

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybnářství a ochrany vod

Diplomová práce

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybnářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Vliv environmentálních koncentrací léčiva dexametazon na ryby

Diplomová práce

Autor: Bc. Adam Bořík

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

Konzultant diplomové práce: MSc. Viktoriina Burkina, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2015

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

Datum

Podpis studenta

Rád bych touto cestou vyjádřil své díky všem zaměstnancům laboratoře environmentální chemie VÚRH ve Vodňanech, kteří se jakoukoliv měrou podíleli na tomto projektu. Mé díky pak patří především vedoucímu práce doc. Ing. Vladimíru Žlábkovi, Ph.D., kterého předchozí spolupráce při tvorbě bakalářské práce neodradila a byl mi inspirací a oporou i při realizaci práce diplomové. Velmi děkuji svému konzultantovi Viktorii Burkině, Ph.D. a Sidice Sakalli, MSc., za vedení a pomoc při realizaci praktické části a také za přátelské přijetí, jehož se mi dostalo.

Závěrem chci poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě v průběhu studia vždy podporovali.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení **Adam Bořík**
studenta:

Studijní program: B4103 Zootechnika (bakaláři) / N4103 Zootechnika (navazující magistři)

Studijní obor: Rybnářství

Název tématu: Vliv environmentálních koncentrací léčiva dexamethasonu na ryby.

Zásady pro vypracování:

(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

O výskytu farmak v životním prostředí a o jejich vlivu na organismy existuje v současné době málo informací. Řada těchto sloučenin není účinně eliminována v čistírenských procesech. Cílem projektu je zjistit vliv široce užívaného humánního farmaka „dexamethasonu“ na necílový organismus pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Léčivo dexamethason patřící do skupiny glukokortikoidů je především používáno při léčbě zánětlivých procesů. Léčivo vyloučené pacienty se dostává do povrchových vod odpadními vodami. Vliv dexamethasonu na ryby bude zjišťován pomocí akvarijních (*in vivo*) testů při použití environmentálně relevantních koncentrací. Následně budou sledovány vybrané biomarkery v jaterní tkáni exponovaných ryb. Realizací diplomové práce budou získány informace týkající se potenciální nebezpečnosti reziduí dexamethasonu ve vodním prostředí, což umožní přesnější interpretaci výsledků environmentálního chemického monitoringu.

Rozsah grafických prací: 5-10 tabulek

5-10 grafů

Rozsah průvodní zprávy: 30-50 stran

Seznam odborné literatury:

Bolis, C. L., Piccolella, M., Dalla Valle, A. Z., and Rankin, J. C. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research* 44, 265-280.

Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

- Burkina, V., Zamaratskaia, G., Randák, T., Li, Z.H., Fedorova, G., Pickova, J., Žlábek, V., 2012. Verapamil does not modify catalytic activity of CYP450 in rainbow trout after long-term exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 148–152.
- Burkina, V., Žlábek, V., Zamaratskaia, G., 2013. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere* 92: 1099–1104.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., and Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1192, 206-215.
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 287-304.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008. Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42 (15), 5807–5813.
- Huggett, D. B., Cook, J. C., Ericson, J. F., and Williams, R. T. (2003). A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 1789-1799.
- Li, Z.H., Žlábek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolařová, J., Li, P., Randák, T., 2013. Multiple Biomarkers Responses in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, After Acute Exposure to a Fungicide Propiconazole. *Environmental Toxicology* 28 (3): 119–26.
- Ringel M, Oesch F, Gerl M, Klebach M, Quint M, Bader A, Bottger T and Hengstler JG (2002) Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica* 32(8):653-666
- Široka, Z., Drastichová, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination-cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet. Brno* 73, 123-132.
- Smith EM and Wilson JY (2010) Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 alpha-carbonitrile, rifampicin, and beta-naphthoflavone. *Aquat Toxicol* 97(4):324-333

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

Konzultant: MSc. Viktoriia Burkina

Datum zadání diplomové práce: 2.ledna.2014

Termín odevzdání diplomové práce:

L.S.

doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
Ředitel ústavu

prof. Ing. Linhart Otomar, DrSc.
Děkan

Ve Vodňanech dne

Obsah

1.	Úvod	10
2.	Léčiva - polutanty vodního prostředí	12
3.	Dexametazon	15
3.1.	Funkce glukokortikoidů a farmakologické využití	15
3.2.	Farmakokinetika dexametazonu	16
3.3.	Výskyt ve vodním prostředí	17
3.3.1.	Analytické metody	17
3.3.2.	Výskyt glukokortikoidů v povrchových vodách	18
3.4.	Vliv dexametazonu na vodní biotu	20
4.	Oxidativní stres	23
4.1.	Iniciátory oxidativního stresu	24
4.2.	Geneze ROS	25
4.2.1.	Fyziologická geneze ROS	25
4.2.2.	Vliv farmak na produkci ROS	28
4.3.	Antioxidační obrana organismu	29
4.4.	Negativní účinky ROS na buněčné makromolekuly	32
4.4.1.	Poškození DNA	32
4.4.2.	Peroxidace lipidů	32
4.4.3.	Oxidativní poškození proteinů	33
4.5.	Reparační mechanismy	33
5.	Biomarkery	35
5.1.	Kategorie biomarkerů	36
5.2.	Biomarkery oxidativního stresu	37

5.3. Vztah procesu posouzení environmentálních rizik a biomarkerů oxidativního stresu	38
6. Legislativní normy	40
7. Materiál a metodika	41
7.1. Chemikálie a činidla.....	41
7.2. Pokusný materiál a experimentální podmínky	41
7.3. Biochemické testy	43
7.3.1. Příprava Post-mitochondriálního supernatantu (PMS)	43
7.3.1. Superoxid dismutáza	43
7.3.2. Kataláza	44
7.3.3. Glutathion peroxidáza.....	44
7.3.4. Glutathion reduktáza	44
7.3.5. Glutathion S-transferáza	45
7.3.6. Úroveň peroxidace lipidů	45
7.4. Statistická analýza	45
8. Výsledky	47
8.1. Superoxid dismutáza (SOD).....	47
8.2. Cataláza (CAT)	47
8.3. Glutathionperoxidáza (GPx)	48
8.4. Glutathionreduktáza (GR)	49
8.5. Glutathion S-transferáza (GST)	49
8.6. Reakce kyseliny thiobarbiturové (TBARS)	50
9. Diskuze	51
10. Závěrečné shrnutí.....	55
Použitá literatura.....	56
Seznam příloh.....	64

Fotografické přílohy	66
Abstrakt	71

1. Úvod

„Nemáme žádné důkazy, že tyto látky jsou při těchto koncentracích škodlivé, ale také nemáme žádné, které by dokazovaly, že nejsou.“

-Michael D. Lemonick-

Citát, kterým jsem se rozhodl uvést svou diplomovou práci, pochází z magazínu Time, kde byl publikován v polovině roku 2003 v článku pod názvem „*In Our Streams: Prozac and Pesticides*“. Tématem, jak ostatně sám název odkrývá je antropogenní znečištění vod farmaceutickými přípravky a pesticidy. Ačkoliv od doby, kdy zmíněný citát opustil pero svého autora, uplynulo více než deset let, lze ho stále považovat za aktuální.

Zhruba od druhé poloviny 20. století můžeme pozorovat značný nárůst produkce a využití farmaceutických prostředků. Každý rok jsou do distribuce dodány nové bioaktivní látky, jejichž osud po terapeutické aplikaci často končí v čistírnách odpadních vod. Budování a užívání těchto objektů výborně přispívá ke zlepšení stavu povrchových vod eliminací organického znečištění, avšak na odstranění reziduí farmak často technologicky nedostačují. Výsledkem je zatěžování vodního ekosystému farmaceutickými polutanty, které mohou mít i ve stopových koncentracích negativní vliv na přírodní společenstva a o jejich celkovém dopadu máme přes veškerou vynaloženou energii zatím umírněně řečeno neúplné informace. Dlužno dodat, že značná průmyslová produkce farmak a technologické nedostatky čistíren odpadních vod nejsou jedinými aspekty, vedoucími k zátěži vodních toků a časté nezodpovědné nadužívání i zneužívání léčiv humánní i veterinární medicínou problém dále prohlubuje.

Cílem této diplomové práce je posouzení rizika environmentálně relevantních koncentrací syntetického glukokortikoidu dexametazon prostřednictvím chronického *in vivo* testu. Vyhodnocení potencionálního negativního efektu bude realizováno sledováním biochemických změn v modelovém organismu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), které nám pomáhají odhalit prvotní negativní efekt cizorodých látek na molekulární úrovni. Prostřednictvím vybraných biomarkerů bude hodnocena

úroveň oxidativního stresu indukovaná sledovanou látkou a tím i odhadnuto
potencionální ohrožení necílových organismů.

2. Léčiva - polutanty vodního prostředí

Polutanty představují všechny látky antropogenního původu kontaminující a poškozující přírodní prostředí. Mezi polutanty vodního ekosystému řadíme také léčiva, která jsou produkty farmaceutického průmyslu (s výjimkou „alternativních“ prostředků, které nejsou předmětem této práce), jejichž účelem je prevence, léčba nebo zmírňování příznaků chorob. Tyto látky jsou řazeny do souhrnné skupiny farmaceutických přípravků a produktů osobní péče (Pharmaceuticals and Personal Care Products- PPCPs). Rozmach průmyslové výroby účinných látek léčiv nastal po 2. světové válce ve spojení s průmyslovou revolucí a tato expanze trvá dodnes (Kotyza et al., 2009). Fent et al. ve své studii publikované v roce 2006 uvádí, že množství individuálních léčivých látek používaných v humánní medicíně se pohybuje kolem 3000 a každý rok jsou schvalovány a distribuovány nové. Narůstající tendenci ve spotřebě dokládá porovnání vybraných skupin léčiv mezi roky 2000 a 2010 v knize *Health at a Glance: Europe* (Lafortune et Balestat, 2012). Podle této publikace stoupla například spotřeba antidiabetických přípravků na území státu EU v uvedeném období průměrně o 75% u antidepresiv byl zaznamenán nárůst dokonce 80%.

Terapeutické, či preventivní účinky farmak jsou využívány jak humánní, tak i veterinární medicínou, kdy po jejich aplikaci dochází k vylučování organismem v nezměněné, nebo často také metabolizované podobě. V organismu je léčivo stejně jako nepolární xenobiotika transformováno v průběhu dvou detoxikačních fází. První fáze spočívá v inkorporaci polární skupiny do molekuly xenobiotika, čímž vniká polárnější sloučenina. Během druhé (konjugační) fáze meziproduct první fáze interaguje s konjugačním činidlem za vzniku silně polární látky, která není schopna reabsorpce a je vyloučena z organismu (Kotlářová et Skála, 2011).

Existuje široké spektrum zdrojů, které kontaminují povrchové vody léčivy respektive jejich bioaktivními látkami. Veterinární léčiva mohou být uvolňována do životního prostředí únikem ze skladovacích kapacit, nebo živočišných odpadů, případně i hnojením (Koplin et al., 2002). Logicky největším zdrojem jsou čistírny odpadních vod (ČOV). Pacienti vylučují tyto látky a spolu s ostatními odpadními produkty metabolismu jsou odvedeny do ČOV, kde však nedochází k efektivnímu odbourávání celého spektra farmak. Důvodem je především fakt, že tyto objekty nebyly primárně koncipované

k odstraňování farmak z odpadních vod a běžně používané procesy jako je koagulace, flokulace a mikrobiální degradace nejsou schopny zaručit dostatečnou eliminaci všech farmaceutických polutantů (Kotyza et al., 2009). Expozice mikroorganismů mineralizujících organické látky během procesu čištění konkrétním léčivům může probíhat již řadu let po bezpočet generací těchto organismů, avšak koncentrace těchto polutantů se může nacházet pod hranicí, kdy by mohla být vytvořena afinita vůči enzymatickému systému těchto destruentů. Také distribuce stále nových typů léčiv, které vždy znamenají novou výzvu pro asimilační a tím i biodegradační procesy aktivního kalu ČOV, znesnadňují adaptaci enzymatických pochodů mikroorganismů (Daughton et Ternes, 1999).

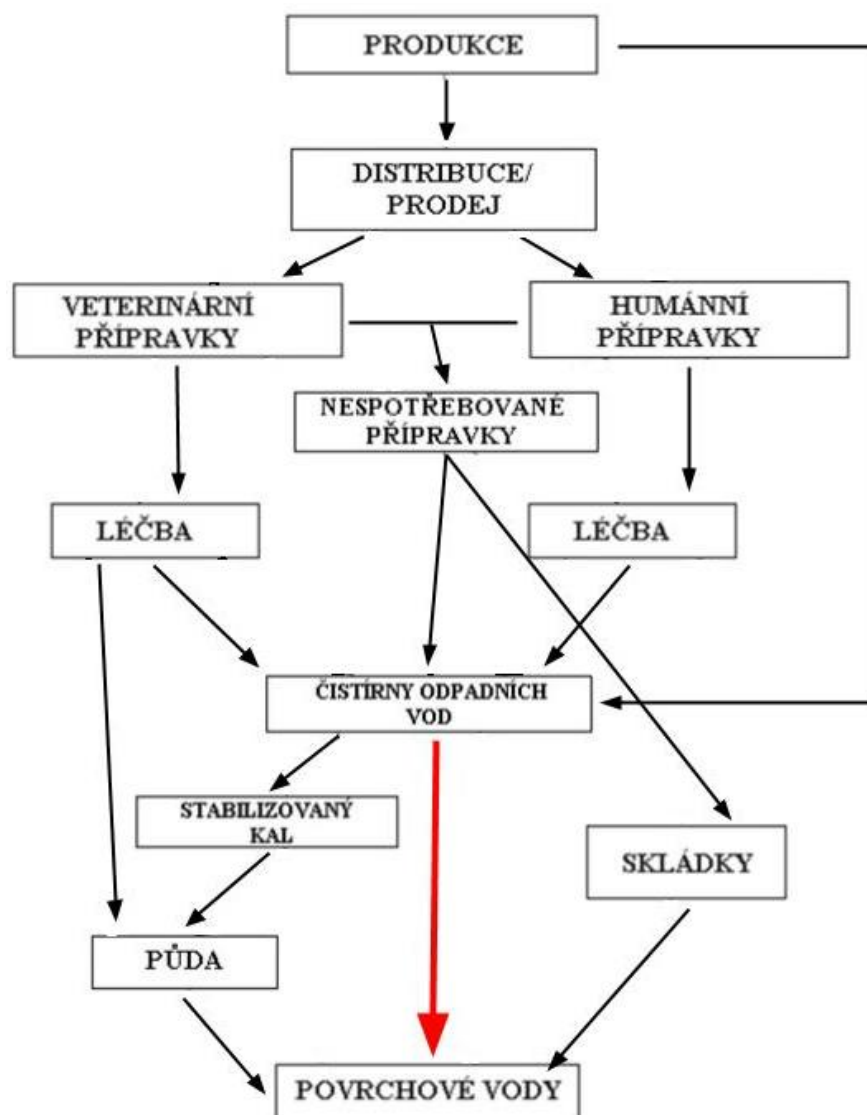
Účinnost mikrobiální degradace a adsorpce na fázi aktivního kalu vykazuje u jednotlivých léčiv velkou diverzitu. Jako příklad lze uvést porovnání ibuprofenu a karbamazepinu, kdy ibuprofen vykazuje za stejných podmínek 90% eliminaci, kdežto karbamazepin jen 7% (Ternes, 1998).

Biodegradace reziduí léčiv je enzymatický proces ovlivňovaný teplotou, z čehož lze odvodit nekonzistentní účinnost eliminace cizorodých látek za různých klimatických podmínek, která je dále ovlivňována dalšími vnějšími faktory, jako je distribuce srážek, uspořádání technologických procesů čištění (Šídlová et al., 2011) a také oxidačně redukčními podmínkami, pH, dobou zdržení nebo stářím kalu v aktivaci (Kotyza et al., 2009). Snaha o komplexní eliminaci farmak během čistírenského procesu odpadních vod vede k testování nových metod. Adsorpce aktivním uhlím se osvědčila jako vhodný prostředek pro eliminaci polutantů. Jiným efektivním procesem je využití membránových technologií jakými jsou reverzní osmóza a nanofiltrace. Největší překážkou pro využití těchto metod je poměrně vysoká cena, která se u sorpce aktivním uhlím pohybuje kolem 1 Eura·m⁻³.

Hlavní cesty samovolné degradace léčiv v povrchových vodách představují přímá fotolýza a radikálový rozpad, jenž lze shrnout pod pojmem fotodegradace. Průběh radikálového rozpadu je iniciován silnými oxidačními činidly, mezi které náleží atomární kyslík, hydroxyl a alkylperoxy. Naproti tomu přímou fotolýzu způsobuje sluneční záření absorbované povrchem molekuly polutantu, což má za následek její rozpad (Kotyza et al., 2009). Celkový pohled na distribuci léčiv do povrchových vod znázorňuje obrázek 1.

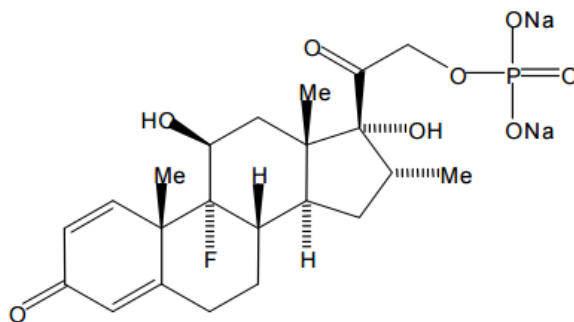
Koncentrace, ve kterých jsou stanoveny farmaceutické polutanty v povrchových vodách, se pohybují v řádech $\text{ng-}\mu\text{g l}^{-1}$, kdy výjimku tvoří zpravidla pouze lokality s průmyslovými zdroji znečištění (Larsson et al., 2007). Ačkoliv mnohé studie potvrdily jejich škodlivost pro vodní organismy i v reziduálních koncentracích (Thorpe et al., 2003) není možné je efektivně regulovat. Producenty totiž nejsou zpravidla jen průmyslové objekty, kterým lze stanovit emisní limity, ale z velké části jednotlivci z běžné populace (Fuksa, 2012).

Polutanty ve vodním prostředí tvoří homogenní směs současně působících látek. Důsledkem tohoto jevu nazývaného „koktejl efekt“ jsou farmakodynamické interakce, kdy může být pozorován synergický, či antagonický účinek polutantů (Celander, 2011).



Obrázek. 1 Schéma distribuce léčiv do vodního prostředí. Upraveno podle Kotyza et al. (2009).

3. Dexametazon



Obrázek. 2 Strukturální vzorec dexametazonu. Převzato z Medsafe (2011).

