

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Účinky léčiva difenhydraminu na molekulární obranné
mechanismy u raka signálního v rámci
bioakumulačního experimentu**

Autor: Dominika Kahudová

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: RNDr. Anna Koubová, Ph.D.

MSc. Tuyen Van Nguyen

Studijní program a obor: Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: Třetí

České Budějovice, 2023

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

V Českých Budějovicích, 2. května 2023

Dominika Kahudová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Vladimíru Žlábkovi, Ph.D. a konzultantům RNDr. Anně Koubové, Ph.D. a MSc. Tuyen Van Nguyenovi za metodické vedení a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Adamovi Boříkovi, Ph.D. a dalším pracovníkům Laboratoře environmentální chemie a biochemie ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech, za pomoc při praktické části práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu při psaní práce. Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 23-07274S – Bioakumulační dynamika emergentních kontaminantů ve vodních bezobratlých organismech studovaná pomocí raka mramorovaného, řešitel doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.). Laboratorní experimenty byly provedeny s využitím zázemí výzkumného centra CENAKVA (LM 2023038) v synergii s cíli evropského konsorcia DANUBIUS RI.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dominika KAHUDOVÁ**
Osobní číslo: **V20B032P**
Studijní program: **B0588A030002 Ochrana vod**
Téma práce: **Účinky léčiva difenhydraminu na molekulární obranné mechanismy u raka signálního v rámci bioakumulačního experimentu.**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Difenhydramin patří mezi volně prodejné léčiva dlouhodobě používaná v mnoha zemích především proti různým typům alergie. Rezidua tohoto léčiva jsou často detekována v povrchových vodách, sedimentech a tkáních vodní bioty. Z tohoto důvodu se řadí mezi významné kontaminanty životního prostředí a jeho účinky na vodní organismy jsou intenzivně studovány. Přes intenzivní výzkum jsou údaje o osudu a účincích tohoto léčiva u bezobratlých velice limitované. Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*) je v České republice řazen mezi invazní druhy, ale ve světě je řazen k významným druhům sladkovodních ekosystémů. Pro účely této práce bude rak signální vybrán jako modelový organismus pro testování kumulace a účinků tohoto léčiva u bezobratlých. V rámci bioakumulačního experimentu budou studovány odpovědi molekulárních obranných mechanismů na různé koncentrace difenhydraminu. Řádově budou použity koncentrace v $\mu\text{g/L}$, které jsou považovány za environmentální a subletální pro drobné vodní korýše. Pro sledování vybraného cíle bude založen 96hodinový akvarijní experiment. Toxicologické účinky difenhydraminu na raky budou stanoveny v několika tkáních hodnocením úrovně peroxidace lipidů, aktivity enzymů oxidativního stresu a aktivity acetylcholinesterázy. Koncentrace absorbovaného léčiva v hemolymfě raků budou ověřeny pomocí pokročilých analytických metod (LC-HRMS) ve spolupráci s výzkumným týmem téže laboratoře. Výsledky budou statisticky hodnoceny pomocí běžně dostupných softwarů.

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

Seznam doporučené literatury:

Armitage, J.M., Erickson, R.J., Luckenbach, T., Ng, C.A., Prosser, R.S., Amot, J.A., Schirmer, K. and Nichols, J.W. 2017. Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: Current knowledge and research priorities. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(4), 882-897.
Berninger, J.P., Du, B., Connors, K.A., Eytcheson, S.A., Kolkmeier, M.A., Prosser, K.N., Valenti Jr, T.W., Chambliss, C.K. and Brooks, B.W. 2011. Effects of the antihistamine diphenhydramine on selected aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(9), 2065-2072.
Boström, M.L. and Berglund, O. 2015. Influence of pH-dependent aquatic toxicity of ionizable pharmaceuticals on risk assessments over environmental pH ranges. *Water research* 72, 154-161.
Kristofco, L.A. and Brooks, B.W. 2017. Global scanning of antihistamines in the environment: Analysis of occurrence and hazards in aquatic systems. *Science of the Total Environment* 592, 477-487.
Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101(1), 13-30.
Nichols, J.W., Du, B., Berninger, J.P., Connors, K.A., Chambliss, C.K., Erickson, R.J., Hoffman, A.D. and Brooks, B.W. 2015. Observed and modeled effects of pH on bioconcentration of diphenhydramine, a weakly basic pharmaceutical, in fathead minnows. *Environmental toxicology and chemistry* 34(6), 1425-1435.

Potter, J. (2012) Assessment of the Toxicologic Interaction of Diphenhydramine and Diazinon in the Invertebrate Daphnia magna.
Scott, W.C., Haddad, S.P., Saari, G.N., Chambliss, C.K., Conkle, J.L., Matson, C.W. and Brooks, B.W. 2019b. Influence of salinity and pH on bioconcentration of ionizable pharmaceuticals by the gulf killifish, Fundulus grandis. Chemosphere 229, 434-442.
Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Faggio, C., Kouba, A. and Velisek, J. 2019. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (Procambarus virginalis). Chemosphere 224, 616-625.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Anna Koubová, Ph.D.**

Datum zadání bakalářské práce: **21. ledna 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. května 2023**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Záhřeš 726/II
309 25 Vodňany (2)


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

V Českých Budějovicích dne 25. února 2022

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled.....	10
2.1 Vstup léčiv do prostředí a jejich osud.....	10
2.2 Vliv léčiv na vodní biotu	11
2.3 Ekotoxikologické biomarkery	12
2.3.1 Oxidativní stres	12
2.3.2 Biomarkery oxidativního stresu.....	13
2.3.3 Biomarkery neurotoxicity	14
2.4 Bioakumulace chemických látek ve vodních organismech	15
2.5 Difenhydramin	16
2.6 Hypotézy předložené práce.....	19
3. Materiál a metodika.....	20
3.1 Experimentální materiál.....	20
3.2 Experiment 1: Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního	21
3.2.1 Design experimentu	21
3.2.2 Odběry vzorků	22
3.2.3 Chemická analýza vody a hemolymfy.....	23
3.2.4 Stanovení biomarkerů oxidativního stresu	23
3.2.5 Stanovení enzymatické aktivity acetylcholinesterázy (AChE).....	25
3.2.6 Výpočet integrované biomarkerové odezvy	26
3.2.7 Statistická analýza	26
3.3 Experiment 2: Bioakumulační dynamika difenhydraminu.....	27
3.3.1 Design experimentu	27
3.3.2 Odběry vzorků	27
3.3.3 Stanovení amoniaku ve vodě	28

3.3.4 Zopakování Experimentu 2 s vysokou koncentrací DFH.....	29
4. Výsledky.....	30
4.1 Experiment 1: Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního	30
4.1.1 Chemická analýza vody a hemolymfy.....	30
4.1.2 Biomarkery oxidativního stresu.....	32
4.1.3 Biomarkery neurotoxicity	36
4.1.4 Index odchylky biomarkeru	36
4.1.5 IBRv2.....	38
4.2 Experiment 2: Bioakumulační dynamika difenhydraminu.....	38
4.2.1 Amoniak	38
4.2.2 Chemická analýza vody a hemolymfy.....	39
5. Diskuze.....	43
5.1 Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního	43
5.1.1 Chemická analýza vody a hemolymfy.....	43
5.1.2 Biomarkery oxidativního stresu a neurotoxicity.....	44
5.2 Bioakumulační dynamika difenhydraminu.....	46
6. Závěr	48
7. Seznam použité literatury	49
8. Seznam zkratk	56
9. Abstrakt	58
10. Abstract.....	59

1. Úvod

V dnešní době je do životního prostředí z domácností, průmyslových závodů a zemědělských provozů vypouštěno stále více kontaminantů, které mohou významně ovlivňovat ekosystémy. Tyto látky a jejich účinky jsou předmětem mnoha výzkumů. Kontaminanty životního prostředí jsou nepříznivě působící chemické a biologické látky. V současné době se mezi relevantní kontaminanty řadí například farmaka a přípravky denní potřeby, hnojiva, pesticidy, těžké kovy, povrchově aktivní látky aj. Některé látky se do prostředí dostávají s odpadními vodami, jiné splachy z polí, na která jsou také přímo aplikovány, dále průsakem do půd nebo emisemi do atmosféry. Mají negativní vliv na vodu, půdu, vzduch i na živé organismy žijící v těchto prostředích, jelikož mají často vysokou schopnost bioakumulace, jsou perzistentní a mohou být toxické. Zmiňované skupiny kontaminantů se mohou také dostávat do potravin a pitné vody, což může mít nežádoucí účinky na lidské zdraví.

Jednou skupinou kontaminantů s vysokým potenciálem k negativnímu působení v prostředí jsou léčiva a přípravky denní potřeby (PPCPs – z angl. *pharmaceuticals and personal care products*). Jedná se například o účinné látky obsažené v mycích prostředcích, kosmetických přípravcích, humánních či veterinárních léčivech. Účinné látky těchto přípravků mohou ve vodním prostředí představovat značné nebezpečí, a to hned z několika důvodů. Prvním z nich je to, že PPCPs jsou používány (často až nadužívány) denně, a tudíž jsou kontinuálně vypouštěny s komunálními odpadními vodami a uvolňovány do životního prostředí. Dále jsou kontaminované vody přiváděny do čistíren odpadních vod, které však nejsou schopny PPCPs z vod zcela odstraňovat, a proto se tyto látky dostávají nejen do povrchových vod, ale i do podzemní a pitné vody. V neposlední řadě jsou některá farmaka a přípravky denní potřeby bioaktivní již při velice nízkých koncentracích, takže i malá množství naměřená ve vodách mohou mít vliv na necílové organismy.

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit, zda má léčivo difenhydramin (DFH) negativní účinky na raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*). Působení DFH na raky bylo vyhodnoceno po akutní expozici dospělých jedinců různým koncentracím léčiva. Biochemické odezvy zaměřené na molekulární obranné mechanismy byly popsány ve třech tkáních raků pomocí biomarkerů oxidativního stresu. Působení DFH bylo studováno stanovením lipidní peroxidace, enzymatické aktivity antioxidantů a

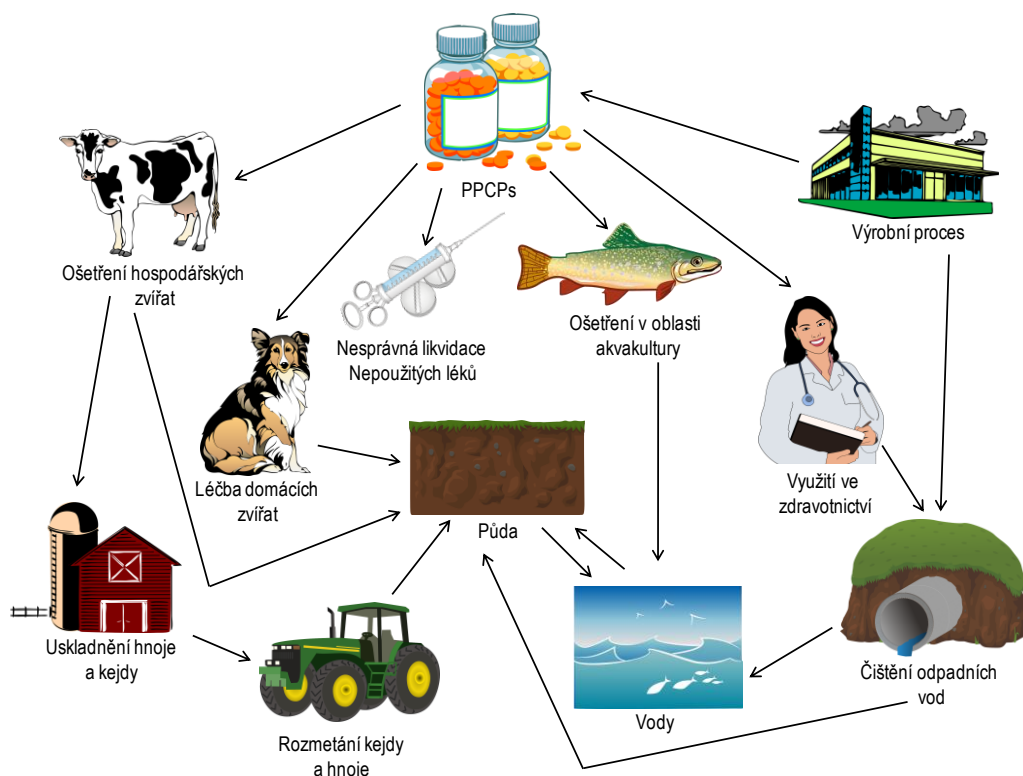
stanovením aktivity acetylcholinesterázy jako biomarkeru neurotoxicity. V rámci bioakumulačního experimentu byla měřena koncentrace absorbovaného a eliminovaného léčiva v račím těle v různých časových intervalech a při různém pH vody. Cílem provedených experimentů bylo vyhodnotit vliv pH na chování testované látky a účinky v exponovaných racích. Výsledky této práce pomohou k doplnění limitovaných znalostí o vlivu tohoto léčiva na vodní bezobratlé.

2. Literární přehled

2.1 Vstup léčiv do prostředí a jejich osud

Léčiva, která se dostávají do prostředí s komunální vodou, jsou stále častěji předmětem environmentálního výzkumu. Světová spotřeba léčiv přitom stále roste nejen díky rozvoji medicíny a farmacie, ale také z důvodu stále se zvyšujícího výskytu tzv. civilizačních chorob i rostoucí světové populace. Kontinuální přísun léčiv a produktů jejich metabolické přeměny do vody, jejich nedokonalé odstraňování v čistírnách odpadních vod a jejich vysoká bioaktivita už při nízkých koncentracích jsou příčinami ohrožení vodních organismů. Počet farmaceuticky aktivních sloučenin zjištěných ve vodách stále narůstá (PhAC – z angl. *pharmaceutically active compounds*). Koncentrace PCPPs v povrchových vodách se pohybují v $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ až $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, na odtocích z čistíren odpadních vod dokonce v $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Loos a kol., 2013; Rivera-Utrilla a kol., 2013; Fedorova a kol., 2022, Sun a kol., 2016).

Většina léčiv se do toků dostává s vodami z čistíren odpadních vod, kam přitékají komunální odpadní vody z domácností a ze zdravotnických zařízení. Léčiva, či jejich metabolity vyloučené z organismu, nejsou v čistírnách odpadních vod dostatečně odstraňovány, a proto dochází ke kontaminaci povrchových, případně i podzemních vod (Obr. č.1) (Ternes a kol., 2004). V některých případech může docházet i ke znečištění půdy při využívání recyklované vody (Watkinson a kol., 2007). Po vstupu do prostředí si mohou tyto látky zachovat svoji chemickou strukturu, mohou být částečně přeměněny, či mineralizovány. Léčiva se sorbují, desorbují a jsou přijímána organismy. Také mohou být transformována, dochází k degradaci chemické struktury léčiva, a to procesy hydrolýzy, fotolýzy a biodegradace. Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv ovlivňují další osud a chování léčiv v prostředí, např. struktura sloučeniny, rozpustnost ve vodě a v lipidech, disociační konstanta, těkavost atd. (Ebele a kol., 2017).



Obr. č.1 Cesty PPCPs do životního prostředí (Převzato a upraveno podle Boxall (2004))

2.2 Vliv léčiv na vodní biotu

Některá léčiva mohou být vysoce bioaktivní a mohou se bioakumulovat do živých organismů. Je známo, že některé chemické látky v prostředí existují v neutrální formě, ale odhaduje se, že až 80 % léčiv se vyskytuje v podobě iontů (často slabé kyseliny a zásady). To ovlivňuje jejich toxicitu a biologickou dostupnost pro vodní živočichy (Boxall a kol., 2012). Příjem a vylučování ionizovatelných léčiv vodními organismy závisí často tedy na pH vody (Valenti a kol., 2009).

