

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Fotoiniciovaná degradace vybraných léčiv  
(dexametazonu, prednisolonu, fluoxetinu)  
a testování toxicity léčiv a produktů jejich  
fotodegradace na vodní organismy  
(*Daphnia magna*)**

Diplomová práce

**Bc. Eliška Dokoupilová**

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2020

**Dokoupilová E., 2020:** Fotoinicovaná degradace vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu, fluoxetinu) a testování toxicity léčiv a produktů jejich fotodegradace na vodní organismy (*Daphnia magna*) [Photoinitiated degradation of selected drugs (dexamethasone, prednisolone, fluoxetine) and toxicity tests of the drugs and their photodegradation products on aquatic organisms (*Daphnia magna*). Master Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This diploma thesis investigates kinetics of photoinitiated degradation of selected drugs (dexamethasone, prednisolone, fluoxetine) under conditions relevant to surface waters and provides results of toxicity tests of original compounds and their photodegradation products mixtures for a representant of aquatic organisms, cladoceran *Daphnia magna*.

The theoretical part describes the basic characteristics, mechanism of action and therapeutic usage of selected drugs. Toxicological studies related to adverse effects of these substances on aquatic organisms are also briefly outlined.

The experimental part presents first the results of photochemical degradation kinetics of the studied compounds and second the findings of chronic toxicity tests of the selected drugs and their photoproducts mixtures on *Daphnia magna*, namely on the number of juveniles, on the number of clutches and on the body size.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. dubna 2020

.....

Podpis

## **Cíl práce**

Cílem práce bylo v teoretické části popsat základní charakteristiku vybraných léčiv a shrnout toxikologické studie související s nežádoucími účinky těchto léčiv na různé vodní organismy.

Experimentálním cílem bylo proměřit kinetiku fotochemické degradace dvou reprezentantů farmakologické skupiny steroidních hormonů (dexametazonu a prednisolonu) a jednoho zástupce antidepresiv (fluoxetinu) za podmínek relevantních přírodním vodním systémům a otestovat toxicitu směsi produktů fotodegradace ve srovnání s mateřskou sloučeninou na hrotnatce *Daphnia magna*.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a věnovaný čas při zpracování této práce. Především oceňuji její profesionální přístup, ochotu a vstřícnost s čímkoliv a kdykoliv pomoci. Paní docentka je skvělý člověk na správném místě.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michalu Šorfovi, Ph.D. za poskytnutí možnosti provést testy toxicity na pracovišti katedry biologie ekosystémů, ale také za pomoc se statistickým zpracováním i za velmi užitečné rady při vyhodnocování výsledků.

Poděkování patří i Mgr. Kateřině Kocourkové za poskytnutou pomoc po celou dobu experimentů.

Také děkuji Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. a Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. z laboratoře environmentální a analytické chemie za pomoc s obsluhou HPLC analyzátoru a za provedení HPLC analýz.

Na závěr děkuji své rodině a svému příteli za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Dexametazon .....	3
1.2	Prednisolon .....	7
1.3	Fluoxetin.....	10
1.4	Využití hrožnatky <i>Daphnia magna</i> v ekotoxikologii.....	15
2	Materiály a metody.....	20
3	Výsledky.....	23
3.1	Kinetika fotochemických degradací vybraných léčiv .....	23
3.2	Testování toxicity vybraných léčiv a produktů jejich fotodegradace.....	27
4	Diskuze.....	35
5	Závěr.....	39
6	Seznam použité literatury .....	40
7	Přílohy .....	56

# 1 Úvod

Znečištění životního prostředí způsobené humánními a veterinárními farmaceutickými výrobky a výrobky osobní péče se v posledních letech stává globálním problémem. V důsledku neustálého nárůstu lidské populace a zvýšeného používání zejména neuroaktivních a protizánětlivých léčiv, antibiotik či betablokátorů objevují se v literatuře posledních let práce o možných toxických účincích nejen mateřských sloučenin těchto léčiv, ale i produktů jejich transformace pro vodní organismy (Godoy et al., 2015; Parezanović et al., 2019).

Na rozdíl od jiných kontaminujících látek jsou léčiva navržena tak, aby vyvolala specifickou terapeutickou odpověď u lidí (Fent et al., 2006), ale mnoho z jejich molekulárních cílů je přítomno také v jiných organismech (Gunnarsson et al., 2008). Lze tedy očekávat možné biologické účinky na necílové organismy, zejména na organismy vodního ekosystému všech tří trofických hladin, tj. řasy, bezobratlé, ryby (De Farias et al., 2019).

Bylo zjištěno, že z hlediska hodnocení ekologického rizika jsou významné nejen aktivní složky léčiv, ale i produkty jejich transformace a někdy i pomocné látky obsažené ve farmaceutickém výrobku (DellaGreca et al., 2004; Silva et al., 2014).

Pokročilé analytické metody hrají významnou roli v analýze vzorků životního prostředí s cílem potvrdit stupeň znečištění dané části životního prostředí. Tyto rychlé, velmi citlivé a v posledních letech ekonomicky dostupné metody umožňují získat spolehlivé výsledky z většího počtu vzorků a nabízejí rychlý odhad expozice organismů farmaceutickým přípravkům a látkám vzniklým jejich transformací (Gracia-Lor et al., 2010; Negreira et al., 2015).

Evropská agentura pro léčivé přípravky požaduje, aby nová léčiva byla ve fázi vývoje farmaceutických přípravků podrobena posouzení rizik pro životní prostředí. Hodnocení expozice se provádí výpočtem předpokládané koncentrace v životním prostředí (predicted environmental concentration, PEC). Pokud je hodnota PEC léčiv v životním prostředí vyšší než 0,01 µg/l jsou nutná další sledování. V této fázi hodnocení se také vypočítává poměr PEC / PNEC, kde PNEC (predicted no-effect concentration) je předpokládaná koncentrace bez účinku. Pokud je poměr PEC / PNEC < 1, pak se předpokládá, že látka představuje malé environmentální riziko. Pokud je poměr PEC / PNEC > 1, pak se předpokládá možnost vyššího rizika (Parezanović et al., 2019).

Nedávná studie ukázala, že poměr PEC / PNEC byl vyšší než 1 u 12 hojně předepisovaných léčiv, což naznačuje značné riziko pro vodní organismy (Pereira et al., 2017).

Přes rychle rostoucí počet studií o přítomnosti léčiv v životním prostředí je počet prací zabývajících se identifikací, kvantifikací a charakterizací produktů jejich přeměny v přírodním prostředí stále nízký.

Potenciální účinky léčiv na životní prostředí se hodnotí pomocí testů akutní a chronické toxicity jednotlivých látek vůči vybraným typům organismů, neméně důležité jsou však také informace o aerobních a anaerobních degračních pokusech, biologické rozložitelnosti, hydrolýze, případně fotochemické degradaci zkoumaných látek. Dosud však není možné posoudit detailně a komplexně rizika všech léčiv a jejich produktů transformace, včetně smíšených interakcí léčiv a pomocných látek v životním prostředí z důvodu nedostatku ekotoxikologických údajů a velkého počtu možných vzájemných interakcí. Transformační produkty mohou navíc vykazovat odlišný mechanismus účinku než mateřská sloučenina (Godoy et al., 2015).

Hlavní cestou vstupu léčiv do životního prostředí je vylučování z těla jako důsledek použití léčiva pacientem nebo v důsledku nesprávného zacházení s nepoužitými léčivy (Gomes et al., 2017), kdy se léčiva dostávají do odpadních vod (Evgenidou et al., 2015). Touto cestou se do životního prostředí dostávají jednak původní formy léčiv jednak v lidském těle vzniklé metabolity původních látek (Subedi et al., 2015; Wilkinson et al., 2017). Čistírný odpadních vod nejsou konstruovány na zachycování velkého počtu látek nesmírně různorodých vlastností a v nízkých koncentracích, takže nedokáží zachytit farmaceutické látky, i když v posledních letech se začíná využívat filtrů s aktivním uhlím právě kvůli farmakologickým kontaminantům (Macías-García et al., 2019).

Léčiva nezachycená v čistírnách odpadních vod tak mohou kontaminovat povrchové vody a být absorbována do rostlinných či živočišných tkání vodních organismů. Existuje mnoho důkazů o výskytu přibližně 160 léčiv v odpadních vodách, podzemních vodách, půdě (Luo et al., 2014) a dokonce některé aktivní složky farmaceutických produktů byly detekovány v pitné vodě (Jones et al., 2005; Mompelat et al., 2009).

Nedostatek relevantních údajů o toxicitě většiny léčiv pro vodní organismy a rovněž údajů týkajících se koncentrací těchto látek v životním prostředí logicky brání odhadu možných negativních účinků na necílové organismy. Ačkoli byly zjištěné koncentrace léčiv v životním prostředí většinou na úrovni stopových koncentracích (ng/l až nízké hodnoty µg/l), mnoho studií ukazuje, že i takové nízké koncentrace byly dostatečné k vyvolání toxického účinku (Heberer, 2002; Daughton, 2016; Tiwari et al., 2017).

V povrchových vodách může být účinná látka léčiva degradována a transformována pomocí biotických a abiotických procesů. Biotické procesy probíhají za účasti mikroorganismů,

abiotické transformace obvykle probíhají jako hydrolýza či fotodegradace (Tixier et al., 2003). Pro látky rezistentní k mikrobiálnímu rozkladu a nepodléhající hydrolytickým přeměnám je transformace účinkem světla důležitým procesem přeměny v životním prostředí (Fatta-Kassinos et al., 2011). Účinnost procesů fotochemické degradace léčiv závisí na mnoha faktorech, jako je např. pH, zákal, intenzita a vlnová délka slunečního záření, zeměpisná šířka a povětrnostní podmínky. Několik prací dokládá, že produkty fototransformace mohou být toxičtější než výchozí látky (DellaGreca et al., 2004; Trovó et al., 2009; Miao et al., 2015).

Posouzení rizik pro životní prostředí je většinou založeno na stanovení těchto rizik pro jednu aktivní složku, i když je tato složka v důsledku přítomna v životním prostředí jako vícesložková směs s různými dalšími léčivy a pomocnými látkami, které mohou ovlivňovat její ekotoxikologický účinek či projevovat vlastní ekotoxikologické vlastnosti (Altenburger et al., 2013; Backhaus, 2014). Příklady pomocných látek jako potenciálních toxických složek při vysokých dávkách léčiva jsou diethylenglykol, cyklodextriny, dextransy, mannitol, propylenglykol atd. (Valeur et al., 2018; Yang et al., 2018). V některých případech pomocné látky přispívají k transformacím jiných léčiv (Pifferi a Restani, 2003; Silva et al., 2014). Silva et al. (2014) prokázali různou ekotoxicitu pěti léčivých přípravků obsahujících stejnou účinnou látku (fluoxetin hydrochlorid), což potvrzuje, že pomocné látky ovlivňují ekotoxický potenciál.

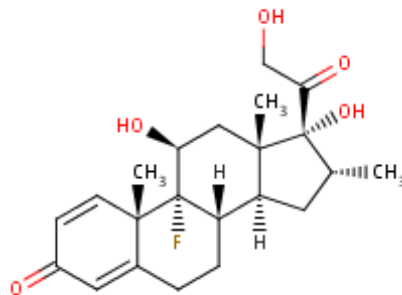
## 1.1 Dexametazon

Dexametazon (Obr. 1) je syntetický hormon z třídy glukokortikosteroidů obsahující v molekule atom fluoru. Používá se široce při léčbě zánětů, alergií a jiných onemocnění souvisejících s nedostatečností kůry nadledvin. Jako derivát kortizolu (hydrokortizonu), steroidního hormonu produkovaného v nadledvinách, je dexametazon známý také jako 1-dehydro-9a-fluor-16a-methylhydrokortison (Lüllmann et al., 2004).

Jeho název podle názvosloví IUPAC<sup>1</sup> je (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one (PubChem).

---

<sup>1</sup> IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry



**Obr. 1:** Strukturální vzorec dexametazonu (ChEBI).

Glukokortikosteroidy jsou kortikosteroidní hormony produkované kůrou nadledvin. Vzhledem k jejich silným protizánětlivým a imunosupresivním vlastnostem se běžně používají k léčbě revmatoidní artritidy a astmatu nebo jako podpůrné chemoterapeutické látky (Lüllmann et al., 2007). Glukokortikosteroidy se vážou na glukokortikoidní receptory a následně inhibují účinky zánětlivých mediátorů cyklooxygenázové a lipoxygenázové dráhy metabolismu kyseliny arachidonové, polynenasycené mastné kyseliny, která je složkou fosfolipidů. Hlavním úkolem je podpora vzniku protizánětlivě působících molekul jako je např. interleukin-10 (Czock et al., 2005). Tento mechanismus účinku může pomoci zvládnout celou řadu onemocnění charakterizovaných nadměrným zánětem. Účinky glukokortikosteroidů také zahrnují stimulaci glukoneogeneze, zvýšený katabolismus proteinů a mobilizaci volných mastných kyselin (Czock et al., 2005). K dalším jejich účinkům patří inhibice apoptózy, demarginace neutrofilů, působení proti otokům, kapilární dilatace a napomáhání ukládání fibrinu společně s kolagenem (Lee, 2015). Vysoké dávky glukokortikoidů se po delší době vážou kromě glukokortikoidních receptorů též na mineralokortikoidní receptory, čímž ovlivňují hladiny sodíku a draslíku v těle (Khan et al., 2005).

Dexametazon se používá při léčbě mnoha stavů, včetně revmatických problémů, řady kožních onemocnění, těžkých alergií, astmatu, chronického obstrukčního plicního onemocnění, otoku mozku a spolu s antibiotiky i při tuberkulóze. Dexametazon je také vhodný jako přímé chemoterapeutické činidlo u určitých hematologických malignit, zejména při léčbě mnohočetného myelomu (Harousseau et al., 2006). Lidé s rakovinou podstupující chemoterapii často dostávají dexametazon, aby působil proti některým vedlejším účinkům jejich protinádorové léčby jako například zvýšení antiemetického účinku antagonistů receptoru 5-HT<sub>3</sub>, jejichž příkladem je lékový přípravek ondansetron (Italian Group for



Antiemetic Research, 2000). Přesný mechanismus této interakce není známý, ale předpokládá se, že se kromě jiného uplatňuje inhibice syntézy prostaglandinů a snížené uvolňování endogenních opioidů (Holte a Kehlet, 2002). Dexametazon je přítomen též v některých očních, nosních a ušních kapkách používaných při infekcích v těchto oblastech (Brady et al., 2016; Kim et al., 2017). Dexametazon se využívá i ve veterinární medicíně k léčbě obtížných ušních infekcí, zejména u psů. Může být také kombinován s trichlormethiazidem pro ošetření koní s otokem distálních částí končetin (Khan et al., 2005). Dexametazon lze užívat perorálně, intramuskulárně nebo intravenózně (Spoorenberg et al., 2014).

Dlouhodobé užívání dexametazonu může mít za následek úbytek kostní hmoty, katarakty, modřiny nebo svalovou slabost. Kontraindikace dexametazonu zahrnují nekontrolovanou systémovou infekci, otok a poškození mozku v důsledku malárie či současnou léčbu živými virovými vakcínami (Ciriaco et al., 2013).

Dexametazon se v plazmě váže na proteiny (přibližně ze 77 %) a hlavní cestou eliminace dexametazonu z těla je vylučování žlučí do trávicího traktu (> 90 %), zbytek je vyloučen močí (Czock et al., 2005). Průměrný poločas eliminace z organismu při podání 6 mg perorální tablety dexametazonu je podle Spoorenbergera et al. (2014) 6,2 – 12,4 h. Dexametazon je z malé části metabolizován v játrech enzymem CYP3A4 hydroxylací v poloze 6 na dva hydroxyderiváty a následně přeměněn dehydrogenací na 11-dehydrodexametazon kortikosteroidním 11-beta-dehydrogenázovým izozymem 2 (Lüllmann et al., 2004).

Široká škála farmakologických účinků řadí syntetické glukokortikoidy mezi nejpoužívanější léčiva na světě (DellaGreca et al., 2004). Mají potenciál kontaminovat přírodní prostředí prostřednictvím nedokonalého odstranění v čistírnách odpadních vod (Chang et al., 2007; Lin et al., 2009). Dalším vstupem syntetických hormonů do životního prostředí jsou velkochovy hospodářských zvířat, kde jsou často přidávány do krmných směsí z důvodu využití jejich anabolických vlastností a následného zvýšení rychlosti růstu svalové hmoty především u hovězího skotu (Calza et al., 2001; Adeel et al., 2017). Jak uvádí Chen et al. (2010), při analýze vod pocházejících z velkochovů hospodářských zvířat byly detekovány koncentrace steroidních hormonů až 1267 ng/l. Výrazně nižší koncentrace byly detekovány při analýze odpadních vod u čistíren odpadních vod, kde se koncentrace hormonů pohybovaly v řádu desítek ng/l.

Dexametazon byl detekován v říční vodě poblíž jedné francouzské farmaceutické továrny v koncentraci 10 µg/l (Gilbert, 2011).

V rezervoáru pitné vody v Šanghaji byla tato léčiva detekována v koncentracích až 28 ng/l (Nie et al., 2014).

Častý výskyt dexametazonu ve vodním prostředí vedl ke zkoumání jeho vlivu na organismy vodního ekosystému.

Účinky dexametazonu na reprodukci, růst a vývoj ryb se zabýval LaLone et al. (2012). Ke stanovení reprodukční toxicity a účinků dexametazonu v raném stadiu jelenečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) byl zvolen 21denní reprodukční test a 29denní embryo-larvální test. Expozice 500 µg/l dexametazonu ve 21denním testu způsobila snížení reprodukční schopnosti u samců. V plazmě samic byl výrazně snížen estradiol. Samice ryb vystavené této dávce dexametazonu také vykazovaly zvýšení plazmatických hladin vitellogeninového proteinu, pravděpodobně kvůli sníženému tření. Histologické výsledky ukazují, že 29denní embryo-larvální expozice 500 µg/l dexametazonu způsobila významné zvýšení deformací žaber. Potěr ryb vystavených dexametazonu po dobu 29 dní vykazoval významné snížení hmotnosti a délky ve srovnání s kontrolním potěrem.

