

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Akumulace a transformace antidepresiv v organismu
volně žijících hlodavců**

Diplomová práce

Jana Štanderová

Ochrana a využívání přírodních zdrojů

prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Akumulace a transformace antidepressiv v organismu volně žijících hlodavců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc. za její čas, cenné rady, věcné poznámky a ochotu. Nemohla jsem si vybrat lepší vedoucí práce. Další poděkování náleží Ing. Lukášovi Prausovi, Ph.D. za jeho čas, který mi věnoval a za objasnění mnoha věcí v laboratoři. Dále děkuji Ing. Zuzaně Čadkové, Ph.D., DiS., a Ing. Zdeňce Klimkové za zasvěcení do světa hrabošů a velkou pomoc při experimentu. Poděkovat bych chtěla i Ing. Filipovi Merclovi, Ph.D. za to, že si na mě v jeho nabitém programu našel čas a za pomoc v laboratoři. A v neposlední řadě děkuji mému tatškovi, který mi pomohl se statistickým vyhodnocením a kladl ty správné otázky.

Akumulace a transformace antidepresiv v organismu volně žijících hlodavců

Souhrn

V současné době jsou antidepresiva stále více předepisována. Jejich užívání ale přináší řadu rizik, která jsou poslední roky sledována a popisována. Po pozření a vyloučení z organismu se antidepresiva dostávají do prostředí, a to zejména skrze čistírny odpadních vod, kde nejsou zcela zachycena. Mezi nejsledovanější léčiva řadíme právě karbamazepin, který se používá i k léčbě depresí a jiných psychických poruch. Podobně jsou v prostředí nalézány i rizikové prvky, jako je například arsen. Díky zpracování uhlí a různých kovových rud se dostává do prostředí. Oba tyto zmíněné kontaminanty pak v prostředí působí na volně žijící organismy.

Cílem této práce bylo posoudit vzájemný vliv karbamazepinu a arsenu na hraboše polního (*Microtus arvalis* (Pallas 1778)). Jedinci hraboše polního byli odchyceni ve volné přírodě a následně adaptováni na život v laboratoři. Tam byli rozděleni do čtyř skupin dle diety, která jim byla po dobu šesti týdnů podávána: skupina As (krmena arsenem), skupina As + CMZ (krmena arsenem a karbamazepinem ve vodném roztoku), skupina CMZ (dostávala pouze karbamazepin) a kontrolní skupina (nedostávala ani jeden kontaminant).

Po ukončení experimentu byla z kadáverů vypreparována játra, ledviny, slezina, plíce a varlata. Tyto orgány byly následně podrobeny laboratorním analýzám na stanovení množství arsenu. V játrech byla stanovována koncentrace karbamazepinu a vybraných sloučenin arsenu.

Bylo zjištěno, že skupiny As + CMZ vykazovaly obecně vyšší koncentrace arsenu než skupiny As. Statisticky prokázáno to bylo však pouze u jednoho orgánu. Nastínilo to však fakt, že by mohl existovat vzájemný vztah mezi arsenem a karbamazepinem a tyto dva kontaminanty by se mohly v organismu ovlivňovat. Jelikož se však jednalo o první experiment zabývající se tímto vztahem, je třeba provést další experimenty, aby byl příjem obou těchto kontaminantů současně a jejich působení v organismu lépe pochopeno a popsáno.

Klíčová slova: karbamazepin, arsen, hraboš polní, akumulace, transformace

Accumulation and transformation of antidepressants in organisms of small terrestrial mammals

Summary

Nowadays, antidepressants are increasingly prescribed. However, their use brings a number of risks that have been monitored and described in recent years. After ingestion and elimination from the body, antidepressants enter the environment, especially through sewage treatment plants, where they are not completely captured. Carbamazepine, which is also used to treat depression and other psychological disorders, is among the most studied drugs. Similarly, risk elements such as arsenic are also found in the environment. Due to the processing of coal and various metal ores, it enters the environment. Both of these contaminants then affect free-living organisms in the environment.

The aim of this work was to assess the mutual influence of carbamazepine and arsenic on the common vole. Individuals of the common vole were caught in the wild and then adapted to life in the laboratory. There, they were divided into four groups according to the diet they were given for six weeks: the As group (fed with arsenic), the As + CMZ group (fed with arsenic and carbamazepine in an aqueous solution), the CMZ group (received only carbamazepine), and the control group (did not receive a single contaminant).

After the end of the experiment, the liver, kidneys, spleen, lungs and testicles were dissected from the cadavers. These organs were subjected to laboratory analyzes to determine the amount of arsenic. The concentration of carbamazepine and selected arsenic compounds was determined in the liver.

It was found that the As + CMZ groups showed generally higher arsenic concentrations than the As groups. However, this was statistically proven in only one organ. However, it did outline the fact that there could be a relationship between arsenic and carbamazepine and that the two contaminants could interact in the body. However, as this was the first experiment dealing with this relationship, further experiments are needed to better understand and describe the intake of both these contaminants at the same time and their effects in the organism.

Keywords: carbamazepine, arsenic, common vole, accumulation, transformation

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	12
3 Přehled literatury	13
3.1 Antidepresiva	13
3.1.1 Antidepresiva v životním prostředí	13
3.1.2 Problematika čištění odpadních vod	14
3.1.2.1 Základní proces čištění odpadních vod.....	14
3.1.2.2 Farmaceutické přípravky v čistírnách odpadních vod.....	15
3.1.2.3 Možnosti řešení	16
3.1.3 Osud v životním prostředí a organismech	16
3.1.3.1 Bioakumulace	17
3.1.3.2 Vliv na primárně necílené organismy	17
3.2 Karbamazepin	19
3.2.1 Využití karbamazepinu	19
3.2.2 Metabolismus.....	20
3.2.3 Karbamazepin v ČOV	21
3.2.4 Karbamazepin ve vodním prostředí	22
3.2.5 Karbamazepin a rostliny	23
3.2.6 Dopad karbamazepinu na primárně necílené organismy.....	24
3.3 Arsen	26
3.3.1 Specie arsenu	26
3.3.2 Zdroje a použití arsenu.....	27
3.3.2.1 Antropogenní zdroje.....	27
3.3.2.2 Přírodní zdroje	27
3.3.3 Arsen ve vodě.....	28
3.3.4 Arsen v rostlinách.....	29
3.3.5 Arsen ve zvířatech	29
3.3.6 Vliv arsenu na lidský organismus.....	30
3.3.6.1 Akutní toxicita.....	30
3.3.6.2 Chronická toxicita	31
3.4 Hraboš polní	32
3.4.1 Život.....	32
3.4.2 Výskyt	32
4 Metodika	33

4.1	Povolení k experimentu	33
4.2	Odběr půdy	33
4.3	Krmivo a tekutiny.....	34
4.4	Chov jedinců v laboratorních podmínkách.....	34
4.5	Stanovení arsenu	35
4.5.1	Stanovení celkového obsahu arsenu v živočišných tkáních.....	35
4.5.2	Speciační analýza arsenu v živočišných tkáních.....	36
4.6	Stanovení karbamazepinu	36
4.7	Statistické vyhodnocení	37
5	Výsledky	38
5.1	Vývoj hmotnosti.....	38
5.2	Příjem krmiva a tekutin	42
5.3	Příjem arsenu a karbamazepinu	44
5.4	Obsah arsenu	45
5.5	Obsah karbamazepinu.....	52
6	Diskuze	53
6.1	Vývoj hmotnosti zvířat v průběhu experimentu.....	53
6.2	Arsen	53
6.2.1	Sloučeniny arsenu.....	54
6.3	Karbamazepin	54
7	Závěr	56
8	Literatura.....	57
9	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Antidepresiva, podobně jako další léčiva (např. antibiotika nebo analgetika) jsou v dnešní době stále častěji předepisována a užívána. Jejich užívání však přináší řadu rizik, které se v poslední době dostávají stále více a více do popředí. Po pozření jsou tato léčiva v organismu metabolizována a následně buď akumulována v organismu nebo vyloučena.

Po vyloučení se dostávají do životního prostředí prostřednictvím čistíren odpadních vod, a to zaprvé aplikací čistírenských kalů na zemědělskou půdu a zadruhé s "vyčištěnou" odpadní vodou, protože mnoho těchto látek je zachyceno v čistírnách odpadních vod jen částečně (Painter et al. 2010; Gould et al. 2021). Jedním z nejvíce sledovaných léčiv, které se kvůli výše zmíněným důvodům dostává do prostředí je právě karbamazepin používající se i pro léčbu deprese (Valdés et al. 2016).

Karbamazepin tak nalézáme ve vodním prostředí, v půdách, rostlinách a v živočiších. Stává se součástí potravního řetězce a ovlivňuje tak celou řadu organismů. Jeho dopad na primárně necílené organismy byl už zkoumán v řadě studií. Studie se zaměřovaly zejména na organismy žijící ve vodním prostředí. Zde byl pozorován negativní vliv na přežití organismů, jejich reprodukci a růst. Další experimenty byly prováděny na suchozemských organismech jako jsou laboratorní hlodavci, u kterých byla zjištěna embryotoxicita karbamazepinu. U potomstva byly pozorovány nežádoucí anatomické změny (Gerennutti et al. 2008; Qiang et al. 2016).

Současně v prostředí nalézáme řadu rizikových prvků jako je olovo, rtuť, kadmium a arsen. Právě ten je v této diplomové práci sledován a analyzován. Arsen se do prostředí dostává zejména kvůli zpracování uhlí a kovových rud. Nalézáme ho ve vodách a půdách, kde se často nechází ve vysokých koncentracích (Meharg & Hartley – Whitaker 2002; Ravenscroft et al. 2009) Následně je přijímán rostlinami a živočichy a stává se součástí potravního řetězce stejně jako karbamazepin. V organismu také podléhá řadě složitých procesů a je metabolizován na různé specie, které se v organismech mohou akumulovat. Toxické účinky byly pozorovány u rostlin a celé řady živočichů až po člověka (Chen et al. 2020; Xue et al. 2022).

Chování a transformace karbamazepinu byla popsána jak ve vodních ekosystémech, tak i v suchozemských systémech, v půdě, rostlinách i edafonu (Miao et al. 2005; Bahlmann et al. 2014; Paltiel et al. 2016). Je ale jen velmi málo informací o případném vlivu reziduí karbamazepinu na drobné zemní savce. Tito savci navíc často žijí v půdách, které jsou kontaminovány dalšími rizikovými látkami, jako například rizikovými prvky, a to například právě arsenem. V takovém případě, kdy organismus musí čelit několika stresovým faktorům současně, může být odezva organismu odlišná od případu, kdy je tento organismus exponován pouze karbamazepinu.

Tato diplomová práce se zaměřuje právě na akumulaci a transformaci antidepresiv ve volně žijících hlodavcích a jeho případné vzájemné působení na akumulaci a transformaci arsenu. Jako modelový organismus je v experimentu použit hraboš polní. V experimentální části je jedincům hraboše polního podávána různá dieta složená, dle příslušné skupiny, z arsenu a/nebo karbamazepinu. Následně je karbamazepin a arsen stanovován ve vybraných orgánech (játra, ledviny, slezina, plíce a varlata) a výsledky zpracovány a vyhodnoceny.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce byl experiment na hraboších polních, kterým byl podáván arsen a karbamazepin a po ukončení experimentu měla být posouzena míra akumulace karbamazepinu v jejich organismu.

Stejně tak měla být změřena koncentrace arsenu a jeho specií ve vybraných orgánech (ledviny, játra, plíce, slezina, varlata). Následně měl být zjištěn případný vztah mezi akumulací karbamazepinu a arsenu v jednotlivých orgánech. Mělo být zjištěno, zda karbamazepin podporuje nebo snižuje akumulaci arsenu v organismu. Stejně tak zda arsen má vliv na chování karbamazepinu v tělech hlodavců.

Vědecká hypotéza: příjem a akumulace karbamazepinu v organismu hraboše polního se mění v případě, že je organismus hraboše vystaven zvýšeným koncentracím arsenu, a naopak příjem a akumulace arsenu se mění v případě, že je organismus hraboše polního vystaven působení karbamazepinu.

3 Přehled literatury

3.1 Antidepresiva

Antidepresiva jsou nejčastěji indikována při léčbě deprese. K dalšímu použití antidepresiv se řadí úzkostné poruchy (panická porucha a agorafobie, sociální fobie, obsedantně kompulzivní porucha – OCD, posttraumatická stresová porucha – PTSD, generalizovaná úzkostná porucha – GAD). Dále tyto léky pomáhají s chronickou bolestí a využívají se i při léčbě nespavosti a poruch příjmu potravy (Fujáková & Kopeček 2012).

O objev antidepresiv se zasloužil zejména newyorský psychiatr Nathan S. Kline. Ten v roce 1957, kdy se konal sjezd Amreické Psychiatrické Společnosti poprvé spolu se svými spolupracovníky prezentoval data o euforizujících účincích iproniazidu, kterým byli léčeni tuberkulózní pacienti. Téhož roku své výsledky potvrdil kontrolovaným klinickým výzkumem a publikoval (Fujáková & Kopeček 2012; Vinař 2012).

Od konce 90. let minulého století se k antidepresivům začala upínat čím dál tím větší pozornost, protože jejich spotřeba rapidně stoupá (Argaluz et al. 2021; Gould et al. 2021). Vzhledem k nedávné situaci kolem pandemie Covid – 19 někteří vědci předpokládají ještě rychlejší nárůst jejich spotřeby (Argaluz et al. 2021).

Mezi ostatními farmaky vzbuzují psychiatrické léky pozornost ze dvou hlavních důvodů: jejich častému použití, jak již bylo zmíněno, a také kvůli jejich potenciálu znečišťovat a poškozovat životní prostředí (Argaluz et al. 2021).

Princip působení

Cílem terapie antidepresivy je ovlivnit aktivitu neurotransmiterů (Fujáková & Kopeček 2012) a regulovat jejich zpětné vychytávání (Sehonová et al. 2018). Neurotransmitery, jako je serotonin, norepinefrin a dopamin, se účastní hlavních homeostatických procesů v centrálním a periferním nervovém systému. Jakékoliv změny v jejich regulaci prostřednictvím vnějšího zdroje, v našem případě antidepresivy, mohou mít multisystémové důsledky (Painter et al. 2010). Mechanismy působení různých druhů antidepresiv se však mezi sebou liší (Painter et al. 2010; Sehonová et al. 2018).

Na základě těchto rozdílných mechanismů účinku byla klasifikována první generace antidepresiv, do které patřily dvě skupiny: inhibitory monoaminoxidáz (MAO) a tricyklická antidepresiva (TCA) (Vinař 2012; Fujáková & Kopeček 2012). V současné době je již na trhu čtvrtá generace antidepresiv a jednotlivá léčiva jsou klasifikována do 9 skupin dle chemické struktury či mechanismu účinku. (Fujáková & Kopeček 2012).

3.1.1 Antidepresiva v životním prostředí

Antidepresiva jsou z těla vylučována močí a dostávají se tak do odpadních vod, které jsou jejich hlavním zdrojem v prostředí (Painter et al. 2010; Gould et al. 2021). Zdrojem odpadních vod jsou domácnosti, průmysl, zemědělství nebo živočichové. Co se týče konkrétních případů jedná se akvakulturu, kal z čistíren odpadních vod (zejména, pokud je dále používán jako hnojivo), vyluhování podzemních vod po dešti (Argaluz et al. 2021) a také průsak skládkové vody (Schulz et al. 2011).

Vzhledem k tomu, že látky používané ve farmaceutickém průmyslu potřebují být obvykle metabolicky stabilní, jsou tak často odolné vůči mikrobiální degradaci a mohou procházet procesem čištění odpadních vod. Čistírny odpadních vod nejsou navrženy tak, aby tyto látky odstraňovaly. Zbytky farmatik tak zůstávají biochemicky aktivní i poté, co se dostanou důsledkem nedostatečného čištění odpadních vod do vodního ekosystému, což má za následek nepříznivé biologické účinky (Painter et al. 2010; Melchor-Martínez et al. 2021).

Dle Gould et al. (2021) byla antidepresiva ve vodním prostředí prvně popsána v roce 2002, kdy byl fluoxetin stanoven v různých vodních zdrojích v USA. Od té doby byla provedena řada studií, během kterých byla naměřena koncentrace antidepresiv ve vodním prostředí v řádech několik nanogramů na litr až několik málo mikrogramů na litr (Painter et al. 2010; Gould et al. 2021). Obvykle se však tato koncentrace pohybovala pod 100 ng/l (Ford & Fong 2016).

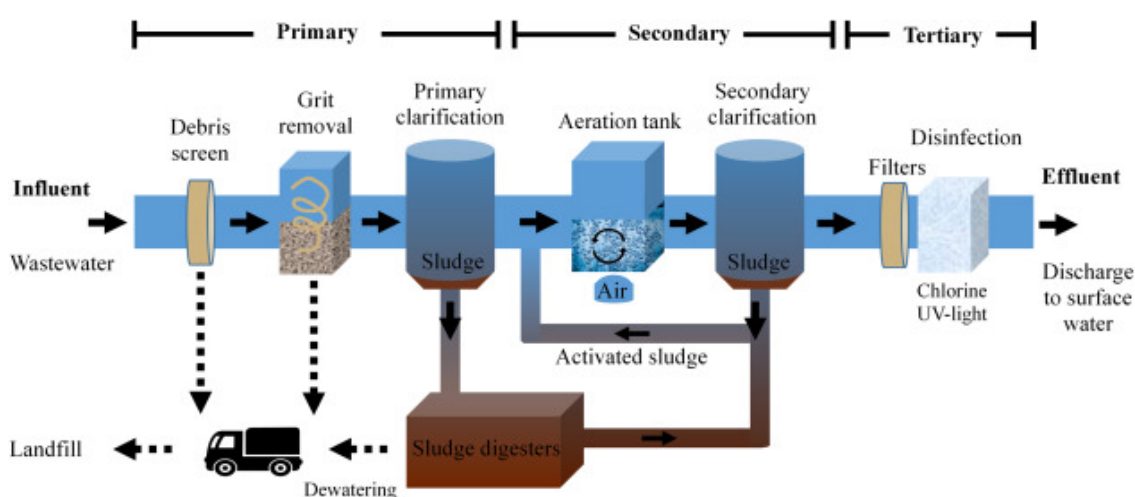
Přítomnost reziduí léčiv byla prokázána i v dalších složkách životního prostředí než jen ve vodním. Jejich přítomnost byla zjištěna i v půdě a ve vzduchu (Silva et al. 2015; Argaluz et al. 2021).

3.1.2 Problematika čištění odpadních vod

3.1.2.1 Základní proces čištění odpadních vod

Pokud se bavíme o konvenčním, nejhojněji používaném procesu čištění odpadních vod, můžeme ho rozdělit do následujících kroků (viz Obrázek 1):

1. Předčištění odpadních vod
2. Mechanické (primární) čištění
3. Biologické (sekundární) čištění
4. Terciární čištění (dočištění)



Obrázek 1: Schéma ČOV s terciárním čištěním (Martín-Pozo et al. 2022)

Předčištění odpadních vod spočívá v odstranění hrubých nečistot ze surové odpadní vody. Tyto nečistoty nejsou žádoucí v následných procesech čištění. Obvykle tento první krok zahrnuje lapák šterku a písku, česle, popřípadě drtič. Lapák šterku písku funguje na principu jímky, kde se hrubé nečistoty usazují. Česle jsou tvořeny mřížkou, na které se nečistoty zasekávají. Drtič rozmělní velké částice, aby mohly být odstraněny v následujícím kroku.

Mechanické (primární) čištění začíná na přítoku předčištěné vody a probíhá v usazovacích nádržích. Principem je odstranění nerozpuštěných látek, které jsou schopné sedimentace nebo plavou na hladině. Sedimentované nečistoty jsou setřeny ze dna. To samé platí pro nečistoty, které zůstaly na hladině. Produktem tohoto stupně čištění je primární kal.

Dalším stupněm je čištění biologické, kdy je voda zbavována biologicky rozložitelných organických látek, ale také sloučenin dusíku a fosforu. Hlavním mechanismem jsou oxidačně – redukční reakce. Biologické čištění nám umožňují mikroorganismy, které se těmito látkami živí. Souhrně se nazývají jako tzv. „aktivační kal“ a zahrnují bakterie, houby, plísně, kvasinky, prvoky a další. Celý tento stupeň probíhá v aktivačních a dosazovacích nádržích buď v aerobních, anoxických nebo i anaerobních podmínkách. Vedlejším produktem je sekundární kal.

Terciární čištění odpadních vod není vždy součástí systému. Využívá se v případech, kdy jsou kladeny na kvalitu vody z čistírny vyšší nároky anebo musí být odstraněny specifické látky, které v předchozích krocích nejsme schopni odstranit. Může se jednat například o látky z nemocničních zařízení či pokud chceme vodu nadále využívat jako užitkovou. Terciární čištění probíhá v přírodních biologických dočišťovacích nádržích, filtrací nebo např. chlorací (FAO 1992).

3.1.2.2 Farmaceutické přípravky v čistírnách odpadních vod

Čistírny odpadních vod jsou považovány za jeden z hlavních zdrojů reziduí léčiv v životním prostředí (Khasawneh & Palaniandy 2021). Je tomu tak proto, jelikož čistírny odpadních vod jsou navrženy, aby odstraňovaly a rozkládaly biologicky odbouratelné sloučeniny uhlíku, dusíku a fosforu, stejně jako mikroorganismů, živin a patogenů (Khasawneh & Palaniandy 2021). Avšak u reziduí léčiv už tak účinné nejsou. Některé léky mohou být během procesu čištění eliminovány, ale ostatní si zachovávají původní strukturu a v nezměněné podobě jsou uvolňovány spolu s odtokem vody z čistíren (Argaluz et al. 2021).

Dle Argaluz et al. (2021) může být dokonce koncentrace léčiv na odtoku vyšší než na přítoku ČOV. To je způsobeno tím, že mikroorganismy odpovědné za biologické čištění odpadních vod mohou metabolizovat konjugáty s kyselinou glukuronovou, takže se léčivo vrací do své původní formy. Takto se děje právě v případě karbamazepinu a v řadě dalších léčiv. Karbamazepin se dokonce používá jako marker pro hodnocení znečištění povrchových vod odpadními vodami, protože je v podstatě všudypřítomný.