Konkrétně je známo, že antibiotika (např. tetracyklin) mají vliv na snižování populace řas a sinic, poškozují reprodukci raných vývojových stadií vodních organismů, způsobují morfologické změny u plůdku ryb a mohou být pro ryby embryotoxické. Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs – *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) (např. diklofenak, ibuprofen) způsobují poškození ledvin ryb, nižší produkci embryí ryb, pokles hladiny testosteronu u ryb, či snížení až inhibici rozmnožování zooplanktonu. Látky s progestagenní aktivitou pak mohou způsobovat feminizaci samců (např. 17- α -ethinylestradiol v antikoncepčních přípravcích), snížení jejich plodnosti, až sterilitu (Velíšek a kol., 2014). Antidepresiva mohou narušovat homeostázu vodních

živočichů a ovlivňovat chování ryb (Giebułtowicz a Nałęcz-Jawecki, 2014). Rizika antihistaminik pro necílové organismy nejsou stále dost dobře známá (Kristofco a Brooks, 2017).

Raci a další velcí bezobratlí obývající vodní prostředí jsou vhodnými modelovými a experimentálními organismy, jelikož jsou důležitými bioindikátory v ekosystémech. Jsou relativně citliví vůči znečištění a zasahují svými nároky do více úrovní potravního řetězce (Buřič a kol., 2013). V České republice se přirozeně vyskytují původní, ohrožené a striktně chráněné druhy raků, jako je rak říční, rak kamenáč, rak bahenní, ale i zavlečené nepůvodní druhy, jako rak signální, rak mramorovaný a rak pruhovaný (Kozák a kol., 2013). Rak signální je proto vhodný k testování toxicity a bioakumulace léčiv.

S použitím raků v testech toxicity souvisí i koncept 3R (z angl. *Replacement, Reduction, Refinement*). Tento koncept napomáhá ochraně a humánnímu přístupu k pokusným zvířatům. *Replacement* je definován jako upřednostnění využívání nižších živočichů v testech toxicity nebo úplné nahrazení jinými metodami. *Reduction* představuje princip snižování množství používaných pokusných organismů. Poslední princip, *Refinement*, se zasazuje o zmírnění utrpení a bolesti těchto zvířat (Russell a Burch, 1959).

2.3 Ekotoxikologické biomarkery

2.3.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres je definován jako nerovnováha mezi množstvím volných radikálů a antioxidantů (Burton a Jauniaux, 2011). Je zapříčiněn působením reaktivních forem kyslíku (ROS – *reactive oxygen species*), např. superoxidovým aniontem ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxidem vodíku (H_2O_2), či hydroxylovým radikálem ($\text{OH}\cdot$) (Storz a Imlay, 1999). V důsledku oxidativního stresu dochází k oxidaci lipidů, tím dochází k narušení funkce fosfolipidových membrán, ke změně jejich struktury, propustnosti a redoxního potenciálu. Oxidativní stres poškozuje DNA (deoxyribonukleová kyselina) oxidací nukleotidů, což může způsobovat mutace. Dále způsobuje změny struktur proteinů a jejich aktivity.

Antioxidanty snižují hladinu volných radikálů – reaktivních částic s jedním nebo více nepárovými elektrony. Oxidativní stres se v jisté míře v organismu vyskytuje přirozeně, jako důsledek aerobních procesů (Storz a Imlay, 1999), je ale známo, že může být také důsledkem expozice různým polutantům a jejich metabolitům (van der Oost a kol., 2003). Oxidativní stres je možné přímo odhadnout stanovením přítomných ROS ve tkáni nebo pomocí biomarkerů oxidativního stresu, jako lipidní peroxidace a aktivity tzv. enzymů oxidativního stresu (Halliwell a Gutteridge, 2015).

Rozlišujeme primární, sekundární a terciární reakce na stres, přičemž primární reakcí jsou přechodné změny kortizolu, sekundární reakce vede ke změnám některých biochemických parametrů a terciární reakce mění a ovlivňuje celkový zdravotní stav organismu kompletně, příjem potravy, chování a schopnost rozmnožování (Carneiro a kol., 2021).

2.3.2 Biomarkery oxidativního stresu

Pomocí biomarkerů jsou získávány znalosti o účincích xenobiotik v organismu. Mezi biomarkery oxidativního stresu patří stanovení množství malondialdehydu, který vzniká při lipidní peroxidaci, dále hodnocení aktivity enzymů, či hladiny antioxidantů (van der Oost a kol., 2003).

Lipidní peroxidace se stanovuje na principu schopnosti reaktivních látek s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) vytvářet barevné komplexy, které jsou pak měřeny spektrofotometricky (Rice-Evans a kol., 1991). Volné radikály a ROS působí na nenasycené mastné kyseliny, které tvoří lipidovou složku membrán, a tím narušují propustnost membrán pro ionty (Catalá, 2009).

Produkty lipidní peroxidace jsou například látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, mezi které patří např. malondialdehyd, ty se pak stanovují jako TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) a vyjadřují míru lipidní peroxidace (Lushchak, 2011, Karthikeyan a Rani, 2003).

Antioxidanty katalyzují antioxidační reakce a napomáhají tak při obraně proti nadměrnému vzniku volných radikálů. Můžeme je dělit na enzymové (např. superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, glutathion reductáza, glutathion-S-transferáza, guaiacol peroxidáza, askorbát peroxidáza, glukóza-6-fosfát

dehydrogenáza atd.) a neenzymové (transferin, albumin, kyselina močová, askorbát, vitamin E, glutathion atd.) (Karthikeyan a Rani, 2003).

Superoxid dismutáza (SOD) zajišťuje dismutaci superoxidu za vzniku peroxidu vodíku, ten je pak odstraňován pomocí katalázy a glutathion peroxidázy. Rozlišujeme několik typů superoxid dismutáz (van der Oost a kol., 2003). Kataláza (CAT) štěpí peroxid vodíku na kyslík a vodu, chrání tak buňky organismů před vysokými koncentracemi peroxidu vodíku a navazuje na funkci SOD (Chelikani a kol., 2004). Glutathion peroxidáza (GPx), stejně jako CAT, navazuje na funkci SOD tím, že štěpí peroxid vodíku. Dále také oxiduje glutathion. Glutathion reduktáza (GR) přeměňuje oxidovaný glutathion na redukovaný glutathion (Racek a Holeček, 1999), který je potřebný pro funkce GPx. Glutathion-S-transferáza (GST) zajišťuje konjugaci redukované formy glutathionu s nukleofilními xenobiotiky.

2.3.3 Biomarkery neurotoxicity

Přenos nervového impulzu (neurotransmise) v těle organismu je zajišťován nervovou synapsí, ta může být elektrická (těsné spojení buněk), či chemická (přenos vzruchu neuromediátory). Vzruch je tedy přenášen pomocí neurotransmiteru, který se váže na receptor neuronu (postsynaptického útvaru) (Orel, 2015).

Neurotoxicitou se pak obecně nazývá poškození neuronů, narušení jejich funkce či struktury (Moszczynska a Callan, 2017). Může být způsobena buď blokadou enzymů ukončujících nervosvalový vzruch nebo zablokováním cholinergních receptorů v postsynaptické membráně.

Cholinesterázy jsou hlavní esterázy živočichů. Jedná se o enzymy štěpící cholin. Mezi cholinesterázy patří acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BChE), ty mají podobnou strukturu, ale i specifické vlastnosti, například substrátovou specifitu, kinetické parametry aj. (Jebali a kol., 2013; Lockridge a kol., 2018).

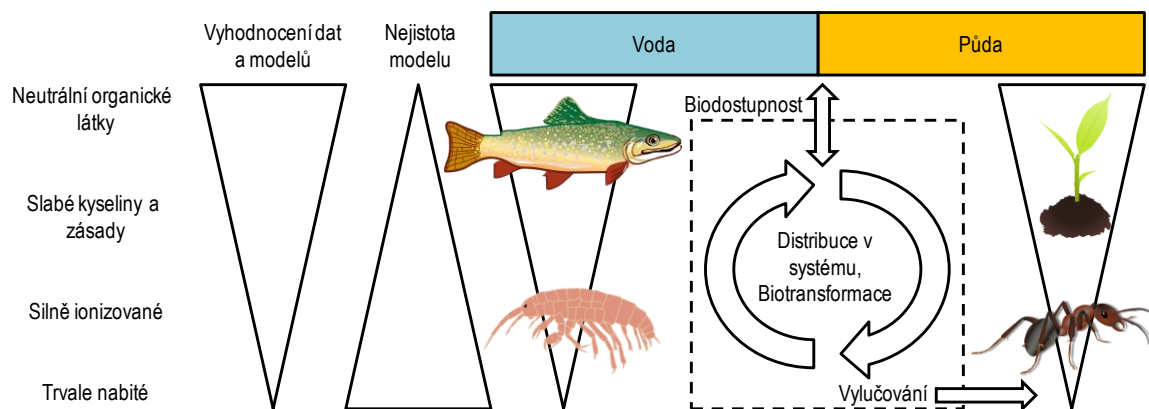
Hlavní funkcí AChE je hydrolýza neurotransmiteru acetylcholinu, při které vzniká cholin a acetát. Aktivita AChE je nutná pro neurotransmisi a účastní se na zakončení nervových synapsí (Jebali a kol., 2013).

2.4 Bioakumulace chemických látek ve vodních organismech

Bioakumulace představuje nárůst koncentrace a akumulace látky v organismu. Látky mohou být do těla organismu akumulovány z okolního prostředí nebo z potravy. V důsledku bioakumulace látek může docházet k poškození i k smrti jedince. Modelované bioakumulační parametry mohou sloužit k posouzení nebezpečnosti, toxicity a rizik různých chemických látek.

Bioakumulační potenciál je charakterizován pomocí biokoncentračního faktoru (BCF), bioakumulačního faktoru (BAF), bioamplifikačního faktoru (BMF) a trofického magnifikačního faktoru (TMF). Akumulace látky z okolního prostředí, nikoli tedy z potravy, je procesem biokoncentrace. Biokoncentrační faktor vyjadřuje poměr koncentrací chemické látky v organismu a v médiu, které ho obklopuje. Bioakumulační faktor je pak poměr koncentrací látky v organismu a v médiu, které ho obklopuje, přičemž k expozici dochází pomocí potravy i média (vody). Poměr koncentrací dané látky v organismu a v jeho potravě vyjadřuje BMF (Armitage a kol., 2017). Trofický magnifikační faktor udává průměrný přenos látky z potravy do organismu, tedy stoupající koncentraci látky, prostřednictvím potravního řetězce (Borgå a kol., 2012).

Jelikož jsou do prostředí denně vypouštěny tisíce různých látek a není tedy možné všechny tyto látky testovat, byly navrženy modely využitelné pro hodnocení rizik látek. Tyto modely uplatňují fyzikálně-chemické vlastnosti látek (ty ale nedostatečně reflektují chování ionizovatelných chemických látek) nebo jsou využívány empirické modely zahrnující kinetiku v prostředí daného organismu (Obr. č.2) (Armitage a kol., 2017, Carter a kol., 2022).



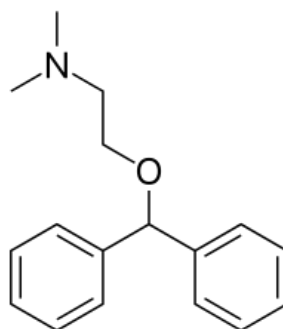
Obr. č.2 Odlišná úroveň dostupných informací u bioakumulačních modelů pro různé chemické skupiny a živé organismy. Bioakumulace chemických látek v živých organismech je důsledkem souboru procesů jako jsou absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování (převzato a upraveno podle Carter a kol., 2022).

Podle dalších autorů vědecké literatury je bioakumulace důležitou součástí hodnocení nebezpečnosti a rizik podle schématu ADMET – absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxicita (Arnott a Planey, 2012). Hodnocení nebezpečnosti chemických látek zahrnuje perzistenci, bioakumulaci a toxicitu chemických sloučenin, zatímco hodnocení rizik je interpretací údajů o toxicitě týkajících se vnějších koncentrací a vnitřní tělesné zátěže. Absorpce organických xenobiotik z vodního sloupce je u všech organismů převážně pasivní, a proto jsou rychlosti absorpce podobné jak u ryb, tak u bezobratlých korýšů, přičemž biokoncentraci látky v expozičních studiích je možné předvídat z doprovodných biokoncentračních parametrů. Rozdíly v distribuci po tělních orgánech a tkáních bezobratlých a obratlovců jsou odvozeny hlavně z částečně otevřeného oběhového systému u bezobratlých, jako jsou dekapodní korýši, a uzavřeného systému u vodních obratlovců, jako jsou ryby (Reiber, 1992). Rychlost biotransformace látek (metabolismu) je specifická pro danou skupinu živočichů a závisí na konkrétní regulaci a aktivitách enzymů, které jsou obecně vyšší u ryb než u vodních bezobratlých (Livingstone, 1998).

2.5 Difenhydramin

Difenhydramin (DFH) (Obr. č.3) je primárně antihistaminikum prodávané pod komerčními názvy jako Benadryl, Nytol, Dimedrol, Unisom aj. Difenhydramin byl ke klinickému užití zaveden v roce 1946 (Simons a Simons, 2011). Je používán

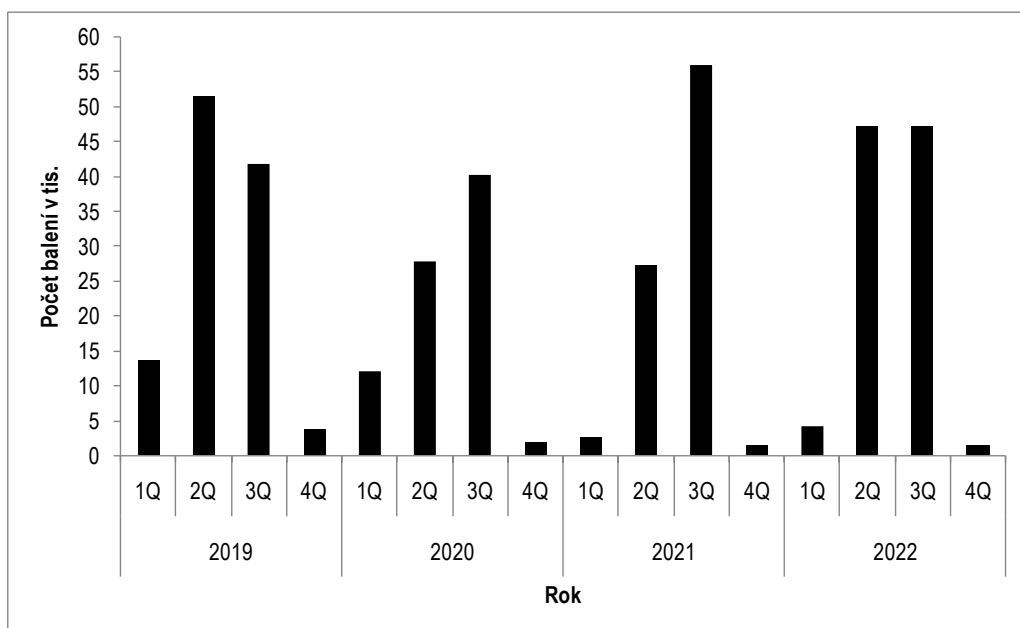
při léčbě příznaků spojených s alergií, nachlazením a také má sedativní účinky využitelné k léčbě nespavosti (Potter, 2012).



