

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod



HABILITAČNÍ PRÁCE

Vliv komunálního znečištění na vodní organismy se
zaměřením na bioakumulaci a metabolom

Ing. Kateřina Grabicová, Ph.D.

VODŇANY

2025

Obsah

1. Úvod.....	3
1.1. Koncentrace léčiv a jejich metabolitů ve vodním ekosystému	5
1.2. Bioakumulace léčiv ve vodních organismech	8
1.3. Vliv léčiv na vodní organismy	12
1.4. Cíle práce	15
2. Výsledky a diskuze	16
2.1. Léčiva přítomná ve vodních organismech – metoda jejich stanovení	16
2.2. Sledování léčiv ve vodních organismech	18
2.3. Změny metabolomu způsobené vlivem léčiv	28
3. Závěry	33
3.1. Význam výsledků pro vědní obor a možnosti dalšího výzkumu	33
3.2. Využití dosažených výsledků při výuce.....	34
3.3. Využití dosažených výsledků pro praxi	35
4. Seznam použité literatury.....	36
5. Seznam prací autorky, které jsou součástí habilitační práce.....	46
6. Český abstrakt	49
7. Anglický abstrakt	50
8. Poděkování	51
9. Přílohy	Chyba! Záložka není definována.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou habilitační práci „Vliv komunálního znečištění na vodní organismy se zaměřením na bioakumulaci a metabolom“ vypracovala samostatně s použitím dostupných literárních zdrojů a výsledků vlastní vědecké práce. K sestavení habilitační práce jsem využila vybrané originální výsledky, které jsem společně se spoluautory uvedenými v jednotlivých publikacích získala v průběhu své vědecké kariéry.

Ve Vodňanech, dne 12. května 2025

Ing. Kateřina Grabicová, Ph.D.

1. Úvod

Rychlý růst životní úrovně lidské populace v posledním století vede k zásadnímu prodloužení doby dožití. Z velké míry je to také zásluhou významných pokroků ve vědě, včetně medicíny a farmakologie. Množství léčiv a také prostředků denní péče jako jsou detergenty, syntetické vůně, barviva a konzervanty se tak neustále zvyšuje. Díky antropogenní činnosti se pak do vodního prostředí dostávají tyto cizorodé organické sloučeniny. Léčiva jsou z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností širokou a rozmanitou skupinou sloučenin. Jednou z možností jejich systemizace a inventarizace je rozdělení do tzv. terapeutických skupin podle ATC (anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace). Některé z těchto skupin podléhají více či méně přísné regulaci, jako příklad mohou sloužit antibiotika, která jsou regulována, aby jejich nadužíváním nedocházelo k vývoji kmenů bakterií odolných vůči těmto léčivům. Použití jiných skupin sleduje socio-ekonomické trendy ve společnosti jako je např. stárnutí populace.

Po požití se léčiva v lidském těle částečně metabolizují. Po této přeměně jsou zbylé původní látky a jejich metabolity vyloučeny a s odpadní vodou vstupují do čistíren odpadních vod (ČOV). Tradičních technologické postupy, tzn. mechanicko-biologického čištění vod, jsou podle stávající legislativy zaměřeny zejména na živiny (organický uhlík, dusík a fosfor) a některé cizorodé látky. Tyto postupy však nejsou optimalizovány pro mikropolutanty, mezi které patří i léčiva jejich metabolity, a proto se tyto sloučeniny dostávají do povrchových vod, kde mohou působit na vodní organismy po celý jejich život. Vzhledem k velkému počtu účinných látek je nutné zúžit (prioritizovat) počty sloučenin na ty, které jsou nejvíce relevantní. Bylo vyvinuto několik strategií (Brooks a kol., 2009; Gunnarsson a kol., 2008; Huggett a kol., 2003), které jsou založeny na předpokladu, že sloučeniny se stejným receptorem u lidí i ryb budou mít podobný efekt při obdobných koncentračních hladinách v plazmě. Tento koncept je také nazýván efektovým poměrem (effect ratio), který je založen na znalosti terapeutické koncentrace v lidské plazmě a predikci rovnovážné koncentrace v rybí plazmě. Odhad

koncentrace v rybí plazmě pak byl proveden na základě predikovaných koncentrací 500 léčiv ve vodě (Fick a kol., 2010b) a pro cca 25 léčiv také ověřen analýzou vody a rybí plazmy (Fick a kol., 2010a).

