

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

Bakalářská práce  
**VLIV ATENOLOLU NA RYBÍ ORGANISMUS**

Autor: Adam Bořík

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

Konzultant bakalářské práce: Viktoriia Burkina, MSc.

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2013

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

Datum

Podpis studenta

## Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Vladimíru Žlábkovi, Ph.D., za vedení bakalářské práce, poskytnuté materiály, cenné rady a obrovskou dávku trpělivosti, jejíž hranice se mi v průběhu tvorby práce nepodařilo nalézt. Chtěl bych také velmi poděkovat Viktorii Burkině, MSc., za pomoc s praktickou částí a vyhodnocení výsledků.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adam BOŘÍK**  
Osobní číslo: **V10B003P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Vliv atenololu na rybí organismus.**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

O výskytu farmak v životním prostředí a o jejich vlivu na organismy existuje v současné době málo informací. Řada těchto sloučenin není účinně eliminována v čistírenských procesech. Cílem projektu je zjistit vliv široce užívaného humánního farmaka "atenololu" na necílový organismus pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Léčivo atenolol patří do skupiny beta blokátorů (selektivní antagonisty  $\beta$  receptoru) je především používáno při léčbě kardiovaskulárních nemocí. Léčivo vyloučené pacienty se dostává do povrchových vod odpadními vodami. Vliv atenololu na ryby bude zjišťován pomocí akvariálních (*in vivo*) testů při použití environmentálně relevantních koncentrací. Následně budou sledovány vybrané biomarkery (především aktivita detoxikačních enzymů) v jaterní tkáni exponovaných ryb. Realizací bakalářské práce budou získány informace týkající se potenciální nebezpečnosti reziduí atenololu ve vodním prostředí, což umožní přesnější interpretaci výsledků environmentálního chemického monitoringu.

Rozsah grafických prací: **3 - 6 tabulek, 3 - 6 grafů**  
Rozsah pracovní zprávy: **20 - 30 stran**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: **MSc. Viktoriia Burkina**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání bakalářské práce: **2. prosince 2011**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2013**

  
prof. Ing. Otomar Liháří, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

- Bolis, C. L., Piccolella, M., Dalla Valle, A. Z., and Rankin, J. C. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research* 44, 265-280.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., and Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1192, 206-215.
- Celander, M., Stegeman, J.J., Forlin L., 1996. CYP1A1-, CYP2B- and CYP3A-like proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: CYP1A1-specific down-regulation after prolonged exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.* 42, 283-286.
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 287-304.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008. Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42 (15), 5807-5813.
- Huggett, D. B., Cook, J. C., Ericson, J. F., and Williams, R. T. (2003). A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 1789-1799.
- Jonsson, E. M., Abrahamson, A., Brunstrom, B., and Brandt, I. (2006). Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo [a] pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology* 79, 226-232.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T., 2011b. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 319-327.
- Široka, Z., Drastichová, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination-cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet. Brno* 73, 123-132.

<b>Obsah</b>	
<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Léčiva jako antropogenní kontaminant v povrchových vodách</b>	<b>10</b>
<b>3. Atenolol</b>	<b>11</b>
3.1. Princip funkce atenololu	11
3.2. Výskyt atenololu ve vodách	12
3.3. Vliv atenololu na ichtyofaunu	12
3.4. Detekce a kvantifikace pomocí HPCL-MS/MS	13
3.4.1. HPCL	13
3.4.2. MS/MS	13
3.5. Možnosti odstranění	13
3.5.1. Fotochemická degradace	13
3.5.2. Biodegrace	14
3.5.3. Sorpce	14
<b>4. Biomarker</b>	<b>15</b>
4.1. Klasifikace biomarkerů	16
4.2. Přednosti a limity využití biomarkerů	16
4.3. Cytochrom P450	17
4.4. Měření enzymatické činnosti	17
<b>5. Materiál a metody</b>	<b>18</b>
5.1. Chemikálie a činidla	18
5.2. Testovací organismus a podmínky experimentu	18
5.3. Vzorkování a preparace mikrozomů	19
5.4. Mikrosomální enzymatická aktivita	20
5.5. Statistické vyhodnocení enzymatické aktivity	21
<b>6. Výsledky</b>	<b>22</b>
6.1. EROD	22
6.2. MROD	23
6.3. PROD	24
<b>7. Diskuze</b>	<b>27</b>
<b>8. Závěr</b>	<b>29</b>
<b>9. Zdroje</b>	<b>30</b>
<b>10. Seznam obrázků, tabulek, grafů a příloh</b>	<b>33</b>
10.1. Obrázky	33

10.2. Tabulky	33
10.3. Grafy	33
10.4 Přílohy	33
<b>11. Přílohy</b>	<b>34</b>
<b>Abstrakt</b>	<b>39</b>
<b>Abstract</b>	<b>40</b>



# 1. Úvod

Produkce a využívání léčiv patří mezi výtobytky moderní společnosti. Největší rozmach využití farmak přišel po 2. světové válce a je spjat s vědeckotechnickou revolucí. Produkce účinných látek od té doby probíhá průmyslově a ve velkém množství.

Farmaka jsou bioaktivní látky se specifickým účinkem. Účinné látky těchto farmak jsou v organismu metabolicky transformovány a následně vyloučeny. Exkretované látky se dostávají do čistíren odpadních vod, odkud jsou dále distribuovány do vodního toku. Následkem je expozice necílových organismů těmto látkám, které mohou představovat potenciální riziko pro vodní ekosystémy a pro organismy, které je obývají. Důvodem nebezpečnosti může být jiný způsob působení na necílový organismus, než je tomu u cílového, vycházející také z kontinuální expozice.

Cílem této práce je získání informací týkajících se potenciální nebezpečnosti reziduí atenololu vyskytujících se v povrchových vodách a jejich vlivu na rybí organismus prostřednictvím biomarkerů. Současně bylo provedeno vyhodnocení použitelnosti vybraných biochemických reakcí pro hodnocení účinků expozice. Díky vhodným biomarkerům je umožněna přesnější interpretace výsledků chemického monitoringu.

## 2. Léčiva jako antropogenní kontaminanty povrchových vod

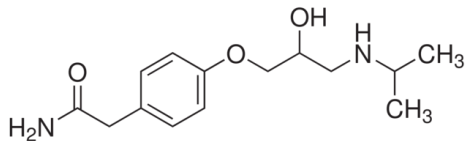
Léčiva představují látky sloužící k odstranění nebo mírnění chorob a jejich projevů. Jejich využívání člověkem probíhá od nepaměti, přičemž se v počátcích jednalo o látky rostlinného a živočišného původu, které nepředstavují hrozbu pro přírodní ekosystémy.

Primárním zdrojem farmaceutických xenobiotik jsou pacienti, kteří tyto látky vylučují v nezměněné podobě nebo formou metabolitů. Prostřednictvím moči a výkalů odcházejí farmaka a jejich metabolity do čistíren odpadních vod (ČOV). Zde však často nedochází k jejich efektivnímu odbourávání a jsou vypouštěny do povrchových vod, které jsou z tohoto důvodu zpravidla nejvíce zatížené. Zde pak mohou negativně ovlivňovat vodní společenstva. Logicky se potom tento problém týká především středních a dolních toků řek, kde se nachází velké množství aglomerací a tím pádem i velké množství ČOV a malých vodních toků, kde vyčištěné odpadní vody zaujímají velký podíl celkového průtoku recipientu a tudíž nemůže dojít k jejich významnému zředění.

Hlavní problém spočívá ve faktu, že ČOV nebyly primárně konstruovány pro odstraňování farmak z odpadních vod a základní způsoby používané pro čištění komunálních odpadních vod jako koagulace a flokulace nelze označit za dostatečné (Kotyza et al., 2009).

Z pohledu kontaminace vodního prostředí a podobnosti fyziologických procesů je možné označit ryby s velkou pravděpodobností jako nejcitlivější skupinu živočichů vůči farmaceutickým polutantům (Corcoran et al., 2010).

### 3. Atenolol



Atenolol ((*RS*)-2-{4-[2-Hydroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]phenyl}acetamide) je medikament spadající do kategorie  $\beta$ -blokerů, léčiv určených pro léčbu pacientů s kardiovaskulárními chorobami, jako je hypertenze, ale také angína pectoris a akutní infarkt myokardu. K uvedení atenololu na trh došlo v roce 1976 z důvodu náhrady za propranol, který vykazoval nežádoucí vedlejší účinky pro nervový systém (Agon et al., 1991).