Obr. č.3 Strukturní vzorec difenhydraminu (převzato podle Topp a kol., 2012)

Difenhydramin může být užíván vnitřně formou tablet, či aplikován na kůži. Difenhydramin se kompetitivně váže na histaminový receptor H1, tím zabraňuje vazbě histaminu, uvolňovaného za přítomnosti alergenu, na tento receptor a snižuje alergickou reakci. Má anticholinergní účinky, což znamená, že se naváže na muskarinové acetylcholinové receptory v neurosvalové synapsi, a tím snižuje signál vysílaný neurotransmiterem acetylcholinem. Tato reakce také snižuje toxický účinek organofosfátů a pomáhá proti příznakům Parkinsonovy choroby (Haas a kol., 2008). Avšak DFH má pro člověka i vedlejší účinky, například ospalost, podrážděnost a při nadměrném používání může způsobovat i křeče, záchvaty a závažné srdeční komplikace.

Difenhydramin je v České republice používán hlavně cestou kožního podání, tudíž je do lékáren a dalších zdravotnických zařízení distribuován ve formě gelů. Nejvíce je DFH v ČR využíván v jarním a letním období (SÚKL, 2023) (Graf č.1). V současnosti je DFH považován za nescifické léčivo s mnoha nežádoucími, ale i toxickými účinky (Wolfson a kol., 2022). Je tedy snaha nahrazovat DFH moderními léčivy, hlavně antihistaminiky druhé a třetí generace.



Graf č.1 Počet distribuovaných balení difenhydraminu do lékáren a jiných zdravotnických zařízení v jednotlivých kvartálech (Q) let 2019-2022 v ČR (SÚKL, 2023).

Difenhydramin byl detekován ve vodě, v sedimentu i v rybí tkáni (Berninger a kol., 2011). V povrchových vodách byly zjištěny koncentrace v rozmezí $0,01 - 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Stackelberg a kol., 2004), ve svalovině ryb byly naměřeny koncentrace přibližně $1,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a v játrech ryb pak přibližně $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ramirez a kol., 2007). V sedimentu byly zjištěny koncentrace vyšší, a to $17 - 49 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ferrer a kol., 2004). Látka je však v prostředí perzistentní, např. v půdě byl DFH detekován i po dvou letech po experimentální aplikaci (Topp a kol., 2012).

Pro experimenty byl DFH vybrán, jelikož by svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi mohl být modelem pro chování řady dalších léčiv. Jde o slabě zásaditou, ionizovatelnou ($\text{pK}_a=8,9$), ve vodě snadno rozpustnou sloučeninu. V běžných čistírnách odpadních vod je špatně odstranitelný a je perzistentní v půdě a sedimentech. V těle ryby se akumuluje hlavně při vyšším pH (snížení míry ionizace) (Berninger a kol., 2011).

2.6 Hypotézy předložené práce

Pro účely předložené práce byly stanoveny následující hypotézy:

- 1) Lékivo difenhydramin způsobí změny v molekulárních obranných mechanismech u raka signálního, konkrétně v lipidní peroxidaci, aktivitě antioxidantních enzymů a bude mít vliv na aktivitu acetylcholinesterázy.
- 2) Lékivo difenhydramin způsobí různou míru oxidativního stresu v hepatopankreatu, žlázech a svalech raka signálního.
- 3) Absorpce difenhydraminu do těla raka bude záviset na velikosti jeho těla.
- 4) Množství absorbovaného léčiva do hemolymfy bude záviset na pH roztoku léčiva, kterému jsou pokusní jedinci exponováni.

3. Materiál a metodika

Experimenty byly provedeny v Laboratoři environmentální chemie a biochemie (LECHB) ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém (VÚRH) ve Vodňanech, který je součástí Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Živý experimentální materiál zajistili pracovníci Laboratoře sladkovodních ekosystémů a chemické analýzy vzorků byly provedeny v LECHB ve spolupráci s Ing. Adamem Boříkem, Ph. D.

3.1 Experimentální materiál

Rak signální (*Pacifastacus leniusculus*) je v České republice nepůvodním a invazním druhem, byl sem dovezen v roce 1980 k produkci tržních raků. Dnes je v Evropě nejrozšířenějším nepůvodním račím druhem (Kozák a kol., 2013).

Tento druh dorůstá velikosti 12 cm (samice) až 16 cm (samci) a dosahuje hmotnosti 200 – 250 g. Má hnědé zbarvení a je typický bílou až namodralou skvrnou na kloubu klepet. Klepeta jsou na spodní straně červená a u samců jsou klepeta mohutnější než u samic. Povrch klepet a krunýře (karapaxu) je, na rozdíl od raka říčního, hladký a bez trnů (Kozák a kol., 2013; Štambergová a kol., 2009). Rak signální se vyskytuje spíše v chladnějších vodách, avšak k vysokým teplotám je tolerantnější než rak říční. Je citlivý na kyselé prostředí, na hodnoty pH nižší než 6,5 (Kozák a kol., 2013; Svobodová, 1987). Je přenašečem račího moru a proto ohrožuje a vytlačuje původní druhy raků. (Kozák a kol., 2013).

Rak signální nepatří mezi ohrožené ani mezi chráněné druhy raků, je v České republice invazivním druhem, a proto byl vybrán jako vhodný druh pro experimentální účely. Jedinci raka signálního pro všechny níže uvedené experimenty pocházeli z Křesanovského potoka (potok nacházející se v okrese Prachatice, mezi městem Vimperk a vesnicí Křesanov, přítok řeky Volyňky, souřadnice GPS: 49.0618756N, 13.7550450E).

3.2 Experiment 1: Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního

3.2.1 Design experimentu

Ručně nasbíraní raci byli dovezeni do VÚRH a z důvodu aklimatizace byli tři dny před začátkem experimentu umístěni do skleněných akvárií s dechlorovanou vodou. Poté bylo vybráno 120 raků (délka karapaxu $28,7 \pm 4,6$ mm), kteří byli náhodně rozděleni do 12 akvárií po 10 jedincích. Poměr samců a samic byl v každém akváriu 1:1. Experimentální akvária byla vybavena úkryty, z důvodu snížení kanibalismu mezi jedinci (Obr. č.4). V akváriích bylo 10 l vody a pH bylo upraveno na 8,3 pomocí 5M roztoku hydroxidu sodného (NaOH). Raci nebyli v průběhu experimentu krmeni. Roztoky v akváriích byly každý den zcela vyměněny za čerstvé.



Obr. č.4 Experimentální akvária s úkryty

V průběhu celého testu byly sledovány a zaznamenávány fyzikálně-chemické parametry vody, teplota vody se pohybovala v rozmezí $18,8 - 19,2$ °C, množství rozpuštěného kyslíku v rozmezí $8,0 - 9,4$ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a pH bylo naměřeno v rozmezí $8,0 - 8,2$. Experiment proběhl za přirozených světelných podmínek laboratoře situované na sever a odpovídající 1. dekádě července (cca 16 hodin světlo a 8 hodin tma).

Byly testovány celkem tři různé koncentrace DFH oproti kontrole (K) bez testovaného léčiva. Expoziční koncentrace DFH byly zvoleny na základě poznatků získaných z literatury:

1) Nízká (L) $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ – environmentální koncentrace, odvozená z průměru koncentrací bez pozorovatelných účinků v modelu vodních bezobratlých *Daphnia magna* a v rybím modelu *Pimephales promelas* (Berninger a kol. 2011);

2) Střední (M) $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ – desetinásobná koncentrace, odvozena z průměru maximálních hodnot v sedimentech (Ferrer et al. 2004);

3) Vysoká (H) $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ – subletální koncentrace pro velké bezobratlé, odvozena z letální dávky u *D. magna* (Berninger a kol. 2011; Potter 2012).

3.2.2 Odběry vzorků

Po 96 hodinách expozice raků léčivu byli z každého akvária (včetně kontrolního) vybráni 4 samci a 4 samice raků. Raci byli zchlazeni na ledu asi 3 min a pomocí injekční stříkačky byla odebrána hemolymfa z ventrální dutiny abdominálního segmentu (Obr. č.5). Rakům byly odebrány vzorky žaber, hepatopankreatu a abdominálních svalů. Všechny biologické vzorky byly přeneseny do mikrozkušavek typu eppendorf (2 ml), ihned umístěny do ledové tříště a poté uchovány v hlubokomrazicím boxu při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pro následné analýzy. Vzorky vody pro ověření koncentrace DFH byly odebírány denně vždy před a po výměně experimentální lázně a uchovány při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. č.5 Odběr hemolymfy injekční stříkačkou

3.2.3 Chemická analýza vody a hemolymfy

Příprava biologických vzorků probíhala na základě upravené metodiky podle Grabicové a kol. (2018). K 0,25 g hemolymfy bylo přidáno 250 μ l extrakčního rozpouštědla (acetonitril s 0,1 % kyseliny methanové) a 5 ng izotopicky značeného standardu. Směs byla poté homogenizována a přes noc uložena do -20 °C, poté byla odstředěna (5 min, 10000 rpm, Minispin, zkumavka typu eppendorf) a 100 μ l bylo využito k analýze léčiva. Vzorky vody byly přefiltrovány přes regenerovaný celulóзовý filtr s pórovitostí 0,2 μ m a následně byl odebrán alikvot 1 ml, do kterého bylo přidáno 5 ng izotopicky značeného standardu.

Stanovení koncentrací DFH pak bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie (LC) s tandemovou hmotnostní spektrometrií, kdy bylo do LC systému vstříknuto 10 μ l vzorku a pomocí gradientové eluce separován cílový analyt na chromatografické koloně pracující na principu extrakce na reverzní fázi (Hypersil gold aQ C18, Thermo Scientific). Mobilní fáze byly tvořeny okyseleným acetonitrem a okyselenou ultračistou vodou (0,1 % kyseliny methanové).

Detekce analytu probíhala pomocí hmotnostního spektrometru Q Exactive s vyhřívaným elektrosprejem. Hmotnostní spektrometr pracoval v módu detekce pozitivně nabitých molekulových iontů a selektivně zaznamenával fragmentační spektra cílového analytu a jeho intenzity.

Výsledné koncentrace byly vypočítány na základě průměrného odezvového faktoru DFH a izotopicky značeného standardu sedmi bodových kalibračních řad. Kalibrační řady byly připraveny v matrici vzorku, která podléhala stejnému způsobu úpravy jako samotné vzorky a byla fortifikována v požadovaném koncentračním rozsahu (voda 1 – 125 μ g·l⁻¹, hemolymfa 0,04 – 50 ng·ml⁻¹)

3.2.4 Stanovení biomarkerů oxidativního stresu

Hepatopankreas, žábry a svaly raků byly rozmrazeny na ledové tříšti a na analytických vahách bylo naváženo asi 0,1 g tkáně. Za použití ultrazvukového homogenizátoru byly tkáně rozemlety v ledově chladném 0,1M fosfátovém pufru (PBS, pH 7,4) v poměru vzorku a pufru 1:15 (m:V), podle metodiky Howcroft a kol. (2009).

Lipidní peroxidace byla měřena stanovením zbarvených produktů peroxidace lipidů, TBARS (Ohkawa a kol., 1979). Ke 100 μ l zhomogenizované tkáně bylo přidáno

325 μl 12% kyseliny trichloroctové, 250 μl 60mM TRIS-HCl s 0,12mM kyselinou diethylenetriaminpentaoctovou a 325 μl 0,75% kyseliny thiobarbiturové.

Tato směs byla vařena 60 min při 100 °C a dále centrifugována 5 min na 10 000 \times g, při teplotě 25 °C. Absorbance v supernatantu byla měřena při vlnové délce 535 nm. Lipidní peroxidace pak byla vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu a vyjádřena jako látkové množství vznikajících TBARS na 1 g čerstvé tkáně.

Enzymatická aktivita katalázy (CAT), superoxidodismutázy (SOD), glutathionperoxidázy (GPx), glutathion S-transferázy (GST) a glutathionreduktázy (GR) byla měřena v homogenátu podle upravené metodiky publikované v práci Koubová a kol. (2022). Centrifugací homogenátu (10 000 \times g) byl připraven postmitochondriální supernatant (PMS). Všechny použité metodiky byly upraveny pro 96 jamkové průhledné mikrotitrační destičky s plochým dnem jamek. Pro analýzu CAT byly použity speciální mikrotitrační destičky pro měření vlnové délky v UV spektru.

Aktivita CAT byla měřena dle upravených metodik Claiborne (1985) a Cappello a kol. (2016). K 25 μl PMS na jednu jamku bylo přidáno 200 μl 24mM peroxidu vodíku (H_2O_2) a 75 μl 50mM pufru PBS. Absorbance byla měřena v kinetických intervalech po dobu 1 min při vlnové délce 240 nm a enzymatická aktivita pak byla stanovena jako H_2O_2 , který byl spotřebován za 1 min na 1mg proteinu.

Enzymatická aktivita SOD byla měřena podle metodiky Ewing a Janero (1995). K 50 μl PMS byla přidána reakční směs, která se skládala (v přepočtu na 1 jamku) z 50 μl 275 μM NBT (nitrotetrazolium blue chlorid), 50 μl 440 μM NADH (β -nikotinamid adenindinukleotid redukovaný dipotasiovou solí) a 100 μl 275 μM EDTA (kyseliny ethylen diamintetraoctové). Dále bylo přidáno 25 μl 38,5 μM phenazinmethosulfátu rozpuštěného v PBS (0,05M, pH 7,4). Absorbance byla měřena v kinetických intervalech po dobu 5 min při vlnové délce 560 nm. Metoda pak byla založena na stanovení inhibice redukce NBT na fialový komplex formazanu, kterou zprostředkovává SOD. Výsledná aktivita SOD byla vyjádřena jako látkové množství redukovaného NBT $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu.

Dle metodiky uvedené Mohandas a kol. (1984) byla měřena enzymatická aktivita GPx. Ke 25 μl PMS byla přidána směs složená z 4mM EDTA, 0,48 U enzymu glutathionreduktázy (v 50mM PBS), 4mM azidu sodného, 0,9mM NADPH (β -nikotinamidadenindinukleotidfosfát) v 50mM PBS, 4,5mM redukovaného L-

glutathionu a z 1,5mM H₂O₂. Absorbance pak byla měřena v kinetických intervalech po dobu 3 min při vlnové délce 340 nm a enzymatická aktivita byla vyjádřena jako látkové množství oxidovaného NADPH min⁻¹·mg⁻¹ proteinu.

Enzymatická aktivita GR byla měřena pomocí metodik popsanych v pracích Cribb a kol. (1989) a Carlberg a Mannervik (1975). K 50 µl PMS bylo přidáno 2mM EDTA, 0,4mM NADPH a 4mM oxidovaný L-glutathion (v 50mM PBS). Absorbance byla měřena v kinetických intervalech po dobu 5 min při vlnové délce 340 nm a aktivita byla také stanovena jako látkové množství oxidovaného NADPH min⁻¹·mg⁻¹ proteinu.