Zatímco multireziduální metody analýzy vody byly po roce 2010 již vyvinuty a v naší laboratoři používané (Grabic a kol., 2012; Lindberg a kol., 2014), analýzy biologických vzorků (plazmy a tkání ryb) nebyly dostupné pro požadované velmi nízké hladiny cílových látek ve složité biologické matici.

Prvním krokem pro sledování přenosu léčiv do vodních organismů a jejich osud v biotě tedy byl vývoj vhodné extrakční a analytické metody. Vyvinuli jsme a validovali proto relativně jednoduchou, robustní a efektivní extrakční a analytickou metodu pro stanovení širokého rozsahu léčiv a jejich metabolitů (**příloha 1** – Grabicová a kol., 2018). Dalším, neméně důležitým parametrem k získání věrohodných výsledků je metodika vzorkování. Tím, jak jsou výsledky ovlivněny různým přístupem ke vzorkování, jsme se zabývali v **příloze 2** (Grabicová a kol., 2022a).

V dalších studiích jsme se pak zaměřili na bioakumulaci jednotlivých léčiv a jejich metabolitů ve vodních organismech pocházejících ze stojatých a tekoucích vod. Jednalo se o:

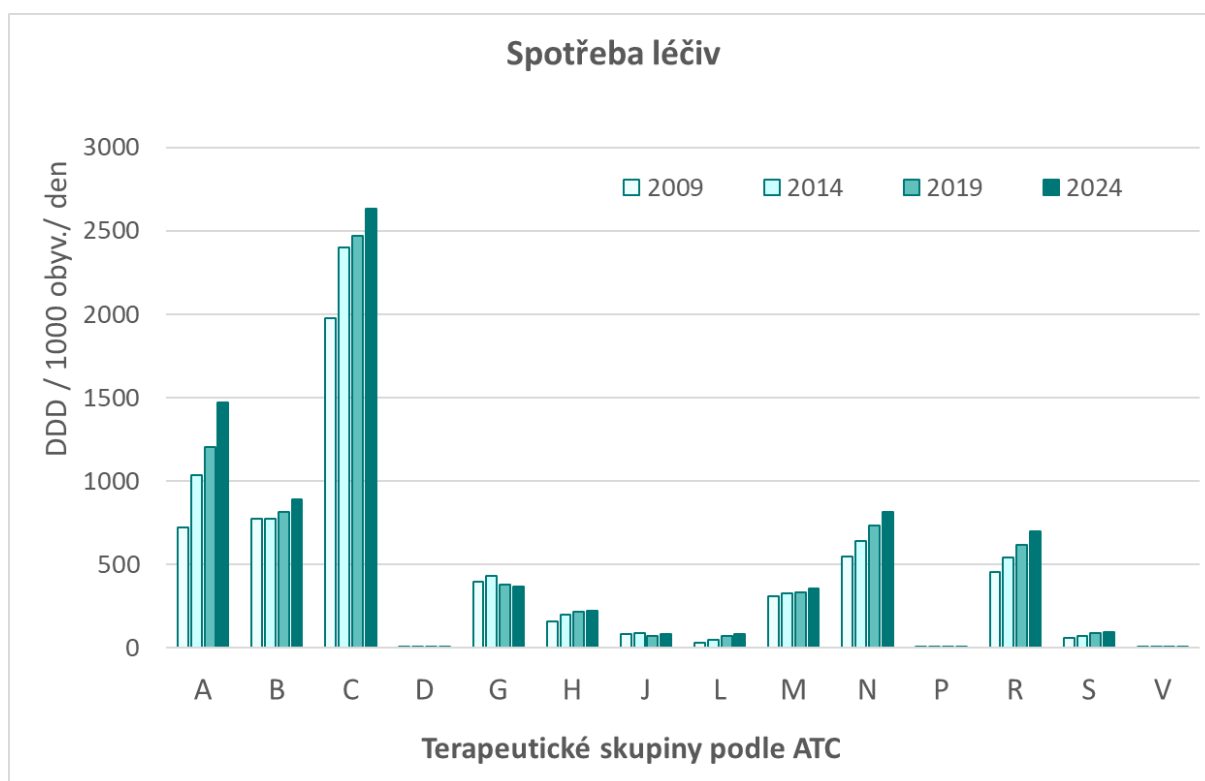
- Bioakumulaci 26 léčiv a metabolitů v bentických organismech exponovaných v mesokosmovém měřítku po jednorázové aplikaci směsi léčiv (**příloha 3** – Grabicová a kol., 2024);
- Bioakumulaci 80 léčiv a jejich metabolitů v jednotlivých vývojových stádiích tří druhů bezobratlých organismů (jedic druhu *Siplonurus* a chrostíků *Oligotricha* a *Limnephilus*) exponovaných odpadní vodě (**příloha 4** – Let a kol., 2025);
- Bioakumulaci 67 léčiv a metabolitů v bentických organismech, juvenilních rybách a dospělých jelce tlouště (*Squalius cephalus*, svalovina a plazma) pocházející z 10 toků ČR (**příloha 5** – Grabicová a kol., 2022b);

