17α-ethynylestradiol

Chemikálie pro SPE
Oasis HLB (Waters, Irsko)
Acetonitril (Biosolve, Nizozemí)
Aceton (Lab Scan, Polsko)
100 nM Hydrogenuhličitan sodný
99% Dansyl chlorid

Chemikálie pro *in vitro* analýzu
Trypsin
FBS (fetální bovinní sérum)
FBS-DCT (dialyzované fetální bovinní sérum)
DMEM médium (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) bez fenolové červeně a L-Glutaminu
DMEM médium práškové
Lyzační pufr pro extrakci luciferázy
Kit pro stanovení luciferázy Steady-Glo® (Promega, USA)

4.1.1 Příprava roztoků, pufrů a médií

Příprava fosfátového pufru PBS

K přípravě 1 l PBS bylo třeba navážit 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 2,89 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ a 0,20 g KH_2PO_4. Navážené chemikálie se kvantitativně převedly do odměrné baňky (1000 ml) a doplnily vodou po rysku. Po rozpuštění bylo upraveno pH pufru na 7,20 pomocí 1M HCl a NaOH. Roztok byl sterilován ve 250ml skleněných lahvích v autoklávu.

Příprava kultivačního nasazovacího média

Pro nasazení buněk do mikrodesek bylo použito sterilní DMEM s 10 % dialyzovaného FBS-DCT. Po přídavku FBS-DCT bylo pro zajištění sterility přefiltrováno přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm do sterilní skleněné lahve. Takto připravené médium bylo uschováváno v chladničce při teplotě 4 °C max. 1 měsíc.

Příprava expozičního (3krát, 9krát) koncentrovaného média

Médium z práškového DMEM a dalších přísad bylo připraveno dle návodu výrobce. K přípravě 3krát koncentrovaného média bylo nutno ztrojnásobit navážky jednotlivých komponent: 3,37 g DMEM, 1,11 g NaHCO3 se 3 ml L-glutaminu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky (100 ml) a doplněno destilovanou vodou po rysku. Podle návodu výrobce bylo pH média upraveno v rozmezí 6,8-7,5 a poté sterilováno filtrací přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm do skleněné lahve. Pro přípravu 9krát koncentrovaného média byl postup zopakován ještě jednou.

Příprava lyzačního pufru pro extrakci luciferázy

K přípravě pufru bylo použito 121,14 g tris-(hydroxymetyl)-aminometanu, 30,80 g 2mM dithiothreitolu a 76,08 g kyseliny etylenglykoltetraoctové (EGTA). Navážená chemikálie byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky (100 ml) a doplněny destilovanou vodou po rysku. Pomocí 1M NaOH či HCl bylo pH pufru upraveno na 7,80. Lyzační pufr byl uchováván v chladničce při teplotě 4 °C.

Příprava roztoku pro stanovení luminiscence

Na jednu 96jamkovou mikrotitrační desku bylo potřeba 0,6 ml směsi komerčně dodávaného kitu Promega Steady-Glo® s 3 ml DMEM bez FBS a 3 ml lyzačního pufru pro extrakci luciferázy. Luminiscenční roztok byl vždy připraven bezprostředně před stanovením luminiscence.

Příprava kalibrační řady standardních látek

Nejprve byl připraven zásobní roztok 0,01M E2 ve 100% metanolu rozpuštěním 2,10 mg E2 v 770 µl metanolu. Připravený roztok byl dále ředěn na požadované koncentrace.

4.2 Buněčná kultura hERα-HeLa-9903

Buněčná kultura HeLa je linie lidských epiteliálních nádorových buněk, které byly izolovány v roce 1995. Pocházejí z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacks.[85] Jedná se o nejstarší a nejhojněji využívaná lidská buněčná linie v mnoha oborech světového výzkumu zahrnující biologické, chemické a medicínské disciplíny.

Byly to první lidské buňky, které byly namnoženy v laboratoři a označeny za „nesmrtelné“, protože nevykazují žádné známky poškození i po mnoha buněčných děleních díky přítomností enzymů telomeráz, které se podílí na zpětném prodlužování konců telomer po buněčném dělení.[86]

Linie hERα-HeLa-9903 je stabilně transfekována dvěma konstrukty. Těmi jsou zakódování lidského ER hERα (*human ERα*) a reportérový systém luciferázy světlušek spojující pět tandemových repeticí vitelogeninového ERE řízeného myším methalothioneinovým promotérem TATA elementu.[84]

Díky této modifikaci se může na buněčné linii hERα-HeLa-9903 testovat estrogenitu, v tomto případě schopnost chemikálie indukovat hERα-zprostředkovanou transaktivaci exprese luciferázového genu.

Buněčná linie hERα-HeLa-9903 byla získána z buněčné banky Japonské sbírky výzkumných biozdrojů (*JCRB – Japanese Collection of Research Bioresources*) se souhlasem o převozu materiálu.

4.3 Analyzované vzorky

4.3.1 Vzorek 1 – Ponávka

Potok Ponávka pramení jižně od obce Vranov v lese, kterým protéká jihozápadním směrem přes obec Lelekovice až do Údolí Ponávky, jak se jmenuje mělké údolí spojující Brno s Boskovickou brázdou. Údolím Ponávky vstupuje potok do Brna, konkrétně městskou částí Mokrá Hora, protéká kolem areálu Lachemy Brno podle železniční trasy v Řečkovicích a dále podél Myslínovy ulice za nádraží Brno-Královo Pole. Bezprostředně za nádražím Ponávka opouští své přirozené koryto a mizí v ústí štoly CI, kterou teče 3 km až do Cacovického náhonu na řece Svitavě.[87]

***Obr. 10:** Satelitní snímek a fotografie odběrové místa vzorku 1 – Ponávka*

4.3.2 Vzorek 2 – Svitava

Řeka Svitava je dlouhá 97 km a je 24. nejdelší řekou v České republice. Pramení u obce Javorník nedaleko města Svitavy a po cestě do Brna protéká Letovicemi, Boskovicemi, Blanskem a Adamovem. Na jihu Brna se vlévá do řeky Svratky. Významným přítokem je podzemní říčka Punkva v Blansku.

Tato řeka hrála významnou roli při industrializaci Brna koncem 19. století, kdy se kolem ní vytvořila Posvitavská průmyslová zóna. I proto byla ve 20. stoletím značně znečištěna.[88]

***Obr. 11** Satelitní snímek a fotografie odběrové místa vzorku 2 – Svitava*

4.3.3 Vzorek 3 – Kohoutovický potok

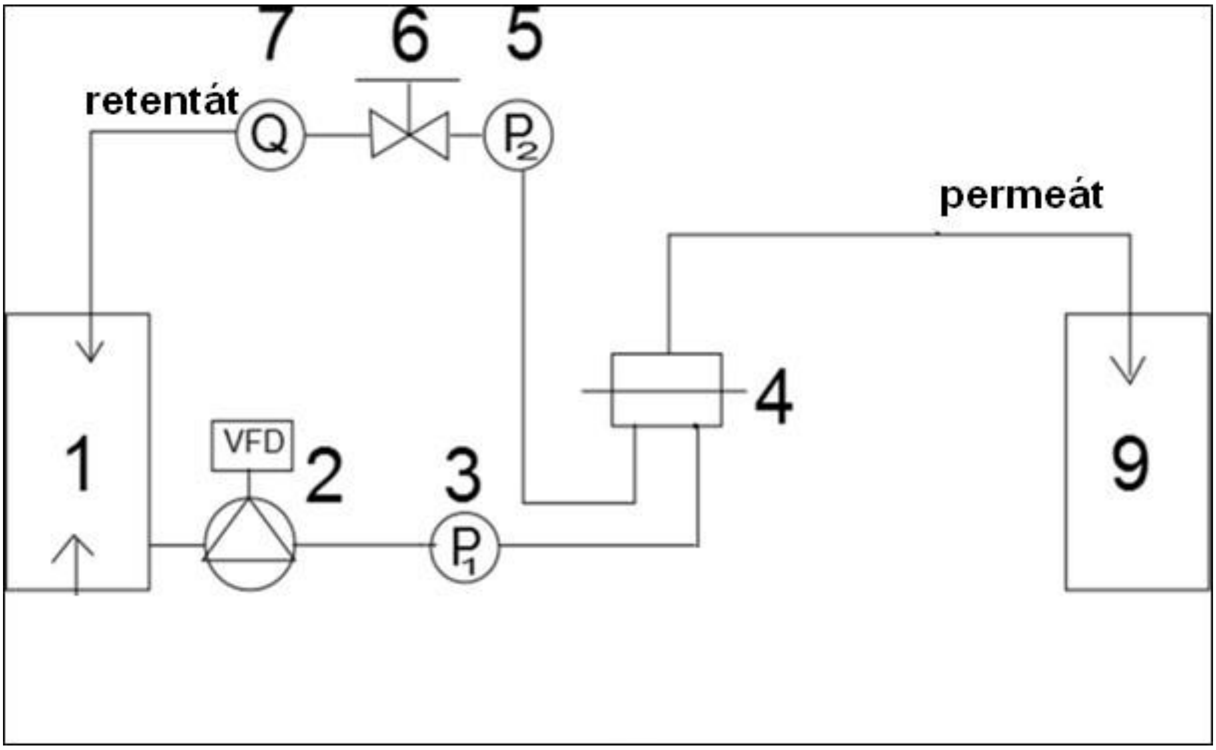
Kohoutovický potok je necelé 2 km dlouhý vodní tok nacházející se na území městských částí Brno-Kohoutovice a Brno-střed Pisárky. Horní část toku protéká Údolím Kohoutovického potoka, který je přírodní památkou. Spodní část potoku je vedena potrubím a pak dále v umělém korytě v parku u muzea Antropos.[89] Údolí je známé svou vegetací, konkrétně výskytem silně ohrožené orchideje Okrotice červené.[90] Kohoutovický potok je pravým přítokem řeky Svratky.

***Obr. 12:** Satelitní snímek a fotografie odběrové místa vzorku 3 – Kohoutovický potok*

5 Experimentální zařízení

5.1 Zařízení pro reverzní osmózu

Prekoncentrace vodných roztoků estrogenů byla provedena využitím tangenciální cross-flow reverzní osmózou v recirkulačním uspořádání (retentát byl recirkulován zpět do zásobní lahve). Vodný vzorek je zásobní lahve (1) přiváděn do zařízení pomocí membránového čerpadla (2) Aquatec 8800 (Aquatex International, Inc., USA) napájeného adaptérem OptiDrive 0,75 kW (Invertek Drives Ltd., UK). Vzorky byly vedeny PTFE hadičkami do *cross-flow* deskového modulu (Sterlitech Corporation, USA) (4), ve kterém byla umístěna vyměnitelná membrána pro reverzní osmózu Filmtec BW30LE (The Dow Chemcial Company, USA). K modulu je připojena vývod pro permeát vedoucího do zásobníku pro permeát (9) a vývod pro retentát. Manometry jsou připojeny k oběma přívodům (3) a k vývodu retentátu (5). Z druhého manometru (5) je vzorek přiváděn do ultrazvukového průtokoměru (7) skrze jehlový ventil, který slouží ke sledování tlaku v zařízení. Z průtokoměru je retentát odvádět zpět do zásobníku (1), odkud je znovu přiváděn do zařízení.[b]



Obr. 13: *Schéma experimentálního zařízení pro RO*

[b] Pro potřeby tohoto experimentu bylo zařízení zjednodušeno odstraněním průtokoměru a vinutého modulu.