Dexametazon, který je také znám například pod výrobními názvy Decadron, Dexason, Maxidex nebo Hexadrol, je za běžných podmínek bílá krystalická látka, která je silně hygroskopická, hydrosolubilní s mírnou rozpustností v alkoholu. Systematicky tento syntetický analog náleží do skupiny steroidních hormonů s glukokortikoidovou aktivitou (Medsafe, 2011; Myeloma, 2014).

3.1. Funkce glukokortikoidů a farmakologické využití

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony, jejichž syntéza v kůře nadledvin podléhá řízení adenohipofýzou, konkrétně adrenokortikotropním hormonem, který je touto částí hypofýzy produkován. Prekurzorem kortikoidů je cholesterol, jenž je následně enzymaticky přeměněn na pregnenolon a dále například na kortisol, nejběžnějšího zástupce glukokortikoidů.

V organismu jsou glukokortikoidy standardně produkovány a tvoří vazbu s glukokortikoidními receptory vyskytujícími se v širokém spektru tkání. Po navázání hormonu na cytoplasmatický receptor následuje proces dimerizace a přechod komplexu do jádra buňky, kde působí iniciaci, nebo terminaci transkripce v závislosti na typu tkáně. Zvýšení produkce je realizováno jako odpověď na stresové faktory, kterým je organismus vystaven (Proteau, 2010).

Ovlivnění metabolismu je realizováno v mnoha rozličných směrech. Jedním z významných účinků je podpora metabolismu sacharidů prostřednictvím glukoneogeneze. V důsledku účinku těchto hormonů dochází k nárůstu aktivity glukoneogenních enzymů a zvýšení katabolismu proteinů a tuků ve prospěch tvorby

glukózy. Zvyšováním úrovně plazmatické glukózy vede k vyšší rezistenci vůči stresovým faktorům. Další aspekt spočívá v ovlivnění imunitních reakcí. Pokles počtu periferních lymfocytů vede k imunosupresivním účinkům, které jsou nástrojem terapie autoimunitních chorob. Obdobného efektu je využíváno při léčbě zánětlivých onemocnění, kdy je zabráněno kumulaci neutrofilních granulocytů v místě zánětu a tím k inhibici zánětlivého projevu (Proteau, 2010).

Některé studie potvrzují účinek syntetických kortikoidů jakožto růstového promotoru v chovu jatečných zvířat. Výsledky Istasse et al. (1989) prokazatelně doložily vliv dexametazonu na snížení krmného koeficientu a zvýšení přírůstků u 14 měsíců starých býků. Využívání těchto látek je však v živočišné výrobě na území vyspělých zemí nelegální.

3.2. Farmakokinetika dexametazonu

Dexametazon je pro terapeutické použití distribuován v rozličných formách. Pro lokální aplikace je k dostání v podobě sprejů, nebo mastí. Další možnosti je per orální podávání v podobě tablet a intermuskulární či intravenózní injekce. Glukokortikoidová aktivita dexametazonu může být ve srovnání s hydrokortisonem 25 až 30 krát silnější (Medsafe, 2011). Hydrokortison je nejúčinnější hormon stejné skupiny, přirozeně produkováný kůrou nadledvin. Ve srovnání s kortizolem však dexametazon vykazuje jen nepatrnou mineralokortikoidní aktivitu neboli aktivitu metabolismu minerálů.

Nejvyšších dávek dexametazonu v krevní plazmě je dosaženo aplikací intravenózní, nebo intramuskulární cestou. Biologický poločas eliminace, který vystihuje hranici, kdy klesne koncentrace léčiva v krevní plazmě na 50% počáteční hodnoty, se v případě dexametazonu pohybuje kolem hranice 190 minut. Tento parametr je získáván na základě hodnot celkového odbourání a distribučního objemu. Syntetické analogy glukokortikoidů nepodléhají ve srovnání s kortizolem tak rychlé metabolizaci a jsou v menší míře vázány na plazmatické bílkoviny. Inaktivované metabolity a stejně tak menší množství nekonjugovaného dexametazonu vylučuje tělo prostřednictvím moči, kdy je v průběhu 24 hodin vyloučeno až 65% celkového množství léčiva (Medsafe, 2011). Nejvýznamnější podíl metabolizace je realizován v jaterní tkáni. První fáze metabolizace farmaceutických xenobiotik je uskutečněna enzymy cytochromálního

komplexu P450, kdy dochází ke zvýšení hydrofilicity. V případě dexametazonu se konkrétně jedná o metabolity 6 α -hydroxydexametazon a 6 β -hydroxydexametazon produkované reakcí s CYP3A4 a dále také hydroxy-9- α -fluoro-androsta a 11-dehydroxy-9 α -fluoro-androsta, jež jsou produkty reakce enzymu CYP17 (Tomlinson et al., 1997). 6 β -hydroxydexametazon byl prokázán jako majoritní metabolit dexametazonu v moči člověka, přičemž nezměněný medikament tvoří jen malý objem z celkového přijatého množství. Podobně nízký podíl připadá na produkty druhé fáze metabolismu xenobiotik, tvořené konjugáty kyseliny glukuronové (Minagawa et al., 1986). Objem celkové nekonjugované látky vyloučené organismem může být poměrně variabilní. Rozdíly způsobují nejen odlišná množství terapeutické dávky (například pro léčbu posttraumatických stavů je běžně použita jedna intravenózní dávka 2-6 mg.kg⁻¹), ale také individuální metabolizace v rámci jednotlivých pacientů, případně i kombinace dexametazonu s jinými léčivy. Studie publikovaná roku 1971 Haque et al. popisuje vliv difenylhydantoinu (léčivo spadající do skupiny antiepileptik) na exkreci dexametazonu, přičemž výsledky prokázaly zvýšení exkrece sledované nekonjugované látky na hodnotu mezi 7-31%.

3.3. Výskyt ve vodním prostředí

3.3.1. Analytické metody

Environmentální matrice povrchových vod je z hlediska nároků na analytické prostředky velmi problematická. Efektivní kvantifikace farmaceutických xenobiotik byla v minulých desetiletích v podstatě nerealizovatelný úkol z důvodu absence vhodných metod. Až současné chromatografické metody umožnily spolu s hmotnostní spektrometrií a metodami pro úpravu vzorků praktický monitoring léčiv v povrchových vodách a nejen v nich. Jednou z významných komplikací při analytickém stanovení farmak jsou reziduální koncentrace těchto kontaminantů pohybující se řádově jednotkách ng·l⁻¹ i nižších. Vzhledem k takto nízkým koncentracím i komplexnímu složení environmentálních vzorků je běžně aplikována technika extrakce na pevné fázi, která umožňuje tyto komplikace eliminovat. Princip této preparační a purifikační metody spočívá v průchodu vzorku přes pevnou fázi s afinitou k cílové skupině sloučenin, zatímco nežádoucí složky odchází pryč. Požadované sloučeniny jsou

následně vyextrahovány ze sorbentu vhodným rozpouštědlem (Kostopoulou et Nikolaou, 2008). Příkladem analytického stanovení glukokortikoidů včetně dexametazonu v povrchových vodách může být studie autorského kolektivu Tölgyesi et al. publikovaná roku 2010. Pro potřeby práce autoři použili kapalinovou chromatografii jakožto separační metodu jednotlivých složek a kvantifikace proběhla prostřednictvím tandemového hmotnostního spektrometru (LC-MS/MS) s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Mezi přednosti metody založené na kapalinové chromatografii v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií náleží možnost separace a detekce látek se stejnou molekulovou hmotností nebo také poskytnutí informací o struktuře analyzovaných sloučenin (Kostopoulou et Nikolaou, 2008). Uvedený příklad není jedinou možnou metodou, kterou lze pro stanovení kortikosteroidů aplikovat. Existuje řada dalších postupů lišících se drobnými modifikacemi, ale i zcela odlišnými kroky.

Za alternativu přímého chemického monitoringu povrchových vod lze považovat predikci koncentrace farmaceutických xenobiotik kalkulovanou na základě známé spotřeby léčiv a matematického modelu metabolizace a eliminace. Výhodou je alespoň přibližný odhad zatížení recipientu, dále potom nenáročnost na technické vybavení a celkové náklady v komparaci s chromatografickými metodami, jejichž příklad je v této kapitole uveden (Kugathas et al., 2012).

3.3.2. Výskyt glukokortikoidů v povrchových vodách

Řada studií prokázala přítomnost glukokortikoidů včetně dexametazonu v povrchových vodách. Konkrétní příklady včetně zjištěných koncentrací jsou součástí této kapitoly.

Důležitým zdrojem, který tvoří vstupní článek farmaceutických polutantů do povrchových vod, jsou čistírny vod odpadních, kde dochází k více, či méně rozsáhlé degradaci těchto xenobiotik. Výzkum prováděný na čistírně odpadních vod ve francouzském Lyonu konkrétně v městské části Pierre Benite odhalil degradaci dexametazonu v průběhu procesu čištění na úrovni 53,3 %, při naměřené koncentraci na výstupu $7 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (Piram et al., 2008). Obdobný projekt realizovaný od června do července roku 2006 na ČOV v čínském městě Peking prokázal v tomto období prakticky

úplné odstranění dexamezonu v průběhu procesu čištění, přičemž hodnota na vstupu se pohybovala v rozmezí 0,5-1,9 ng·l⁻¹ (Chang et al., 2007). Vliv jednotlivých fází procesu úpravy odpadní vody na koncentraci dexametazonu dokládá měření z druhé poloviny měsíce května roku 2010 na ČOV Huiyang a Meihu, nacházejících se v čínské provincii Guangdong. V Huiyang došlo ke snížení původní koncentrace 22,6 ± 4,0 ng·l⁻¹ na úroveň 13,6 ± 0,8 ng·l⁻¹ v usazovací nádrži. Následný anoxický a anaerobní stupeň snížil hodnotu postupně až na 3,4 ± 1,3 ng·l⁻¹, přičemž v aerobním procesu se koncentrace dexametazonu nacházela pod hranicí detekce (0,04. ng·l⁻¹). Stejně jako v případě ČOV Huiyang došlo v Meihu k degradaci pod hranici detekce v primárním stupni čištění a to již v jeho anoxickém průběhu (Liu et al., 2011).

Nástrojem efektivnější eliminace dexametazonu z odpadních vod by mohlo být použití UV-B (302 nm), UV-C (254 nm) záření (Kawabata et al., 2013), nebo elektrokoagulace (Arsand et al., 2013). UV- B a UV-C se prokázaly jako velmi účinné prostředky rozkladu dexametazonu. Také expozice polutantu slunečnímu záření vedla k téměř 100% fotodegradaci při množství 50 ng sledované látky disociované v 50 ml vody po uplynutí dvou hodin v laboratorních podmínkách. Druhá zmiňovaná metoda využívá pro snížení koncentrace xenobiotika agregaci koloidních částic prostřednictvím elektrického proudu, kdy bylo pozorováno až 38,1% snížení koncentrace sledované látky.

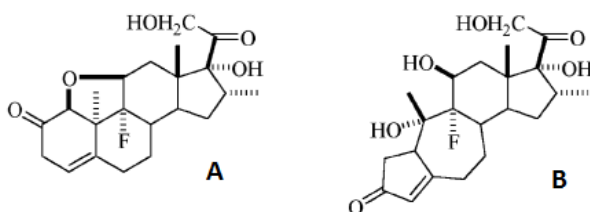
Čistírny odpadních vod nereprezentují jediný možný zdroj farmaceutických polutantů. Potencionálně značné riziko kontaminace vodního ekosystému syntetickými glukokortikoidy mohou představovat zemědělské podniky s produkcí zaměřenou na živočišnou výrobu a to především v zemích s benevolentnějšími legislativními normami. Příkladem takového znečištění je farma v čínském městě Bohai, které je nejvýznamnějším městem v provincii Guangxi s chovem jatečných zvířat, konkrétně prasat. V areálu o rozloze 70 000 m² jsou chovány řádově jednotky tisíc kusů rozličných věkových kategorií. V tomto zařízení je odpadní voda z čištění odchovných prostor jímána do nádrží, které umožňují před opuštěním areálu odtokovou stokou určitý stupeň biologického čištění. Zdržení odpadní vody v nádržích skutečně snižuje zatížení prostředí a hodnota obsahu dexamtazonu neměřena kilometr od zemědělského komplexu byla o 39,8% nižší ve srovnání s úrovní v retenční nádrži, i tak však bylo prostředí zatíženo 37,8 ± 3,1 ng·l⁻¹. Podle výsledků měření lze konstatovat, že rezidua

dexametazonu nemají tendenci ke kumulaci v sedimentech a sorpci kalu a partikulárních částicích, kde se koncentrace nacházely pod hranicí detekce (Liu et al., 2012).

Analytické stanovení kortikosteroidů v povrchových vodách v roce 2010 publikoval Tölgyesi et al., jehož výsledky z řeky Dunaj ve městě Budapešť se pro syntetický glukokortikoid dexametazon nacházely pod hranicí detekce a to jak v období září-listopad 2008 (hranice detekce $0,07 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$), tak i v listopadu 2009 (mez detekce $0,01 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$). Predikce zatížení řeky Temže prostřednictvím softwarového nástroje založeného na geografickém informačním systému, který v sobě současně kombinuje hydrologické a kvalitu vody hodnotící modely (LF2000-WQX) orientačně vymezil celkovou koncentraci glukokortikoidů (včetně dexametazonu) mezi hodnotami $30 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ v situaci nejnižších úrovní exkrece a nejvyšších eliminace v ČOV a $850 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ v případě opačných trendů (Kugathas et al., 2012). Metoda je stručně popsána v závěru přechází podkapitoly.

3.4. Vliv dexametazonu na vodní biotu

Testování akutní a chronické toxicity dexametazonu na některých vodních organismech prokázalo řádově vyšší hodnoty nutné pro získání výsledku, než jaké odpovídají doposud zjištěným koncentracím v povrchových vodách. Shrnutí hodnot akutní a chronické toxicity dexametazonu a vybraných derivátů je uvedeno v tabulce 1. převzaté z práce DellaGreca et al. (2004). Struktura fotodegradačních produktů je znázorněna na obrázku 3. Následující část kapitoly je zaměřena na osvětlení zpravidla standardizovaných způsobů, jakými jsou hodnoty akutních a chronických toxicit pro uvedené organismy získávány.



Obrázek 3. Strukturní vzorce fotodegradačních produktů dexametazonu. Převzato z DellaGreca et al. (2004).

Hodnocení úrovně akutní toxicity na organismech skupiny *Rotifera* (*Brachionus calyciflorus*) je zaměřeno na stanovení koncentrace sledované látky, která vede k usmrcení 50% živočichů za dobu 24 hodin (24hLC50) ve srovnání s kontrolní skupinou. Experiment se zpravidla provádí na čerstvě vylíhlých jedincích. Obdobným způsobem jsou realizovány i pokusy akutní toxicity na drobných zástupcích podkmenu *Crustacea* (*Thamnocephalus platyurus*), kde výsledek také vymezuje hodnota 24hLC50. *Daphnia magna*, rovněž zástupce podkmenu korýši, konkrétně řádu *Cladocera* vykazuje zpravidla podobnou senzitivitu k chemickému znečištění jako předešlý zástupce. Posouzení koncentrace nutné k akutnímu toxickému působení obvykle probíhá na základě posouzení množství látky, jenž způsobuje efekt 50% imobilizace jedinců v průběhu 24, nebo častěji 48 hodin neboli 48hEC50 (pozn.: v tabulce 1. jsou uvedeny hodnoty 24hEC50).

Posouzení chronické toxicity dexametazonu a derivátů vznikajících při jeho fotodegradaci je znázorněno na dalším zástupci perlooček *Ceriodaphnia dubia* prostřednictvím reprodukčního testu. Tato testovací metoda sleduje množství partenogeneticky vyprodukovaných potomků ve snaze identifikovat koncentraci způsobující 50% inhibici reprodukce ve srovnání s kontrolou (EC50). Druhým modelovým organismem je zelená řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*. Chronické působení látek s dobou expozice 72 hodin vymezuje úroveň efektivní koncentrace inhibující růst biomasy o 50% (Štěpánová, 2014).

Ovlivnění fyziologických pochodů subletálními koncentracemi znázorňuje výzkum LaLone et al. (2012). Dexametazon způsobil po 21. dnech testování při koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ v těle samic *Pimephales promelas* snížení plodnosti, množství estradiolu a nárůst úrovně vitellogeninu v krevní plasmě. Navýšení úrovně plasmatického vitellogeninu autoři připisují spíše snížení frekvence výtěru, nežli xenoestrogennímu účinku dexametazonu. Tomuto předpokladu nasvědčuje snížení exprese vitelogenin mRNA v jaterní tkáni. Histologické testy prováděné na plůdku ukázaly při stejné koncentraci a době expozice 29. dnů zvýšení frekvence výskytu deformit skřelového aparátu a redukci růstových parametrů.

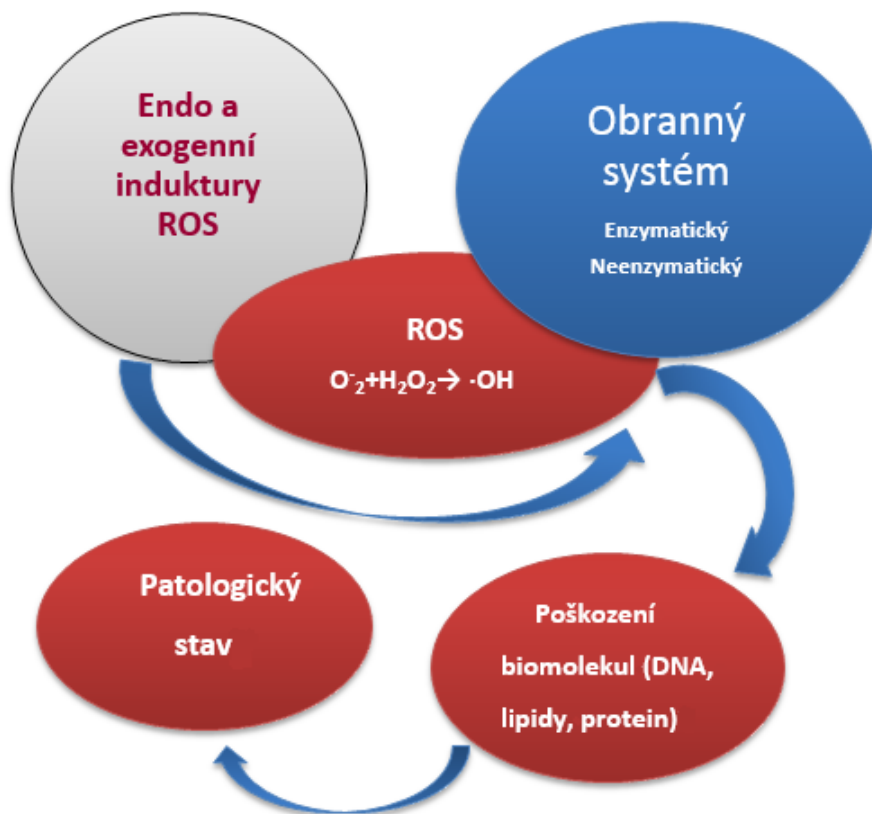
Tabulka 1. Shrnutí akutních a chronických koncentrací dexametazonu v mg· l⁻¹ pro vybrané vodní organismy. Hodnota uvedená v závorce odpovídá 95% intervalu spolehlivosti. Upraveno podle DellaGreca et al. (2004).