#### 3.1. Princip funkce atenololu

$\beta$ -blokátory jsou látky, které tlumí některé funkce sympatického nervového systému působením na  $\beta$ -receptory nebo na jeden konkrétní druh. Tyto receptory jsou děleny do 3. skupin:  $\beta_3$ - jeho stimulace na tukových buňkách působí štěpení tuku,  $\beta_2$  rozšiřování průdušek a  $\beta_1$ , jehož stimulace probíhá prostřednictvím sympatomimetik, jakými jsou adrenalin, noradrenalin a isoprenalin. Následkem stimulace tohoto receptoru nacházejícího se především v srdeční tkáni dochází ke zvýšení srdečních kontrakcí. Princip funkce beta blokátorů spočívá ve struktuře podobné sympatomimetikům jakým je adrenalin a jejich afinitě k receptoru a zároveň absenci hydroxylové skupiny na aromatickém jádru, která je zodpovědná za samotnou sympatomimetickou aktivitu (Kameník, 2001). Inhibici  $\beta_1$  je možné **selektivně** provádět právě pomocí atenololu. (López-Sendón et al., 2004)

Atenolol patří k jednomu z nejvíce používaných  $\beta$ -blokátorům, ale jeho podíl využití při léčbě kardiovaskulárních chorob se postupně snižuje z důvodu jeho nahrazením novějšími a účinnějšími léky. Některé studie navíc naznačují, že jeho použití zvyšuje riziko výskytu diabetu typu 2 (Higgins et al., 2006).

#### 3.2 Výskyt atenololu ve vodách

Atenolol není významněji metabolizována a velká část léku je pacienty vylučována v nezměněné podobě, ve které je z čistíren odpadních vod následně vypouštěna do vodního toku (Winter et al., 2008).

Koncentrace atenololu uvedené v tabulce 1 byly zjištěny v rámci projektu detekce a hodnocení vlivu léčiv a jejich transformačních produktů na lidské zdraví nacházejících se v povrchových a pitných vodách. Měření byla prováděna v říjnu roku 2009. Vzorky byly odebrány v Nizozemské části povodí řeky Rýna, Meuse a potom také v místě jejich soutoku (de Jongh et al., 2012). Koncentrace atenololu v povrchových vodách ČR zatím nebyly publikovány.

**Tabulka 1.** Environmentální koncentrace atenololu v povodí řek Rýn a Meuse (2012)

Průměrná koncentrace v povrchových vodách (ng/l)			
Průměrná koncentrace	Maximální koncentrace	Počet pozitivních vzorků	Celkový počet vzorků
6	26	6	14

### 3.3. Vliv atenololu na ichtyofaunu

Vliv atenololu na vodní organismy nebyl doposud podrobně studován. Toto léčivo se dostává do povrchových vod ve směsi společně s dalšími polutanty především vypouštěním odpadních vod. V průběhu *in vitro* expozice ledvinových buněk dánie pruhovaného (*Danio rerio*) samotným atenololem došlo k mírnému navýšení buněčné proliferace. Při testování látek ve směsi se však efekt neprojevil, což naznačuje možný antagonistický vztah s dalšími polutanty (Pomati et al., 2007).

Testy toxicity prováděné na medace japonské (*Oryzias latipes*) a korýších (*Thamnocephalus platyurus*) neprokázaly akutní toxicitu atenololu při koncentraci převyšující 100 mg·l<sup>-1</sup> (Kim JW. et al., 2009). Avšak již environmentálně relevantní koncentrace mohou u lososa obecného (*Salmo salar*) způsobit útlum/ aktivaci exprese specifických genů. Jedná se například o indukci části procesu oxidativní fosforylace, signální dráhu vápníku a narušení procesu buněčného cyklu (Hampel et al., 2010).

Působení  $\beta$ -blokátoru atenololu na ryby je spojeno také s funkcí  $\beta$ -receptorů, kdy při stresové tvorbě glukózy dojde k inhibici receptoru a tím i inhibici syntézy (Ings et al., 2012). Vztah atenololu a jaterní enzymatické aktivity a jeho vliv na jaterní mikrosomální systém zatím nebyl studován.

### **3.4. Detekce a kvantifikace pomocí HPLC-MS/MS**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, představuje velmi citlivý analytický nástroj kombinující separační účinnost HPLC s identifikační a kvantifikační schopností MS/MS. To umožňuje velmi přesné určení jednotlivých látek v komplexní směsi. Instrumentální analýzy využívající HPLC-MS/MS představují velice citlivou metodu pro zjišťování koncentrací polárních sloučenin, mezi které patří také atenolol.

#### **3.4.1 HPLC**

Klíčovou vlastností HPLC je vyšší účinnost separace látek v kratší době oproti sloupcové chromatografii díky vysokotlakému čerpadlu, která je součástí aparatury a umožňuje průtok mobilní fáze kolonou menších rozměrů, v níž je stacionární fáze vázána na částice o velikosti několika mikrometrů (Gerber et al., 2004).

#### **3.4.2 MS/MS**

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určující hmotnost molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.

Tandemový hmotnostní spektrometr obsahuje dva hmotnostní analyzátory, které jsou sériově spojené kolizní celou. V prvním z nich dochází k rozlišení mateřských (nekurzorových) iontů a k výběru jednoho z nich. Ten je poté podroben fragmentaci v kolizní cele a vzniklé dceřiné (produktové) ionty jsou rozlišeny v druhém analyzátoru (Chace et al., 1993).

### **3.5. Možnosti odstranění**

Mechanismy vedoucí k odstranění organických sloučenin z volných vod je možné rozdělit do dvou druhů. Sorpčních a degradačních (biotických a abiotických).

#### **3.5.1 Fotochemická degradace**

Fotolýza molekul léčiva je způsobena absorpcí slunečního záření a je považována hlavní způsob degradace farmak v povrchových vodách. Hlavními faktory, které ovlivňují účinnost tohoto procesu jsou absorpční spektrum molekuly polutantu, intenzita slunečního záření a hloubka, ve které se molekula nachází, neboť sluneční

záření je vodou a ostatními složkami v ní rozpuštěnými pohlcováno, proto probíhá degradace ve větších hloubkách v daleko menší míře (Lam et al., 2000).

### **3.5.2 Biodegradace**

Tento proces zajišťují mikroorganismy resp. působení v aktivovaném kalu ČOV. Výsledkem je buď jen částečná degradace léčiv, nebo jejich úplné rozložení. Díky nízkým koncentracím léčiv dochází k degradaci tímto procesem jen v menší míře a nejsou zcela přesně známy ani faktory ovlivňující účinnost (Zwiener et al., 2000).

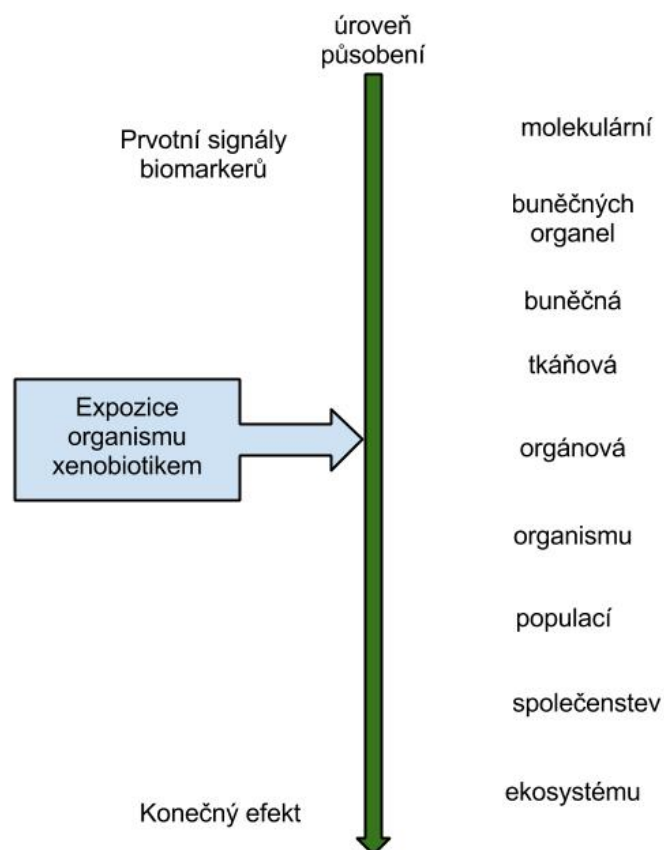
### **3.5.3 Sorpce**

Jedná se o mechanismus, který je v současné době v odstraňování farmak z odpadních vod nejpoužívanější. Princip funkce spočívá v absorpci na základě hydrofobních interakcí alifatických a aromatických skupin léčiv s lipofilními částmi aktivovaného kalu a lipofilní membránami mikroorganismů. Současně dochází také k adsorpci vlivem elektrostatických sil mezi pozitivním nábojem farmak a záporně nabitým povrchem biomasy (Schwarzenbach et al., 2003).

### 3. Biomarker

Pro různé obory toxikologie a jiné odvětví s nimi spojené jsou důležitými aspekty kvantifikace expozice organismu polutantem, určení reakce organismu a také pokud možno schopnost předpovídat celkový efekt, který by chemická látka mohla mít. Nástrojem pro získávání těchto poznatků jsou biomarkery (Timbrell, 1998).