Obr. 14: *Fotografie experimentálního zařízení pro RO*

5.2 Zařízení pro extrakci na tuhou fázi

SPE vakuový rozdělovač – Visiprep™ DL
Laboratorní suchá lázeň - ThermoFisher Scientific
Oasis HLB kolony 60 mg (Waters, Irsko)

5.3 Zařízení pro *in vitro* biotest

Inkubátor – CO_2 Sanyo MCO 18AIC
Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu – Box Safeflow 12
Inverzní mikroskop – Labomed TCM40
Cellometr (Auto T4) – CHT4 Nexcelom Bioscience
Luminometr – Luminoscan Ascent DLReadyTM
Laboratorní předvážky- Radwag XA 82/220/2X
Analytické váhy – Kern & Sohn GmbH WB0950291
Sterilní 96jamkové bílé mikrotitrační desky s průhledným dnem – Thermo Fisher Scientific
Temperační deska – Falc PA series

6 Metody

6.1 Příprava a zpracování vzorků vody

6.1.1 Příprava vzorků vodovodní vody obohacených estrogeny

Pro přípravu vzorků vodovodní vody bylo předpokládáno, že voda neobsahuje detekovatelné množství estrogenů.

Při přípravě vzorků pitné vody s přídavky estrogenů E1, E2, E3 a EE2 byl brán zřetel na jejich environmentální koncentrace a na citlivost in vitro biotestu. Byly tak zvoleny koncentrace, které odpovídají množství daných estrogenů v životním prostředí a zároveň před i po prekoncentraci pomocí RO bylo ve vzorcích detekovatelné množství hormonů.

Zásobní roztoky výše jmenovaných estrogenů byly připraveny do minivialek o celkovém objemu 1,5 ml. Z těchto zásobních roztoků byl mikropipetou odpipetován požadovaný objem estrogenu pro přípravu 1 100 ml vzorku. Před procesem zakoncentrování byly odebírány vzorky pro *in vitro* a instrumentální analýzu o objemu 10 ml.

K přípravě vzorků byla použita vodovodní voda z areálu Univerzitního kampusu Masarykovy univerzity Brno v Bohunicích, konkrétně v budově 29, ve které sídlí pracoviště RECETOX. Dodávku vody v Brně mají na starost Brněnské vodárny a kanalizace a.s. Objem vody byl odměřen odměrnými válci o objemech 1 000 a 100 ml. U vodovodní vody a následně připraveného vodného vzorku estrogenů byly změřeny pH, měrná vodivost a teplota.

Vzorky bylo připraveny ve třech opakováních od každého estrogenu, pro přehlednost byly označeny písmeny A, B a C.

Tab. 2*: Přehled koncentrací zásobních roztoků estrogenů, objemů a koncentrací estrogenů v jednom litru vzorku*

Estrogen (A,B,C)	**Zásobní koncentrace [ng·l^{-1}]**	**Objem E v 1 l vody [µl]**	**Koncentrace E [ng·l^{-1}]**
E2	$200 \cdot 10^3$	82,5	15
EE2	$200 \cdot 10^3$	22,0	4
E1	$400 \cdot 10^3$	82,5	30
E3	$200 \cdot 10^3$	165,0	30

6.1.2 Zpracování environmentálních vzorků

Vzorky povrchové vody byly odebírány metodou aktivního vzorkování, tedy přímo odebírány do lahví z tmavého skla o objemu 2,5 l. Tyto láhve byly předem vypláchnuty dichlormetanem, který byl z lahví volně odpařen.

K odběru vzorku byly cíleně zvoleny tři lokality města Brna, a to konkrétně:

- potok Ponávka, městská část Brno – Řečkovice, průmyslová oblast (areál společnosti Erba Lachema s.r.o.), souřadnice 49.2482886N, 16.5901372E

- řeka Svitava, městská část Brno – Zábrdovice v bezprostřední blízkosti Vojenské nemocnice Brno (levý břeh), souřadnice 49.2021075N, 16.628368E

- Kohoutovický potok, městská část Písárky, park Antropos, souřadnice 49.1928106N, 16.5660486E

Lahve byly nejprve třikrát vypláchnuty vodou z daného říčního toku a teprve poté byl odebrán konečný vzorek. Ihned po jeho odebrání byla změřena teplota vody digitálním teploměrem Greisinger GTH 1170 a byla zapsána společně se souřadnicemi lokality odběru do odběrového protokolu. Souřadnice lokalit odběru byly zjištěny pomocí mobilní aplikace Mapy.cz na mobilním telefonu.

Po odběru byly vzorky bezprostředně transportovány do laboratoře. Vzhledem k průměrné teplotě vzduchu v den odběru, která činila -5 °C a rychlosti odběru a transportu vzorků, byla dodržena doporučená teplota skladování. Multimeterm byla změřena měrná vodivost a pH surových vzorků. Část vzorků pro prekoncentraci pomocí RO a SPE byla podrobena vakuové filtraci pomocí membránové vývěvy přes filtrační papír ze skleněného vlákna o velikosti pórů 0,45 µm. Zbylá část vzorků byla ponechána pro SPE bez filtrace. Na filtračních papírech bylo možné pozorovat organické znečištění vzorků vody, které bylo v případě řeky Svitavy znatelné již na první pohled.

Obr. 15: *Fotografie filtrů po filtraci vzorků povrchové vody – Ponávka (vlevo), Svitava (uprostřed) a Kohoutovický potok (vpravo)*

6.2 Prekoncentrace vzorků vody vybranými metodami

6.2.1 Metodika reverzní osmózy

Zpracované vzorky vodovodní i povrchové vody byly následně zakoncentrovány využitím RO.. Metodika prekoncentrace se opírá o předchozí vývoj a optimalizaci této metody na pracovišti RECETOX.

Pro následující experiment byla použita RO s tangenciálním prouděním (*cross-flow*) s využitím tenkovrstvé RO membrány o účinném povrchu 42 cm^2. Před zahájením experimentu bylo zařízení pečlivě promyto 2,5 l destilované vody. Pro případ možné kontaminace zařízení estrogeny z předchozího experimentu, bylo zařízení dále promyto 5 l NaOH při pH 11. Nakonec bylo zařízení promyto 7,5 l destilované vody pro vymytí zbytků hydroxidu, dokud měrná vodivost promývací vody neklesla pod 10 $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Ke zvýšení účinnosti RO membrány byla dle Kulkarni a kol. (1996) membrána namočena do 50% roztoku etanolu po dobu minimálně 12 hodin před začátkem experimentu.[91] Po namočení byla instalována do zařízení a dále kondiciována demineralizovanou (mQ) vodou do stálého průtoku permeátu. Průtok permeátu byl měřen jako přírůstek hmotnosti permeátu za jednotku času.

Během samotného zakoncentrování vzorků vody byl tlak na membráně udržován na hodnotě 7 barů, láhev se vzorkem byla uchována ve vodní lázni s ledem pro udržení teploty cca 20°C. Proces trval tak dlouho, dokud se objem vzorku nezmenšil přibližně na desetinu původní objemu, tedy přibližně 100 ml (snaha o dosažení teoretického faktoru zakoncentrování 10), rychlost průtoku permeátu byl rovněž zaznamenán pro orientační stanovení délky trvání zakoncentrování jednoho vzorku. Tato doba se lišila v závislosti na typu estrogenu a na počtu použití membrány. Pro každý estrogen byla použita jiná membrána a každý vzorek byl zakoncentrován ve třech opakováních. (A,B,C).

Po skončení reverzní osmózy byla změřena hmotnost, měrná vodivost a pH obou výstupů, tedy retentátu i permeátu a byly z nich odebrány vzorky pro *in vitro* analýzu o objemu cca 20 ml.

6.2.2 Metodika extrakce na tuhou fázi

Vzorky vodovodní i povrchové vody byly také zakoncentrovány metodou SPE. Metodika prekoncentrace pomocí SPE vychází ze studie Jálové a kol. (2013).[38]

Pro tento experiment byly použity SPE extrakční kolony s Oasis HLB sorbentem. Před extrakcí byl do vzorku extrahovaného vzorku přidán standard EE2 v acetonitrilu. Kolony byly kondiciovány 3 ml acetonu a 2 ml ultračisté vody. Po dokončení extrakce byla kolona vymyta 1,5 ml 5% metanolu a vzorek byl eluován 2 ml acetonu. K eluátu byl přidán E2 standard a následně odpařen pod proudem dusíku při teplotě 40 °C.

6.3 Metodika *in vitro* biotest

6.3.1 Práce s buněčnou linií hERα-HeLa-9903

Buňky se kultivují v kultivačních lahvích v médiu DMEM s 10% DCT-FBS v inkubátoru s 5 % CO_2 při 37 ˚C. Pasážují se přibližně každé dva až tři dny, dle míry konfluence (75-90%), v poměru 1:4 až 1:6. Buňky by se neměly kultivovat déle než je 40 pasáží (potom již nebude zachována integrita odpovědi na estrogen).

Metodika práce s buněčnou linii hERα-HeLa-9903 z normy OECD/455.[c] Tento test standardně slouží jako zavedená in vitro metoda stanovení estrogenity. V tomto exprimentu slouží jako vyhodnocovací kritérium účinnosti prekoncentrace vybraných metod.

Pasážování buněk

Do laminárního boxu byly umístěny lahev s médiem, lahev se sterilním PBS a zkumavka s trypsinem vytemperované na 37 °C. Rukavice byly před prací ošetřeny 70% etanolem. Sterilní skleněnou Pasteurovou pipetou, ožehnutou nad kahanem a nasazenou na vývěvu bylo odsáto médium z kultivační lahve. Plastovou Pasteurovou pipetou bylo nasáto 2-3 ml PBS k opláchnutí buněk, které bylo dvakrát zopakováno. Do kultivační lahve bylo následně napipetováno 0,5 ml trypsinu, lahev byla uzavřena a vložena zpět do inkubátoru. Po 2-3 minutách byla láhev vytažena z inkubátoru a byl zkontrolován stav disperze buněk.

V případě dostatečné disperze bylo do lahve přidáno médium (inhibuje činnost trypsinu). Objem média se bolí v závislosti na poměru pasáže. Buňky byly následně pomocí plastové pipety zhomogenizovány přímo v lahvi. Pipetou se odsál požadovaný objem podle poměru pasáže do nové sterilní lahve. Ke zbylému objemu suspenze se přidalo cca 5 ml média. Lahve byla uzavřena a opět vložena do inkubátoru. Pracovní pomůcky a chemikálie byly vyjmuty z flow-boxu, pracovní plocha byla ošetřena 70% etanolem a vysvícena UV lampou po dobu 10 minut.