- Bioakumulaci 19 psychoaktivních látek v hepatopankreatu, ledvinách a mozku dospělých ryb jelce tlouště a homogenátu juvenilních ryb odlovených na 10 lokalitách ČR (**příloha 6** – Grabicová a kol., 2020a);
- Bioakumulaci 11 psychoaktivních léčiv v jednotlivých tkáních pstruha obecného (*Salmo trutta m. fario*) přesazeného do toku s vysokým podílem vyčištěné odpadní vody po dobu 1, 3 a 6 měsíců (**příloha 7** – Grabicová a kol., 2017);
- Bioakumulaci 66 léčiv a metabolitů v jednotlivých tkáních (játra/hepatopankreas, ledviny, mozek, svalovina a plazma) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a candáta obecného (*Sander lucioperca*) exponovaných po dobu šesti měsíců v rybníku s vysokým znečištěním (**příloha 8** – Grabicová a kol., 2020b).

Tyto látky se ve vodních organismech mohou nejen bioakumulovat, ale vzhledem ke své biologické aktivitě také ovlivňovat jejich metabolismus. Vlivem studovaných psychoaktivních léčiv nebo jejich reálných směsí na metabolismus ryb jsme se zabývali v posledních dvou studiích zahrnutých do habilitační práce (**příloha 9** – Horký a kol., 2021, **příloha 10** – Giebułtowicz a kol., 2024).

1.1. Koncentrace léčiv a jejich metabolitů ve vodním ekosystému

Vlivem antropogenní činnosti je vodní ekosystém znečištěn různými cizorodými látkami organického původu (aus der Beek a kol., 2016; Fairbairn a kol., 2016; Fekadu a kol., 2019; Klatte a kol., 2017; Roberts a kol., 2016). Do této kategorie spadají i léčiva a jejich metabolity, jejichž spotřeba v posledních patnácti letech stoupá, jak je vidět z grafu na obrázku 1.