Biomarkery představují měřitelnou změnu biologických parametrů živého systému, k níž dochází po expozici cizorodými látkami, nebo fyzikálními podmínkami. Jedná se o prvotní změny vnitřního prostředí organismu na molekulární úrovni, se kterými jsou spjaté následné negativní důsledky narušením homeostázy případně negativní ovlivnění populací, či celých ekosystémů (Obrázek 1.). Účinky toxické látky na vyšších úrovních například orgánové už do biomarkerů řazeny nebývají, protože jsou důsledkem působení látky na nižších úrovních (van der Oost et al., 2003).



Obrázek 1. Postup toxického účinku vyvolaného působením xenobiotika. Převzato z van der Oost (2003).

#### 4.1. Klasifikace biomarkerů

- **Biomarkery expozice** se využívají pro potvrzení expozice látkou, nebo skupinou látek a jejich metabolitů. Tvoří důkaz mezi vnějším výskytem podnětu a vnitřní odpovědi organismu.

- **Biomarkery citlivosti** odrážejí rozdílnou senzibilitu jedinců na sledovanou látku. Jeden z faktorů variability citlivosti vůči toxickým látkám vychází ze skutečnosti určitých genetických odlišností jedinců v rámci jedné populace a enzymatickým polymorfismem, který je s těmito variancemi spjat.

- **Biomarkery účinku** dokumentují druh změny v organismu způsobené cizorodou látkou před zjevným stádiem jejich projevu. Spektrum biomarkerů účinku obsahuje mimo jiné také velmi sofistikované metody, například **stanovení enzymatické inhibice a indukce**.

Výše uvedené rozdělení není fixní a jednotlivé kategorie se mohou vzájemně prolínat. Současně je důležité podotknout skutečnost, že samotné vymezení pojmu biomarker není zcela konzistentní a v různých publikacích můžeme narazit na mírné odlišnosti (Timrell, 1998; van der Oost et al., 2003).

#### 4.2. Přednosti a limity využití biomarkerů

Výhody použití biomarkerů oproti monitorování chemickému spočívají v možnosti integrace individuálních i provázaných procesů, které v organismech probíhají společně biologickou dostupností kontaminantu. Na druhou stranu mohou být limitovány některými faktory, které nesouvisí se znečištěním a je třeba je brát v úvahu při interpretaci dat biomarkerů (Oost et al., 2003). Existují totiž proměnné, které mohou ovlivňovat enzymatické pochody v organismu, ačkoliv nesouvisí se znečišťujícími látkami, kterým je organismus vystavován. Jedná se například o faktory jako je migrační chování, reprodukční chování, dostupnost potravy, věk, pohlaví a celkový zdravotní stav (De Kruijf, 1991).

Důležitá je schopnost citlivé kvantifikace odpovědi organismu na environmentálně relevantní dávku toxické látky. Využitelnost biomarkeru je hodnocena na základě kritérií v souvislosti s jejich efektivitou při hodnocení ekologických rizik (environmental risk assessment- ERA). Prostřednictvím pokusů byl jako cenný biomarker v rámci ERA mimo jiné označena aktivita enzymů CYP 450 I. fáze detoxikačního procesu (van der Oost et al., 2003).



### 4.3. Cytochrom P450

Cytochrómy P450 tvoří jaterní systémem oxidačně- redukčních enzymů (hemoproteinů), které jsou hlavní aktivní složkou metabolické transformace velkého množství substrátů jako například mastných kyselin, steroidních hormonů a **xenobiotik**. Tyto enzymy tvoří oxidační komplex první fáze metabolismu, metabolizují cizorodé látky a vytváří polárnější sloučeniny, které jsou v průběhu druhé fáze snadněji vylučovány (Lewis et al., 2001). Velké pozornosti se cytochromu P450 dostává v souvislosti s biotransformací léčiv v lidském organismu a stejně tak i jiných savců. Ačkoliv může být mechanismus funkce tohoto enzymatického komplexu v mnoha ohledech u ryb velmi podobný, nelze očekávat, že tomu tak bude ve všech aspektech (Franklin et al., 1980).

Expresi genů pro indukci detoxikačních enzymů náležících do skupiny cytochrom P450 je do značné míry závislá na **Ah receptoru** neboli receptoru aryl substituovaných uhlovodíků aktivovaného navázáním ligandu a následným přesunem do jádra, kde se podílí na expresi isoformem CYP 450 (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).

Nejvýznamnější z celé skupiny ve vztahu ke kontaminaci životního prostředí je u ryb **CYP 1A**, jenž se osvědčil jako indikátor polutantů skupiny POP. (např.: PAH- polycyklické aromatické uhlovodíky, PCB- polychlorované bifenyly, PCDD- polychlorované dibenzo-p-dioxiny) (van der Oost et al., 2003).

### 4.4. Měření enzymatické činnosti

Ethoxyresorufin-O-dethylasa (EROD) je enzymatická reakce sloužící jako biomarker použitelný pro indikaci kontaminace perzistentními organickými polutanty (POP). Funkce EROD je zprostředkována afinitou k enzymů CYP450 1A a jeho aktivitu lze měřit různými metodami detekce fluorescenčního záření, neboť je schopen přeměňovat substráty na produkty vykazující fluorescenci, kterou je následně možné měřit pomocí spektrofluorimetrie. Obdobným způsobem je měření prováděno i u dalších dvou biomarkerů MROD (CYP1A2) methoxyresorufin-O-demethylase a PROD (CYP2B) penthoxyresorufin-O-depenthylase (Burke et al., 1985).

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Chemikálie a činidla

Atenolol, Resorufin, 7-ethoxyresorufin (ER), 7-methoxyresurofin (MR), 7-pentoxyresurofin (PR), nicotinamid adenin dinucleotid fosfát (NADPH) a kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) byly získány z Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo nebo České republiky).

### 5.2. Testovací organismus a podmínky experimentu

Pro pokus byli použiti juvenilní jedinci pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), původem z komerčního chovu (Husinec, Česká republika). Průměrná délka těla činila  $23,38 \pm 1,25$  cm a hmotnost  $145 \text{ g} \pm 22,22 \text{ g}$ . Podrobné informace uvedeny v tabulce 2 a tabulce 3.

**Tabulka 2.** Údaje délek skupin testovaných ryb. Délky jsou uváděny v milimetrech (mm). Ryby byly rozčleněny podle expozice sledovanou látkou (C0/CA-  $0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , A1-  $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , A2-  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a A3-  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a délkou jejího trvání (0,21,42 dnů).

	celková	tělo
<b>C0</b>	221,25±11,39	198,125±8,64
<b>CA_21d</b>	230,75±15,25	205,25±15,30
<b>A1_21d</b>	236,25±11,65	212,13±10,2
<b>A2_21d</b>	234±11,49	206,5±9,31
<b>A3_21d</b>	234±9,53	208,13±7,88
<b>CA_42d</b>	245±13,46	215,63±11,3
<b>A1_42d</b>	243,13±10,59	214,38±10,14
<b>A2_42d</b>	246,25±10,83	216,86±8,64
<b>A3_42d</b>	240,63±9,82	215±10

Experiment byl proveden v akváriích s objemem 200 l sladké vody při stále aeraci a 12. hodinovým světelným režimem. Měření hodnot pH a obsahu kyslíku ( $8,33 \pm 0,75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  respektive  $7,43 \pm 0,31$ ) bylo prováděno každý den po dobu trvání experimentu před výměnou vody, která spočívala ve vypuštění 150 l z celkového objemu a

následným doplněním vody nové spolu s příslušnou koncentrací atenololu. (semistatický průběh testu).

Před samotným začátkem pokusu proběhla 14denní aklimatizace na podmínky experimentu. Ryby byly náhodně rozmístěny do akvárií po 20. kusech. Experiment včetně kontrol probíhal duplicitně celkem v 8. akváriích. Ryby byly vystaveny účinkům environmentálně relevantní koncentraci  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , střední koncentraci  $10^{-1} \mu\text{g l}^{-1}$  a vysoké koncentraci  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  s dobou trvání 42 dní.

Pro ověření koncentrace atenololu v jednotlivých akváriích bylo provedeno třikrát s odstupem 20 dnů odebírání vzorků.