Toxicitou osmi léčiv včetně dexametazonu pro ryby v raném stadiu života s využitím téhož druhu ryb se věnovali Overturf et al. (2012), kteří zjistili, že jedinci vystavení působení dexametazonu vykazovali významné snížení přežití (téměř 50%) při koncentraci 577 µg/l.

Sledováním toxicity dexametazonu společně s diklofenakem (zástupce nesteroidních antirevmatik) se zabývali Guiloski et al. (2015). Obě látky způsobily oxidativní stres v jaterních buňkách trahira malabarského (*Hoplias malabaricus*). Dexametazon navíc redukoval antioxidační systém v pohlavních žlázách ryb. Hlavní účinkem obou léčiv bylo výrazné snížení hladiny testosteronu u samců, čímž byla ohrožena jejich reprodukční schopnost. Účinky se projeví již při dávce 0,3 µg/kg pro dexametazon a 0,2 µg/kg pro diklofenak.

Bal et al. (2017a) provedli studii s cílem posoudit vliv vícegeneračních expozic dvou glukokortikoidů (dexametazonu a prednisolonu) na parametry života korýše *Ceriodaphnia dubia*. Výsledky testů ukázaly, že korýši *C. dubia* vykazovali různé citlivosti vůči oběma studovaným chemickým látkám, byli však při 48 hodinové expozici ve všech generacích citlivější na dexametazon ( $EC_{50}^2$  0,75 mg/l) ve srovnání s prednisolonem ( $EC_{50}$  19 mg/l).

---

<sup>2</sup> Střední účinná (efektivní) koncentrace

U obou sledovaných látek byly prokázány snížené hodnoty plodnosti, velikosti embrya, doby do prvního embrya, rychlosti růstu populace i růstu těla.

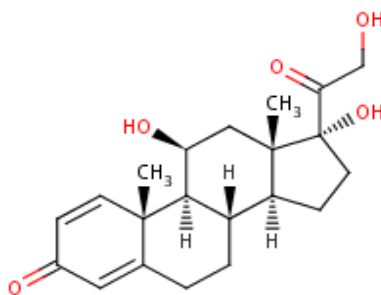
Ve studii DellaGreca et al. (2004) byla testována toxicita dexametazonu a prednisolonu a jejich fotochemických produktů vzniklých po několikahodinovém ozáření solárním simulátorem na řase *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve známá jako *Selenastrum capricornutum*) a korýši *Ceriodaphnia dubia*. Korýši byli výrazně citlivější než řasy – pro dexametazon byla stanovena efektivní koncentrace 0,05 mg/l, zatímco u řasy nebyl pozorován efekt ani v koncentraci 160 mg/l.

Kawabata et al. (2013) provedli studii, ve které byl zkoumán vliv záření různých vlnových délek na perzistenci a ekotoxicitu léčiv kontaminujících vodní prostředí. Vystavili devět léčiv (včetně dexametazonu a prednisolonu) v koncentraci řádově 1 mg/l slunečnímu světlu (léto, Hiroshima, Japonsko). Všechna léčiva podléhala fotodegradaci při použití UV-C záření, dexametazon byl zcela odbourán během 6 hodin. K jeho degradaci docházelo i při použití rozmezí vlnových délek UV-B (doba potřebná k odbourání činila 24 h), zatímco UV-A bylo méně účinné (po 24 h nedošlo k úplnému odbourání).

Kawabata et al. (2013) dále testovali toxicitu zkoumaných léčiv pro luminiscenční bakterie. Test prokázal, že v případě dexametazonu UV degradace snížila toxicitu vůči luminiscenčním bakteriím, v případě dalších léčiv ale byla prokázána u fotoproduktů toxicita zvýšená.

## 1.2 Prednisolon

Prednisolon (Obr. 2) je stejně jako dexametazon synteticky vyrobený glukokortikoid odvozený od kortizolu (hydrokortizonu) a široce používaný v humánní i veterinární medicíně pro své protizánětlivé, imunosupresivní, antineoplastické a vazokonstrikční účinky (Yasir a Sonthalia, 2019). Z chemického hlediska se jedná o biologicky aktivní metabolit prednisonu, který se získává dehydrogenací molekuly kortizonu v pozicích 1 a 2 jádra cyklopentan-perhydro-fenanthrenu. Systematický název prednisolonu podle názvosloví IUPAC je (8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one (PubChem).



**Obr. 2:** Strukturální vzorec prednisolonu (ChEBI).

Prednisolon je indikován k léčbě určitých typů alergií, zánětlivých stavů, autoimunitních poruch a jako podpůrná léčba u určitých druhů rakovin. Některé z těchto stavů zahrnují adrenokortikální nedostatečnost, vysokou hladinu vápníku v krvi, revmatoidní artritidu, dermatitidu, zánět očí, astma a roztroušenou sklerózu (Lüllmann et al., 2004; Lee, 2015). Používá se orálně ve formě tablet, intravenózně, jako kožní krém nebo oční kapky (Czock et al., 2005). Oční suspenze prednisolonu je vhodná ke snížení zarudnutí, otoku, svědění a alergických reakcí ovlivňujících oko. Oční suspenzí lze léčit i bakteriální keratitidu (Herretes et al., 2014). Obdobně jako všechny glukokortikosteroidy má prednisolon převažující glukokortikoidní a nízkou mineralokortikoidní aktivitu, díky čemuž je užitečný při léčbě široké škály zánětlivých a autoimunitních stavů (Czock et al., 2005). Prednisolon lze také použít jako imunosupresivní lék při transplantaci orgánů (Vethe et al., 2011). Má své využití i ve veterinární léčbě zejména u zánětlivých a alergických stavů u koček a psů.

Mezi vedlejší účinky při krátkodobém užívání patří gastrointestinální poruchy, pocit únavy, nespavost a neklid. K běžným vedlejším účinkům při dlouhodobém užívání patří úbytek kostí a svalů, slabost, zvýšené riziko kvasinkové infekce, vyrážky a snadné modřiny (Yasir a Sonthalia, 2019).

Prednisolon má krátkou dobu působení, protože poločas přetrvávání v plazmě je 2,1 – 3,5 h. Vazba na proteiny je velmi variabilní a pohybuje se v rozmezí od 65 do 91 % u zdravých pacientů (Czock et al., 2005). Farmakokinetické studie u člověka prokázaly, že vysoký podíl (> 98 %) prednisolonu se vylučuje močí. Prednisolon může být metabolizován na prednison, jehož následně vzniklé metabolity a glukurované konjugáty jsou opět vylučované močí (Matabosch et al., 2015).

Prednisolon se v posledních letech řadí k nejpředepisovanějším léčivým látkám (Díez et al., 2018). Stejně jako jiná léčiva se prednisolon dostává do povrchových vod, přičemž významným zdrojem znečištění jsou odpadní vody z nemocnic, kde byla potvrzena přítomnost prednisolonu v rozmezí koncentrací 315 – 1918 ng/l (Schriks et al., 2010). Koncentrace prednisolonu detekované v povrchových vodách se pohybují od ng/l do jednotek µg/l (Schriks et al., 2010; Klauson et al., 2013).

Naopak velmi nízké koncentrace udávají Chang et al. (2007), kteří identifikovali několik glukokortikoidů v sedmi čistírnách odpadních vod a blízkých říčních vodách (Peking, Čína), kde detekovali koncentraci prednisolonu v rozmezí 1,4 – 4,6 ng/l ve vstupních a 0,5 – 0,62 ng/l v odtokových vzorcích z čistíren odpadních vod.

Mezi toxikologické studie zabývající se vlivy prednisolonu na vodní organismy patří např. práce De Vrieze et al. (2014), kde prokázali, že prednisolon indukuje osteoporotický fenotyp při regeneraci šupin dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Vystavení prednisolonu v koncentraci 9,01 mg/l mělo za následek změnu obsahu minerálů (poměr vápník/fosfor) a vznik osteoporotické genové exprese v osteoblastech a osteoklastech.

Bal et al. (2016) pozorovali účinek koncentrací prednisolonu (62,5 až 125 µg/l) v embryonálním vývoji sladkovodního hlemýžďe *Physa acuta* a to zejména na ukládání vápníku a následně ztenčení ulity.

O rok později provedli Bal et al. (2017b) podobnou studii, kde byly posuzovány vícegenerační účinky prednisolonu na různá stádia životního cyklu na stejném organismu. Kontinuální expozice prednisolonu způsobila generační poškození u více sledovaných parametrů - anomálie se vyskytly jak ve struktuře skořepiny ulity, tak ve velikosti ulity a v jejím vývoji. Hodnoty LOEC (low observed effect concentration, nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem) se v exponovaných generacích pohybovaly od 4 do 32 µg/l. Přestože nalezené hodnoty LOEC jsou relativně vysoké s dosud měřenými koncentracemi v přírodních vodách, autoři odvozují, že jejich výsledky s dlouhodobou expozicí *P. acuta* mohou stimulovat další práce na výzkumu transgeneračních epigenetických jevů a odhalit nové odpovědi organismů na expozici člověkem produkovaných látek.

Ve studii Kugathase a Sumptera (2011) bylo zjištěno, že 21denní expozice prednisolonu o koncentraci 1 µg/l významně snižuje počet leukocytů a významně zvyšuje hladiny glukózy v plazmě u dospělých samců jelenečka velkohlavého (*Pimephales promelas*).

Výzkumem vlivu prednisolonu v časných stádiích dánia pruhovaného (*Danio rerio*) na fyziologické a behaviorální reakce se zabývají práce McNeila et al. (2016a a 2016b). V práci

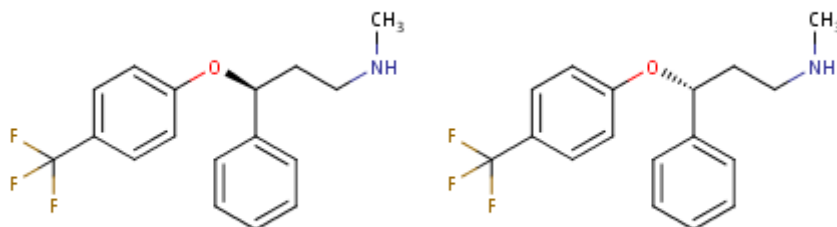
McNeila et al. (2016a) byl zkoumán vliv prednisolonu na morfologii oka. Expozice prednisolonu nezměnila morfologii oka, ale byla snížena agregace melaninu v kůži v reakci na zvyšující se úroveň světla a embrya vystavená prednisolonu (10 µg/l) udržovala tmavší fenotyp. Vystavení prednisolonu také zvýšilo preferenci embryí pro tmavé prostředí.

Cílem druhé studie (McNeil et al., 2016b) bylo prozkoumat fyziologický a behaviorální dopad expozice environmentálně relevantním koncentracím prednisolonu během embryogeneze dávná pruhovaného (*Danio rerio*). Při sledovaných koncentracích byla signifikantně snížena frekvence spontánních svalových kontrakcí. Během embryogeneze byla významně zvýšena srdeční frekvence i spotřeba kyslíku. V odezvě na 1 µg/l prednisolonu byly detekovány morfologické změny dolní čelisti. Významně bylo ovlivněno i několik parametrů charakterizující pohyb těchto živočichů, např. neobvyklá frekvence spontánních svalových kontrakcí či netypické změny v expresi myostatinu, produkci osteoblastů, regulaci svalové hmoty, mineralizaci kostí a v pohybech při plavání.

Výsledky studií potvrzují, že syntetické glukokortikoidy mají nepříznivý vliv na metabolismus, behaviorální chování, fyziologii, pohyb, regeneraci či genovou expresi u ryb.

### 1.3 Fluoxetin

Fluoxetin je silný psychotropní lék ze třídy selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI - selective serotonin reuptake inhibitors). V terapii se fluoxetin používá ve formě hydrochloridu jako racemická směs dvou enantiomerů (Obr. 3), přičemž S-enantiomer je při inhibici zpětného vychytávání serotoninu přibližně 1,5krát účinnější než R-enantiomer (Hiemke a Härtter, 2000). Konformační vlastnosti fluoxetinu vysoce ovlivňují jeho neurotransmiterovou roli a selektivitu. Systematický název fluoxetinu podle názvosloví IUPAC je N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amine (PubChem).



**Obr. 3:** Strukturální vzorce S- a R- enantiomerů fluoxetinu (ChEBI).

Fluoxetin vyvolává antidepresivní účinek tím, že se váže v presynaptické membráně na serotoninový transportér označovaný SERT nebo 5-HT<sup>3</sup> a inhibuje tak zpětné vychytávání neurotransmiteru serotoninu, čímž se zvyšuje koncentrace, dostupnost a přenos tohoto neurotransmiteru v postsynaptických receptorových místech. Fluoxetin zpožďuje zpětné vychytávání serotoninu, což má za následek delší přetrvávání serotoninu po jeho uvolnění v mozku (Pinna et al., 2009; Fabbri et al., 2014). Navíc má fluoxetin též slabou afinitu k transportérům noradrenalinu a dopaminu (Perez-Caballero et al., 2014), což při podávání vysokých dávek fluoxetinu (tzv. supratherapeutických dávek 60 až 80 mg na den) může způsobit obsazení těchto transportérů a volný dopamin a noradrenalin tedy mohou přispívat k antidepresivnímu účinku.

Fluoxetin je indikován k léčbě depresivní poruchy, obsedantně-kompulzivní poruchy, posttraumatické stresové poruchy, poruch příjmu potravy (zejména mentální bulimie) a panické poruchy (Stewart et al., 2014). Některé studie uvádějí přínos fluoxetinu u lidí s autismem (Williams et al., 2013). Fluoxetin se užívá perorálně ve formě potahovaných tablet. Mezi běžné nežádoucí účinky u osob léčených fluoxetinem patří potíže se spánkem, nevolnost, ztráta chuti k jídlu, sucho v ústech nebo dermatologické změny na kůži v podobě vyrážky. Mezi závažnější nežádoucí účinky patří serotoninový syndrom, tedy život ohrožující toxicita vysokých koncentrací serotoninu, zvýšené riziko sebevražedného chování v počátečních stádiích léčby a ve vzácných případech zvýšené riziko kožních krvácivých projevů jako je purpura a ekchymóza (Lüllmann et al., 2007).

Fluoxetin je metabolizován v játrech izoenzymy systému cytochromu P450, včetně CYP2D6, který je zodpovědný za přeměnu fluoxetinu N-demetylací na jeho jediný aktivní metabolit norfluoxetin (Margolis et al., 2000).

Fluoxetin i norfluoxetin se vážou na plazmatické proteiny (přibližně z 94 %), což umožňuje snadnou distribuci léku i jeho aktivního metabolitu norfluoxetinu do mozku (Perez-Caballero et al., 2014). Fluoxetin je vylučován z lidského těla primárně močí v podobě norfluoxetinu nebo glukuronovaného fluoxetinu (Silva et al., 2012) a pouze méně než 10 % podané dávky je vylučováno jako nezměněná původní sloučenina (Hiemke a Hartter, 2000). Fluoxetin i norfluoxetin vykazují extrémně pomalou eliminaci z těla. Obě látky časem inhibují svůj vlastní metabolismus, takže poločas eliminace fluoxetinu se z 1 až 3 dnů po akutním podání mění na 4 až 6 dnů po dlouhodobém užívání. Podobným způsobem se mění poločas eliminace norfluoxetinu až na 16 dnů při dlouhodobém užívání (Hiemke

---

<sup>3</sup> Serotonin neboli 5-hydroxytryptamin je zkráceně označován 5-HT.

a Hartter, 2000). Koncentrace léčiva a jeho aktivního metabolitu v krvi tedy během prvních několika týdnů léčby stále roste a jejich stabilní koncentrace v krvi je dosaženo až po čtyřech týdnech (Brunswick et al., 2002). Úplné vyloučení léku po ukončení podávání z těla může trvat až několik týdnů. Tyto údaje o poločasech eliminace fluoxetinu a norfluoxetinu potvrzují studie Henryho et al. (2005), kteří udávají, že během prvního týdne po přerušení léčby se koncentrace fluoxetinu v mozku snižuje pouze o 50 % a Burkeho et al. (2000), kteří zjistili, že od ukončení léčby je norfluoxetin v krvi stále detekovatelný po dobu 7 týdnů.

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) jsou v současné době nejvíce předepisovanými psychotropními léky, fluoxetin je nejčastěji používaným preparátem z této skupiny léků (Stewart et al., 2014). V důsledku toho byly fluoxetin i jeho aktivní metabolit norfluoxetin často detekovány v řadě vzorků z odpadních a povrchových vod. Maximální koncentrace fluoxetinu zjištěná v rozsáhlé studii amerických jezer, potoků a řek v letech 1999-2000 byla 12 ng/l (Kolpin et al., 2002). Schultz et al. (2010) uváděli koncentrace fluoxetinu 15 ng/l v řece po proudu od čistíren odpadních vod v USA. Naopak práce Metcalfa et al. (2003) shrnující analýzy léčiv v oblasti Velkých jezer v Kanadě v odtocích z čistíren odpadních vod v období léta a podzimu roku 2000 uvádí koncentrace fluoxetinu až 99 ng/l. Přes zavádění procesů na odstraňování léčiv včetně fluoxetinu při čištění odpadních vod, u nichž je udáváno, že odstraní až 80 % fluoxetinu, je jeho stálý přísun a relativní stabilita příčinou toho, že tato látka je v povrchových vodách opakovaně detekována (Vasskog et al., 2006). Norfluoxetin byl měřen v odtoku odpadních vod v Montrealu v Kanadě v koncentracích 12 – 13 ng/l během dvou různých vzorkovacích studií (Lajeunesse et al., 2008) a v povrchových vodách povodí Horní Tennessee v koncentraci 3,9 – 10 ng/l (Conley et al., 2008).