V rozvojových zemích se předpokládá, že je tato situace ještě závažnější. Odhaduje se, že až 70 % všech odpadních vod není před vypuštěním do prostředí nijak vyčištěno, tudíž jejich koncentrace bude v prostředí několikanásobně vyšší (Argaluz et al. 2021).

3.1.2.3 Možnosti řešení

Na základě těchto nedostačujících opatření, se vědci snaží vyvinout nové technologie a přístupy, které by byly v eliminaci léčiv z odpadních vod efektivnější.

Jako možnost se nabízí čištění odpadních vod z nemocnic přímo v daných zařízeních. Nemocnice jsou totiž považovány za podstatný zdroj reziduí léků. Takto by musel být zbaven léčiv menší objem vody, než kdyby se z nemocnic voda vypustila do kanalizace a musela být čištěna v městských ČOV (Argaluz et al. 202).

Dalším způsobem by mohlo být používání ozonu a aktivního uhlí. Tuto metodu chtějí aplikovat ve Švýcarsku, kde tento proces chtějí zařadit do konvenčních ČOV. Problémem je zde finanční náročnost a také fakt, že ozonizací některých látek mohou vznikat látky nové u kterých neznáme jejich ekotoxicitu. (Bourgin et al. 2018, Argaluz et al. 2021).

Využití aktivního uhlí je jeden ze způsobů, který využívá procesu adsorpce. Mezi další patří využití grafenu a oxidu grafenu, který má větší specifický povrch než aktivní uhlí nebo aplikace uhlíkových trubic (Wang & Wang 2016).

Biologické procesy mohou být také efektivní. Jedná se například o aplikaci mikrobiálních monokultur odebraných z aktivovaného kalu nebo sedimentů ČOV, která je efektivní i konkrétně v případě karbamazepinu.

Nabízí se i využití UV – záření, které je v některých případech účinné. Ovšem v odstranění karbamazepinu efektivní není. V neposlední řadě můžeme také jednotlivé procesy zkombinovat a dosáhnout tak lepších výsledků (Wang & Wang 2016).

Álamo et al. (2020) uvádějí, že xylofágní houby, které v přírodě konzumují lignin, produkují enzym lignin peroxidázu se schopností oxidovat organické látky, včetně léčiv.

Fytoremediace může být také účinný způsob, kterým snížíme množství kontaminantů v půdě. Použitím některých druhů rostlin v kontaminovaných oblastech dochází ke zvýšení mikrobiální aktivity organismů žijících v půdě, které se podílejí na degradaci nežádoucích látek. Kořenové exudáty obsahují cukry a aminokyseliny, které jsou pak dále využity mikroorganismy pro jejich metabolismus. Rostliny také zvyšují obsah kyslíku v rhizosféře a ten mikroorganismy využívají pro svůj metabolismus nebo pro oxidaci polutantů. Fytoremediace je však spíše vhodný způsob do méně kontaminovaných oblastí nebo oblastí které jsou předem ošetřeny jinými dekontaminačními technikami (Campanella et al. 2002).

3.1.3 Osud v životním prostředí a organismech

Po tom, co se léčiva a jejich rezidua dostanou do prostředí, projdou celou řadou procesů, které mají za následek jejich transformaci a degradaci. Takové děje ovlivňují jejich mobilitu a perzistenci. Toto zjištění je znepokojivé, protože organismy, zejména pak vodní, jsou koncentracím těchto látek vystaveny po celou dobu života (Silva et al. 2015).

Když se kontaminanty z prostředí dostanou do těl organismů, projdou řadou metabolických procesů. Metabolismus může vést jak k detoxifikaci (inaktivaci) dané látky, tak i k její aktivaci. Avšak ve většině případech se jedná o detoxifikaci (Silva et al. 2015).

Jakmile se rezidua dostanou do vodního prostředí, začne na ně působit řada faktorů jako je pH a další chemické a fyzikální vlastnosti vody. Dále má vliv fakt, do jakého stupně jsou léčiva v organismech, ze kterých byla vyloučena, metabolizována a v jaké formě jsou

do prostředí vyloučena. Všechny tyto faktory pak ovlivňují biologickou dostupnost těchto látek (Gould et al. 2021).

3.1.3.1 Bioakumulace

Bylo zjištěno, že rezidua léčiv mají vysokou míru bioakumulace (Richmond et al. 2018) a může se dokonce stát, že v organismech, kterým léčiva nejsou primárně určena se nachází vyšší koncentrace (Argaluz et al. 2021).

Richmond et al. (2018) provedl studii, kde zkoumali akumulaci léčiv (včetně karbamazepinu) v potravním řetězci platýse velkého (*Pleuronectes platessa* L.) a pstruha obecného (*Salmo trutta* L.). Nejdříve bylo akumulováno určité množství v larvách hmyzu, kterými se ryby živí a později se tak rezidua dostala do těl ryb. Studii bylo zjištěno, že platýsi jsou vystavováni množství léčiv, které odpovídá téměř poloviční denní dávce pacienta, který léky užívá.

Bylo provedeno i několik málo studií zabývajících se akumulací léků (včetně karbamazepinu) v tělech terestriálních živočichů jako jsou žížaly. Ty se dostávají do kontaktu s kontaminovanou půdou nebo vodou. Bylo zjištěno, že do jejich těl se rezidua dostávají a hromadí se v nich. To má za následek ovlivnění celého potravního řetězce. Jelikož žížaly jsou klíčovou součástí potravního řetězce mnoha predátorů, jako jsou například ptáci, je toto zjištění znepokojivé (Carter et al. 2014).

Míra bioakumulace se také může lišit mezi jednotlivými druhy, tak i v rámci jednotlivých tkání, ukázaly výzkumy prováděné na rybách. U ryb bylo také ukázáno to, že samotná míra bioakumulace neurčuje, v jaké míře a jak zásadně bude organismus ovlivněn. Na to má velký vliv převážně účinnost dané látky (Gould et al. 2021).

3.1.3.2 Vliv na primárně necílené organismy

Jak již bylo zmíněno, léčiva jsou biologicky aktivní látky ovlivňující řady řídicích procesů v organismech. Ovlivňují hladinu hormonů a přenos informací mezi buňkami a regulují metabolismus. I přes to, že koncentrace, ve kterých je v prostředí nalézáme nejsou škodlivé pro lidský organismus nebo nezpůsobují akutní či chronickou toxicitu u organismů vystavených jejich působení sekundárně, musíme brát v potaz, že v prostředí se vyskytuje řada druhů těchto látek. Působí tak společně a navzájem se ovlivňují, což má za následek závažné ekotoxické účinky (Silva et al. 2015).

Většina studií zabývajících se vlivem reziduí léčiv na sekundárně ovlivněné organismy probíhá v laboratořích. To má za následek jedno hlavní úskalí a tím je, že organismům je podáván jen jeden druh léčiva. Tím pádem se nebere v potaz kombinace účinků léčiv, která se v prostředí nacházejí společně (Silva et al. 2015).

U ryb byla dokázáno, že antidepresiva mění v jejich mozcích hladiny neurotransmiterů, a tak můžeme očekávat fyziologické i behaviorální změny (Silva et al. 2015; Gould et al. 2021).

Z fyziologických změn se jedná například o ovlivnění vývoje kostry dánía pruhovaného (*Danio rerio* (Hamilton – Buchanan 1822)). Tyto změny se však vyskytly až po podání dávek, které mnohonásobně převyšují běžnou koncentraci v prostředí. (Gould et al. 2021). Dle Sehonové et al. 2018 byly v některých experimentech zabývajících se dlouhodobým působením léčiv zaznamenány změny v mozcích, srdcích a ledvinách ryb.

Kvůli působení reziduí léků na ryby, se v některých případech změnilo i jejich chování. Jednalo se zejména o behaviorální změny při lovu, kdy ryby méně útočily na svou kořist (Gould et al. 2021).

U bezobratlých, konkrétně různonožců (*Amphipoda*), byly detekovány změny v plavání už při velmi nízkých koncentracích léčiv (1-100 ng/l) (Sehonová et al. 2018).

Vliv a bioakumulace léčiv v organismech a potravních řetězcích zajisté vyžadují další studie. Předmětem experimentů by mohly být transgenerační a epigenetické účinky antidepressiv na ryby. Behaviorální změny, jako je výběr partnera, by mohly změnit strukturu celé další generace organismů. Další změny v chování se mohou objevit v podobě změn mezidruhových interakcí, což by mělo za následek ovlivnění celých ekosystémů. V neposlední řadě nebyla věnována dostatečná pozornost snížené spotřebě potravy u ryb, které byly exponovány kontaminantům. Tento fakt by pak mohl snížit velikosti populací, které jsou na rybách závislé. Ale jak bylo předem zmíněno, vše je třeba potvrdit či vyvrátit dalšími výzkumy (Gould et al. 2021).

3.2 Karbamazepin

Karbamazepin ($C_{15}H_{12}N_2O$) je tricyklická sloučenina využívaná jako orálně podávané antikonvulzivum, které se široce využívá při léčbě pacientů trpících epilepsií (Tolou – Ghamari et al. 2013; Paltiel et al. 2016). Dále však byly prokázány jeho účinky i při léčbě depresí, zejména tedy opět u pacientů trpících epilepsií (Post et al. 1986; Allen & Ojong 2012).

Karbamazepin je po vstupu do organismu metabolizován a následně, buď v podobě metabolitů (převážně) nebo v původní struktuře, exkretován močí do prostředí (Bahlmann et al. 2014; Paltiel et al. 2016). Studie v Evropě a Severní Americe ukázaly, že karbamazepin je jedním z nejčastěji detekovaných léčiv v odpadních vodách ČOV a v řekách (Miao et al. 2005). V prostředí se pak významně podílí na znečišťování odpadních vod, půdy a následně se pak dostává do živých organismů (Kodešová et al. 2019a; Paltiel et al. 2016).

3.2.1 Využití karbamazepinu

Karbamazepin byl poprvé vyroben ve Švýcarsku, roku 1953. Prvně byl využíván při léčbě zánětu trojklaného nervu. V současné době se jedná o náladu stabilizující lék nacházející své místo při léčbě epilepsie, bipolární poruchy, poruchy pozornosti s hyperaktivitou (angl. zkratka ADHD), schizofrenie (Tolou-Ghamari et al. 2013) a v neposlední řadě při zmírnění příznaků deprese (Post et al. 1986; Allen & Ojong 2012).

Pokud léčíme epilepsii a depresi, je našim prioritním cílem dosažení kontroly nad záchvaty. Některá antikonvulziva, jako například karbamazepin, prokázala zlepšení nálady u pacientů s epilepsií a dále také účinnost v prevenci manických a depresivních epizod u pacientů s bipolární poruchou (Allen & Ojong 2012).

Post et al. (1986) zkoumali antidepresivní vliv karbamazepinu. Do studie bylo zapojeno 35 jedinců, u kterých byla diagnostikována velmi vážná deprese. 22 bylo žen a zbylých 13 mužů. Po přijetí jedinců do experimentu byl zahájen první týden, kdy všem pacientům bylo podáváno placebo, aniž by s tím byli obeznámeni. Následující týden už byl podáván karbamazepin v počátečních dávkách 200-400 mg/den. Dávka se postupně zvyšovala, dokud nebylo dosaženo klinické odezvy nebo se neobjevily vedlejší účinky. Maximální podaná dávka byla mezi 1600 a 2200 mg/den, medián délky léčby byl 45 dní.

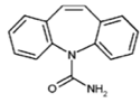
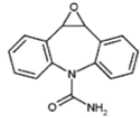
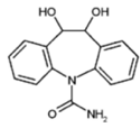
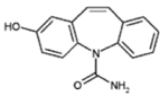
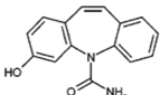
Výsledky experimentu ukázaly, že deprese se od týdne, kdy bylo podáváno placebo, výrazně snížila. 25 ze všech jedinců se zlepšilo o 1 a více bodů, což je dle Bunney – Hamburg stupnice významný rozdíl.

Jako nebezpečný vedlejší účinek užívání karbamazepinu je často uváděna hepatotoxicita. Ta ve většině případech bývá po ukončení léčby reverzibilní. Zlepšení se projeví po pěti až sedmi týdnech. Pokud se však léčba nepřerušuje a poškození jater je už velmi vážné, může dojít k akutnímu selhání jater a následné smrti (National Library of Medicine 2017).

Dle SÚKL (2022) bylo do České republiky dovezeno v roce 2022 celkem 183 714 balení karbamazepinu, což odpovídá téměř 2,5 milionům DDD (Defined Daily Dose = předpokládaná průměrná udržovací denní dávka léku využívaného pro jeho primární funkci u dospělých).

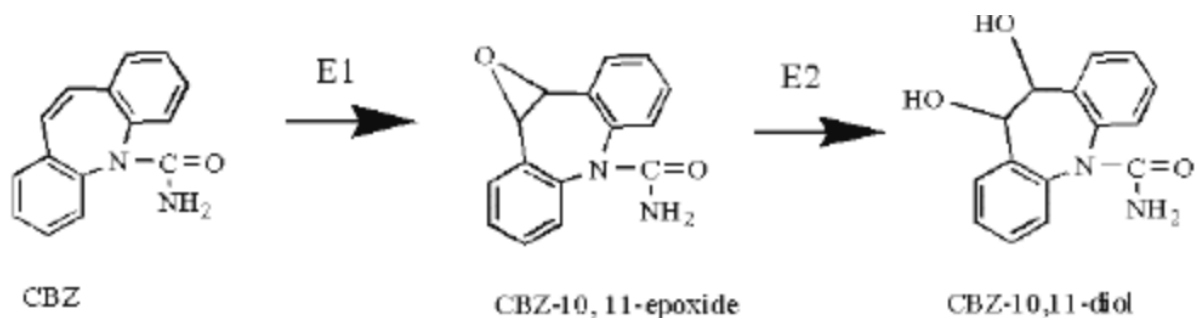
3.2.2 Metabolismus

Karbamazepin je metabolizován v játrech. Je známo více než 30 metabolitů, na které je v organismu přeměňován (Miao et al. 2005; Bahlmann et al. 2014). Nejvýznamnější jsou zobrazeny na Obrázku 2. Následně se dostává do prostředí močí nebo spolu s výkaly. Uvádí se, že 72 % opouští tělo močí a zbylých 18 % je exkretováno výkaly (Bahlmann et al. 2014). Méně než 3 % jsou vyloučena z těla v původní podobě, ve které karbamazepin do těla vstoupil, a zbylá část odchází v podobě metabolitů (Paltiel et al. 2016).

Structure	Analyte
	Carbamazepine
	10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamazepine
	10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepine
	2-hydroxycarbamazepine
	3-hydroxycarbamazepine

Obrázek 2: Některé z metabolitů karbamazepinu (Miao et al. 2005)

Karbamazepin má dva hlavní metabolity: 10,11 – epoxykarbamazepin (CBZ – EP) a 10,11 - dihydroxykarbamazepin (CBZ – DiOH) (viz Obrázek 2). V organismu je karbamazepin nejdříve oxidován pomocí enzymu cytochromu P450 na 10,11 – epoxykarbamazepin. Následně tento metabolit podléhá hydrolýze pomocí enzymu epoxidové hydrolázy a stává se z něj 10,11 – dihydroxykarbamazepin (Miao et al. 2005; Bahlmann et al. 2014) (viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Transformace karbamazepinu na CBZ-EP a CBZ-DiOH (Konsil et al. 2022).

Bylo prokázáno, že CBZ – EP má podobné antiepileptické vlastnosti jako karbamazepin a může mít neurotoxické účinky (Miao et al. 2005). CBZ – DiOH je hlavním metabolitem detekovaným v moči (Paltiel et al. 2016).

Druhá cesta degradace karbamazepinu je také zprostředkována cytochromem P450 a jejími produkty jsou 1- hydroxy-CBZ (1-OH-CBZ), 2 - hydroxy-CBZ (2-OH-CBZ) a 3 – hydroxy - CBZ (3-OH-CBZ) (Bahlmann et al. 2014).

Kromě těchto hlavních produktů se během degradace tvoří i akridin (Bahlmann et al. 2014).

3.2.3 Karbamazepin v ČOV

Po vyloučení se karbamazepin a jeho metabolity dostávají do čistíren odpadních vod. Karbamazepin je velmi odolný vůči rozkladu a během procesu čištění odpadních vod v běžných ČOV téměř vůbec nedegraduje a jeho koncentrace na odtoku zůstávají velmi podobné těm na vstupu. Obvykle je odstraněno méně než 10 % (Bahlmann et al. 2014; Hai et al. 2018). Zmiňované terciární čištění není v tomto případě efektivní. Stejně tak jako na jeho koncentraci nemá žádný vliv infiltrace vyčištěné odpadní vody do vod podzemních (Fenz et al. 2005).

V některých případech je dokonce uváděna vyšší koncentrace karbamazepinu na odtoku z ČOV. Koncentrace se obvykle pohybují v řádech ng/l nebo několik málo mg/l (Bahlmann et al. 2014).

Bahlmann et al. (2014) provedl studii zabývající se karbamazepinem a jeho metabolity v odpadních vodách z ČOV v Německu a Portugalsku. Celkem bylo odebráno 46 vzorků z přítoku a odtoku na ČOV a ty byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Osud karbamazepinu a jeho metabolitů byl sledován u vzorků ze šesti německých ČOV.

Výsledky potvrdily, že karbamazepin je opravdu velmi stabilní a proces konvenčního čištění si s ním neumí poradit. Koncentrace samotného karbamazepinu dokonce stouply na odtoku v průměru o 14 % a koncentrace CBZ – EP se zvýšily v průměru o 32 %. Naproti tomu koncentrace CBZ – DiOH zaznamenaly pokles v průměru o 16 %. Po porovnání vzorků z Německa a Portugalska se ukázalo, že množství pozorovaných látek bylo u portugalských ČOV vždy nižší.

Další studie prováděná na ČOV v Kanadě se také zaměřovala na obsah karbamazepinu a jeho metabolitů. Výsledky opět potvrdily stabilitu sledovaných látek. Průměrná koncentrace karbamazepinu klesla z 356 ng/l v nečištěné odpadní vodě na 251 ng/l (pokles o 29 %) v čištěné odpadní vodě. Ve vzorcích odpadní vody převládal metabolit CBZ – DiOH. Na rozdíl však

od předchozí zmiňované studie, se zde výrazně zvýšila koncentrace CBZ – DiOH po vyčištění vody (Miao et al. 2005).

Rozdíly koncentrací v odpadních vodách může ovlivnit řada faktorů. Jedná se například o míru produkce/spotřeby léčiva, regulace týkající se této problematiky, efektivita ČOV a sezónní faktory ovlivňující výkon ČOV (Hai et al. 2018).

Kvůli této problematice jsou v posledních letech přijímána nová opatření, která mají pomoci při čištění vody od látek jako je karbamazepin. Jedná se o ozonizaci, biofiltraci, koagulaci a fotodegradaci (Khazri et al. 2019).

Vzhledem k tomu, že rezidua léčiv nacházíme v životním prostředí ve velké míře, jelikož proces čištění odpadních vod není dostatečný, tak bylo třeba založit systém a standardy, dle kterých se bude situace monitorovat. Karbamazepin byl navrhnout jako marker antropogenního znečištění sladkovodního prostředí (Hai et al. 2018).

Jak bylo v této kapitole nastíněno, karbamazepin se i po průchodu odpadní vody ČOV dostává dále do prostředí. To má za následek kontaminaci povrchové, podzemní i pitné vody a negativní vliv na další složky prostředí (Bahlmann et al. 2014; Hai et al. 2018; Khazri et al. 2019).

3.2.4 Karbamazepin ve vodním prostředí

Karbamazepin je jeden z nejčastěji nalézaných léků v antropogenně ovlivněných povrchových vodách (Valdés et al. 2016). Například v celoevropském monitorovacím průzkumu řek byl karbamazepin jedním z nejčastěji detekovaných kontaminantů v 122 analyzovaných řekách, s nejvyšší zjištěnou maximální koncentrací 12 µg/l (Santos et al. 2018). Jeho hlavní zdroj je právě odtok odpadních vod z ČOV (Hai et al. 2018; Almeida 2021). Po tom, co se dostane do sladkovodních útvarů, jako jsou potoky, řeky, jezera a další, přichází na řadu mnoho různých přírodních procesů, které jeho koncentraci v prostředí snižují. Jedná se o fotolýzu, aerobní biodegradaci, sorpci na sedimenty a ředění povrchových vod (Hai et al. 2018).

Míra poklesu koncentrace karbamazepinu v prostředí však velmi závisí na jeho fyzikálně – chemických vlastnostech a vlastnostech a podmínkách okolního prostředí. V experimentech bylo porovnáváno mnoho různých léčiv a rychlost a míra jejich rozkladu velmi záležela na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech, jako je např. volatilita či hydrofilita (Kunkel & Radke 2012).

Vyšší koncentrace karbamazepinu byly naměřeny za suchého počasí, oproti tomu během deštivého období roku byly koncentrace nižší, jelikož se voda více naředila. Pokud byly vzorky kontaminované vody odebírány v létě, byly koncentrace reziduí léčiv nižší, než když byly odebrány v zimě. To se dá nejspíše vysvětlit vyšší teplotou během letních měsíců, kdy rozkladné procesy probíhají intenzivněji (Hai et al. 2018). Naopak v Itálii byly za letních měsíců naměřeny vyšší koncentrace karbamazepinu, což mohl způsobit větší turistický ruch (Almeida 2021).

Karbamazepin a jeho metabolity byly také detekovány ve slané vodě v hodnotách dosahujících až několik stovek ng/l. Ještě větší množství léčiva bylo zjištěno u ústí řek do moře, kde je to nejspíše způsobeno blízkou přítomností ČOV, naopak směrem od břehu se množství snižovalo (Almeida 2021).