**Tabulka 3.** Údaje hmotností skupin testovaných ryb spolu s pohlavím. Hmotnosti jsou uváděny v gramech (g). Ryby byly rozčleněny podle expozice sledovanou látkou (C0/CA-  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ , A1-  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ , A2-  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  a A3-  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ) a délkou jejího trvání (0,21,42 dnů).

	celková	bez vn. orgánů	ledviny	srdce	gonády	pohlaví
						♂/♀
<b>C0</b>	120,74±11,46	99,85±9,81	1,61±0,23	0,17±0,02	5,04±3,32	6/2
<b>CA_21d</b>	142,5±25,25	118,75±23,05	1,48±0,18	0,23±0,05	5,42±5,41	4/2
<b>A1_21d</b>	144,38±27,78	126,25±20,12	1,7±0,31	0,23±0,05	1,82±4,40	1/0
<b>A2_21d</b>	146,88±20,15	125,63±15,7	1,75±0,24	0,24±0,06	5,63±6,51	3/1
<b>A3_21d</b>	146,25±9,27	122,5±11,18	1,59±0,29	0,22±0,03	6,8±5,58	5/0
<b>CA_42d</b>	169,38±30,77	141,88±22,9	1,76±0,41	0,26±0,03	8,25±8,82	4/0
<b>A1_42d</b>	163,13±30,3	140,63±21,13	1,59±0,43	0,23±0,05	5,1±8,34	2/4
<b>A2_42d</b>	167,5±25,86	146,88±22,07	1,69±0,33	0,25±0,05	2,17±4,6	1/1
<b>A3_42d</b>	164,38±15,5	141,25±14,09	1,62±0,18	0,25±0,02	4,9±6,48	2/4

### 5.3. Vzorkování a příprava mikrosomů

Odběry vzorků byly provedeny třikrát v průběhu testu, a to na začátku testu (C0- kontrolní skupina na začátku testu bez expozice), po 21 a 42 dnech (CA- 21d, respektive CA- 42d). Na konci expozice jednotlivých skupin byly ryby usmrceny v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. a vždy u 4 ryb z akvária (8 ryb/skupina) bylo provedeno odebrání vzorku jater o hmotnosti 0,5 g, fixace kapalným dusíkem. Zmrazené vzorky byly skladovány při teplotě  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

V průběhu vzorkování byly dále odebrány také ledviny a svalová tkáň pro hodnocení bioakumulace sledované látky (výsledky nejsou předmětem této práce).

Příprava mikrosomální frakce proběhla pomocí metody diferenciální centrifugace. Vzorky jater byly pozvolna rozmrazeny, umístěny do pufráčního roztoku Tris-sacharózy (10 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, pH 7.4) a následně mechanicky homogenizovány (Schuett homogen, Germany). Následovaly dvě fáze centrifugace. První 10 000g při 4°C po dobu 15 min. Poté byl odebrán do nové zkumavky vzniklý supernatant, který byl použit v druhé fázi centrifugace 36 000g trvající 60 min. Po vyjmutí z centrifugy bylo možné na dně zkumavek pozorovat usazené mikrosomální frakce. Poslední krok představovalo ředění vzorku pufráčním roztokem Tris-sacharózy na objem 1 ml a jeho homogenizace (UltraTurrax; Ika, Germany). V průběhu celé preparace je nezbytné vzorky chladit.

Kvantifikace proteinů byla provedena BCA testem (bicinchoninic acid). Standardem pro tvorbu kalibrační řady byl plazmatický albumin (BSA). Příprava mikrosomální suspenze spočívala v rozmrazení vzorků, přidání NaOH v poměru 1:20 (30  $\mu$ l:570  $\mu$ l) a promíchání. Stejným způsobem byla připravena kalibrační řada. Jednotlivé vzorky o neznámé koncentraci spolu s kalibrační řadou byly umístěny duplicitně do jamek transparentní mikrodestičky spolu s reakčním roztokem, který se skládal z 19,6 ml reaktantu A (roztok bicinchoninové kyseliny) a 0,4 ml reaktantu B (roztok síranu měďnatého), čili 200  $\mu$ l na jednu destičku. Po přidání reakčního roztoku ke vzorkům je nutné jejich promíchání a přelepení destičky fólií. Následovala inkubace po dobu 30 min. při teplotě 37 °C. Poté byla měřena absorbance roztoků spektrometrem při vlnové délce 562 nm. Na základě výsledků byla upravena koncentrace ve vzorcích mikrosomu na hodnotu 4 mg ml<sup>-1</sup>.

#### **5.4. Mikrosomální enzymatická aktivita**

Pro určení aktivity jaterních enzymů první detoxikační fáze P450 a jeho izoforem (CYP450 1A1, CYP450 1A2, CYP450 2B) byl použit fluorescenční katalytický test pro ER substrát.

EROD reakce představuje transformaci z ER na resorufin. Detekce resorufinu (excitace/emise 544/590 nm) ve fluorescenčním detektoru (Infinite 200 – Photometer TECAN) probíhala na černé mikrodestičce s 96 jamkami, přičemž se reakční směs skládala z: pufráčního roztoku (50 mM, pH=7.8), mikrosomální proteiny (0.2 mg), ER substrát (8  $\mu$ M). Reakce byla iniciována NADPH (1.2 mM).

Měření enzymatické činnosti MROD (P450 1A2) a PROD (P450 2B) probíhalo obdobným způsobem jako v případě EROD jen byl 7-ethoxyresorufin nahrazen 7-methoxyresorufin (MR) a 7-pentoxyresorufin (PR). Enzymatická aktivita byla vyjádřena jako pmol resorufinu uvolněného za min a na mg mikrosomálního proteinu (mez detekce pro resorufin  $2 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

## 5.5. Statistické vyhodnocení enzymatické aktivity

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistica 10 (StatSoft). Jako test normálního rozdělení posloužil Kolmogorův-Smirnovův test (K-S test) prostřednictvím porovnání vypočtené hodnoty testované statistiky s kritickou hodnotou, kdy je  $H_0$  zamítnutá, pokud platí, že  $D_n \geq D_n(\alpha)$ . Kritická hodnota  $D_n(\alpha)$  byla zjištěna z tabulky upravených kritických hodnot dle Lillieforse. Popřípadě Shapiro-Wilkovým testem normality (S-W test) a porovnání p-value vůči hladě významnosti  $\alpha=0,05$ . Data byla normalizována pomocí logaritmické transformace s prezentací výsledků po zpětné transformaci.

V případě ověření normality a homoskedasticity dat (Levenův test) respektive provedení normalizace dat bylo pro hodnocení mezi skupinových rozdílů použito analýzy rozptylu a parametrického Tukeyova testu, nebo v případě heteroskedasticity dat neparametrického Kruskal-Wallisova testu, jejichž výstup umožňuje vzájemné porovnání všech 9 skupin. Výsledky označeny za signifikantní, pokud dosahovalo p-value < 0,05.

Pro vizualizaci výsledku posloužil krabicový diagram (box plot) se střední hodnotou vymezenou průměrem (mean) a mírou variability jako směrodatnou odchylkou společně s vyznačením minimální a maximální hodnoty souboru.