Ačkoliv byly fluoxetin a norfluoxetin detekovány v životním prostředí v relativně nízkých koncentracích, mohou představovat environmentální riziko prostřednictvím akumulace v sedimentech (Furlong et al., 2004). Též byla prokázána bioakumulace ve tkáních živých organismů (Silva et al., 2015). Brooks et al. (2005) detekovali fluoxetin a norfluoxetin v mozkových, jaterních a svalových tkáních tří různých druhů ryb žijících v severním Texasu v USA, přičemž nejvyšší koncentrace fluoxetinu a norfluoxetinu byly naměřeny v mozkové tkáni a to  $1,58 \pm 0,74$  ng/g pro fluoxetin a  $8,86 \pm 5,9$  ng/g pro norfluoxetin. V játrech byl fluoxetin detekován v koncentraci  $1,34 \pm 0,65$  ng/g, ve svalu  $0,11 \pm 0,03$  ng/g. Norfluoxetin byl v játrech detekován v koncentraci  $20,27 \pm 5,73$  ng/g, ve svalu



1,07 ± 0,41 ng/g. V jiné studii byl ovšem ve tkáni sladkovodní mušle (*Elliptio complanata*) fluoxetin zjištěn ve výrazně vyšším množství a to 79,1 ng/g (Chu a Metcalfe, 2007).

Jak fluoxetin tak norfluoxetin jsou odolné vůči biodegradaci a hydrolyze (Furlong et al., 2004).

Existuje řada prací, která se zabývá vlivem látek patřících do skupiny SSRI na biologické funkce vodních organismů, jako je růst (Brooks et al., 2003a), přežití (Brooks et al., 2003b), reprodukce (Péry et al., 2008), chování (Winder et al., 2012), regenerace (Ofoegbu et al., 2019b) či poškození DNA (Ofoegbu et al., 2019a). Změna v mechanismu zpětného vychytávání serotoninu zprostředkovaná SSRI může pravděpodobně vést ke škodlivým účinkům ve více biologických procesech u vodních organismů, protože rovnováha tělesné homeostázy je řízena převážně v mozku a centrálním nervovém systému obratlovců i bezobratlých (Kreke a Dietrich, 2008; Johnson a Sumpter, 2014). Kromě specifického účinku SSRI může fluoxetin a jeho metabolit norfluoxetin také interagovat s enzymy cytochromu P450, které tvoří důležitou superrodinu detoxikačních enzymů nacházející se v suchozemských a vodních organismech, od bakterií až po obratlovce (Hemeryck a Belpaire, 2002).

Významný vliv fluoxetinu a to i v nízkých koncentracích byl pozorován na různých trofických úrovních necílových organismů, řas, bezobratlých a obratlovců.

Posouzení účinků fluoxetinu na životní cyklus vodních bezobratlých se věnovali Péry et al. (2008). Tři druhy organismů, perloočka *Daphnia magna*, různonohý korýš *Hyaella azteca* a vodní plž *Potamopyrgus antipodarum* byli vystaveni roztokům fluoxetinu. Účinky fluoxetinu byly pozorovány při koncentracích kolem 10 µg/l, zejména pro reprodukci *D. magna* a *P. antipodarum*. U reprodukce *H. azteca* nebyl zjištěn žádný účinek na reprodukci, ale významný vliv na velikost těla byl pozorován u 33 µg/l.

Pokud jde o nepříznivé účinky fluoxetinu na reprodukci vodních bezobratlých organismů, některé studie jsou v rozporu. Flaherty a Dodson (2005) zjistili zvýšení reprodukce u *D. magna* při expozici 36 µg/l fluoxetinu po dobu 30 dnů. Také Brooks et al. (2003b) pozorovali výrazné zvýšení plodnosti u *Ceriodaphnia dubia* během sedmidenního období expozice fluoxetinu o koncentraci 56 µg/l. Naopak Henry et al. (2004) pozorovali reprodukční pokles u stejného druhu při expozici 89 µg/l.

Jiné studie se zabývaly hodnocením vlivu fluoxetinu na ryby a jejich vývojová stádia. Foran et al. (2004) zaznamenali při dlouhodobé expozici environmentálně relevantních koncentrací

fluoxetinu vývojové abnormality embryí (otoky, zakřivené páteře) a neúplný vývoj (žádné prsní ploutve, snížené postavení očí). Dále byla zaznamenána zvýšená koncentrace cirkulujících steroidů u samic.

De Farias et al. (2019) v testech akutní toxicity pozorovali zpožděné líhnutí, ztrátu rovnováhy a účinky na lokomotorickou a acetylcholinesterázovou aktivitu.

Latifi et al. (2015) zjistili u samců ryb významné snížení hladiny testosteronu po expozici fluoxetinu. Hlavní účinky fluoxetinu byly však pozorovány na úrovni reprodukčního cyklu (vliv na počet vajíček a inter-reprodukční intervaly).

Dopad expozice fluoxetinu na pohybové chování ryb zkoumali Winder et al. (2012). Již po velmi krátké době expozice fluoxetinu vykazovala zvířata sníženou lokomotorickou aktivitu.

Zásadní studii ohledně enantiospecificity provedli Stanley et al. (2007). Zkoumali enantiospecifické subletální účinky fluoxetinu a prokázali, že S-fluoxetin je výrazně toxičtější než R-fluoxetin. V testu EC10 (efektivní koncentrace pro desetiprocentní snížení aktivity) byla hodnota koncentrace pro R-fluoxetin 132,9 µg/l, zatímco pro S-fluoxetin 14,1 µg/l.

Sledování účinků fluoxetinu na fotosensitizující organismy byla rovněž věnována pozornost. V práci Brookse et al. (2003a) byla pro řasu *P. subcapitata* (dříve *Selanastrum capricornutum*) uvedena nejnižší pozorovaná koncentrace účinku (LOEC) 13,6 mg/l. Při této koncentraci byla také pozorována výrazná deformace a menší velikost buněk *P. subcapitata* než u neošetřených kontrol. Mechanismus, kterým může fluoxetin indukovat deformaci v řasových buňkách, není doposud znám.

Amy-Sagers et al. (2017) provedli laboratorní ekotoxikologická hodnocení pro širokou škálu koncentrací fluoxetinu na fyziologii vodní rostliny *L. minor* a na její fotosyntetickou funkci. Fluoxetin významně snížil denní rychlost růstu a reprodukci při 90 µg/l.

Některé studie se zabývaly účinky fluoxetinu v kombinaci s jinými léčivy.

Franzellitti et al. (2013) se zabývali účinky propranololu a antidepresiva fluoxetinu na slávce středomořské (*Mytilus galloprovincialis*), a to samostatně i v kombinaci. Propranolol působil proti zvýšení exprese genového produktu serotoninového receptoru (5-HT1) indukovaného fluoxetinem, aniž by však měl vlastní účinek. Navíc tato léčiva snižovala hladinu ABCB mRNA v zaživací žláze mušlí, když působila samostatně, ale nezpůsobila žádné významné změny v testu směsi.

Účinkům antidepresiv na cirkadiánní rytmy u ryb se ve své práci věnovali Melvin et al. (2017). Fluoxetin ani sertralin neměly vliv na vzorce denních aktivit, pokud byly ryby vystaveny těmto sloučeninám samostatně v jakékoli koncentraci, zatímco venlafaxin významně narušil normální cirkadiánní rytmus. Směs fluoxetinu, sertralínu a venlafaxinu rozrušila denní rytmy.

Painter et al. (2009) se ve své práci zabývali vlivem antidepresiv na únikové chování embryí a larev ryb. Studie prokázala, že vystavení směsi čtyř antidepresiv (fluoxetin, sertralin, venlafaxin, bupropion) zpomalilo únikové chování ryb jak ve stádiu embrya, tak i ve stádiu larvy.

#### **1.4 Využití hrotnatky *Daphnia magna* v ekotoxikologii**

Ekotoxikologie je vědní obor zabývající se studiem účinků toxických látek na živé organismy na všech úrovních biologické organizace od molekulární úrovně až po celé populace, společenstva, ekosystémy a biosféru (Anděl, 2011). Hlavním cílem ekotoxikologických studií je monitorovat a předpovědět osud a vliv cizorodých látek v kontextu všech ostatních faktorů životního prostředí pomocí testů akutní a chronické toxicity. Na základě těchto znalostí lze navrhnout nejúčinnější opatření k prevenci nebo nápravě škodlivých účinků. V ekosystémech, které jsou již znečištěny, mohou ekotoxikologické studie sloužit k výběru účinné a efektivní obnovy ekosystémových struktur a funkcí (Anděl, 2011).

Pomocí ekotoxikologických biotestů lze prokázat toxický účinek testované látky, směsi látek, výluhů apod. sledováním změn konkrétních parametrů organismu (přežití, reprodukce, růst, chování, regenerace, mezibuněčná komunikace a mutagenita) po aplikaci testované látky za definovaných podmínek (Fent et al., 2006). Odpověď organismu na testovanou látku může vzniknout při krátkodobém působení látky (testy akutní toxicity) nebo dlouhodobé expozici (testy chronické toxicity). Testy akutní i chronické toxicity jsou vhodné pro chemické látky, které jsou rozpustné ve vodě, popřípadě je možné je udržovat ve stabilních suspenzích či disperzích. Testování je vhodné i pro environmentální vzorky z povrchových, podzemních či odpadních vod (čištěných v čistírnách odpadních vod i nečištěných) a vodných výluhů z pevných matric (Fent et al., 2006).

K nejrozšířenějším metodikám testů toxicity se řadí testování na vodních organismech. Nejvyužívanější organismy jsou ryby jako např. *Danio rerio*, *Cyprinus carpio* nebo *Oncorhynchus mykiss* (Corcoran et al., 2010; Stewart et al., 2014). K testování se velmi často využívají také bezobratlí živočichové jako např. perloočky, žábřonozky, vířníci nebo

lasturnatky (Camargo et al., 2005) ale i jednobuněčné zelené řasy (např. *Desmodesmus subspicatus*), rostliny (*Lemna minor*, *Sinapis alba*), heterotrofní sinice, bakterie či kvasinky (Bondarenko et al., 2016; Neale et al., 2017). Testované organismy by měly být vybírány na základě dopodrobna známé etologie, ekologie, a životního cyklu. Sladkovodní korýš hrotnatka velká (*Daphnia magna*) je typickým příkladem takového organismu. Je jedním z nejpoužívanějších modelů vodních bezobratlých pro environmentální toxikologická hodnocení znečišťujících látek po celém světě (Shaw et al., 2008). Literatura uvádí, že využití hrotnatek představuje 8 % všech experimentálních údajů o vodních bezobratlých organismech v toxikologických databázích (Denslow et al., 2007). Kromě ekotoxikologie využívají hrotnatku i jiné oblasti výzkumu zaměřující se na fyziologii (Glover a Wood, 2005), vrozenou imunitu (Little et al., 2003), interakce mezi hostitelem a parazity (Jensen et al., 2006), stárnutí (Iampolskiĭ a Galimov, 2005), epidemiologii (Hall et al., 2006) a vývojovou regulaci (Shiga et al., 2006).

*Daphnia magna* (hrotnatka velká) je malý zooplanktonní korýš rodu *Daphnia*, který systematicky patří do čeledi hrotnatkovití (Daphniidae) a řádu perloočky (Cladocera). Délka dospělé samice dosahuje velikosti až 5 mm, samci jsou výrazně menší (2 mm). Patří k největším druhům svého rodu (Forró et al., 2007).

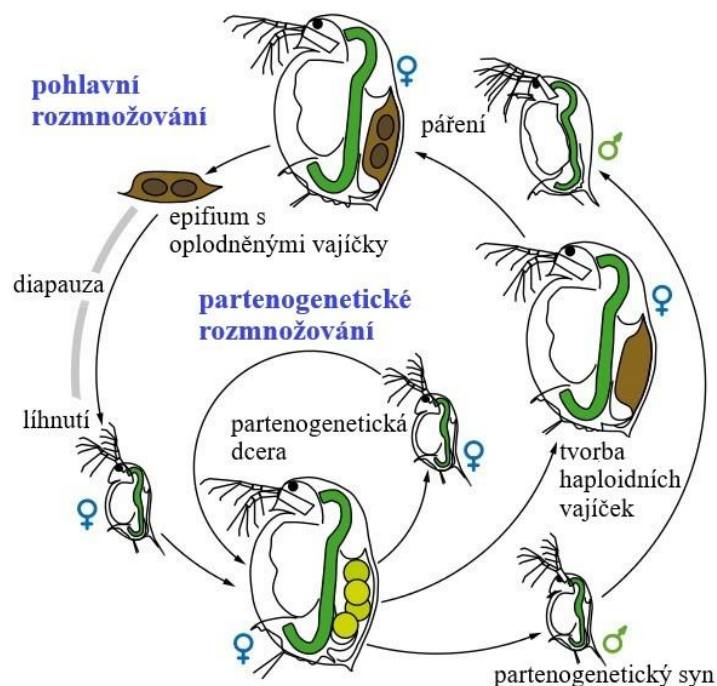
*D. magna* je rozšířena na severní polokouli. Obývá rozmanité sladkovodní prostředí různých velikostí, od drobných tůní až po velká jezera, rybníky a údolní nádrže bohaté na sediment a organickou hmotu. Vyhýbá se vodám s prudkým tokem, podzemním a extrémně znečištěným vodám. Vyskytuje se převážně v pelagické zóně stojatých vod, protože se živí především suspendovanými částicemi ve vodním sloupci (hlavně řasami, ale také bakteriemi a detritem). Ve srovnání s jinými druhy hrotnatek se vyskytuje častěji ve spojení se substrátem, kde je schopna využívat bentické zdroje potravy jako perifyton a sediment (Siehoff et al., 2009).

Hrotnatky představují ekologicky důležitou složku potravních řetězců ve vodních ekosystémech, protože jsou primárními konzumenty bakterií, sinic, prvoků a zejména planktonních řas, čímž určují jejich hustotu, druhové složení, zabraňují jejich přemnožení a napomáhají správnému fungování vodních ekosystémů. Zároveň slouží hrotnatky jako primární zdroj potravy pro mnohé planktivorní ryby a tvoří tak transformační článek energie a biomasy mezi primárními producenty a rybami (Tessier et al., 2000; Lampert, 2006). Hrotnatky jsou velmi citlivé na jakékoli změny chemického složení vodního prostředí, proto jejich pokles ve vodárenských nádržích, jezerech či rybnících slouží jako důležitý

bioindikátor environmentálního hodnocení vodních systémů, zejména při kontaminaci pitné vody (Zeng et al., 2012).

Jako většina ostatních druhů rodu *Daphnia* se hrotnatka reprodukuje pomocí heterogonie (Obr. 4) vázané na podmínky prostředí (střídání asexuálního partenogenetického a pohlavního rozmnožování). Tato forma reprodukce je charakterizována střídavou produkcí asexuálního potomstva a v určité době produkcí haploidních vajíček, která je třeba oplodnit samci při pohlavním rozmnožování (Shaw et al., 2008). Asexuální vajíčka (až několik desítek na snůšku) jsou diploidní, tvoří se partenogeneticky při příznivých podmínkách v zárodečném prostoru dospělé samice a vyvinou se v geneticky identické samice. Vajíčka prochází osmi vývojovými stádii a délka embryonálního vývoje závisí hlavně na teplotě prostředí. Při teplotě 25 °C a za dobrých životních podmínek vzniká snůška i po 46 hodinách. Juvenilové procházejí čtyřmi až šesti vývojovými stádii, zrají po dobu 5 – 10 dnů. Jednotlivá stadia juvenilů lze odlišit podle postupného svlékání chitinové schránky. Za dospělého je jedinec považován od okamžiku, kdy u něj dojde k první snůšce (Ebert, 2005).

V reakci na nepříznivé environmentální podněty (změna teploty, změna fotoperiody, úbytek potravy, chemické znečištění) začnou hrotnatky produkovat haploidní klidová (diapauzní) vajíčka, ze kterých se líhnou samci umožňující pohlavní reprodukci (Ignace et al., 2011). Ve vaječníku samice dochází k oplodnění vajíček, ta jsou poté zabalena do ochranného chitinového obalu zvaného sedélko (efipium). Tato klidová vajíčka vstupují po oplodnění do fáze diapauzy a jsou schopna odolávat dlouhým obdobím nepříznivých až extrémních podmínek prostředí (i dlouhodobé vyschnutí). Jakmile nastanou vhodné podmínky, dojde k líhnutí. Líhnutí se spouští v reakci na specifické podněty, jako je teplota nebo zkrácení fotoperiody. Z klidových vajíček se vyvinou výhradně samice (Ebert, 2005).



**Obr. 4:** Životní cyklus *Daphnia magna* (upraveno podle Vizoso, 2013, commons.wikimedia.org).

Hrotnatka velká patří k nejlépe prostudovaným vodním bezobratlým živočichům z hlediska biologie a toxikologických specifik, proto se široce používá jako modelový organismus pro testování biologických účinků chemických látek a kontaminantů rozpuštěných ve vodě (Shaw et al., 2008).