I v podzemních vodách nacházíme určité množství karbamazepinu a ostatních léčiv. Tyto látky se do podzemních vod dostávají mnoha různými způsoby jako je například průsak skládkové vody, infiltrace dešťové vody a vody z ČOV a únik z kanalizace. Koncentrace karbamazepinu se pohybovaly od 1 ng/l až po 3600 ng/l. Záleželo na lokalitě, odkud byly vzorky odebírány, například zda v okolí byla ČOV a dalších podmínkách. Podzemní vody jsou nejvýznamnějším zdrojem pitné vody, a i když zde obvykle nenalézáme tak vysoké koncentrace jako ve vodách povrchových, z tohoto hlediska je to velmi znepokojující zjištění (Hai et al. 2018).

Karbamazepin, stejně jako řada jiných léčiv, je schopen bioakumulace. Ta byla v případě karbamazepinu pozorována v řadě organismů: řasy, zooplankton, bezobratlí, ryby a rybí orgány. Tato zjištění pocházejí jak z laboratorních experimentů, tak i z terénního monitorování (Almeida 2021). U výše zmíněných organismů, ale i u bakterií, působí toxicky (Rezaei et al. 2020).

3.2.5 Karbamazepin a rostliny

Jak již bylo dříve zmiňováno, farmaka, včetně karbamazepinu, nalézáme v odpadních vodách. Takto znečištěná voda může následně kontaminovat i půdu, pokud je jí zavlažována, a odtud jsou kontaminanty přijímány rostlinami (Kodešová et al 2019a; Klement et al. 2020). Další cestou, jak se karbamazepin dostává do rostlin je čistírenský kal, který během procesu čištění odpadních vod vzniká. Ten obsahuje také značné množství reziduí léčiv. Pokud je pak kal dál použit jako hnojivo a půdní aditivum, rostliny farmaka přijímají (Kodešová et al 2019b). Rostliny, zvláště jejich kořeny a listy, tak mohou při konzumaci člověkem představovat zdravotní riziko (Klement et al. 2020).

Příjem těchto kontaminujících látek probíhá hlavně skrze transpirační proud (Kodešová et al 2019a; Kodešová et al 2019b). Kolik rostlina látky přijme, závisí na struktuře buněčné membrány a fyzikálně – chemických vlastnostech sloučeniny. Adsorpce a propustnost buněčné membrány se zvyšuje s klesající lipofilitou, molekulovou hmotností a velikostí a polaritou přijímané látky. Dále má na příjem vliv forma kontaminantu. Pokud se v prostředí vyskytuje v nedisociované formě, pak je přijímán lépe (Kodešová et al 2019a).

Vnější prostředí hraje také významnou roli v příjmu látek rostlinou. Mobilita farmaceuticky aktivních sloučenin v půdní vodě a jejich potenciální dostupnost rostlinám se odvíjí od sorpce těchto látek na půdu. Pokud jsou látky silně sorbovány na půdní částice, snižuje se tak jejich dostupnost pro rostlinu. Dále hraje faktor i počet druhů látek vyskytujících se v prostředí. Jednotlivé kontaminanty na sebe mohou působit synergicky, ale i kompetitivně (Klement et al. 2020).

Dle Kodešové et al. (2019a) se množství přijaté látky odvíjí také od druhu rostliny. Ve studii, kterou prováděli, byl zkoumán příjem tří farmak, včetně karbamazepinu, čtyřmi různými rostlinnými druhy. Jednalo se o kozlíček polní, špenát, rukolu a ředkev. Koncentrace přijatých látek byly podobné u ředkve a rukoly, ale od špenátu a kozlíčku se velmi lišily. V téže studii bylo vyzkoušeno, že karbamazepin se akumuluje jak v kořenech, tak v listech. Avšak pokud byly jeho koncentrace vyšší v listech, jednalo se o výrazně větší množství než v kořenech rostlin. Karbamazepin byl v rostlinách také metabolizován.

Další studie zkoumala vliv půdy na příjem a translokaci léčiv z půd ošetřených čistírenským kalem. Jako pokusná rostlina zde byl použit špenát. Vzorky kalů byly odebrány ze dvou ČOV a celkem v nich byla analýzou zjištěna přítomnost 45 různých léčiv a jejich metabolitů. Karbamazepin se řadil mezi ty s nejvyšší naměřenou koncentrací a to 43 a 93 ng/g. Vysoké koncentrace byly detekovány i u CBZ – EP. U karbamazepinu byla také zjištěna vysoká míra akumulace. Akumulace byla vyšší v listech rostlin než v kořenech. Výsledky experimentu ukázaly, že příjem karbamazepinu byl závislý na zdroji kontaminace, tj. na kalu. Kal z první ČOV měl vyšší salinitu, což omezilo transpiraci rostlin a to mělo nejspíše za následek menší transformaci na metabolity a jejich nižší obsah než u kalu z druhé ČOV (Kodešová et al. 2019b).

Karbamazepin je tedy rostlinami přijímán, akumulován v jejich tkáních a také podstupuje transformaci a přeměňuje se, mimo jiné, na CBZ – EP a CBZ – DiOH (Klement et al. 2020).

3.2.6 Dopad karbamazepinu na primárně necílené organismy

Karbamazepin může mít toxické účinky na primárně necílené organismy, zejména ty, které žijí ve vodním prostředí. Pokud je ve vodním prostředí přítomen, může ovlivnit život organismů narušením jejich chování a následně ovlivnit jejich populační dynamiku. Chování je velmi důležitý faktor, který následně ovlivňuje přežití, růst a reprodukci organismů. Karbamazepin tak v důsledku může ovlivňovat celé složení vodního společenstva a funkci vodních ekosystémů (Qiang et al. 2016).

Již byla provedena řada studií, kde byly využity jako modelové organismy řasy, perloočky a ryby. Avšak i přesto nemáme dostatek dat a ucelenou představu o chronických účincích karbamazepinu a jeho metabolitů. Řada chronických účinků u ryb již byla pozorována. Jednalo se například o sníženou produkci embryí, nepravidelnosti v oocytech, snížení plazmatických pohlavních steroidů u dospělců *Danio rerio* a sníženou motilitu a rychlost spermií (Santos et al. 2018).

Qiang et al. (2016) prováděli studii, kde pozorovali vliv karbamazepinu na vývoj embryí *Danio rerio*. Karbamazepin byl v prostředí v různých koncentracích. U kontrolní skupiny 0 µg/l, u dalších skupin pak 1 µg/l, 2 µg/l a 5 µg/l. Ukázalo se, že koncentrace od 1 µg/l zvýšily rychlost vývoje embrya. Také délka těl u skupin s koncentrací od 2 µg/l a vyšší byla větší. Karbamazepin také ovlivnil jejich chování. S množstvím léčiva také rostla aktivita rybích embryí. Koncentrace od 1 µg/l vyvolaly vyšší citlivost vůči světlu. Shrnutím této studie bylo, že karbamazepin v daných koncentracích ovlivňuje a narušuje raný vývoj embryí.

Santos et al. (2018) zkoumali chronickou toxicitu karbamazepinu, opět, na rybách *Danio rerio*. Jedinci byly léčivu vystaveny po dobu 63 dnů v koncentracích 0 µg/l, 10 µg/l a 10000 µg/l. Expozice měla za následek snížení času příjmu potravy. Co se týká rozmnožování, bylo vypořádováno, že počet embryí se mezi skupinami nelišil, ovšem kvalita vajíček byla karbamazepinem negativně ovlivněna.

Gerennutti et al. (2008) se zabývali reprodukcí a embryotoxicitou u potkanů vystavených karbamazepinu. Ten jim byl podáván orálně v roztoku s propylenglykolem v množství 20 mg/kg nebo 40 mg/kg po přepočtení na tělesnou hmotnost. Kontrolní skupina dostávala pouze propylenglykol. Na pokus byly použity březí samice od 2. až 19. dne gravidity. 20. den byla zvířata usmrcena. U samic skupin, kterým byl podáván karbamazepin

byl zaznamenán pokles váhy. Plody, které byly vypreparovány, byly karbamazepinem značně ovlivněny. Oproti kontrolním skupinám u nich došlo ke zploštění kostí lebky, opožděnému vývoji lebečních kostí, a snížení osifikace hrudní kosti.

3.3 Arsen

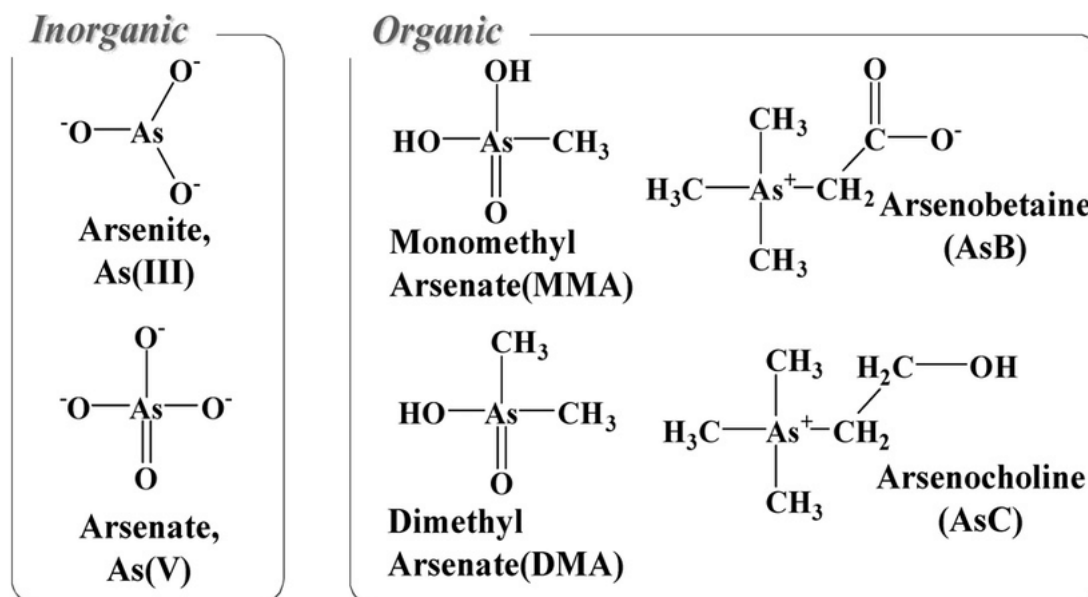
Arsen je všudypřítomný prvek, který nalzááme ve vodě, vzduchu, potravinách a půdě. Mimo jiné má také významnou roli jako mikronutrient (National Cancer Institute 2022). Zaujímá 20. místo v hojnosti v zemské kůře, 14. místo v mořské vodě a 12. místo v lidském těle (Mandal & Suzuki 2002). Můžu existovat ve čtyřech oxidačních stavech: As (-III), As (0), As (III) a As (V) (Oremland & Stolz 2003).

Arsen byl našimi předky používán již před počátkem letopočtu ať už k tvrzení bronzu či postupem času jako jed (Ravenscroft et al. 2009). Byl využíván jako přísada do hnojiv, stále se používá při mnoha průmyslových procesech, kde se je uplatňuje zejména v oblasti elektroniky a ve zdravotnictví (IRZ 2021; NCI, Mandal & Suzuki 2002).

Jeho výskyt v životním prostředí je často spojován s dalšími prvky (zejména Au, Ag, Cu a Sn). Těžba spolu se zpracováním těchto rud vedly k jeho uvolňování a následnému znečištění podzemních vod a těžebních oblastí po celém světě (Meharg & Hartley – Whitaker 2002; Ravenscroft et al. 2009). Toto je problém zejména kvůli jeho toxicitě jak pro organismy vodní, tak pro suchozemské, včetně člověka (IRZ 2021). V současné době je už dobře známo, že působení arsenu, i v nízkých dávkách, má karcinogenní účinky (Mandal & Suzuki 2002).

3.3.1 Specie arsenu

Arsen v prostředí nalzááme v anorganických formách, ale i ve formách organických (monomethylované a dimethylované deriváty) (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Příklady specií arsenu (Choi et al. 2010)

K transformaci anorganických forem na formy organické vede řada reakcí jako je redukce, oxidace a methylace. Tyto vzájemně propojené reakce mohou probíhat i zpětně, a tak se organické formy přeměňují zpět na formy anorganické (Chen et al. 2020). Transformovaný arsen je pak z těla vyloučen močí (Bhattacharjee 2013).

Jakmile se anorganický arsen dostane do organismu, je postupně metabolizován na organické sloučeniny. Nejdříve je As (V) enzymaticky redukován na As (III). Následuje methylace v játrech, kde se transformuje již na organickou formu MMAs (V) (kyselina monomethylarseničná). Tato forma je poté redukována na MMAs (III) (kyselina monomethylarsenitá). Ta je následně oxidována a připojením další methylové skupiny vzniká DMAs (V) (kyselina dimethylarseničná) (Chen et al. 2020).

Další cesta metabolizace arsenu se děje pomocí GSH (glutathion). As (III) reaguje s GSH za vzniku MMAs (III) nebo DMAs (III) (kyselina dimethylarsenitá). Ty mohou být následně oxidovány do jejich pětimocného stavu (Bhattacharjee 2013; Chen et al. 2020).

Organických sloučenin arsenu je celá řada, např. arsenobetain (AsB), arsenolipidy a arsenocukry (Musil et al. 2020; Xue et al. 2022).

Obecně bylo uvažováno, že organické formy arsenu jsou méně toxické, ale toto tvrzení se přehodnocuje, jelikož se ukázalo, že trojmocné methylované sloučeniny arsenu jsou extrémně toxické (Xue et al. 2022). Organické formy jsou z těla odbourávány rychleji než formy anorganické. Zároveň pětimocný arsen organismus vyloučí rychleji, než pokud je ve stavu trojmocném (Mandal & Suzuki 2002).

3.3.2 Zdroje a použití arsenu

3.3.2.1 Antropogenní zdroje

Antropogenní zdroje arsenu, jako jsou minerální odpady z těžby a zpracování, přísady do krmiva pro drůbež a prasata a pesticidy způsobují kontaminaci půdy a podzemní vody (Nordstrom 2002).

Nejčastějším a nejvýznamnějším zdrojem znečištění způsobené člověkem je zpracování geologických materiálů jako je uhlí a různé kovové rudy (Ravenscroft et al. 2009). Arsen je uvolňován zejména ve formě vázané na popílek. Nezanedbatelná část zůstává také ve škváře (IRZ 2021). Z ovzduší pak arsenu může být inhalován nebo se akumulovat na zemi v podobě spadu, odkud je přijímán rostlinami nebo se spolu s povrchovým odtokem dostává hlouběji do půdy a podzemních vod, kde může přetrvávat velice dlouhou dobu, protože má značnou schopnost kumulovat se v sedimentech (IRZ 2021; Ravenscroft et al. 2009).

Arsen se také hojně používal při výrobě insekticidů a herbicidů. Další využití našel při pěstování bavlny, kdy se uplatňoval jako defoliant (Mandal & Suzuki 2002). Jako další sféru, ve které stále nachází uplatnění můžeme uvést konzervaci dřeva (IRZ 2021; Mandal & Suzuki 2002).

V zemědělství je arsen stále používán jako aditivum v krmivech hospodářských zvířat (Mandal & Suzuki 2002; Oremland & Stolz 2003). Zde jsou využívány zejména organické sloučeniny arsenu, které působí na zažívací trakt prasat, zabráňují kokcidióze, zlepšují pigmentaci a zvyšují růst chovné drůbeže určené pro výkrm (Oremland & Stolz 2003).

3.3.2.2 Přírodní zdroje

Arsen se do prostředí dostává také přírodními procesy jako je zvětrávání hornin a sedimentů, sopečná činnost, geotermální aktivita, lesní požáry a větrem navátý prach a mořská

sůl. V tomto případě může být arsen pevně vázaný na suspendované částice transportován na velké vzdálenosti díky vodě a větru (Nriagu et al. 2007).

3.3.2.2.1 Arsen v zemské kůře

Arsen se přirozeně vyskytuje ve více než 200 různých minerálních formách (Mandal & Suzuki 2002). Nachází se v některých silikátových minerálech jako je biotit. K nejvýznamnější akumulaci dochází ve dvou minerálních formách – sulfidech a oxidech (Ravenscroft et al. 2009). Některé ze sulfidických minerálů se běžně tvoří v oblastech hydrotermální aktivity a jsou často spojovány s kovovými rudami (Mandal & Suzuki 2002; Ravenscroft et al. 2009).

3.3.2.2.2 Arsen v půdách

Běžné obsahy arsenu v půdách se mezi jednotlivým geografickými oblastmi značně liší, ale pokud se jedná o výrazněji nekontaminovanou půdu, tak se pohybují v rozmezí 0,1 až 40 mg/kg (průměrně 6 mg/kg). V písčitých půdách nalézáme nejnižší koncentrace arsenu, zatímco v nejvyšších koncentracích se nachází v aluviálních a organických půdách (Mandal & Suzuki 2002; Ravenscroft et al. 2009).

Hlavními faktory ovlivňující koncentraci prvků v půdě je mateřská hornina a antropogenní činnost. Další méně podstatné, avšak ne zanedbatelné faktory jsou klima, obsah organické a anorganické složky v půdě a redoxní potenciál (Mandal & Suzuki 2002).

Arsen se v půdách vyskytuje převážně v anorganické formě. Může se ale vázat na organický materiál. V jaké formě arsen najdeme závisí především na pH, redoxním potenciálu a množství sorpčních složek půdy. V aerobních podmínkách, které umožňují oxidaci se objevuje ve formě As (V). Takto je silně sorbován na jíly, oxidy/hydroxidy železa a manganu a organické látky. Naopak v redukčních podmínkách převládá As (III) (Mandal & Suzuki 2002).

3.3.3 Arsen ve vodě

Ve vodě se arsen v nízkých koncentracích vyskytuje přirozeně. Maximální přípustná hodnota obsahu arsenu v pitné vodě je stanovena WHO a EPA na 50 µg/l. Doporučená hranice je však nižší a to 10 µg/l (Mandal & Suzuki 2002).

Jelikož měření koncentrací arsenu není obvykle zařazeno do standartního testování kvality vod a arsen není identifikovatelný lidskými smysly, nalézáme ho stále na dalších nových místech. Nejrizikovějšími oblastmi jsou Argentina, Kambodža, Čína, Indie, Mexiko, Pákistán, USA a Vietnam (Podgorski & Berg 2020).

Cesty, jakými se arsen dostává do podzemních vod je několik.

1) Redukční rozpouštění

K tomuto procesu dochází, když se oxidy železa, na které je arsen adsorbován, rozkládají vlivem rozkládajících se organických látek (ty spotřebovávají kyslík). Následně je tak uvolňován i arsen.

2) Desorpce v alkalickém prostředí

Ta probíhá, pokud je pH vyšší nebo rovno osmi a za přítomnosti rozpuštěného kyslíku, nitrátů nebo síranů.

3) Oxidace sulfidů

Probíhá v prostředí, často u vodní hladiny, kde jsou sulfidické minerály vystaveny kyslíku.

4) Geotermální voda

Vody z hlubinných, někdy vulkanických zdrojů vyluhují arsen z okolních hornin. (Ravenscroft et al. 2009)

Výskyt velkého množství arsenu v podzemních vodách je celosvětový problém s vážnými zdravotními dopady na organismy (Podgorski & Berg 2020).

3.3.4 Arsen v rostlinách

Arsen je tedy do prostředí uvolňován v anorganické i organické formě. Anorganická forma, v podobě As (III) a As (V) může být rostlinami přijímána z půdního roztoku (Meharg & Hartley – Whitaker 2002). Organické methylované formy arsenu jsou rostlinám také dostupné (Chen et al. 2020). Ovšem anorganické formy se, jak již bylo řečeno, mohou přeměnit na formy organické a naopak, díky mikrobům schopných methylace a demethylace (Meharg & Hartley – Whitaker 2002). Arsenocukry tvoří například až 80 % celkového arsenu u mořských řas (Chen et al. 2020).

Rostliny přijímají arsen kořeny a ten se v jejich tělech může akumulovat (Mandal & Suzuki 2002; Ravenscroft et al. 2009). Pokud je jediným zdrojem arsenu půda, tak postupem času jeho množství v rostlině klesá. Větší problém nastává, pokud je obsažen v závlahové vodě a tím pádem i v půdě.

Velké množství arsenu nalezneme v listové zelenině. Problematictější je ale jeho vysoký obsah v obilovinách, zejména v rýži. V některých asijských zemích je toto významnější problém než příjem arsenu vodou. Arsen je pro rostliny ve vysokých koncentracích toxický, a to má v případě pěstování rýže negativní ekonomický dopad (Ravenscroft et al. 2009).

Rostlinné druhy se mezi sebou značně liší odolností vůči arsenu (Meharg & Hartley – Whitaker 2002). Pokud koncentrace arsenu přesáhne únosnou mez, tak můžeme u rostlin pozorovat různé změny. Na první pohled je viditelná snížená schopnost růstu. Dochází k zmenšení kořenového systému a opadávání listů. V další řadě vyvolává arsen oxidativní stres a narušuje proces fotosyntézy, protože snižuje množství chlorofylu (Moreno – Jimenez et al. 2012)

Vysoké koncentrace arsenu v rostlinách jsou tedy problémem zejména proto, že se jedná o jednu z cest, jak se dostává do lidského organismu (Ravenscroft et al. 2009).

3.3.5 Arsen ve zvířatech

Stejně jako v rostlinné tkáni, má arsen schopnost kumulovat se v tkáni živočišné. Je ovšem nutné brát zřetel na to, že akumulace a množství arsenu záleží na jeho konkrétní specii (Chen et al. 2020; Xue et al. 2022).

MMA a DMA jsou vytvářeny různými druhy organismů od hub přes bakterie, řasy, mořské organismy, myši až po člověka. Arsenobetain je hlavní specii arsenu u mnoha mořských býložravců. Vyskytuje se u řady ryb, které mají nízký obsah tuku. Tam tvoří až 100 % celkového arsenu. Dále je nacházen v humrech a mořských houbách (Xue et al. 2022).

U mořských živočichů, jako jsou měkkýši či korýši, bylo zjištěno, že celkový arsen se akumuluje v množství od 0,005 do 0,3 mg/kg. Někteří měkkýši dokonce obsahují více než 100 mg/kg. (Mandal & Suzuki 2002).

Pokud byl během experimentů na hlodavcích aplikován anorganický arsen v toxických dávkách březím samicím intravenózně nebo intraperitoneálně, došlo u přeživších plodů k deformacím oka, ledvin a kostry. Aplikace také způsobila zvýšenou letalitu u potomstva a hmotnost nově narozených jedinců byla pod normálem (Jacobson et al. 1999).