Obrázek 1. Spotřeba léčiv (doporučené denní dávky na 1000 obyvatel a den) v letech 2009, 2014, 2019 a 2024 rozdělená podle terapeutických skupin podle ATC (anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv). Zkratky terapeutických skupin: A ... trávicí ústrojí a metabolismus, B ... krev a krev tvořící orgány, C ... kardiovaskulární systém, D ... dermatologika, G ... urogenitální systém a pohlavní hormony, H ... systémové hormonální přípravky kromě pohlavních hormonů a inzulínu, J ... protinfekční léčiva pro systémové použití, L ... antineoplastika a imunomodulující léčiva, M ... muskuloskeletální systém, N ... nervová soustava, P ... antiparazitika, insekticidy, repelenty, R ... dýchací ústrojí, S ... smyslové orgány, V ... různé. Data pocházejí ze statistik Státního úřadu pro kontrolu léčiv (www.sukl.cz).

Celková spotřeba léčiv narostla za pět let o 10 %, za posledních patnáct let dokonce o 40 % (www.sukl.cz). Nejvyšší nárůst byl zaznamenán v léčivech zařazených do skupiny antineoplastika a imunomodulující léčiva (tzn. léčiva používaná na léčbu rakoviny a imunitního systému jako jsou antihistaminika, imunosupresiva, imunostimulancia, monoklonální protilátky a očkování; tabulka 1). Spotřeba některých léčiv naopak za posledních patnáct let klesla, a to léčiva ze skupiny urogenitální systém a pohlavní hormony (-7 %) a protinfekční léčiva pro systémové použití (-3 %).

Tabulka 1. *Nárůst spotřeby léčiv mezi lety 2009-2024. Data pocházejí ze statistik Státního úřadu pro kontrolu léčiv (www.sukl.cz).*

Terapeutické skupiny podle ATC	Zkratky	Nárůst 2024 vs 2009 [%]	Nárůst 2024 vs 2014 [%]	Nárůst 2024 vs 2019 [%]
Trávicí ústrojí a metabolismus	A	104	42	22
Krev a krvetvorné orgány	B	15	16	9
Kardiovaskulární systém	C	33	10	7
Dermatologika	D	49	53	62
Urogenitální systém a pohlavní hormony	G	-7	-14	-3
Systémové hormonální přípravky kromě pohlavních hormonů a inzulinu	H	42	13	3
Protiinfekční léčiva pro systémové použití	J	-3	-9	10
Antineoplastika a imunomodulující léčiva	L	166	80	16
Muskuloskeletální systém	M	15	10	8
Nervová soustava	N	48	27	11
Antiparazitika, insekticidy, repelenty	P	58	6	-1
Dýchací ústrojí	R	53	29	13
Smyslové orgány	S	57	26	5
Různé	V	66	14	-28
Suma		40	18	10

Jak již bylo napsáno v úvodu, léčiva jsou po aplikaci částečně metabolizována a společně s metabolity vyloučena z těla. Následně se přes odpadní vodu dostávají do čistíren odpadních vod. Stávající čistírenské technologie nejsou zaměřené na odstraňování cizorodých látek na stopových koncentracích (nanogramy až mikrogramy na litr), neboť ve vyčištěné odpadní vodě jsou regulovanými parametry pouze obsahy makropolutantů jako jsou živiny a pro průmyslové čistírny i specifické prvky a sloučeniny. V současné době však byla schválena revize zákonů a směrnic o odpadních vodách (Vodní zákon 254/2001 Sb., Směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod a Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění

odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech). V rámci těchto změn by ve vyčištěné odpadní vodě měla být sledována koncentrace 12 polutantů, z čehož je 10 léčiv (amisulprid, citalopram, diklofenak, hydrochlorothiazid, irbesartan, kandesartan, karbamazepin, klarithromycin, metoprolol a venlafaxin; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022D1307>). Nicméně finální implementace této směrnice na národní úrovni teprve probíhá.

A tak se léčiva a jejich metabolity ve vodním ekosystému vyskytují na koncentračních hladinách od ng/l do µg/l (Desbiolles a kol., 2018; Golovko a kol., 2014a; Golovko a kol., 2014b; Kelly a Brooks, 2018; Kristofco a Brooks, 2017; Mole a Brooks, 2019; Schroder a kol., 2016; Sehonova a kol., 2018) a jejich přítomnost je známkou urbanizovaných vod (Brooks, 2018).