6.3.2 Provedení biotestu

Nasazování desky

20 µl buněčné směsi z pasážování bylo odebráno a nasazeno na desku do jamky u seříznutého rohu. Počet buněk byl spočítán Cellometrem a v pomocí Microsoft Office Excel byl přepočítán potřebný objem směsi buněk na koncentraci $20 \cdot 10^3$ buněk/jamka. Z vypočítaného objemu bylo zjištěno potřebné množství DMEM k doplnění na 6 ml. Multifunkční pipetou bylo do jamek napipetováno 100 µl média s buněčnou linií.

Expozice

Do jamek s médiem a buněčnou linii bylo napipetováno 100 µl retentátu, vzorku, kalibrační řady E2 v metanolu, čistého metanolu, filtrátu a vody z promývání zařízení, vždy ve třech opakováních. Vzorek a retentát byly nasazeny ve třech koncentracích – původní koncentrace, 3krát a 9krát koncentrovanější.

---

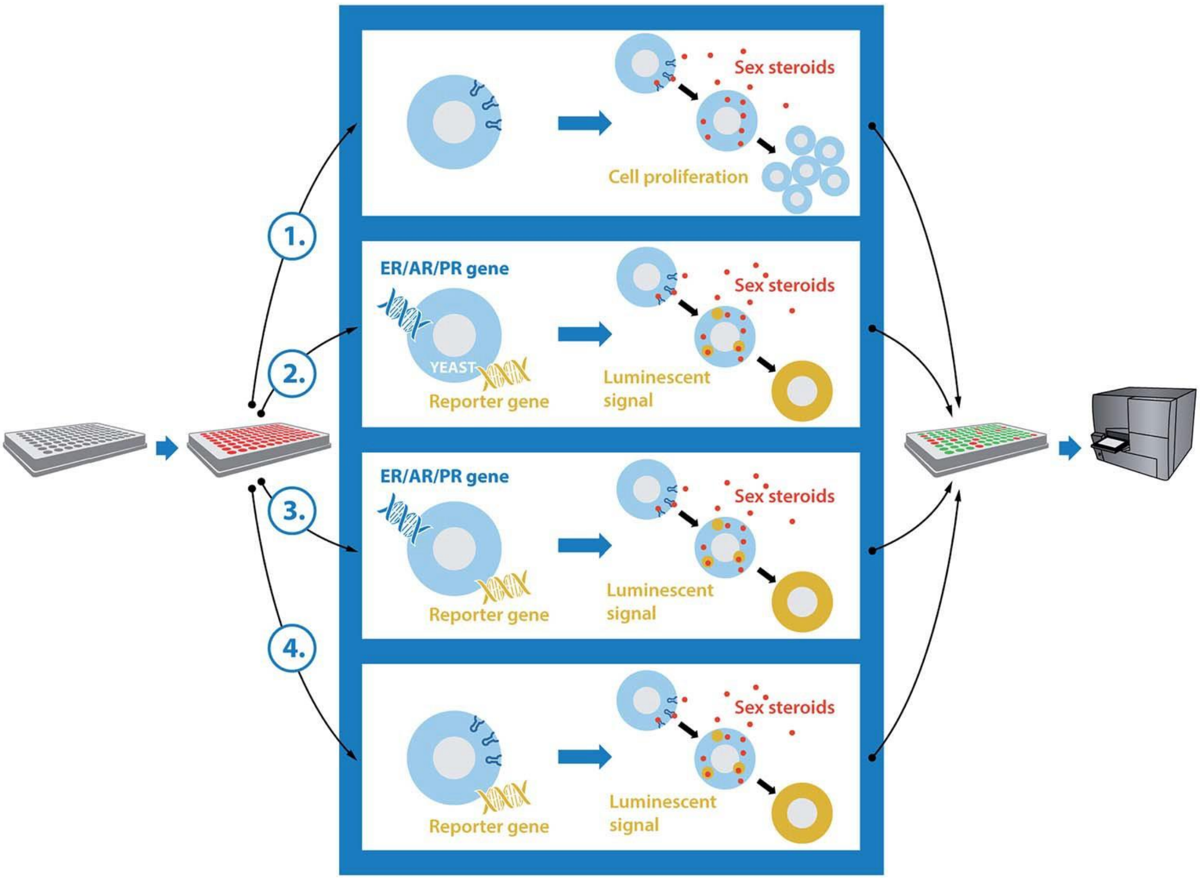
[c] Autor práce asistoval při manipulaci s buněčnou liní hERα-HeLa-9903 a při provádění biotestů, jenž byly náplní diplomové práce Bc. Barbory Taškové.

Kalibrační řada E2 v metanolu byla připravena o koncentracích 1,37; 4,10;3 7,00; 333,00 a 1 000,00 pM. Takto nasazené desky byly vráceny zpět do inkubátoru na 24 hodin. Každá deska byla připravena ve dvou opakováních (A,B).

Vyhodnocení

Vytemperovaný luciferin byl přidán do směsi DMEM a lyzačního pufru. Desky byly vyjmuty z inkubátoru a stav buněk byl zkontrolován pod mikroskopem. Multikanálovou automatickou pipetou bylo opatrně odsáto médium a napipetováno 100 µl PBS. Po odsátí PBS bylo napipetováno stejné množství směsi luciferinu, DMEM a pufru. Do krajních jamek desky bylo napipetováno PBS a desky byly ponechány homogenizaci na třepačce po dobu 15 minut. Desky byly během třepání zakryty alobalem.

Po 15 minutách bylo dno desek podlepeno bílým papírem a bez víčka byly vloženy do luminometru. Pomocí softwaru Ascient byla změřena luminiscence desek, naměřená data byla importována do tabulkového procesoru Microsoft Office Excel a dále vyhodnocena.



Obr. 16: *Schéma hlavních přístupů při in vitro testování estrogenních, androgenních a progestagenních účinků*[8]

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou uvedeny experimentálně zjištěné hodnoty sledovaných vlastností vodných vzorků estrogenů před a po jejich zakoncentrování pomocí SPE a RO. Dále jsou zde uvedeny výsledky vyhodnocení účinnosti vybraných metod na základě *in vitro* testů estrogenity se stručným vysvětlením vyhodnocovací metody.

Cílem této kapitoly je porovnat účinnost vybraných metod na základě experimentální zjištěných hodnot.

7 Prekoncentrace vodných vzorků pomocí reverzní osmózy

7.1 Metoda vyhodnocení dat *in vitro* analýzy

Detekovaná indukce luminiscence byla převedena na maximální odpověď na E2 (1 000 pM) v procentech, zatímco kontrola rozpouštědla poskytla výchozí hodnotu. Zjištěná estrogenní aktivita vzorků, vyjádřená jako 17β-estradiol ekvivalent (*EEQ – Estradiol Equivalent*) zakoncentrovaných vybranou metodou, byla vypočítána pomocí softwaru GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA). Koncentrace EEQ vzorků byly stanoveny metodou vyhodnocení EEQ z nejvyšší naměřené aktivity (*PME – point-maximum evaluation*), kde se vztáhla maximální odpověď neředěného vzorku k E2 koncentraci se stejnou odpovědí. Konečné hodnoty EEQ byly vypočteny z průměru dvou nezávislých měření.

7.2 Vzorky vodovodní vody

Vzorky vodovodní vody obohacené o estrogeny E1, E2, E3 a EE2 byly zakoncentrovány metodou RO. V následujících tabulkách jsou uvedeny fyzikálně-chemické parametry vzorků – teplota, pH a měrná vodivost a také výstupní hodnoty z *in vitro* analýzy, jimiž jsou reálný faktor zakoncentrování a výtěžnost. U těchto vzorků byl také sledován čas procesu prekoncentrace.

Teoretická faktor zakoncentrování je počítán jako objem vzorku dělený objemem retentátu. Reálný faktor zakoncentrování je definován jako koncentrace estrogenu ve vzorku dělená koncentrací v estrogenu v retentátu. Obě koncentrace byly stanoveny *in vitro*. Výtěžnost tedy představuje poměr reálného a teoretického faktoru a je uváděna v procentech.
In vitro analýza operuje s koncentrací estrogenů v jednotkách pM, která je ve výsledné tabulce vyjádřena v $ng \cdot l^{-1}$.

8.1.1 Estron

Tab. 3: Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti a teploty vzorků vody, retentátu a permeátu pro E1

vzorek	τ [min]	Vzorek vody			Retentát			Permeát		
		pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]
E1/A	338	7,50 21,6	551 20,6	1 100	7,74 21,6	1 384 21,6	124	6,98 20,5	121 21,2	932
E1/B	393	7,67 21,3	568 21,1	1 100	7,6 22,8	1 395 22,4	119	6,7 22,1	98 22,0	940
E1/C	439	7,40 21,1	546 21,3	1 100	7,6 21,1	1 384 21,3	119	6,6 21,8	92 21,7	936

Tab. 4: Přehled vypočítaných hodnot při vyhodnocení účinnosti prekoncentrace na základě in vitro analýzy pro E1

vzorek	Deska	Koncentrace vzorku [pM EEQ]	Koncentrace retentátu [pM EEQ]	Teoretický faktor zakoncentrování	Reálný faktor zakoncentrování	**Výtěžnost [%]**
E1/A	A	–	–	8,87	–	–
	B	11,97	68,61		5,73	64,62
E1/B	A	9,50	32,49	9,24	3,42	37,00
	B	15,02	124,12		8,26	89,42
E1/C	A	12,54	46,21	9,24	3,68	39,88
	B	20,39	181,31		8,89	96,22

8.1.2 17β-estradiol

Tab. 5: Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti a teploty vzorků vody, retentátu a permeátu pro E2

vzorek	τ [min]	Vzorek vody			Retentát			Permeát		
		pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]
E2/A	338	7,5 22,7	558 22,7	1100	7,53 20,2	1 519 22,7	118	6,7 21,2	87 22,7	901
E2/B	393	7,5 22,7	558 22,3	1100	7,45 19,2	1 615 21,1	125	6,56 21,3	84 21,2	903
E2/C	439	7,24 22,9	543 22,8	1100	7,62 22	1 365 21,8	121	7,15 21,6	79 21,6	922

Tab. 6: Přehled vypočítaných hodnot při vyhodnocení účinnosti prekoncentrace na základě in vitro analýzy pro E2

vzorek	Deska	Koncentrace vzorku [pM EEQ]	Koncentrace retentátu [pM EEQ]	Teoretický faktor zakoncentrování	Reálný faktor zakoncentrování	**Výtěžnost [%]**
E2/A	A	106,92	373,45	9,32	3,49	37,48
	B	104,22	262,38		2,52	27,01
E2/B	A	97,76	185,35	8,80	1,90	21,54
	B	47,15	89,66		1,90	21,61
E2/C	A	66,60	396,70	9,09	5,96	65,53
	B	114,84	605,45		5,27	58,00

8.1.3 Estriol

Tab. 7: Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti a teploty vzorků vody, retentátu a permeátu pro E3

Vzorek	τ [min]	Vzorek vody			Retentát			Permeát		
		pH *t* [°C]	*κ* [μS·cm^{-1}] *t* [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	*κ* [μS·cm^{-1}] *t* [°C]	*V* [ml]	pH *t* [°C]	*κ* [μS·cm^{-1}] *t* [°C]	*V* [ml]
E3/A	330	5,40 21,1	546 21,5	1 100	7,21 19,9	1 445 20,0	118	6,69 20,0	93 19,9	932
E3/B	380	7,31 21,7	548 21,7	1 100	7,38 21,5	1 325 21,8	137	7,30 21,1	83 21,3	911
E3/C	408	7,3 21,6	541 21,7	1 100	7,6 23,2	1 392 23,3	123	6,5 22,3	78 21,1	926