Aktivita GST byla stanovena podle metodiky publikované v práci Habig a kol. (1974). Při tomto měření bylo ke 25 µl PMS přidáno 250 µl reakční směsi, která se skládala z 245,5 ml 1,1mM redukovaného L-Glutathionu (v 0,1M PBS) a z 4,5 ml 60mM 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CDNB). Absorbance byla měřena v kinetických intervalech po dobu 6 min při vlnové délce 340 nm a aktivita byla také vyjádřena jako látkové množství vzniklého konjugátu CDNB min⁻¹·mg⁻¹ proteinu.

3.2.5 Stanovení enzymatické aktivity acetylcholinesterázy (AChE)

Aktivita acetylcholinesterázy byla měřena podle původní metody publikované v pracích Ellman a kol. (1961) a Guilhermino a kol. (1996). Ke 25 µl vzorku bylo přidáno 225 µl reakční směsi složené z 0,64mM DTNB (kyseliny 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoové), 1,14mM NaHCO₃ (v 0,1M PBS) a 1,2mM acetylthiocholin jodidu (v 0,1M PBS). Absorbance byla měřena 5 min při vlnové délce 414 nm v kinetických intervalech a aktivita byla stanovena jako látkové množství vzniklého konjugátu DTNB min⁻¹·mg⁻¹ proteinu.

Všechny testy byly připraveny na ledové tříšti a měření byla provedena při 25 °C. Absorbance byla měřena pomocí spektrofotometru Infinite M200Pro – TECAN pro stanovení absorbance na mikrotitračních destičkách. Princip výpočtu LPO a enzymatických aktivit byl publikován již dříve např. v diplomové práci Hlávková (2018).

3.2.6 Výpočet integrované biomarkerové odezvy

Integrovaná biomarkerová odezva verze 2 (IBRv2), která shrnuje a zjednodušuje komplexní data, byla v rámci Experimentu 1 vypočtena podle Sanchez a kol. (2013). Tato analýza vyjadřuje celkový vliv oxidativního stresu na aktivaci (indukci) či utlumení (inhibici) exprese nebo samotné funkce antioxidantních enzymů v exponovaných tkáních.

Standardizací dat byl získán standardní průměr Y_i podle vzorce:

$$Y_i = \log(X_i/X_0),$$

kde X_i je průměrná hodnota biomarkeru exponovaných skupin vzorků a X_0 jsou průměrné hodnoty referenčních skupin vzorků v příslušné tkáni. Standardizovaná odpověď biomarkeru (Z_i) byla získána podle vzorce:

$$Z_i = (Y_i - \mu) / s,$$

kde μ je obecný průměr získaný výpočtem průměru všech skupin vzorků příslušného biomarkeru a s je obecná směrodatná odchylka všech skupin vzorků příslušného biomarkeru v dané tkáni. Index odchylky biomarkeru (A_i) byl vypočítán podle vzorce:

$$A_i = Z_i - Z_0,$$

kde Z_i je standardizovaná odpověď exponovaných skupin vzorků a Z_0 je standardizovaná odpověď referenčních (kontrolních) skupin vzorků. Integrovaná biomarkerová odezva byla získána převedením A_i každé skupiny vzorků (exponovaných skupin) do absolutních hodnot a jejich součtem podle vzorce:

$$IBRv2 = \sum |A_{i1-7}|.$$

3.2.7 Statistická analýza

Rozdíly mezi jednotlivými odpověďmi biomarkerů na různé koncentrace DFH byly určeny pomocí metody jednocestná ANOVA a rozdíly mezi skupinami byly testovány následným Tukeyho testem. Za významné pak byly považovány ty rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

3.3 Experiment 2: Bioakumulační dynamika difenhydraminu

3.3.1 Design experimentu

Raci byli nejprve týden aklimatizováni v dechlorované vodě a krmeni plátky mrkve. Poté bylo vybráno 170 raků, kteří byli rozděleni do 6 akvárií. Jako v předchozím experimentu byl poměr samice:samci v každém akváriu 1:1 a akvária byla taktéž vybavena plastovými úkryty. V každém akváriu bylo 60 l vody, ve třech akváriích bylo pH postupně upraveno na 8,7 a v dalších třech na pH 6,7. Zvolená koncentrace DFH byla $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Fyzikálně-chemické parametry vody byly sledovány a zaznamenávány stejně jako v Experimentu 1. Světelný režim byl nastaven na 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Celý experiment trval 240 hodin, prvních 168 hodin byli raci exponováni léčivu, poté byli raci přemístěni do vody bez přídavku DFH k depuraci. Raci nebyli v průběhu experimentu krmeni a roztok v akváriích byl měněn každé ráno po odběru vzorků.

3.3.2 Odběry vzorků

Celkem proběhlo 14 odběrů vzorků hemolymfy a těl raků. První odběr proběhl před přidáním DFH do akvárií a sloužil jako kontrola. Při tomto odběru byli z každého akvária náhodně vybráni 2 raci, vždy samec a samice. Raci byli následně znehybněni chlazením v ledové tříšti, změřeni a zváženi (Obr. č.6 a 7). Injekční stříkačkou jim bylo z ventrální dutiny abdominálního segmentu odebráno 180 μl hemolymfy do 2ml mikrocentrifugační mikrozkuřavky typu eppendorf. Hemolymfa byla promíchána s 20 μl heparinu, aby nedošlo ke koagulaci proteinů v hemolymfě. Další odběry hemolymfy probíhaly po 1, 6, 12, 24, 48, 96 a 168 hodinách expozice testované látky (absorpční fáze) a 1, 3, 12, 24, 48 a 72 hodin po přesunutí raků do vody bez DFH (depurační fáze) (Tab. č.1). Odběr probíhal vždy stejně, jako je uvedeno u prvního odběru. Mikrozkuřavky s hemolymfou a sáčky s těly raků byly ihned umístěny do ledové tříště a poté uchovány v hlubokomrazícím boxu při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. č.6 Vážení raků



Obr. č.7 Měření raků

Tab. č.1 Odběry vzorků hemolymfy a těl raků v Experimentu 2

	Den 0	Den 1	Den 2	Den 4	Den 7	Den 8	Den 9	Den 10
7:00	0	24	48	96	168 (0)	192 (24)	216 (48)	240 (72)
8:00	1	Absorpce			169 (1)	Depurace		
13:00	6				171 (3)			
19:00	12				180 (12)			

Při každém odběru hemolymfy bylo odebráno 4,5 ml vody, které byly uchovány při -20 °C. Před výměnou vody byl odebrán vzorek vody (50 ml) pro měření přítomnosti amoniaku.

Chemická analýza vody a hemolymfy byla provedena jako v Experimentu 1 (kapitola 3.2.3), jen výsledná koncentrace DFH byla vyjádřena v $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ hemolymfy.

3.3.3 Stanovení amoniaku ve vodě

Amoniakální dusík byl stanoven pomocí metody absorpční spektrofotometrie po reakci s Nesslerovým činidlem dle Valentové (2013). Nejprve byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentracích N-NH_4^+ : 0; 0,16; 0,40; 0,80; 1,60; 2,40 a 3,20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Po odečtení blanku (destilovaná voda) byla z hodnot naměřených absorbancí

kalibračních roztoků sestavena kalibrační přímka. K odebraným vzorkům vody pak bylo přidáno 0,5 ml roztoku Seignetovy soli (vinan sodnodraselný) a 1 ml Nesslerova činidla. Po 10 min byla při vlnové délce 412 nm na spektrofotometru změřena absorbance vzorků vody. Pomocí kalibračního grafu a regresní rovnice byly vypočteny koncentrace N-(NH₃+NH₄⁺) ve vodě, výsledky pak byly přepočítány na volný amoniak (NH₃).

3.3.4 Zopakování Experimentu 2 s vysokou koncentrací DFH

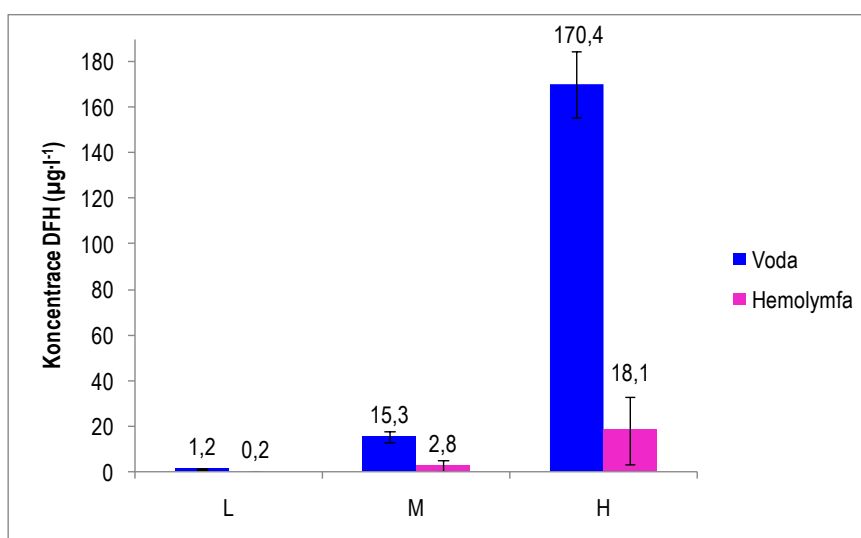
Experiment 2 byl znovu zopakován z důvodu nízké naměřené koncentrace DFH v hemolymfě. Zopakovaný experiment probíhal stejným způsobem, jako předchozí, pouze zvolená koncentrace DFH byla 200 µg·l⁻¹ a ve fázi depurace proběhl jeden odběr hemolymfy navíc (6 hodin po přesunutí raků do vody bez DFH). Chemická analýza vody a stanovení amoniaku ve vodě bylo provedeno též stejným způsobem. Vzorek vody pro měření přítomnosti amoniaku (50 ml) byl odebrán pouze jednou pro ověření předpokládaného negativního výsledku (po 12 h expozice testované látky).

4. Výsledky

4.1 Experiment 1: Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního

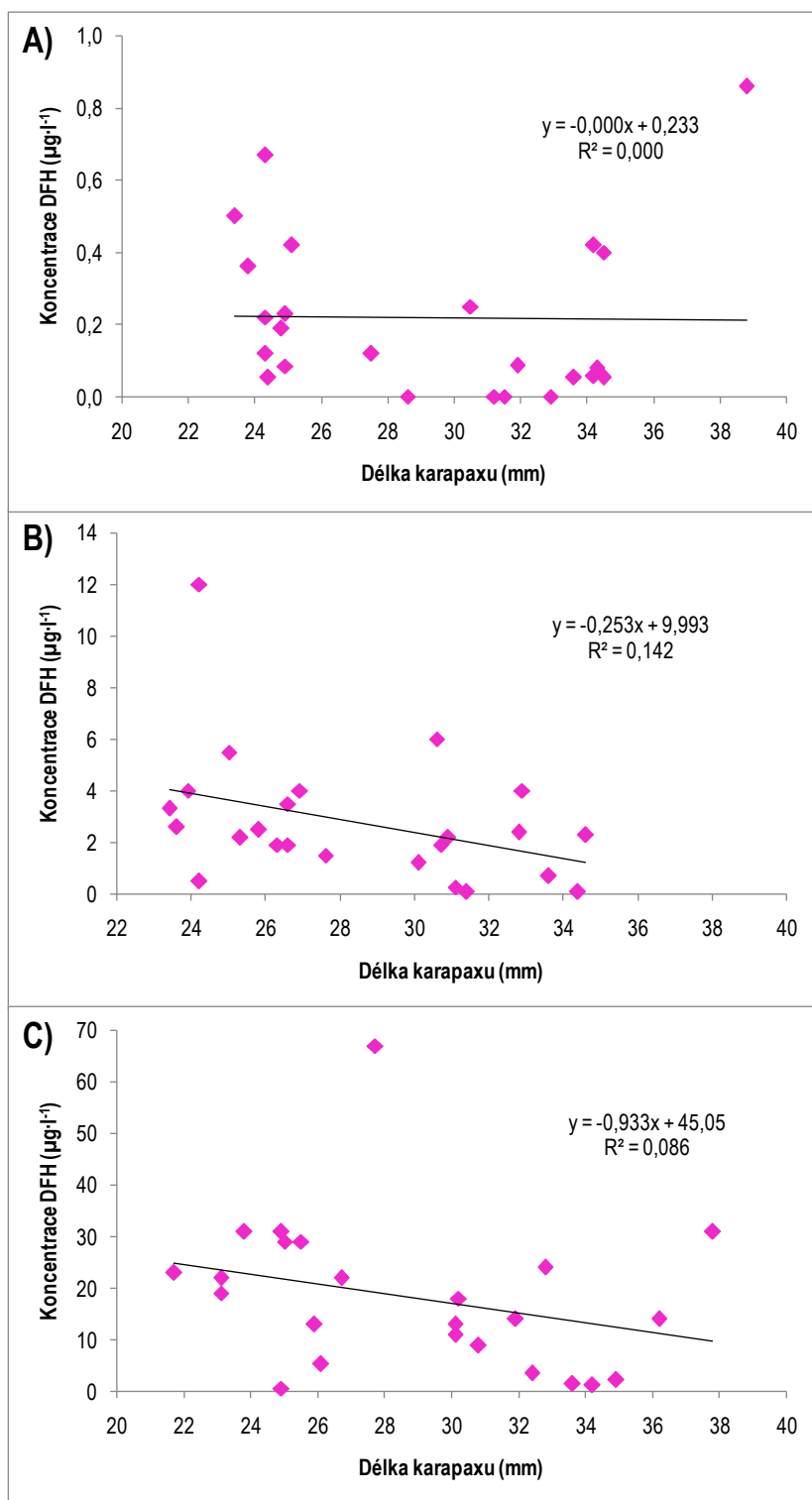
4.1.1 Chemická analýza vody a hemolymfy

Průměrné naměřené koncentrace DFH ve vodě a v hemolymfě jsou zobrazeny v Grafu č.2. Koncentrace DFH naměřené ve vodě byly oproti nominální koncentraci nižší, ale oproti koncentracím naměřeným v hemolymfě po 96 hodinách byly o jeden řád vyšší. Naměřené koncentrace DFH v hemolymfě rostly podle gradientu naměřených koncentrací DFH ve vodě.



Graf č.2 Průměrné naměřené koncentrace DFH ve vodě a v hemolymfě raka signálního exponovaného různými koncentracemi difenhydraminu. Uveden průměr ± směrodatná odchylka. Zkratky: L – nízká ($2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední ($20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH.

Závislost koncentrací DFH naměřených v hemolymfě na délce karapaxu (krunýře) raků je vyobrazena v Grafu č.3. Z těchto grafů a rovnic regrese je viditelné, že mezi koncentrací DFH v hemolymfě a délkou karapaxu raků nebyla lineární závislost v žádné z testovaných koncentrací DFH.



Graf č.3 Závislost naměřené koncentrace DFH v hemolymfě na délce karapaxu raka. Koncentrace DFH – **A)** $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, **B)** $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, **C)** $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.1.2 Biomarkery oxidativního stresu

Účinky testovaných koncentrací DFH, měřené v testovaných tkáních raka signálního, na jednotlivé biomarkery oxidativního stresu jsou zobrazeny v Grafech č.4. Z grafů jsou zřejmé inhibované a indukované biomarkerové reakce a jejich statisticky průkazný rozdíl.

Lipidní peroxidace (Graf č.4 A) byla zvýšená v hepatopankreatu pouze při vysoké koncentraci DFH ($p < 0,001$), v žábřách naopak se zvyšující se koncentrací klesala. Ve svalech byla LPO snížena při nízké a střední koncentraci.