Akutní toxicita			
Typ sledované látky	<i>D. magna</i> (EC50)	<i>T. platyurus</i> (LC50)	<i>B. calyciflorus</i> (LC50)
Dexametazon	48,30 (39,91–58,45)	60,11 (44,21–81,73)	48,22 (41,37–56,2)
Derivát A	10,88 (7,28–16,26)	20,9 (16,49–26,50)	13,20 (11,43–15,23)
Derivát B	17,82 (13,84–22,94)	30,52 (25,54–46,66)	44,66 (38,91–51,25)
Chronická toxicita			
Typ sledované látky	<i>C. dubia</i> (7 dnů)		<i>P. subcapitata</i> (3 dny)
Dexametazon	0,05 (0,042–0,076)		-
Derivát A	0,13 (0,11–0,15)		12,15 (8,96–16,49)
Derivát B	0,06 (0,04–0,08)		40,75 (36,35–45,69)

Látka rozptýlená v prostředí však nemusí být jediným expozičním zdrojem. Odezvu lze pozorovat po alimentárním předložení léčiva. *Hoplías malabaricus* vystavený dávkám v řádu desetin až jednotek mikrogramů na kilogram vykazuje redukcí funkce antioxidantních enzymů gonád, ale naproti tomu indukcí aktivity stejného systému v jaterní tkáni. Dalším prokazatelným ovlivněním metabolismu je snížení hladiny testosteronu v krevním řečišti samců tohoto druhu (Guiloski et al., 2015).

4. Oxidativní stres

Za běžných okolností udržuje hemostáza organismu rovnováhu mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidačním obranným systémem. Standardní fyziologické koncentrace volných radikálů nepředstavují hrozbu, naopak jsou nezbytné pro některé signální dráhy buněk, účastní se mitochondriálního dýchání a podílejí se na eliminaci patogenů (Gajdošová et al., 2012). Výskyt metabolických procesů chránících organismus před reaktivními formami kyslíku je společný pro všechny aerobní formy života. Disbalanci tohoto mechanismu ve prospěch reaktivních forem kyslíku je možné definovat jako oxidativní stres, který má za následek destrukci základních makromolekul organismu jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny a fosfolipidy (Halliwell, 2007). Průběh účinku nadměrné produkce ROS znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4. Návaznost jednotlivých kroků nadměrné produkce ROS. Převzato z Bandyopadhyay et al. (1999).

Původ volných radikálů je v zásadě dvojího druhu a to endogenního, kdy je geneze iniciovaná vnitřními biochemickými pochody a exogenního, které naproti tomu zahrnuje například působení UV záření (Liebel et al., 2012), nebo chemických látek (Deavall et al., 2012).

4.1. Iniciátory oxidativního stresu

Reaktivní neboli také aktivní formy kyslíku (ROS) zahrnují nejen volné radikály, které postrádají jeden párový elektron v elektronovém obalu, ale i další reaktivní molekuly (tabulka 2.). Spojením superoxidu s oxidem dusnatým vznikají reaktivní formy dusíku, které jsou ve srovnání s ROS reaktivnější. Tyto molekuly dusíku a kyslíku produkuje působení enzymů NADPH-oxidázy a syntázy oxidu dusného (Deavall et al., 2012). Reaktivní formy dusíku, kyslíku a jeho volné radikály tvoří nejdůležitější skupiny reaktivních složek organismu.

Tabulka 2. Přehled reaktivních forem kyslíku. Převzato z Piterková et al. (2005).

Sloučenina	Zkrácené označení	Strukturní vzorec
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$	O-O:
Superoxidový anion-radikál	O_2^-	$[\text{O}=\text{O}]^-$
Hydroxylový radikál	OH^\cdot	O-H
Hydroxylový ion	OH^-	O-H
Perhydroxylový radikál	O_2H^\cdot	$\text{O}=\text{O}-\text{H}$
Peroxid vodíku	H_2O_2	$\text{H}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$

Molekulární kyslík se od ostatních atmosférických molekul odlišuje obsahem dvou nepárových elektronů, díky čemuž se nachází v tzv. biradikálním stavu. Tento stav elektronového obalu má za následek paramagnetické vlastnosti molekuly, díky kterým je velmi stabilní a reakce s bivalentním reduktantem není za běžných podmínek pravděpodobná. Poměrně inertní stav molekulárního kyslíku není pro biologický systém nijak nebezpečný a určité riziko nastává v případě jeho „aktivace“. Pro vznik aktivní formy je nutné překonat překážku v podobě energie, kterou je pro aktivaci nutné vyvinout ($22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro obrácení spinu jednoho z elektronů a $497 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro přerušení vazby mezi atomy kyslíku). Všechny kroky reakčního řetězce mohou jakožto exotermní jevy probíhat samovolně s výjimkou prvního. Děj iniciačního kroku nabízí dvě alternativy průběhu, kdy první spočívá v tvorbě sigletového kyslíku s následným vznikem hydroperoxidu. Druhá varianta aktivuje kyslík jednoelektronovou redukcí za vzniku superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu, přičemž k úplné redukc

kyslíku až na H_2O je zapotřebí čtyř elektronů. Superoxid nemá schopnost procházet přes biologické membrány a může působit jako oxidační i redukční činidlo. Výstupem druhé redukce je peroxid vodíku, který na rozdíl od předchozího produktu disponuje schopností procházet přes buněčnou membránu. Z hlediska oxidativního stresu je nejvýznamnější předposlední složka reakčního řetězce, hydroxylový radikál (Piterková et al., 2005; Lewis, 2002).

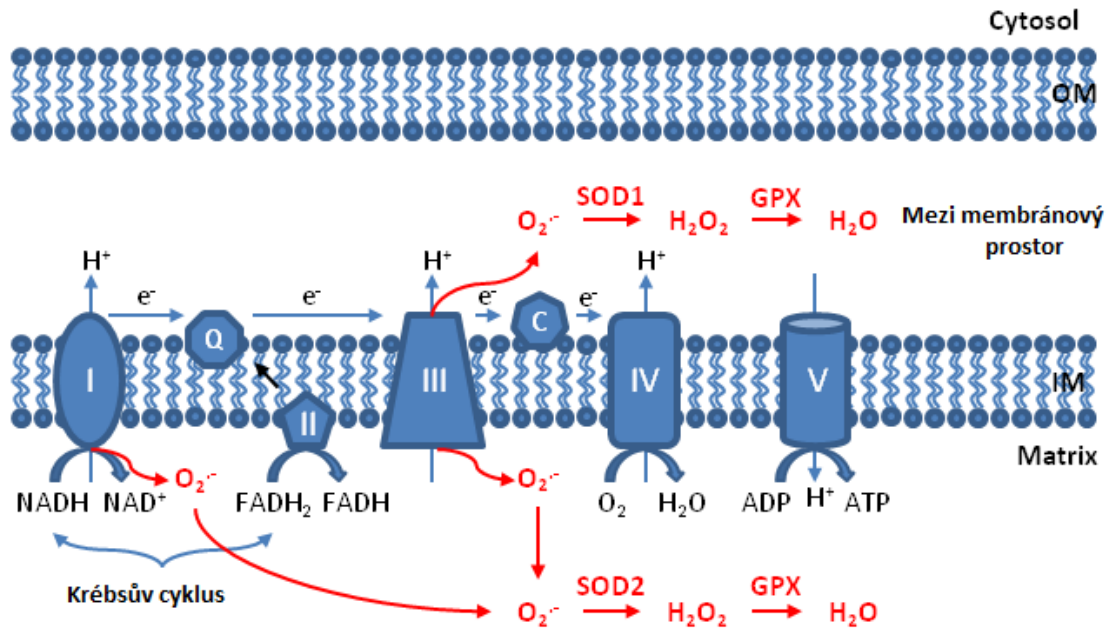
4.2. Geneze ROS

4.2.1. Fyziologická geneze ROS

Jak již bylo řečeno, reaktivní formy kyslíku jsou přirozenou součástí metabolismu všech aerobních organismů. Buněčné organely nazývané mitochondrie představují jeden z nejvýznamnějších zdrojů ROS. Primárním účelem těchto buněčných struktur v metabolismu eukaryotických buněk je produkce látek určených pro přenos energie, prostřednictvím procesu oxidativní fosforylace, jehož dílčí částí je i redukce kyslíku. Stavbu mitochondrie lze popsat jako složeninu vnější a vnitřní fosfolipidové membrány, přičemž vnitřní membrána vzhledem ke svému členitému povrchu disponuje výrazně větší plochou a pro energetický metabolismus má majoritní funkci, kterou ji propůjčují zakomponované membránové enzymy. Tvorba adenosintrifosfátu (ATP) je iniciována tokem elektronů, pocházejícím z Krebsova cyklu. Tyto elektrony jsou předány přes molekuly NADH a $FADH_2$ komplexu elektron-transportního řetězce, který využívá jejich energii pro vytvoření koncentračního gradientu vodíkových protonů, jenž prochází zpět do mitochondriálního matrix přes ATP- syntázu transformující ADP na ATP. Finálním akceptorem elektronu z elektron- transportního řetězce je molekula kyslíku redukující se na vodu.

Jistá část elektronů uniká z elektron-transportního řetězce a v důsledku této události dochází k redukci molekulárního kyslíku na superoxidový anion. Z obrázku 5. je patrné, že k úniku elektronu a vzniku ROS dochází především vlivem I a III komplexu transportního řetězce. Vzniklý anion je katalyzován superoxid dismutázou na peroxid vodíku. Předpokládá se, že 1 % spotřebovaného kyslíku je takto přeměněno na reaktivní formu. K umocnění tohoto jevu může docházet vlivem poškození některého

z enzymů elektron-transportního řetězce, nebo vytvořením velkého koncentračního gradientu protonů ve vnitřní membráně (Fariss et al., 2005).

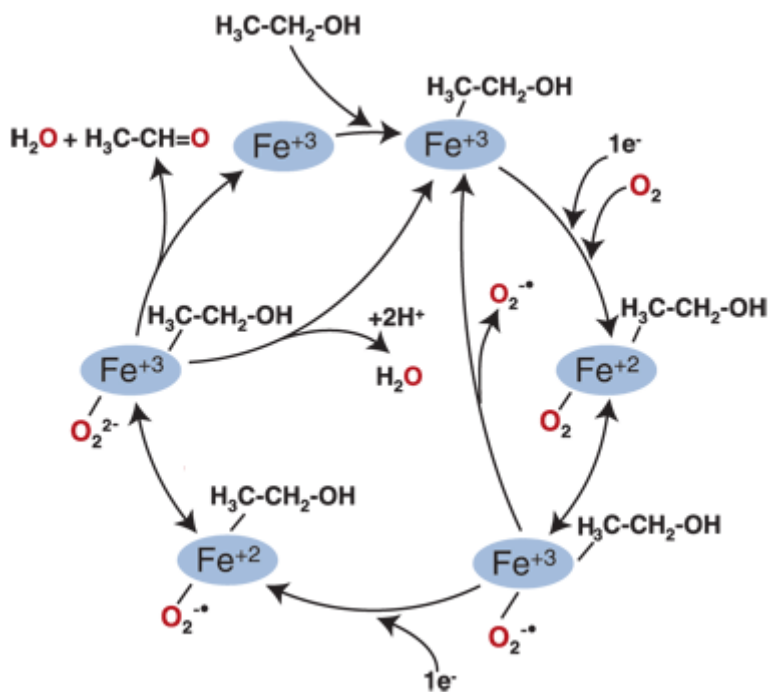


Obrázek 5. Mitochondriální geneze ROS. Převzato z Li et al. (2013).

Mitochondrie ryb vykazují určité strukturní a biochemické adaptace na změnu prostředí. Příkladem je přizpůsobení antioxidantního systému na dlouhodobé biologické hladovění, kdy ani po dlouhém období není pozorováno snížení aktivity obraných enzymů, ve srovnání s jinými mitochondriálními enzymy (cytochromoxidáza). Zmíněný jev byl popsán u tresky obecné *Gadus morhua* a migrujících lososů, pro které je dlouhodobé hladovění přirozenou součástí životního cyklu (Filho, 2007).

Ačkoliv jsou mitochondrie považované z hlediska přenosu elektronů za majoritní buněčnou organelu, skutečností je, že 60 % z celkového objemu elektronového transferu v jaterní tkáni je realizováno prostřednictvím hemoproteinů, naproti tomu flavoproteiny zabírají asi 20-30 % podíl. Mikrosomální monoxygenázy jsou lokalizované v hladkém endoplasmatickém retikulu většiny živočišných tkání, přičemž z výše uvedeného plyne převážná lokalizace v játrech. Obsah mikrosomálních monoxygenáz v ostatních tkáních je nesrovnatelně menší, avšak i přes menší počet bývá jejich význam z pohledu elektronového transferu srovnatelný. Ve výsledku tak mikrosomální monoxygenázy produkují ve velkém množství buněk stejně významný objem ROS jako mitochondrie, ačkoliv Fariss et al. (2005) připisuje mitochondriím 90%

celkově produkovaných reaktivních forem. Převážná část ROS produkovaných cytochromem P450 připadá na katalytický cyklus, jehož substrátem mohou být kromě xenobiotik také steroidní hormony a další běžně fyziologicky produkované molekuly.



Obrázek 6. Průběh katalytického cyklu CYP450. Převzato z Koop (2006).

Vazba substrátu na CYP450 má za následek snížení redoxního potenciálu enzymu, který kooperuje s ostatními proteiny lokalizovanými v endoplasmatickém retikulu, kde prostřednictvím reakce (například NADPH P450 reduktázou) dojde k redukci železa v hemové skupině předáním elektronu z NADPH. Následuje vazba atomu kyslíku na atom železa, jenž je transformován na více stabilní komplex se superoxidem. Fáze, při kterých probíhají druhá redukce a štěpení atomárního kyslíku nebyly doposud experimentálně pozorovány a jejich děj byl odvozen hypoteticky na základě chování jiných hemoproteinů. Existuje předpoklad, že průběh druhé redukční fáze má za následek vznik molekuly peroxidového anionu, který je příznivější pro reakci se dvěma protony z okolního prostředí a rozdělení vazby mezi atomy kyslíku, kdy druhý opouští enzym s následnou redukcí na vodu. První atom vázaný na hemovou skupinu je inkorporován do substrátu, který po vytvoření hydroxilové formy opouští molekulu enzymu. Katalytická monooxygenace je tím ukončena a enzym se vrací do výchozího

stavu (Segall, 1997; Lewis, 2002). Celý průběh je schematicky shrnut na obrázku 6., kde jsou všechny formy kyslíku zvýrazněny.

Některé isoformy cytochromu P450 vytvářejí ve srovnání s jinými výrazně větší množství ROS, konkrétně lze hovořit o CYP2E1 a CYP3A. Indukce ROS prostřednictvím CYP450 vedla k celé řadě autoregulačních faktorů, jakým je vliv transkripčních faktorů (NF1 a NF κ B) zodpovídajících za genovou expresi CYP450. Regulační prostředek může také fungovat na principu destabilizace proteinu (Zangar et al., 2003).

Uvedené fyziologické procesy nejsou jedinými zdroji reaktivních molekul v organismu a existuje celá řada dalších, potencionálně přispívajících k oxidativním změnám biologického systému. Důležitými producenty ROS je například celá řada enzymů spadajících do kategorie oxidáz, jakými jsou xanthionoxidázy, lipoxygenázy a NADPH-oxigenázy (Racek et Holeček, 1999).

4.2.2. Vliv farmak na produkci ROS

Oxidativní stres je součástí toxického účinku mnoha farmaceutických přípravků a jeho projevy pozorujeme na celé řadě orgánů. Mezi hlavními částmi organismu postiženými toxickým projevem ROS se nachází nervový systém, ledviny, játra a kardiovaskulární systém. Způsob jakým léčiva reaktivní molekuly generují je u jednotlivých typů tkání a léčiv značně individuální a nelze je díky tomu jednoduše zobecnit (Deavall et al., 2012).

Antipsychotikum chlopromazin iniciuje vznik ROS fotosenzitivní reakcí v kožní tkáni. Chlopromazin podrobený fotodechloraci je převeden do excitovaného stavu, který umožňuje přenos energie na molekulární kyslík (Moore, 2002). Jiný způsob radikálového poškození znázorňuje působení farmaceutického přípravku používaného k léčbě maligních nádorových onemocnění, doxorubicin. Působením mitochondriálních reductáz je molekula doxorubicinu redukována, čímž je umožněn vznik antracyclin semiquinon (částečně redukovaného) volného radikálu. Tento farmaceutický přípravek podléhá také degradaci při styku s trojmocným železem za vzniku volného radikálu (Deavall et al., 2012).

Steroidní hormony skupiny glukokortikoidů prokazatelně ovlivňují oxidačně-redukční rovnováhu organismu. Obecným principem indukce oxidativního stresu

glukokortikoidy prokázaným v mnoha studiích ptáků a savců je potlačení enzymatických a neenzymatických obranných mechanismů (Costantini et al., 2011).

Jedním z hypotetických způsobů indukce oxidativního poškození při chronické expozici glukokortikoidy je ovlivnění regulační schopnosti mineralokortikoidních a glukokortikoidních receptorů, respektive jejich schopnost adekvátní odpovědi na fyziologické stresové faktory. Působením na tyto receptory může dojít k navýšení produkce glukokortikoidů a následné amplifikaci stresové odezvy osy orgánů hypotalamus-hypofýza-nadledviny, která zapříčiňuje zvýšení úrovně metabolických pochodů, jenž jsou samy o sobě producenty ROS.

Dexametazon působí jako induktor oxidativních stresorů amyloid β -proteinu a glutamátu. Toxicitu způsobuje disbalance antioxidantního systému a snížení hladiny glutathionu. Pokles úrovně glutathionu je způsobený kompeticí o antiport glutamátu s cystinem, prekurzorem glutathionu. V důsledku eliminačního procesu glutathionu dochází ke kumulaci peroxidu vodíku a následné buněčné apoptóze (Behl et al., 1996).