Hrotnatka má několik výhodných charakteristik, díky nimž je cenná pro biologický výzkum. Její průhlednost umožňuje pozorování vnitřních anatomických struktur v mikroskopu. Reprodukce cyklickou partenogenezí umožňuje vytvářet klony (asexuální reprodukce) nebo provádět křížení mezi kmeny při sexuální reprodukci (Shaw et al., 2008), kdy vývoj sexuálně produkovaných diapauzovaných vajíček lze zastavit v klidové fázi. Vajíčka hrotnatky zůstávají životaschopná po celá desetiletí a poté poskytují jedinečnou příležitost pro zkoumání předešlých populací a změn populací v čase v určité oblasti (Pollard et al., 2003; Ignace et al., 2011). Mezi další praktické atributy, díky nimž je *Daphnia magna* užitečným modelovým systémem pro experimentální výzkum, patří poměrně snadná manipulace, nenáročný chov a udržitelnost v relativně jednoduchých definovaných médiích. Výhodou tohoto organismu je i rychlá reprodukce (krátká generační perioda), snadné a levné krmení planktonními řasami a příhodná velikost. Kromě toho je *Daphnia magna* velmi užitečný modelový systém pro toxikologii vzhledem k její jedinečné citlivosti k toxickým látkám a změnám vlastností daného prostředí (Villegas-Navarro et al., 2003). Rod *Daphnia* je velmi

rozšířený a jednotlivé druhy tohoto rodu jsou si biologicky velmi podobné. Lze tedy očekávat, že látka testovaná na jednom druhu bude mít velmi podobný účinek i u dalších druhů hrotnatek, které se vyskytují jinde ve světě. *Daphnia magna* se navíc (díky své velikosti) liší od ostatních druhů velkým množstvím juvenilů v jedné snůšce, přičemž tyto juvenilové jsou poměrně velcí a lehce zabarvení, tudíž je velmi snadné vyhodnocovat jejich počty (Forró et al., 2007).

Pro všechny výše uvedené vlastnosti je hrotnatka hojně využívána v ekotoxikologickém výzkumu jak v testech akutní toxicity, tak i v testech toxicity chronické a subchronické<sup>4</sup>. I přes značný technologický pokrok jsou ekotoxikologické testy s hrotnatkami stále jedním z nejspolehlivějších způsobů, jak zjistit toxický vliv chemických polutantů na vodní ekosystémy. Pokročilé technologie společně s modelovými organismy vytvářejí stále vyspělejší metody a ekotoxikologie se tak posouvá stále vpřed. Hrotnatka jako relevantní zástupce vodního ekosystému se nadále blíže zkoumá a jsou u ní sledovány stále nové účinky jako např. změny v expresi genů (Dominguez et al., 2015) či změny biochemických parametrů (Ulm et al., 2015).

---

<sup>4</sup> Subchronická toxicita zahrnuje nepříznivé účinky, které se objeví u laboratorního zvířete v důsledku opakované expozice chemické látky po dobu představující 10 % očekávané délky života příslušného organismu.

## 2 Materiály a metody

Všechny testované látky (dexametazon, prednisolon, fluoxetin) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Zásobní roztoky jednotlivých látek byly připravovány rozpuštěním v ultračisté vodě (Milli-Q®) v koncentraci 50 mg/l, uchovávány byly v temnu při pokojové teplotě. Stabilita roztoků byla ověřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC - high-performance liquid chromatography).

UV-VIS spektra byla proměřena přístrojem UV-VIS spectrophotometer SHIMADZU, typ UV-1601 s použitím softwaru UV Probe.

Chromatografická stanovení pomocí HPLC byla provedena na přístroji ThermoScientific Dionex Ultimate systém (USA) s kolonou Phenomenex Luna C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm). Jako mobilní fáze byla u testování dexametazonu a prednisolonu použita směs vody a methanolu v poměru 60:40. U stanovení fluoxetinu byla jako mobilní fáze použita směs 28 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu v poměru 67:33. Eluce byla prováděna isokraticky. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, nastříkovaný objem vzorku byl 20 μl. Pro zpracování chromatografických dat byl použit program Chromeleon. Detekce byla prováděna spektrofotometrickým UV-VIS detektorem s diodovým polem PDA 3000RS s využitím vlnových délek 248 nm u dexametazonu, 243 nm u prednisolonu a 226 nm u fluoxetinu.

Ozařování vzorků probíhalo ve skleněných kyvetách s víčkem ve fotochemickém reaktoru Rayonet RPR-100 osazeném lampami RPR 3000Å emitující světlo o vlnové délce 250 – 350 nm, vlnové délky pod 300 nm byly odfiltrovány použitím optického skla. Zářivý tok tohoto reaktoru byl 4,5 W.

Doba ozařování byla volena tak, aby v reakční směsi bylo přítomno co nejvíce vytvořených produktů, a přitom zbývalo určité množství původní látky. Vodný roztok dexametazonu byl ozařován po dobu 5 minut, prednisolonu 3 minuty. Vodný roztok fluoxetinu s přísadkou Fe (III) v koncentraci 5 mg/l byl ozařován 90 minut. Stabilita směsí byla ověřena pomocí HPLC.

Metodika testu chronické toxicity inspirovaná metodikou OECD č. 211 (OECD, 2004) za použití hrotnatky *Daphnia magna* je totožná s metodikou použitou v bakalářské práci Dokoupilové (2018). Pro přehlednost je však použitý postup zopakován i v této práci.



Pro test toxicity byly použity roztoky dexametazonu, prednisolonu a fluoxetinu vždy v koncentraci 250 µg/l (zásobní roztok ředěný vzduchovanou vodovodní vodou temperovanou na laboratorní teplotu).

Směsi po ozáření byly pro test toxicity dávkovány tak, aby byl přidán tolikrát větší objem, kolikrát se snížilo množství výchozí mateřské látky a bylo tudíž dosaženo stejné koncentrace mateřské látky v obou případech (u dexametazonu a prednisolonu sedminásobně větší objem, u fluoxetinu pětinasobně).

Po dobu 21 dní byly hrotnatky vystaveny jednak působení testované látky (dexametazonu, prednisolonu, fluoxetinu) a jednak produktům jejího fotochemického rozkladu. Během testu bylo každý druhý den vždy přibližně ve stejnou dobu zaznamenáváno přežití a počet potomků, kteří byli od matek odebráni. Médium bylo měněno každý čtvrtý den, obden byly hrotnatky krmeny zelenou řasou *Desmodesmus subspicatus* v koncentraci 6 mg C/l.

Do testu byli nasazováni juvenilové mladší 24 hodin pocházející z laboratorního chovu *D. magna*. Při testování účinků dexametazonu a jeho degradačních produktů došlo omylem k nasazení 4 samců. Proto bylo pro optimální průběh dalších dvou testů (prednisolon, fluoxetin) nutné ujištění, zda budou do testu nasazovány samice. Během nasazování proto bylo pod lupou kontrolováno pohlaví juvenilních hrotnatek. Juvenilové byli pod lupou odděleně pozorováni v mikrotitrační destičce (96 jamek) a při nepatrném proostřování bylo možné rozpoznat rozdílnou velikost prvního páru tykadel (antenu), která slouží jako relativně snadný znak pro rozlišení samic a samců.

Inkubace hrotnatek probíhala odděleně v 50 ml média v počtu 1 hrotnatky na kádinku. Celkový počet 45 kádinek byl rozdělen do tří sad po patnácti kádinkách, v každé sadě bylo použito jiné médium – médium s mateřskou látkou, médium s produkty fotochemického rozkladu a kontrola. Médium bylo ředěno vzduchovanou temperovanou vodovodní vodou a byly přidávány řasy jako potrava. V rámci každého testu byla nasazena kontrolní sada kádinek, která obsahovala pouze potravu ve formě řas a vzduchovanou temperovanou vodu. Všechny kádinky s nasazenými juvenily byly uchovávány v temperovaném boxu s nastavenou teplotou 20 °C a světelnou periodou 16:8, tj. 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Při založení testu toxicity bylo náhodně vybráno několik juvenilních hrotnatek. Tito jedinci byli zafixováni přídatkem formaldehydu a uchováni pro následné změření velikosti těla.

Na konci pokusu byly všechny přeživší samice vloženy jednotlivě do malých zkumavek a zafixovány formaldehydem. Zafixovaná zvířata sloužila k porovnání velikosti těla mezi jednotlivými typy média.

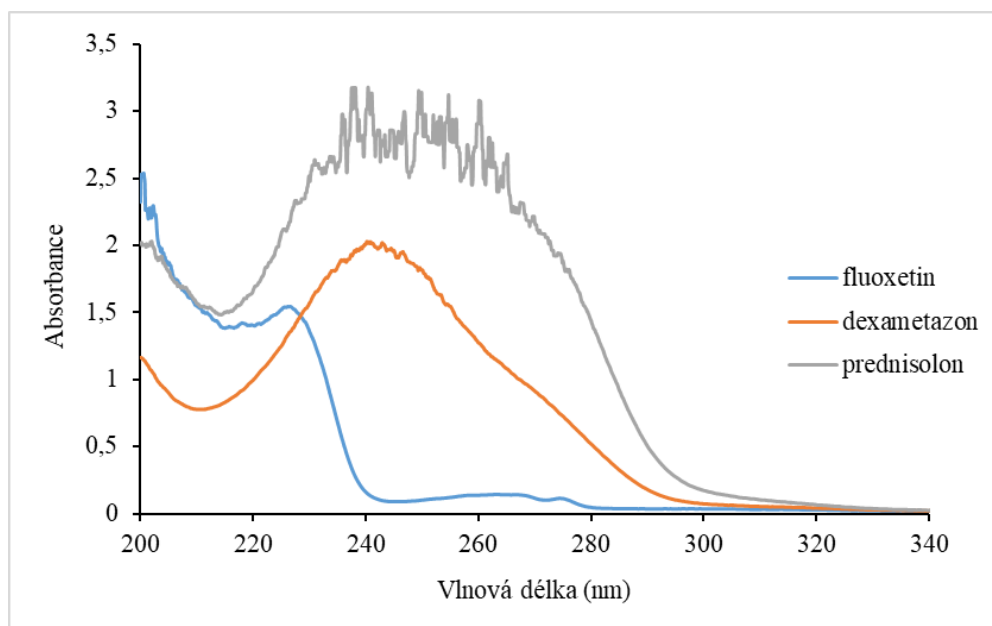
Pro vyhodnocení dopadu dexametazonu, prednisolonu a fluoxetinu a jejich fotodegradačních produktů na celkový počet juvenilů, počet snůšek a velikost těla hrotnatek byl zvolen neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným mnohonásobným porovnáním.

Kaplan-Meierova analýza přežívání byla použita k vyhodnocení rozdílů přežívání u dexametazonu. Porovnání přežití mezi kontrolou, dexametazonem a produkty fotodegradace bylo vyhodnoceno chí-kvadrát testem. Statistické zpracování bylo provedeno v programu Statistica 13.2 (TIBCO Software Inc., 2017).

### 3 Výsledky

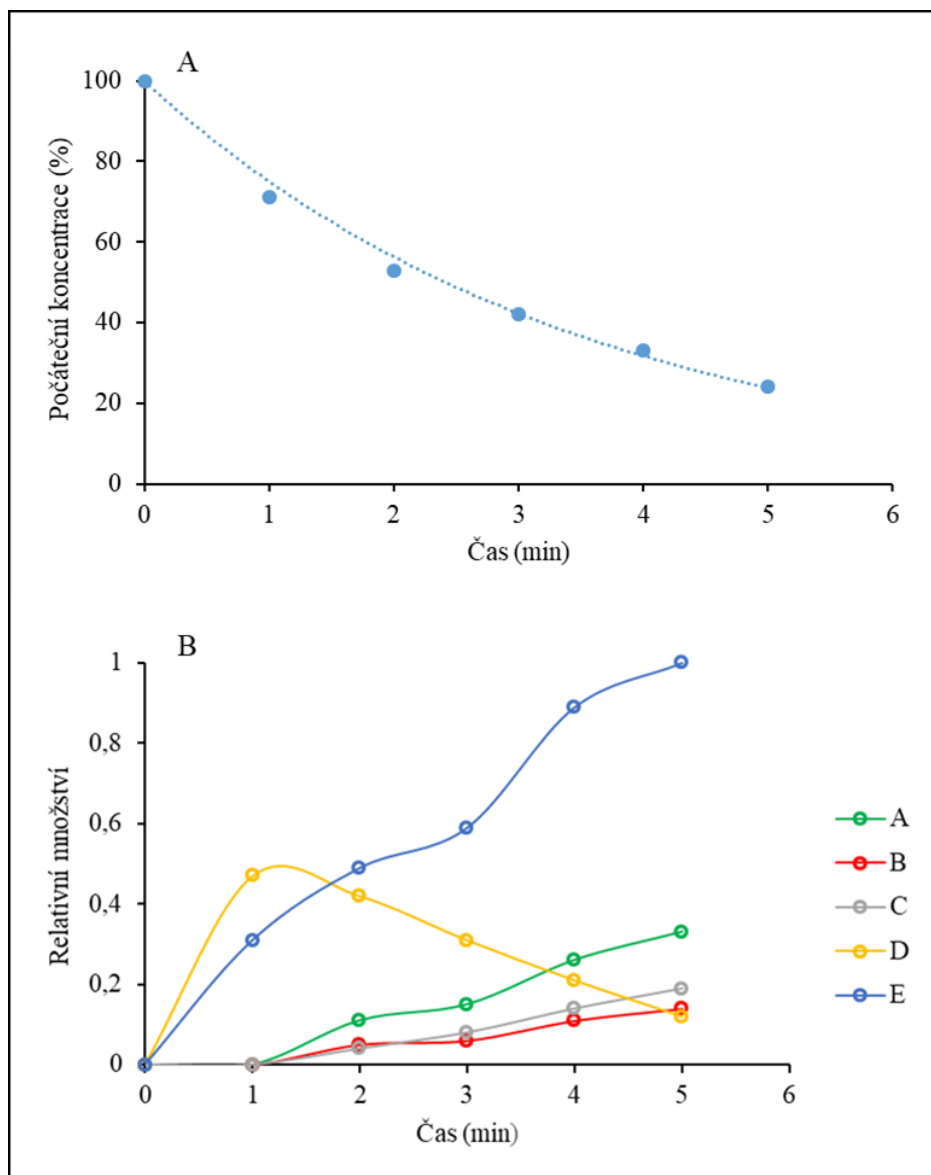
#### 3.1 Kinetika fotochemických degradací vybraných léčiv

Jak ukazují absorpční charakteristiky jednotlivých studovaných látek, všechny tři látky vykazují silnou absorpci v UV oblasti (Obr. 5). Zatímco v oblasti vlnových délek nad 300 nm mají prednisolon a dexametazon jen velmi malou absorpci, fluoxetin v této oblasti neabsorbuje vůbec.



**Obr. 5:** Absorpční spektra zásobních roztoků dexametazonu, prednisolonu a fluoxetinu.

Ozařování dexametazonu a tvorbu fotodegradačních produktů shrnuje Obr. 6.

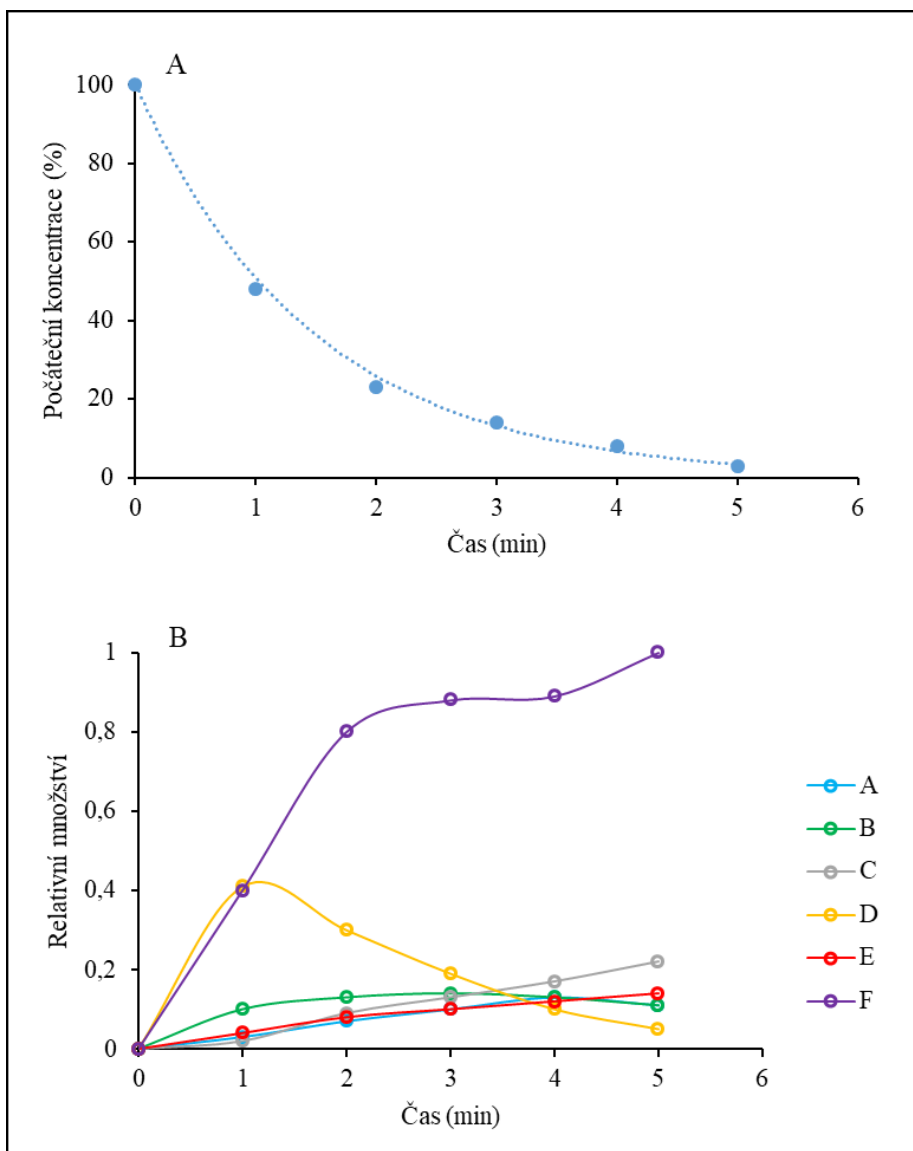


**Obr. 6:** Úbytek dexametazonu (A) a průběhy tvorby jednotlivých produktů označených jako A, B, C, D, E (B).

Fotochemická degradace dexametazonu probíhá dle kinetiky 1. řádu s rychlostní konstantou  $0,287 \text{ min}^{-1}$  a to bez přídavku jakékoli pomocné látky, např. iontů kovů (Obr. 6A).