Tab. 8: Přehled vypočítaných hodnot při vyhodnocení účinnosti prekoncentrace na základě in vitro analýzy pro E3

Vzorek	Deska	Koncentrace vzorku [pM EEQ]	Koncentrace retentátu [pM EEQ]	Teoretický faktor zakoncentrování	Reálný faktor zakoncentrování	**Výtěžnost [%]**
E3/A	A	19,89	114,74	9,32	5,77	61,89
	B	34,68	307,19		8,86	95,03
E3/B	A	4,00	32,09	8,03	8,03	99,96
	B	16,85	42,54		2,52	31,44
E3/C	A	14,17	160,21	8,94	11,31	126,46
	B	38,17	395,27		10,35	115,82

8.1.4 17α-ethynylestradiol

Tab 9: *Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti a teploty vzorků vody, retentátu a permeátu pro E3*

Vzorek	**τ [min]**	**Vzorek vody**			**Retentát**			**Permeát**		
		pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] *t* [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] t [°C]	*V* [ml]	pH t [°C]	κ [μS·cm^{-1}] *t* [°C]	*V* [ml]
EE2/A	340	7,36 23,4	543 23,1	1 100	7,38 20,1	1 312 22,7	137	6,55 21,8	100 22,7	913
EE2/B	420	7,41 22	539 21,8	1 100	7,56 19,2	1 509 21,1	119	7,03 21,3	88 21,2	933
EE2/C	440	7,24 22,9	543 22,8	1 100	7,55 21,2	1 448 21,3	121	7,37 21,1	81 21,1	922

Tab. 10: *Přehled vypočítaných hodnot při vyhodnocení účinnosti prekoncentrace na základě in vitro analýzy pro EE2*

Vzorek	Deska	Koncentrace vzorku [pM EEQ]	Koncentrace retentátu [pM EEQ]	Teoretický faktor zakoncentrování	Reálný faktor zakoncentrování	**Výtěžnost [%]**
EE2/A	A	4,58	16,79	8,03	3,67	45,70
	B	8,39	96,71		11,53	143,54
EE2/B	A	19,51	248,49	9,24	12,74	137,88
	B	41,43	517,43		12,49	135,15
EE2/C	A	13,51	227,67	8,94	16,85	188,49
	B	40,32	450,56		11,18	125,00

8.2 Vzorky povrchové vody

Vzorky povrchové vody byly rovněž zakoncentrovány metodou RO. V tabulkách jsou uvedeny hodnoty vstupních a výstupních parametrů vzorků, což bylo teplota, pH, měrná vodivost a množství rozpuštěného kyslíku.

V těchto vzorcích nebyla detekována žádná estrogenní aktivita, na konci kapitoly je souhrnné zhodnocení estrogenní aktivity vzorků.

8.2.1 Vzorek 1 – Ponávka

Tab. 11: *Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti, teploty a obsahu rozpouštěného kyslíku, vzorků vody retentátu a permeátu pro vzorek 1*

	V [ml]	pH t [°C]	κ [µS·cm^{-1}] t [°C]	O_2 [mg·l^{-1}]
Původní vzorek	1 072	8,58 14,3	1076 14,5	9,70 18,1
Retentát	120	7,75 21,4	4 150 21,4	8,37 18,1
Permeát	922	7,30 21,8	145 21,7	8,58 18,1
Teoretický faktor zakoncentrování	8,93			

8.2.2 Vzorek 2 – Svitava

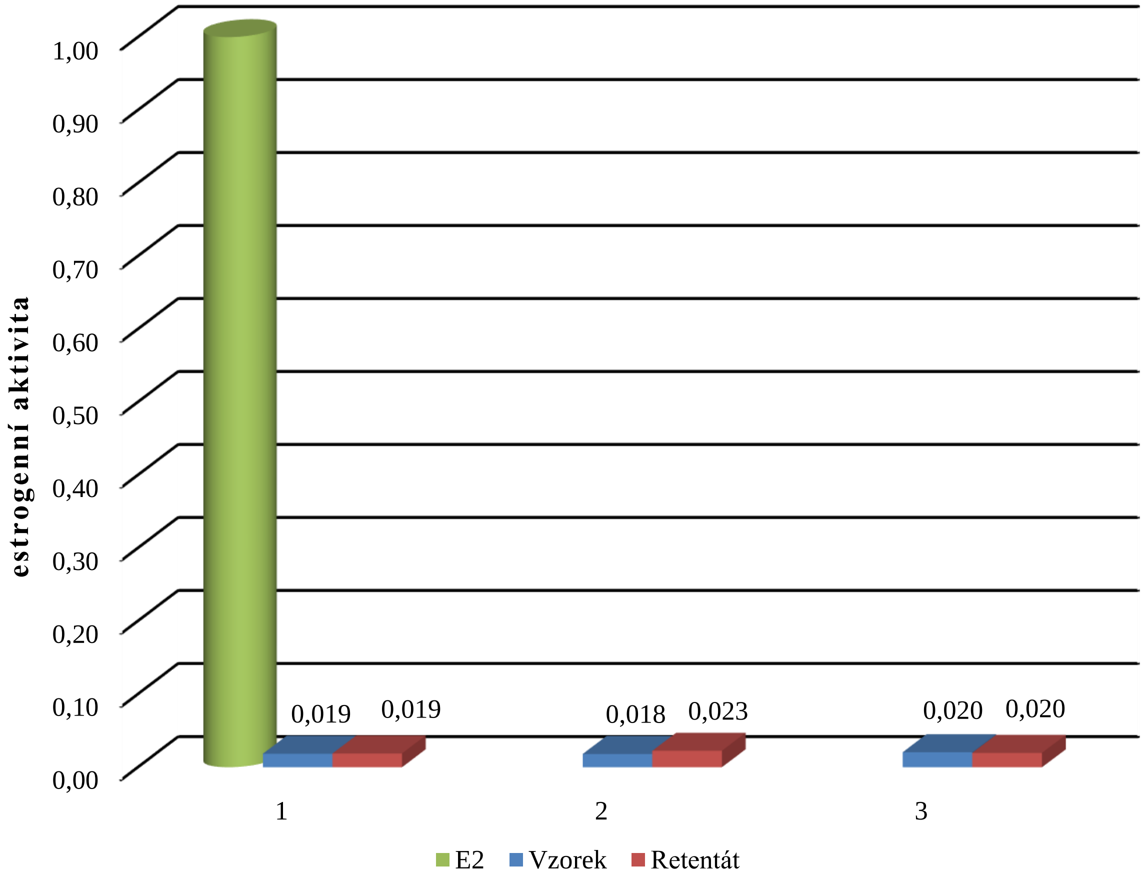
Tab. 12: *Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti, teploty a obsahu rozpouštěného kyslíku, vzorků vody retentátu a permeátu pro vzorek 2*

	V [ml]	pH t [°C]	κ [µS·cm^{-1}] t [°C]	O_2 [mg·l^{-1}]
Původní vzorek	1 100	8,58 10,7	527 9,9	8,90 18,4
Retentát	116	7,75 22,8	2 100 21,5	8,38 21,0
Permeát	945	7,30 21,9	90 21,4	8,40 21,5
Teoretický faktor zakoncentrování	9,32			

8.2.3 Vzorek 3 – Kohoutovický potok

Tab. 13: *Přehled naměřených hodnot pH, měrné vodivosti, teploty a obsahu rozpouštěného kyslíku, vzorků vody retentátu a permeátu pro vzorek 3*

	V [ml]	**pH** ***t*** **[°C]**	κ **[µS·cm^{-1}]** ***t*** **[°C]**	O_2 **[mg·l^{-1}]**
Původní vzorek	1 100	8,32 10,7	1 978 12,6	8,70 15,4
Retentát	118	7,78 22,8	8 430 22,1	8,46 22,6
Permeát	931	7,58 21,9	416 21,3	8,37 21,6
Teoretický faktor zakoncentrování	9,48			



Obr. 17: *Souhrnné vyhodnocení estrogenní aktivity vzorků povrchové vody – 1 Ponávka, 2 Svitava, 3 Kohoutovický potok*

8.3 Zhodnocení prekoncentrace pomocí reverzní osmózy

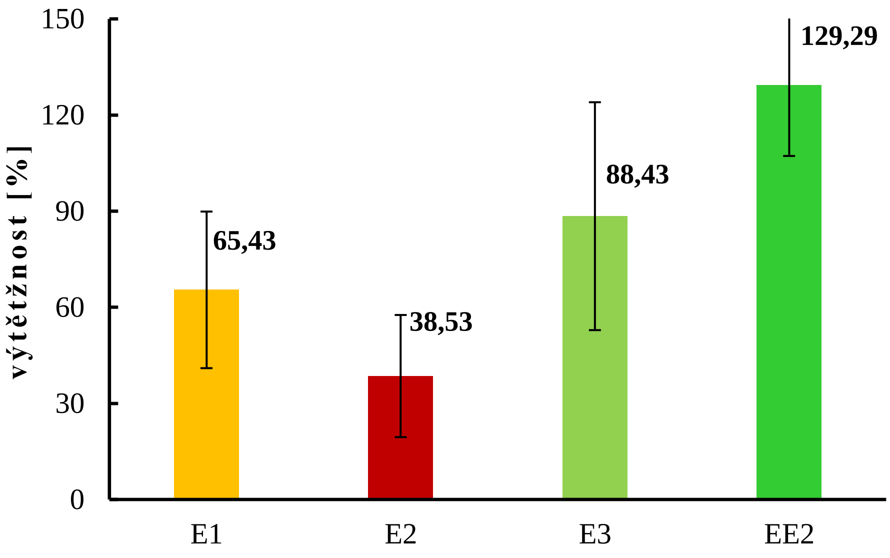
Tab. 14 *Přehled konečných výsledků pro prekoncentraci vodných vzorků estrogenů pomocí reverzní osmózy*

Estrogen	Koncentrace vzorku [ng·l^{-1} EEQ]	Koncentrace retentátu [ng·l^{-1} EEQ]	Teoretický faktor zakoncentrování	Reálný faktor zakoncentrování	**Výtěžnost [%]**	**SD [%]**
E1	3,78	24,66	9,24	6,00	65,43	24,435
E2	24,40	86,84	9,07	3,51	38,53	19,062
E3	5,80	47,76	8,76	7,81	88,43	35,567
EE2	5,80	70,71	8,74	11,41	129,29	22,073

Celkové výsledky prekoncentrace vzorků vodovodní vody představuje ***Tab. 14***. Z těchto výsledků lze na první pohled vidět, že bylo nejvyšší výtěžnosti dosaženo u prekoncentrace vodného vzorku EE2 se 129,29% výtěžností. Na druhou stranu nejnižší výtěžnosti bylo dosaženo u vzorku E2, u kterého hodnota výtěžnosti činila pouhých 38,53 %. Relativně uspokojivé výtěžnosti se dosáhlo u zakoncentrování vzorků E1 s 65,43 % a E3 s 88,43 %.