Glukokortikoidy poskytují v určitých situacích protektivní odezvu vůči oxidativnímu poškození organismu, jak ukazuje studie Yoshioka et al. (1994), ve které po aplikaci methylprednisolu došlo ke zvýšení genové exprese SOD v ledvinových buňkách, snížení produkce volných radikálů a poškození oxidativním stresem.

4.3. Antioxidační obrana organismu

Aerobní formy života disponují rozličnou paletou látek chránících vnitřní prostředí organismu eliminací negativních účinků volných radikálů a ROS. Součástí obranného mechanismu je membránově vázaný tokoferol a ve vodní fázi vyskytující se kyselina askorbová, což jsou látky s nízkou molekulovou hmotností spadající do skupiny vitamínů (vitamin E a C). Významnou roli zaujímá také koncový produkt purinového metabolismu- kyselina močová. Její důležitost spočívá nejen v antioxidačních vlastnostech, ale také ve schopnosti vázat kovy jako je železo či měď. Zmíněné kovy mohou být součástí reakce produkující ROS prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce. Mezi dalšími sloučeninami, které chrání organické molekuly lze jmenovat například karoten a ubichinon (Davies, 2000). Tyto antioxidanty neenzymatického charakteru jsou s velkou pravděpodobností evolučně starší.

Obraným antioxidačním mechanismus vykazuje u fylogeneticky starších druhů ryb odlišnou aktivitu. Evolučně starší taxony nedisponují zpravidla vysokou funkcí antioxidačních enzymů a obranou reakci přebírají neenzymatické mechanismy. V této souvislosti je zpravidla také pozorována vyšší úroveň peroxidovaných lipidů ve srovnání s evolučně mladšími kostnatými rybami. Celkově vzato však obecně u ryb pozorujeme nižší aktivitu enzymů CAT, SOD, GPx ve srovnání s ptáky a savci (Martínez-A´lvarez et al., 2005). Vzájemnou vazbu enzymů a průběh reakcí je znázorněn na obrázku 7.

Superoxiddismutáza (SOD) je součástí antioxidačního enzymatického systému naprosté většiny aerobních organismů jako prostředek, který výrazně urychluje disproportionaci (dismutaci) superoxidu. Eukaryotní organismy disponují dvěma druhy SOD, které se odlišují obsaženým atomem kovu, majícím účinek na katalytickou funkci. Prvním typem je enzym skládající se z dvou podjednotek (dimer), kdy v jedné je obsažen atom zinku (strukturní funkce) a v druhé mědi ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}\text{SOD}$). Mechanismus reakce spočívá v redukci ionu mědi molekulou superoxidu, ze které se tím stává molekulární kyslík. Další molekula superoxidu je převedena do protonizované formy prostřednictvím aminokyseliny argininu, jenž je dárce protonu. Vzniklý hydroperoxylový radikál navrací enzym zpět do výchozího stavu opětovnou oxidací ionu mědi a sám je transformován na peroxid vodíku. Vyšší eukaryotické organismy byly v průběhu evoluce vybaveny také další formou superoxiddismutázy lokalizovanou v mitochondriích, konkrétně se jedná o MnSOD.

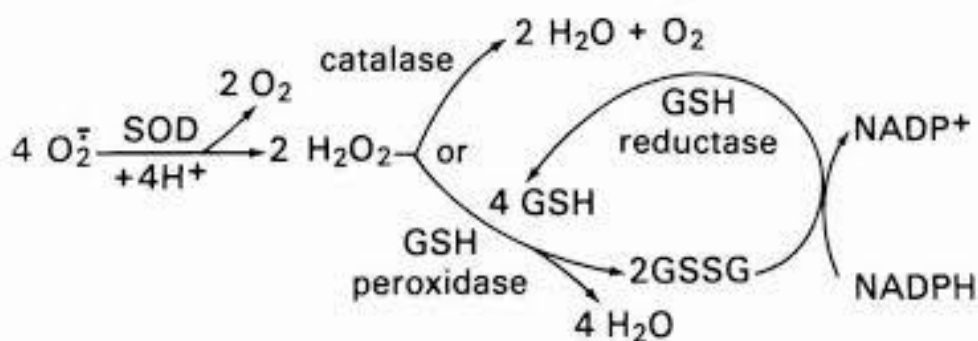
Superoxid není příliš reaktivní formou kyslíku, a proto sám o sobě nepředstavuje pro organismus významnější hrozbu. Je však prekurzorem pro vznik reaktivnějších a tím i nebezpečnějších forem jako peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Samotná protekční aktivita tohoto enzymu vede ke vzniku peroxidu vodíku, který je eliminován navazujícími mechanismy.

Jedním z těchto mechanismů je enzymatické štěpení **katalázou (CAT)**. Strukturně se jedná o tetramerní hemoprotein se čtyřmi molekulami NADPH. Enzym katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík a to především v situacích s vyššími koncentracemi peroxidu.

Druhým významným enzymem, který se podílí na eliminaci peroxidu vodíku je **glutathionperoxidáza (GPx)**. Rozdílem oproti kataláze je nejen funkce při nižších koncentracích peroxidu, ale také schopnost eliminace jiných reaktivních molekul, než

jen peroxidu vodíku. Membránově vázaný typ nazývaný fosfolipidová glutathionperoxidáza (pGPx) chrání fosfolipidovou dvou vrstvou svou schopností redukovat také lipidové hydroxoperoxidy. Včetně zmíněného pGPx rozeznáme tři typy GPx. Zbylé dvě formy spojuje výskyt selenocysteinu v aktivním místě enzymu, jenž disponuje svou vlastní transferovou RNA (někdy označovanou za 21 aminokyselinu). V obou případech se také již nejedná o membránově lokalizované enzymy, přičemž cGPx se nachází v buněčné cytoplasmě a eGPx v extracelulární tekutině.

Katalytická reakce štěpení peroxidu na vodu probíhá spolu s oxidací substrátu tvořeného glutathionem (GSH). Oxidovaný glutathion (GSSH) by však nemohl dále plnit svou funkci a proto funguje v kooperaci s **glutathion reduktázou (GR)**, která prostřednictvím NADPH navrácí glutathion do původního redukovaného stavu (Racek et Holeček, 1999).



Obrázek 7. Průběh navazujících reakcí enzymatických antioxidantů. Převzato z Proctor et Reynolds (1984).

Glutathion-S- transferázy (GSTs) je skupina enzymů tvořící jednu z hlavních součástí druhé fáze detoxikačního metabolismu. Mechanismem reakce je spojení glutathionu s molekulou nepolární látky prostřednictvím sulfhydrylové skupiny, čímž je zvýšena hydrosolubilita metabolizovaného substrátu (Ketterer et al., 1988)

Zvýšení úrovně peroxidu vodíku má za následek nárůst aktivity GST. Pokud za stejné situace nastane inhibice GST, dochází k akumulaci produktů lipidové peroxidace (Kondala Rao et Shaha, 2000). Katalyzací konjugace redukovaného glutathionu jsou eliminovány nejen cizorodé lipofilní látky, ale také buněčné složky poškozené ROS (Storey, 1996).

4.4. Negativní účinky ROS na buněčné makromolekuly

4.4.1. Poškození DNA

Poškození genetické informace uchované molekulou DNA je nejčastěji důsledkem adice hydroxylového radikálu do dvojných vazeb (pyrimidinu a purinu) dusíkatých bází a abstrakcí vodíkového atomu z methylové skupiny, která je součástí deoxyribózy a thyminu. ROS může být také iniciátorem tvorby příčných vazeb mezi nukleovou kyselinou a proteinem, jenž znemožňuje průběh replikace a genovou expresi daného úseku. Mechanismus uvedené reakce je závislý na vzniku radikálu dusíkaté báze a tvorbou vazby s aminokyselinou proteinu (Evansa et al., 2004).

Strukturní změny DNA jsou příčinou řady biochemických disfunkcí. Například narušení mitochondriální DNA může způsobit produkci strukturně abnormálních součástí elektronového transportního řetězce, které se negativně projeví na dalším zvýšení produkce ROS. Poškození a změny na struktuře nukleových kyselin mají za následek mutagenních modifikací genetického kódu, vznik rakovinného bujení, případně může být genová exprese ovlivněna nepřímo narušením signálních drah odpovědných za transkripční faktory (Bandyopadhyay et al., 1999)

4.4.2. Peroxidace lipidů

Současně s významným podílem na energetickém metabolismu mají lipidy v organismu nezastupitelnou roli základních stavebních prvků buněčných membrán ve formě fosfolipidů. Ryby patří do skupiny poikilotermních živočichů, u kterých se vyvinul adaptační mechanismus buněčných membrán, který zajišťuje jejich fluiditu i za nízkých teplot. Optimální vlastnosti membrán jsou zajištěny skladbou lipidové složky, tvořené nenasycenými mastnými kyselinami (Dey et al., 1993). Právě polynenasycené mastné kyseliny jsou velmi vnímavé k působení volných radikálů a ROS, kdy dochází k reakci s methylenovými skupinami, respektive s vodíky v nich obsaženými. Reakci iniciuje vznik lipidového radikálu působením ROS. Takto vzniklý lipidový radikál reaguje s dalšími lipidy, přičemž vyprodukuje lipidový peroxid a kyselý radikál. Vlivem negativních strukturních změn buněčných membrán může dojít až k lyzi buňky. Produkty lipidové peroxidace jsou také poškozovány proteiny i nukleové kyseliny. V případě selhání obranných mechanismů nastává terminace až v momentě

vzájemného kontaktu dvou radikálů a jejich celkově vysoké koncentraci (Halliwell et Chirico, 1993; Tocher, 2003).

4.4.3. Oxidativní poškození proteinů

Významný podíl na poškození proteinových molekul má působení hydroxylových radikálů, avšak i ostatní formy ROS přispívají k oxidativní modifikaci proteinových struktur. Existuje mnoho rozličných způsobů, jakými ROS účinkují na molekulu bílkoviny. Tyto interakce jsou zpravidla ireverzibilní a řadíme mezi ně například fragmentaci proteinu, oxidace postranního řetězce, vznik příčných vazeb. Proteiny zauímají v biochemických pochodech organismu nepřehledné množství rolí a uvedené nevratné důsledky interakcí aktivních forem kyslíku s bílkovinami zapříčiňují narušení jejich funkce (Kuka et al., 2012). Výjimku tvoří aminokyseliny methionin a cystein, jejichž postranní řetězce jsou v případě oxidace navraceny do původního stavu (Hoshi et Heinemann, 2001).

4.5. Reparační mechanismy

Opravné mechanismy oxidativního poškození buněčných makromolekul lze rozdělit do dvou kategorií a to přímé a nepřímé. Přímé reparační procesy nejsou tak široce prozkoumány. Takovým procesem je působení methioninsulfoxid reduktázy na oxidovanou sulfhydrylovou proteinovou skupinu, čímž dojde k regeneraci aminokyselinového zbytku obnovení funkce proteinu.

Nepřímý reparační mechanismus poškozených proteinů funguje na principu rozpoznání a následné degradace na jednotlivé aminokyseliny. Eukaryota ve své buněčné cytoplasmě a jádru uchovávají proteozomální komplex, jehož účelem je rozklad poškozených proteinů. Rozkladem jsou jednotlivé aminokyseliny uvolněny pro recyklaci, neboť oxidativnímu poškození zpravidla podléhají jen 2-3 aminokyseliny. Proteozomální komplex tvořící až 1% z celkového objemu buněčných bílkovin, determinuje poškozený protein hydrofobní vazbou. Ačkoliv oxidativní změny proteinu mohou působit zvýšení hydrofilní povahy proteinu, v konečném důsledku oxidativního narušení vede k parciální denaturaci a hydrofobitě strukturně narušených částí.

Oxidované fosfolipidy jsou substrátem pro fosfolipázy. Jejich působením se fosfolipidy štěpí na mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Lysofosfolipidy mohou být recyklovány zpět na fosfolipidy a podobně jako u proteinů i zde pravděpodobně reakci iniciuje narušením přirozené interakce molekuly s vodním prostředím. V tomto případě jsou zvýšeny hydrofilní vlastnosti mastné kyseliny, která má za běžných podmínek hydrofobní vlastnosti. Další reparační mechanismy lipidů, mezi které patří pGPx jsou uvedeny v kapitole 4.3. (Davies, 2000).

Poškození genetické informace způsobuje narušením nukleotidu skládajícího se z dusíkaté báze, pentózy a zbytku kyseliny fosforečné. DNA reparační mechanismy jsou spjaté s fází dělení buněčného cyklu, respektive jeho kontrolními body. Excizní oprava báze je hlavní způsob, jakým se organismus vypořádává s oxidativně modifikovanými molekulami- 8-hydroxyguaninu, formamidopyrimidinu a 5-hydroxyuracilu a to jak jaderné, tak i mitochondriální DNA. Poškozené báze determinuje a odstraňuje DNA glykosyláza, přičemž kompletní náprava poškození probíhá v kooperaci s dalšími enzymy (endonukleázy, DNA polymeráza, ligáza). V případech, kdy poškození genetické informace buňky neumožňuje její opravu, dochází ve snaze zabránit projevu mutace (např. rakovinné bujení) k apoptóze buňky (Maynard et al., 2009).

5. Biomarkery

Chemický monitoring povrchových vod neposkytuje konkrétní obraz o nebezpečnosti stanovených látek pro vodní biotu, a je tak pouze ukazatelem zatížení antropogenními vlivy. Posouzení kvality prostředí pro organismy respektive zhodnocení nebezpečnosti koncentrace sledované látky, je důležité definovat jejich případné fyziologické odpovědi na polutant a tím umožnit predikci komplexního efektu znečišťující látky. Prostředníkem pro získávání hlubších poznatků o vlivu cizorodých látek na biologický systém jsou biochemické markery neboli biomarkery.

Biomarkery jsou nejčastěji definovány, jako měřitelná odchylka určitého parametru biologického systému od normálního stavu, ke které dochází na základě interakce s fyzikálním, biologickým nebo chemickým parametrem vnějšího prostředí. Tyto změny mohou být patrné přímo v organismu, případně i v produktech metabolismu (moč, výkaly, kožní deriváty) (van der Oost et al., 2003). Průběh odezvy biologického systému na expozici polutantem je znázorněn na obrázku 8.

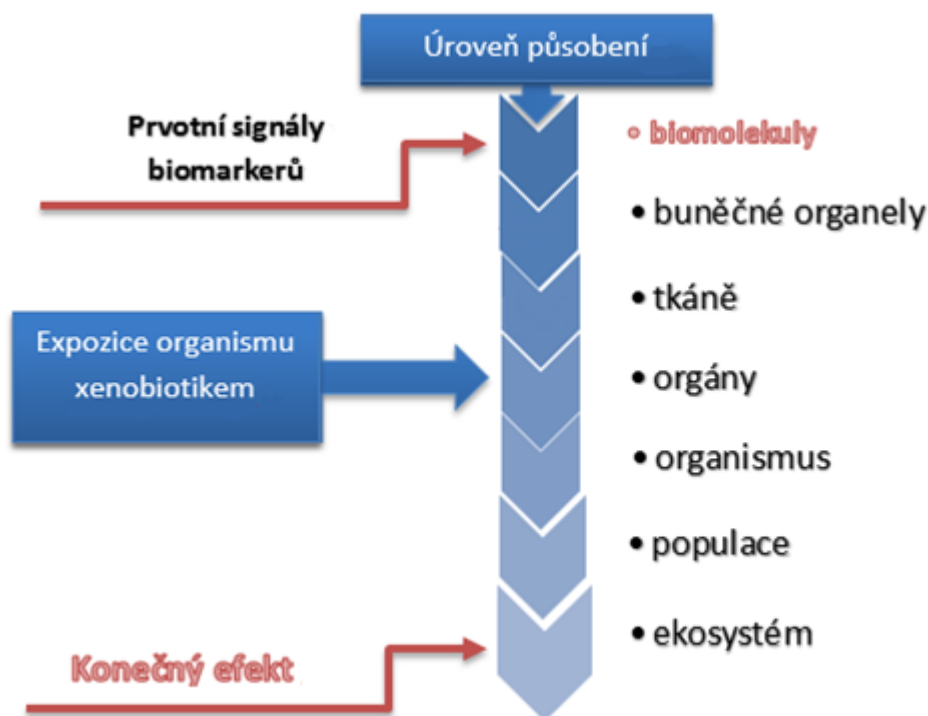
Odlišnost termínů biomarker a bioindikátor spočívá v úrovni, na které je definováno sledování negativního účinku, přičemž biomarkery nebývají stanovovány na vyšší úrovni, než je orgánová, neboť k té dochází v důsledku molekulárních změn. Odezva na biomolekulárním stupni, tak poskytuje informaci o prvotních varovných změnách. Naproti tomu bioindikátor odpovídá narušení na úrovni organizace populace i celého ekosystému (Bartell, 2006). V ideálním případě by měl být biomarker neinvazivní, aby byla umožněna jeho aplikace i na ohrožené, či chráněné taxony.

Pro posouzení eventuální vhodnosti fyziologického parametru jakožto biomarkeru ryb bylo stanoveno několik kritérií:

- Spolehlivost a snadná proveditelnost testu.
- Odezva biomarkeru na sledovanou látku by měla být dostatečně citlivá, aby byl zachován efekt časného varovného signálu.
- Dobře definovaná výchozí data biomarkeru pro odlišení přirozené variability a změny indikované stresovým signálem.
- Definice základního mechanismu mezi sledovanou látkou a projevem biomarkeru.

- Stanovení toxikologického významu biomarkeru, například definicí vztahu projevu biomarkeru a dlouhodobého dopadu na organismus.
- Stanovení možných dopadu některých vedlejších faktorů na měření.

S posledním bodem je spjata potřeba znalosti biologie a fyziologie pokusného organismu z důvodu eliminace chyb měření, způsobených těmito faktory (van der Oost et al., 2003). V rámci rozličných fyziologických pochodů se může vyskytovat značná variabilita způsobená věkem, migračním chováním, pohlavím, hladověním atd., což jsou faktory, které nemají souvislost s výskytem polutantu, ale značně ovlivňují vnitřní prostředí organismu (de Kruijf, 1991).



Obrázek 8. Průběh toxického účinku způsobeného polutantem. Upraveno podle van der Oost et al. (2003).

5.1. Kategorie biomarkerů

- **Biomarkery citlivosti** reflektují individuální míru citlivosti jedince v rámci populace na expozici cizorodými látky, přičemž tato senzibilita může být

podmíněna geneticky alelovým polymorfismem, nebo jinak získaná v průběhu ontogeneze.

- **Biomarkery expozice** slouží jako důkaz o vystavení organismu skupinou polutantů, konkrétní látkou nebo jejich metabolitů, na základě fyziologické odezvy na zatížení prostředí.
- **Biomarkery toxického efektu** jsou tkáňové, biochemické, nebo jiné změny vyvolané faktorem vnějšího prostředí, v jehož důsledku může být výrazně narušena homeostáza organismu.