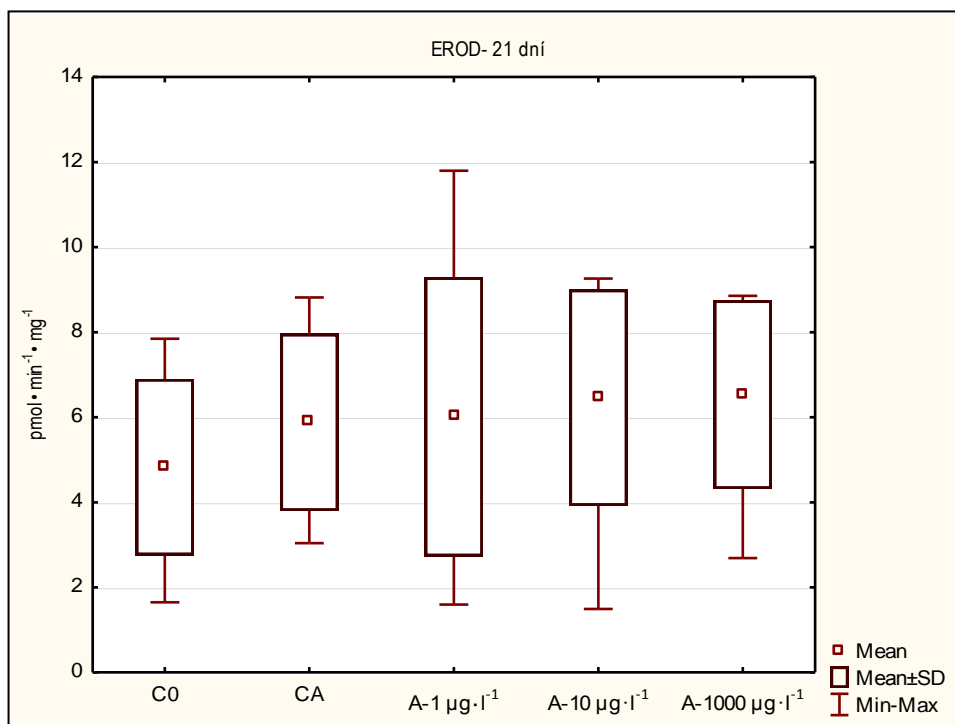
## 6. Výsledky

### 6.1 EROD

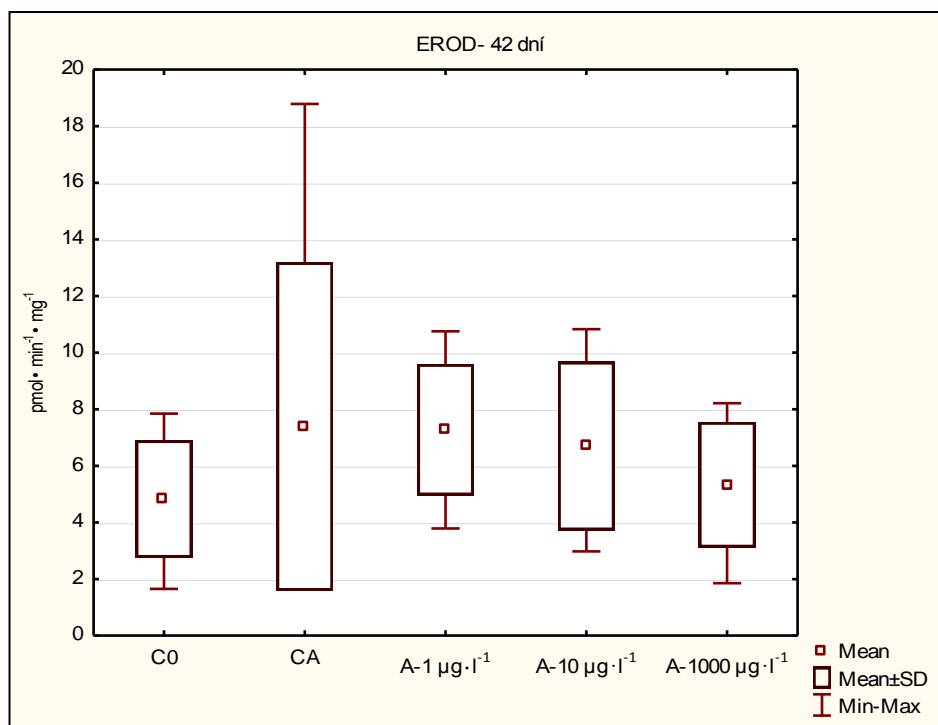
Výsledky měření aktivity EROD v játrech ryb po expozici atenololem jsou uvedeny v grafech 1 a 2.

Výsledky měření reakce 7 -ethoxyresurofin O -deethylace jejímž prostřednictvím proběhlo měření hodnot enzymatické aktivity CYP450 1A byly podrobeny statistické analýze, při které byla ověřena normalita všech podmnožin statistických souborů s následným pozitivním testem homoskedasticity. Po splnění předchozích náležitostí proběhlo vzájemné porovnání skupin koncentrací (1, 10, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) všech dob expozic (0,21,42 dní) jedno-faktorovým ANOVA testem, jehož výsledek neprokázal žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinami (signifikantní pokud  $p\text{-value} < 0,05$ ). Průměrné hodnoty společně se směrodatnými odchylkami jsou zaneseny v tabulce 4.

Ačkoliv statistické vyhodnocení nepotvrdilo prokazatelný rozdíl mezi jednotlivými skupinami je možné z grafu 2 pozorovat mírný nárůst střední hodnoty enzymatické aktivity ve všech skupinách po 42 dnech expozice. Naproti tomu graf 1 skupiny s 21denní expozicí ukazuje velmi vyrovnané výsledky.



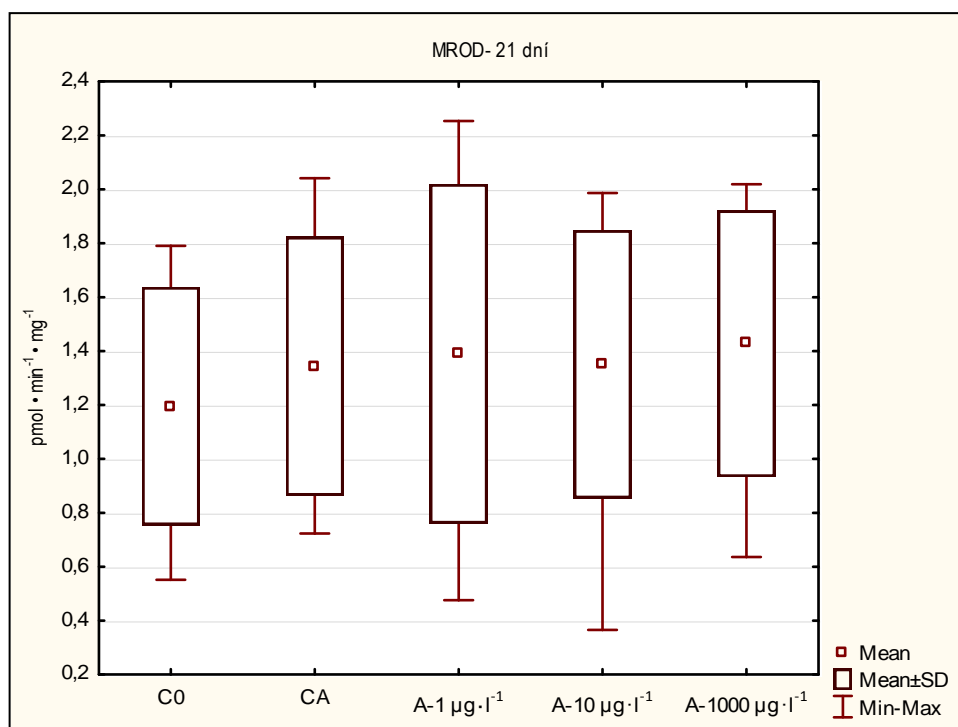
Graf 1. Porovnání aktivity EROD po expozici 21 dnů.



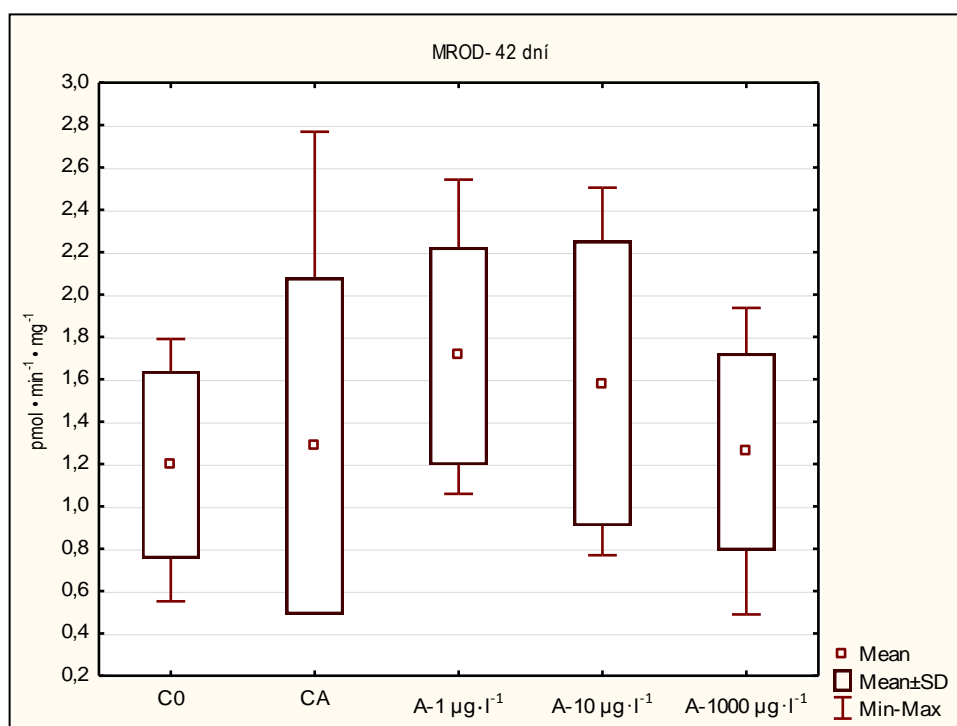
Graf 2. Porovnání aktivity EROD po expozici 42 dnů.

## 6.2 MROD

Výsledky měření enzymatické reakce 7- methoxyresorufin *O*-demethylace odpovídající aktivitě enzymu CYP450 1A2 jsou uvedeny v grafech 3 a 4. Výsledky ukazují velmi podobný průběh aktivity MROD, jako je tomu u reakce EROD v uvedené v grafech 1 a 2. Ani v tomto případě nebyl prokázán signifikantní rozdíl.



Graf 3. Porovnání aktivity MROD po expozici 21 dnů.