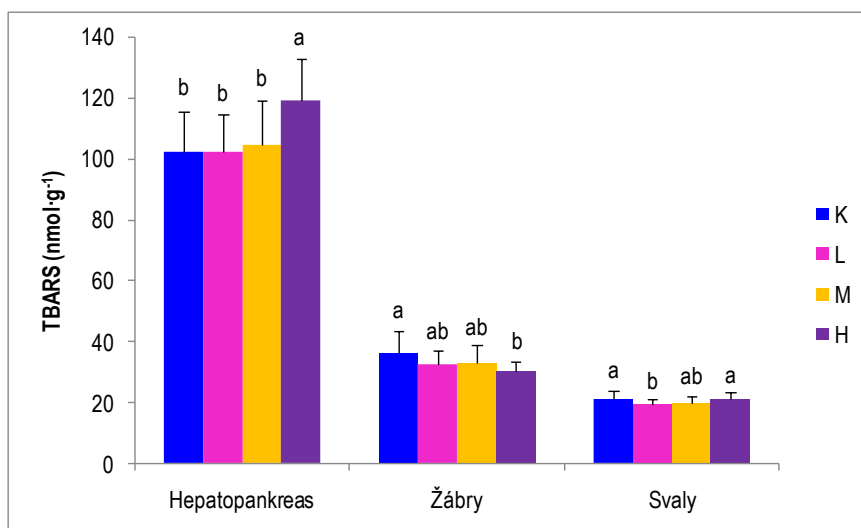
Aktivita CAT (Graf č.4 B) byla při vysoké koncentraci DFH ve svalech zvýšená ($p < 0,001$). V ostatních tkáních nevykazovala aktivita CAT ani významnou indukci, ani významnou inhibici.

Aktivita SOD (Graf č.4 C) byla v žábřách inhibována při střední a vysoké koncentraci DFH ($p < 0,001$), ve svalech byla naopak vysokou koncentrací indukována ($p < 0,008$). V hepatopankreatu SOD aktivitu výrazněji neměnila.

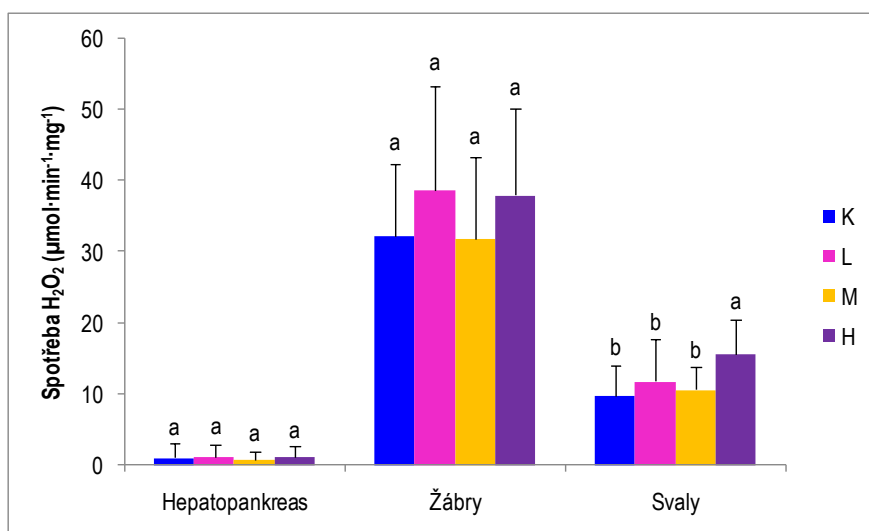
U aktivity GPx (Graf č.4 D) nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v žádné z tkání, ani při žádné koncentraci DFH.

V hepatopankreatu se aktivita GR (Graf č.4 E) snížila při nízké a vysoké koncentraci DFH ($p < 0,001$), stejně tak se snížila ve svalech při vysoké koncentraci ($p < 0,001$). V žábřách byla aktivita GR indukována při střední a vysoké koncentraci DFH ($p < 0,001$).

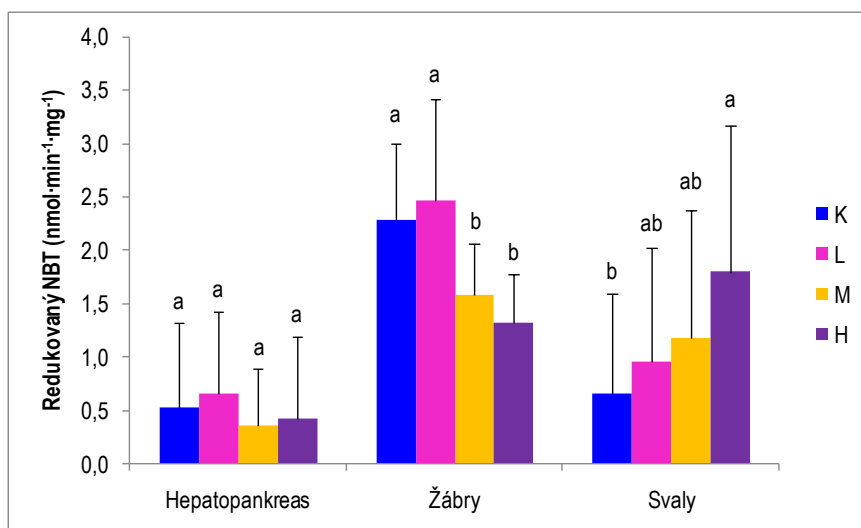
Aktivita GST (Graf č.4 F) byla zvýšena v hepatopankreatu při nízké a vysoké koncentraci DFH ($p < 0,001$). Ve svalech byla aktivita GST snížena při nízké a střední koncentraci DFH ($p < 0,002$). V žábřách se aktivita GST významně neměnila.



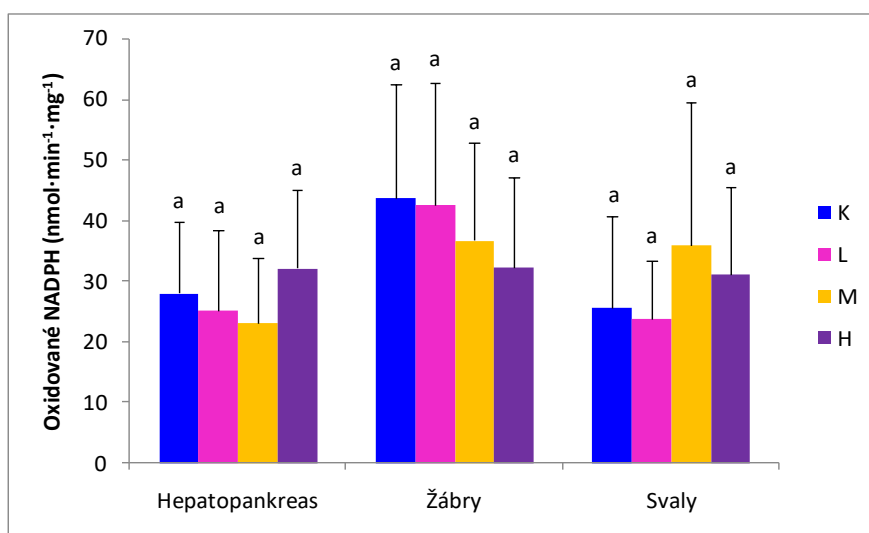
Graf č.4 A) Lipidní peroxidace stanovená v jednotkách TBARS v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká ($2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední ($20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).



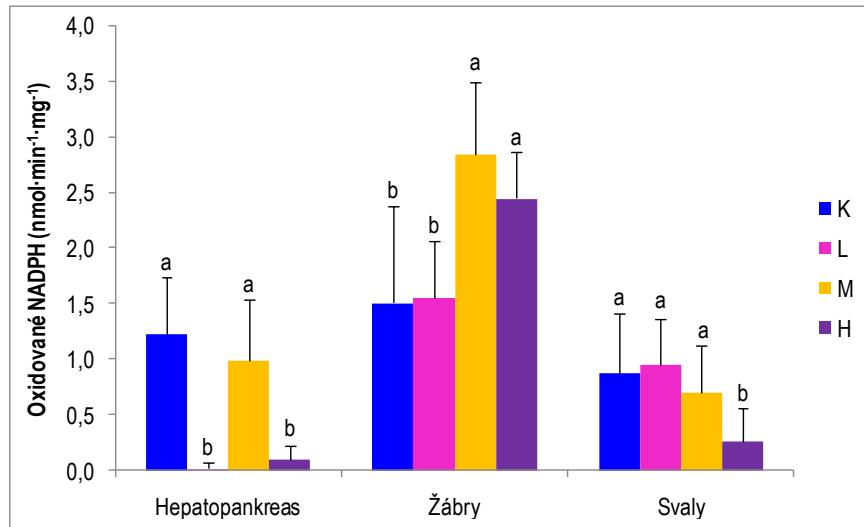
Graf č.4 B) Enzymatická aktivita CAT stanovená jako látkové množství spotřebovaného H₂O₂ v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká ($2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední ($20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).



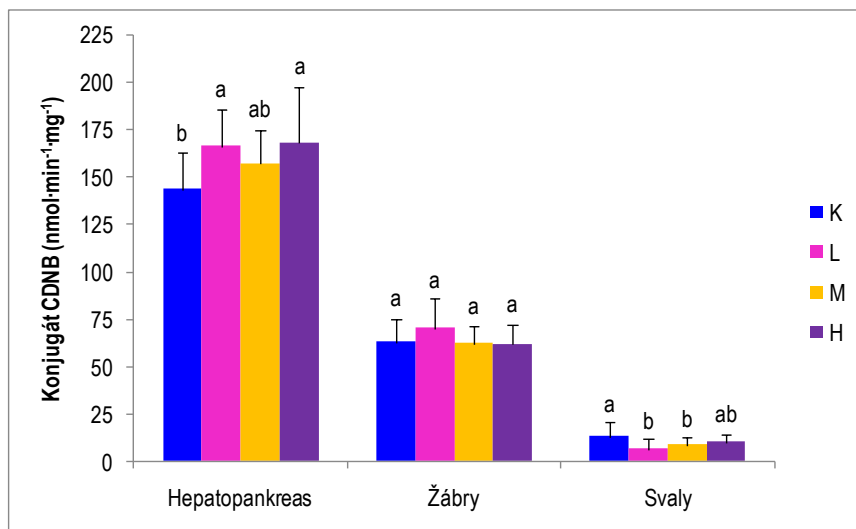
Graf č.4 C) Enzymatická aktivita SOD stanovená jako látkové množství redukováného NBT v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká (2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední (20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká (200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).



Graf č.4 D) Enzymatická aktivita GPx stanovená jako látkové množství oxidovaného NADPH v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká (2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední (20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká (200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).



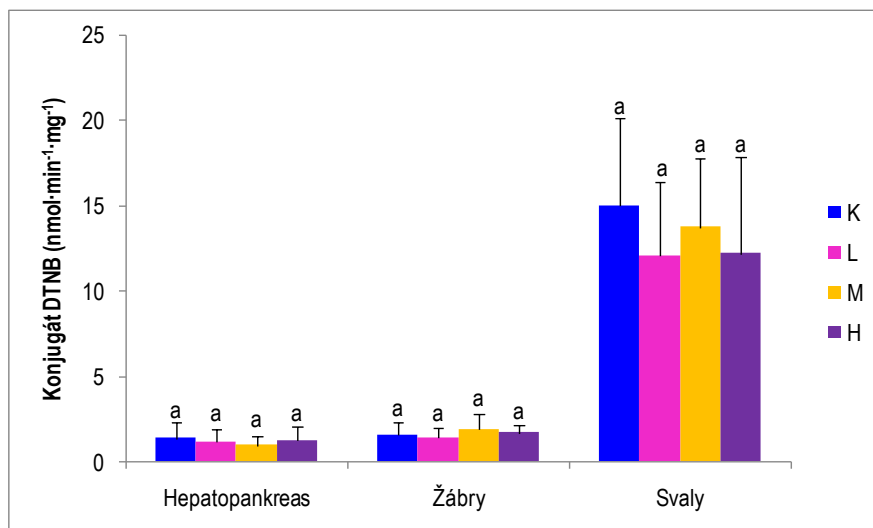
Graf č.4 E) Enzymatická aktivita GR stanovená jako látkové množství oxidovaného NADPH v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká (2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední (20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká (200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).



Graf č.4 F) Enzymatická aktivita GST stanovená jako látkové množství vzniklého konjugátu CDNB v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká (2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední (20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká (200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Biomarkery neurotoxicity

Aktivitu AChE (Graf č.5) nezměnila expozice raků DFH žádné z testovaných koncentrací, v žádné z tkání tedy aktivita AChE nevykazovala ani indukci, ani inhibici. Nejvyšší absolutní aktivita AChE v porovnání s ostatními tkáněmi byla naměřena ve svalech.



Graf č.5 Enzymatická aktivita AChE stanovená jako látkové množství vzniklého konjugátu DTNB v testovaných tkáních raka signálního, exponovaného různými koncentracemi DFH. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká ($2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední ($20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH. Různá písmena v rámci jedné tkáně vyjadřují statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$).

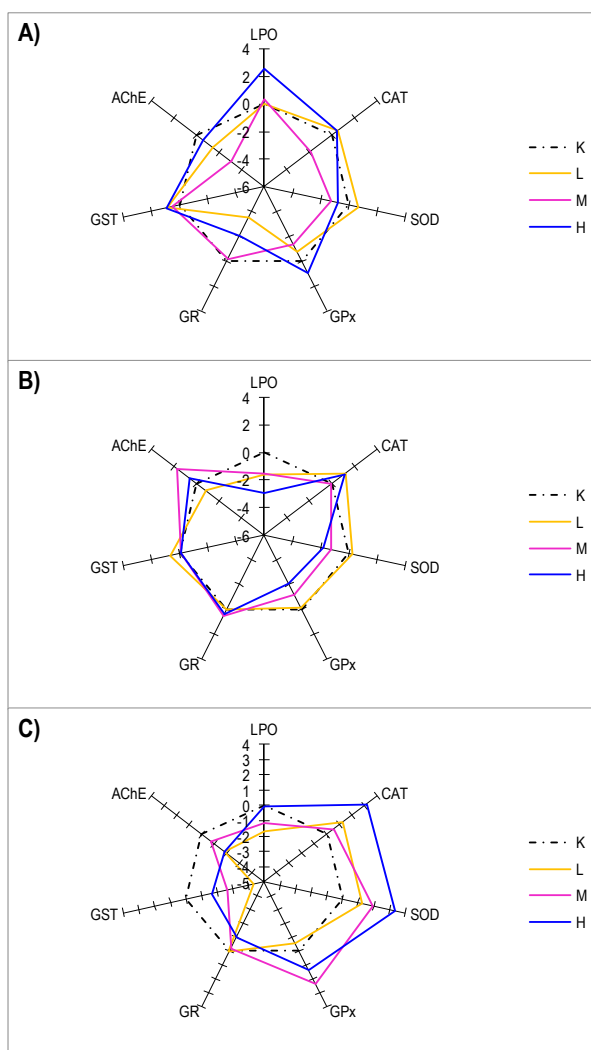
4.1.4 Index odchyly biomarkeru

Index odchyly biomarkeru zobrazuje indukci a inhibici funkce antioxidantních biomarkerů vzhledem ke kontrole (Graf č.6). Inhibice a indukce funkcí biomarkerů byly v jednotlivých tkáních a koncentracích DFH různé, avšak ve všech tkáních bylo zjištěno devět indukovaných a dvanáct inhibovaných biomarkerů. Všechny aktivity biomarkerů byly tedy v každé tkáni, každou koncentrací DFH alespoň minimálně, avšak ne vždy průkazně, ovlivněny.