Naopak, pokud byl v laboratorních podmínkách podáván arsen hlodavčím samicím orálně, v potravě, pitné vodě či inhalací, nebyly u potomstva pozorovány žádné deformace, a to ani v dávkách, které byly pro některé z březích samic letální (Jacobson et al. 1999).

U savců byla pozorována akumulace arsenu v tkáních ektodermu. Mandal & Suzuki (2002) pak konstatují, že se anorganický arsen váže zvláště na chlupy a další tkáně bohaté na keratin. Obecně jsou k poškození arsenem náchylnější tkáně obsahující velké množství oxidačních enzymů. Mluvíme tak o gastrointestinálním traktu, játrech, ledvinách, plicích, endotelu a epidermis (Garland 2021).

Otrava arsenem u zvířat bývá obvykle akutní s největším dopadem na gastrointestinální trakt a kardiovaskulární systém. Charakteristický je vodnatý průjem a dehydratace. Nejčastěji zasažené orgány jsou játra a ledviny, kde dochází k zánětlivým procesům a játra mohou začít nekrotizovat. Nástup otravy je obvykle rychlý a projevuje se do několika hodin (Garland 2021).

Co se týká karcinogenity, bylo provedeno několik studií, které však byly omezeny časem expozice a počtem jedinců, proto jsou pouze orientační. Výsledkem těchto experimentů bylo však tvrzení, že arsen může podporovat vznik nádorů (INCHEM 2001). Při běžných koncentracích As v prostředí bylo prokázáno, že nemá negativní účinky na vývoj budoucího potomstva (Jacobson et al. 1999).

3.3.6 Vliv arsenu na lidský organismus

Znečištění prostředí arsenem, zejména podzemních vod, je celosvětový problém, který denně ovlivňuje miliony lidí (Ratnaike 2003; Podgorski & Berg 2020; WHO 2022). Odhaduje se, že 140 milionů lidí z více než 70 zemí přijde do styku s vyšší koncentrací arsenu, než je přípustná hranice stanovená WHO (WHO 2022).

3.3.6.1 Akutní toxicita

Většina případů akutní otravy arsenem se vyskytuje při náhodném požití insekticidů nebo pesticidů a méně často při pokusu o sebevraždu. Malá množství (<5 mg) vedou ke zvracení a průjmu, ale odezní do 12 hodin a léčba není nutná. Letální dávka arsenu při akutní otravě se pohybuje v rozmezí mezi 100 mg až 300 mg (Ratnaike 2003).

Arsen postihuje zejména gastrointestinální trakt a způsobuje nevolnost, zvracení a průjem. Dále může postihnout i dýchací a nervový systém (Ratnaike 2003; National Library for Medicine 2017).

Smrt obvykle nastává do 24 hodin po vstupu arsenu do systému (Ratnaike 2003; National Library for Medicine 2017).

3.3.6.2 Chronická toxicita

První příznaky dlouhodobé expozice vysokým hladinám anorganického arsenu jsou obvykle pozorovány na kůži. Zahrnují změny pigmentace, kožní léze a tvrdé skvrny na dlaních a chodidlech (hyperkeratóza). Tyto známky chronické otravy se objevují po minimálně pětileté expozici a mohou být předzvěstí rakoviny kůže (WHO 2022).

Z dalších orgánů, u kterých arsen způsobuje rakovinu jsou močový měchýř a plíce (Ratnaik 2003; WHO 2022).

Arsen také negativně ovlivňuje vývoj dítěte, zvyšuje pravděpodobnost úmrtí u kojenců. Lidé vystavení působení arsenu mají větší pravděpodobnost výskytu rakoviny, srdečního selhání a plicních onemocnění v raném věku. V neposlední řadě má arsen tak vliv na kognitivní vývoj jedince, inteligenci a paměť (WHO 2022).

Proti chronickým účinkům arsenu se dá bojovat pomocí selenu. Sah & Smits (2012) ve svém experimentu pozorovaly účinky selenu proti toxicitě vyvolané arsenem. V laboratorních podmínkách byl potkanům podáván arsen (40 and 80 ppm) v pitné vodě. Současně byli jedinci rozděleni do tří skupin a každá z nich měla dietu lišící se hladinami selenu (deficitní: 0,01 mg/kg, adekvátní: 0,15 mg/kg a obohacená: 0,6 mg/kg). Tato dieta byla podávána 16 týdnů. U skupiny s deficitní dávkou selenu se projevila potlačená produkce protilátek a tím pádem poškození organismu arsenem bylo závažnější. Selen u jedinců zvyšoval hladiny glutathionu v krvi, který má obranné účinky a působí tak pozitivně proti toxicitě arsenu. Selen tedy působí jako antagonist arsenu.

Pozitivní efekt selenu byl studován i u rostlin. Bylo zkoumáno, jaký má vliv Se (IV) nebo Se (VI) na toxicitu As (III) a As (V) u rostlin rýže. Pozorován byl příjem a transport arsenu z půdy do rostlin. Ukázalo se, že selen by mohl inhibovat příjem arsenu kořeny rostlin, ale vše závisí na specii arsenu, jeho koncentraci v prostředí a samotném kultivaru rýže (Pokrhel et al. 2020).

3.4 Hraboš polní

Hraboš polní je jedním z mnoha zástupců drobných savců rodu *Microtus*. Zástupce tohoto rodu řadíme mezi jedny z nejmladších hlodavců vůbec (Baláž 2010).

3.4.1 Život

Hraboš polní se ve volné přírodě obvykle dožívá maximálně 36 měsíců (Eol 2018), v zajetí se však tato doba může značně prodloužit a jedinci se tak mohou dožívat i o 20 měsíců déle (AnAge 2017).

Pokud samice zabřezne, tak po 16–24 dnech (AnAge 2017; Eol 2018) porodí okolo pěti mláďat (Eol 2018), jejichž váha se pohybuje kolem dvou gramů (AnAge 2017; Eol 2018). Za každoroční období reprodukce, které trvá od března do října samice obvykle prodělá tři reprodukční cykly (Eol 2018).

V dospělosti jedinci dosahují váhy od 20 g až do 50 g, což mimo jiné záleží na pohlaví a na okolních podmínkách (Jacob et al 2014; AnAge 2017; Eol 2018). Samice mívají nižší váhu než samci (AnAge 2017; Eol 2018).

Hraboši polní žijí v mělkých norách, ve hloubce 30–40 cm (Jacob et al. 2014; Eol 2018). Nory slouží jako prostředí pro výchovu mláďat, uskladnění potravy a jako úkryt při odpočinku (Eol 2018).

Velikost populace je závislá a odvíjí se od ročního období. Nejpočetnější bývá populace obvykle koncem období páření, což je podzim. Pokud je však dostatek potravy a sněhové pokrývky, která chrání hraboše před predátory a nízkými teplotami, mohou se rozmnožovat i v zimě (Jacob et al. 2014).

Populační dynamika je charakterizována víceletými cykly trvající dva roky až pět let. V době nejintenzivnějšího rozmnožování mohou počty hraboší populace dosáhnout počtu více než 2 000 jedinců na hektar. Během těchto období působí značné škody na zemědělských plodinách a ekonomice v celé Evropské unii (Aulický et al. 2022).

3.4.2 Výskyt

Hraboše polního řadíme k nejhojněji se vyskytujícím druhům drobných savců v Evropě, včetně České republiky (Jacob et al. 2014; Aulický et al. 2022). Populace hraboše polního nalézáme od severního Španělska až po centrální část Ruska (Baláž 2010; Jacob et al. 2014). Izolované populace se nacházejí i na Pyrenejském poloostrově, Normanských ostrovech a na skotském soustroví Orkneje (Jacob et al. 2014).

Obvyklý habitat hraboše polního je otevřená zemědělská krajina, jako jsou pole, louky, břehy potoků, příkopy a železniční násypy. Ze zemědělských plodin si obvykle vybírá stanoviště, kde roste vojtěška nebo jetel (Aulický et al. 2022). Jedince tohoto druhu však můžeme nalézt i v řídkých lesních porostech jako jsou například nově zalesněné plochy (Baláž 2010).

Hlavní výskyt hraboše polního je uváděn v nadmořské výšce 200–600 m n.m. Jsou však záznamy o jedincích žijících v nadmořské výšce až 1600 m n.m. V České republice preferuje zejména mírně teplé klimatické oblasti, kde se nachází většina jeho zdejší populace (Aulický et al. 2022).

4 Metodika

4.1 Povolení k experimentu

Celý experiment s laboratorními zvířaty probíhal v souladu s platnými zákony České republiky, a to konkrétně se zákonem č. 246/1992 Sb. Zákon o ochraně zvířat proti týrání a směrnicí ES 86/609/EHS. Pokus byl schválen komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, schvalovací kód MŠMT-1082/2017-2. Na péči a zacházení se zvířaty dohlížela autorizovaná osoba Ing. Zuzana Čadková, Ph.D., DiS., držitelka certifikátu Ústřední komise pro ochranu zvířat č. CZ 02201.

4.2 Odběr půdy

Aby bylo posouzeno a stanoveno množství arsenu, kterému mají být jedinci vystaveni, byla v okolí dvou různých lokalit odebrána povrchová vrstva půdy (0–20 cm). První lokalitou byla orná půda z okolí města Cítov. Druhý vzorek půdy byl odebrán z okolí vesnice Mokrsko, kde byla půda tvořena primární mineralizací nad ložiskem zlata.

Tyto dvě lokality byly vybrány kvůli velmi rozdílnému pseudocelkovému obsahu arsenu. Cítovská půda obsahuje arsen a další stanovované prvky pod preventivními hodnotami a sloužila v tomto pokusu jako kontrolní. Naopak půda z oblasti Mokrsko se vyznačuje extrémně zvýšeným pseudocelkovým obsahem arsenu nad preventivní hodnoty, ale zároveň obsahy ostatních toxických prvků preventivní hodnoty nepřekročily (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Pseudocelkové obsahy vybraných prvků v půdách (průměr ± SDa) a jejich preventivní hodnoty [mg/kg]

Prvky	Půda z lokality Cítov	Půda z lokality Mokrsko	Preventivní hodnoty*
As	12 ± 1.1	1304 ± 131	20.0
Be	0.778 ± 0.014	0.545 ± 0.018	2.0
Cd	0.165 ± 0.046	0.265 ± 0.005	0.5
Co	6.08 ± 0.36	11.7 ± 0.0	30.0
Cr	25.3 ± 0.4	16.0 ± 0.1	90.0
Cu	10.7 ± 0.1	30.8 ± 6.4	60.0
Ni	14.0 ± 0.5	8.23 ± 0.46	50.0
Pb	12.4 ± 0.6	10.2 ± 0.8	60.0
V	34.7 ± 0.0	91.3 ± 1.3	130.0
Zn	39.4 ± 0.7	76.6 ± 0.2	120.0

a = standardní odchylka; *ustanovené Vyhláškou č.153/2016 Sb., o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy

4.3 Krmivo a tekutiny

Před samotnou přípravou peletovaných granulí, v jejichž podobě bylo krmivo podáváno, byla půda popsaná v předchozí kapitole na vzduchu vysušena, hmoždířem rozmělněna a následně proseta přes síto z nerezové oceli s průměrem ok 2 mm.

K přípravě krmiva byly využity komerčně prodávané peletované granule od firmy Velaz s.r.o., které jsou zbaveny jakýchkoliv patogenních organismů. Tyto granule byly rozemlety na jemný prášek a nazvány jako práškové granulované krmivo (PGK). Z PGK bylo dvakrát samostatně odváženo 90 g. Prvních 90 g bylo smícháno s 10 g cítovské půdy a druhých 90 g s 10 g půdy z lokality Mokrsko. Vznikla tak homogenní směs, kde půda tvořila 10 % hmotnosti. Tato směs komerčních granulí a půdy byla poté peletizována a pojmenována jako experimentální krmivo.

Obsah arsenu v experimentálním krmivu byl 166 mg/kg. V krmivu, které o arsen obohaceno nebylo a dále bylo nazýváno jako kontrolní byl stanoven arsen v množství 1,25 mg/kg.

Co se týká tekutiny, byly použity dva druhy – roztok karbamazepinu s kohoutkovou vodou a pouze kohoutková voda. Roztok karbamazepinu byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 3,6 mg /l a jeho finální koncentrace byla 10 µg/l. Finální koncentrace byla založena na jeho reálné koncentraci ve sladkovodním prostředí (Wilkinson et al. 2022).

4.4 Chov jedinců v laboratorních podmínkách

Na experiment bylo použito 63 jedinců hraboše polního. Ti si prvních sedm dní zvykali na laboratorní podmínky. Během této doby byli krmeni komerčními granulemi a kohoutkovou vodou ad libitum. V místnosti byl udržován cyklus 12 hodin světlo – 12 hodin tma a teplota 22 ± 2 °C.

K započetí experimentu bylo zapotřebí osmi plastových průhledných boxů o rozměrech 370 x 270 x 170 mm. Každý z nich byl vybaven pítkem o objemu 500 ml a krmítkem. Jako podestýlka byly použity piliny. Jednotlivé boxy byly označeny názvem příslušné skupiny. Jednalo se o boxy: As – B1, As – B2, CMZ – B1, CMZ – B2, As + CMZ – B1, As + CMZ – B2, Kontrola – B1, Kontrola – B2.

Všichni jedinci hraboše polního byli na začátku rozděleni do osmi skupin dle druhu krmiva a tekutin, které jim byly podávány, a každá skupina byla dána do jednoho z boxů:

As – B1 – 7 jedinců

As – B2 – 8 jedinců

CMZ – B1 – 8 jedinců

CMZ – B2 – 8 jedinců

As + CMZ – B1 – 8 jedinců

As + CMZ – B2 – 8 jedinců

Kontrola – B1 – 9 jedinců

Kontrola – B2 – 7 jedinců

Jedincům skupiny As bylo po dobu trvání experimentu podáváno experimentální krmivo se zvýšenou koncentrací arsenu. Skupiny CMZ dostávaly jako tekutinu místo vody roztok karbamazepinu a kontrolní krmivo. Skupinám As + CMZ bylo podáváno jak experimentální krmivo se zvýšenou koncentrací arsenu, tak i roztok karbamazepinu. Jedinci ze skupin Kontrola byli krmeni nekontaminovaným kontrolním krmivem a jako tekutina jim byla podávána kohoutková voda.

Experiment byl započat 17.2.2022 a trval po dobu následujících šesti týdnů. Poslední vážení proběhlo 31.3.2022 a ještě v ten den byla zvířata eutanizována.

Před umístěním zvířat do boxu byl každý jedinec zvážen. Další vážení probíhalo vždy po sedmi dnech a trvalo až do konce experimentu. Průběžně probíhala i kontrola krmiva a tekutin. Ta probíhala vždy v dobu vážení, a ještě jednou v týdnu. Úbytek tekutin a krmiva byl zaznamenáván. Následně bylo doplněno potřebné množství. Během těchto šesti týdnů se narodilo několik mláďat. Ta byla vždy zapsána a odebrána k náhradní matce. 31.3.2022 byla všechna zvířata usmrcena. K usmrcení byla využita inhalace narkotika – konkrétně chloroformu.

Z každého kadáveru byla následně odebrána krev pomocí injekční stříkačky. Ta však pro účely této diplomové práce použita nebyla. Poté bylo u každého jedince určeno pohlaví a věk (adultní, subadultní či juvenilní). Z kadáverů byly vyjmuty vybrané orgány pro další analýzy. Jednalo se o játra, ledviny, slezinu, plíce a varlata. Všechny uvedené orgány byly promyty deionizovanou vodou, zváženy, lyofilizovány, poté uloženy v Petriho miskách a uchovávány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do laboratorních analýz. Analýzy celkového obsahu prvků byly stanoveny v ledvinách, plicích, slezině a varlatech, zatímco játra byla použita pro analýzu speciace arsenu a kvantifikaci karbamazepinu a jeho metabolitů.

4.5 Stanovení arsenu

4.5.1 Stanovení celkového obsahu arsenu v živočišných tkáních

20-150 mg lyofilizovaného homogenního vzorku tkáně bylo naváženo do 35 ml křemmené zkumavky, poté byly přidány 3,0 ml HNO_3 (Analpure®, Analytika, Česká republika) a 3,0 ml H_2O_2 (Rotipuran®, Carl Roth, Německo). Zkumavky byly zavíčkované a umístěny do mikrovlnné rozkladné jednotky (Discover SP-D, CEM Corp., USA). Mineralizace probíhala při $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 min. Po naředění mineralizátů Milli-Q vodou ($\geq 18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$; MilliQ system, Millipore, SAS, Francie) byla koncentrace As v mineralizátech stanovena technikou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS; Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA). Přístroj byl kalibrován v rozsahu $0,01 - 100\text{ }\mu\text{g/l}$. Měření probíhalo s využitím kolizní cely s průtokem helia ($0,36\text{ ml/min}$) a výsledky byly korigovány na odezvu interního standardu (^{72}Ge). Správnost měření byla zajištěna paralelní analýzou certifikovaného referenčního materiálu hovězí játra (Bovine liver; BCR®-185R) a analýzou procedurálních slepých vzorků.

4.5.2 Speciační analýza arsenu v živočišných tkáních

a) Extrakce

150 mg lyofilizovaného homogenního vzorku tkáně bylo naváženo do 35 ml křemmené zkumavky. K uvolnění specií As do vodného roztoku byla využita metoda, kterou popsali Lin et al. (2020) s několika úpravami uvedenými níže. K extrakci bylo použito rozkladné zařízení s mikrovlnným ohřevem, extrakce se skládala ze dvou kroků: 1) ke vzorku bylo pipetováno 6,0 ml 20 mmol/l HNO₃, následoval ohřev na teplotu 120 °C, udržení této teploty po dobu 20 min a ochlazení. Vzorek byl odstředěn (2680 × g) po dobu 10 min a roztok nad sedlinou byl slit a ponechán; 2) k sedlině bylo opět pipetováno 6,0 ml 20 mmol/l HNO₃ a pokračovalo se dle podmínek prvního extrakčního kroku až do získání druhého roztoku nad sedlinou. Oba roztoky byly smíchány, protřepány a přefiltrovány přes stříkačkový filtr (0,2 μm, NYLON). Z výsledného roztoku byly odebrány dva alikvotní podíly. První alikvot byl analyzován na celkový obsah As technikou ICP-MS (pro stanovení extrakční účinnosti), druhý alikvot byl podroben speciační analýze spřaženou technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC; Agilent 1260, Agilent Technologies Inc., USA) s ICP-MS.

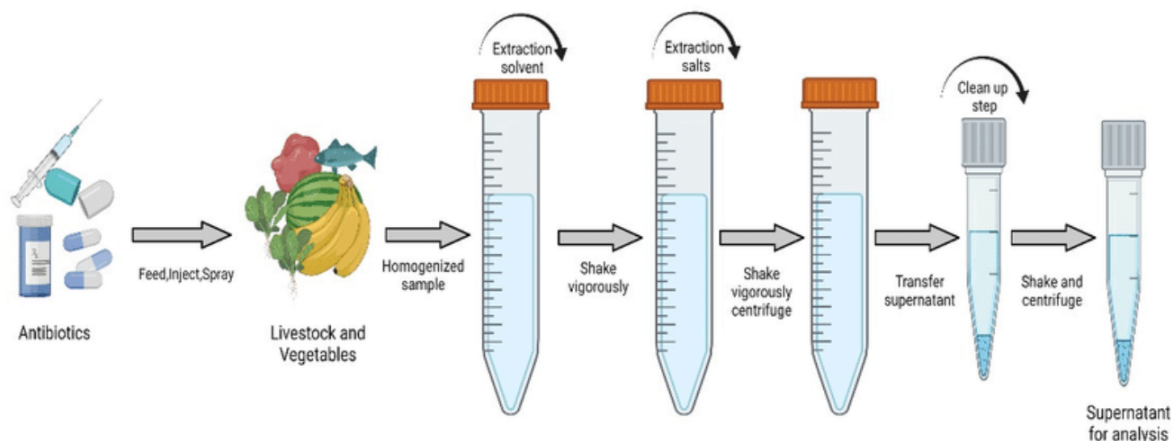
b) Speciační analýza

Analytický přístroj HPLC byl vybaven aniontově výměnnou kolonou PRP-X100 (150 × 4,6 mm, 10 μm; Hamilton, USA). Byla aplikována gradientová eluce podle postupu, který publikovali Button et al. (2011). Složení mobilní fáze: 4 mmol/l NH₄NO₃ (A) a 60 mmol/l NH₄NO₃ (B), jejichž poměr byl regulován takto: 70 %/30 % A/B (0-3,3 min), 20 %/80 % A/B (3,5-8,0 min), poté zpět na výchozí podmínky 70 % /30 % A/B. Průtok mobilní fáze byl 0,95 ml /min, pH obou mobilních fází bylo nastaveno na hodnotu 8,7 s roztokem NH₄OH (AnalaPure®, Analytika, Česká republika), objem nástřiku vzorku 20 μl, ohřev kolony na 30 °C. K externí kalibraci přístroje v rozsahu 0,1 – 50 μg/l As byly připraveny příslušné roztoky, a to rozpuštěním NaAsO₂ (As III), Na₂HAsO₄ × 7H₂O (As V), kyseliny dimethylarseničné (DMA), vše zakoupeno ve Fluka (Švýcarsko), dále kyseliny monomethylarseničné (MMA) arsenobetainu, které byly připraveny v laboratoři. Všechny vzorky byly před analýzou naředěny mobilní fází (50 %/50 % A/B) s přihlédnutím k rozsahu kalibrace.

4.6 Stanovení karbamazepinu

Ke stanovení karbamazepinu byla využita metoda QuEChERS – Quick (rychlá), Easy (snadná), Cheap (levná), Effective (účinná), Rugged (robustní), Safe (bezpečná). Tato metoda byla původně využívána pro stanovení reziduí pesticidů, ale postupem času se rozšířila i do oblasti stanovování reziduí farmak, mykotoxinů a kontaminantů prostředí jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a perzistentní organické polutanty (POP). Metoda QuEChERS je oproti ostatním konvenčním metodám výhodná, protože vyžaduje méně času, spotřebuje se při ní méně rozpouštědla a provádí se v méně krocích.