Uvedené rozdělení je spíše orientační, neboť mezi skupinami není striktně vymezená hranice a některé biomarkery mohou splňovat předpoklady pro zařazení do více kategorií (Timbrell, 1998).

5.2. Biomarkery oxidativního stresu

Reaktivnost aktivních forem kyslíku znemožňuje přímé stanovení jejich úrovně *in vivo*, proto jsou jako důkazy geneze ROS využívány stabilnější molekuly v podobě biomarkerů, které vznikají jako odpověď organismu na aktivní formy molekul (Gajdošová et al., 2012). Značnou výpovědní hodnotu o reakci biologického systému poskytují údaje o aktivitě antioxidačních mechanismů, mezi které patří enzymatické a neenzymatické procesy blíže popsané v kapitole 4.3. Expozice organismu látkám, které mají za následek genezi volných radikálů a ROS obecně, vede k postupnému vyčerpání enzymatického systému (**SOD, CAT, GPx**), ačkoliv dočasně může dojít ke zvýšení aktivity ve snaze zmírnit negativní účinky nadměrného množství ROS.

Velká pozornost je z hlediska radikálového poškození věnována lipidům. Testovací metoda peroxidační degradace tuků je nejčastěji založena na reakci malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Malondialdehyd (MDA) vzniká pouze jakou sekundární produkt peroxidace, ale jeho kvantifikace představuje ve srovnání s primárními produkty (hydroperoxydy) výrazně méně komplikací. Metoda stanovení MDA bývá provedena ve spojení s kapalinovou chromatografií (Valavanidis et al., 2006), nebo spektrofotometrií (**TBARS**) (Botsoglou et al., 1994).

Látky skupiny aldehydů vznikají také v případě oxidativního působení kovů, kdy bývá pozorován zvýšený výskyt oxidovaných aminokyselin v krevních proteinech. Vzniklé aldehydy (g-Glutamyl semialdehyd, 2 – amino-adipic semialdehyd) lze identifikovat a kvantifikovat pomocí HPLC-MS. V souvislosti s toxicitou kovů je aplikováno využití i dalšího biomarkeru a to bílkoviny metalothinein, k jejíž indukci v případě expozice kovům dochází. Tento na cystein bohatý protein působí ve vztahu s kovy jako chelatční činidlo (Valavanidis et al., 2006).

5.3. Vztah procesu posouzení environmentálních rizik a biomarkerů oxidativního stresu

Proces posuzování environmentálních rizik (environmental risk assessment- ERA) vznikl jako reakce na potřebu definovat negativní dopady antropogenních činností a posoudit přijatelnost rizik vzniklých touto činností na základě vědecky podložené analýzy. Využití nachází v posledních letech především při posuzování chemických látek mezinárodními organizacemi jako je organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) a evropské středisko pro ekotoxikologii a toxikologii chemických látek (ECETOC). Cílem je nalezení kompromisu mezi zatížením prostředí a finanční náročnosti s těmito riziky bojovat. Realizace hodnocení ERA je rozdělena do osmi dílčích kroků:

- **Určení nebezpečnosti** na základě negativních účinků, které mohou být způsobeny chemickými látkami.
- **Posouzení efektu látky** ve vztahu k množství jakému je organismus vystaven.
- **Posouzení míry expozice**, které jsou složky životního prostředí reálně vystaveny na základě výsledků měření.
- **Charakterizace rizika** je spojením poznatků z předchozích kroků.
- **Klasifikace rizika** spočívá v posouzení, zdali je nutný zásah pro snížení negativních důsledků.
- **Zhodnocení výhod a záporů** navrhovaných řešení, jejichž cílem je snížení negativních důsledků.
- **Snížení rizika** aplikace opatření s cílem ochrany složek životního prostředí.

- **Monitorování** je důležitým krokem již při stanovení zatížení prostředí znečišťující látkou, tak i jako ověřovací stupeň po přijetí nápravných opatření.

Biomarkery lze z pohledu jejich definice považovat za vhodným nástroj vymezení prvních kroků ERA. Tato skutečnost je vztažena do jisté míry i na enzymatické biomarkery oxidativního stresu. Enzym **CAT** se například pro potřeby ERA ukázal být platným, neboť vykazuje signifikantní výsledky ve změnách aktivity spjatých s expozicí cizorodými látkami. Naproti tomu ratifikace **SOD** jako platného biomarkeru komplikují odlišné výsledky terénních a laboratorních výzkumů. Potenciál platných biomarkerů mají neenzymatický antioxidant tokoferol a **GPx**, avšak u nich je potřeba dalších studií.

Navzdory širokému využívání ERA stále neexistuje komplexní rozhodovací rámec s jasným vymezení úloh vědeckých a politických nástrojů pro tvorbu principů ochrany životního prostředí (van der Oost et al., 2003).

6. Legislativní normy

Legislativní úprava ochrany kvality vodního prostředí z hlediska znečištění chemickými látkami ošetřuje v současné době směrnice Evropského parlamentu a Rady 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013. Tento dokument nahradil původní směrnici 2008/105/ES. Nově vydaný dokument rozšiřuje seznam prioritních látek (látek, u kterých jsou stanoveny normy environmentální kvality s maximální povolenou koncentrací ve vodním prostředí) o 12 nových, jež vejdou v platnost v roce 2018 s cílem dosáhnout dobrého stavu vodního prostředí pro tyto látky do roku 2027. Současně došlo k doplnění seznamu znečišťujících látek o 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol a Diclofenac. Tyto polutanty mohou být v budoucnu přidány na seznam prioritních látek. Seznam znečišťujících látek je sestavován na základě dostupných podkladů, které naznačují možnost významného rizika pro vodní prostředí. Výsledkem monitoringu znečišťujících látek na území EU je vypracování strategického přístupu a eventuální přijetí opatření proti negativním důsledkům těchto polutantů.

Současný seznam prioritních látek čítá 45 položek a je složen ze skupin látek náležících mezi polycyklické aromatické uhlovodíky, povrchově aktivní látky, retardéry hoření, halogenovaná rozpouštědla, pesticidy, těžké kovy, benzen. Vůbec poprvé se na seznam sledovaných látek dostávají také farmaka, což s velkou pravděpodobností může vést k jejich regulaci v povrchových vodách po přidání na seznam látek prioritních.

7. Materiál a metodika

7.1. Chemikálie a činidla

Dexamtazon sodium fosfát byl získán z Voight (USA). Rozpuštěním v destilované vodě byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny ostatní chemikálie, které byly při experimentu použity, pocházely ze Sigma Aldrich.

7.2. Pokusný materiál a experimentální podmínky

Pro praktickou část designovanou jako *in vivo* experiment byl zvolen pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) v juvenilní periodě původem z komerčního odchovu (Husinec, Česká republika). Detailní hmotnostní a délkové parametry usmrcených jedinců v souvislosti s jednotlivými skupinami a délkou expozice jsou uvedeny v tabulce 3. Součástí tabulky s údaji o velikosti jedinců je také informace o pohlaví vzorkovaných ryb, které bylo makroskopicky determinováno. Počet juvenilních jedinců, u kterých nebylo možné pohlaví determinovat je roven rozdílu celkového počtu ryb ve skupině (vždy 8 kusů) a součtu ryb, jejichž pohlaví je uvedeno.

Nezbytná aklimatizace na podmínky experimentu proběhla dva týdny před jeho začátkem. Držení pokusného materiálu bylo uskutečněno ve 250 l nádržích s 12 hodinovým světelným režimem a semistatickým konceptem pokusu, přičemž 4/5 objemu nádrže bylo každý den vyměněno z důvodu udržení nastavené koncentrace sledované látky a celkové kvality vodního prostředí.

Tabulka 3. Údaje o hmotnosti, délce a pohlaví ryb. Údaje prezentovány jako průměry délek a hmotností spolu se směrodatnou odchylkou. Ryby jsou členěny do skupin podle sledované úrovně koncentrace (C- kontrolní skupiny $0 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, D1- $3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, D2- $30 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, D3- $300 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, D4- $3000 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a délce trvání expozice (0, 21, 42dnů).

skupina	Délkové údaje (cm)		Hmotnostní údaje (g)			♀;♂
	Celková	Tělo	Celková	Bez org.	Játra	
C_0d	23,58 (1,36)	21,28 (1,19)	175,56 (30,41)	157,35 (27,9)	1,43 (0,31)	0;0
C_21d	25,59 (0,83)	23,04 (0,58)	217,31 (21,59)	194,21 (19,42)	2,05 (0,2)	3;4
D1_21d	25,69 (1,18)	23,33 (1,05)	218,52 (21,45)	192,2 (18,32)	1,86 (0,29)	4;3
D2_21d	24,68 (1,47)	22,13 (1,37)	196,01 (36,59)	175,3 (34,64)	1,7 (0,27)	3;2
D3_21d	25,16 (1,03)	22,58 (0,74)	203,25 (28,77)	182,35 (26,62)	1,93 (0,32)	5;2

D4_21d	25,15 (0,96)	22,58 (1,14)	204,95 (27,66)	180,26 (18,97)	1,92 (0,34)	5;3
C_42d	25,3 (1,4)	23,38 (1,27)	236,34 (33,47)	205,66 (30,66)	2,26 (0,4)	6;2
D1_42d	26,63 (0,49)	23,7 (0,62)	229,03 (22,82)	205,04 (22,26)	1,85 (0,21)	6;1
D2_42d	26,16 (0,77)	23,2 (0,66)	222,59 (29,16)	198,4 (29,73)	1,89 (0,21)	4;1
D3_42d	26,65 (1,2)	23,68 (1,02)	235,14 (40,37)	207,86 (34,74)	1,91 (0,31)	6;1
D4_42d	26,05 (0,61)	23,3 (0,31)	220,89 (11,41)	197,82 (8,21)	1,9 (0,22)	4;1

Každodenní náplň zahrnovala sledování nasycení vody kyslíkem, teploty, pH a to před obměnou části objemu nádrže. Naměřené parametry prostředí dosahovaly poměrně stabilních hodnot, které v průběhu experimentu, ani v jednotlivých nádržích nedosahovaly výraznějších odchylek ($14,2 \pm 1$ °C; pH $7,7 \pm 0,1$; $8-9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ O}_2$).

Na začátku experimentu byly ryby stochasticky rozděleny do dvanácti nádrží vždy po dvaceti kusech. Expozice modelových organismů proběhla prostřednictvím dvou environmentálně relevantních koncentrací- $3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $30 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a dvou vyšších než environmentálně relevantních- $300 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $3000 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž všechny skupiny byly duplikovány a doplněny kontrolní skupinou s nulovou koncentrací sledované látky. Úroveň dexametazonu v nádržích byla v průběhu experimentu průběžně sledována (celkem 6 měření se stejnoměrnými časovými odstupy) a průměrné hodnoty těchto měření jsou uvedeny v tabulce 4. Chronická expozice trvala celkem 42 dnů, kdy se realizovaly odběry vzorků žaberní (oboustranný odběr) a jaterní tkáně a to celkem třikrát v den 0, 21 a 42. Z každé skupiny bylo odebráno 8 ryb (4 z každého akvária), jejichž usmrcení proběhlo v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. Vzorky byly uskladněny do doby dalšího využití při teplotě -80 °C.

Tabulka 4. Porovnání nominálních koncentrací s naměřeným množstvím látky v průběhu experimentu. Výsledky jsou uvedeny jako průměry naměřených hodnot v $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ se směrodatnými odchylkami (včetně duplikované skupiny). < LOQ= koncentrace pod mezí detekce.

Kontrola		$3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$		$30 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$	
a	b	a	b	a	b
< LOQ	< LOQ	3 (5,93)	4 (6,8)	26 (5,84)	26 (7,1)
$300 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$		$3000 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$			
a	b	a	b		
235 (49,12)	235,5 (33,95)	2115 (307,32)	2126 (393,45)		

Dietetické potřeby byly zaopatřovány komerční krmnou směsí (BioMar, Denmark) v množství 1 % z hmotnosti biomasy obsádky každého akvária. Krmení pokusného materiálu bylo přerušeno vždy 24 h před vzorkováním.

7.3. Biochemické testy

7.3.1. Příprava Post-mitochondriálního supernatantu (PMS)

Post-mitochondriální supernatant (PMS) byl připraven podle metodického postupu, jehož autorem je Howcroft (2009). Homogenizace vzorků ultrasonickým homogenizérem (Ystral GmbH D-7801; Dottingen, Germany) proběhla v 0,1 M K-fosfátovém pufru při objemu 1,5 ml, pH 7,4 a za současného chlazení vzorku. Ze vzniklé homogenizované tkáně bylo odebráno 0,1 ml pro stanovení úrovně peroxidovaných lipidů. Zbylá část se dále zpracovala centrifugací (10,000 g; 20 min; 4°C) pro samotnou izolaci PMS.

Množství proteinu bylo stanoveno spektrofotometricky dle Smith (1985), přičemž jako standard posloužila plazmatická bílkovina albumin. Proteinová koncentrace PMS byla upravena na úroveň 10 mg·ml⁻¹.

Instrumentální část zahrnující použití spektrofotometru Infinite M200 (TECAN, Mannedorf, Switzerland) temperovaného na 25 °C je společná všem ostatním metodám popsaným níže. Všechny vzorky byly přechodně uchovány na ledu z důvodu eliminace tepelné degradace. Vztah mezi absorbancí a trváním každé reakce vykazoval lineární závislost ($R^2 > 0,8$) a aktivita je vždy vyjádřena jednotkou substrátu hydrolyzovaného za minutu na miligram proteinu.

7.3.1. Superoxid dismutáza

Aktivita antioxidačního enzymu superoxid dismutázy byla stanovena pomocí metody Ewing et Janero (1995) s menšími modifikacemi. Reakční směs obsahovala následující komponenty: 25 µl PMS, 25 µl fenazin metosulfát (3,5 µM) ve fosfátovém pufru (50 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) a 200 µl reakčního roztoku (48 µM nitro blue tetrazolium -NBT a 80 µM NADPH).

Kompletní reakční směs byla pipetována na transparentní mikrodestičku s 96 jamkami s triplikací každého vzorku. Spektrofotometrická kvantifikace aktivity SOD proběhla při absorpenci 560 nm za použití NTB jako reakčního substrátu.

7.3.2. Kataláza

Stanovení aktivity katalázy bylo realizováno metodou podle Claiborne (1985). Měření aktivity enzymu reflektovalo snížení úrovně peroxidu vodíku v reakčním roztoku. PMS o objemu 15 μl bylo přimícháno k 100 μl 0,03 M peroxidu vodíku a 185 μl 0,05 M K-fosfátového pufru (pH 7). Spektrofotometrické stanovení dekompozice substrátu bylo stanoveno při absorpenci 240 nm a následně kalkulováno s molárním extinkčním koeficientem $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7.3.3. Glutathion peroxidáza

Měření aktivity proběhlo prostřednictvím metody vytvořené Mohandas et al. (1984). Reakční směs se skládala z 15 μl PMS ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 252 μl fosfátového pufru (stejný pufr, jako v případě katalázy), EDTA 1 mM, 1 mM azidu sodného a glutathion reduktáza (7,5 ml obsahující $1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Jako substrát byl použit 30 μl 4 mM redukovaného glutathionu a 0,8 mM NADPH. Začátek reakce iniciovalo přidání 0,5 mM peroxidu vodíku. Reakce byla kvantifikována při hodnotě absorpance 340 nm a kalkulována s extinkčním koeficientem $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7.3.4. Glutathion reduktáza

Aktivita tohoto enzymu byla stanovena pomocí metody vyvinuté Cribb et al. (1989). Pracovní postup se v některých nuancích odlišoval. Reakční roztok o celkovém objemu 150 μl obsahoval NADPH (0,4 mM), oxidovaný L-glutathion (2 mM) a dietylenetriaminepentaacetiovou kyselinu (DTPA) (1 mM) v 50 ml fosfátového pufru (stejný pufr, jako v případě katalázy). Součástí roztoku bylo také 50 μl PMS. Měření probíhalo při absorpenci 340 nm a následná kalkulace s extinkčním koeficientem $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

7.3.5. Glutathion S-transferáza

Stanovení aktivity enzymu druhé fáze detoxikace organismu proběhla na základě metody Habig (1974) upravená podle Frasco et Guilhermino (2002) pro použití se zařízením uzpůsobeným pro čtení mikrodestiček. Inkubační směs obsahovala 100 μl PMS o koncentraci 0,04 mg proteinu na ml a reakční složku. Reakční směs byla připravena smísením substrátu v podobě 10 mM 1-chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) o objemu 2,55 ml, 10 mM redukovaného glutathionu v množství 15,3 ml a K-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,5). Vlnová délka pro měření absorbance byla nastavena na 340 nm a kalkulace proběhla ve spojení s extinkčním koeficientem $9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

7.3.6. Úroveň peroxidace lipidů

Metodický postup popsaný Ohkawa (1979) posloužil pro stanovení úrovně poškození lipidů oxidativním stresem. Trichloracetová kyselina (12%) o objemu 333 μl byla smíchána se 100 μl homogenizovaného vzorku, dále bylo přidáno 200 μl 60 mM Tris-HCl s 0,1 mM DTPA a 333 μl thiobarbiturové kyseliny (0,73 %). Vzorky byly podrobeny dvěma dalším krokům v podobě centrifugace (3000 g; 5 min; 25°C) a inkubace (100 °C po dobu 1 hodiny). Stanovení absorbance proběhlo při vlnové délce 535 nm s kalkulací zahrnující extinkční koeficient $156\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

7.4. Statistická analýza

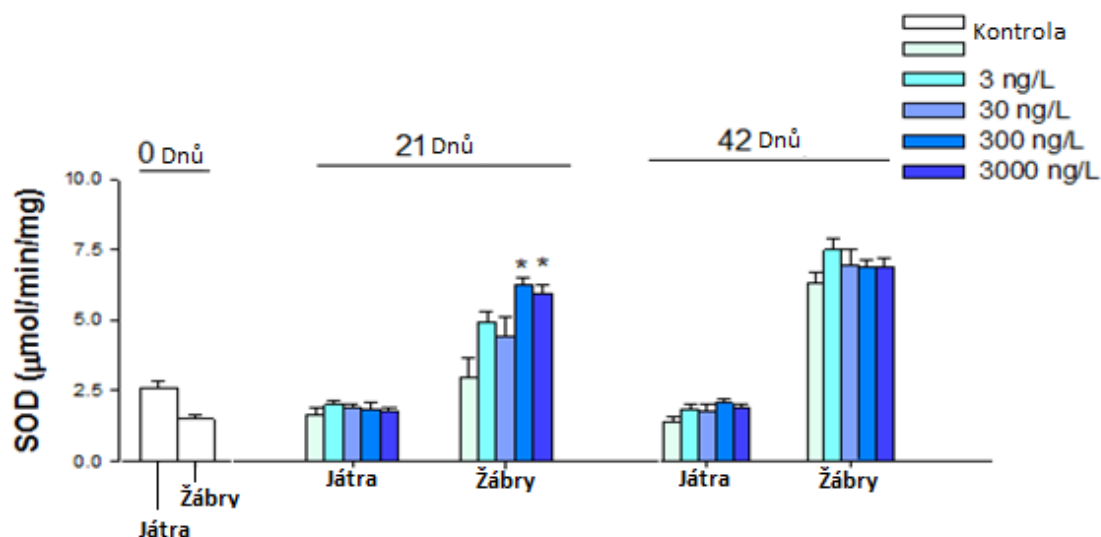
Statistické hodnocení dat bylo provedeno prostřednictvím programu Statistica 12 (StatSoft). Jako test Gaussova rozdělení posloužil Kolmogorův-Smirnovův test pomocí komparace vypočtené hodnoty testované statistiky s kritickou hodnotou, kdy je H_0 zamítnutá, za předpokladu platnosti $D_n \geq D_n \alpha$. Kritická hodnota $D_n \alpha$ byla zjištěna z tabulky kritických hodnot dle Lillieforse. Popřípadě Shapiro-Wilkovým testem normality a porovnání p-value vůči hladě významnosti (pravděpodobnost chyby prvního druhu) $\alpha=0,05$. Data byla normalizována logaritmickou transformací s prezentací výsledků po zpětné transformaci. V případě ověření normality a homoskedasticity dat (Levenův test) respektive provedení normalizace dat bylo pro stanovení mezi skupinových rozdílů použito analýzy rozptylu a parametrického

Tukeyova testu, nebo v případě heteroskedasticity dat neparametrického Kruskal-Wallisova testu, jejichž výstup umožňuje vzájemné porovnání všech skupin. Výsledky označeny za signifikantní, pokud dosahovalo $p\text{-value} < 0,05$. Pro vizualizaci výsledku posloužil sloupcový graf se střední hodnotou vymezenou průměrem a mírou variability souboru jako směrodatnou odchylkou.