Při degradaci vzniká pět produktů, z nichž produkt označený písmenem D má zřetelný průběh meziproduktu reakce, ostatní se ve sledovaném časovém úseku chovají jako konečné produkty (Obr. 6B).

Ozařování prednisolonu a tvorbu fotodegradačních produktů shrnuje Obr. 7.

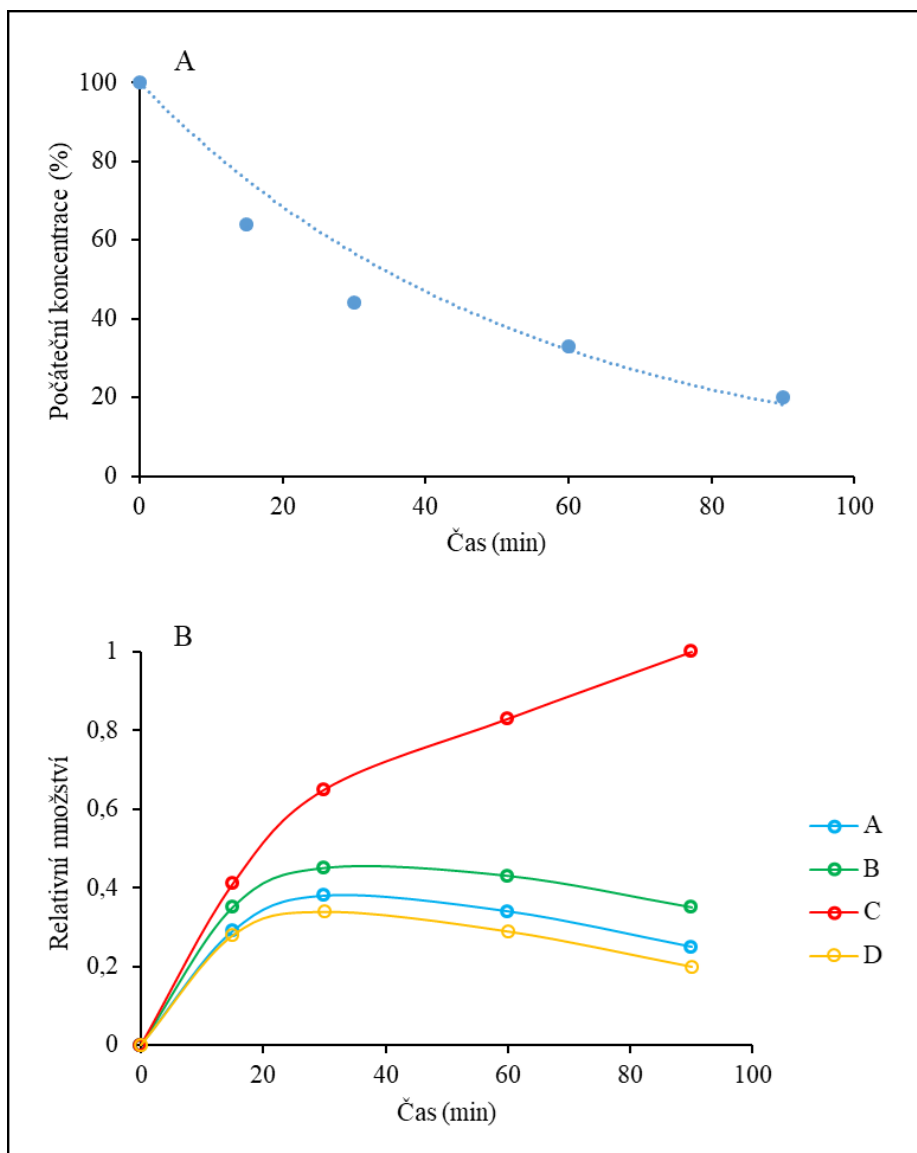


**Obr. 7:** Úbytek prednisolonu (A) a průběhy tvorby jednotlivých produktů označených jako A, B, C, D, E, F (B).

Fotochemická degradace prednisolonu probíhá také dle kinetiky 1. řádu s rychlostní konstantou  $0,676 \text{ min}^{-1}$  a to bez přidavku jakékoli pomocné látky, např. iontů kovů (Obr. 7A).

Při degradaci vzniká šest produktů, z nichž produkt označený písmenem D má zřetelný průběh meziproduktu reakce, ostatní se ve sledovaném časovém úseku chovají jako konečné produkty (Obr. 7B).

Ozařování fluoxetinu a tvorbu fotodegradačních produktů shrnuje Obr. 8.



**Obr. 8:** Úbytek fluoxetinu za přítomnosti Fe (III) (A) a průběhy tvorby jednotlivých produktů označených jako A, B, C, D (B).

Fluoxetin je fotochemicky odbouráván až po přidavku iontů kovů, Fe (III), přičemž k signifikatnímu odbourávání dochází až při přidavku Fe (III) v koncentraci 5 mg/l. Za těchto podmínek činí úbytek fluoxetinu po 90 minutách ozařování 80 % původně přítomného množství. Úbytek neodpovídá kinetice prvního řádu po celou dobu, po níž byla reakce sledována (Obr. 8A) – reakce je v prvních 30 minutách rychlejší, pokles v tomto časovém úseku odpovídá exponenciálnímu průběhu a rychlostní konstanta pro těchto prvních 30 minut činí  $0,03 \text{ min}^{-1}$ . V dalším stadiu je průběh reakce pomalejší.

Z detekovaných produktů mají produkty A, B a D zřetelný průběh meziproduktů, produkt C vykazuje setrvalý nárůst typický pro konečný produkt (Obr. 8B).

### 3.2 Testování toxicity vybraných léčiv a produktů jejich fotodegradace

Před zahájením testu chronické toxicity byla testována stabilita zásobních roztoků i směsí po fotochemické degradaci.

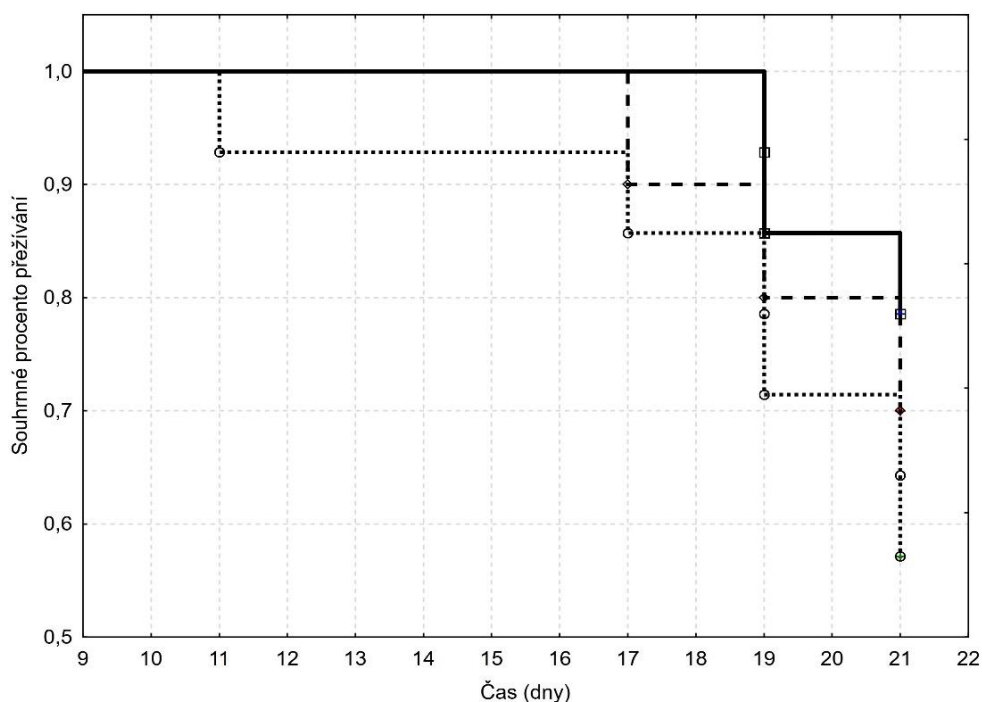
Koncentrace dexametazonu se v jeho zásobním roztoku po dobu 5 dní nezměnila, v ozářené směsi se koncentrace dexametazonu snížila o cca 10 %, u produktů nedošlo k žádné změně v koncentraci.

Koncentrace prednisolonu se v jeho zásobním roztoku ani v ozářené směsi po dobu 5 dní nezměnila, rovněž nedošlo u ozářené směsi ke změnám v koncentraci produktů.

Koncentrace fluoxetinu v jeho zásobním roztoku byla sledována po dobu 7 dní, přičemž nebyla pozorována žádná změna. V ozářené směsi nedošlo za stejně dlouhou dobu ani ke změnám koncentrace fluoxetinu ani ke změnám koncentrace jednotlivých produktů.

V chronickém testu toxicity při teplotě média 20 °C bylo pozorováno, že se jeden den staré hrotnatky začaly rozmnožovat v devátém dni pokusu. Pro testování toxicity dexametazonu byli do pokusu omylem nasazeni čtyři samci. Navíc, během testu uhynuly tři samice 7. den, tj. před vytvořením první snůšky. Samci a samice, které zemřely 7. den, byli z hodnocení testu vyřazeni. V průběhu experimentu uhynuly další samice, přežívání dokumentuje analýza přežívání (Obr. 9). Během testování toxicity prednisolonu uhynula jen jedna samice, v průběhu testování fluoxetinu uhynuly dvě. Tyto zemřelé samice nebyly rovněž zahrnuty do statistického zpracování.

Obr. 9 zobrazuje analýzu přežívání hrotnatek vystavených dexametazonu a jeho fotodegradačním produktům.



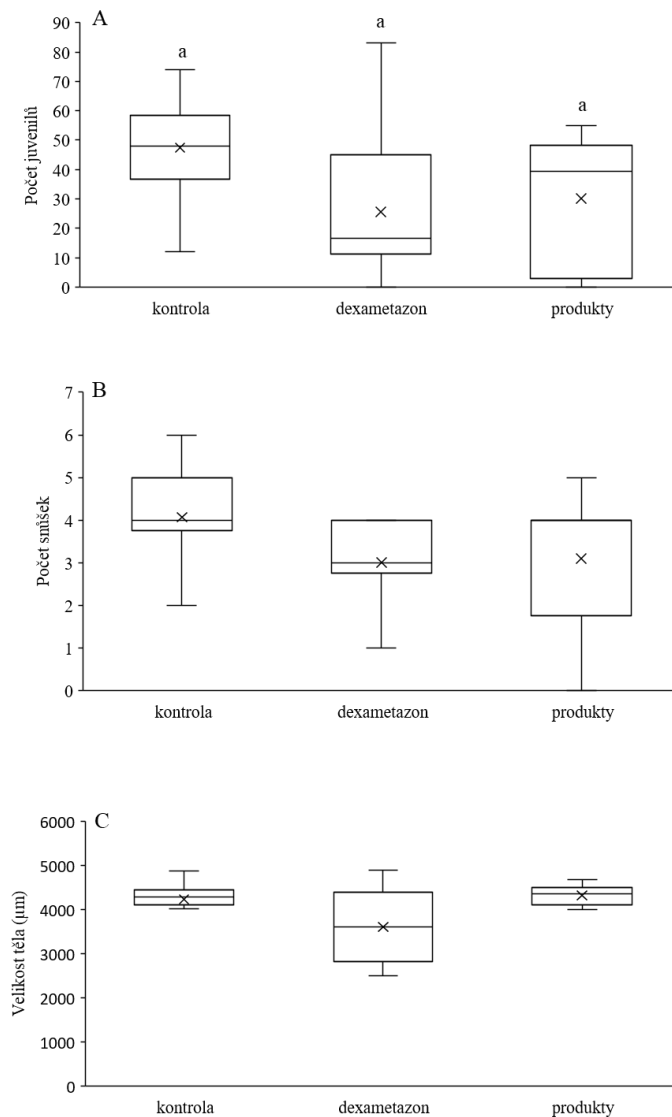
**Obr. 9:** Analýza přežívání během vystavení hrotnatek dexametazonu a fotodegradčním produktům po dobu 21 dní. Plná čára – kontrola, tečkovaná čára – dexametazon, čárkovaná čára – produkty fotodegradace.

Z Obr. 9 je patrné, že všechny samice byly naživu až do 11. dne pokusu, kdy došlo k úmrtí jedné samice v prostředí dexametazonu. Sedmnáctý den pokusu uhynula jedna samice v prostředí dexametazonu a jedna samice v prostředí produktů fotodegradace byla usmrcena při manipulaci. Devatenáctý den pak došlo k úhynu pěti samic ve všech prostředích a to dvě v čisté vodě, dvě v dexametazonu a jedna v prostředí produktů fotodegradace. 21. den pokusu uhynuly čtyři samice a to jedna v kontrolní skupině s čistou vodou, jedna v prostředí fotodegradčních produktů a dvě v dexametazonu. Z trendu jednotlivých čar je zřejmé, že nejvíce umíraly samice v médiu s dexametazonem, méně v produktech fotodegradace a nejméně v kontrolní skupině.

Proto byla použita Kaplan-Meierova metoda, která hodnotí, zda se je rozdíl mezi úhynem v jednotlivých prostředích a to pomocí výpočtu tzv. kumulativního procenta přežívání. Toto kumulativní procento přežívání vypočítané Kaplan-Meierovou metodou neprokázalo rozdílné přežívání mezi experimentálními zásahy ( $\chi^2 = 1,68$ ;  $P = 0,43$  – pro průkazný rozdíl by hodnoty těchto parametrů musely být 5,99 pro  $\chi^2$  a 0,05 pro parametr  $P$ ).

Grafické znázornění sledovaných parametrů pro dexametazon a jeho produkty fotochemické degradace je na Obr. 10.





**Obr. 10:** Počet juvenilů (A), počet snůšek (B) a velikost těla v  $\mu\text{m}$  (C) během vystavení hrotnatek třem odlišným typům média (kontrola, dexametazon a fotodegradací produkty) po dobu 21 dní. Vodorovná čára – medián, křížek – průměr, horní a dolní hranice boxu – horní a dolní kvartil, rozsah hodnot – minimum a maximum.

Indexy značí průkazné rozdíly mezi skupinami: zkoumaná média označená stejnými indexy aaa (Obr. 10A) nejsou průkazně odlišná na hladině  $P < 0,05$ , u zkoumaných médií bez indexů (Obr. 10B, C) nebyl signifikantní výsledek statistického zpracování.

Z Obr. 10 je dobře patrné, že počet juvenilů a počet snůšek je výrazně menší u roztoku dexametazonu a směsi fotoproduktů v porovnání s kontrolou. Velikost těla měla u dexametazonu velké rozpětí, nicméně hodnoty pro kontrolu a fotoprodukty jsou prakticky shodné.

Číselné vyjádření medián (min-max) sledovaných parametrů u hrotnatek v pokusu s dexametazonem a produkty jeho fotochemického odbourávání jsou uvedeny v Tab. I. Detailní data naměřených parametrů pro dexametazon obsahuje Příloha 1.

**Tab. I:** Hodnoty sledovaných parametrů pro test toxicity dexametazonu a produktů jeho fotodegradace: počet juvenilů a počet snůšek jako hodnoty sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu toxicity dexametazonu a jeho degradačních produktů. Parametr před závorkou udává medián, parametry v závorce udávají minimální a maximální hodnotu.

typ média	počet juvenilů	počet snůšek	velikost těla ( $\mu\text{m}$ )
kontrola	48 (12 - 74)	4 (2 - 6)	4325 (4025 - 4875)
dexametazon	16,5 (0 - 83)	3 (1 - 4)	3613 (2500 - 4900)
produkty	39,5 (0 - 55)	4 (0 - 5)	4350 (4000 - 4675)

Z Tab. I vyplývá, že počet juvenilů a snůšek byl nejvíce ovlivněn dexametazonem i produkty jeho fotodegradace. Velikost těla hrotnatek byla nejvíce ovlivněna samotným dexametazonem.

V Tab. II jsou prezentovány výsledky Kruskal-Wallisova testu pro dexametazon porovnávající sledované parametry.

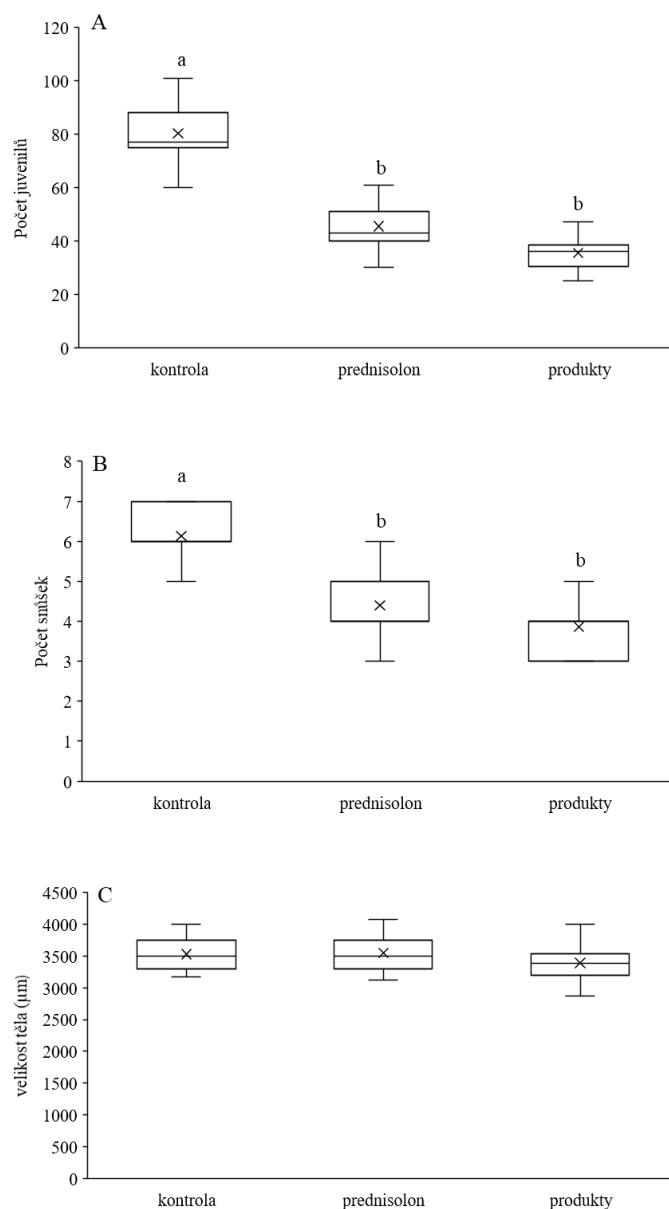
**Tab. II:** Výsledky Kruskal-Wallisova testu porovnávajícího sledované parametry hrotnatek v kontrole, roztoku dexametazonu a produktů fotodegradace.