Metoda probíhá ve dvou krocích. V první řadě se provádí extrakce analytu z homogenizovaného vzorku a ve druhém kroku je vzorek přečištěn. Přečištění se provádí kvůli lipidům, organickým kyselinám, cukrům a barvivům, které vzorek může obsahovat a jejichž přítomnost není pro následnou analýzu žádoucí (Kim et al. 2019) (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma metody QuEChERS (Dawadi et al. 2021)

Nejprve byla játra homogenizována pomocí tekutého dusíku. Vzorek byl umístěn do porcelánového hmoždíře, zalit tekutým dusíkem a rozmělněn na jemný prášek.

Následně bylo odváženo vždy 0,1 g vzorku a ten byl přendán do zkumavky. Ke vzorku byl přidán interní standard a 1 ml Milli-Q vody. Vzorek byl promíchán v orbitální třepačce Vortex a vložen do lednice (4 °C) na čtyři minuty. Po vyjmutí z lednice byl k vzorku přilít 1 ml acetonitrilu a vše bylo opět promícháno v třepačce po dobu jedné minuty. Po promíchání bylo přidáno 650 mg QuEChERS soli a vzorek byl po dobu pěti vteřin míchán v třepačce. Dále byl vzorek centrifugován (4 °C, 4500 rpm, 10 min). Centrifugací došlo k oddělení jednotlivých vrstev. V dolní části zkumavky zůstaly extrakční soli a v horní vrstvě se oddělil supernatant. Supernatant byl pomocí pipety odebrán a přelit do 1,5 ml mikrozukavky Eppendorf. Z tohoto množství bylo ještě odměřeno 700 µl supernatantu a ten byl pipetován do 2 ml mikrozukavek Eppendorf. K tomuto množství bylo přidáno 700 µl hexanu a celá směs byla promíchána ve Vortexu po dobu 3 minuty a následně šla do centrifugy (4 °C, 14000 rpm, 5 min). V horní vrstvě se oddělil hexan, který na sebe navázal lipidy a v dolní vrstvě acetonitril s karbamazepinem. Hexanová vrstva byla odstraněna a dolní acetonitrilová vrstva byla přečištěna pomocí d-SPE. Pro d-SPE byla použita směs z 50 mg PSA, 50 mg C18 a 150 mg MgSO₄. Komponenty pro d-SPE byly předem naváženy do 1,5 ml mikrozukavek Eppendorf ke kterým bylo následně přilito 650 µl acetonitrilové vrstvy. Vzorek byl opět promíchán ve Vortexu po dobu několika vteřin a centrifugován (4 °C, 14000 rpm, 5 min). Odstředěný supernatant z horní vrstvy byl odebrán a analyzován pomocí LC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií).

4.7 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo prováděno u každého orgánu. Pomocí ANOVA a následně Tukeyova testu pomocí volně dostupného statistického prostředí R byli hodnoceni samci mezi jednotlivými skupinami a samice mezi jednotlivými skupinami. T – test v programu Excel byl použit pro srovnání samců a samic vždy v rámci jedné skupiny.

5 Výsledky

Na začátku bylo do experimentu zařazeno 63 jedinců. Druhý týden uhynul ve skupině Kontrola – B2 jeden jedinec a byl tak vyřazen. Třetí týden byla ze skupiny As – B2 vyřazena jedna samice i s mláďaty, která porodila. Čtvrtý týden se ve skupině Kontrola – B2 narodila čtyři máďata, která byla z boxu odebrána k náhradní matce.

5.1 Vývoj hmotnosti

Každý týden byly jedinci váženi a jejich hmotnosti byly zaznamenány. Následně byly váhy jedinců za každý týden ve skupině zprůměrovány a z nich byly tvořeny následující grafy.

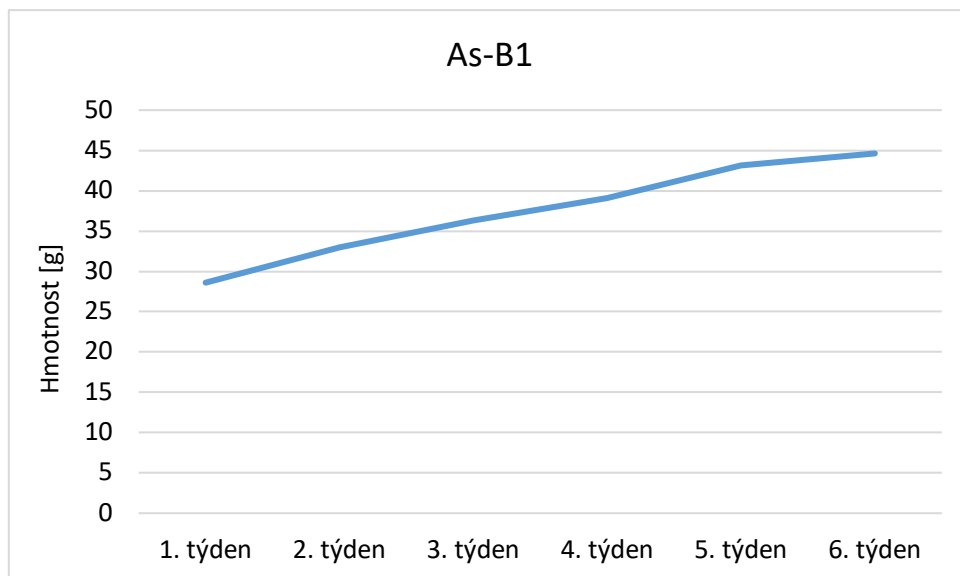
Průměrná hmotnost jedinců skupin As se každý týden zvyšovala. Průměrná hmotnost jedinců As – B1 začala na 28,6 g a v šestém týdnu dosáhla 44,6 g. Průměrná hmotnost As – B2 začala na 20,8 g a v šestém týdnu byla navážena hodnota 33,2 g (viz Obrázek 6, Obrázek 7).

Průměrná hmotnost jedinců skupin CMZ měla rostoucí tendenci. Počáteční průměrná hmotnost jedinců CMZ – B1 byla 23,3 g a v šestém týdnu byla 34,6 g. Mezi třetím a čtvrtým týdnem byl zaznamenán nejnižší nárůst a to z 29,0 g na 29,1 g (viz Obrázek 8). Počáteční průměrná hmotnost skupiny CMZ – B2 byla 15,1 g a zvýšila se na 26,7 g v šestém týdnu (viz Obrázek 9).

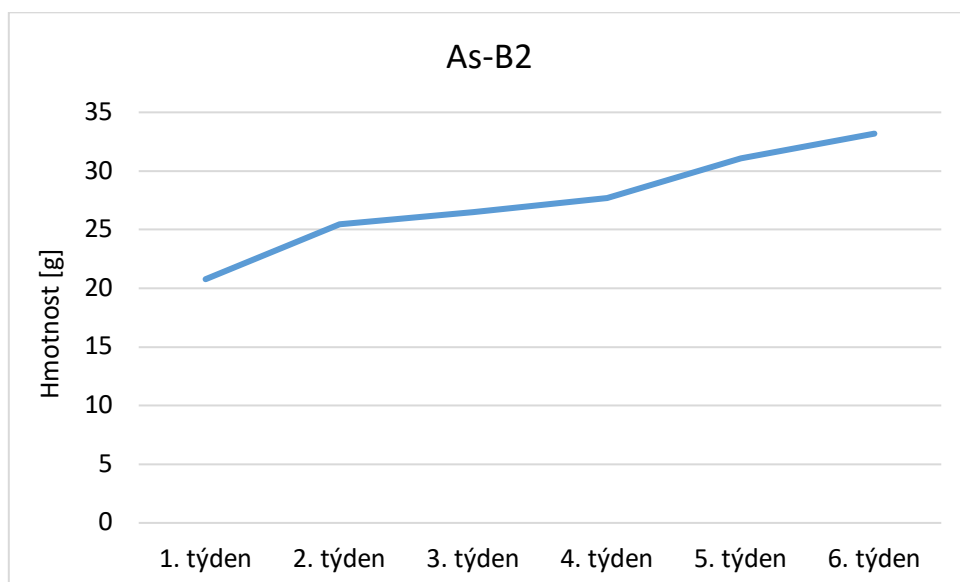
U skupin As + CMZ průměrná hmotnost jedinců také rostla. U As + CMZ – B1 se zvýšila z 16,3 g na 26,1 g a u As + CMZ – B2 z 16,1 g na 29,7 g v šestém týdnu (viz Obrázek 10, Obrázek 11).

Průměrná hmotnost jedinců skupiny Kontrola – B1 začala na 14,6 g a v šestém týdnu dosáhla 28,2 g (viz Obrázek 12). U skupiny Kontrola – B2 byl ze třetího na čtvrtý týden zaznamenán, jako u jediné skupiny, pokles a to z 39,3 g na 38,5 g. Celkově se průměrná hmotnost jedince v této skupině zvýšila z 30,8 g na 44,5 g (viz Obrázek 13).

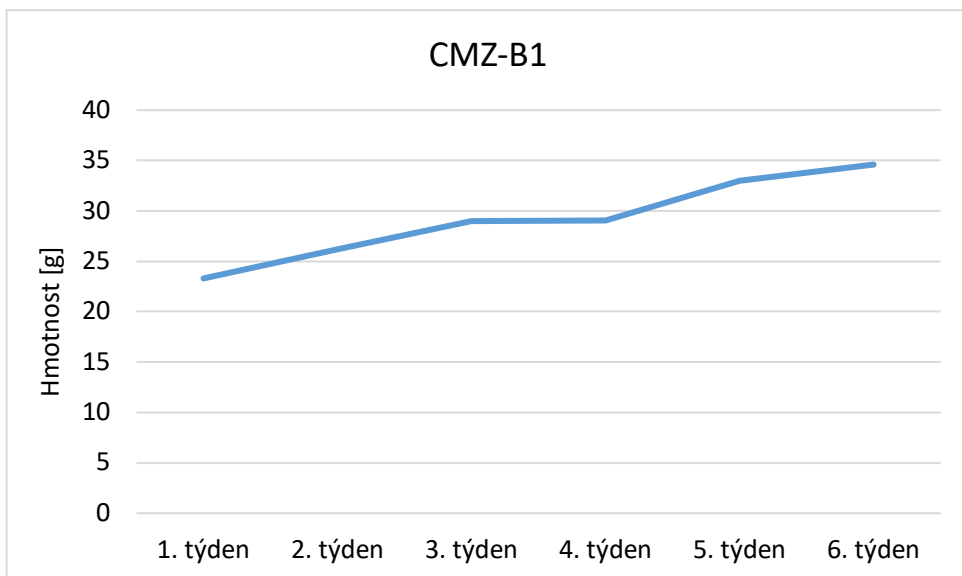
Celkově nejvyšší průměrná hmotnost byla zamenána u skupin As – B1 (viz Obrázek 6) a Kontrola – B1 (viz Obrázek 12). Naopak nejnižší průměrná hmotnost jedinců byla u skupiny CMZ – B2 (viz Obrázek 9) a As + CMZ – B1 (viz Obrázek 10).



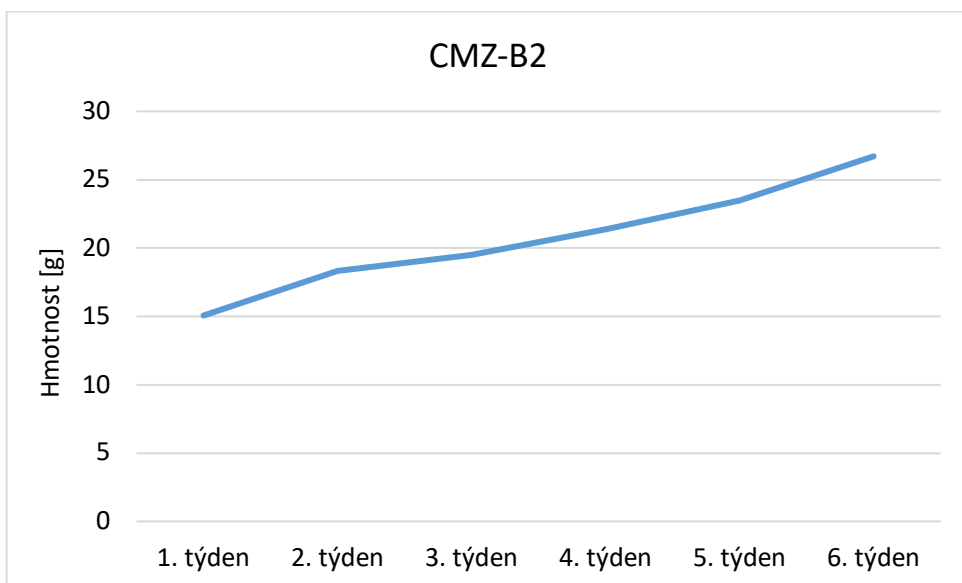
Obrázek 6: Průměrná hmotnost jedinců As-B1 [g]



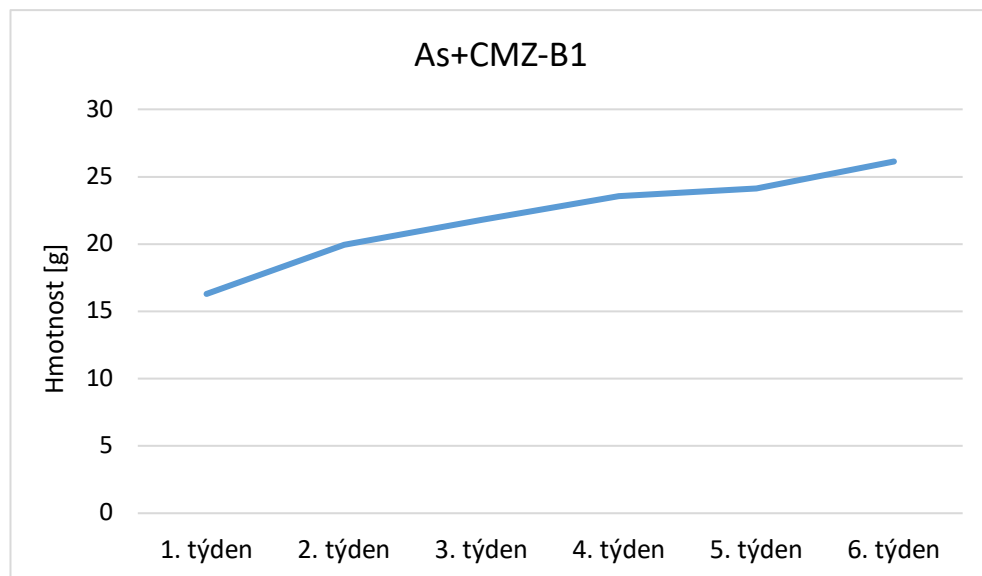
Obrázek 7: Průměrná hmotnost jedinců As-B2 [g]



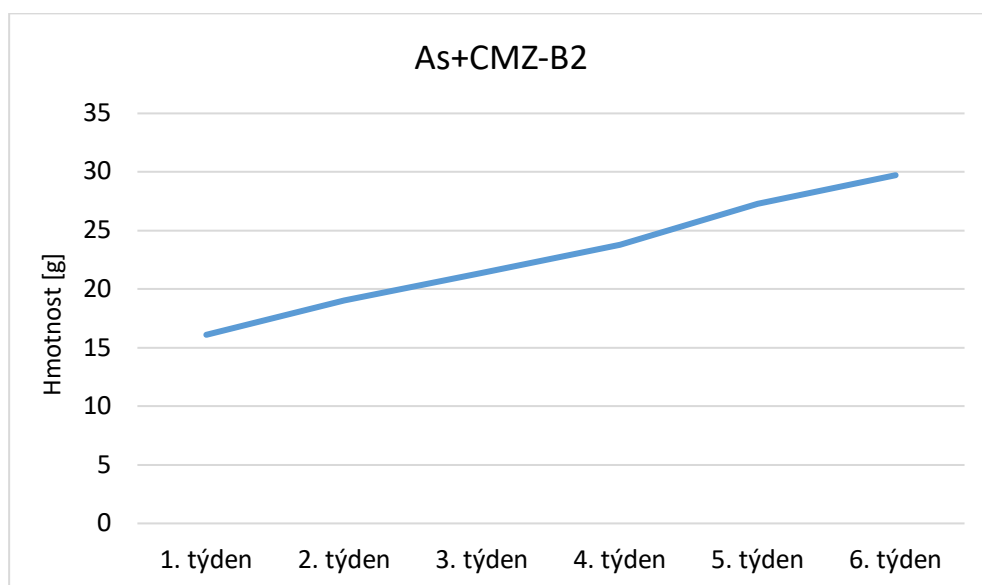
Obrázek 8: Průměrná hmotnost jedinců CMZ-B1 [g]



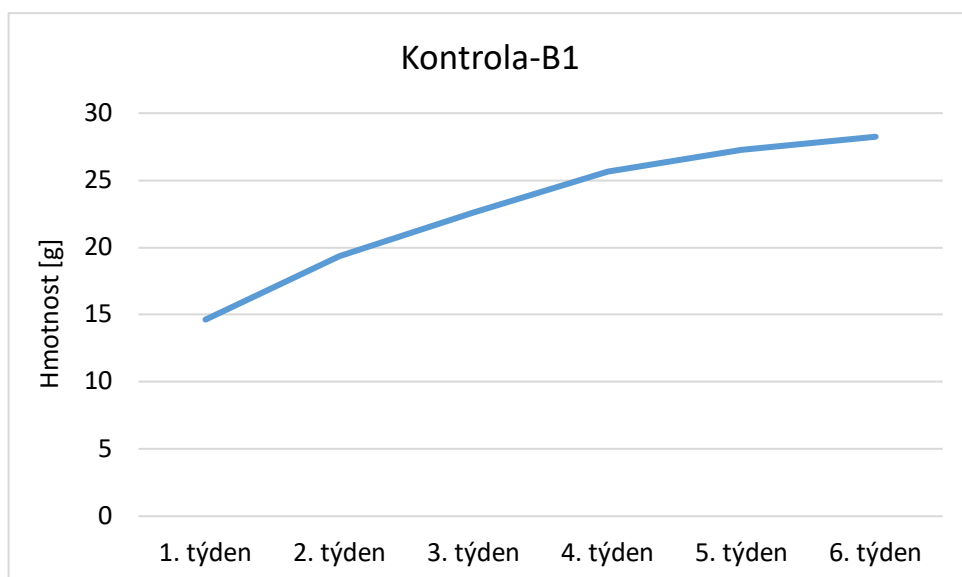
Obrázek 9: Průměrná hmotnost jedinců CMZ-B2 [g]



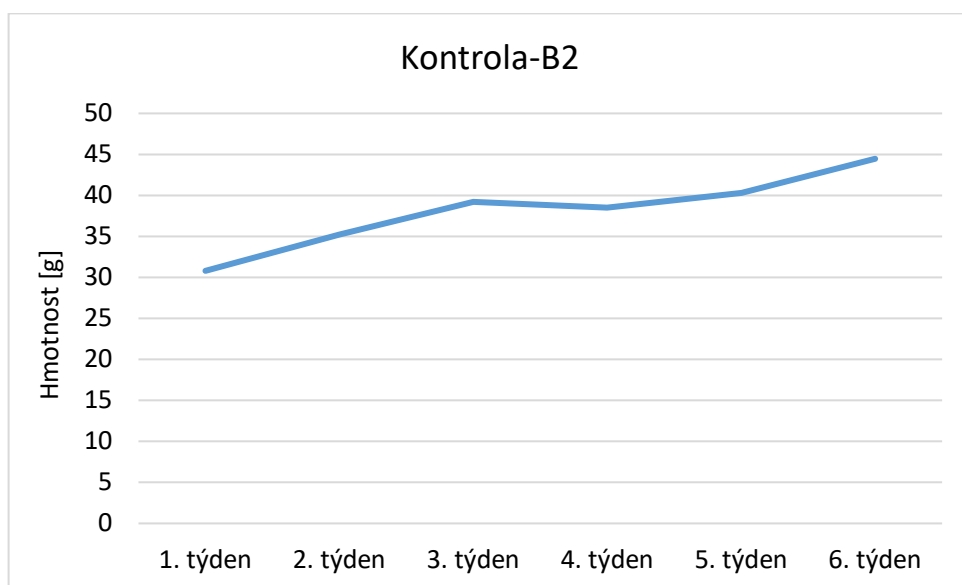
Obrázek 10: Průměrná hmotnost jedinců As+CMZ-B1 [g]



Obrázek 11: Průměrná hmotnost jedinců As+CMZ-B2 [g]



Obrázek 12: Průměrná hmotnost jedinců Kontrola-B1 [g]



Obrázek 13: Průměrná hmotnost jedinců Kontrola-B2 [g]

5.2 Příjem krmiva a tekutin

Průměrná spotřeba krmiva jedincem za den dosáhla celkově nejvyšších hodnot u skupiny As – B1 a Kontrola – B2. Jedinec v As – B1 spotřeboval průměrně za den 7,03 g krmiva a ve skupině Kontrola – B2 7,02 g krmiva. Naopak nejnižší průměrnou spotřebu krmiva vykazovali jedinci skupiny As + CMZ – B1 a to 4,45 g. I přesto, že spotřeba krmiva u některých skupin v určitých týdnech poklesla, průměrná denní spotřeba krmiva jedincem byla na konci experimentu vždy vyšší než na začátku (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Průměrná spotřeba krmiva za den v jednotlivých skupinách [g]

Skupina	Průměrná spotřeba krmiva jedincem za den [g]						
	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden	Celkově
As – B1	5,40	7,15	6,85	6,95	7,67	8,16	7,03
As – B2	4,77	5,09	5,34	5,27	6,68	5,37	5,42
CMZ – B1	4,98	4,76	5,15	5,85	5,68	5,75	5,36
CMZ – B2	3,83	3,83	7,70	4,50	9,11	9,64	6,44
As + CMZ – B1	4,11	4,16	4,53	4,23	5,01	4,68	4,45
As + CMZ – B2	3,69	4,02	4,72	5,14	5,23	5,38	4,70
Kontrola – B1	4,44	4,68	5,18	5,60	5,19	5,98	5,18
Kontrola – B2	5,92	6,81	6,60	7,24	8,06	7,48	7,02