V hepatopankreatu byla zjištěna nejvyšší míra indukce u LPO při vysoké koncentraci DFH, největší inhibice pak byla u GR při nízké koncentraci. Nejvíce indukci zde bylo vyvoláno vysokou koncentrací DFH a nejvíce inhibicí pak střední koncentrací.

V žábřách byla zjištěna nejvyšší indukce aktivity u AChE při střední koncentraci DFH a nejvyšší míra inhibice u LPO při vysoké koncentraci. Jako u hepatopankreatu, i zde bylo nejvíce inhibicí funkcí vyvoláno střední koncentrací DFH, ale nejvíce indukcí nízkou koncentrací.

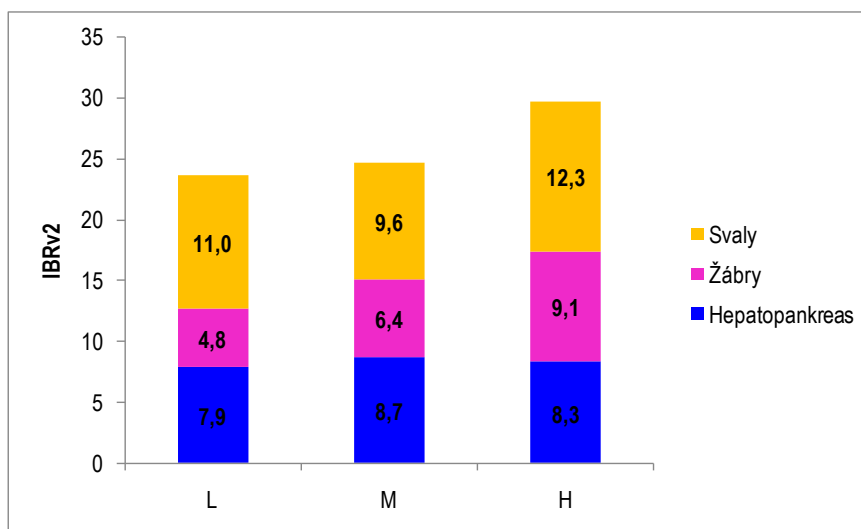
Ve svalech byla zjištěna nejvyšší indukce aktivity u SOD při vysoké koncentraci DFH a nejvyšší míra inhibice u GST při nízké koncentraci. Všechny koncentrace DFH vyvolaly stejný počet inhibicí a indukcí aktivit biomarkerů.



Graf č.6 Index odchylky biomarkeru **A)** v hepatopankreatu, **B)** v žábřách, **C)** ve svalech raka signálního exponovaného různými koncentracemi DFH. Kladné hodnoty vůči kontrole (nulové linii) značí indukci biomarkeru a záporné hodnoty značí inhibici biomarkeru. Zkratky: K – kontrola bez DFH, L – nízká ($2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), M – střední ($20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a H – vysoká ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentrace DFH, LPO – lipidní peroxidace, CAT – kataláza, SOD – superoxid dismutáza, GPx – glutathion peroxidáza, GR – glutathion reduktáza, GST – glutathion-S-transferáza, AChE – acetylcholinesteráza.

4.1.5 IBRv2

Z integrované biomarkerové odezvy verze 2 (Graf č.7) bylo zjištěno, že nejvyšší účinky byly vyvolány vysokou koncentrací DFH ve svalech. Nejnížší odezvy pak byly způsobeny nízkou koncentrací DFH v žábřích. Nejsilněji byly ovlivněny biomarkery vysokou koncentrací DFH, nejslaběji pak nízkou koncentrací.



Graf č.7 Integrovaná biomarkerová odezva verze 2 – absolutní účinky DFH na biomarkery raka signálního. Zkratky: L – nízká (2 µg·l⁻¹), M – střední (20 µg·l⁻¹) a H – vysoká (200 µg·l⁻¹) koncentrace DFH.

4.2 Experiment 2: Bioakumulační dynamika difenhydraminu

4.2.1 Amoniak

V Tab. č.2 jsou zaznamenány koncentrace amoniaku a amoniakálního dusíku naměřené ve vzorcích vody v průběhu experimentu. Všechny naměřené koncentrace byly pod limitem toxicity pro raky. Pro koncentraci DFH 200 µg·l⁻¹ byly změřeny jen 3 kontrolní vzorky vody 12 hodin po přidavku DFH.

Tab. č.2 Koncentrace amoniaku a amoniakálního dusíku ve vzorcích vody z experimentálních akvárií. Koncentrace DFH – **A)** 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, **B)** 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Zkratky: LOQ – limit kvantifikace.

A)	pH 6,7			pH 8,7		
	N-(NH ₄ ⁺ +NH ₃) ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-(NH ₄ ⁺ +NH ₃) ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
1 h	210	0,3	0,2	170	22	18
12 h	90*	0,1*	0,1*	90*	1*	1*
24 h	110*	0,1*	0,1*	110*	14*	12*
48 h	120*	0,1*	0,1*	70*	4*	3*
96 h	120*	0,1*	0,1*	160	14	11
144 h	140*	0,2*	0,1*	90*	12*	10*
168 h	160	0,2	0,2	180	8	7
192 h	160	0,2	0,2	220	8	6
216 h	120*	0,1*	0,1*	150*	30*	24*

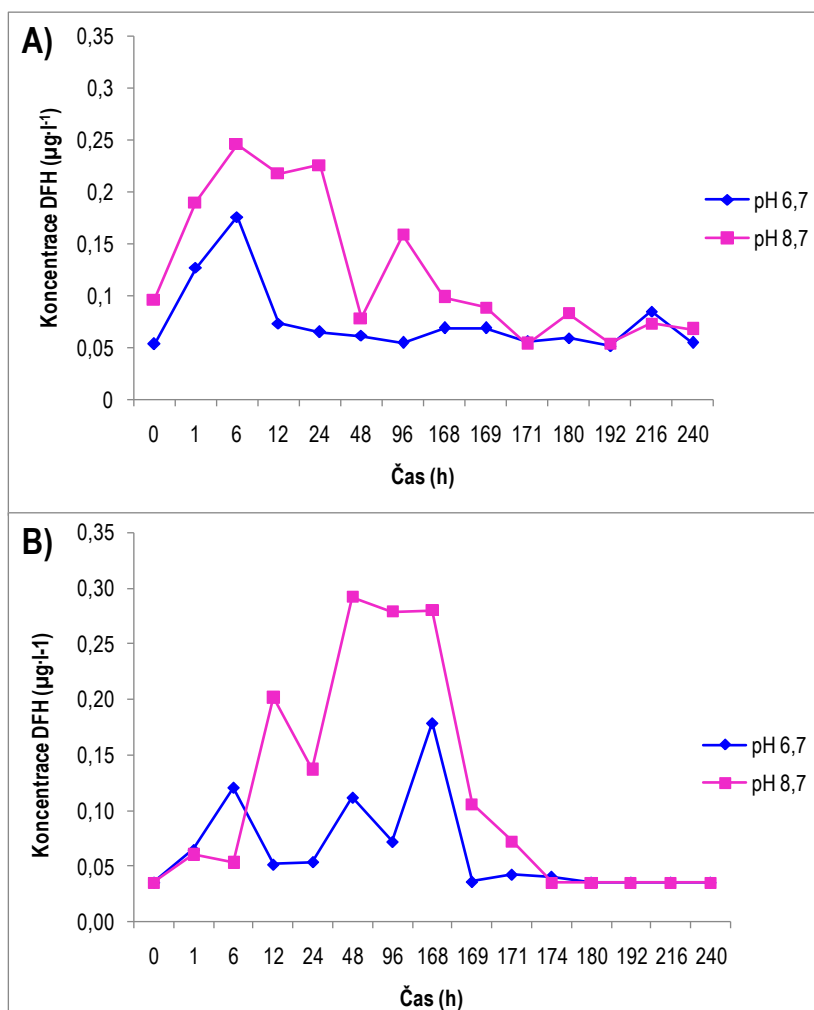
* <LOQ

B)	pH 6,7			pH 8,7		
	N-(NH ₄ ⁺ +NH ₃) ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-(NH ₄ ⁺ +NH ₃) ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	N-NH ₃ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
	90*	0,2*	0,2*	140*	28*	23*
12 h	100*	0,2*	0,2*	130*	26*	21*
	100*	0,2*	0,2*	120*	25*	20*

* <LOQ

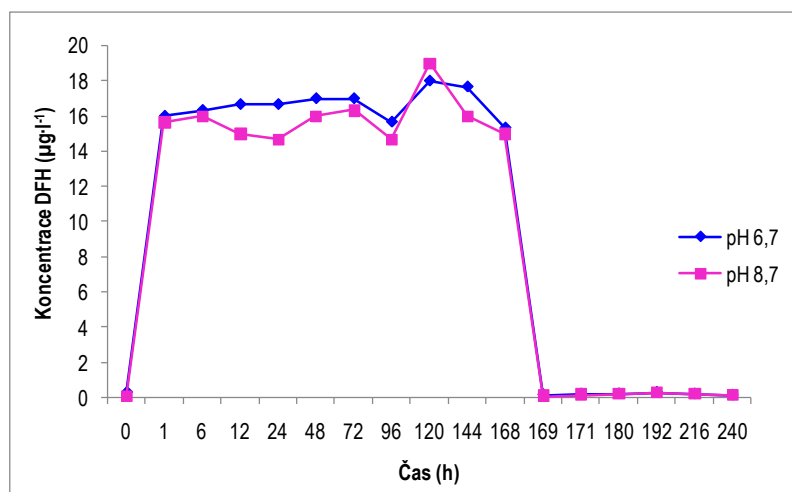
4.2.2 Chemická analýza vody a hemolymfy

Koncentrace DFH absorbovaného a eliminovaného z hemolymfy raka v čase při vybraných hodnotách pH jsou zobrazeny v Grafu č.8. Při vyšší hodnotě pH byla naměřena vyšší koncentrace DFH v hemolymfě. Naměřené hodnoty koncentrace DFH v hemolymfě raků byly velice nízké, při koncentraci DFH 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ byly hodnoty o dva řády nižší, při koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ dokonce o tři řády nižší. Difenhydramin byl postupně v čase z hemolymfy eliminován.

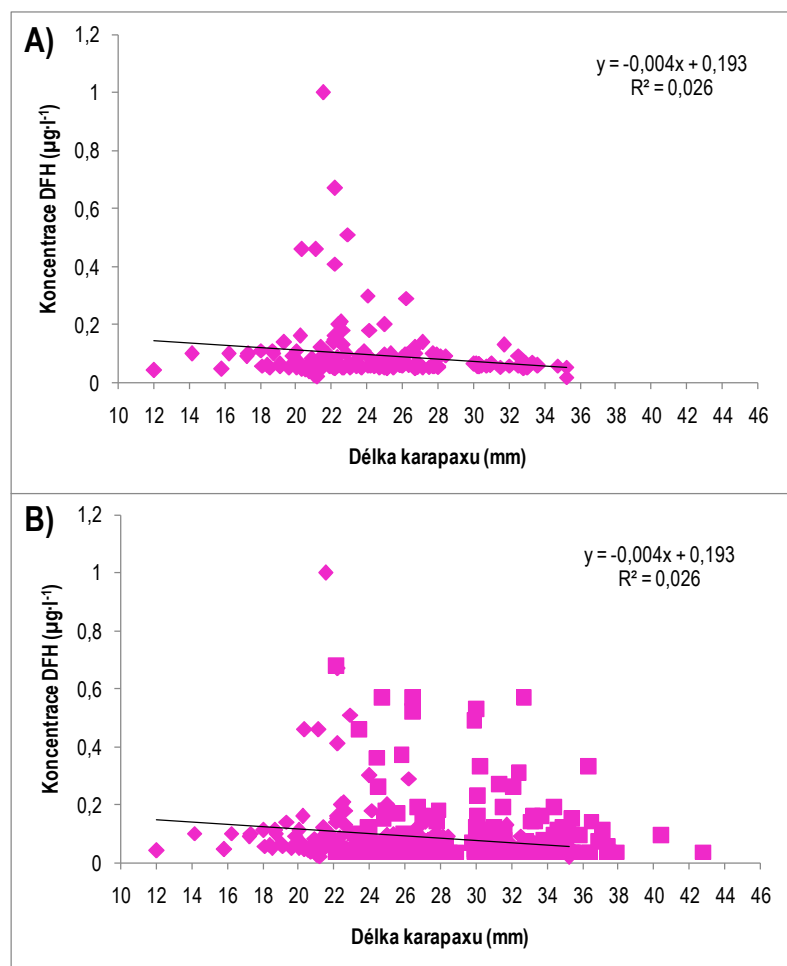


Graf č.8 Koncentrace DFH v hemolymfě raka signálního, vystaveného různým hodnotám pH, v čase. Koncentrace DFH – **A)** $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, **B)** $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Uvedeny jsou průměry naměřených hodnot v daném čase.

Koncentrace DFH ve vodě byla při nižší hodnotě pH mírně vyšší. V době depurace ve vodě nebyla zjištěna přítomnost DFH (Graf č.9). Stejně jako v Experimentu 1, ani zde nebyla zjištěna lineární závislost naměřené koncentrace DFH v hemolymfě raka na délce karapaxu raka v žádné z testovaných koncentrací DFH (Graf č.10).



Graf č.9 Naměřené koncentrace DFH ve vodě z experimentálních akvárií, při testovaných hodnotách pH, v čase. Koncentrace DFH – 20 µg·l⁻¹. Uvedeny jsou průměry hodnot v daném čase.



Graf č.10 Závislost naměřené koncentrace DFH v hemolymfě na délce karapaxu raka. Koncentrace DFH – **A)** 20 µg·l⁻¹, **B)** 200 µg·l⁻¹.

Ve vzorcích hemolymfy bez přidaného heparinu byly naměřeny řádově shodné koncentrace DFH, jako ve vzorcích s heparinem. Ve vybraných vzorcích těl raků však byly naměřeny koncentrace DFH o dva až tři řády vyšší než v hemolymfě. I v tělech raků byla absorpce DFH větší při vyšších hodnotách pH. Biokoncentrační faktor vyjadřuje poměr koncentrací DFH v tělech raků ku koncentraci DFH ve vodě. Z našich dat vyplývá, že BCF byl ve všech měřených vzorcích nižší než 1 a nedocházelo k biokoncentraci léčiva v račích tkáních (Tab. č.3). Data však nezahrnují dostatečný statistický vzorek.

Tab. č.3 Porovnání naměřených koncentrací DFH ve vodě, v hemolymfě s heparinem, v hemolymfě bez heparinu a v těle raka při testovaných hodnotách pH. 168 hodin expozice DFH. Nominální koncentrace DFH – 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Zkratky: BCF – biokoncentrační faktor, hep. – heparin, LOQ – limit kvantifikace.