Význam zkratk: N – počet opakování, H – testové kritérium, d.f. – počet stupňů volnosti, P – pravděpodobnost.

parametr	N	H	d.f.	P
počet juvenilů	38	6,36	2	0,04
počet snůšek	38	6	2	0,05
velikost těla ( $\mu\text{m}$ )	33	3,43	2	0,18

Z Tab. II je vidět, že ze sledovaných parametrů byl nalezen těsný průkazný rozdíl u počtu juvenilů ( $P < 0,05$ ).

Grafické znázornění výsledků testu pro prednisolon a jeho produkty fotochemické degradace je na Obr. 11.



**Obr. 11:** Počet juvenilů (A), počet snůšek (B) a velikost těla v  $\mu\text{m}$  (C) během vystavení hrotnatek třem odlišným typům média (kontrola, prednisolon a fotodegradační produkty) po dobu 21 dní. Vodorovná čára – medián, křížek – průměr, horní a dolní hranice boxu – horní a dolní kvartil, rozsah hodnot – minimum a maximum.

Indexy značí průkazné rozdíly mezi skupinami: zkoumaná média označená odlišnými indexy abb (Obr. 11A, B) jsou průkazně odlišná na hladině  $P < 0,05$ , u zkoumaných médií bez indexů (Obr. 11C) nebyl patrný signifikantní výsledek statistického zpracování.

Z Obr. 11 je zřejmé, že hrotnatky, které byly inkubovány v roztoku prednisolonu a směsi produktů fotodegradace prednisolonu, vykazovaly výrazně nižší počet juvenilů a nižší počet snůšek v porovnání s kontrolou. Rozdíly mezi samotným roztokem prednisolonu a jeho

fotodegradačními produkty však nelze odlišit. U velikosti těla hrotnatek nebyly mezi sledovanými zásahy patrné průkazné rozdíly.

Číselné hodnoty medián (min-max) sledovaných parametrů pro pokus s prednisolonem a produkty jeho fotochemického odbourávání jsou shrnuty v Tab. III, detailní hodnoty pro pokus s prednisolonem jsou v Příloze 2.

**Tab. III:** Hodnoty sledovaných parametrů pro test toxicity prednisolonu a produktů jeho fotodegradace: počet juvenilů a počet snůšek jako hodnoty sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu toxicity prednisolonu a jeho degradačních produktů.

Parametr před závorkou udává medián, parametry v závorce udávají minimální a maximální hodnotu.

typ média	počet juvenilů	počet snůšek	velikost těla ( $\mu\text{m}$ )
kontrola	77 (60 - 101)	6 (5 - 7)	3500 (3175 - 4000)
prednisolon	43 (30 - 61)	4 (3 - 6)	3500 (3125 - 4075)
produkty	36 (25 - 47)	4 (3 - 5)	3388 (2875 - 4000)

Z Tab. III vyplývá, že roztok prednisolonu a jeho produktů fotodegradace negativně ovlivnily počet juvenilů i počet snůšek v porovnání s kontrolou. Výrazné rozdíly u velikosti těla nejsou z tabulky zřejmé.

Porovnání sledovaných parametrů hrotnatek získané z Kruskal-Wallisova testu pro prednisolon je vidět v Tab. IV.

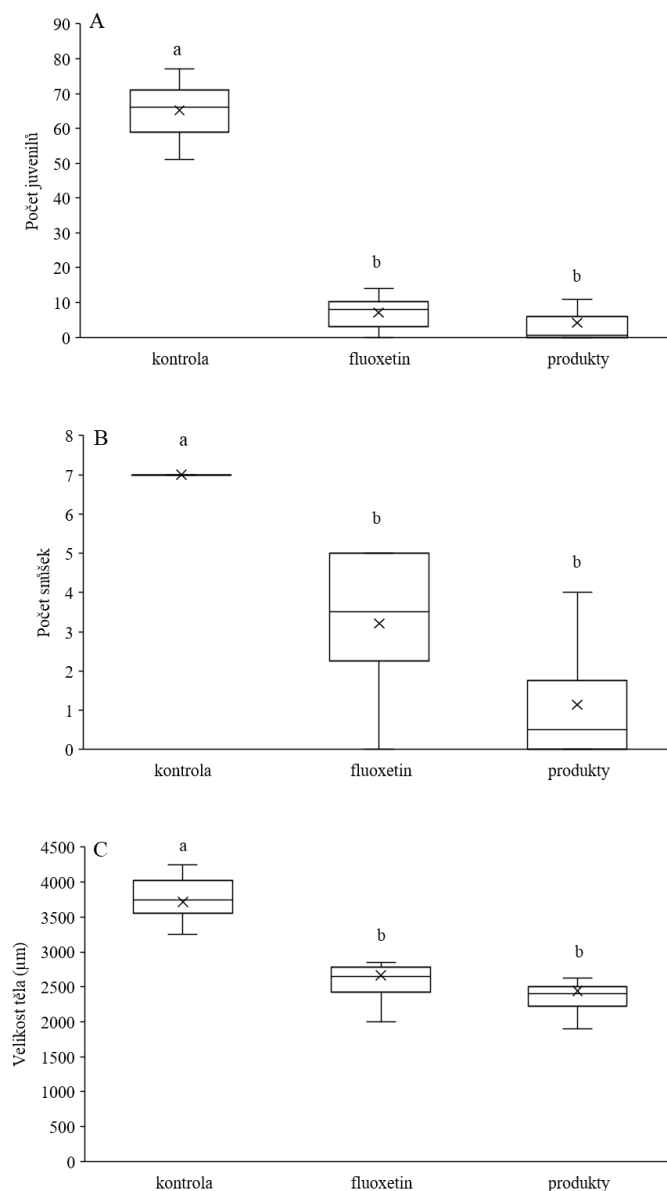
**Tab. IV:** Výsledky Kruskal-Wallisova testu porovnávajícího sledované parametry hrotnatek v kontrole, roztoku prednisolonu a produktů fotodegradace.

Význam zkratk: N – počet opakování, H – testové kritérium, d.f. – počet stupňů volnosti, P – pravděpodobnost.

parametr	N	H	d.f.	P
počet juvenilů	44	33	2	< 0,001
počet snůšek	44	27,55	2	< 0,001
velikost těla ( $\mu\text{m}$ )	44	2,37	2	0,31

Z Tab. IV je vidět, že byl zjištěn průkazný rozdíl u počtu juvenilů a počtu snůšek ( $P < 0,05$ ).

Grafické znázornění výsledků testu toxicity pro fluoxetin a jeho produkty fotochemické degradace je v Obr. 12.



**Obr. 12:** Počet juvenilů (A), počet snůšek (B) a velikost těla v  $\mu\text{m}$  (C) během vystavení hrotnatek třem odlišným typům média (kontrola, fluoxetin a fotodegradační produkty) po dobu 21 dní. Vodorovná čára – medián, křížek – průměr, horní a dolní hranice boxu – horní a dolní kvartil, rozsah hodnot – minimum a maximum.

Indexy značí průkazné rozdíly mezi skupinami: zkoumaná média označená odlišnými indexy abb (Obr. 12A, B, C) jsou průkazně odlišná na hladině  $P < 0,05$ .

Z Obr. 12 je zřejmé, že jak fluoxetin tak produkty jeho fotochemické degradace měly dramatický vliv na počet juvenilů, kdy v obou případech došlo k velmi významnému snížení. Rozdíly mezi fluoxetinem a produkty fotodegradace nejsou významné.

U počtu snůšek i u velikosti těl hrotnatek bylo zaznamenáno též výrazné snížení hodnot jak u fluoxetinu tak u produktů jeho fotodegradace, přičemž u počtu snůšek byl efekt snížení významnější u produktů fotodegradace ve srovnání s mateřskou látkou, zatímco u velikosti těla hrotnatek není signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami.

Číselné hodnoty medián (min-max) sledovaných parametrů u fluoxetinu a produktů jeho fotochemické degradace jsou shrnuty v Tab. V, detailní hodnoty pro pokus s fluoxetinem jsou v Příloze 3.

**Tab. V:** Hodnoty sledovaných parametrů pro test toxicity fluoxetinu a produktů jeho fotodegradace: počet juvenilů a počet snůšek jako hodnoty sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu toxicity fluoxetinu a jeho degradačních produktů. Parametr před závorkou udává medián, parametry v závorce udávají minimální a maximální hodnotu.

typ média	počet juvenilů	počet snůšek	velikost těla (μm)
kontrola	66 (51 - 77)	7 (7 - 7)	3750 (3250 - 4250)
fluoxetin	8 (0 - 14)	3,5 (0 - 5)	2650 (2000 - 2850)
produkty	0,5 (0 - 11)	0,5 (0 - 4)	2400 (1900 - 2625)

Z Tab. V je patrné, že všechny sledované parametry byly výrazně ovlivněny jak samotným roztokem fluoxetinu tak i produkty jeho fotochemické degradace.

Hodnoty výsledků Kruskal-Wallisova testu pro fluoxetin jsou v Tab. VI.

**Tab. VI:** Výsledky Kruskal-Wallisova testu porovnávacího sledované parametry hrotnatek v kontrole, roztoku fluoxetinu a produktů fotodegradace.

Význam zkratk: N – počet opakování, H – testové kritérium, d.f. – počet stupňů volnosti, P – pravděpodobnost.

parametr	N	H	d.f.	P
počet juvenilů	43	30,45	2	< 0,001
počet snůšek	43	33	2	< 0,001
velikost těla (μm)	43	26,12	2	< 0,001

Z Tab. VI je vidět, že byl zjištěn průkazný rozdíl u všech sledovaných parametrů (P < 0,05).

## 4 Diskuze

U všech tří studovaných léčiv docházelo k degradaci při ozáření světlem, které imitovalo krátkovlnnou část slunečního záření dopadajícího na zemský povrch, tedy 300 – 350 nm. Reakce fotochemické degradace u dexametazonu a prednisolonu byla výrazně rychlejší (rychlostní konstanty  $0,287 \text{ min}^{-1}$  a  $0,676 \text{ min}^{-1}$ , resp.) než u fluoxetinu (rychlostní konstanta  $0,030 \text{ min}^{-1}$ ). Dexametazon a prednisolon reagovaly bez přídavku jakéhokoli dalšího činidla jako např. katalyzátoru či senzitivátoru, přestože jejich absorpce v uvedené oblasti je velmi nízká.

Podobný jev je popsán v práci Klementové et al. (2017) pro případ hydrokortizonu, což je také látka ze skupiny glukokortikoidních hormonů. V uvedené práci je pozorovaná reaktivita s rychlostní konstantou degradace  $4,40 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  vysvětlována fotokatalýzou ionty kovů přítomnými ve stopovém množství, neboť v reakčních směsích byla v dané práci nalezena analýzou ICP-MS koncentrace Fe v rozmezí 2 – 4  $\mu\text{g/l}$ .

Fotodegradaci glukokortikoidních hormonů studovali např. DellaGreca et al. (2004) a Kawabata et al. (2013). DellaGreca et al. (2004) uvádí, že studovali fotodegradaci dexametazonu a prednisolonu, ale pro dexametazon nejsou v práci uvedeny žádné hodnoty pro kinetiku odbourávání, jen že k odbourávání došlo. U prednisolonu je v práci popsána jen skutečnost, že čtyřhodinová expozice vedla k produkci největšího počtu produktů reakce.

Z výsledků Kawabaty et al. (2013) je vidět, že po hodině ozařování zbyvalo u dexametazonu cca 5 % počátečního množství, pokles v průběhu této hodiny nebyl zaznamenáván, po hodině ozařování byl odebrán první vzorek. Z této práce ale také vyplývá, že rychlost úbytku, kterou měřili pomocí zdroje poskytujícího UV-B záření (tedy 280 – 315 nm) významně závisí na intenzitě použitého světla.

Skutečnost, že v obou pracích bylo odbourávání výrazně pomalejší než v našich podmínkách, lze tedy připsat tomu, že DellaGreca et al. (2004) použili sluneční simulátor a Kawabata et al. (2013) prováděli ozařování slunečním světlem, kdy v obou případech byla intenzita krátkovlnného záření nižší než při ozařování lampami použitými v této studii za použití lamp RPR 3000Å s odfiltrovaným světlem o vlnové délce kratší než 300 nm, aby byla zachována relevance k přírodnímu prostředí.

Fotodegradaci prednisolonu se zabývá také práce Cacciaro et al. (2017). V této práci ale ozařovali prednisolon světlem o vlnové délce maxima absorpce, tedy 248 nm s použitím 150 wattové xenonové lampy a monochromatického filtru pro danou vlnovou délku. Tato práce tedy nemá přímý vztah k dějům, které mohou probíhat v přírodním prostředí.

V této práci je uvedeno, že molekulární kyslík se účastní fotochemické reakce za tvorby reaktivních oxidačních částic a autoři vyslovili hypotézu, že tedy degradace probíhá jako substrátem senzitivovaná reakce (self-sensitized capacity).

Kdyby byla taková reakční cesta pozorována při ozařování delšími vlnovými délkami (nad 300 nm), bylo by možné vyslovit hypotézu, že tento mechanismus přispívá k rychlé reakci málo absorbujících kortikosteroidů. Protože ale pro uvedený mechanismus při delších vlnových délkách není žádný důkaz, je pravděpodobnější vysvětlení o stopové katalýze ionty kovů vyslovené v práci Klementové et al. (2017).

Pro fotodegradaci fluoxetinu byl v této práci nutný přídavek iontů kovů Fe (III). Úbytek fluoxetinu při fotochemické degradaci neodpovídal kinetice prvního řádu po celou dobu. Po prvních 30 minutách, kdy reakci lze popsat jako reakci 1. řádu s rychlostní konstantou  $0,03 \text{ min}^{-1}$  docházelo v dalším stádiu ke zpomalování, které mohlo být způsobeno možným inhibičním efektem některého z produktů, jejichž koncentrace se v reakční směsi zvyšovala. Lam et al. (2005) pozorovali, že fluoxetin prochází velmi pomalou přímou fotodegradací v deionizované vodě s poločasem  $55,2 \pm 3,6 \text{ h}^{-1}$ . Kwon a Armbrust (2006) ve svých experimentech ukázali, že rychlost degradace se zvýší přidáním syntetických huminových kyselin, tento účinek přičetli tvorbě reaktivních oxidačních částic, které ozářením huminových látek vznikají. Tato zvýšená rychlost fotodegradace však nebyla pozorována u fluoxetinu ve vzorcích přírodních jezerních vod ve srovnání s pufovanými laboratorními roztoky obsahujícími huminový materiál, přestože koncentrace organického dusíku byly velmi podobné (3,15 mg/l v syntetické vodě a 4,60 mg/l v přírodních jezerních vodách). Autoři vyslovili několik možných hypotéz k vysvětlení výsledku a to, že v přírodní jezerní vodě mohly působit zhašecí efekty v přírodních organických látkách, nebo že mohlo docházet k většímu zeslabení světla absorbujícími látkami než u vody se syntetickou huminovou látkou, případně že v každém typu přírodních rozpustěných organických látek mohou být přítomné jiné funkční skupiny, které mohou mít vliv na senzitivizační efekt těchto organických látek.

Fotochemické chování mnoha léčiv a potenciální ekotoxicita jejich fotoproduktů jsou do značné míry neznámé, proto se jeví užitečné se soustředit v testech toxicity vybraných léčiv nejen na samotnou mateřskou látku, ale též na produkty fotochemické degradace těchto farmak prováděné za podmínek relevantních přírodním vodním systémům.



Výsledky chronického testu toxicity dexametazonu a jeho fotodegradačních produktů na hrotnatce *Daphnia magna* prezentované v této práci nebyly výrazně statisticky průkazné. U počtu juvenilů byl určitý rozdíl mezi dexametazonem a kontrolou ( $P = 0,04$ ), ale rozdíly mezi všemi skupinami nebylo možné sledovat signifikantními a prokazatelnými ( $P = 0,052$ ). Nicméně z grafů na obrázku 10 lze vidět určitý efekt na počet juvenilů a počet snůšek. U tohoto testu z neznámých důvodů došlo k náhodně rozloženému úmrtí části pokusných jedinců, proto by pro posouzení toxicity tohoto léčiva bylo potřeba celý test opakovat. V důsledku zmíněného úhynu samic během testu byla provedena statistická analýza přežívání pomocí Kaplan-Meierovy metody (sledování délky časového intervalu od určitého počátku expozice stresovému faktoru do výskytu očekávané události, např. vznik onemocnění, relaps, úmrtí). Analýza přežívání však nevyšla průkazně, proto nelze říct, že hrotnatky umíraly různě v různých prostředích, tj. kontrole, dexametazonu a směsi produktů fotodegradace. Pokus by nicméně z důvodu tohoto úhynu většího počtu jedinců bylo nutné pro účely publikace zopakovat.