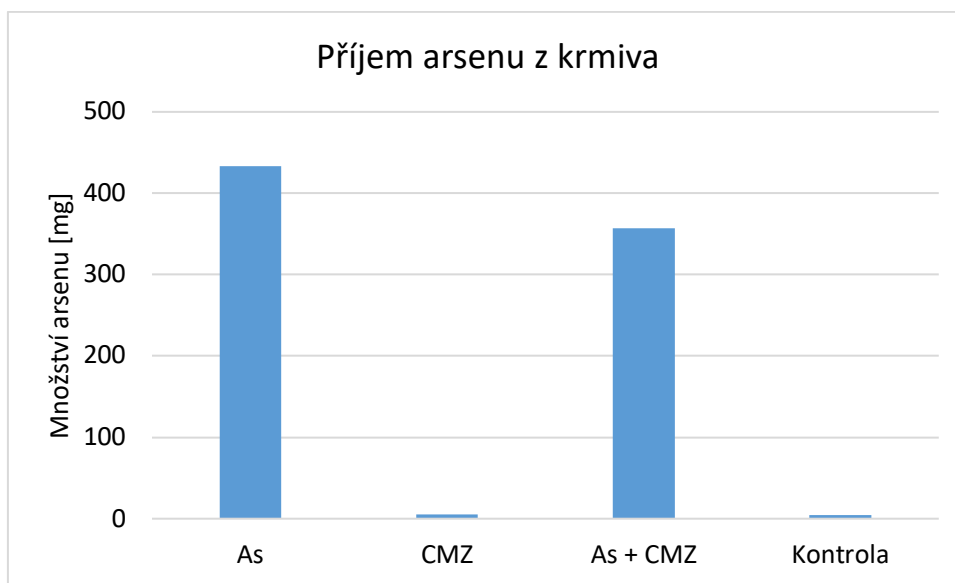
Průměrná denní spotřeba tekutin na jedince za celý experiment byla nejvyšší u skupiny Kontrola – B2 a to 13,42 ml. Nejnižší spotřebu tekutin na jedince vykazovala skupina As + CMZ – B1 a to 6,99 ml. Spotřeba tekutin každý týden kolísala a některé týdny byla nižší než týden předchozí. Celkově však měla u všech skupin rostoucí tendenci a koncem experimentu byla vždy vyšší než na začátku (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Průměrná spotřeba tekutin jedincem za den v jednotlivých skupinách [ml]

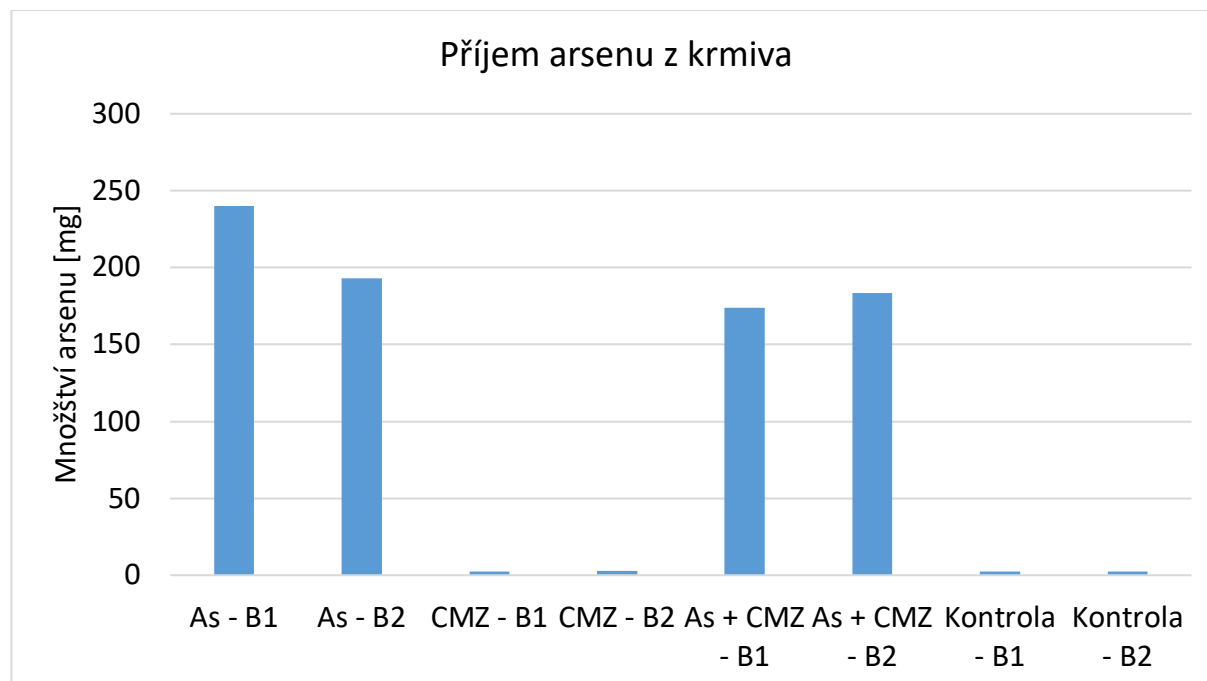
Skupina	Průměrná spotřeba tekutin jedincem za den [ml]						
	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden	Celkově
As – B1	8,47	9,69	10,61	11,43	12,96	14,08	11,21
As – B2	8,66	9,82	8,98	10,10	10,20	9,08	9,47
CMZ – B1	9,46	9,82	9,46	11,79	11,25	11,70	10,58
CMZ – B2	10,00	8,75	9,64	11,43	10,63	10,54	10,16
As + CMZ – B1	8,48	7,68	8,30	8,75	9,55	9,02	8,63
As + CMZ – B2	6,50	6,61	6,61	7,14	7,23	7,86	6,99
Kontrola – B1	7,62	9,37	9,44	10,32	12,78	8,89	9,74
Kontrola – B2	11,84	10,83	14,29	14,76	12,86	15,95	13,42

5.3 Příjem arsenu a karbamazepinu

Příjem arsenu krmivem zobrazuje Obrázek 14 a Obrázek 15. U skupin, kterým bylo podáváno experimentální krmivo, jsou hodnoty přijatého arsenu výrazně vyšší než u skupin s krmivem kontrolním. Nejvyšší množství arsenu, 433 mg, přijaly skupiny As. Jedinci As + CMZ přijali 357 mg. U skupiny CMZ bylo zjištěno množství přijatého arsenu 4,95 mg a u kontrolních skupin 4,71 mg. Konkrétně nejvíce arsenu přijala skupina As – B1 a to 240 mg a za ní skupina As – B2 193 mg.

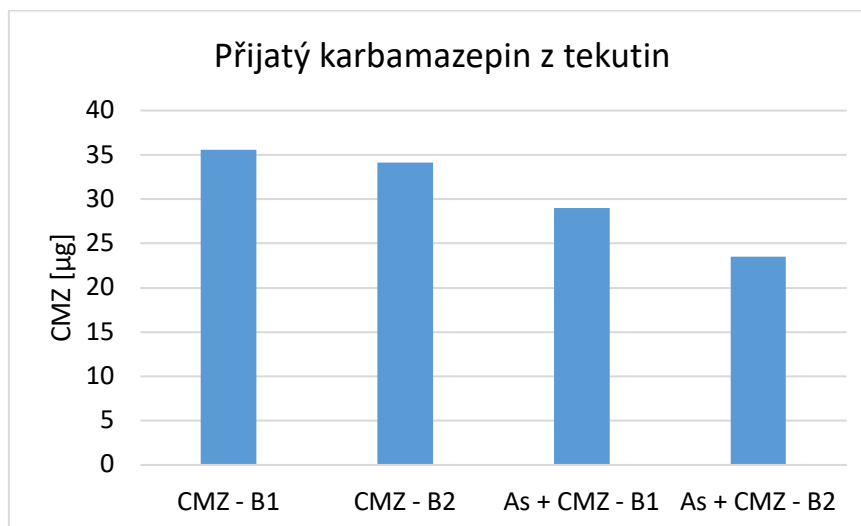


Obrázek 14: Množství přijatého arsenu z krmiva dle jednotlivých diet [mg]



Obrázek 15: Množství přijatého arsenu z krmiva u jednotlivých skupin [mg]

Ze skupin, kterým byl podáván roztok karbamazepinu, ho přijala za celý experiment nejvíce skupina CMZ – B1 a to 35,6 µg. Následovala skupina CMZ – B2 s hodnotou 34,2 µg a skupina AS + CMZ – B1 s 29,0 µg. Nejméně přijali jedinci As + CMZ – B2 a to 23,5 µg (viz Obrázek 16).



Obrázek 16: Množství přijatého karbamazepinu u skupin, kterým byl podáván roztok karbamazepinu [µg]

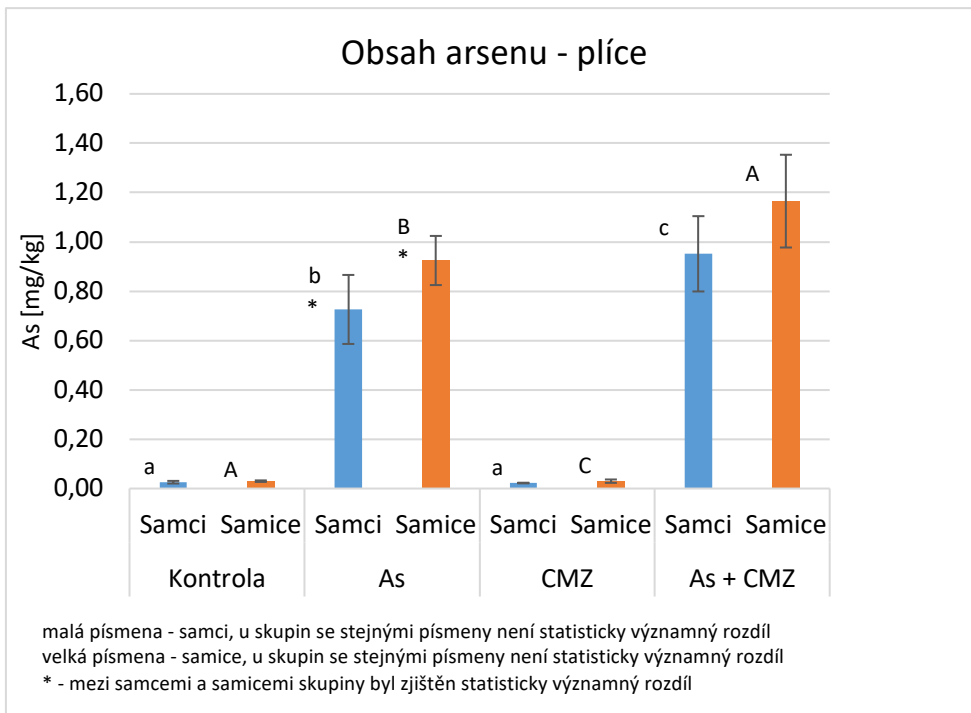
5.4 Obsah arsenu

Celkový arsen byl stanovován ve všech orgánech. Obsahy byly zpracovány do grafů dle spočítaných mediánů.

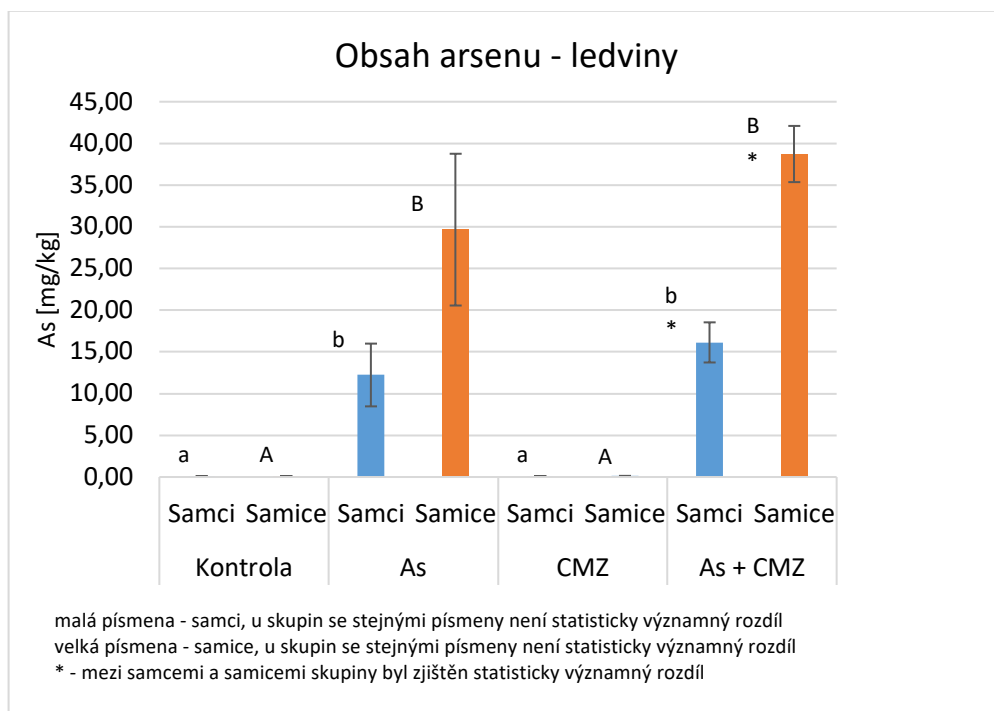
Na první pohled je viditelný velký rozdíl v koncentracích arsenu mezi skupinami, které byly krmeny experimentálním krmivem a krmivem kontrolním (viz Obrázek 17;18;19;20;21). U jedinců ze skupin As a As + CMZ množství arsenu mnohonásobně převyšovaly jeho množství u zbývajících skupin. U všech orgánů byly nejvyšší koncentrace celkového arsenu naměřeny u jedinců ze skupin As + CMZ. Nejvyšší koncentrace arsenu byly zjištěny v ledvinách (viz Obrázek 18), a naopak nejnižší množství bylo naměřeno ve varlatech (viz Obrázek 20). Ve většině případů byla koncentrace arsenu u samic vyšší než u samců.

V plicích bylo nejvíce arsenu stanoveno u skupiny As + CMZ, naopak nejméně u CMZ (viz Obrázek 17). U ledvin byl největší rozdíl obsahu arsenu mezi pohlavími. Ledviny samic obsahovaly výrazně vyšší koncentrace než ledviny samců (viz Obrázek 18). Slezina byla jediným případem, kde se u samců hromadil arsen více než u samic, a to konkrétně u skupin As (viz Obrázek 19). Ve varlatech byly opět mnohonásobně vyšší koncentrace u skupin As a As + CMZ (viz Obrázek 20). Celkový arsen v játrech byl stanovován za celé skupiny nezávisle na pohlaví. I zde jeho koncentrace byla nejvyšší u skupin As + CMZ (viz Obrázek 21).

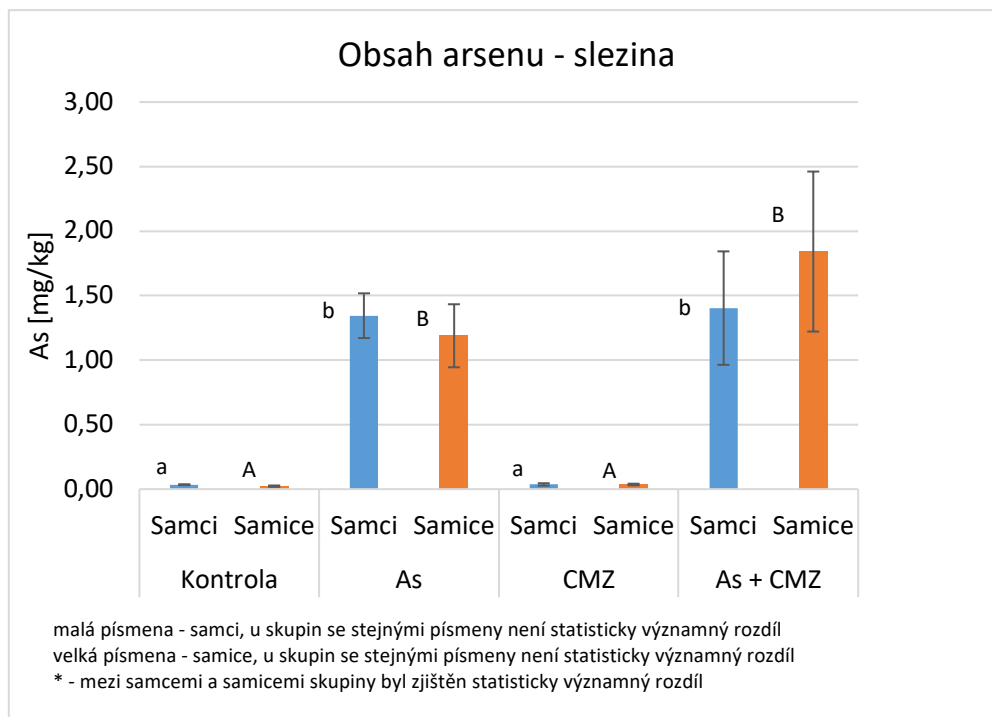
Statistické vyhodnocení bylo zaneseno do grafů pomocí písmen, popřípadě symbolu „*“ (viz Obrázek 17;18;19;20).



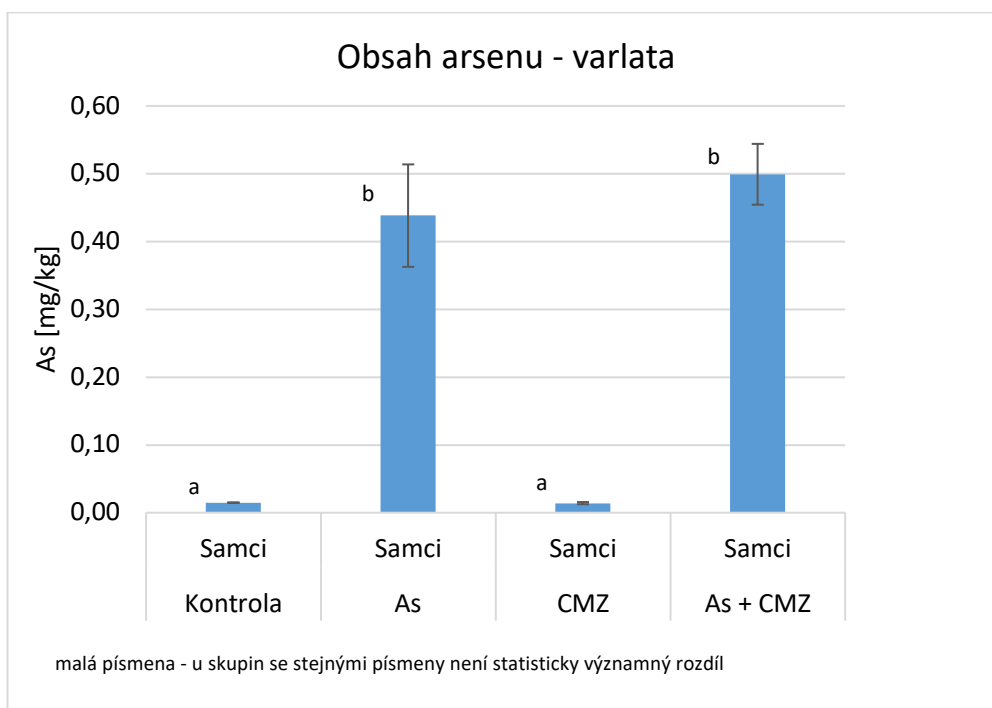
Obrázek 17: Koncentrace arsenu v plicích u jednotlivých skupin a pohlaví [mg/kg]



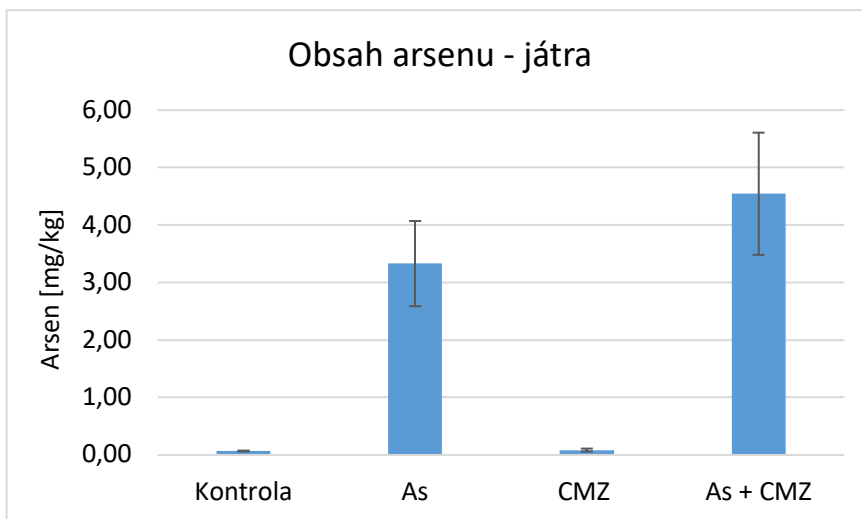
Obrázek 18: Koncentrace arsenu v ledvinách u jednotlivých skupin a pohlaví [mg/kg]



Obrázek 19: Koncentrace arsenu ve slezině u jednotlivých skupin a pohlaví [mg/kg]



Obrázek 20: Koncentrace arsenu ve varlatech u jednotlivých skupin [mg/kg]



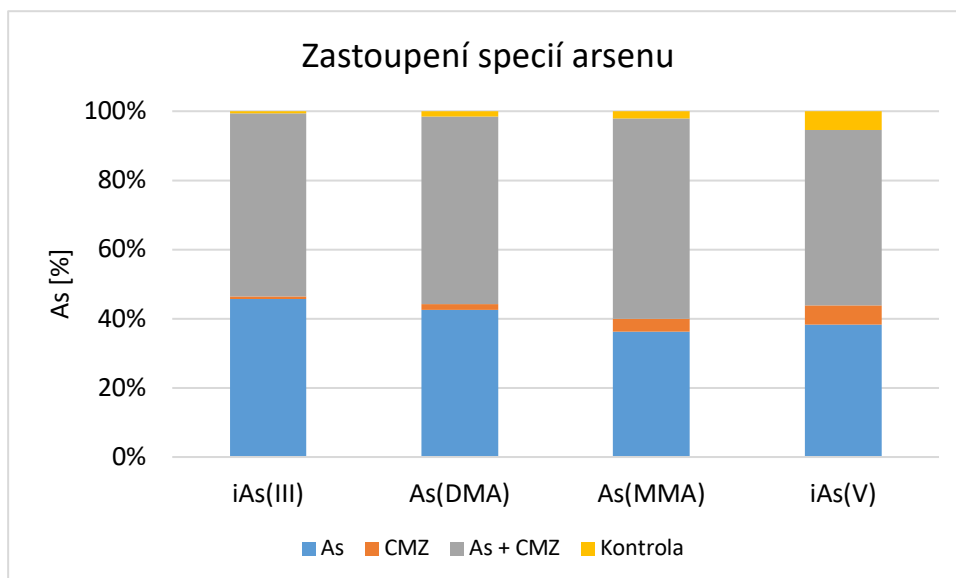
Obrázek 21: Koncentrace arsenu v játrech u jednotlivých skupin [mg/kg]

Specie arsenu byly stanovovány v játrech vždy za celou skupinu. Ze specií arsenu se zjišťovala přítomnost As (III), As (DMA), As (MMA) a As (V). Z každého vzorku byly analyzovány dva nezávislé dílčí vzorky. Zjištěná koncentrace byla následně průměrována (viz Tabulka 4).