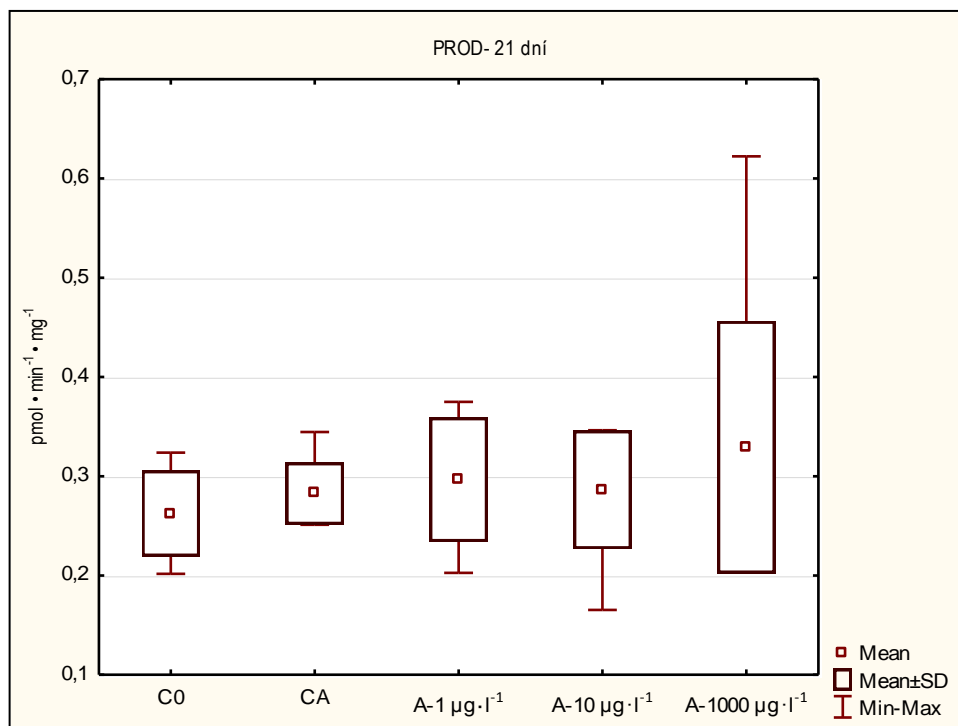
Graf 4. Porovnání aktivity MROD po expozici 42 dnů.

### 6.3. PROD

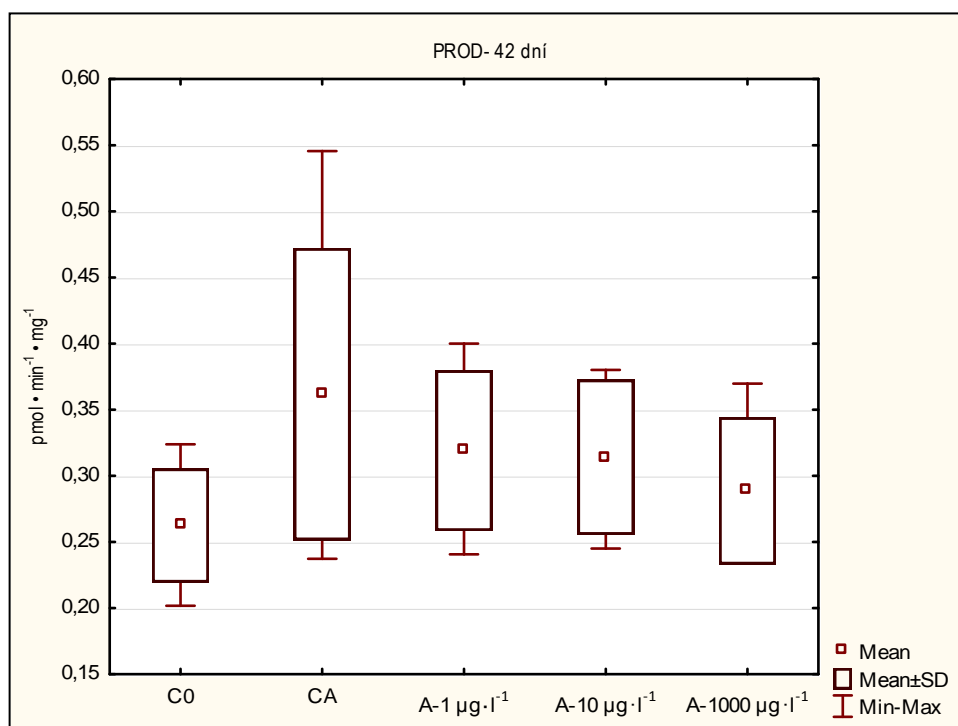
7- pentoxyresurofin *O*-depentylace odpovídá aktivitě enzymu CYP450 2B. Statistické vyhodnocení zjištěných hodnot vyvrátilo hypotézu o normálním rozdělení podmnožiny s koncentrací 1000 µg·l<sup>-1</sup> souboru s 21denní expozicí (A-1000 µg·l<sup>-1</sup> 21d). Po logaritmické transformaci a následné analýze rozptylu nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl.

Výsledky uvedené v grafech 5 a 6 dokumentují aktivitu PROD v mikrosomální frakci jater pstruha duhového. Aktivita PROD u skupiny vystavené testované látce po dobu 21 dnů (graf 5) lehce vybočuje z trendu patrného u předchozích dvou parametrů. Enzymatická aktivita zde vykazuje menší směrodatné odchylky v porovnání s předchozími. Také je viditelné mírné zvýšení střední hodnoty při koncentraci Atenololu 1000 µg·l<sup>-1</sup>. Aktivita PROD skupiny s expozicí 42 dnů uvedená v grafu 6 má již stejný průběh jako EROD a MROD.





Graf 5. Porovnání aktivity PROD po expozici 21 dnů .



Graf 6. Porovnání aktivity PROD po expozici 42 dnů.

**Tabulka 4.** Přehled středních hodnot (AVE-average) 7 -ethoxyresurofin O-deethylace, 7 -methoxyresurofin O-demethylace a 7-pentoxyresurofin O-depentylace společně s mírou variability (SD-standard devioation). Data byla zpěně transformována. Hodnoty vyjádřeny jako  $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Data vykazují signifikantní rozdíl, pokud  $p\text{-value} < 0,05$

skupiny	EROD		MROD		PROD	
	AVE	SD	AVE	SD	AVE	SD
C0	4,83	1,94	1,20	0,41	0,26	0,04
CA 21 d	5,88	1,95	1,34	0,45	0,28	0,03
A- 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 21 d	6,01	3,07	1,39	0,59	0,30	0,06
A- 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 21 d	6,46	2,37	1,35	0,46	0,29	0,06
A- 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 21 d	6,53	2,07	1,43	0,46	0,33	0,12
CA 42 d	7,39	5,37	1,28	0,72	0,36	0,10
A- 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 42 d	7,28	2,16	1,71	0,48	0,32	0,06
A- 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 42 d	6,70	2,78	1,58	0,63	0,31	0,05
A- 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 42 d	5,33	2,07	1,26	0,43	0,29	0,05
p-value	0,605		0,561		0,479	

## 7. Diskuze

Možnosti hodnocení vlivu farmaceutických polutantů kontaminujících antropogenní činností vodní prostředí je úměrná znalosti biologických odpovědí organismů vystaveným těmto látkám. Výzkum biomarkerů tak dostává rozměr nástroje, jehož funkce převyšuje detekci toxického účinku, ale jejich znalost nám poskytuje vhodný prostředek a argument při ochraně vodních ekosystému. Je také důležité si uvědomit skutečnost, že farmaka nejsou do vodního prostředí vypouštěny jako jednotlivé složky, ale vzájemně interagující směsi, jejichž účinek může být jiný (zvyšování/snižování škodlivého účinku), než při působení jedlových látek separátně. V takovém případě se jedná o takzvaný „koktejl efekt“. Zapojení studií zkoumající účinky látek ve směsích je tedy velmi žádoucí (Celander, 2011).

Cytochrom P450 představuje u ryb obdobně jako u savců součást metabolické dráhy, kterou jsou farmaka metabolizována a odstraňována z organismu. Příkladem úspěšné aplikace hodnocení aktivity jaterních detoxikačních enzymů skupiny P450 jako biomarkeru účinku léčiva na rybí organismus je studie zabývající se hodnocením látky ketokonazol, která je v lékařství využívána jako antimykotický prostředek při léčbě dermatálních onemocnění. Výsledky ukázaly interakce mezi sledovanou látkou a cytochromy P450 1A a P450 3A u juvenilních jedinců pstruha duhového. (Hasselberg et al., 2008).

Jednou ze složek hodnocení vlivu reziduálních vodních kontaminantů jsou bioakumulační markery ryb. Vzhledem k neustálé expozici dochází k bioakumulaci určitých látek, která vyplývá z jejich chemické povahy. Zpravidla se jedná o nepolární lipofilní látky. Například perzistentní organické polutanty (POP), do kterých spadá PCB spolu s DDT mají největší potenciál bioakumulačních markerů a jejich inkorporace do tkání ryb je snadná, kdežto u snadno odbouratelných biologických látek jako PAU a chlorované fenoly nebo farmaka, které nemají tendence k hromadění v tělních tkáních, neodrážejí jejich koncentrace v tělech ryb hodnotu expozice. Pro správné pochopení chování cizorodých látek je nutné uvažovat faktory toxokinety, bioakumulace a složitých metabolických drah. Spojením analyticko-chemických indkátorů (bioakumulační markery) společně s biomarkery získáváme prostředek biomonitoringu, který společně s monitoringem chemickým slouží pro přesnější interpretaci komplexního vlivu polutantů ve vodním prostředí (van der Oost et al., 2003).