Číslo vzorku	168 h	Voda ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Hemolymfa s hep. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Hemolymfa bez hep. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Tělo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé tkáně)	BCF
1	pH 6,7	208	< LOQ	1,6	47	0,2
2	pH 6,7	200	0,3	0,7	63	0,3
3	pH 6,7	196	0,5	1,1	45	0,2
4	pH 8,7	192	0,1	0,4	74	0,4
5	pH 8,7	200	0,2	0,3	63	0,3
6	pH 8,7	200	0,5	0,4	100	0,5

5. Diskuze

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na studium léčiva DFH, který je často detekován ve vodách, tkáních ryb a sedimentech. Přestože dochází k časté detekci DFH v environmentálních vzorcích, jsou znalosti o jeho vlivu na vodní organismy velmi limitované (Berninger a kol., 2011). Rak signální byl vybrán, jelikož představuje vhodný experimentální model velkých vodních bezobratlých, pro které vliv DFH zatím nebyl podrobněji popsán. Vliv DFH byl studován pomocí biochemických markerů, díky kterým je možné dobře indikovat toxicitu léčiv (Luschak, 2011).

5.1 Toxikologické účinky difenhydraminu u raka signálního

5.1.1 Chemická analýza vody a hemolymfy

Výsledky naměřených koncentrací DFH v hemolymfě (kap. 4.1) ukázaly, že se DFH do hemolymfy raků absorboval v souladu s gradientem testovaných koncentrací, ale hodnoty byly o jeden řád nižší, než koncentrace naměřené ve vodě. Absorpce ionizovatelných látek, např. DFH, probíhá hlavně na orgánech, které jsou v kontaktu s prostředím (žábry), či v trávicím traktu organismu. Pasivní difúze léčiv přes žaberní tkáň a dutinu trávicího traktu může být obousměrná. Membránové přenašeče v biologických membránách pak přenášejí polárně nabitě molekuly léčiva absorbované do hemolymfy a jeho metabolity vznikající např. v hepatopankreatu (Carter a kol., 2022). Tyto procesy a buněčné a tkáňové bariéry proto mohou být důvodem, proč byly koncentrace DFH naměřené v hemolymfě nižší než ve vodě. V předložené práci nebyly v hemolymfě raků zjištěny žádné metabolity DFH, avšak v podobném experimentu studie Xie a kol. (2016) byly dva transformační produkty DFH (N-demethyl DFH and N,N-didemethyl DFH) detekovány v plasmě ryb (*Carassius auratus*).

5.1.2 Biomarkery oxidativního stresu a neurotoxicity

Aktivita biomarkerů byla měřena ve třech tkáních, a to v hepatopankreatu, žábřách a svalech. Hepatopankreas má zásadní význam pro regulaci metabolismu, imunitní funkce, detoxifikaci a vstřebávání živin u korýšů (Zhang a kol., 2019). Schopnost hepatopankreatu odbourávat léčiva však může být snížena vysokými koncentracemi těchto léčiv. Žábry raků mají respirační a osmoregulační funkci. Jsou v kontaktu s prostředím, a tak částečně zajišťují výměnu plynů a iontů, avšak jsou i velice náchylné k poškození (Guner, 2007; Stará a kol., 2019). Abdominální svaly jsou pohybovou částí těla raka. Funkce svalů může být regulována některými xenobiotiky, jako jsou antihistaminika, která narušují funkci histaminových receptorů důležitých pro neurotransmisi.

V této studii byla pouze v několika případech zjištěna úzká souvislost biomarkerů toxicity a hladiny lipidní peroxidace s koncentrací DFH. Avšak ve studii Xie a kol. (2016) bylo zjištěno, že oxidativní stres, tedy inhibice či indukce aktivity biomarkerů ve tkáních ryb (*Carassius auratus*), vždy závisela na testované koncentraci DFH. Aktivita SOD a GST se zvyšující se koncentrací DFH postupně klesala, aktivita CAT, GPx a AChE naopak vzrůstala.

Lipidní peroxidace dosahovala v hepatopankreatu nejvyšších hodnot ze všech tkání, což může souviset s nárůstem aktivity GST. Zvýšená LPO značí oxidační poškození tkáně (Stará a kol., 2019). Glutathion-S-transferáza zajišťuje konjugaci redukované formy glutathionu, čímž může být způsoben nedostatek oxidované formy glutathionu, a tudíž i pokles aktivity GR. Studie Trombini a kol. (2021), provedená na rakovi červeném (*Procambarus clarkii*), taktéž zaznamenala v hepatopankreatu, při koncentraci směsi léčiv (ibuprofen, ciprofloxacín a flumequin) $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, nárůst aktivity GST a zároveň prudký pokles aktivity GR.

Vzhledem k tomu, že v žábřách byla naměřena zvýšená aktivita CAT, SOD a GR oproti ostatním testovaným tkáním, zajišťují nejspíš ochranu žaber před oxidativním stresem a pomáhají odstraňovat superoxidové radikály. Aktivita SOD byla nejvyšší při nejnižší koncentraci DFH, poté s vyššími koncentracemi postupně klesala, podobně jako ve studii Gao a kol. (2021), kde byla v žábřách raka červeného (*Procambarus clarkii*), v souladu s gradientem testovaných koncentrací léčiva maduramicinu (0,7; 3,5 a $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sedmý den expozice snižována aktivita SOD. Aktivita CAT se v této studii

v žábrách příliš neměnila, stejně jako v již zmíněné studii Gao a kol. (2021). Aktivita GPx taktéž nebyla v žábrách výrazně zvýšena, avšak v experimentu Gao a kol. (2021) naměřili v žábrách raka červeného (*Procambius clarkii*) zvýšenou aktivitu GPx při testovaných koncentracích maduramicinu. Superoxid dismutáza zajišťuje dismutaci superoxidu, a tím vznik peroxidu vodíku, který je pak odstraňován pomocí CAT a GPx. Glutathion reduktáza mění oxidovaný glutathion na redukovaný.

Aktivita AChE byla ve svalech zvýšená, v jednotlivých koncentracích DFH však nekolísala. Oproti tomu v experimentu studie Solé a kol. (2010) byla naměřena klesající aktivita AChE v žábrách slávky středomořské (*Mytilus galloprovincialis*) po 10 dnech expozice léčivu acetaminofenu. Acetylcholinesteráza je potřebná pro hydrolyzu acetylcholinu na acetát a cholin (Solé a kol., 2010). V tomto experimentu však nemusela být biomarkerem neurotoxicity, jelikož DFH působí jako anticholinergní látka v parasympatické části autonomního nervového systému, který je přítomen například v hladkém svalstvu střev (Potter, 2012).

Nejprve byl vypočítán index odchylky biomarkerů, kde hodnoty pod a nad kontrolní linií značí indukci či inhibici aktivity biomarkeru. Všechny biomarkery vykazovaly snížené nebo zvýšené aktivity a ve všech tkáních bylo vždy devět indukovaných a dvanáct inhibovaných aktivit biomarkerů. Jelikož nelze jednoznačně vyhodnotit, zda má indukce a inhibice aktivity biomarkerů pozitivní či negativní vliv, byly hodnoty sjednoceny pomocí nástroje IBRv2 vyjadřujícího standardizovanou odchylku biomarkeru od kontroly. IBRv2 je nestatistická metoda, která integruje odpovědi biomarkerů s různými řády a jednotkami hodnot, a tím usnadňuje interpretaci výsledků. Největší posun od kontroly způsobený oxidativním stresem byl pomocí IBRv2 detekován ve svalech, což může znamenat, že svaly jsou více citlivé k oxidativnímu stresu než ostatní testované tkáně.

Druhý experiment (kap. 4.2) sledoval absorpci a eliminaci DFH z hemolymfy raka signálního v jednotlivých časových bodech s prodlouženou dobou expozice léčiva na sedm dní. Data, která byla získána ve dvou fázích tohoto experimentu, budou sloužit jako metodický podklad pro další výzkum sorpce a chování tohoto léčiva u bezobratlých vodních organismů a výpočtu příslušných bioakumulačních parametrů.

Na použité množství vody (60 l) nebyly naměřeny nadlimitní koncentrace amoniaku sledovaného za 24 h po výměně vody. Všechny koncentrace amoniaku

v průběhu experimentu byly pod limitem toxicity pro raky. Toxicita amoniaku závisí na teplotě a pH vody a např. pro raka pruhovaného (*Orconectes limosus*) byla zjištěna v rozmezí 15 – 23 mg·l⁻¹ NH₃ (Velíšek a kol., 2018). Vzhledem k tomu, že podmínky experimentu pro limit toxicity amoniaku byly splněny, nebylo nutné jedince rozdělovat do mnoha akvárií jednotlivě po odběrových časech (Huff a kol., 2013).

5.2 Bioakumulační dynamika difenhydraminu

Vzhledem k výsledkům Experimentu 1 (kap. 4.1.1) bylo očekáváno, že naměřené hodnoty koncentrace DFH v hemolymfě budou o jeden řád nižší než odpovídající koncentrace DFH ve vodě, avšak tyto koncentrace se v hemolymfě naměřit nepodařilo (Experiment 2). Z tohoto důvodu byl experiment opakován a koncentrace DFH ve vodě byla o jeden řád zvýšena na 200 µg·l⁻¹. Ani s vyšší koncentrací DFH se nepodařilo detekovat očekávanou koncentraci. Dodatečně tedy byla změřena koncentrace DFH jen v několika vzorcích těl raků. Zjištěná koncentrace byla několikanásobně vyšší než koncentrace v hemolymfě.

Raci mají částečně otevřený oběhový systém s hemolymfou, kde představuje koagulační mechanismus jednu z imunitních odpovědí organismu. Při koagulaci hemolymfy je po aktivaci hemocytů uvolňována transglutamináza z buněk, která následně katalyzuje proces polymerizace plazmatického koagulačního proteinu do stabilní sraženiny. Proto je jedním z možných důvodů, proč se nepodařilo získat požadovaná data, přítomnost koagulačních proteinů v hemolymfě, které chemickou látku navazují, tvoří s ní konjugát a daná látka pak nemůže být v hemolymfě identifikována (Mengal a kol., 2023).

Použitá metoda a proces zpracování hemolymfy nebyl optimalizovaný, a tak mohlo docházet k přeměnám léčiva na metabolity, jejichž přítomnost nebyla při analýze hemolymfy zjištěna. Dalším z důvodů ovlivnění výsledných koncentrací DFH by mohl být přídavek heparinu ke vzorkům hemolymfy. Heparin je antikoagulant krevních proteinů používaný u vzorků obratlovců. Heparin byl tedy také dodatečně metodicky testován, avšak nebyl zjištěn žádný významný vliv na koncentraci DFH v hemolymfě.

Dalším důležitým faktorem pro vstřebávání látek do těl organismů je pH. Z výsledků těchto experimentů je viditelný rozdíl mezi absorpcí léčiva při různých hodnotách pH. Dle výše předložených výsledků se DFH více absorbuje při vyšší

hodnotě pH (8,7), než při hodnotě nižší (pH 6,7). K tomuto dochází pravděpodobně proto, že DFH je slabá zásada s $pK_a=8,9$, vyšší testovaná hodnota pH se tedy více blíží hodnotě disociační konstanty DFH. Berninger a kol. (2011) zjistili větší toxicitu DFH pro *D. magna* při hodnotách pH, které odpovídaly blíže hodnotám pK_a pro DFH.

Znalosti spojené s bioakumulací látek do těl organismů jsou z hlediska rozdílných faktorů prostředí velice důležité. Vody mají rozdílné hodnoty pH, což, jak bylo zjištěno, ovlivňuje vstřebávání látek do organismů. Vypouštěním vod z čistíren odpadních vod a působením dalších antropogenních vlivů (např. splachy ze zemědělských ploch) je měněno pH vod, a tím ovlivněna schopnost látek absorbovat se do těl organismů.

6. Závěr

V předložené bakalářské práci byly vyhodnoceny účinky léčiva difenhydraminu na změny v obranných molekulárních mechanismech raka signálního. Nízká a střední testovaná koncentrace DFH vyvolaly v rámci akutního experimentu změny aktivit pouze u některých biomarkerů oxidativního stresu (např. GST, GR), a to hlavně v hepatopankreatu a ve svalech. Vysoká koncentrace DFH ovlivnila většinu testovaných biomarkerů alespoň v jedné z tkání. Aktivity AChE a GPx nebyly průkazně ovlivněny žádnou z koncentrací, v žádné z testovaných tkání. Pomocí IBRv2 bylo zjištěno, že největší změny působí léčivo ve svalech při všech třech testovaných koncentracích, nejmenší pak v žábách.

Koncentrace absorbovaného léčiva naměřené v hemolymfě raků byly nižší, než bylo předpokládáno. Mezi koncentrací DFH v hemolymfě a velikostí těla raka nebyla zjištěna lineární závislost. Protože se jedná o slabě zásadité léčivo, byla při pH 8,7 roztoku léčiva, kterému byli raci exponováni, prokázána vyšší absorpce léčiva do hemolymfy, než při pH 6,7.

Tato studie prokázala, že difenhydramin způsobil u raka signální změny v molekulárních obranných mechanismech již při environmentálních koncentracích, ale nebyl pro raky akutně neurotoxický. Léčivo při testovaných koncentracích vyvolalo různou míru oxidativního stresu v hepatopankreatu, žábách a svalech. Absorpce DFH do hemolymfy raka nezávisela na velikosti jeho těla, ale spíše na pH prostředí. Výsledky této práce doplňují omezené znalosti o vlivu difenhydraminu na velké vodní bezobratlé. Získaná data budou dále sloužit jako metodický podklad pro další výzkum rychlosti absorpce, eliminace a dalších parametrů bioakumulační kinetiky farmaceuticky aktivních látek u sladkovodních korýšů.

7. Seznam použité literatury

- Armitage, J. M., Erickson, R. J., Luckenbach, T., Ng, C. A., Prosser, R. S., Arnot, J. A., Schirmer, K., Nichols, J. W., 2017. Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: Current knowledge and research priorities. *Environmental toxicology and chemistry*. 36(4), 882 – 897.
- Arnott, J. A., Planey, S. L., 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*. 7(10), 863 – 875.
- Berninger, J. P., Du, B., Connors, K. A., Eytcheson, S. A., Kolkmeier, M. A., Prosser, K. N., Valenti, T. W., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., 2011. Effects of the antihistamine diphenhydramine on selected aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(9). 2065 – 2072.
- Borgå, K., Kidd, K. A., Muir, D. C., Berglund, O., Conder, J. M., Gobas, F. A., Kucklick, J., Malm, O., Powell, D. E., 2012. Trophic magnification factors: considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integrated environmental assessment and management*. 8(1), 64 – 84.
- Boxall, A. B., 2004. The environmental side effects of medication: How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *EMBO reports*. 5(12), 1110 – 1116.
- Boxall, A. B., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, a kol., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environmental health perspectives*. 120(9), 1221 – 1229.
- Burton, G. J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 25(3), 287 – 299.
- Buřič, M., Kouba, A., Machová, J., Mahovská, I., Kozák, P., 2013. Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 10, 607 – 610.
- Cappello, T., Brandão, F., Guilherme, S., Santos, M. A., Maisano, M., Mauceri, A., Canário, J., Pacheco, M., Pereira, P., 2016. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining ¹H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. *Science of the Total Environment*. 548, 13 – 24.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry*. 250(14), 5475 – 5480.