Z rozdílných hodnot teoretických a reálných faktorů zakoncentrování je patrné, že účinnost prekoncentrace ovlivňují molekulární vlastnosti daných estrogenů.
Tohoto jevu si lze nejlépe povšimnout u vzorků E3 a EE2. Oba estrogeny byly obsaženy ve stejné koncentraci původního vzorku, avšak jejich následná koncentrace v retentátu byla odlišná. Dokonce bylo dosaženo i stejného teoretického faktoru zakoncentrování, ale reálný faktor zakoncentrování byl u EE2 vyšší, což vedlo k vyšší výtěžnosti.

Z velkého rozdílu teoretického a reálného faktoru zakoncentrování u E2 lze usoudit, že použité nastavení RO není vhodné pro úpravu vzorků obsahujících E2, ale je vhodné pro prekoncentraci EE2 a E3



Obr. 18: *Výtěžnost prekoncentrace estrogenů metodou RO pro E1,E2,E3 a EE2*

9 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo experimentální otestování metody reverzní osmózy (RO) pro zakoncentrování vybraných estrogenních látek ve vodě a porovnání její účinnosti s již zaběhnutou metodou extrakce na tuhou fázi (SPE).

Estrogenní látky jsou nejvýznamnějšími zástupci endokrinních disruptorů (ED), což jsou látky schopné narušovat správnou funkci endokrinního systému obratlovců, především žijících ve vodním prostředí. Tato schopnost z nich činí významné kontaminanty životního prostředí. V životním prostředí se ED, konkrétně estrogenní látky, vyskytují ve velmi nízkých koncentracích ($ng \cdot l^{-1}$), již při kterých mohou být biologicky aktivní a vykazovat tak endokrinně-disrupční aktivitu.

V případě estrogenních látek se tato aktivita nazývá estrogenita a vyjadřuje míru schopnosti estrogenní látky se vázat na estrogenní receptor (ER) a spustit tak určité signální dráhy vedoucí k expresi cílových genů.

Ke kvantifikaci estrogenity byl v této práci použit zavedený *in vitro* biotest na transgenní buněčné linii hERα-HeLa-9903.

Nízká mez detekce instrumentálních i biologických metod detekce těchto látek nám udává potřebu vzorky vody před jejich analýzou zakoncentrovat. K zakoncentrování vzorků vody se nejběžněji využívá již zmíněná SPE[53] a kapalinová extrakce (LLE)[34].

V této práci byla k zakoncentrování vodných vzorků čtyř estrogenů estronu E1), 17β-estradiolu (E2), 17α-ethynylestradiolu (EE2) a estriolu (E3) provedena metodou RO a SPE.

V předchozích pracích zabývající se prekoncentrací estrogenů pomocí RO na pracovišti RECETOX byl sledován vliv pH na účinnost prekoncentrace. V diplomové práci Kamily Krejčí byl při optimalizaci podmínek pozorována až 3krát vyšší estrogenní odpověď u E2 při pH 12 a výtěžnost přibližně o 40 % vyšší u E2 a EE2.[95] V provozních materiálech výrobců použité membrány je však uvedena provozní rozsah pH 2-11.

Hodnota pH hraje významnou roli při disociaci látek ve vodě. Estrogeny patří mezi hydrofobní látky. Dle některých studií je dokázáno, že při zvýšení pH dochází u estrogenů k porušení vodíkové vazby a tím zvýšení disociace estrogenu ve vodě a tím snížení ulpívání na plastových površích. Proto byla po každé prekoncentraci aparatura promývána cca 5 l NaOH při pH 11.

V tomto experimentu nebylo upravováno pH vodných vzorků. Důvodem je skutečnost, že při vysokém pH se ve vodovodní vodě vysráží určitý podíl vápníku ve formě $Ca(OH)_2$ a docházelo by tak k předčasnému zahlcení membrány. Tohoto jevu v předchozí práci Kamily Krejčí nebylo pozorováno, protože pro přípravu vzorků vody byla použita destilovaná voda.

Během zpracování vzorků bylo sledováno pH a měrná vodivost vzorků a jelikož nedocházelo k detekovatelné změně pH a měrné vodivosti po obohacení vodovodní vody vybranými estrogeny, nebyly tyto hodnoty uvedeny ve výsledcích práce. Hodnoty měrné vodivosti představovaly orientační ukazatel schopnosti RO zadržet ionty obsažené ve vodě způsobující její přirozenou vodivost, avšak ne se 100% účinností.

Z výsledků uvedených v ***Tab. 14*** lze usuzovat, že účinnost prekoncentrace za daných podmínek není pro všechny estrogeny stejná a tudíž závisí na jejich molekulárních vlastnostech,

například molekulové relativní hmotnosti, polaritě a hydrofobitě. Dané podmínky experimentu vyhovovali EE2 a posléze E3.

Na druhou stranu, detekce biologickými metodami není vždy exaktní jako instrumentálními metodami. Úspěšnost biologických metod závisí na mnoha faktorech, zejména na přirozené variabilitě živých organismů, podmínkách kultivace a samotného biotestu. V případě použitého in vitro biotestu se může jednat například o nevyhovující složení média, nedostatečně aseptická práce s a tudíž kontaminace linie, jakost kitu pro vyhodnocování indukce luminiscence atd.

Dále byly zakoncentrovány metodou RO vzorky povrchové vody ze tří brněnských toků – potoku Ponávka, řeky Svitavy a Kohoutovického potoku. Tyto vzorky nebyly obohaceny estrogeny. Před prekoncentrací byly z důvodu odstranění biologického odpadu a prevenci případné mikrobiální kontaminace vzorky podrobeny filtraci přes skleněné vlákno. Míra znečištění těchto toků organickými složkami byla pozorovatelná již na použitých filtrech. Zajímavým zjištěním byly razantní rozdíly v měrné vodivosti těchto vzorků – nejnižší měrná vodivost byla naměřena ve vzorku řeky Svitavy, která také vykazovala nejvyšší organické znečištění. Nejvyšší hodnota měrné vodivosti byla naměřena u Kohoutovické potoka. Tato hodnota byla téměř dvojnásobná oproti Ponávce a téměř čtyřnásobná oproti Svitavě. Za podmínek použité metody nebyla v těchto vzorcích detekována žádné estrogenní aktivita.

Bohužel v tuto chvíli není možné diskutovat účinnost metody SPE a její srovnání s metodou RO, neboť nejsou zatím k dispozici výsledky z *in vitro* analýzy vzorků prekoncentrovaných touto metodou.. Obecně je však známo, že tato metoda disponuje vysokou účinností, proto je ve výzkumu k tomuto účelu hojně využívána.[53]

Nevýhodou SPE je finanční nákladnost a vznik odpadních produktů. Kolona pro SPE je určena k jednorázovému použití, tedy prekoncentrace jednoho vzorku za použití elučního rozpouštědla (i když v relativně malém objemu). SPE je zavedená a optimalizovaná metoda, která nabízí široký sortiment kolon, sorbentů a dalších modifikací pro různé potřeby. Přístrojová nenáročnost a relativně krátká doba procesu jsou dalšími atributy směřujícím k užitečnosti této metody.

Hlavní výhodou RO je rozhodně šetrnost ve zpracování vzorků. Během RO se nepoužívají žádná organická rozpouštědla a tím je tato metoda přívětivější k životnímu prostředí. Vzorky vody zpracované bez přítomnosti těchto rozpouštědel jsou vhodná právě pro analýzu *in vitro*. Další výhodou jsou nižší finanční nároky za zpracování jednoho vzorku – membrány se dají pro daný druh látky použít opakovaně.

Při srovnání výhod a nevýhod těchto metod by mohla RO vystupovat alespoň jako vhodná alternativa k *in vitro* metodám detekce ED.

Další výzkum by se mohl zabývat optimalizací účinnosti prekoncentrace pro jednotlivé estrogeny s ohledem na jejich molekulární vlastnosti než jako celkový vodný vzorek. Dále by to mohla být snaha o regeneraci nebo prodloužení životnosti použitých membrán při opakovaném použití, například regeneraci membrány v roztocích o nízkém a vysokém pH a aparatury po každém procesu zvlášť namísto použitého promývání aparatury s membránou uvnitř.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá metodami prekoncentrace vodných vzorků endokrinních disruptorů před *in vitro* analýzou.

Teoretická část této práce se věnuje problematice endokrinní disrupce a blíže specifikuje endokrinní disruptory a mechanismus jejich účinku. Dále charakterizuje používané metody prekoncentrace vodných vzorků endokrinních disruptorů a stručně představuje instrumentální a *in vitro* metody detekce endokrinních disruptorů ve vodných vzorcích.

Experimentální část je založena na prekoncentraci vodných vzorků estrogenů a environmentálních vzorků dvěma vybranými metodami, a to extrakcí na tuhou fázi a reverzní osmózou.

Celkově byly testovány čtyři estrogeny – estron, 17β-estradiol, 17α-ethynylestradiol a estriol o koncentracích 15 $ng \cdot l^{-1}$ E1, 4 $ng \cdot l^{-1}$ E2 a 30 $ng \cdot l^{-1}$ E3 a EE2, které jsou blízké jejich environmentálním koncentracím. Dále byly testovány tři vzorky povrchové vody – voda z potoku Ponávka, Kohoutovického potoku a řeky Svitavy.

Všechny tyto vzorky byly zakoncentrovány dvěma metodami – RO a SPE a dále byly podrobeny *in vitro* biotestu estrogenity s využitím transkripční aktivace reportérového luciferázového genu pro kvantifikaci účinnosti metody prekoncentrace.

Účinnost prekoncentrace obohacených vzorků využitím RO byla rozdílná pro různé estrogeny. Nejvyšší výtěžnosti 129,29 % bylo dosaženo u EE2, naopak nejnižší výtěžnosti o hodnotě 38,53 % bylo dosaženo u E2. Vzorek E1 byl prekoncentrován s 65,43% účinností a vzorek E3 s výtěžností 88,43 %. Žádný ze vzorků povrchové vody nevykázal estrogenní aktivitu, nebylo tudíž možno vyhodnotit účinnost použité metody pro reálné vzorky. Míra výtěžnosti použité metody byla vyhodnocena na základě *in vitro* analýzy pomocí křivky dávka-odpověď, která byla vyhodnocena metodou nejvyšší naměřené aktivity.

Účinnost prekoncentrace obohacených vzorků využitím SPE zatím nebylo možné vyhodnotit, neboť v době dokončení této práce nebyly výsledky *in vitro* analýzy stále k dispozici.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1 EUROPEAN COMMISSION, 1999. Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. *Community Strategy for Endocrine Disrupters a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. COM 706 final.* [online]. 31. ISSN 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781107415324.004

2 GORE, A.C. CREWS, D. DOAN, L.L. LA MERRILL, M. PATISAUL, H. ZOTA, A. et al., 2014. Introduction to Endocrine disrupting Chemicals (EDCs)-A Guide for Public interest Organizations and Policy-markers. Endocrine Society. *Www.Endocrine.Org*. (December), 1–60.