Winter et al. (2008) provedli studii zabývající se působením atenololu na střevli potoční (*Pimephales promelas*). Předmětem ekotoxikologického pokusu bylo vymezení NOEC (No observed effect concentration = nejvyšší koncentrace, při které nejsou nepozorovány žádné změny) a LOEC (Low observed effect concentration= nejnižší koncentrace, při které jsou pozorovány změny) pro larvální periodu ( $10 > 10 \text{ mg/l}$ ), subchronický test ( $3,2 \text{ a } 10 \text{ mg/l}$ ) a krátkodobý reprodukční test ( $10 > 10 \text{ mg/l}$ ). Jako nejcitlivější ukazatel studie ke koncentraci atenololu se ukázal být vztah kondičního indexu samců ( $1,0 \text{ a } 3,2 \text{ mg/l}$ ). Z výsledků vyplývá nízká chronická toxicita atenololu vzhledem k environmentálně relevantním koncentracím.

Výzkum účinků léčiv na ryby se také zabýval vztahem mezi akutní stresovou produkcí glukózy v játrech ryb na expozici léčiva atenolol a venlafaxin. Testování probíhalo v *in vitro* podmínkách na hepatocytech pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a to při koncentracích sledované látky 0, 0,1, 10 a 1000 nM. Stimulace stresové produkce glukózy probíhala prostřednictvím kortizolu a adrenalinu. Nestimulovaná produkce glukózy nebyla atenololem nijak ovlivněna. Naopak v případě stimulace adrenalinem došlo k přerušení tvorby glukózy už při koncentraci 0,01 nM. Výsledky testu ukázaly, že atenolol inhiboval beta-receptory v hepatocytech pstruha duhového a tím došlo k narušení adaptivní reakce tvorby glukózy (Ings et al., 2012).

Námi provedené studie doplňuje současné znalosti působení farmak na vodní organismy o hodnocení účinku atenololu sledováním konkrétní metabolické dráhy organismu a snahy o pochopení osudu xenobiotika v živém systému na molekulární úrovni detoxikačních hemoproteinů. Prostřednictvím měření (katalytické aktivity) se snažíme získat měřitelnou odpověď organismu na tuto cizorodou látku kontaminující vodní prostředí. Ačkoliv analýza výsledků neprokázala signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami, je možné z průběhu grafů 42denní expozice vyzorovat mírný nárůst středních hodnot aktivity enzymů ve srovnání se s kontrolní skupinou C0. Tato skutečnost může být ovlivněna některými faktory jako například teplota nebo postupujícím ontogenetickým vývojem testovaných organismů. Vzhledem k pravidelným kontrolám fyzikálně chemických parametrů vody v nádržích je možné hypotézu o změně teplotních podmínek vyvrátit a přiklonit se k variantě druhé.

## 8. Závěr

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv environmentálních koncentrací atenololu na aktivitu vybraných jaterních enzymů u pstruha duhového a vyhodnotit možnost použití sledovaných parametrů jako biochemických markerů expozice ryb atenololu v přirozených podmínkách.

Získané výsledky neprokázaly vztah expozice juvenilních pstruhů environmentálně relevantním koncentracím beta-blokeru atenololu na enzymatickou aktivitu vybraných izoform cytochromu P450- 1A1, 1A2, 2B. Tato studie prokázala nevhodnost využití reakcí EROD, MROD a PROD jako potencionálních biomarkerů pro hodnocení expozice vodních organismů atenololu v přirozených podmínkách. V současné době zatím nebyl nalezen vhodný biomarker. Z toho vyplývá nutnost dalšího výzkumu osudu a účinků farmak na vodní organismy a studium dalších kandidátů na biomarkery jejich působení.

## 9. Zdroje

AGON, P.; GOETHALS, P.; VAN HAVER, D.; KAUFMAN, J. Permeability of the blood-brain barrier for atenolol studied by positron emission tomography. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1991, vol. 43, no. 8, p. 597–600.

BURKE, M.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C. R.; HALPERT, J.; HAAPARANTA, T.; MAYER, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985, vol. 34, no. 18, p. 3337–3345.

CELANDER, M. Cocktail effects on biomarker responses in fis. *Aquatic Toxicology*, 2011, vol. 105, p. 72–77.

DE JONGH, C. M.; KOOIJ, P. J.; DE VOOGT, P.; TER LAAK, T. L. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. *Sci. Total Environ.* 2012, vol. 427, p. 70–77.

FUJII-KURIYAMA, Y.; MIMURA, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, vol. 388, no. 1, p. 311–317.

FRANKLIN, R. B., ELCOMBE, C., VODICNIK, M., LECH, J. Coparative aspects of the disposition and metabolism of xenoboitics in fish and mamals. *Federation Proceedings*, 1980, vol. 39, no. 13, p. 3144–3149.

GERBER, F., KRUMMEN, M., POTGETER, H., ROTH, A., SIFFRIN, Ch., SPOENDLIN, Ch. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1036, no. 2, p. 127–133.

HAMPEL, M., ALONSO, E., APARICIO, I., BRON, J. E., SANTOS, J. L., TAGGART, J. B., LEAVER, M. J. Potential physiological effects of pharmaceutical compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar*) implied by transcriptomic analysis, *Environmental science pollution*, 2010, vol. 17, p. 917–933.

HASSELBERG, L.; WASSMUR, B.; WESTERBERG, S.; CELANDER, M. C. Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology*, 2008, vol. 86, no. 2, p. 256–264.

HIGGINS, B., WILLIAMS, B., BAKHSHI, L., DAVIS, M., FORD, G., GRANT, R., HUGHES, M., LOCKHART, I., NHERERA, L., PENNEY, C., PROCTER-KING, J. *Hypertension: Management of hypertension in adults in primary care: partial update*. 2006. ISBN 1 86016 285 1.

CHACE, D.; MILLINGTON, D.; TERADA, N.; KAHLER, S.; ROE, C.; HOFMAN, L. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Adv. Clin. Chem.* 1993, vol. 39, p. 66–71.

KAMENÍK, L. Beta-blokátory (1. část: charakteristika, vlastnosti a účinky), 2001. MEDICINA.cz. [http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s\\_id=1918#2](http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=1918#2) (accessed March 26, 2013).

KOTYZA, J.; SOUDEK, P.; KAFKA, Z.; VANĚK, T. Léčiva – „Nový“ environmentální polutant. *Chemické Listy*, 2009, vol. 103, p. 540–547.

LAM, M. W.; YOUNG, C.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; HANSON, M. A.; WILSON, CH. J.; RICHARDS, S. M. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004, vol. 23, no. 6, p. 1431–1440.

LEWIS, D. F. *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*. 2nd ed. 2001. ISBN 978-0748408979.

LÓPEZ-SENDÓN, J.; SWEDBERG, K.; MCMURRAY, J.; TAMARGO, J.; MAGGIONI, A.; DARGIE, H.; TENDERA, M.; WAAGSTEIN, F.; KJEKSHUS, J.; LECHAT, P.; TORP-PEDERSEN, CH. Expert consensus document on b-adrenergic receptor blockers. *European Heart Journal* 2004, vol. 25, p. 1341–1362.

POMATI, F., ORNALDI, CH., CLERICI, M., LUCIANI, F., ZUCCATO, E. Effects and Interactions in an Environmentally Relevant Mixture of Pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*, 2008, vol. 102, no. 1, p. 129–137.

OOST, R. VAN D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003, vol. 13, no. 2, p. 57–149.

SCHWARZENBACH, R. P., GSCHWEND, P. M., IMBODEN, D. *Environmental Organic Chemistry*. 2nd ed. 2003. ISBN 0-471-35750-2.

SNYDER, S. A. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. *Ozone: Sci. Eng.* 2008, vol. 30, p. 65–69.

TIMBRELL, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 1998, vol. 129, no. 1, p. 1–12.

WINTER, M. J.; LILICRAPA, A. D.; CAUNTERA, J. E.; SCHAFFNERB, CH.; ALDERB, A. C.; RAMILC, M.; TERNESC, T. A.; GILTROWD, E.; SUMPTERD, J. P.; HUTCHINSONA, T. H. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 2008, vol. 86, no. 3, p. 361–369.

ZWIENER, CH.; GLAUNER, T.; FRIMMEL, F. H. Biodegradation of Pharmaceutical Residues Investigated by SPE-GC/ITD-MS and On-Line Derivatization. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000, vol. 23, p. 474–478.