- Carter, L. J., Armitage, J. M., Brooks, B. W., Nichols, J. W., Trapp, S., 2022. Predicting the Accumulation of Ionizable Pharmaceuticals and Personal Care Products in Aquatic and Terrestrial Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1 – 7.
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and physics of lipids*. 157(1), 1 – 11.
- Claiborne, A., 1985. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Catalase Activity. CRC Press, Boca Raton. 283 – 284.
- Cribb, A. E., Leeder, J. S., Spielberg, S. P., 1989. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*. 183(1), 195 – 196.
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging contaminants*. 3(1), 1 – 16.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 7(2), 88 – 95.
- Ewing, J. F., Janero, D. R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical biochemistry*. 232(2), 243 – 248.
- Fedorova, G., Grabic, R., Grabicová, K., Turek, J., Van Nguyen, T., Randák, T., Brooks, B. W., Žlábek, V., 2022. Water reuse for aquaculture: Comparative removal efficacy and aquatic hazard reduction of pharmaceuticals by a pond treatment system during a one year study. *Journal of Hazardous Materials*. 421, 126712.
- Ferrer, I., Heine, C. E., Thurman, E. M., 2004. Combination of LC/TOF-MS and LC/ion trap MS/MS for the identification of diphenhydramine in sediment samples. *Analytical chemistry*. 76(5), 1437 – 1444.
- Gao, X., Liu, X., Song, X., Teng, P., Ji, H., Peng, L., Qiu, Y., Guo, D., Jiang, S., 2021. Effect of maduramicin on crayfish (*Procambarus clarkii*): Hematological parameters, oxidative stress, histopathological changes and stress response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 211, 111896.
- Giebułtowicz, J., Nałęcz-Jawecki, G., 2014. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104, 103 – 109.
- Grabicová, K., Staňová, A. V., Učun, O. K., Bořík, A., Randák, T., Grabic, R., 2018. Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples. *Analytica chimica acta*. 1022, 53 – 60.

- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., Soared, A. M., 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. Chemosphere. 32(4), 727 – 738.
- Guner, U., 2007. Freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) accumulates and depurates copper. Environmental monitoring and assessment. 133, 365 – 369.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., Selbach, O., 2008. Histamine in the nervous system. Physiological reviews. 1183 – 1241.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of biological Chemistry. 249(22), 7130 – 7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA, s. 20 – 23.
- Hlávková, M., 2018. Hodnocení subchronického působení atrazinu na raka (*Cherax destructor*). (diplomová práce), 89 s.
- Howcroft, C. F., Amorim, M. J. B., Gravato, C., Guilhermino, L., Soares, A. M. V. M., 2009. Effects of natural and chemical stressors on *Enchytraeus albidus*: can oxidative stress parameters be used as fast screening tools for the assessment of different stress impacts in soils? Environment International. 35(2), 318 – 324.
- Huff, L., Delos, C., Gallagher, K., Beaman, J., 2013. Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia-freshwater. Washington DC: US Environmental Protection Agency, 242 s.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 61, 192 – 208.
- Jebali, J., Khedher, S. B., Sabbagh, M., Kamel, N., Banni, M., Boussetta, H., 2013. Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. Revista de Gestão Costeira Integrada-Journal of Integrated Coastal Zone Management. 13(4), 525 – 537.
- Karthikeyan, J., Rani, P., 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in selected Piper species. 135 – 40.
- Koubová, A., Van Nguyen, T., Grabicová, K., Burkina, V., Aydin, F. G., Grabic, R., Nováková, P., Švecová, H., Lepič, P., Fedorova, G., Randák, T., Žlábek, V., 2022. Metabolome adaptation and oxidative stress response of common carp (*Cyprinus carpio*) to altered water pollution levels. Environmental Pollution. 303, 119117.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková-Balcarová, E., Polícar, T., 2013. Biologie a chov raků. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, s. 103 – 106.

- Kristofco, L. A., Brooks, B. W., 2017. Global scanning of antihistamines in the environment: Analysis of occurrence and hazards in aquatic systems. *Science of the Total Environment*. 592, 477 – 487.
- Livingstone, D. R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 120(1), 43 – 49.
- Lockridge, O.; Quinn, D. M.; Radić, Z., 2018. Esterases. In: *Biotransformation*. Elsevier Inc., s. 277 – 307.
- Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R. H., Schwesig, D., Gawlik, B. M., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water research*. 47(17), 6475 – 6487.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*. 101(1), 13 – 30.
- Mengal, K., Kor, G., Kouba, A., Kozák, P., Niksirat, H., 2023. Hemocyte coagulation and phagocytic behavior in early stages of injury in crayfish (Arthropoda: Decapoda) affect their morphology. *Developmental & Comparative Immunology*. 141, 104618.
- Mohandas, J., Marshall, J. J., Duggin, G. G., Horvath, J. S., Tiller, D. J., 1984. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer research*. 44(11), 5086 – 5091.
- Moszczynska, A., Callan, S. P., 2017. Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: implications for treatment. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 362(3), 474 – 488.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 95(2), 351 – 358.
- Orel, M., 2015. Nervové buňky a jejich svět: jak přesvědčivě, srozumitelně a působivě prezentovat. Grada Publishing as., s. 73 – 74.
- Potter, J., 2012. Assessment of the Toxicologic Interaction of Diphenhydramine and Diazinon in the Invertebrate *Daphnia magna*. (doktorská dizertační práce), 37 s.
- Racek, J., Holeček, V., 1999. Enzymes and free radicals. *Chemické listy*. 93(12), 774 – 780.
- Ramirez, A. J., Mottaleb, M. A., Brooks, B. W., Chambliss, C. K., 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 79(8), 3155 – 3163.

- Reiber, C. L., 1992. The hemodynamics of the crustacean open circulatory system: Hemolymph flow in the crayfish (*Procambarus clarkii*) and the lobster (*Homarus americanus*). University of Massachusetts Amherst. 449 – 467.
- Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., Symons, M. C., 1991. Techniques in free radical research. Elsevier, 291 s.
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. Chemosphere. 93(7), 1268 – 1287.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L., 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen, London, 238 s.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. Environmental Science and Pollution Research. 20, 2721 – 2725.
- Simons, F. E. R., Simons, K. J., 2011. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 128(6), 1139 – 1150.
- Solé, M., Shaw, J. P., Frickers, P. E., Readman, J. W., Hutchinson, T. H., 2010. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. Analytical and bioanalytical chemistry. 396, 649 – 656.
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., Reissman, D. B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. Science of the total environment. 329(1-3), 99 – 113.
- Stará, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buřič, M., Faggio, C., Kouba, A., Velíšek, J., 2019. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). Chemosphere. 224, 616 – 625.
- Storz, G., Imlay, J. A., 1999. Oxidative stress. Current opinion in microbiology. 2(2), 188 – 194.
- SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv), 2023. [online]. [cit. 24-3-2023]. Dostupné na WWW: <<https://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-latky> >
- Sun, Q., Li, M., Ma, C., Chen, X., Xie, X., Yu, C. P., 2016. Seasonal and spatial variations of PPCP occurrence, removal and mass loading in three wastewater treatment plants located in different urbanization areas in Xiamen, China. Environmental Pollution. 208, 371 – 381.
- Svobodová, Z., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Praha: Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR, 231 s.

- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková-Balcarová, E., 2009. Raci v České republice: [metodika AOPK ČR]. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, s. 71 – 81.
- Ternes, T. A., Joss, A., Siegrist, H., 2004. Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental science & technology*. 38(20), 392A – 399A.
- Topp, E., Sumarah, M. W., Sabourin, L., 2012. The antihistamine diphenhydramine is extremely persistent in agricultural soil. *Science of the total environment*. 439, 136 – 140.
- Trombini, C., Kazakova, J., Montilla-López, A., Fernández-Cisnal, R., Hampel, M., Fernández-Torres, R., Bello-Lopez, M. A., Abril, N., Blasco, J., 2021. Assessment of pharmaceutical mixture (ibuprofen, ciprofloxacin and flumequine) effects to the crayfish *Procambarus clarkii*: A multilevel analysis (biochemical, transcriptional and proteomic approaches). *Environmental Research*. 200, 111396.
- Valenti Jr, T. W., Perez-Hurtado, P., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., 2009. Aquatic toxicity of sertraline to *Pimephales promelas* at environmentally relevant surface water pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(12), 2685 – 2694.
- Valentová, O., Máchová, J., Kocour Kroupová, H., 2013. *Základy hydrochemie: návody pro laboratorní cvičení*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, s. 41 – 44; 73 – 74.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*. 13(2), 57 – 149.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., a kol., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 658 s.
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Costanzo, S. D., 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water research*. 41(18), 4164 – 4176.
- Wolfson, A. R., Wong, D., Abrams, E. M., Waserman, S., Sussman, G. L., 2022. Diphenhydramine: time to move on? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 10(12), 3124 – 3130.
- Xie, Z., Lu, G., Hou, K., Qin, D., Yan, Z., Chen, W., 2016. Bioconcentration, metabolism and effects of diphenhydramine on behavioral and biochemical markers in crucian carp (*Carassius auratus*). *Science of the Total Environment*. 544, 400 – 409.
- Zhang, Y., Li, Z., Kholodkevich, S., Sharov, A., Feng, Y., Ren, N., Sun, K., 2019. Cadmium-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the hepatopancreas of

freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). Science of the Total Environment. 666, 944 – 955.

8. Seznam zkratek

ADMET	– Adsorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxicita
AChE	– Acetylcholinesteráza
A _i	– Index odchylky biomarkeru
BAF	– Bioakumulační faktor
BCF	– Biokoncentrační faktor
BChE	– Butyrylcholinesteráza
BMF	– Biomagnifikační faktor
CAT	– Kataláza
CDNB	– 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
DFH	– Difenhydramin
DNA	– Deoxyribonukleová kyselina
DTNB	– Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
EDTA	– Kyselina ethylendiamintetraoctová
GPx	– Glutathion peroxidáza
GR	– Glutathion reduktáza
GST	– Glutathion-S-transferáza
H	– Vysoká koncentrace difenhydraminu (200 µg·l ⁻¹)
IBRv2	– Integrovaná odezva biomarkeru verze 2
K	– Kontrola bez přídatku difenhydraminu
L	– Nízká koncentrace difenhydraminu (2 µg·l ⁻¹)
LC	– Kapalinová chromatografie
LECHB	– Laboratoř environmentální chemie a biochemie
LOQ	– Limit kvantifikace
LPO	– Lipidní peroxidace
M	– Střední koncentrace difenhydraminu (20 µg·l ⁻¹)
N-(NH ₃ +NH ₄ ⁺)	– Celkový amoniakální dusík
NADH	– β-nikotinamid adenindinukleotid
NADPH	– β-nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	– Nitrotetrazolium blue chlorid
NH ₃	– Amoniak
N-NH ₄ ⁺	– Amoniakální dusík

NSAIDs	– Nesteroidní protizánětlivá léčiva
$\cdot\text{O}_2^-$	– Superoxidový anion
OECD	– Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
$\text{OH}\cdot$	– Hydroxylový radikál
PBS	– Fosfátový pufr
PhAC	– Farmaceuticky aktivní sloučeniny
PMS	– Postmitochondriální supernatant
PPCPs	– Léčiva a přípravky denní potřeby
Q	– Kvartál
ROS	– Reaktivní formy kyslíku
SOD	– Superoxid dismutáza
TBARS	– Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TMF	– Trofický magnifikační faktor
TRIS-HCl	– Tris hydrochloridový pufr
VÚRH	– Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

9. Abstrakt

Účinky léčiva difenhydraminu na molekulární obranné mechanismy u raka signálního v rámci bioakumulačního experimentu

Difenhydramin (DFH) je léčivo dlouhodobě používané po celém světě proti různým typům alergie. Rezidua DFH jsou často detekována v povrchových vodách, sedimentech i tkáních ryb. Působení xenobiotik, například reziduí léčiv, na vodní biotu může způsobit metabolické změny, ale i toxicitu v organismu. Cílem této práce bylo posoudit, zda má léčivo DFH vliv na molekulární obranné mechanismy raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) a v rámci bioakumulačního experimentu vyhodnotit absorpci a eliminaci léčiva v hemolymfě raka signálního. Raci byli exponováni nejprve třem různým koncentracím DFH (2, 20 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 96 hodin. Po ukončení experimentu byla změřena koncentrace DFH v hemolymfě a tkáň raků analyzovány. Ve druhém, desetidenním experimentu byla sledována pouze koncentrace DFH, a to absorpce a eliminace v čase při pH vody 6,7 a 8,7. Raci byli vystaveni po 168 hodin dvěma koncentracím DFH (20 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a po 72 hodin ponechání v čisté vodě bez přídavku DFH. Akutní změny aktivit biomarkerů oxidativního stresu a biomarkeru neurotoxicity byly pozorovány v hepatopankreatu, v žábřácích i ve svalech. Environmentální a středně zvýšená koncentrace DFH způsobila nerovnováhu pouze v aktivitách enzymů spojených s metabolismem glutationu. Největší změny způsobené oxidativním stresem byly detekovány při subletální koncentraci ve svalech. Léčivo u raka signálního způsobilo změny v antioxidačních obranných mechanismech, ale akutní neurotoxicita nebyla prokázána. Výsledky desetidenního experimentu ukázaly, že při hodnotě pH blízké disociační konstantě pro DFH bylo absorbováno větší množství léčiva, naopak nebyla prokázána lineární závislost koncentrace DFH v hemolymfě na velikosti těla raka. Data, která byla získána v této práci, doplňují omezené znalosti o vlivu difenhydraminu na vodní bezobratlé. Výsledky budou dále sloužit jako metodický podklad pro další výzkum rychlosti absorpce, eliminace a dalších parametrů bioakumulační kinetiky farmaceuticky aktivních látek u sladkovodních koryšů.

Klíčová slova: difenhydramin, rak signální, biomarkery oxidativního stresu, biomarkery neurotoxicity, bioakumulace

10. Abstract

Effects of diphenhydramine on molecular defense mechanisms in signal crayfish within a bioaccumulation experiment

Diphenhydramine (DFH) is a medication widely used around the world to treat various types of allergies. Residues of DFH are often detected in surface waters, sediments, and fish tissues. The impact of xenobiotics, such as pharmaceutical residues, on aquatic biota can cause metabolic changes and toxicity in organisms. This study aimed to assess whether DFH affects the molecular defense mechanisms of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and evaluate the absorption and elimination of the drug in the hemolymph of signal crayfish within a bioaccumulation experiment. Crayfish were exposed to three different concentrations of DFH (2, 20, and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) for 96 hours. After the experiment, the concentration of DFH in the hemolymph was measured, and crayfish tissue was analyzed. In a second, ten-day experiment, only the concentration of DFH was monitored for absorption and elimination over time at pH values of 6.7 and 8.7. Crayfish were exposed to two concentrations of DFH (20 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) for 168 hours and then kept in clean water without DFH for 72 hours. Acute changes in oxidative stress biomarker activity and neurotoxicity biomarkers were observed in the hepatopancreas, gills, and muscles. Environmental and moderately increased concentrations of DFH caused an imbalance only in the activities of enzymes associated with glutathione metabolism. The most significant changes caused by oxidative stress were detected at sublethal concentrations in the muscles. The medication caused changes in the antioxidant defense mechanisms of signal crayfish, but acute neurotoxicity was not detected. The results of the ten-day experiment showed that a greater amount of the pharmaceutical was absorbed at pH close to the dissociation constant of DFH, but no linear dependence of the concentration of DFH in the hemolymph on the size of the crayfish was detected. The data obtained in this study complement the limited knowledge about the effect of DFH on aquatic invertebrates. The results will serve as a methodological basis for further research on the rates of absorption, elimination, and other parameters of bioaccumulation kinetics of pharmaceutically active substances in freshwater crustaceans.

Keywords: diphenhydramine, signal crayfish, oxidative stress biomarkers, neurotoxicity biomarkers, bioaccumulation