Hrotnatky, které byly inkubovány v roztoku prednisolonu a ve směsi produktů jeho fotodegradace, vykazovaly výrazně nižší počet juvenilů a nižší počet snůšek v porovnání s kontrolní skupinou. Rozdíly toxicity mezi samotným prednisolonem a jeho fotodegradačními produkty však nelze statisticky průkazně odlišit.

Tyto výsledky jsou ve shodě s prací Della Greco et al. (2004), kteří pozorovali toxický efekt prednisolonu i produktů jeho fotochemické degradace na *Ceriodaphnia dubia*. V jejich práci byl ovšem test prováděn pouze 7 dní, hrotnatky byly vystaveny několik různým koncentracím léčiva a jeho jednotlivým produktům (extrakcí a tenkovrstvou chromatografií izolovaných) a stanovována byla  $LC_{50}^5$  a  $EC_{50}$ . Produkty fotodegradace byly testovány jednotlivě v koncentracích srovnatelných s koncentrací mateřské látky, za těchto podmínek vykazovaly o řád větší toxicitu. Nicméně pro přírodní prostředí má taková studie omezený význam, protože se nedá očekávat, že by se produkty degradace, kterých vzniká v případě prednisolonu několik, vyskytovaly v koncentracích stejných jako koncentrace mateřské látky.

V případě provedeného testu toxicity fluoxetinu a jeho degradačních produktů bylo prokázáno, že samotný fluoxetin i reakční směs obsahující produkty fotokatalyzované

---

<sup>5</sup> Střední smrtelná (letální) koncentrace

degradace mají výrazně negativní vliv jak na reprodukční schopnost (počet juvenilů, počet snůšek) tak i na růst (velikost těla) hrotnatek ve srovnání s kontrolou.

U dvou sledovaných parametrů (počet juvenilů a velikost těla v  $\mu\text{m}$ ) byla toxicita roztoku před ozáření podobná toxicitě reakční směsi po ozáření, což může pravděpodobně znamenat, že se jedná o vliv mateřské látky, protože směs po ozáření bylo pro pokus s toxicitou dávkováno tolikrát víc, kolikrát se snížilo množství výchozí mateřské látky, tudíž její koncentrace byly v obou případech stejné. U počtu snůšek měla reakční směs po ozáření výrazně větší toxické účinky, proto je zde možné vyslovit hypotézu o vyšším toxickém efektu některého ze vznikajících produktů. Podobný výsledek s jiným léčivem, verapamilem, byl popsán v práci Dokoupilové (2018), kde byl také zjištěn výrazný toxický účinek produktů fotochemické degradace antiarytmika verapamilu při obdobném 21denním testu chronické toxicity provedeném na hrotnatce *Daphnia magna*.

Významný vliv fluoxetinu na snížení reprodukce pozorovali Péry et al. (2008) u dvou vodních bezobratlých organismů (perloočka *Daphnia magna*, plž *Potamopyrgus antipodarum*) a to dokonce v koncentracích o tři řády nižších ( $10 \mu\text{g/l}$ ), než byly koncentrace v této práci. U koryše *Hyaella azteca* v téže studii nebyl zjištěn žádný účinek na reprodukci během 28 dní, ale byl pozorován významný vliv na velikost těla u koncentrace  $33 \mu\text{g/l}$  při expozici fluoxetinu trvající 7 dnů. Reprodukční pokles u koryšů *Ceriodaphnia dubia* byl sledován také ve studii Henryho et al. (2004) při expozici fluoxetinu v koncentraci  $89 \mu\text{g/l}$  po dobu 7 dnů.

## 5 Závěr

Všechna tři studovaná léčiva podléhají fotochemickým přeměnám za podmínek relevantních přírodním vodním systémům.

Hodnoty rychlostních konstant činí pro dexametazon  $0,287 \text{ min}^{-1}$ , pro prednisolon  $0,676 \text{ min}^{-1}$ , pro fluoxetin (v prvních třiceti minutách ozařování)  $0,030 \text{ min}^{-1}$ .

Fotodegradace dexametazonu a prednisolonu je s vysokou pravděpodobností katalyzována stopovými množstvími iontů kovů, fluoxetin reaguje až v přítomnosti relativně vysokých koncentrací přidaných železitých iontů.

U všech studovaných léčiv byly prokázány výrazné negativní účinky na hrotnatky.

Dexametazon, prednisolon i fluoxetin negativně ovlivnily počet juvenilů a počet snůšek, na velikost těla měly vliv dexametazon a fluoxetin.

Produkty fotochemické degradace všech tří látek vykazovaly stejné negativní efekty na hrotnatky jako mateřské látky, u produktů fotodegradace fluoxetinu byl dokonce vliv na počet snůšek výrazně větší než vliv samotného fluoxetinu. V případě dexametazonu a prednisolonu byl vliv směsi produktů degradace srovnatelný s vlivem mateřské látky, projevil se tedy pravděpodobně jen vliv zbytkové mateřské látky ve směsi.

## 6 Seznam použité literatury

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environment International*, 99, 107-119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412016304494>
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., & Scholze, M. (2013). Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(8), 1685-1687. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.2294>
- Amy-Sagers, C., Reinhardt, K., & Larson, D. M. (2017). Ecotoxicological assessments show sucralose and fluoxetine affect the aquatic plant, *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, 185, 76-85. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X17300164>
- Anděl, P. (2011). *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, ISBN 978-80-903787-9-7. [http://www.evernia.cz/publikace/Ekotoxikologie\\_bioindikace\\_a\\_biomonitoring.pdf](http://www.evernia.cz/publikace/Ekotoxikologie_bioindikace_a_biomonitoring.pdf)
- Backhaus, T. (2014). Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130585. <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2013.0585>
- Bal, N., Kumar, A., Du, J., & Nugegoda, D. (2016). Prednisolone impairs embryonic and posthatching development and shell formation of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(9), 2339-2348. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3401>
- Bal, N., Kumar, A., Du, J., & Nugegoda, D. (2017a). Multigenerational effects of two glucocorticoids (prednisolone and dexamethasone) on life-history parameters of crustacean *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera). *Environmental Pollution*, 225, 569-578. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116316189>
- Bal, N., Kumar, A., & Nugegoda, D. (2017b). Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Journal of hazardous materials*, 339, 281-291.
- Bondarenko, O. M., Heinlaan, M., Sihtmäe, M., Ivask, A., Kurvet, I., Joonas, E., ... & Singh, S. (2016). Multilaboratory evaluation of 15 bioassays for (eco) toxicity screening and hazard ranking of engineered nanomaterials: FP7 project NANOVALID. *Nanotoxicology*, 10(9), 1229-1242.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2016.1196251>

Brady, C. J., Villanti, A. C., Law, H. A., Rahimy, E., Reddy, R., Sieving, P. C., ... & Tang, J. (2016). Corticosteroid implants for chronic non-infectious uveitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).

<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD010469.pub2/abstract>

Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., ... & La Point, T. W. (2003a). Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology letters*, 142(3), 169-183.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427403000663>

Brooks, B. W., Turner, P. K., Stanley, J. K., Weston, J. J., Glidewell, E. A., Foran, C. M., ... & Huggett, D. B. (2003b). Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere*, 52(1), 135-142.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503001036>

Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., & Lewis, R. J. (2005). Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 464-469. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/04-081R.1>

Brunswick, D. J., Amsterdam, J. D., Fawcett, J., Quitkin, F. M., Reimherr, F. W., Rosenbaum, J. F., & Beasley Jr, C. M. (2002). Fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during relapse-prevention treatment. *Journal of affective disorders*, 68(2-3), 243-249.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165032700003335>

Burke, W. J., Hendricks, S. E., McArthur-Miller, D., Jacques, D., Bessette, D., McKillip, T., ... & Wilson, J. (2000). Weekly dosing of fluoxetine for the continuation phase of treatment of major depression: results of a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of clinical psychopharmacology*, 20(4), 423-427

[https://journals.lww.com/psychopharmacology/Abstract/2000/08000/Weekly\\_Dosing\\_of\\_Fluoxetine\\_for\\_the\\_Continuation.6.aspx](https://journals.lww.com/psychopharmacology/Abstract/2000/08000/Weekly_Dosing_of_Fluoxetine_for_the_Continuation.6.aspx)

Cacciari, R. D., Reynoso, E., Montejano, H. A., & Biasutti, M. A. (2017). Photodegradation of prednisolone under UVB solar irradiation. Role of photogenerated ROS in the degradation mechanism. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(11), 1717-1726.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/pp/c7pp00200a/unauth#!divAbstract>

- Calza, P., Pelizzetti, E., Brussino, M., & Baiocchi, C. (2001). Ion trap tandem mass spectrometry study of dexamethasone transformation products on light activated TiO<sub>2</sub> surface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(12), 1286-1295. [https://link.springer.com/article/10.1016/S1044-0305\(01\)00319-1](https://link.springer.com/article/10.1016/S1044-0305(01)00319-1)
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504009993>
- Ciriaco, M., Ventrice, P., Russo, G., Scicchitano, M., Mazzitello, G., Scicchitano, F., & Russo, E. (2013). Corticosteroid-related central nervous system side effects. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(Suppl1), S94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853679/>
- Conley, J. M., Symes, S. J., Schorr, M. S., & Richards, S. M. (2008). Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere*, 73(8), 1178-1187. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508009843>
- Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 287-304. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408440903373590>
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F. M., & Häussler, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clinical pharmacokinetics*, 44(1), 6198. <https://link.springer.com/article/10.2165/00003088-200544010-00003>
- Daughton, C. G. (2016). Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of the Total Environment*, 562, 391-426. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716305320>
- De Farias, N. O., Oliveira, R., Sousa-Moura, D., de Oliveira, R. C. S., Rodrigues, M. A. C., Andrade, T. S., ... & Grisolia, C. K. (2019). Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 215, 1-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045618301297>
- De Vrieze, E., Van Kessel, M. A. H. J., Peters, H. M., Spanings, F. A. T., Flik, G., & Metz, J. R. (2014). Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating

- zebrafish scales. *Osteoporosis International*, 25(2), 567-578.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00198-013-2441-3>
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtera, L., Rubino, M., & Temussi, F. (2004). Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 54(5), 629-637.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503008774>
- Denslow, N. D., Colbourne, J. K., Dix, D., Freedman, J. H., Helbing, C. C., Kennedy, S., & Williams, P. L. (2007). Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics. *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology*, 33-75. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495904001952>
- Díez, A. M., Ribeiro, A. S., Sanromán, M. A., & Pazos, M. (2018). Optimization of photo-Fenton process for the treatment of prednisolone. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 27768-27782. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-1782-z>
- Dokoupilová E., 2018: Toxicita vybraných antiarytmik (verapamilu a diltiazemu) pro vodní organismy (*Daphnia magna*) [Toxicity of selected antiarrhythmics (verapamil and diltiazem) to aquatic organisms (*Daphnia magna*). Bc. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Dominguez, G. A., Lohse, S. E., Torelli, M. D., Murphy, C. J., Hamers, R. J., Orr, G., & Klaper, R. D. (2015). Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 162, 1-9.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X15000661>
- Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 5-18. [https://edoc.unibas.ch/13505/1/Ebert-Parasitism in Daphnia-2005-A4-print.pdf](https://edoc.unibas.ch/13505/1/Ebert-Parasitism%20in%20Daphnia-2005-A4-print.pdf)
- Evgenidou, E. N., Konstantinou, I. K., & Lambropoulou, D. A. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Science of the Total Environment*, 505, 905-926.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714014594>
- Fabbri, C., Porcelli, S., & Serretti, A. (2014). From pharmacogenetics to pharmacogenomics: the way toward the personalization of antidepressant treatment. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 59(2), 62-75.

- <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/070674371405900202>
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I., & Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85(5), 693-709.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653511007405>
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122-159.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05003267>
- Flaherty, C. M., & Dodson, S. I. (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61(2), 200-207.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350500295X>
- Foran, C. M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B. W., & Huggett, D. B. (2004). Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 46(4), 511-517. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-003-3042-5>
- Forró, L., Korovchinsky, N. M., Kotov, A. A., & Petrusek, A. (2007). Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. In *Freshwater animal diversity assessment* (pp. 177-184). Springer, Dordrecht.
- [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8259-7\\_19](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8259-7_19)
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2013). The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 140, 249-256.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X13001483>
- Furlong, E. T., Kinney, C. A., Ferrer, I., Werner, S. L., Cahill, J. D., & Ratterman, G. (2004). Pharmaceuticals and Personal Care Products in Solids: Analysis and Field Results for Sediment, Soil, and Biosolid Samples.(4517).
- [https://download.clib.psu.ac.th/datawebclib/e\\_resource/e\\_database/agronomy/2004/Browse/pdf/ACS/4517.pdf](https://download.clib.psu.ac.th/datawebclib/e_resource/e_database/agronomy/2004/Browse/pdf/ACS/4517.pdf)
- Gilbert, N. (2011). Drug waste harms fish. *Nature*, 476(7360), 265.
- <https://www.dhushara.com/Biocrisis/11/oct/drugWaste.pdf>
- Glover, C. N., & Wood, C. M. (2005). Physiological characterisation of a pH-and calcium-dependent sodium uptake mechanism in the freshwater crustacean, *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, 208(5), 951-959.



- <https://jeb.biologists.org/content/208/5/951.short>
- Godoy, A. A., Kummrow, F., & Pamplin, P. A. Z. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment-A review. *Chemosphere*, 138, 281-291.
- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>
- Gomes, A. R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Pereira, R. (2017). Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(10), 992-1007.
- <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529.2017.1328946>
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2010). Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(5), 622-632.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967309017774>
- Guiloski, I. C., Ribas, J. L. C., da Silva Pereira, L., Neves, A. P. P., & de Assis, H. C. S. (2015). Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114, 204-211.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651314005326>
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., & Larsson, D. J. (2008). Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental science & technology*, 42(15), 5807-5813.
- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es8005173>
- Hall, S. R., Tessier, A. J., Duffy, M. A., Huebner, M., & Cáceres, C. E. (2006). Warmer does not have to mean sicker: temperature and predators can jointly drive timing of epidemics. *Ecology*, 87(7), 1684-1695.
- [https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1684:WDNHTM\]2.0.CO;2](https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658(2006)87[1684:WDNHTM]2.0.CO;2)
- Harousseau, J. L., Attal, M., Leleu, X., Troncy, J., Pegourie, B., Stoppa, A. M., ... & Moreau, P. (2006). Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *haematologica*, 91(11), 1498-1505.
- <http://www.haematologica.org/content/91/11/1498.short>
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131(1-2), 5-17.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427402000413>
- Hemeryck, A., & Belpaire, F. M. (2002). Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions: an update. *Current drug metabolism*, 3(1), 13-37.
- <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2002/00000003/00000001/art00002>
- Henry, T. B., Kwon, J. W., Armbrust, K. L., & Black, M. C. (2004). Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(9), 2229-2233.
- <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/03-278>
- Henry, M. E., Schmidt, M. E., Hennen, J., Villafuerte, R. A., Butman, M. L., Tran, P., ... & Renshaw, P. F. (2005). A comparison of brain and serum pharmacokinetics of R-fluoxetine and racemic fluoxetine: a 19-F MRS study. *Neuropsychopharmacology*, 30(8), 1576-1583. <https://www.nature.com/articles/1300749>
- Herretes, S., Wang, X., & Reyes, J. M. (2014). Topical corticosteroids as adjunctive therapy for bacterial keratitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
- <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005430.pub3/abstract>
- Hiemke, C., & Härtter, S. (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*, 85(1), 11-28.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725899000480>
- Holte, K., & Kehlet, H. (2002). Perioperative single-dose glucocorticoid administration: pathophysiologic effects and clinical implications. *Journal of the American College of Surgeons*, 195(5), 694-712. [https://www.journalacs.org/article/S1072-7515\(02\)01491-6/abstract](https://www.journalacs.org/article/S1072-7515(02)01491-6/abstract)
- Chang, H., Hu, J., & Shao, B. (2007). Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. *Environmental science & technology*, 41(10), 3462-3468. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es062746o>
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do>
- Chen, T. S., Chen, T. C., Yeh, K. J. C., Chao, H. R., Liaw, E. T., Hsieh, C. Y., ... & Yeh, Y. L. (2010). High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot. *Science of the total environment*, 408(16), 3223-3230.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710003578>
- Chu, S., & Metcalfe, C. D. (2007). Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of*

- Chromatography A, 1163(1-2), 112-118.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967307010308>
- Iampolskiĭ, L. I., & Galimov, I. (2005). Evolutionary genetics of aging in *Daphnia*. *Zhurnal obshchei biologii*, 66(5), 416-424. <https://europepmc.org/article/med/16245571>
- Ignace, D. D., Dodson, S. I., & Kashian, D. R. (2011). Identification of the critical timing of sex determination in *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) for use in toxicological studies. *Hydrobiologia*, 668(1), 117-123.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-010-0534-y>
- Italian Group for Antiemetic Research. (2000). Dexamethasone alone or in combination with ondansetron for the prevention of delayed nausea and vomiting induced by chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 342(21), 1554-1559.  
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200005253422102>
- Jensen, K. H., Little, T., Skorping, A., & Ebert, D. (2006). Empirical support for optimal virulence in a castrating parasite. *PLoS biology*, 4(7).  
<https://journals.plos.org/plosbiology/article/file?type=printable&id=10.1371/journal.pbio.0040197>
- Johnson, A. C., & Sumpter, J. P. (2014). Putting pharmaceuticals into the wider context of challenges to fish populations in rivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130581.  
<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2013.0581>
- Jones, O. A., Lester, J. N., & Voulvoulis, N. (2005). Pharmaceuticals: a threat to drinking water?. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 163-167.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779905000478>
- Kawabata, K., Sugihara, K., Sanoh, S., Kitamura, S., & Ohta, S. (2013). Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A,-B and-C irradiation. *The Journal of toxicological sciences*, 38(2), 215-223.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/2/38\\_215/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/2/38_215/article/-char/ja/)
- Khan, M. O. F., Park, K. K., & Lee, H. J. (2005). Antedugs: an approach to safer drugs. *Current medicinal chemistry*, 12(19), 2227-2239.  
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2005/00000012/00000019/art00004>
- Kim, C. H., Chen, M. F., & Coleman, A. L. (2017). Adjunctive steroid therapy versus antibiotics alone for acute endophthalmitis after intraocular procedure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).  
<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD012131.pub2/abstract>