3 DE COSTER, Sam a Nicolas VAN LAREBEKE, 2012. *Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action* [online]. 2012. ISBN 1687-9805. Dostupné z: doi:10.1155/2012/713696

4 COLBORN, T., F. S. VOM SAAL a A. M. SOTO, 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans [online]. 1993. ISBN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.93101378

5 KUMAR, Vimal, Andrew C. JOHNSON, Achim TRUBIROHA, Jitka TUMOVÁ, Masaru IHARA, Roman GRABIC, Werner KLOAS, Hiroaki TANAKA a Hana Kocour KROUPOVÁ, 2015. *The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review* [online]. 2015. ISBN 1520-5851 (Electronic)r0013-936X (Linking). Dostupné z: doi:10.1021/es5051343

6 ÖRN, Stefan, Henrik HOLBECH a Leif NORRGREN, 2016. Sexual disruption in zebrafish (Danio rerio) exposed to mixtures of 17α-ethinylestradiol and 17β-trenbolone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **41**, 225–231. ISSN 18727077. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2015.12.010

7 HOLBECH, Henrik, Kristoffer D. SCHRÖDER, Marie L. NIELSEN, Nanna BRANDE-LAVRIDSEN, Bente Frost HOLBECH a Poul BJERREGAARD, 2013. Estrogenic effect of the phytoestrogen biochanin A in zebrafish, Danio rerio, and brown trout, Salmo trutta. *Aquatic Toxicology* [online]. **144–145**, 19–25. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.006

8 WANGMO, Chimi, Sergio JARQUE, Klára HILSCHEROVÁ, Luděk BLÁHA a Michal BITTNER, 2018. *In vitro* assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments – a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts* [online]. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/C7EM00458C

9 AMARAL MENDES, J. J., 2002. The endocrine disrupters: A major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **40**(6), 781–788. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(02)00018-2

10 GUZELIAN, Philip S., 1982. Chlordecone poisoning: A case study in approaches for detoxification of humans exposed to environmental chemicals. *Drug Metabolism Reviews* [online]. **13**(4), 663–679. ISSN 03602532. Dostupné z: doi:10.3109/03602538209011091

11 GRAY, L. E., W. R. KELCE, E. MONOSSON, J. S. OSTBY a L. S. BIRNBAUM, 1995. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **131**(1), 108–118.

ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1006/taap.1995.1052
12 LINTELMANN, J, A KATAYAMA, N KURIHARA, L SHORE a And A WENZEL, 2003. ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE ENVIRONMENT (IUPAC Technical Report) Endocrine disruptors in the environment. *Pure Appl. Chem. Schejbal (Czech Republic* [online]. **75**(5), 631–681. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/pac200375050631
13 SCOGNAMIGLIO, Viviana, Amina ANTONACCI, Luisa PATROLECCO, Maya D. LAMBREVA, Simona C. LITESCU, Sandip A. GHUGE a Giuseppina REA, 2016. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier B.V., **80**, 555–567. ISSN 18793142. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.04.014
14 VIGLINO, L., K. ABOULFADL, M. PRÉVOST a S. SAUVÉ, 2008. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta* [online]. **76**(5), 1088–1096. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.05.008
15 NOMENCLATURE JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL, 1984. International Union of Pure and Applied Joint Commission on Biochemical Nomenclature *. *Pure & Applied Chemistry* [online]. **56**(5), 595–624. ISSN 0033-4545. Dostupné z: doi:10.1351/pac198355081269
16 ARANDA, A a A PASCUAL, 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* [online]. **81**(3), 1269–304. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:0031-9333/01
17 SHARPE, Richard M a D Stewart IRVINE, 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *British Medical Journal* [online]. **328**(February), 447–451. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.328.7437.447
18 GROSS-SOROKIN, Melanie Y., Stephen D. ROAST a Geoffrey C. BRIGHTY, 2006. Assessment of feminization of male fish in english rivers by the environment agency of England and Wales. *Environmental Health Perspectives* [online]. **114**(SUPPL.1), 147–151. ISSN 00916765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.8068
19 GUILLETTE, Louis J., Daniel B. PICKFORD, D. Andrew CRAIN, Andrew A. ROONEY a H. Franklin PERCIVAL, 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **101**(1), 32–42. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1006/gcen.1996.0005
20 DUONG, Cuong N., Jin Sung RA, Jaeweon CHO, Sang D. KIM, Hoon K. CHOI, Ji Hyung PARK, Kyoung W. KIM, Edu INAM a Sang Don KIM, 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* [online]. **78**(3), 286–293. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.048
21 TANAKA, Tsuyoshi, Hajime TAKEDA, Fumiko UEKI, Kimimichi OBATA, Hideji TAJIMA, Haruko TAKEYAMA, Yasuhiro GODA, Shigeru FUJIMOTO a Tadashi MATSUNAGA, 2004. Rapid and sensitive detection of 17β-estradiol in environmental water using automated immunoassay system with bacterial magnetic particles. *Journal of Biotechnology* [online]. **108**(2), 153–159. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2003.11.010

22 JOHNSON, Andrew C. a Richard J. WILLIAMS, 2004. A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol Sewage Treatment Works. *Environmental science & technology* [online]. **38**(13), 3649–3658. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es035342u

23 WISE, Amber, Kacie O'BRIEN a Tracey WOODRUFF, 2011. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environmental Science and Technology* [online]. **45**(1), 51–60. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es1014482

24 KIM, Sang D., Jaeweon CHO, In S. KIM, Brett J. VANDERFORD a Shane A. SNYDER, 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research* [online]. **41**(5), 1013–1021. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2006.06.034

25 GRODIN, J. M., P. K. SIITERI a P. C. MACDONALD, 1973. Source of estrogen production in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **36**(2), 207–214. ISSN 19457197. Dostupné z: doi:10.1210/jcem-36-2-207

26 POL, H. E H., P. T COHEN-KETTENIS, N. E M VAN HAREN, J. S PEPER, R. G H BRANS, W. CAHN, H. G SCHNACK, L. J G GOOREN a R. S KAHN, 2006. Changing your sex changes your brain: influences of testosterone and estrogen on adult human brain structure. *European Journal of Endocrinology* [online]. **155**(suppl_1), S107–S114. ISSN 0804-4643. Dostupné z: doi:10.1530/eje.1.02248

27 ARIS, Ahmad Zaharin, Aida Soraya SHAMSUDDIN a Sarva Mangala PRAVEENA, 2014. *Occurrence of 17α-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review* [online]. 2014. ISBN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2014.04.011

28 LAPPANO, Rosamaria, Camillo ROSANO, Paola DE MARCO, Ernestina Marianna DE FRANCESCO, Vincenzo PEZZI a Marcello MAGGIOLINI, 2010. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **320**(1–2), 162–170. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2010.02.006

29 CALAFAT, Antonia M., Xiaoyun YE, Lee Yang WONG, John A. REIDY a Larry L. NEEDHAM, 2008. Exposure of the U.S. population to Bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives* [online]. **116**(1), 39–44. ISSN 00916765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.10753

30 RUBIN, Beverly S., Jenny R. LENKOWSKI, Cheryl M. SCHAEBERLE, Laura N. VANDENBERG, Paul M. RONSHEIM a Ana M. SOTO, 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* [online]. **147**(8), 3681–3691. ISSN 00137227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2006-0189

31 LUETJENS, Marc C. a Gerhard F. WEINBAUER, 2012. Testosterone: Biosynthesis, transport, metabolism and (non-genomic) actions. In: *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution, Fourth Edition* [online]. s. 15–32. ISBN 9781139003353. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781139003353.003

32 SHANLE, E a W XU, 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* [online]. **24**(1), 6–19. Dostupné z: doi:10.1021/tx100231n

33 HEINLEIN, Cynthia A. a Chawnshang CHANG, 2004. *Androgen receptor in prostate cancer* [online]. 2004. ISBN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Dostupné z: doi:10.1210/er.2002-0032

34 BOGERS, Rinus, Selinda DE VRIES-BUITENWEG, Ine GEUIJEN, Beppy VAN DE WAART, Raoul KUIPER, Sander VAN DER LINDEN, Leo PUIJKER, Albertinka MURK, Bart VAN DER BURG a Juliette LEGLER, 2007. An in vitro/in vivo screening assay as a sensitive tool to assess endocrine disruptive activity in surface water. *Environment International* [online]. **33**(3), 292–301. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2006.10.002

35 LI, Jin a Farook AL-AZZAWI, 2009. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* [online]. **63**(2), 142–148. ISSN 03785122. Dostupné z: doi:10.1016/j.maturitas.2009.03.008

36 HE, B, J a KEMPPAINEN, J J VOEGEL, H GRONEMEYER a E M WILSON, 1999. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* [online]. **274**(52), 37219–37225. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.52.37219

37 BENNETT, Nigel C., Robert A. GARDINER, John D. HOOPER, David W. JOHNSON a Glenda C. GOBE, 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **42**(6), 813–827. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2009.11.013

38 JÁLOVÁ, V., B. JAROŠOVÁ, L. BLÁHA, J. P. GIESY, T. OCELKA, R. GRABIC, J. JURČÍKOVÁ, B. VRANA a K. HILSCHEROVÁ, 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environment International* [online]. **59**, 372–383. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2013.06.024

39 WEHMAS, Leah C., Jenna E. CAVALLIN, Elizabeth J. DURHAN, Michael D. KAHL, Dalma MARTINOVIC, Joe MAYASICH, Tim TUOMINEN, Daniel L. VILLENEUVE a Gerald T. ANKLEY, 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* [online]. **30**(2), 439–445. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.388

40 FLEMMING, Ingerslev a Halling-Sørensen BENT, 2003. Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment. *Danish Environmental Protection Agency*. (44), 1–69.

41 LOCATELLI, Marcello, Francesco SCIASCIA, Roberta CIFELLI, Luciano MALATESTA, Pantaleone BRUNI a Fausto CROCE, 2016. *Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples* [online]. 2016. ISBN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.01.034

42 EUROPEAN COMMISSION, 2009. *Common Implementation Strategy for the WFD, Guidance Document No . 19, Guidance on Surface Water Chemical Monitoring*. ISBN 9789279112973.