8. Výsledky

8.1. Superoxid dismutáza (SOD)

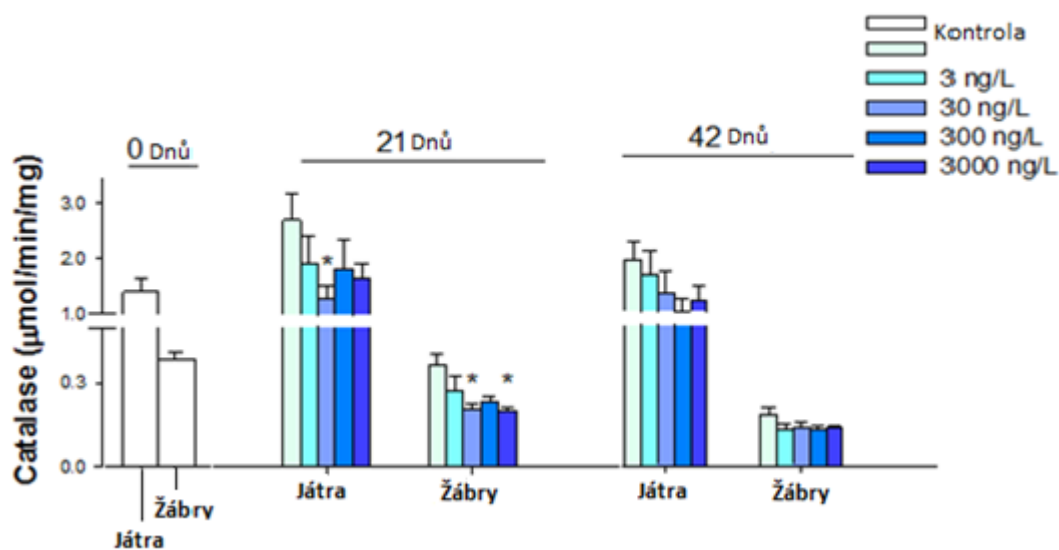
Graf 1. ukazuje výsledky měření aktivity antioxidačního enzymu (SOD) v tkáních žaber a jater pstruha duhového, jehož funkcí je katalyzování reakce superoxidu za vzniku peroxidu vodíku. Stanovení proběhlo po expozici environmentálně relevantními a vyššími koncentracemi glukokortikoidu dexametazon, která měla dobu trvání 21 a 42 dnů, přičemž aktivita byla definována také pro začátek experimentu po aklimatizaci pokusného materiálu z důvodu vytvoření kontrolní skupiny v čase nula. Signifikantní nárůst aktivity byl zjištěn pouze v žaberní tkáni u jedinců vystavených nejvyšším koncentracím v průběhu 21 dnů.



Graf 1. Porovnání aktivit SOD v jaterní a žaberní tkáni.

8.2. Cataláza (CAT)

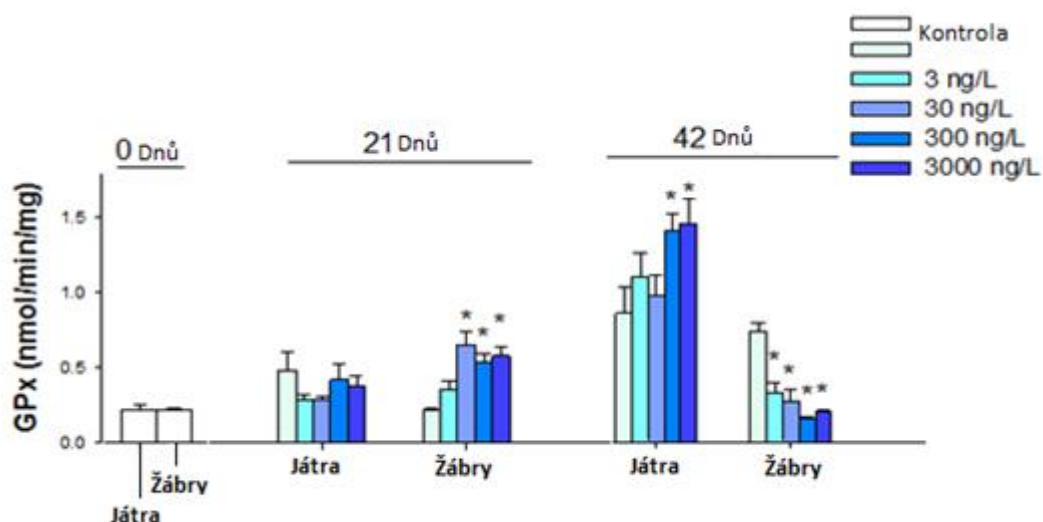
Enzym funkčně spjatý s SOD, neboť jeho funkcí je eliminace peroxidu vodíku, jejíž reakční výstup je složen z molekuly vody a kyslíku. I v tomto případě došlo k prokazatelnému ovlivnění aktivity enzymu v žaberní tkáni po uplynutí 21 dnů, rozdíl je však pozorován v koncentracích, které efekt způsobily. Prokazatelná změna byla způsobena nejvyšší environmentálně relevantní koncentrací a celkovou nejvyšší koncentrací (graf 2.).



Graf 2. Porovnání aktivit CAT v jaterní a žaberní tkáni.

8.3. Glutathionperoxidáza (GPx)

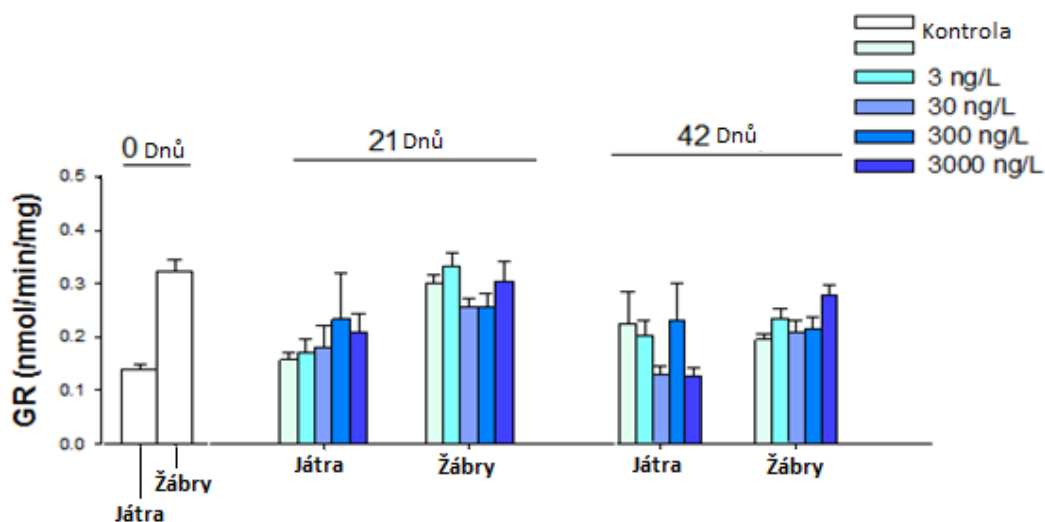
GPx je funkčně velmi podobný CAT, ale reakce funguje odlišným principem. Eliminace molekul peroxidu vodíku GPx probíhá za současné oxidace glutathionu (GSH) na GSSH. Zjištění indukované aktivity bylo pozorováno v žaberní tkáni po uplynutí 21 dnů u všech skupin vyjma kontroly a nízké environmentálně relevantní koncentrace a také v jaterní tkáni po 42 dnech u vyšších než environmentálně relevantních koncentrací. K průkaznému vyčerpání enzymatické obrany GPx vlivem všech koncentrací dexametazonu došlo v žaberní tkáni po 42 dnech (graf 3.).



Graf 3. Porovnání aktivit GPx v jaterní a žaberní tkáni.

8.4. Glutathionreduktása (GR)

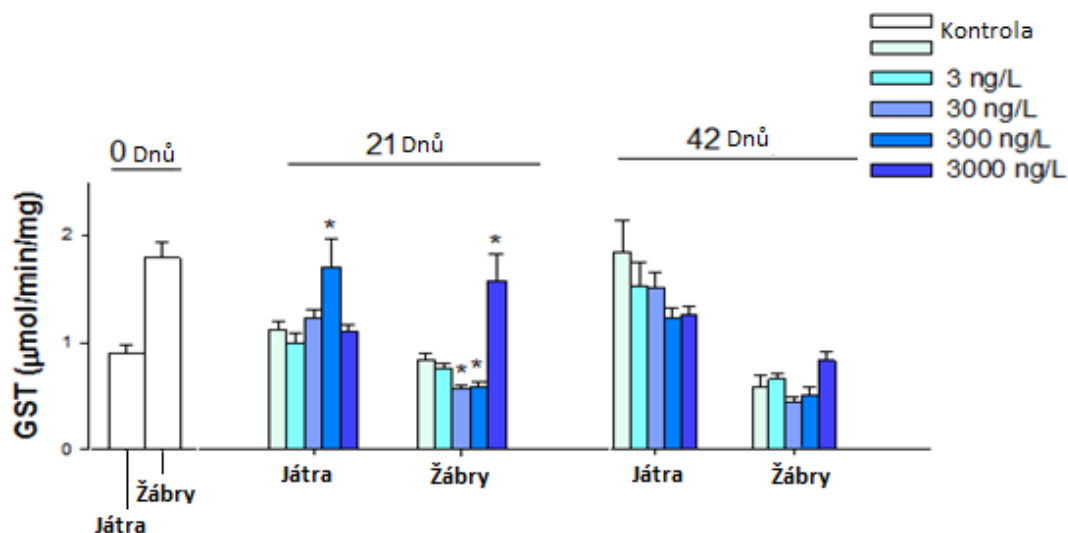
Umožňuje opětovné využití GSSH jeho navrácením zpět do redukovaného stavu GSH. Vliv dexametazonu na enzym nebyl prokázán, jak je patrné z grafu 4.



Graf 4. Porovnání aktivit GR v jaterní a žaberní tkáni.

8.5. Glutathion S-transferáza (GST)

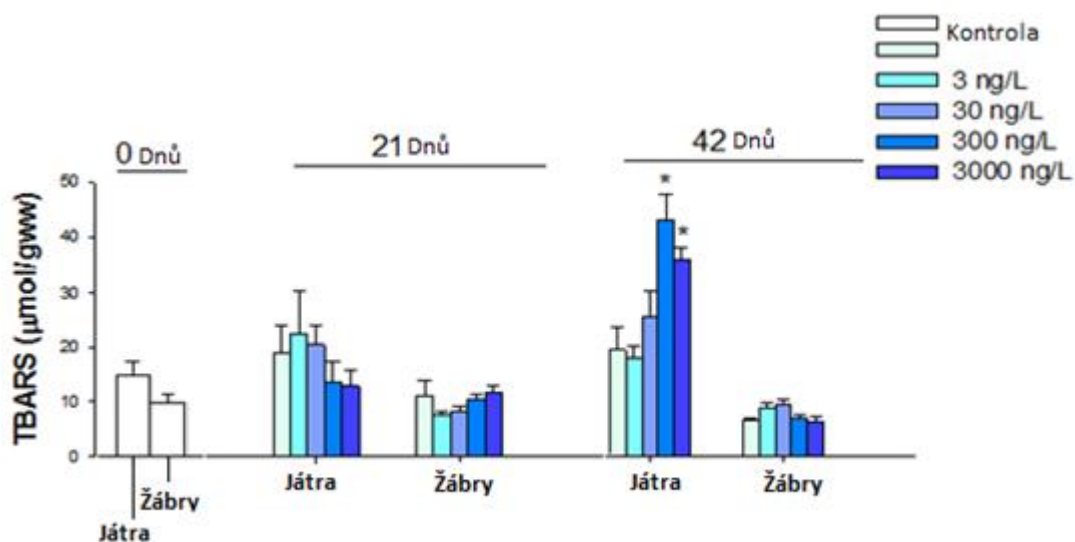
Enzym II. fáze metabolismu cizorodých látek, které mají za úkol zprostředkovat konjugaci GSH s nepolární molekulou, čímž výrazně zvyšuje její hydrosolubilitu a umožňuje tak její exkreci z biologického systému. Měření provedené u vzorků s 21 denní expozicí prokázala nárůst aktivity v jaterní tkáni při koncentrací 300 ng·l⁻¹. V případě žaber byl stejný výsledek pozorován pouze u skupiny s nejvyšší koncentrací dexametazonu. Nejvyšší environmentálně relevantní koncentrace a následující vyšší koncentrace měly opačný efekt. Expozice trvající 42 dnů nevedla k prokazatelným změnám. Uvedené výsledky dokládá graf 5.



Graf 5. Porovnání aktivit GST v jaterní a žaberní tkáni.

8.6. Reakce kyseliny thiobarbiturové (TBARS)

Reakce kyseliny thiobarbiturové se sekundárními produkty lipidové peroxidace umožňuje sledování projevu poškození oxidativním stresem lipidových molekul. Stanovení TBARS prokázalo narušení jaterních a žaberních molekul lipidů po expozici delší než 21 dnů a to při vyšších než environmentálně relevantních koncentracích (graf 6.).



Graf 6. Porovnání aktivit TBARS v jaterní a žaberní tkáni.

9. Diskuze

Základním předpokladem pro hodnocení vlivů farmaceutických polutantů na vodní organismy je determinace specifické biologické odezvy, ke které dochází v důsledku expozice cizorodou látkou. Vymezení vhodných biomarkerů pak není pouhým údajem vypovídajícím o mechanismu toxického účinku xenobiotik, ale zároveň vytváří argumentační základnu pro ochranu povrchových vod. Podstatný je také fakt, že xenobiotika nefigurují ve vodním prostředí v podobě nezávislých složek, ale jedná se o komplexní často dynamicky se měnící směs současné působící na biologický systém. Z toho vyplývá nutnost sledovat nejen účinky jednotlivých polutantů, ale také současné působení více znečišťujících látek, které se reálně v povrchových vodách současně vyskytují (Celander, 2011).

Mezi pokusy zaměřené na konkrétní mechanismus negativního účinku polutantů na organismus jsou řazeny testy sledování enzymatické aktivity cytochromu P450 respektive jeho konkrétních isoform. Dexametazon je známým induktorem aktivity isoformy cytochromu P450 3A v organismu savců. Obdobný efekt byl pozorován na buněčné kultuře jaterních buněk *Ctenopharyngodon idella* po expozici v rozpětí 10-150 μM (Li et al., 2008) a také při *in vitro* experimentu na stejném typu tkáně druhu *Poeciliopsis lucida* (Wassmur et al., 2013).

Alimentární podávání dexametazonu pstruhovy duhovému v koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ indukuje nárůst metabolizace substrátu CEC (3-cyano-7-ethoxycoumarin), který reflektuje aktivitu cytochromálních enzymů 1A2, 2C9, 2C19. Stejná dávka má za následek také nárůst aktivity EROD (7-ethoxyresorufin-O-dealkylace), jenž reflektuje aktivitu 1A1, 1A2, 1B1 a MROD (7-metoxyresorufin-O-dealkylace) odpovídající aktivitě isoformy 1A2 (Smith et Wilson, 2010).

Naproti tomu *in vitro* studie provedená Burkina et al. (2013), jejíž cílem bylo sledování inhibičního účinku dexametazonu na jaterní cytochromy (1A2 a 3A) pstruha duhového, neprokázalo v množství 1, 10, 50, a 100 μM žádný efekt.

Uvedené studie obsahují informace o biochemické odezvě prvního fáze detoxikačního metabolismu ryb jako reakci na expozici glukokortikoidem dexametazon, přičemž některé práce ukazují podobnou odezvu, jakou je možné pozorovat i u savců, jejichž metabolické pochody jsou obecně vzato ve srovnání s

rybami lépe popsané. Ačkoliv je možné pozorovat jisté podobnosti v odezvě tohoto enzymatického systému, nelze předpokládat, že tomu tak bude vždy (Franklin et al., 1980). Z uvedeného logicky vyplývá, že i ostatní enzymatické procesy vykazují diverzitu projevu reakce na vnější podmínky, jakými jsou polutanty, neboť poikilotermní metabolismus ryb je nejen velmi odlišný, ale také evolučně starší a vyžaduje tak vlastní nezávislý výzkum.

Syntetické glukokortikoidy včetně dexametazonu jsou prokazatelným induktorem oxidativního stresu v těle savců i ptáků. Krysy vystavené po dobu 7 dnů koncentraci dexametazonu $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ krmiva prokazatelně vykazují peroxidační poškození buněčných membrán hippokampu a celkové zvýšení množství mitochondriálního superoxidu v hippokampální a kortexové části mozku (Barichello et al., 2011). Obsah dexametazonu odpovídající dávce 4 mg na kilogram hmotnosti zvířete a den vede u nosnic k výraznému snížení produkce vajec i jejich hmotnosti. Současně se snížením produkčních parametrů dochází ke zvýšení peroxidace lipidů v krevní plasmě, játrech i samotných vejcích (Eid et al., 2008).