## 10. Seznam obrázků, tabulek, grafů a příloh

### 10.1. Obrázky

Obrázek 1 Postup toxického účinku vyvolaného působením xenobiotika.	15
---	----

### 10.2. Tabulky

Tabulka 1. Environmentální koncentrace atenololu v povodí řek Rýn a Meuse	12
Tabulka 2. Údaje délek skupin testovaných ryb.	18
Tabulka 3. Údaje hmotností skupin testovaných ryb spolu s pohlavím	19
Tabulka 4. Přehled hodnot vyhodnocení enzymatických aktivit.	26

### 10.3. Grafy

Graf 1. Porovnání aktivity EROD po expozici 21 dnů.	22
Graf 2. Porovnání aktivity EROD po expozici 42 dnů.	23
Graf 3. Porovnání aktivity MROD po expozici 21 dnů.	23
Graf 4. Porovnání aktivity MROD po expozici- 42dnů.	24
Graf 5. Porovnání aktivity PROD po expozici 21 dnů.	25
Graf 6. Porovnání aktivity PROD po expozici- 42 dnů.	25

### 10.4. Přílohy

Příloha 1. Vzorkování jaterní tkáně.	34
Příloha 2. Fixace vzorků kapalným dusíkem.	34
Příloha 3. Mechanická homogenizace jaterních vzorků.	35
Příloha 4. Příprava homogenizované jaterní tkáně na centrifugaci.	35
Příloha 5. Usazené mikrosomální frakce po druhé fázi centrifugace.	36
Příloha 6. Uchování mikrosomálních vzorků.	36
Příloha 7. Příprava BCA testu.	37
Příloha 8. Destička BCA testu po inkubaci, připravená na kvantifikaci proteinů ve spektrofotometru.	37
Příloha 9. Příprava pro fluorescenčního katalytického testu	38

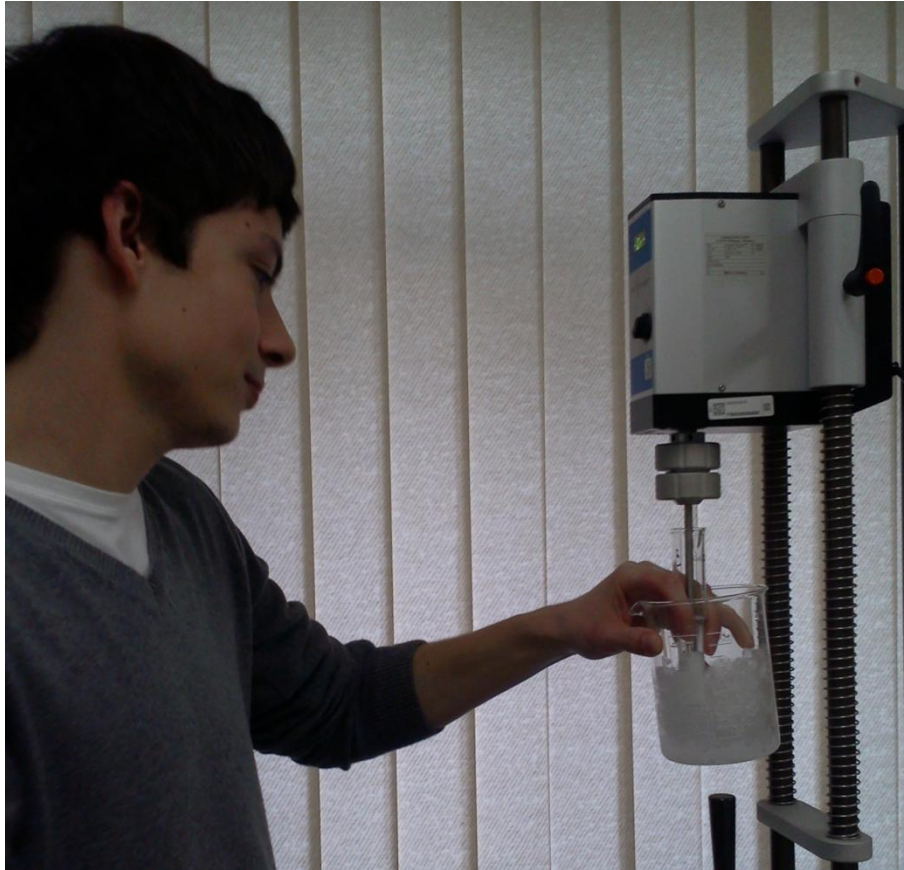
## 11. Přílohy



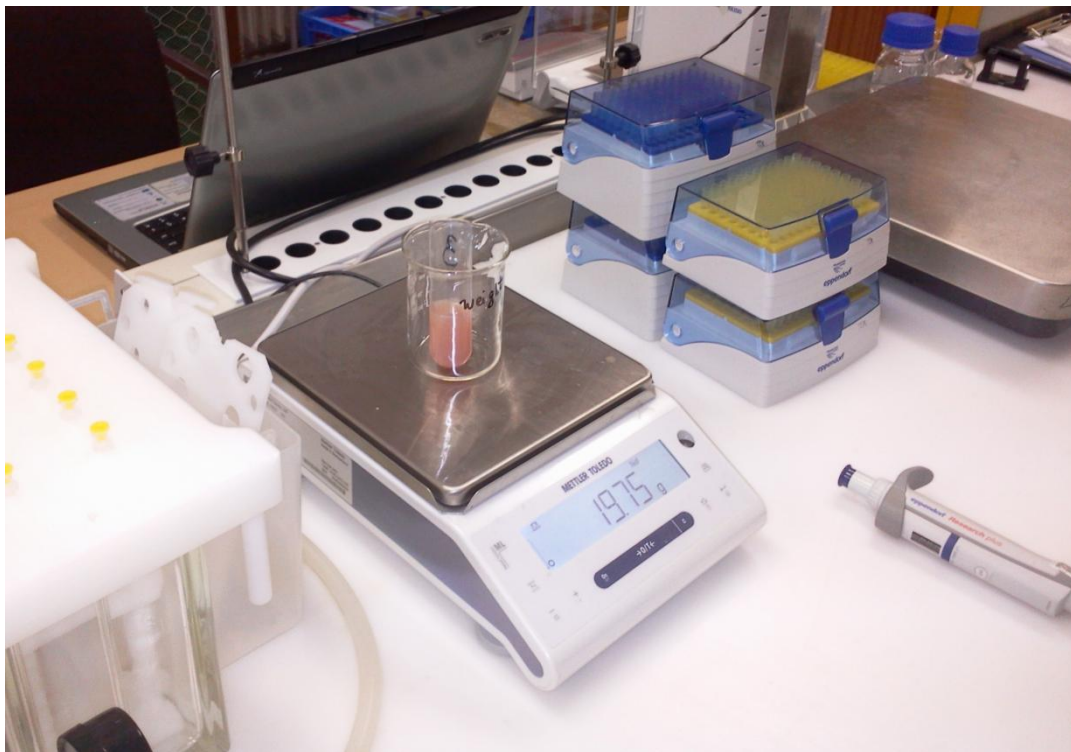
Příloha 1. Vzorkování jaterní tkáně.



Příloha 2. Fixace vzorků kapalným dusíkem.



Příloha 3. Mechanická homogenizace jaterních vzorků.



Příloha 4. Příprava homogenizované jaterní tkáně na centrifugaci.



Příloha 5. Usazené mikrosomální frakce po druhé fázi centrifugace.



Příloha 6. Uchování mikrosomálních vzorků.



Příloha 7. Příprava BCA testu.



Příloha 8. Destička BCA testu po inkubaci, připravená na kvantifikaci proteinů ve spektrofotometru.



## Abstrakt

Farmaka a jejich metabolity jsou polutanty vodního prostředí spojené s naší moderní společností. Cílem této práce bylo získat informace týkající se potenciální nebezpečnosti reziduí atenololu vyskytujícího se v povrchových vodách a jeho vlivu na juvenilní jedince pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) jako modelového organismu. Vliv environmentálních koncentrací atenololu byl sledován *in vivo* pomocí biochemických markerů. V práci bylo ověřeno využití detoxikačního komplexu jaterních hemoproteinů náležících do skupiny cytochromů P450 pro hodnocení účinků expozice v přirozených podmínkách. Konkrétně se jednalo o reakce EROD (CYP 1A), MROD (CYP 1A2) a PROD (CYP 2B). Výsledky experimentu neprokázaly vztah, mezi enzymatickou aktivitou výše zmíněných reakcí a expozicí beta-blokeru atenololu. Z této skutečnosti plyne, že reakce EROD, MROD ani PROD nelze použít jako biomarkery odrážející metabolickou odpověď ryb po expozici tímto xenobiotikem.

Klíčová slova: Atenolol, Biomarker, Cytochrom P450, pstruh duhový.

## Abstract

Pharmaceuticals and their metabolites are emerging pollutants of aquatic environment associated with our modern society. The aim of this bachelor's thesis was to get information about potential hazard levels of atenolol occurring in surface waters and its effects on juveniles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a model organism. The effect of environmentally relevant concentrations of atenolol was assessed *in vivo* by using biochemical markers. Activity of enzymatic reactions EROD (CYP 1A), MROD (CYP 1A2) and PROD (CYP 2B) were tested as possible biomarkers. The experimental work aimed to verify whether selected cytochromes P450 are suitable to evaluate the effects of fish exposure in natural conditions. The results of present experiment did not show a relationship between the enzymatic activity and exposure to beta-blocker atenolol. This fact implies that the enzymatic reaction EROD, MROD and PROD cannot be useful as biomarkers reflecting a metabolic response of fish after exposure to this xenobiotic.

Keywords: Atenolol, Cytochrome P450, Biomarker, Rainbow trout.