43 JUGAN, M. L., L. OZIOL, M. BIMBOT, V. HUTEAU, S. TAMISIER-KAROLAK, J. P. BLONDEAU a Y. LÉVI, 2009. In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment* [online]. B.m.: Elsevier B.V., **407**(11), 3579–3587. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2009.01.027

44 LÓPEZ DE ALDA, Maria J. a Damià BARCELÓ, 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **892**(1–2), 391–406. ISSN 00219673. Dostupné

z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00068-6
45 CITULSKI, Joel a Khosrow FARAHBAKHSH, 2012. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Chemosphere* [online]. **87**(5), 498–503. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.043
46 RODRIGUEZ-MOZAZ, Sara, Maria J. LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ, 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* [online]. s. 85–92. ISBN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.06.040
47 GROVER, D. P., Z. L. ZHANG, J. W. READMAN a J. L. ZHOU, 2009. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta* [online]. **78**(3), 1204–1210. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.12.049
48 D ALVAREZ, J Huckins and M K Nelson, 2014. Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) [online]. (November), 1–2. Dostupné z: papers3://publication/uuid/7B34B940-C243-4355-81AF-2189A30E925A
49 GEHRMANN, Linda, Helena BIELAK, Maximilian BEHR, Fabian ITZEL, Sven LYKO, Anne SIMON, Gotthard KUNZE, Elke DOPP, Martin WAGNER a Jochen TUERK, 2016. (Anti-)estrogenic and (anti-)androgenic effects in wastewater during advanced treatment: comparison of three in vitro bioassays. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 1–11. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-7165-4
50 CIOFI, L., D. FIBBI, U. CHIUMINATTO, E. COPPINI, L. CHECCHINI a M. DEL BUBBA, 2013. Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater. *Journal of Chromatography A* [online]. **1283**, 53–61. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.01.084
51 FAYAD, P B, M PREVOST a S SAUVE, 2013. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta* [online]. **115**, 349–360. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.05.038
52 PATROLECCO, Luisa, Silvio CAPRI, Silvia DE ANGELIS, Romano PAGNOTTA, Stefano POLESELLO a Sara VALSECCHI, 2006. Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber river (central Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* [online]. **172**(1–4), 151–166. ISSN 00496979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-005-9067-9
53 GENTILI, A., PERRET, D., MARCHESE, S., MASTROPASQUA, R., CURINI, R., Di Corcia, 2002. Analysis of Free Estrogens and their Conjugates in Sewage and River Waters by Solid-Phase Extraction then Liquid Chromatography- Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*. **56**(July (No.1/2)), 25–32.
54 NOVÁK, Josef, Lidmila BARTOVSKÁ, Ivan CIBULKA, Vladimír DOHNAL, Pavel CHUCHVALEC, Jiří KOLAFA, Anatol MALIJEVSKÝ, Jaroslav MATOUŠ, Karel ŘEHÁK, Josef ŠOBR a Petr VOŇKA, 2008. Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz. 506.
55 SIGMA-ALDRICH, Supelco, 1998. Guide to Solid Phase Extraction - bulletin 910. *Bulletin 910* [online]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf
56 VEGA-LÓPEZ, Armando, Eva RAMÓN-GALLEGOS, Marcela GALAR-

MARTÍNEZ, F. Alejandro JIMÉNEZ-OROZCO, Ethel GARCÍA-LATORRE a Maria Lilia DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, 2007. Estrogenic, anti-estrogenic and cytotoxic effects elicited by water from the type localities of the endangered goodeid fish Girardinichthys viviparus. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* [online]. **145**(3), 394–403. ISSN 15320456. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpc.2007.01.008
57 FANG, Ting Yien, Sarva Mangala PRAVEENA, Claire DEBURBURE, Ahmad Zaharin ARIS, Sharifah Norkhadijah Syed ISMAIL a Irniza RASDI, 2016. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **165**, 358–368. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.051
58 KOVANDA, Pavel, 2017. *Vakuové odpařování - technologie budoucnosti* [online]. Dostupné z: https://www.mmspektrum.com/clanek/vakuove-odparovani-technologie-budoucnosti.html
59 CHEVOLLEAU, Sylvie, Laurent DEBRAUWER, Thomas STROHEKER, Liza VIGLINO, Issam MOURAHIB, Maria Helena MEIRELES, Marina GRIMALDI, Patrick BALAGUER a Lodovico DI GIOIA, 2016. A consolidated method for screening the endocrine activity of drinking water. *Food Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **213**, 274–283. ISSN 18737072. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.089
60 FLICKINGER, Michael C, Stephen W DREW a John WILEY, 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation , Biocatalysis , and. *Builder* [online]. **1**–**5**(23), 2844. ISSN 04711382. Dostupné z: doi:10.1002/0471250589.ebt215
61 GAIDHANI, Kunal A, Mallinath HARWALKAR, Deepak BHAMBERE a Pallavi S NIRGUDE, 2015. LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. In: *World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor*. s. 516–543.
62 FRANKS, Felix a Tony AUFFRET, 2007. *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals* [online]. ISBN 978-0-85404-268-5. Dostupné z: doi:10.1039/9781847557704
63 KRISHNAVENI, Marimuthu a Ravi DHANALAKSHMI, 2014. World Journal of Pharmaceutical ReseaRch [online]. **3**(6), 1687–1696. Dostupné z: doi:10.20959/wjpr20168-6435
64 MIKULÁŠEK, Pavel a kolektiv, 2013. *Tlakové membránové procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-862-7.
65 DOSTÁL, JIŘÍ, PAULOVÁ, HANA, SLANINA, JIŘÍ, TÁBORSKÁ, Eva, 2009. *Biochemie pro posluchače bakalářských oborů*. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-5020-4.
66 DOW FILMTEC™, nedatováno. *Basics of RO and NF : Principle of Reverse Omosis and Nanofiltration* [online]. Dostupné z: http://www.dow.com/
67 LANXESS, 2013. Index. *Reverse Osmosis Theory: Principles of Reverse Osmosis Membrane Separation* [online]. 1–17. Dostupné z: http://lpt.lanxess.com/uploads/tx_lxsmatrix/01_lewabrane_manual_ro_theory.pdf
68 BITTNER, Michal, Ondřej ŠKORVÁN, Chimi WANGMO, 2016. *Development of experimental device for solute concentration by pressure membrane processes*.
69 ASSESSMENT, Product Safety, 2014. FILMTEC ™ Membrane Elements. 1–5.
70 CHROMATOGRAPHY, Gas a Liquid CHROMATOGRAPHY, 2003. Gas Chromatography (GC) and Liquid Chromatography (LC). *Education* [online]. (Lc), 7–31. Dostupné z: doi:10.1002/0470867299.ch2
71 SOSA-FERRERA, Zoraida, Cristina MAHUGO-SANTANA a José Juan SANTANA-

RODRÍGUEZ, 2013. *Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples* [online]. 2013. ISBN 2314-6141 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1155/2013/674838
72 GALEN, Peter M Van a Mass SPECTROMETRY, 2005. Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. **40**(5), 273R+. Dostupné z: doi:10.1007/SpringerReference_35854
73 SOTO, A. M., C. SONNENSCHEIN, K. L. CHUNG, M. F. FERNANDEZ, N. OLEA a F. OLEA SERRANO, 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. In: *Environmental Health Perspectives* [online]. s. 113–122. ISBN 0091-6765 (Print)r0091-6765 (Linking). Dostupné z: doi:10.2307/3432519
74 SCHILIRÒ, Tiziana, Arianna PORFIDO, Federica SPINA, Giovanna Cristina VARESE a Giorgio GILLI, 2012. Oestrogenic activity of a textile industrial wastewater treatment plant effluent evaluated by the E-screen test and MELN gene-reporter luciferase assay. *Science of the Total Environment* [online]. **432**, 389–395. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.008
75 KUSK, Kresten Ole, Tanja KRÜGER, Manhai LONG, Camilla TAXVIG, Anne E. LYKKESFELDT, Hanne FREDERIKSEN, Anna Maria ANDERSSON, Henrik R. ANDERSEN, Kamilla M S HANSEN, Christine NELLEMANN a Eva C. BONEFELD-JØRGENSEN, 2011. Endocrine potency of wastewater: Contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. **30**(2), 413–426. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.385
76 KLEDAL, T. J. S., M JORGENSEN, F. MENGARDA, N E SKAKKEBAEK a H. LEFFERS, 2000. New methods for detection of potential endocrine disruptors. *Andrologia* [online]. **32**(4–5), 271–278. ISSN 1439-0272. Dostupné z: doi:10.1046/j.1439-0272.2000.00395.x
77 LEGLER, Juliette, Christina E. VAN DEN BRINK, Abraham BROUWER, Albertinka J. MURK, Paul T. VAN DER SAAG, A. Dick VETHAAK a Bart VAN DER BURG, 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences* [online]. **48**(1), 55–66. ISSN 10966080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/48.1.55
78 PROCHÁZKOVÁ, Tereza, Eliška SYCHROVÁ, Barbora JAVŮRKOVÁ, Jaroslava VEČERKOVÁ, Jiří KOHOUTEK, Olga LEPŠOVÁ-SKÁCELOVÁ, Luděk BLÁHA a Klára HILSCHEROVÁ, 2017. Phytoestrogens and sterols in waters with cyanobacterial blooms - Analytical methods and estrogenic potencies. *Chemosphere* [online]. **170**, 104–112. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.006
79 ROUTLEDGE, Edwin J. a John P. SUMPTER, 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. **15**(3), 241–248. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1897/1551-5028
80 URBATZKA, Ralph, Anne VAN CAUWENBERGE, Silvia MAGGIONI, Luigi VIGANÒ, Alberta MANDICH, Emilio BENFENATI, Ilka LUTZ a Werner KLOAS, 2007. Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. *Chemosphere* [online]. **67**(6), 1080–1087. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.041
81 WILSON, Vickie S., Kathy BOBSEINE, Christy R. LAMBRIGHT a L. E. GRAY, 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and

glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* [online]. **66**(1), 69–81. ISSN 10966080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/66.1.69
82 VAN DER LINDEN, Sander C., Minne B. HERINGA, Hai Yen MAN, Edwin SONNEVELD, Leo M. PUIJKER, Abraham BROUWER a Bart VAN DER BURG, 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science and Technology* [online]. **42**(15), 5814–5820. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es702897y
83 KLEDAL, TJ. S., M. JORGENSEN, F. MEGADRDA, N.E. SKAKKEBEAK a H. LEFFERS, 2000. *New methods for detection of potential endocrine disruptors*. Andrologia [online].
84 USEPA, 2009. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1300: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (Human Cell Line (HeLa-9903) [online]. Dostupné z: file:///C:/Users/shoeppner/Downloads/EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0006.pdf
85 KING, Robert C, William D STANSFIELD a Pamela K MULLIGAN, 2006. *A Dictionary of Genetics* [online]. ISBN 0195307623. Dostupné z: doi:10.1093/acref/9780199766444.001.0001
86 LANDRY, Jonathan J M, Paul Theodor PYL, Tobias RAUSCH, Thomas ZICHNER, Manu M TEKKEDIL, Adrian M STÜTZ, Anna JAUCH, Raeka S AIYAR, Gregoire PAU, Nicolas DELHOMME, Julien GAGNEUR, Jan O KORBEL, Wolfgang HUBER a Lars M STEINMETZ, 2013. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)* [online]. **3**(8), 1213–24. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:10.1534/g3.113.005777
87 KALINA, Jiří, nedatováno. *Ponávka* [online]. Dostupné z: http://jza.smerem.cz/Tema/Ponávka
88 KRCHŇAVÝ, L. *Hodnocení hydromorfologické kvality říštní sítě v brněnské aglomeraci.*Brno:Masarykova univerzita, Přírodovědná fakulta, 2015.92 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Zdeněk Máčka, Ph.D.
89 BRNĚNSKÁ NÁBŘEŽÍ, nedatováno. *O řece Svitavě* [online]. Dostupné z: http://nabrezisvitavy.cz/kontakt/
90 HOSKOVEC, Ladislav, 2008. *Brno, Údolí Kohoutovického potoka - přírodní památka* [online]. Dostupné z: https://botany.cz/cs/kohoutovicky-potok/
91 KULKARNI, Ashish, Debabrata MUKHERJEE a William N. GILL, 1996. Flux enhancement by hydrophilization of thin film composite reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science* [online]. **114**(1), 39–50. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/0376-7388(95)00271-5
92 CUI, Jie, YONG SHEN a RENA LI, 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine* [online]. B.m.:Elsevier Ltd, 19(3), 197-209. ISSSN 14714914. Dostupné z: doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007
93 CHEMICKÁ OBCHODÍ SPOLEČNOST, S.R.O, NEDATOVÁNO. *Reverzní osmóza* [online]. Dostupné z htttp://www.chos.cz/uprava-vody/reverzni-osmoza/
94 BÍLEK FILTRY, S.R.O, nedatováno. *CrossFlow filtr* [online]. Dostupné z: https://filtrace.com/cross-flow-filtr/
95 KREJČÍ, Kamila Originální využití reverzní osmózy při testování toxicity environmentálních vzorků.Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2013.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AR	androgenní receptor
ARE	androgen responzivní jednotka
BPA	bisfenol A
DDT	dichlordifenyltrichloretan
DHT	dihydrotestosteron
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
E1	estron
E2	17β-estradiol
E3	estriol
EE2	17α-ethynylestradiol
EEQ	estradiol ekvivalent
ED	endokrinní disruptor
ER	estrogenní receptor
ERE	estrogen responzivní jedontka
FBS	fetální bovinní sérum
FBS-DCT	dialyzované fetální bovinní sérum
GC	plynová chromatografie
HeLa	Henrietta Lacks
hERα	lidský estrogenní receptor alfa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LLE	kapalinová extrakce
MS	hmotnostní spektrometrie
NF	nanofiltrace
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
RECETOX	Centrum pro výzkum toxických láotek v prostředí
RO	reverzní osmóza
SPE	extrakce na tuhou fázi
VO	vakuové odpařování
κ	měrná vodivost [$\mu S \cdot cm^{-1}$]
τ	čas [min]
t	teplota [°C]