V porovnání se sumou realizovaných výzkumů na homiootermních obratlovcích nedosahují naše znalosti na tomto poli v souvislosti s rybami a jinými vodními organismy dostatečné úrovně.

Hlavní devízou *in vivo* designu experimentu je jeho schopnost zahrnout do výsledku vzájemné komplexní vztahy odlišných tkáňových struktur i biochemických reakcí, ke kterým v biologickém systému běžně dochází, ačkoliv nemusí být vždy plně znám mechanismus účinku (Kučera et al., 2006). Přes jisté politické i obecné sociální nátlaky na substituci pokusných zvířat (včetně ryb) alternativami, které nezahrnují použití tohoto pokusného materiálu, ale například tkáňových kultur (*in vitro*) nebo tzv. *in silico* metod jakou je QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), mají *in vivo* experimenty z důvodu souhrnného pohledu na biochemické odezvy organismu svou opodstatněnou a obtížně zastupitelnou roli.

V případě naší studie byl použit jako modelový organismus pstruh duhový, jenž je dlouhodobě jedním z nejvíce využívaných rybích druhů pro *in vivo* testování toxického účinku cizorodých látek. Jeho aplikace v experimentálním modelu nabízí kromě velkého množství již existujících údajů o negativních účincích látek také další benefity, v podobě dostatečné velikosti pro snadnou manipulaci ve srovnání s menšími

laboratorními druhy ryb, ale především existence několika inbridních kmenů, které jsou vhodné pro laboratorní testy (Carvan et al., 2007).

Experimentální měření aktivity antioxidantních enzymů bylo v našem experimentu provedeno na žaberní a jaterní tkáni. Respirační tkáň lze považovat za vhodný prostředek toxikologických studií. Přes jejich rozměrný povrch je respiračními pohyby skřelového aparátu „zpracován“ objem vody, který během hodiny několika set násobně převyšuje objem těla živočicha a tkáň je tak v přímé kontinuální expozici vodnímu prostředí a všem látkám v něm obsaženým. Současně může zastupovat roli vstupního článku pro široké spektrum polutantů (Erickson et al., 2008). Naproti tomu jaterní tkáň plní úlohu orgánu udržujícího homeostázu vnitřního prostředí syntézou a sekrecí mnoha molekul, které se podílejí exkreci endogenních molekul a snižování jejich případného negativního dopadu (Hinton et al., 2001).

Enzymatická eliminace super oxidu nevykazovala v žádné ze skupin vzorků jater prokazatelnou změnu aktivity. Výjimku tvořila žaberní tkáň po 21 denní expozici s vyššími než environmentálně relevantními koncentracemi, kde byl nárůst aktivity statisticky prokazatelný. V komparaci se studií Guiloski et al. (2015), která sledovala vývoj aktivit antioxidantních enzymů v játrech *Hoplias malabaricus* po alimentární podávání dexametazonu v koncentracích 0,03, 0,3 a 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ krmiva, bylo dosaženo stejného výsledku.

V souvislosti s nárůstem aktivity SOD v žaberní tkáni v průběhu 21 denní expozice, kdy došlo k navýšení produkce peroxidu vodíku tímto enzymem, byl pozorován možný důsledek na další část systému enzymatické obrany organismu. Tento vývoj nadměrné produkce reaktivní formy kyslíku měl patrně za následek inhibici funkčně spjatého enzymu CAT. Průkazně však došlo ke snížení aktivity CAT u nejvyšší environmentálně relevantní a celkové nejvyšší koncentrace. Jaterní tkáň vykazovala snížení aktivity enzymu při nejvyšší environmentálně relevantní koncentraci, čímž výsledek odbočuje od práce Guiloski et al. (2015), kde došlo k nárůstu aktivity po vystavení koncentraci 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V kontextu s inhibicí CAT v žaberní tkáni v průběhu 21 dnů bylo pozorováno zvýšení aktivity druhého enzymu katalyzujícího rozklad peroxidu vodíku GPx a to u tří nejvyšších koncentrací (včetně vysoké environmentálně relevantní koncentrace). Naopak v žaberní tkáni po 42 dnech bylo zjištěno signifikantní snížení funkce enzymu u

všech koncentrací. Lze usuzovat, že nadměrná produkce peroxidu vodíku vyústila ve vyčerpání aktivity GPx a tím byla znemožněna jeho další funkce, při odstraňování ROS. Zajímavá je skutečnost, že navzdory prokazatelným změnám enzymatické aktivity GPx, nedošlo k žádnému ovlivnění funkce GR, se kterým je spjatá redukce glutathionu, jehož oxidace je součástí reakce eliminující peroxid vodíku GPx. Jaterní GPx významně zvýšil svou aktivitu pouze během 42 dnů u dvou nejvyšších koncentrací, zde se náš výstup rozchází s Guiloski et al. (2015), kde byl prokázán nárůst aktivity GPx v játrech při expozici 0,3 and 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, stejné koncentrace měly za následek také nárůst aktivity GST a peroxidační poškození lipidů.

Pozoruhodný výsledek ukázalo měření aktivity GST. Enzym druhé fáze detoxikačního metabolismu v žábách významně snížil v průběhu 21 dnů v porovnání s kontrolou svou aktivitu při vysoké environmentální koncentraci a také v koncentraci vyšší. Během stejného období však nejvyšší koncentrace způsobila vysoký nárůst aktivity enzymu. Údaje z měření po 42 dnech však již žádný prokazatelný výsledek neodhalily. Tento trend by mohl být způsoben nekonzistentní reakcí enzymatického systému na odlišné koncentrace dexametazonu v průběhu ontogeneze, neboť funkčnost enzymů se v průběhu vývoje organismů mění a je možné například pozorovat rozdíly mezi jedinci v adultní a juvenilní periodě (Wiegand et al., 2000).

Další dílčí výsledek experimentu v podobě měření reakce kyseliny thiobarbiturové s malondialdehydem neprokázal významné poškození buněčných membrán, ani jiných lipidových molekul obsažených v jaterní, nebo žaberní tkáni při environmentálně relevantních koncentracích. Pouze jaterní tkáň po 42 denní expozici dvěma nejvyššími koncentracím vykazovala průkazné poškození buněčných molekul. Metoda TBARS je však do jisté míry limitována svojí schopností reakce s jinými sloučeninami, než jen sekundárními produkty lipidové peroxidace. Mezi takové látky patří například bilirubin, který tak může výsledné hodnoty zkreslovat (Paulová et al., 2004).

10. Závěrečné shrnutí

Cílem této práce bylo posouzení nebezpečnosti frekventovaně využívaného syntetického glukokortikoidu dexametazon, jehož rezidua kontaminují vodní toky prostřednictvím čistíren odpadních vod, vyústěním odpaní vody ze zemědělských podniků (především v asijských zemích) a producentů farmaceutických látek. Hodnocení rizika proběhlo chronickou *in vivo* expozicí pstruha duhového environmentálně relevantním koncentracím léčiva dexametazon. V žaberní a jaterní tkáni pak byly sledovány biomarkery oxidativního stresu.

Reaktivní formy kyslíku jsou běžnou součástí celé řady metabolických procesů všech aerobních živočichů, avšak nerovnováha obranného mechanismu ve prospěch nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku může mít za následek vážné poškození biomolekul organismu, které v konečném důsledku narušuje nejen homeostázu a kvalitu života jedince, ale může negativně poznamenat celou populaci, případně i ekosystém.

Výsledky předložené studie prokazatelně potvrdily reakci enzymatické činnosti na oxidativní stres indukovaný environmentálně relevantními koncentracemi farmaceutického polutantu a to především v žaberní tkáni, která je tomuto stresoru bezprostředně kontinuálně vystavena. Experimentálním výstupem tedy byla potvrzena potencionální nebezpečnost glukokortikoidu dexametazon pro necílové organismy vyskytující se v zatíženém vodním ekosystému.

Použitá literatura

Arsand, D. R.; Kümmerer, K.; Martins, A. F. Removal of dexamethasone from aqueous solution and hospital wastewater by electrocoagulation. *Science of the Total Environment* **2013**, *443*, 351–357.

Bandyopadhyay, U.; Das, D.; Banerjee, R. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current science* **1999**, *77* (5), 658–666.

Barichello, T.; Santos, A. L. B.; Silvestre, C.; Generoso, J. S.; Cipriano, A. L.; Petronilho, F.; Dal-Pizzol, F.; Comim, C. M.; Quevedo, J. Dexamethasone treatment reverses cognitive impairment but increases brain oxidative stress in rats submitted to pneumococcal meningitis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2011**, *2011*, 1–7.

Bartell, S. M. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment — A Brief Review and Evaluation. *Environmental Bioindicators* **2006**, *1*, 60–73.

Behl, Ch.; Lezoualc'h, F.; Trapp, T.; Widmann, M.; Skutella, T.; Holsboer, F. Glucocorticoids Enhance Oxidative Stress-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons in Vitro. *Endocrinology* **1996**, *138* (1), 101–106.

Botsoglou, N. A.; Fletouris, D. J.; Papageorgiou, G. E.; Vassilopoulos, V. N.; Mantis, A. J.; Trakatellis, A. G. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for measuring of Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, *42*, 1931–1937.

Burkina, V.; Zamaratskaia, G.; Randák, T.; Li, Z. H.; Fedorova, G.; Pickova, J.; Žlábek, V. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere* **2012**, *92*, 1099–1104.

Carvan, M. J.; Gallagher, E.; Goksøyr, A.; Hahn, M. E.; Larsson, D. G. J. roundtable discussion fish models in toxicology. *Zebrafish* **2007**, *4* (1), 9–20.

Celander, M. C. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* **2011**, *105*, 72–77.

Claiborne, A. Catalase activity. In *CRC handbook of methods in oxygen radical research*; Greenwall, R. A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1985; pp 283–284.

Costantini, D.; Marasco, V.; Møller, A. P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B* **2011**, *181*, 447–456.

Cribb, A. E.; Leeder, J. S.; Spielberg, S. P. Analytical Biochemistry. *Use of a microplate reader in an assay of glutathione-reductase using 5,5'-dithiobis (2 - nitrobenzoic acid)* **1989**, *183*, 195–196.

Daughton, C. G.; Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 907–938.

Davies, K. J. A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life* **2000**, *50*, 279–289.

de Kruijf, H. A. M. Extrapolation through hierarchical levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **1991**, *100* (1-2), 291–299.

Deavall, D.; Martin, E.; Horner, J.; Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* **2012**, *2012*, 1–13.

DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Isidori, M.; Lavorgna, M.; Previtiera, L.; Rubino, M.; Temussi, F. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere* **2004**, *54*, 629–637.

Dey, I.; Buda, C.; Wiik, T.; Halver, J. E.; Farkas, T. Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90*, 7498–7502.

Eid, Y.; Ebeid, T.; Moawad, M.; El-Habbak, M. Vitamin e supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in laying hens. *Egyptian Poultry Science Association* **2008**, *28* (3), 785–798.

Erickson, R. J.; Nichols, J. W.; Cook, P. M.; Ankley, G. T. Bioavailability of chemicals contaminants in Aquatic systems. In *The toxicology of fishes*; Di Giulio, R. T., Hinton, D. E., Eds.; Taylor and Francis group, 2008; pp 9–54.

Evansa, M. D.; Dizdaroglu, M.; Cooke, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* **2004**, *567* (1), 1–61.

Ewing, J. F.; Janero, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* **1995**, *232*, 243–248.

Fariss, M. W.; Chan, C. B.; Patel, M.; van Houten, B.; Orrenius, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions* **2005**, *5* (2), 94–111.

Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **2006**, *76*, 122–159.

Filho, D. W. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Bioscience* **2007**, *12*, 1229–1237.

Franklin, R. B.; Elcombe, C.; Vodcnik, M.; Lech, J. Comparative aspects of the disposition and metabolism of xenobiotics in fish and mammals. *Federation Proceedings* **1980**, *39* (13), 3144–3149.

Frasco, M. F.; Guilhermino, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* **2002**, *26*, 149–156.

Fuksa, J. K. Farmaka ve vodách: znečištění, na které nejsme připraveni. *Vodní hospodářství* **2012**, *62* (6), 10–12.

Gajdošová, M.; Syslová, K.; Kačer, P. Molekulárně diagnostický přístup k onemocněním indukovaným oxidativním stresem. *Chemické listy* **2012**, *106*, 11–16.

Guiloski, I. C.; Ribas, J. L. C.; Pereira, L. D. S.; Neves, A. P. P.; Silva de Assis, H. C. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2015**, *114*, 204–211.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione s-transferases - first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249*, 7130–7139.

Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35* (5), 1147–1150.

Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1993**, *57* (7), 15–25.

Haque, N.; Thrasher, K.; Werk, E. E.; Knowles, H. C.; Sholiton, L. J. Studies on Dexamethasone Metabolism in Man: Effect of Diphenylhydantoin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1971**, *34* (1), 44–50.

Hinton, D. E.; Segner, H.; Braunbeck, T. Toxic responses of the liver. In *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*, 1st ed.; Schlenk, D., Benson, W. H., Eds.; Taylor & Francis: 11 New Fetter, London, 2001; Vol. 1, pp 248–298.

Hoshi, T.; Heinemann, H. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology* **2001**, *531* (1), 1–11.

Howcroft, C. F.; Amorim, M. J. B.; Gravato, C.; Guilhermino, L.; Soares, A. M. V. M. 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* **2009**, *35*, 318–324.

Chang, H; Hu, J; Shao, B. Occurrence of Natural and Synthetic Glucocorticoids in Sewage Treatment Plants and Receiving River Waters. *Environmental science & technology* **2007**, *41* (10), 3462–3468.

Istasse, L.; Haan, V.; de Eenaeme, C.; van Butts, B.; Baldwin, P.; Gielen, M.; Demeyer, D.; Bienfait, J. Effects of dexamethasone injections on performances in a pair of monozygotic cattle twins. *Journal of Animal Physiology, Section A: Animal Nutrition* **1989**, *62*, 150–158.

Kawabata, K.; Suqihara, K.; Sanoh, S.; Kitamura, S.; Ohta, S. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A, -B and -C irradiation. *Journal of Toxicological Sciences* **2013**, *38* (2), 215–223.

Ketterer, B.; Meyer, D.; Coles, B.; Taylor, J. B. Glutathione transferases. In *Cellules Hépatiques et Médicaments*, 1st ed.; Guillouzo, A., Ed.; John Libbey Eurotext Ltd: Motrouge, France, **1988**; Vol. 164, pp 69–80.

Kondala Rao, A.; Shaha, Ch. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress – induced male germ cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *29* (10), 1015–1027.

Koop, R. D. Alcohol Metabolism's Damaging Effects on the Cell A Focus on Reactive Oxygen Generation by the Enzyme Cytochrome P450 2E1. *Alcohol Research & Health* **2006**, *29* (4), 274–280.

Koplin, D.; Furlong, E.; Meyer, M.; Thurman, E.; Zaugg, S.; Barber, L.; et al. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental science and technology* **2002**, *36*, 1202–1211.

Kostopoulou, M.; Nikolaou, A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (11), 1023–1035.

Kotlářová, L.; Skála, B. Cílená detoxikace jako podpora účinné farmakoterapie. *Practicus* **2011**, *3*, 28–30.

Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z.; Vaněk, T. Léčiva – „Nový“ environmentální polutant. *Chemické listy* **2009**, *103*, 540–547.

Kučera, O.; Lotková, H.; Křiváková, P.; Roušar, T.; Červinková, Z. Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá fyziologie* **2006**, *55* (3), 52–59.

Kugathas, S.; Williams, R. J.; Sumpter, J. P. Prediction of environmental concentrations of glucocorticoids: The River Thames, UK, as an example. *Environment International* **2012**, *40*, 15–23.

Kuka, S.; Tatarkova, Z.; Kaplan, P. Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta medica martiniana* **2012**, *12*(1), 5–11.

Lafortune, G.; Balestat, G. Pharmaceutical consumption. in *health at a glance: Europe*, 1st ed.; 2012; pp 88–89.

Lalone, C. A.; Villeneuve, D. L.; Olmstead, A. W.; Medlock, E. K.; Kahl, M. D.; Jensen, K. M.; Durhan, E. J.; Makynen, E. A.; Blanksma, Ch. A.; Cavallin, J. E.; Thomas, I. m.; et al. effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31* (3), 611–622.

Larsson, D. G. J.; de Pedro, C.; Paxeus, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *148*, 751–755.

Lewis, D. F. Review Oxidative stress: the role of cytochromes P450 in oxygen activation. *Journal of chemical technology and biotechnology* **2002**, *77*, 1095–1100.

Li, D.; Yang, X.; Zhang, S.; Lin, M.; Yu, W.; Hu, K. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2008**, *147* (1), 17–29.

Li, X.; Fang, P.; Mai, J.; Choi, E. T.; Wang, H.; Yang, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology* **2013**, *6* (19), 1–19.

Liebel, F.; Kaur, S.; Ruvolo, E.; Kollias, N.; Southall, M. E. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. *Journal of Investigative Dermatology* **2012**, *132*, 1901–1907.

Liu, S.; Ying, G.; Zhao, J.; Chen, F.; Yang, B.; Zhou, L.; Lai, H. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (10), 1367–1378.

Liu, S.; Ying, G.; Zhou, L.; Zhang, R.; Chen, Z.; Lai, H. Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Research* **2012**, *46*, 3754–3768.

Martínez-A'lvarez, R. M.; Morales, A. E.; Sanz, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **2005**, *15*, 75–88.

Maynard, S.; Schurman, S. H.; Harboe, Ch.; Souza-Pinto, N. C.; Bohr, V. A. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **2009**, *30* (1), 2–10.

Medsafe. DBL™ Dexamethasone sodium phosphate injection, 2011. <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/d/DbIDexamethasoneNewFormulationinj.pdf> (accessed Sept 11, 2014).

Minagawa, K.; Kasuya, Y.; Baba, S.; Knapp, G.; Skelly, J. Identification and quantification of 6 beta-hydroxydexamethasone as a major urinary metabolite of dexamethasone in man. *Steroids* **1986**, *47* (2-3), 175–188.

Mohandas, J.; Marshall, J. J.; Duggin, G. G.; Horvath, J. S.; Tiller, D. J. Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney - possible implications in analgesic nephropathy. *Biochemical Pharmacology* **1984**, *33*, 1801–1807.

Moore, D. E. Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Safety* **2002**, *25* (5), 345–372.

Myeloma. Dexametazon a jine-steroidy. <http://www.myeloma.cz/res/file/brozury/dexametazon-a-jine-steroidy.pdf> (accessed Oct 06, 2014).