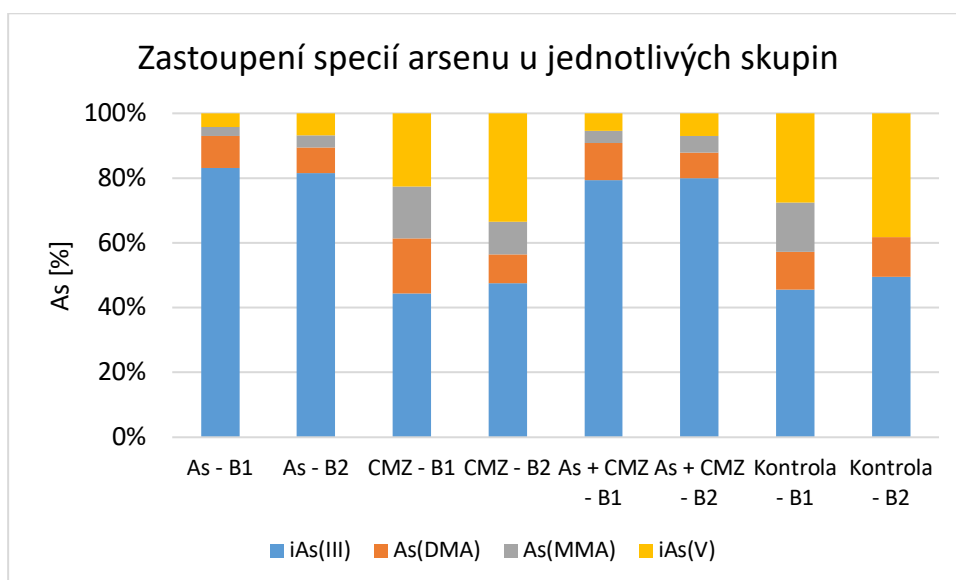
Zastoupení jednotlivých specií je vyobrazeno na Obrázku 22 a Obrázku 23. U všech vzorků a skupin výrazně převládal As (III). Jako druhý se u skupin, kterým bylo podáváno experimentální krmivo objevil As (DMA) (viz Tabulka 4). Avšak u skupin, které byly krmeny kontrolními granulami, byl druhý nejhojněji zastoupený As (V). U všech skupin se nejméně objevil As (MMA). U Kontroly – B2 byl dokonce pod detekčním limitem (viz Tabulka 4). Je zřejmé, že skupiny konzumující experimentální krmivo se zvýšeným množstvím arsenu vykazovaly daleko vyšší hodnoty specií arsenu než skupiny konzumující potravu kontrolní (viz Obrázek 24;25;26;27).

Tabulka 4: Koncentrace jednotlivých specií mezi skupinami [$\mu\text{g/g}$]

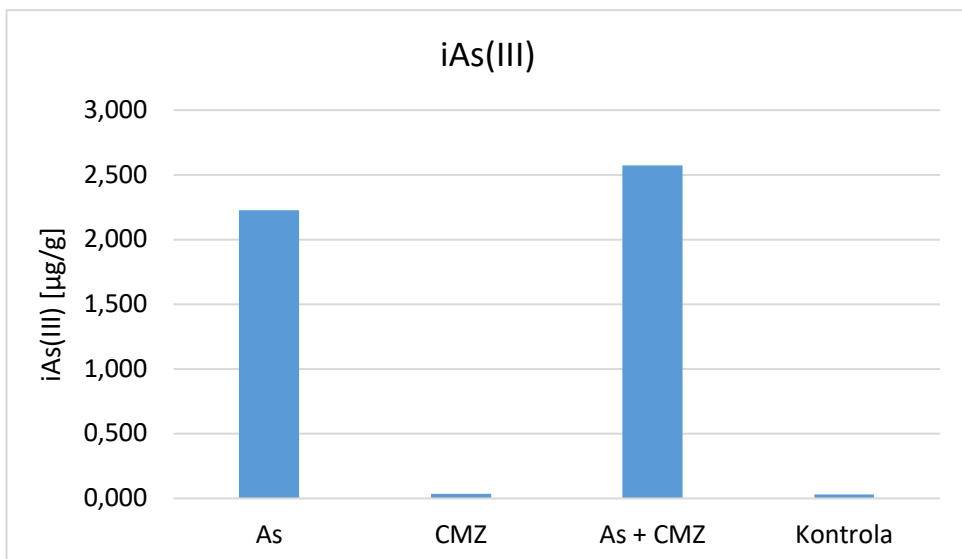
Skupina	iAs(III)	As(DMA)	As(MMA)	iAs(V)
	$\mu\text{g/g}$			
As - B1	1,786	0,213	0,061	0,090
As - B2	2,667	0,253	0,128	0,219
CMZ - B1	0,024	0,009	0,009	0,012
CMZ - B2	0,048	0,009	0,010	0,034
As + CMZ - B1	1,940	0,278	0,093	0,132
As + CMZ - B2	3,209	0,316	0,209	0,277
Kontrola - B1	0,033	0,009	0,011	0,020
Kontrola - B2	0,031	0,008	<0,008	0,024



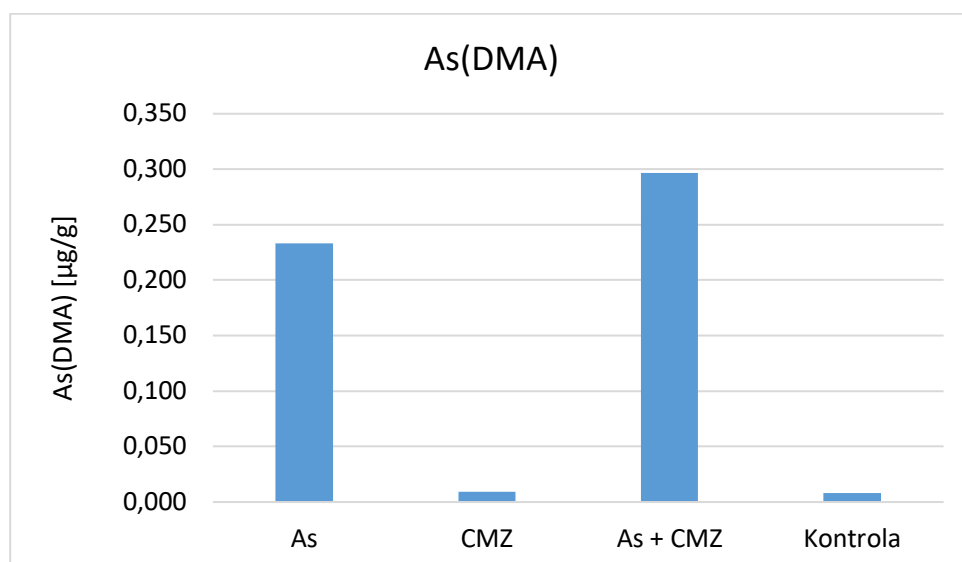
Obrázek 22: Zastoupení specií arsenu [%]



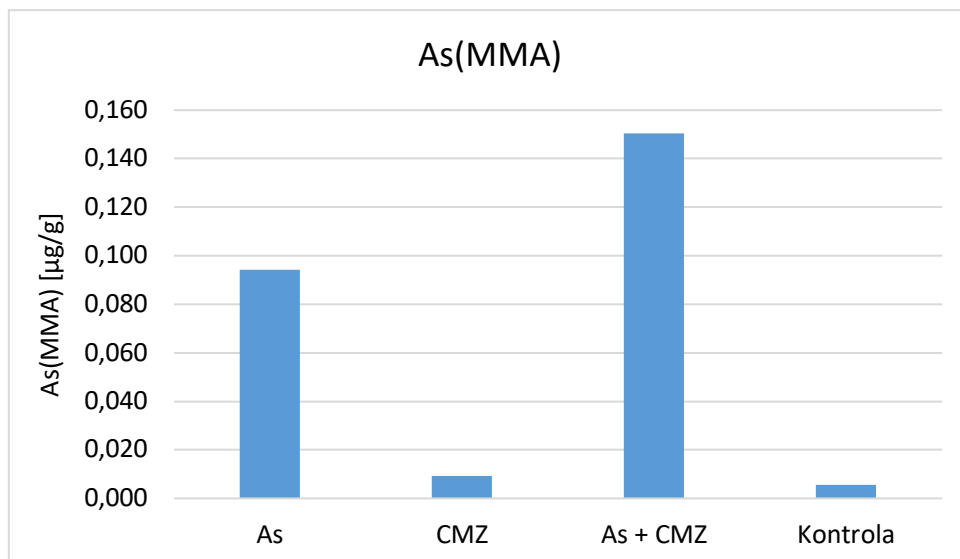
Obrázek 23: Zastoupení specií arsenu mezi jednotlivými skupinami [%]



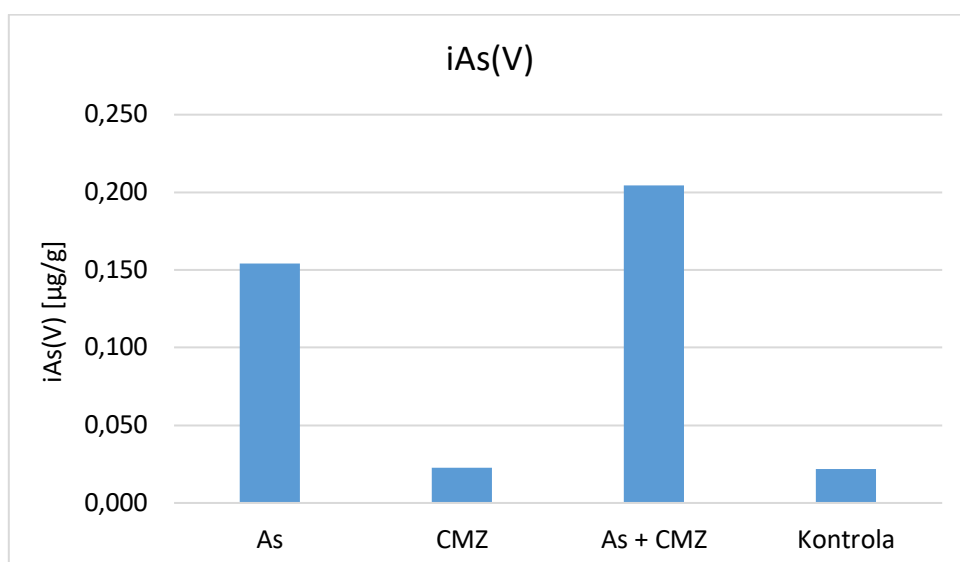
Obrázek 24: Koncentrace As(III) [µg/g]



Obrázek 25: Koncentrace As(DMA) [µg/g]



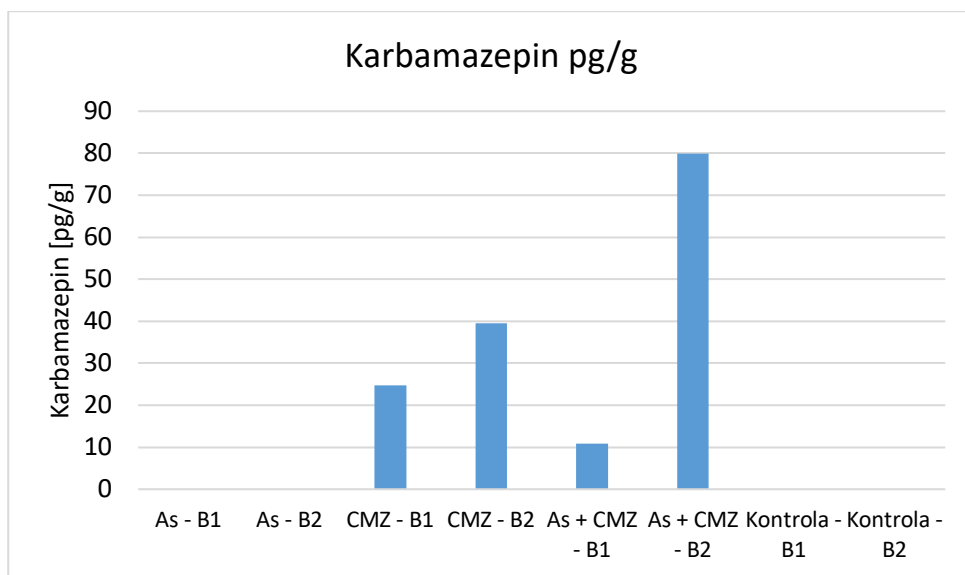
Obrázek 26: Koncentrace As(MMA) [µg/g]



Obrázek 27: Koncentrace As(V) [µg/g]

5.5 Obsah karbamazepinu

Zjištěné koncentrace karbamazepinu ukazuje Obrázek 28. U skupin kterým byla podávána kohoutková voda (As, Kontrola) byla naměřená koncentrace vždy <LOD (10 pg/g). Nejvyšší koncentrace 79,9 pg/g byla zjištěna u As + CMZ – B2. Naopak nejnižší koncentrace 10,8 pg/g byla naměřena u AS + CMZ – B1. Skupiny CMZ vykazovaly koncentraci karbamazepinu 24,8 pg/g u CMZ – B1 a 39,5 pg/g u CMZ – B2.



Obrázek 28: Koncentrace karbamazepinu u jednotlivých skupin [pg/g]

6 Diskuze

6.1 Vývoj hmotnosti zvířat v průběhu experimentu

Během chovu hrabošů v laboratorních podmínkách byla průběžně zaznamenávána jejich hmotnost. Vývoj hmotnosti byl zpracován do grafů dle diety, která byla jedincům přiřazena.

U všech skupin byla zjištěna rostoucí tendence. Váha jak skupin kontrolních, tak i skupin, kterým byl podáván arsen, karbamazepin nebo kombinace obojího, se zvyšovala. To odporuje výsledkům, které publikovali Sun et al. (2015). Tito autoři podávali arsen v pitné vodě myším po dobu tří měsíců. Zjistili, že jeho příjem výrazně snížil přírůstek hmotnosti myši oproti skupinám, které arsen nedostávaly. V našem případě finální hmotnosti všech skupin dosahovaly podobných hodnot. Tento výsledek však může být ovlivněn různými faktory.

Jako experimentální organismus byli v obou případech použiti hlodavci, avšak jiný živočišný druh. Doba expozice v našem případě byla kratší, a to pouze šest týdnů. Způsob podání arsenu se také lišil. V našem případě byl arsen podáván krmivem vyrobeným z kontaminované půdy, Sun et al. (2015) podávali arsen v pitné vodě. V neposlední řadě mohla odlišný výsledek ovlivnit rozdílná dostupnost arsenu z vody a půdy. Száková et al. (2012) a Vlčková et al. (2014) také uvádějí, že na dostupnost arsenu hlodavcům z půdy měly vliv konkrétní fyzikálně – chemické vlastnosti této půdy (např. celkový organický uhlík, pH, sorpční kapacita).

Gerennutti et al. (2008) podávali karbamazepin březím samicím potkanů a zanedbali také pokles jejich váhy a značné deformace u potomstva. Úbytek váhy u našich hrabošů, kterým byl karbamazepin podáván však zaznamenán nebyl. To mohlo být způsobeno rozdílnou dávkou karbamazepinu, která byla hlodavcům podávána. Gerennutti et al. (2008) používal terapeutické dávky karbamazepinu (20 mg/kg a 40 mg/kg po přepočtení na živou hmotnost). V našem případě byly aplikovány velmi nízké koncentrace (roztok o koncentraci 10 µg/l), které se běžně vyskytují v životním prostředí a volně žijící zvířata se s nimi mohou v reálném prostředí setkat.

6.2 Arsen

Arsen je celosvětově rozšířený prvek přirozeně se vyskytující v mnoha minerálních formách v horninách, půdách, vodách a také v rostlinách a živočíchách. Živé organismy jsou tak vystaveny jeho působení z životního prostředí a přijímají ho do svých těl vodou či, jako v tomto experimentu, potravou.

Arsen byl podáván skupinám As a As + CMZ. Vyšší příjem arsenu vykazovaly jedinci ze skupin As. To může být vysvětleno vyšší průměrnou spotřebou krmiva jedincem za den. U skupin As byla denní průměrná spotřeba krmiva jedincem za celý experiment 7,03 g a 5,42 g. U skupin As + CMZ byly tyto hodnoty nižší a to 4,45 g a 4,70 g krmiva.

Celkový obsah arsenu byl stanoven v plicích, ledvinách, slezině, játrech a ve varlotech. Dle mnoha studií (Erry et al. 2000; Erry et al. 2005; Garland 2021) se arsen hromadí právě v těchto orgánech, čemuž odpovídaly i výsledky tohoto experimentu. Množství arsenu bylo u skupin, kterým byl arsen podáván v těchto orgánech mnohonásobně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou a arsen se zde akumuloval.

Hodnocen byl i rozdíl mezi obsahem arsenu u samců a samic vždy v rámci jedné skupiny. Obecně bylo zjištěno, že u samic byl obsah arsenu vyšší. Avšak statisticky významný rozdíl byl zjištěn pouze u plic skupiny As a ledvin skupin As + CMZ, kde musíme brát ale v potaz i přítomnost karbamazepinu. Čadková et al. (2023) také pozorovali obecně vyšší obsahy arsenu v samičích ledvinách a játrech než u samců. Ve většině případech ovšem také nebyly statisticky významné. Maihaba et al. (2022) ve své studii na potkanech také nastínili, že pohlaví může ovlivnit biotransformaci arsenu. Estrogen u samic může mít vliv na rychlost a účinnost biotransformace arsenu v ovlivněných orgánech, avšak k této problematice musí být provedeno více studií.

Nejvyšší koncentrace arsenu byly zjištěny v ledvinách a následně v játrech. To můžeme vysvětlit tím, že ledviny a játra se přímo účastní metabolizace a následné exkrece arsenu z organismu (Erry et al. 2005).

6.2.1 Sloučeniny arsenu

Sloučeniny arsenu byly stanovovány v játrech. Játra jsou dle práce, kterou publikovali Saunders et al. (2010) hlavním orgánem pro metabolizaci arsenu. Ze sloučenin As byl stanovován As (III), As (V), MMA a DMA, přičemž všechny zmíněné sloučeniny byly v játrech identifikovány a kvantifikovány. To odpovídá výsledkům jiných autorů, kdy například Saunders et al. (2010) a Yan et al. (2020), identifikovali v játrech potkanů stejné čtyři sloučeniny. Detekce sloučenin As také potvrdila popsání metabolismus arsenu a tvrzení, že tento prvek v těle podléhá transformaci z anorganických forem na formy organické (Bhattacharjee 2013; Chen et al. 2020).

Nejvíce zastoupená sloučenina byl As (III). Následovala DMA, As (V) a nejméně zastoupená byla forma MMA. Dominantní zastoupení As (III) pozorovali i Saunders et al. (2010). Avšak dle jiných studií (Lin et al. 2005; Chen et al. 2013; Yan et al. 2020) byla v játrech potkanů z těchto čtyř látek nejvíce zastoupena DMA. V našem případě se tedy anorganický As (III) ve větší míře akumuloval v játrech než-li by byl dále metabolizován na MMA a DMA. Na tento rozdíl mohlo mít vliv více faktorů. V jiných studiích byl arsen podáván v odlišné formě (např. As_4S_4) a trvání experimentu a dávka arsenu se také lišily. Žádná ze zmíněných studií také nepoužila jako pokusný organismus hraboše polního.

Pokud jsme porovnávali zmiňované sloučeniny u skupin As a u skupin As + CMZ, tak u skupin As + CMZ byla koncentrace specií arsenu vždy vyšší. Jedincům As + CMZ byl podáván spolu s arsenem i karbamazepin. Přítomnost karbamazepinu v dietě měla zřejmě vliv na akumulaci specií v jednotlivých orgánech. Vztah karbamazepinu a arsenu však nebyl v žádných relevantních studiích dosud popsán. Zde bylo tedy pouze nastíněno, že karbamazepin by mohl zvyšovat akumulaci specií v organismu, avšak pro potvrzení tohoto faktu je zapotřebí provést další zkoumání.

6.3 Karbamazepin

Karbamazepin byl detekován v játrech u skupin CMZ a As + CMZ, kterým byl také v pitné vodě podáván. U zbývajících skupin vůbec detekován nebyl. Játra byla zvolena, protože karbamazepin je v tomto orgánu metabolizován (Miao et al. 2005; Bahlmann et al. 2014).

Skupiny CMZ – B1 a CMZ – B2 přijaly téměř stejné množství karbamazepinu z tekutin (CMZ – B1 35,6 µg a CMZ – B2 34,2 µg). I přesto byl v jejich játrech zjištěn rozdíl v koncentraci karbamazepinu. Paradoxně skupina CMZ – B2 s nižším příjmem stanovované látky vykazovala její vyšší koncentraci (39,5 pg/g) než skupina CMZ – B1 (24,8 pg/g). To samé bylo pozorováno i u skupin As + CMZ. Jedinci AS + CMZ – B1 přijali více karbamazepinu, ale finální koncentrace v játrech byly nižší (10,8 pg/g) než u As + CMZ - B2 (79,9 pg/g).