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Normalizovaná křivka dávka-dopověď pro E1 ……………………………….....59

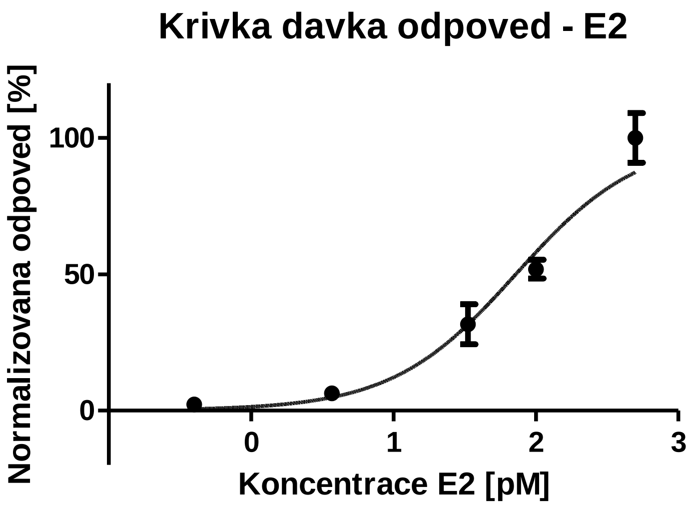
Příloha 2: Křivka dávka-dopověď pro E1………………………………………….. …59

Příloha 3. Křivka dávka-odpověď pro E2 ……………………………………………......60

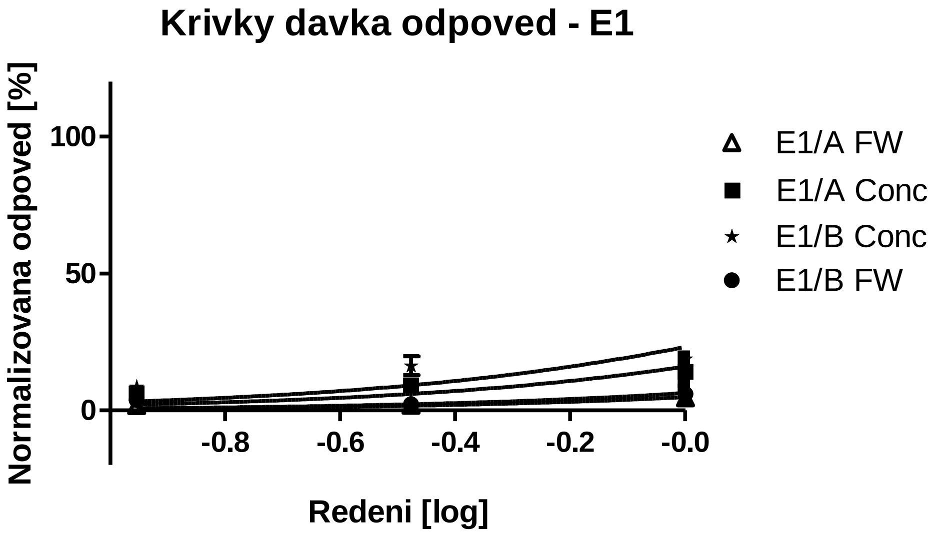
Příloha 4: Křivka dávka odpověď pro E3 ……………………………………………..60

Příloha 5: Křivka dávka odpověď pro EE2 …………………………………………....61

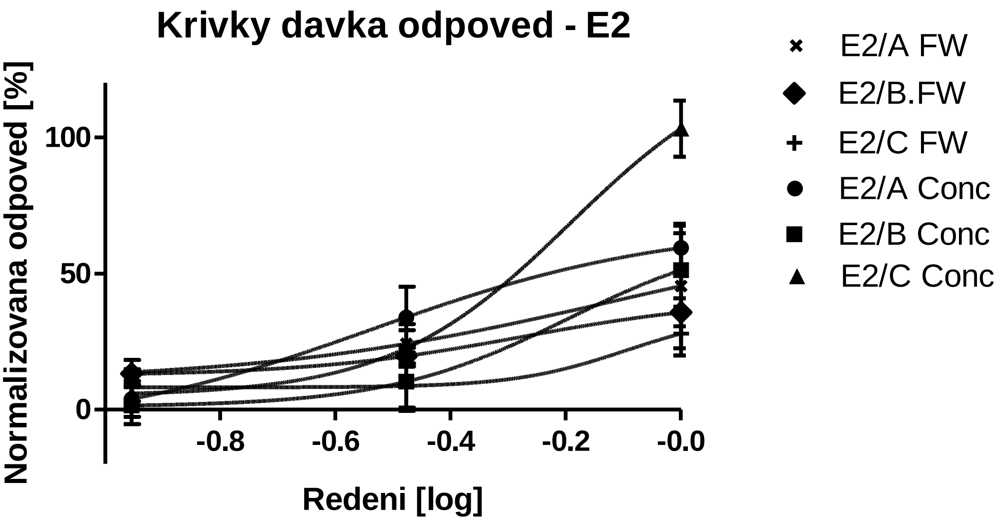
PŘÍLOHY



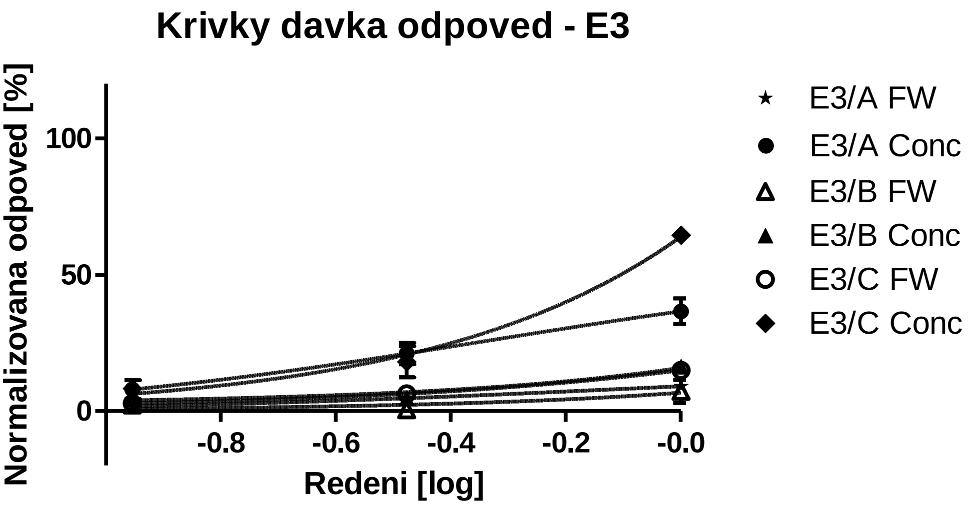
Příloha 1: *Křivka dávka-odpověď pro E1; FW – feed water (nekoncentrovaný vzorek), conc – retentát*



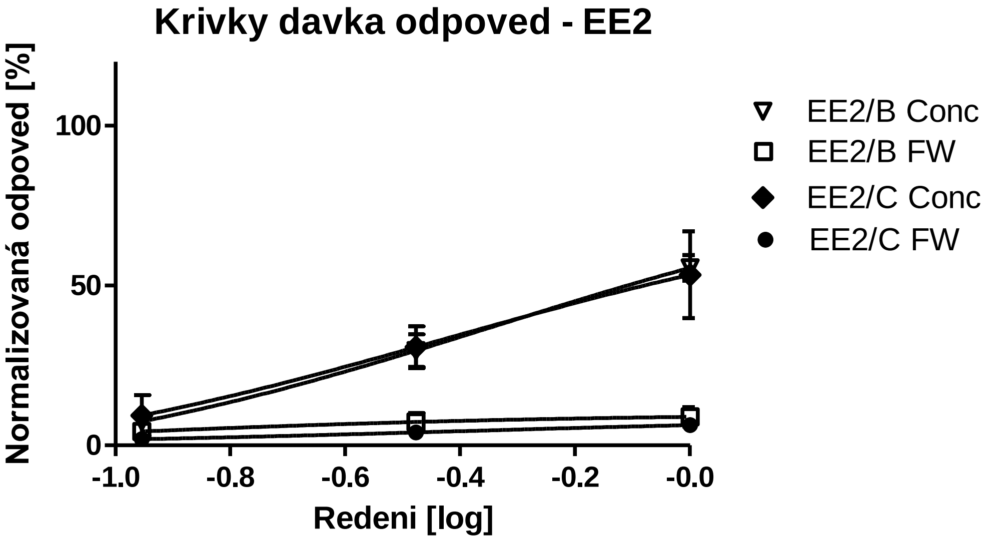
Příloha 2: *Křivka dávka-odpověď pro E1; FW – feed water (nekoncentrovaný vzorek), conc – retentát*



Příloha 3:*Křivka dávka-odpověď pro E2; FW – feed water (nekoncentrovaný vzorek), conc – retentát*



Příloha 4: *Křivka dávka-odpověď pro E2 ;FW – feed water (nekoncentrovaný vzorek), conc – retentát*



Příloha 5: *Křivka dávka-odpověď pro E2 ;FW – feed water (nekoncentrovaný vzorek), conc – retentát*