- Klauson, D., Pilnik-Sudareva, J., Pronina, N., Budarnaja, O., Krichevskaya, M., Käkinen, A., ... & Preis, S. (2013). Aqueous photocatalytic oxidation of prednisolone. *Open Chemistry*, 11(10), 1620-1633. <https://www.degruyter.com/view/j/chem.2013.11.issue-10/s11532-013-0290-8/s11532-013-0290-8.xml>
- Klementova, S., Kahoun, D., Doubkova, L., Frejlichova, K., Dusakova, M., & Zlamal, M. (2017). Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(1), 67-71. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/pp/c6pp00164e>
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, 36(6), 1202-1211. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es011055j>
- Kreke, N., & Dietrich, D. R. (2008). Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Critical reviews in toxicology*, 38(3), 215-247. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408440801891057>
- Kugathas, S., & Sumpter, J. P. (2011). Synthetic glucocorticoids in the environment: first results on their potential impacts on fish. *Environmental science & technology*, 45(6), 2377-2383. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es104105e>
- Kwon, J. W., & Armbrust, K. L. (2006). Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(10), 2561-2568. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/05-613R.1>
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2008). Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(14), 5325-5333. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac800162q>
- LaLone, C. A., Villeneuve, D. L., Olmstead, A. W., Medlock, E. K., Kahl, M. D., Jensen, K. M., ... & Thomas, L. M. (2012). Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(3), 611-622. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.1729>
- Lam, M. W., Young, C. J., & Mabury, S. A. (2005). Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. *Environmental science & technology*, 39(2),

- 513-522. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0494757>
- Lampert, W. (2006). Daphnia: model herbivore, predator and prey. Polish journal of ecology, 54(4), 607-620. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-article-BGPK-1546-5938>
- Latifi, T., Forsatkar, M. N., & Nematollahi, M. A. (2015). Reproduction and behavioral responses of convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata* to fluoxetine. J. Fish. Aquat. Sci, 10, 111-120. <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=jfas.2015.111.120>
- Lee, S. H. (2015). Mechanisms of glucocorticoid action in chronic rhinosinusitis. Allergy, asthma & immunology research, 7(6), 534-537. <https://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.4168/aaair.2015.7.6.534&code=0166AAIR&vmode=FULL>
- Lin, A. Y. C., Yu, T. H., & Lateef, S. K. (2009). Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. Journal of hazardous materials, 167(1-3), 1163-1169. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389409001538>
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. F. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. Current Biology, 13(6), 489-492. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982203001635>
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (2007). Barevný atlas farmakologie. Vyd. 3., české. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-1672-5.
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Wehling, M. (2004). Farmakologie a toxikologie. Vyd. 2. české. Praha: Grada, ISBN 80-247-0836-1.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., ... & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Science of the total environment, 473, 619-641. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713015465>
- Macías-García, A., García-Sanz-Calcedo, J., Carrasco-Amador, J. P., & Segura-Cruz, R. (2019). Adsorption of paracetamol in hospital wastewater through activated carbon filters. Sustainability, 11(9), 2672. <https://www.mdpi.com/2071-1050/11/9/2672>
- Margolis, J. M., O'Donnell, J. P., Mankowski, D. C., Ekins, S., & Obach, R. S. (2000). (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. Drug metabolism and disposition, 28(10), 1187-1191. <http://dmd.aspetjournals.org/content/28/10/1187.short>
- Matabosch, X., Pozo, O. J., Pérez-Mañá, C., Papaseit, E., Segura, J., & Ventura, R. (2015). Detection and characterization of prednisolone metabolites in human urine by

- LC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(3), 633-642.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jms.3571>
- McNeil, P. L., Nebot, C., Cepeda, A., & Sloman, K. A. (2016a). Environmental concentrations of prednisolone alter visually mediated responses during early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental pollution*, 218, 981-987.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116309150>
- McNeil, P. L., Nebot, C., & Sloman, K. A. (2016b). Physiological and behavioral effects of exposure to environmentally relevant concentrations of prednisolone during zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Environmental science & technology*, 50(10), 5294-5304.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b00276>
- Melvin, S. D. (2017). Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests. *Aquatic toxicology*, 182, 20-30. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X16303277>
- Metcalf, C. D., Miao, X. S., Koenig, B. G., & Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental toxicology and chemistry: An international journal*, 22(12), 2881-2889. <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/02-627>
- Miao, H. F., Cao, M., Xu, D. Y., Ren, H. Y., Zhao, M. X., Huang, Z. X., & Ruan, W. Q. (2015). Degradation of phenazone in aqueous solution with ozone: influencing factors and degradation pathways. *Chemosphere*, 119, 326-333.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514008297>
- Mompelat, S., Le Bot, B., & Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, 35(5), 803-814. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008002225>
- Neale, P. A., Leusch, F. D., & Escher, B. I. (2017). Applying mixture toxicity modelling to predict bacterial bioluminescence inhibition by non-specifically acting pharmaceuticals and specifically acting antibiotics. *Chemosphere*, 173, 387-394.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517300206>
- Negreira, N., Regueiro, J., de Alda, M. L., & Barceló, D. (2015). Degradation of the anticancer drug erlotinib during water chlorination: Non-targeted approach for the identification of transformation products. *Water research*, 85, 103-113.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135415301561>
- Nie, M., Yang, Y., Liu, M., Yan, C., Shi, H., Dong, W., & Zhou, J. L. (2014). Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal

- contribution and risk assessment. *Science of the total environment*, 487, 785-791.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713014642>
- OECD. (2004). OECD guidelines for the testing of Chemicals. *Test*, (October), 1–21.  
<https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>
- Ofoegbu, P. U., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2019a). Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea*. *Chemosphere*, 217, 542-549.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518320691>
- Ofoegbu, P. U., Campos, D., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2019b). Combined effects of NaCl and fluoxetine on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes: Dugesiiidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(11), 11326-11335. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-04532-4>
- Overturf, M. D., Overturf, C. L., Baxter, D., Hala, D. N., Constantine, L., Venables, B., & Huggett, D. B. (2012). Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62(3), 455-464. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-011-9723-6>
- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., ... & Schoenfuss, H. L. (2009). Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2677-2684.  
<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1897/08-556.1>
- Parezanović, G. Š., Lalic-Popovic, M., Golocorbin-Kon, S., Vasovic, V., Milijašević, B., Al-Salami, H., & Mikov, M. (2019). Environmental Transformation of Pharmaceutical Formulations: A Scientific Review. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(2), 155-161. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-019-00630-z>
- Pereira, A. M., Silva, L. J., Laranjeiro, C. S., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2017). Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Science of the Total Environment*, 609, 1182-1191.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717319022>
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2014). Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert opinion on drug discovery*, 9(5), 567-578.

- <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17460441.2014.907790>
- Péry, A. R. R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., ... & Garric, J. (2008). Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73(3), 300-304. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508008126>
- Pifferi, G., & Restani, P. (2003). The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco*, 58(8), 541-550. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X0300079X>
- Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2009). SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Current opinion in pharmacology*, 9(1), 24-30. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489208002038>
- Pollard, H. G., Colbourne, J. K., & Keller, W. B. (2003). Reconstruction of centuries-old *Daphnia* communities in a lake recovering from acidification and metal contamination. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(3), 214-218. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-32.3.214>
- PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone#section=Names-and-Identifiers>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prednisolone#section=Names-and-Identifiers>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluoxetine#section=Names-and-Identifiers>
- Shaw, J. R., Pfrender, M. E., Eads, B. D., Klaper, R., Callaghan, A., Sibly, R. M., ... & Colbourne, J. K. (2008). *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*, 2, 165-328. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872242308000057>
- Shiga, Y., Sagawa, K., Takai, R., Sakaguchi, H., Yamagata, H., & Hayashi, S. (2006). Transcriptional readthrough of Hox genes *Ubx* and *Antp* and their divergent post-transcriptional control during crustacean evolution. *Evolution & development*, 8(5), 407-414. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1525-142X.2006.00114.x>
- Schriks, M., van Leerdam, J. A., van der Linden, S. C., van der Burg, B., van Wezel, A. P., & de Voogt, P. (2010). High-resolution mass spectrometric identification and quantification of glucocorticoid compounds in various wastewaters in the Netherlands. *Environmental science & technology*, 44(12), 4766-4774. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es100013x>
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L.



- B., ... & Vajda, A. M. (2010). Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental science & technology*, 44(6), 1918-1925.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9022706>
- Silva, L. J., Lino, C. M., Meisel, L. M., & Pena, A. (2012). Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: an ecopharmacovigilance approach. *Science of the total environment*, 437, 185-195.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712010923>
- Silva, A., Santos, L. H., Delerue-Matos, C., & Figueiredo, S. A. (2014). Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*. *Environmental technology*, 35(24), 3124-3129.  
<https://iahr.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2014.932438>
- Silva, L. J., Pereira, A. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2015). Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environmental Pollution*, 197, 127-143.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749114004990>
- Siehoff, S., HAMMERS-WIRTZ, M. O. N. I. K. A., Strauss, T., & Ratte, H. T. (2009). Periphyton as alternative food source for the filter-feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshwater biology*, 54(1), 15-23.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2427.2008.02087.x>
- Spoorenberg, S. M., Deneer, V. H., Grutters, J. C., Pulles, A. E., Voorn, G. P., Rijkers, G. T., ... & van de Garde, E. M. (2014). Pharmacokinetics of oral vs. intravenous dexamethasone in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *British journal of clinical pharmacology*, 78(1), 78-83.  
<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcp.12295>
- Stanley, J. K., Ramirez, A. J., Chambliss, C. K., & Brooks, B. W. (2007). Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere*, 69(1), 9-16.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507006066>
- Stewart, A. M., Grossman, L., Nguyen, M., Maximino, C., Rosemberg, D. B., Echevarria, D. J., & Kalueff, A. V. (2014). Aquatic toxicology of fluoxetine: understanding the knowns and the unknowns. *Aquatic toxicology*, 156, 269-273.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X14002793>
- Subedi, B., Balakrishna, K., Sinha, R. K., Yamashita, N., Balasubramanian, V. G., &

- Kannan, K. (2015). Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants in India. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(4), 2882-2891. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343715002626>
- Tessier, A. J., Leibold, M. A., & Tsao, J. (2000). A fundamental trade-off in resource exploitation by *Daphnia* and consequences to plankton communities. *Ecology*, 81(3), 826-841. [https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[0826:AFTOIR\]2.0.CO;2](https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658(2000)081[0826:AFTOIR]2.0.CO;2)
- TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13. <http://statistica.io>.
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., & Buelna, G. (2017). Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource technology*, 224, 1-12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416315577>
- Tixier, N., Guibaud, G., & Baudu, M. (2003). Effect of pH and ionic environment changes on interparticle interactions affecting activated sludge flocs: a rheological approach. *Environmental technology*, 24(8), 971-978. <https://iahr.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330309385635>
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F., Agüera, A., Sirtori, C., & Fernández-Alba, A. R. (2009). Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere*, 77(10), 1292-1298. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509011679>
- Ulm, L., Krivohlavek, A., Jurašin, D., Ljubojević, M., Šinko, G., Crnković, T., ... & Vrček, I. V. (2015). Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19990-19999. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-5201-4>
- Valeur, K. S., Hertel, S. A., Lundstrøm, K. E., & Holst, H. (2018). The cumulative daily tolerance levels of potentially toxic excipients ethanol and propylene glycol are commonly exceeded in neonates and infants. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 122(5), 523-530. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12950>
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P. J., Kallenborn, R., & Jensen, E. (2006). Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *Journal of Chromatography A*, 1115(1-2), 187-195.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X09002268>
- Vethe, N. T., Midtvedt, K., Asberg, A., Amundsen, R., & Bergan, S. (2011). Drug interactions and immunosuppression in organ transplant recipients. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 131(20), 2000-2003. <https://europepmc.org/article/med/22016125>
- Villegas-Navarro, A., Rosas-L, E., & Reyes, J. L. (2003). The heart of *Daphnia magna*: Effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 136(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00172-8)
- Vizoso, D., (2013), *Daphnia Magna Life Cycle*. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DaphniaMagna\\_LifeCycle\\_DVizoso.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DaphniaMagna_LifeCycle_DVizoso.svg)
- Williams, K., Brignell, A., Randall, M., Silove, N., & Hazell, P. (2013). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8). <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004677.pub3/abstract>
- Wilkinson, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J. (2017). Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*, 231, 954-970. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116327257>
- Winder, V. L., Pennington, P. L., Hurd, M. W., & Wirth, E. F. (2012). Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(1), 51-58. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2012.607767>
- Yang, Y. Y., Zhao, J. L., Liu, Y. S., Liu, W. R., Zhang, Q. Q., Yao, L., ... & Ying, G. G. (2018). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) in surface and ground waters and their application as indication of wastewater contamination. *Science of the Total Environment*, 616, 816-823. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717329595>
- Yasir, M., & Sonthalia, S. (2019). Corticosteroid Adverse Effects. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>
- Zeng, Y., & Ren, Z. (2012). The effects of residual chlorine on the behavioural responses of *Daphnia magna* in the early warning of drinking water accidental events. *Procedia Environmental Sciences*, 13, 71-79. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029612000072>

## 7 Přílohy

**Příloha 1:** Hodnoty měřených parametrů sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu chronické toxicity dexametazonu a jeho fotodegradačních produktů.

<b>zásah</b>	<b>celkem juvenilů</b>	<b>počet snůšek</b>	<b>velikost na konci pokusu (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
kontrola	60	4	4550
kontrola	39	4	4125
kontrola	49	4	4250
kontrola	74	6	4025
kontrola	38	4	4875
kontrola	45	4	4400
kontrola	32	3	4375
kontrola	58	4	4325
kontrola	47	5	4200
kontrola	33	3	4425
kontrola	72	4	4250
kontrola	55	5	4325
kontrola	12	2	4050
kontrola	50	5	4600
dexametazon	83	4	4900
dexametazon	12	3	3150
dexametazon	43	4	4125
dexametazon	19	3	2575
dexametazon	9	3	neměřeno
dexametazon	12	2	3000
dexametazon	14	3	4450
dexametazon	19	3	2900
dexametazon	13	3	2500
dexametazon	3	1	4200
dexametazon	51	6	4075
dexametazon	0	0	3100
dexametazon	20	4	neměřeno
dexametazon	61	3	4375
produkty	18	4	4000
produkty	37	3	4375
produkty	48	4	4550
produkty	0	0	neměřeno
produkty	49	5	4675
produkty	55	4	4450
produkty	3	1	4000
produkty	3	2	4275
produkty	47	4	4200
produkty	42	4	4350

**Příloha 2:** Hodnoty měřených parametrů sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu chronické toxicity prednisolonu a jeho fotodegradačních produktů.

<b>zásah</b>	<b>celkem juvenilů</b>	<b>počet snůšek</b>	<b>velikost na konci pokusu (μm)</b>
kontrola	68	5	3175
kontrola	87	6	3375
kontrola	75	7	3425
kontrola	88	6	3825
kontrola	83	6	3675
kontrola	60	5	3300
kontrola	96	7	3775
kontrola	88	7	3250
kontrola	66	5	3400
kontrola	76	6	3175
kontrola	101	7	3725
kontrola	76	6	4000
kontrola	77	6	3575
kontrola	77	6	3750
kontrola	87	7	3500
prednisolon	43	4	3400
prednisolon	51	4	3750
prednisolon	40	4	3475
prednisolon	39	4	3425
prednisolon	30	3	3500
prednisolon	43	5	3125
prednisolon	49	4	3900
prednisolon	58	6	3875
prednisolon	61	5	4075
prednisolon	40	4	3550
prednisolon	33	3	3250
prednisolon	51	5	3250
prednisolon	53	5	3675
prednisolon	51	5	3725
prednisolon	40	5	3300
produkty	38	3	3250
produkty	47	4	3750
produkty	45	4	4000
produkty	35	4	3350
produkty	32	4	3200
produkty	37	4	3625
produkty	31	3	3450
produkty	37	4	3300
produkty	29	3	3425
produkty	37	5	3125
produkty	34	3	3175
produkty	40	5	3500
produkty	29	4	3500
produkty	25	4	2875

**Příloha 3:** Hodnoty měřených parametrů sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci testu toxicity fluoxetinu a jeho fotodegradačních produktů.

<b>zásah</b>	<b>celkem juvenilů</b>	<b>počet snůšek</b>	<b>velikost na konci pokusu (μm)</b>
kontrola	74	7	3750
kontrola	77	7	3375
kontrola	62	7	3250
kontrola	58	7	3550
kontrola	51	7	3800
kontrola	67	7	3625
kontrola	59	7	4050
kontrola	64	7	4100
kontrola	66	7	4250
kontrola	56	7	3550
kontrola	73	7	3625
kontrola	69	7	3250
kontrola	71	7	4025
kontrola	60	7	3750
kontrola	71	7	3800
fluoxetin	9	3	2425
fluoxetin	13	5	2750
fluoxetin	14	5	2750
fluoxetin	8	4	2425
fluoxetin	9	4	2750
fluoxetin	8	3	2800
fluoxetin	0	0	2450
fluoxetin	10	5	2850
fluoxetin	11	5	2550
fluoxetin	4	3	2425
fluoxetin	0	0	2000
fluoxetin	8	5	2775
fluoxetin	6	3	2525
fluoxetin	0	0	3800
produkty	2	1	2300
produkty	0	0	2125
produkty	0	0	2250
produkty	0	0	1900
produkty	1	1	2300
produkty	11	4	2625
produkty	5	1	2500
produkty	0	0	2450
produkty	0	0	2150
produkty	0	0	3750
produkty	0	0	2525
produkty	9	4	2350
produkty	4	1	2500
produkty	27	4	2450