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **1979**, *95*, 351–358.

Paulová, H.; Bochořánková, H.; Táborská, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* **2004**, *98*, 174–179.

Piram, A.; Salvador, A.; Gauvrit, J.; Lanteri, P.; Faure, R. Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. *Talanta* **2008**, *74*, 1463–1475.

Piterková, J.; Tománková, K.; Luhová, L.; Petřivalský, M.; Peč, P. Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **2005**, *99*, 455–466.

Proctor, P. H.; Reynolds, E. S. Free radicals and diseases in man. *Physiological Chemistry and Physics and Medical* **1984**, *16*, 175–195.

Proteau, P. J. Steroid Hormones and therapeutically related compounds. In *Organic Medicinal and pharmaceutical chemistry*, 12th ed.; Beale, J. M., Block, J. H., Eds.; 2010; pp 819–864.

Racek, J.; Holeček, V. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* **1999**, *93*, 774–780.

Segall, M. An ab Initio Study of Biological Systems. A dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy, University of Cambridge, **1997**, 55-59.

Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2008/105/ES ze dne ze dne 16. prosince 2008. *Úřední věstník Evropské unie L 348/84*, 24. 12. 2008.

Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013, *Úřední věstník Evropské unie L 226/1*, 24. 8. 2013.

Smith, E. M.; Wilson, J. Y. Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16-carbonitrile, rifampicin, and beta-naphthoflavone. *Aquatic Toxicology* **2010**, *97*, 234–333.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, *150*, 76–85.

Storey, K. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **1996**, *29*, 1715–1733.

Šídlová, P.; Podlipná, R.; Vaněk, T. Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chemické listy* **2011**, *105*, 8–14.

Štěpánová, S. Hodnocení toxicity látek a přípravků pro organismy vodního prostředí. *Vodní toxikologie pro rybáře*, 1st ed.; Vodňany, **2014**; pp 95–130.

Ternes, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* **1998**, *32* (11), 3245–3260.

Thorpe, K. L.; Cummings, R. I.; Hutchinson, T. H.; Scholze, M.; Brighty, G.; Sumpter, J. P.; Tyler, C. R. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental science technology* **2003**, *37* (6), 1142–1149.

Timbrell, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology* **1998**, *126* (1), 1–12.

Tocher, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* **2003**, *11* (2), 107–184.

Tölgyesi, Á.; Verebey, Z.; K. Sharma, V.; Kovacsics, L.; Fekete, J. Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **2010**, *78*, 972–979.

Tomlinson, E. S.; Lewis, D. F. V.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Kroemer, H. K.; Back, D. J. In vitro metabolism of dexamethasone (dex) in human liver and kidney: the involvement of cyp3a4 and cyp17 (17, 20 lyase) and molecular modelling studies. *Biochemical Pharmacology* **1997**, *54*, 605–611.

Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, *64* (2), 178–189.

van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2003**, *13* (2), 57–149.

Wassmur, B.; Grans, J.; Norstrom, E.; Wallin, M.; Celander, M. C. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on key detoxification mechanisms and cytoskeleton in *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma, PLHC-1 cell line. *Toxicology in Vitro* **2013**, *27* (1), 111–120.

Wiegand, C.; Pflugmacher, S.; Oberemm, A.; Steinberg, Ch. Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology* **2000**, *85* (4), 413–422.

Yoshioka, T.; Kawamura, T.; Meyrick, B.; Beckman, J.; Hoover, R.; Yoshida, H.; Ichikawa, I. Induction of manganese superoxide dismutase by glucocorticoids in glomerular cells. *Kidney International* **1994**, *45* (1), 211–219.

Zákon č. 246/ 1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. *Sbírka zákonů ČR*.

Zangar, R. C.; Davydov, D. R.; Verma, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2003**, *199* (3), 316–331.

Seznam příloh

Obrázky

Obrázek 3. Schéma distribuce léčiv do vodního prostředí.	12
Obrázek 4. Strukturní vzorec dexametazonu	13
Obrázek 3. Strukturní vzorce fotodegradačních produktů dexametazonu	18
Obrázek 4. Návaznost jednotlivých kroků nadměrné produkce ROS	21
Obrázek 5. Mitochondriální geneze ROS	24
Obrázek 6. Průběh katalytického cyklu CYP450	25
Obrázek 7. Průběh navazujících reakcí enzymatických antioxidantů	29
Obrázek 8. Průběh toxického účinku způsobeného polutantem	34

Fotografické přílohy

Příloha 1. Akvárium s nejvyšší nominální koncentrací	64
Příloha 2. Předběžné uchování jaterních vzorků	64
Příloha 3. Průběh vzorkování jaterní tkáně	65
Příloha 4. Homogenizace žaberní a jaterní tkáně	65
Příloha 5. Vážení a centrifugace vzorků	66
Příloha 6. Příprava TBARs	66
Příloha 7. Výsledek reakce TBARs	67
Příloha 8. Výstup všech reakcí pohromadě.	67
Příloha 9. Začátek spektrofotometrického měření.	68

Tabulky

Tabulka 1. Shrnutí akutních a chronických koncentrací dexametazonu	20
Tabulka 2. Přehled reaktivních forem kyslíku.	22
Tabulka 3. Údaje o hmotnosti, délce a pohlaví ryb.	39
Tabulka 4. Porovnání nominálních koncentrací s naměřeným množstvím látky v průběhu experimentu.	40

Grafy

Graf 1. Porovnání aktivit SOD v jaterní a žaberní tkáni	45
Graf 2. Porovnání aktivit CAT v jaterní a žaberní tkáni	46
Graf 3. Porovnání aktivit GPx v jaterní a žaberní tkáni	46
Graf 4. Porovnání aktivit GR v jaterní a žaberní tkáni	47

Graf 5. Porovnání aktivit GST v jaterní a žaberní tkáni	48
Graf 6. Porovnání aktivit TBARS v jaterní a žaberní tkáni	48

Fotografické přílohy



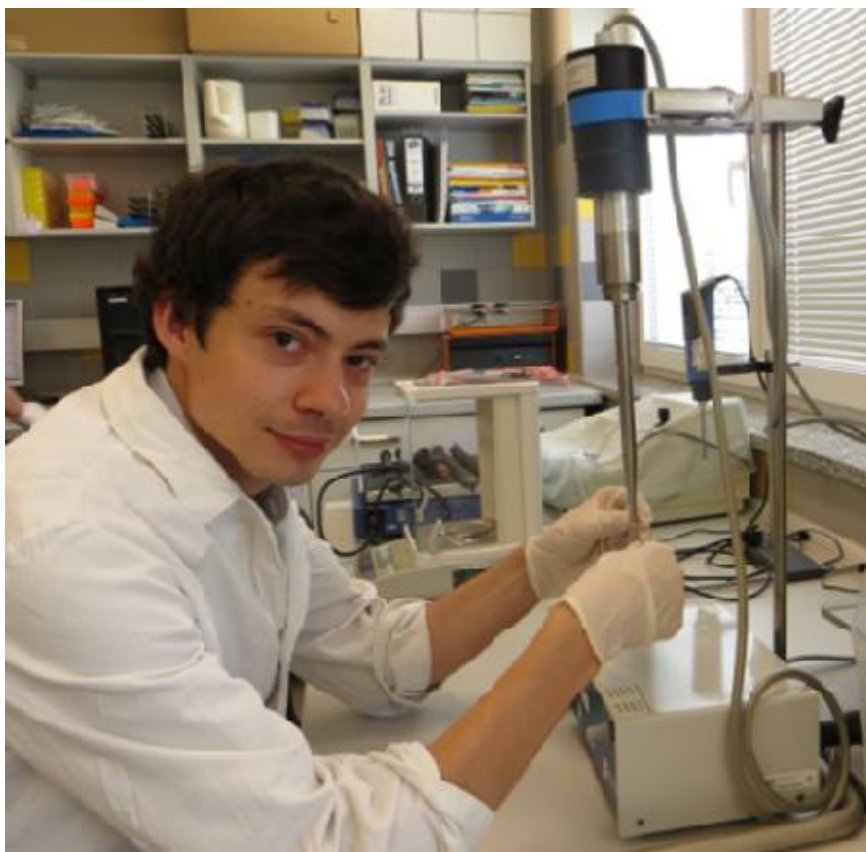
Příloha 1. Akvárium s nejvyšší nominální koncentrací.



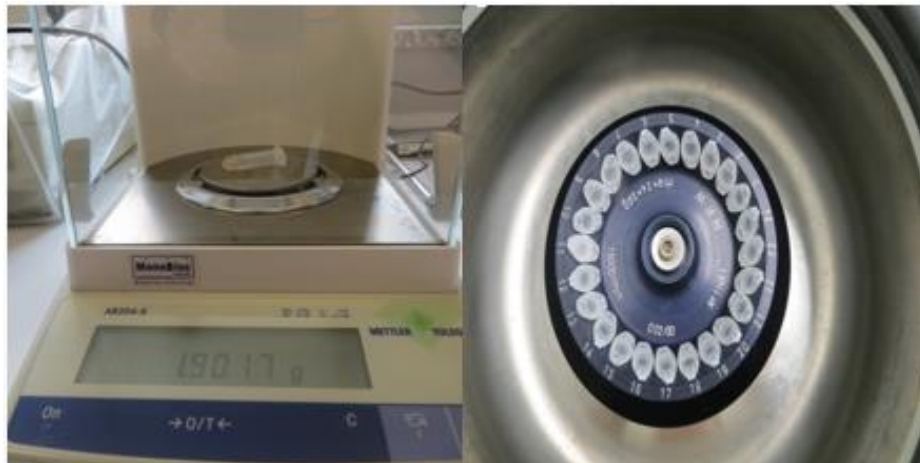
Příloha 2. Předběžné uchování jaterních vzorků.



Příloha 3. Průběh vzorkování jaterní tkáně.



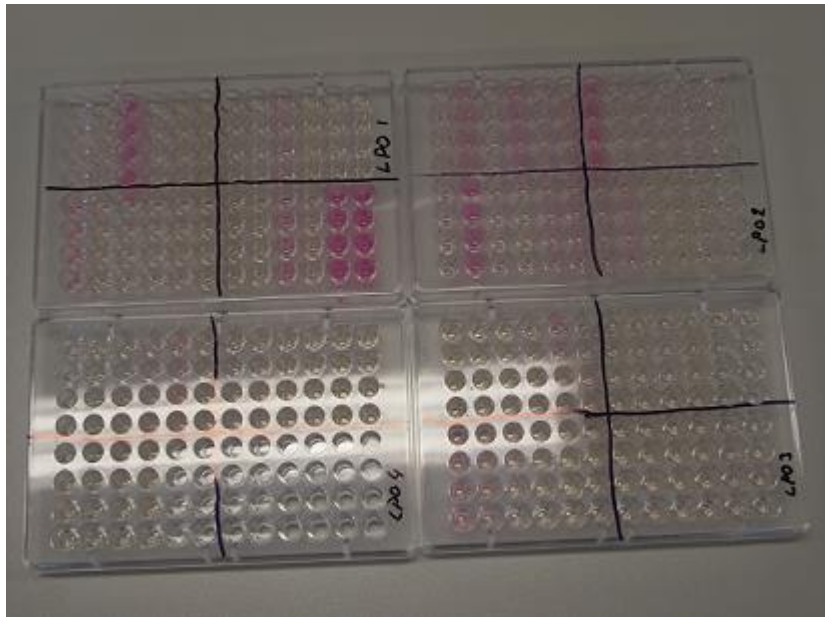
Příloha 4. Homogenizace žaberní a jaterní tkáně.



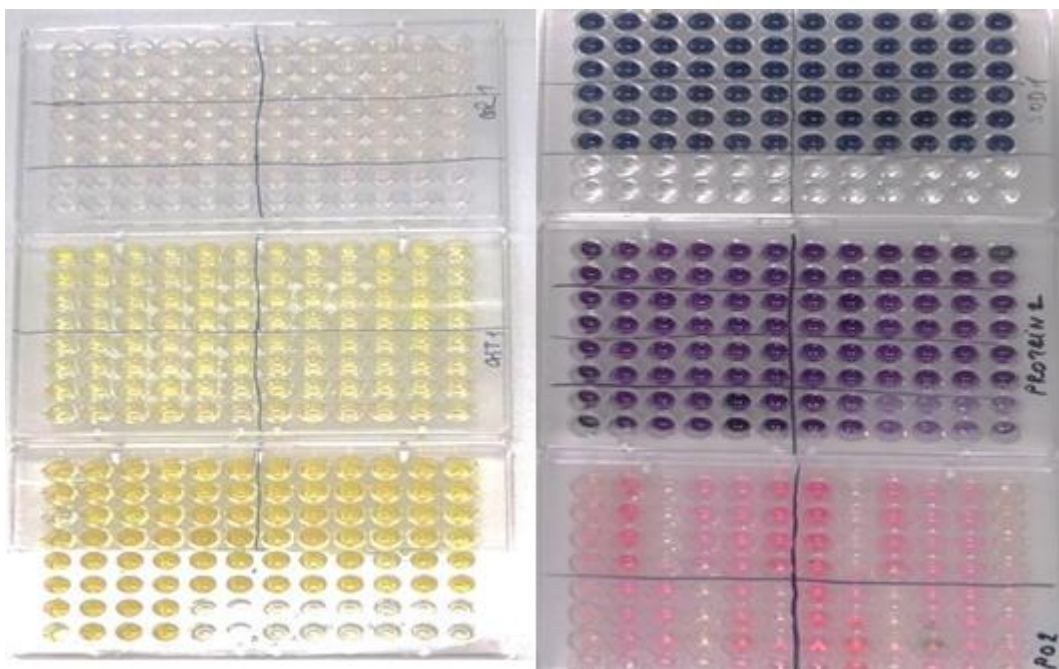
Příloha 5. Vážení a centrifugace vzorků.



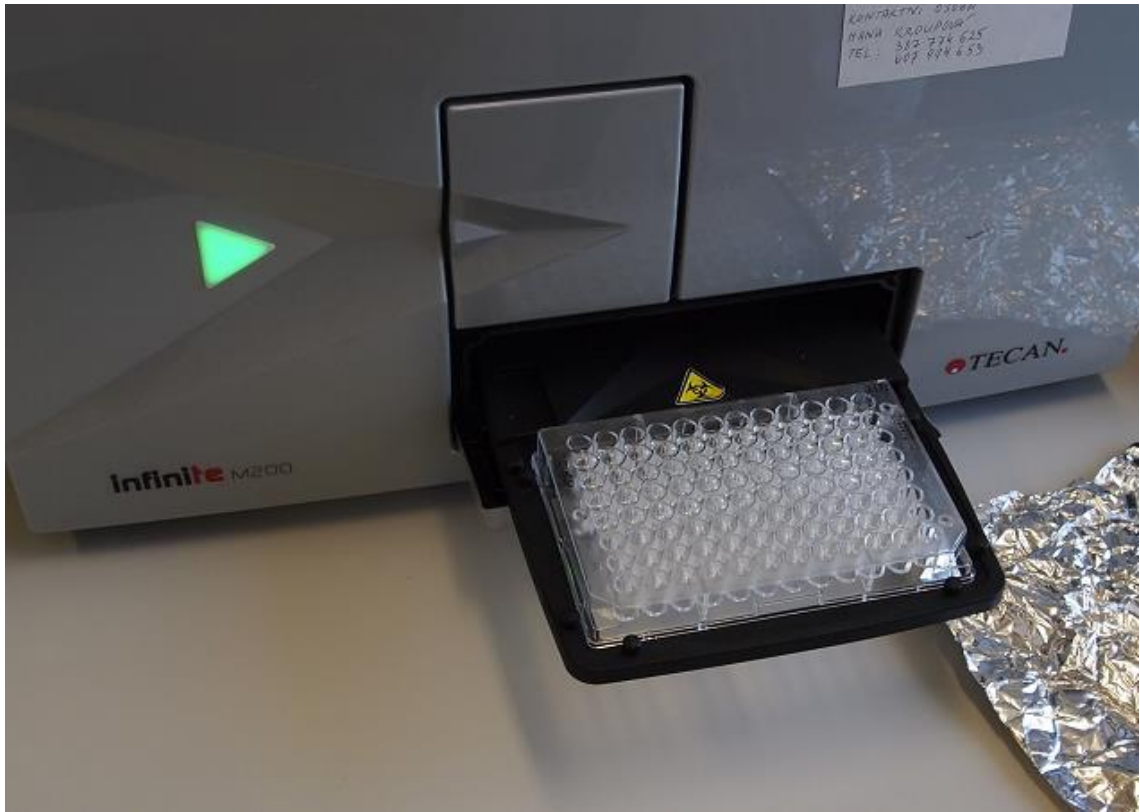
Příloha 6. Příprava TBARS.



Příloha 7. Výsledek reakce TBARs.



Příloha 8. Výstup všech reakcí pohromadě.



Příloha 9. Začátek spektrofotometrického měření.

Abstrakt

V posledních letech je farmaceutickým polutantům ve vodním prostředí věnováno velké množství pozornosti. Vlivem lidské činnosti jsou povrchové vody zatěžovány velkým množstvím látek včetně produktů osobní péče, mezi které jsou řazena také léčiva. Předmětem této práce je posouzení vlivu environmentálně relevantních koncentrací syntetického glukokortikoidu dexametazon na vodní organismy prostřednictvím biomarkerů oxidativního stresu. Princip experimentu spočíval v chronické *in vivo* expozici modelového organismu (pstruh duhový) dávkám tohoto léčiva a následném sledování aktivit antioxidantního enzymatického systému v žaberní a jaterní tkáni. Výsledky pokusu prokázaly odezvu enzymatických ochranných mechanismů na zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku indukovanou tímto léčivem v environmentálně relevantních koncentracích a to především v žaberní tkáni. Naše výsledky tak dokládají reálné riziko, které toto xenobiotikum pro vodní organismy představuje.

Klíčová slova: Dexametazon, biomarker, oxidativní stres, pstruh duhový.

Abstract

Pharmaceutical pollutants have been aim of many recent aquatic environment studies. Due to human activities surface waters are polluted with plenty of substances, including products of personal care, which are ranked among a number of pharmaceuticals. The main goal of this work is to assess the impact of environmentally relevant concentrations of the synthetic glucocorticoid dexamethasone on aquatic organisms through biomarkers of oxidative stress. The principle of this experiment was chronic *in vivo* exposure model organisms (rainbow trout) to doses of this drug and the subsequent monitoring activities of antioxidant enzyme system in the liver and gill tissues. Experimental results have demonstrated a response enzymatic protection mechanism on the increased production of reactive oxygen species induced by the drug at environmentally relevant concentrations especially in gill tissue. Our results illustrate a real risk that this xenobiotic represents to aquatic organisms.

Key words: Dexamethasone, biomarker, oxidative stress, rainbow trout.