Pokud jsme se zaměřili na vzájemné působení arsenu a karbamazepinu, tak u skupin, kterým byly podávány oba kontaminanty, byla naměřena jak nejnižší koncentrace karbamazepinu (AS + CMZ – B1(10,8 pg/g)), tak i paradoxně koncentrace nejvyšší (As + CMZ – B2 (79,9 pg/g)). Toto mohlo být způsobeno nedokonalou homogenizací vzorku nebo také faktem, že jsme se pohybovali v opravdu nízkých koncentracích měřené látky. Nastínilo to však, že pokud jsou v organismu přítomné obě látky, mohly by na sebe navzájem působit a ovlivňovat tak svoji akumulaci.

7 Závěr

- Po dobu šesti týdnů byli v pokusných stájích chováni jedinci hraboše polního. Dle přidělené diety jim byl podáván arsen, arsen a karbamazepin, karbamazepin nebo se jednalo o kontrolní skupinu, které nebyla podávána ani jedna z látek. Po ukončení experimentu byli z kadáverů vypreparovány plíce, slezina, ledviny, játra a varlata. Tyto orgány byly následně podrobeny laboratorním analýzám.
- Všechny orgány byly homogenizovány a následně byl ve všech stanovován obsah arsenu hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. V játrech byla měřena i koncentrace specií arsenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Množství karbamazepinu bylo stanovováno také v játrech, a to metodou QuEChERS.
- Arsen byl detekován ve všech ze zmíněných orgánů u všech skupin. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny v ledvinách a nejnižší ve varlatech. Obecně byly koncentrace arsenu vyšší u samic. Specie arsenu byly stanovovány čtyři: As (III), As (V), MMA, DMA a všechny byly v játrech zachyceny. Nejvíce zastoupen byl As (III).
- Přítomnost karbamazepinu byla zjištěna jen u skupin, kterým byl podáván jeho roztok v pitné vodě. Mezi jednotlivými skupinami byly na první pohled znatelné rozdíly. Naměřené koncentrace byly velmi nízké, v řádech pg/g.
- Statistické vyhodnocení bylo provedeno u celkového arsenu. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami, kterým byl arsen podáván a kterým podáván nebyl. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami As a As + CMZ byl zjištěn pouze u plic. Při porovnání koncentrace arsenu mezi samci a samicemi v rámci jednotlivých skupin byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze ve dvou případech.
- Vědecká hypotéza byla z části potvrzena. U skupin, kterým byl podáván arsen spolu s karbamazepinem byly naměřeny vyšší koncentrace v arsenu oproti skupinám, kterým byl podáván pouze arsen. Statisticky významný rozdíl byl však prokázán pouze u plic. U karbamazepinu žádná jasná souvislost s arsenem prokázána nebyla, protože nebyl získán dostatek dat na její statistické vyhodnocení.
- Poslední dobou se do prostředí dostává stále více reziduí léčiv, jako je právě karbamazepin. Současně je prostředí často kontaminováno rizikovými prvky, a to například arsenem. Primárně necílené organismy jsou tak vystaveny působení obou látek najednou. V této práci byl pozorován vzájemný vliv karbamazepinu a arsenu. Výsledky nastínily možné interakce mezi těmito dvěma látkami. Jednalo se však o první experiment, který se na tento vztah zaměřoval. Je třeba provést další zkoumání, aby bylo dosaženo relevantních výsledků a objasnily se možné interakce mezi léčivými a rizikovými prvky.

8 Literatura

Allen SN, Ojong M. 2012. Treatment of Depression in Patients With Epilepsy. *U.S. Pharmacist* **37**(11):29-32.

Almeida A, Soares AMVM, Esteves VI, Freitas R. 2021. Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **86**.

AnAge. 2017. AnAge entry for *Microtus arvalis*. HAGR – Human Ageing Genomic Resources. Available from https://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Microtus_arvalis (accessed December 2022).

Argaluz J, Domingo-Echaburu S, Orive G, Medrano J, Hernandez R, Lertxundi U. 2021. Environmental pollution with psychiatric drugs. *World Journal of Psychiatry* **11**(10):197-804.

Aulicky R, Tkadlec E, Suchomel J, Frankova M, Heroldova M, Stejskal V. 2022. Management of the Common Vole in the Czech Lands: Historical and Current Perspectives. *Agronomy* **12**(7):1629.

Álamo AC, Pariente MI, Martínez F, Molina R. 2020. *Trametes versicolor* immobilized on rotating biological contractors as alternative biological treatment for the removal of emerging concern micropollutants. *Water Research* **170**:115313.

Bahlmann A, Brack W, Schneider RJ, Krauss M. 2014. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Research* **57**:104-114.

Baláž I. 2010. Somatic characteristics and reproduction of common vole, *Microtus arvalis* (Mammalia: Rodentia) populations in Slovakia. *Biologia* **65**(6):1064–1071.

Bhattacharjee P, Chatterjee D, Singh KK, Giri AK. 2013. Systems biology approaches to evaluate arsenic toxicity and carcinogenicity: An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **216**(5):574-586.

Bourgin M, Beck B, Boehler M, Borowska E, Fleiner J, Salhi E, Teichler R, von Gunten U, Siegrist H, McArdell ChS. 2018. Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant upgraded with ozonation and biological post-treatments: Abatement of micropollutants, formation of transformation products and oxidation by-products. *Water Research* **129**:486-498.

Button M, Moriarty MM, Watts MJ, Zhang J, Koch I, Reimer KJ. 2011. Arsenic speciation in field-collected and laboratory-exposed earthworms *Lumbricus terrestris*. *Chemosphere* **85**:1277-1283.

Campanella BF, Bock C, Chröder P. 2002. Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs. Potential and limitations. *Environmental Science and Pollution Research* **9**(1):73-85.

Carter LJ, Garman CD, Ryan J, Dowle A, Bergström E, Thhomas-Oates J, Boxall ABA. 2014. Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil – Earthworm Systems. *Environmental Science & Technology* **48**(10):5955-5963.

Čadková Z, Vořechovská L, Javorská D, Száková J, Tlustoš P. 2023. The oral bioavailability of soil-borne risk elements for small terrestrial mammals: *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) and *Apodemus sylvaticus* L. and its implication in environmental studies. *Environmental Science and Pollution Research* DOI <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26437-z> .

Dawadi S, et al. 2021. Technological Advancements for the Detection of Antibiotics in Food Products. *Processes* **9** (e1500) DOI: 10.3390/pr9091500.

Eol. 2018. Common Vole. Eol. Available from <https://eol.org/pages/1179634> (accessed January 2023).

Erry BV, Macnair MR, Meharg AA, Shore RF. 2000. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environmental Pollution* **110**:179-187.

Erry BV, Macnair MR, Meharg AA, Shore RF. 2005. The Distribution of Arsenic in the Body Tissues of Wood Mice and Bank Voles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**:569-576.

FAO. 1992. Wastewater treatment. FAO. Available from <https://www.fao.org/3/t0551e/t0551e05.htm#3.%20wastewater%20treatment> (accessed January 2023).

Fenz R, Blaschke AP, Clara M, Kroiss H, Mascher D, Zessner M. 2005. Monitoring of carbamazepine concentrations in wastewater and groundwater to quantify sewer leakage. *Water Science and Technology* **52**:205-213.

Ford AT, Fong PP. 2016. The Effects of Antidepressants Appear to be Rapid and at Anevironmentally Relevant Concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**:794-798.

Fujáková M, Kopeček M. 2012. Antidepressiva – od teorie ke klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie* **26**(1):29-37.

Garland T. 2021. Inorganic Arsenical Toxicosis in Animals. *MSD Manual – Veterinary Manual*. Available from <https://www.msdsmanual.com/toxicology/copper-poisoning/copper-poisoning-in-animals> (accessed January 2023).

Gerenutti M, Oliviera CC, Miranda ACR, Rosa RM, Sá del Fiol F. 2008. Reproductive performance and embryotoxicity of rats exposed to carbamazepine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **44**(3):509-514.

Gould SL, Winter MJ, Norton WHJ, Tyler CHR. 2021. The potential for adverse effects in fish exposed to antidepressants in the aquatic environment. *Environmental Science & Technology* **55**(24):16299-16312.

Hai FI, Yang S, Asif MB, Sencadas V, Shawkat S, Sanderson – Smith M, Gorman J, Xu ZQ, Yamamoto K. 2018. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. *Water* **10**:1-32.

Chen B, Cao F, Yuan C, Lu X, Shen S, Zhou J, Le XC. 2013. Arsenic speciation in saliva of acute promyelocytic leukemia patients undergoing arsenic trioxide treatment. *Analytical and bioanalytical chemistry* **405**(6):1903-1911.

Chen J, Garbinski LD, Rosen B, Zhang J, Xiang P, Ma LQ. 2020. Organoarsenical compounds: Occurrence, toxicology and biotransformation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **50**(3):217-243.

Choi H, Park SK, Kim DS, Kim M. 2010. Risk Assessment of Arsenic in Agricultural Products. *Korean Journal of Environmental Agriculture* **29**(3):266-272.

INCHEM. 2001. Arsenic and arsenic compounds. World Health Organization. Available from <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#1.6> (accessed December 2022).

IRZ. 2021. ARSEN A JEHO SLOUČENINY (JAKO AS). Ministerstvo životního prostředí. Available from https://www.irz.cz/latky-v-irz/arsen-a-jeho-slouceniny-jako-as#field_content_zakladni_informace (accessed January 2023).

Jacob J, Manson P, Barfknecht R, Fredericks T. 2014. Common vole (*Microtus arvalis*) ecology and management: implications for risk assessment of plant protection products. *Pest Management Science* **70**:869-878.

Jacobson CF, Stump DG, Nemeč MD, Holson JF, DeSesso JM. 1999. Appropriate Exposure Routes and Doses in Studies Designed to Assess Developmental Toxicity: A Case Study of Inorganic Arsenic. *International Journal of Toxicology* **18**:361-368.

Khasawneh OFS, Palaniandy P. 2021. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants. *Process Safety and Environmental Protection* **150**:532-556.

Khazri HH, Hassine SB, Ghorbel – Abid I, Kalfat R, Trabelsi – Ayadi M. 2019. Presence of carbamazepine, naproxen, and ibuprofen in wastewater from northern Tunisia. *Environmental Forensics*. DOI: 10.1080/15275922.2019.1597779.

Kim L, Lee D, Cho HK, Choi SD. 2019. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trend in Environmental Analytical Chemistry* (e00063) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>

Klement A, Kodešová R, Golovko O, Fér M, Nikodem A, Kočárek M, Grabic R. 2020. Uptake, translocation and transformation of three pharmaceuticals in green pea plants. *Journal of Hydrology and Hydromechanics* **68**:1-11.

Kodešová R, Klement A, Golovko O, Fér M, Nikodem A, Kočárek M, Grabic R. 2019a. Root uptake of atenolol, sulfamethoxazole and carbamazepine, and their transformation in three soils and four plants. *Environmental Science and Pollution Research* **26**:9876-9891.

Kodešová R, Klement A, Golovko O, Fér M, Nikodem A, Kočárek M, Grabic R. 2019b. Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *Journal of Environmental Management* **250**:109407.

Konsil J, Dechasathian S, Mason DH, Stevens R. 2002. Reanalysis of Carbamazepine and Carbamazepin-Epoxyde Pharmacokinetics after Multiple Dosing of Extended Release Formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **5**:169-175.

Kunkel U, Radke M. 2012. Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Research* **46**:5551-5565.

Lin CJ, Wu MH, Hsueh YM, Sun SS, Cheng AL. 2005. Tissue distribution of arsenic species in rabbits after single and multiple parenteral administration of arsenic trioxide: tissue accumulation and the reversibility after washout are tissue-selective. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **55**(2):170-178.

Lin Y, Sun Y, Wang X, Chen S, Wu Y, Fu FF. 2020. A universal method for the speciation analysis of arsenic in various seafood based on microwave-assisted extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal* **159**:105592.

Maihaba M, Mei Y, Rongxiang X, Yuanyan L, Jun W. 2022. Gender difference in arsenic biotransformation is an important metabolic basis for arsenic toxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology* **23**:15.

Mandal BK, Suzuki KT. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* **58**:201-235.

Martín-Pozo L, Gómez-Regalado MC, García-Córcoles MT, Zafra-Gómez A. 2022. Removal of quinolone antibiotics from wastewaters and sewage sludge. Pages 381–406 in Sarma H, Dominguez DC, Lee WY editors. *Emerging Contaminants in the Environment*. Elsevier, Amsterdam.

Meharg AA, Hartley-Whitaker J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* **154**:29-43.

Melchor-Martínez EM, Jiménez-Rodríguez MG, Martínez-Ruiz M, Pena-Benavides SA, Iqbal HMN, Parra-Saldívar R, Sosa-Hernández JES. 2021. Antidepressants surveillance in wastewater: Overview extraction and detection. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* (e100074) DOI: 10.1016/j.csee.2020.100074.

Miao XS, Yang JJ, Metcalfe ChD. 2005. Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science Technology* **39**:7469-7475.

Moreno-Jiménez E, Esteban E, Penalosa JM. 2012. The fate of Arsenic in Soil-Plant Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **215**:1-27.

Musil S. 2020. Speciační Analýza Arsenu Založená na Generování Hydridů. *Chemické Listy* **114**:374-381.

National Cancer Institute. 2022. Arsenic (Code C28131). United States government. Available from https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C28131 (accessed December 2022).

National Library for Medicine. 2017. Arsenic. National Center for Biotechnology Information. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548692/> (accessed January 2023).

Nordstrom DK. 2002. Worldwide Occurrences of Arsenic in ground Water. *Science* **296**:2143-2145.

Nriagu JO, Bhattacharya P, Mukherjee AB, Bundschuh J, Zevenhoven R, Loeppert RH. 2007. Arsenic in soil and groundwater: an overview. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* **9**:3-60.

Oremland RS, Stolz JF. 2003. The Ecology of Arsenic. *Science* **300**:939-944.
Painter MM, Buerkley MA, Julius ML, Vajda AM, Norris DO, Barber LB, Furlong ET, Schultz MM, Schoenfuss HL. 2010. Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12):2677-2684.

Paltiel O, Fedorova G, Tadmor G, Kleinstern G, Maor Y, Chefetz B. 2016. Human Exposure to Wastewater – Derived Pharmaceuticals in Fresh Produce: A Randomized Controlled Trial Focusing on Carbamazepine. *Environmental Science & Technology* **50**:4476-4482.

Podgorski J, Berg M. 2020. Global threat of arsenic in groundwater. *Science* **368**:845-850.

Pokrhel GR, Wang KT, Zhuang HM, Wu YCh, Chen W, Lan Y, Zhu X, Li Z, Fu FF, Yang GD. 2020. Effect of selenium in soil on the toxicity and uptake of arsenic in rice plant. *Chemosphere* **239**:124712.

Post RM, Uhde TW, Roy – Byrne PP, Joffe RT. 1986. Antidepressant Effects of Carbamazepine. *American Journal of Psychiatry* **143**(1):29-34.

Qiang L, Cheng J, Yi J, Rotchell JM, Zhu X, Zhou J. 2016. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology* **25**(7):1426-1437.

Ratnaike RN. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medicine Journal* **79**(933):391-396.

Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. 2009. *Arsenic Pollution*. Blackwell Publishing, Chichester.

Rezaei M, Mashinchian Moradi A, Mortazavi P, Jamili S. 2020. Effects of chronic exposure to carbamazepine on hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Fisheries Science* **19**(1):443-456.

Richmond EK, Rosi EJ, Walters DM, Fick H, Hamilton SK, Brodin T, Sundelin A, Grace MR. 2018. A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. *Nature Communications* **9**:4491.

Sah S, Smits J. 2012. Dietary selenium fortification: a potential solution to chronic arsenic toxicity. *Toxicological & Environmental Chemistry* **94**(7):1453-1465.

Santos NS, Oliveira R, Lisboa CA, Pinto JM, Sousa – Moura D, Camargo NS, Perillo V, Oliveira M, Grisolia CK, Domingues I. 2018. Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **164**:297-304.

Saunders JR, Knopper LD, Koch I, Reimer KJ. 2010. Arsenic transformations and biomarkers in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living on an abandoned gold mine site in Montague, Nova Scotia, Canada. *Science of the Total Environment* **408**:829-835.

Sehonová P, Svobodová Z, Doležalová P, Vošmerová P, Faggio C. 2018. Effects of waterborne antidepressant on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment* **631–632**:789-794.

Schulz MM, Painter MM, Bartell SE, Logue A, Furlong ET, Werner SL, Schoenfuss HL. 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology* **104**:38-47.

Silva B, Costa F, Neves IC, Tavares T. 2015. Pharmaceuticals in the Environment: Case study of Psychiatric Drugs. Pages 19-46 in Silva B, Costa F, Neves IC, Tavares T, editors. *Psychiatric Pharmaceuticals as Emerging Contaminants in Wastewater*. Springer Cham, Cham.

SÚKL. 2022. Dodávky léčiv – se zaměřením na léčivé látky. SÚKL, Praha. Available from <https://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-latky> (accessed January 2023).

Sun BF et al. 2015. Exercise Prevents Memory Impairment Induced by Arsenic Exposure in Mice: Implication of Hippocampal BDNF and CREB. *PLOS ONE* **10** (e0137810) DOI: 10.1371/journal.pone.0137810.

Száková J, Novosadová Z, Zídek V, Fučíková A, Zídková J, Miholová D, Tlustoš P. 2012. Effect of the diet amended with risk elements contaminated soil on risk elements content in tissues and hematological parameters of rats. *Czech Journal of Animal Science* **57**(9):430-441.

Tolou – Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, Najafi MR. 2013. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *Journal of Research in Medical Sciences* **18**:81-85.

Valdés ME, Huerta B, Wunderlin DA, Bistoni MA, Barceló D, Rodríguez – Mozaz S. 2016. Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Science of the Total Environment* **557-558**:58-67.

Vinař O. 2012. Psychofarmakologie je už šedesátiletá. *Klinická farmakologie a farmacie* **26**(1):14-17.

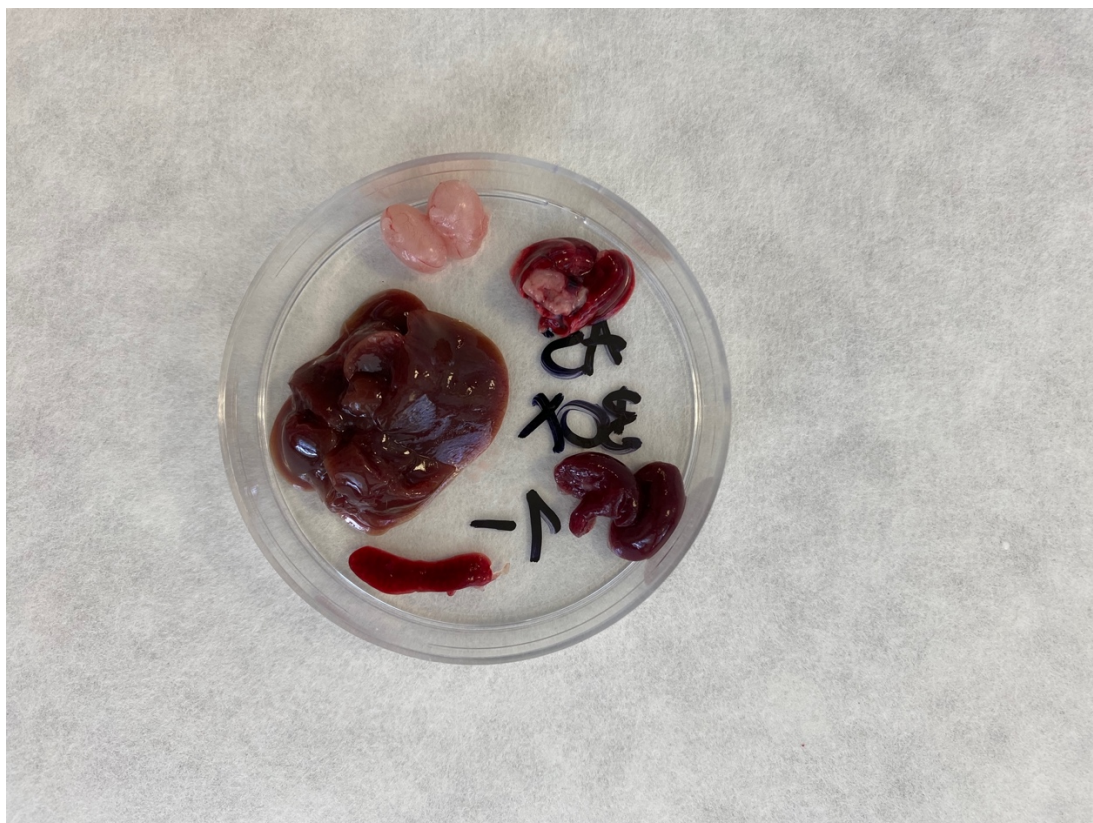
Vlčková V, Malinová M, Koubková B, Száková J, Zídek V, Fučíková A, Zídková J, Kolihová D, Tlustoš P. 2014. Long-term effect of diet amended by risk elements contaminated soils on risk element penetration and physiological parameters of rats. *Czech Journal of Animal Science* **59**(9):416-427.

Wang J, Wang S. 2016. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management* **182**:620-240.

WHO. 2022. Arsenic. WHO. Available from <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/arsenic> (accessed December 2022).

Xue XM, Xiong Ch, Yoshniga M, Rosen B, Zhu YG. 2022. The enigma of environmental organoarsenicals: Insights and implications. *Critical Reviews in Environmental and Science* **52**(21):3835-3862.

Yan Y, Shuang-Rong G, Jing X, Chun-Ying L, Yong Z, Yu-Shi Z, Ai-Hua L, Shen J. 2020. Study of the accumulation and distribution of arsenic species and association with arsenic toxicity in rats after 30 days of oral realgar administration. *Journal of Ethnopharmacology* **247**:111576.



Obrázek 3: Varlata, plíce, ledviny, slezina, játra



Obrázek 4: Lyofilizované orgány



Obrázek 5: Homogenizovaná játra