1.2. Bioakumulace léčiv ve vodních organismech

Aby bylo možné zhodnotit, zda a které cizorodé látky se ve vodních organismech biokoncentrují (expoziční cesta pouze přes vodu) či bioakumulují (všechny expoziční cesty, Alexander, 1999), je nutné použít nejen citlivou, selektivní a robustní multireziduální analytickou metodu (Huerta a kol., 2012), ale i správně odebrat a připravit daný biologický vzorek (Dimpe a Nomngongo, 2016; Grabicová a kol., 2020b). V současné době je za „zlatý standard“ (state of art) analytickou metodu pro stanovení mikropolutantů v komplexní biologické matrici považována vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s tandemovou hmotnostní detekcí. Zatímco nejrozšířenějšími hmotnostními spektrometry jsou trojitě kvadrupóly či kombinace kvadrupólu s analyzátozem doby letu (Yue a kol., 2024), vysoko-rozlišující hmotnostně-spektrometrická detekce (HRMS) nabývá na důležitosti hlavně vzhledem k vyšší selektivitě detekce (Bussy a kol., 2016; Grabicova a kol., 2018).

Nieméně všechno začíná u odběru vzorku – pokud je vzorek špatně odebrán, ani nejlepší analytická metoda „nevykouzlí“ správné výsledky. Při odběru biologických vzorků (ryb) záleží na prodlevě mezi odlovem organismu a odběrem vzorku, na médiu, ve kterém je organismus (ryba) převážen (voda z lokality vs čistá voda), na způsobu anestezie použité před odběrem vzorku i na podmínkách skladování vzorku (doba a teplota) od odběru do jeho přípravy k analýze (Grabicová a kol., 2022a; Miller a kol., 2018). Odběr vzorků při terénních studiích ale není většinou v literatuře uveden (shrnutí v tabulce 1 v článku Grabicová a kol., 2022a) a větší důraz je kladen na analytickou metodu než na dokumentaci a standardizaci odběru vzorků (Miller a kol., 2018). Dalším kritériem pro získání důvěryhodného výsledku je příprava vzorků. Cílem přípravy biologických a environmentálních vzorků je zkoncentrování cílového analytu v extraktu a snížení komplexity vzorku v relativně krátkém čase s ohledem na koncept zelené (udržitelné) chemie. Příprava vzorku tedy zahrnuje několik důležitých kroků jako je např. lyofilizace, homogenizace, extrakce, filtrace a centrifugace vzorku (Baduel a kol., 2015; Dimpe a Nomngongo, 2016; Nunez a kol., 2017; Perez-Fernandez a kol., 2017; Sanchez-Prado a kol., 2015).

Ne všechna léčiva, která se vyskytují ve vodě, mají schopnost bioakumulovat se ve vodních organismech. Záleží na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Bioakumulují se sloučeniny s hydrofóbnější povahou, tzn. sloučeniny, které mají hodnotu $\log K_{ow}$ (rozdělovací koeficient oktanol-voda) vyšší než 4 (Constantine a kol., 2024). Zda má léčivo schopnost bioakumulovat ve vodním organismu můžeme zhodnotit i pomocí biokoncentračního (BCF) nebo bioakumulačního faktoru (BAF), kdy koncentraci daného analytu nalezeného ve vodním organismu vydělíme koncentrací ve vodě. Rozdíl mezi těmito dvěma faktory je ve způsobu příjmu cizorodé látky. Pokud je daná látka přijímána organismy pouze vodou, jedná se o BCF, pokud je v expoziční cestě zahrnut i příjem potravou či přes sediment, jedná se o BAF (OECD, 2002). Podle výše zmíněné Evropské směrnice je použití experimentálně zjištěného BCF/BAF

vhodnější pro posouzení schopnosti sloučeniny bioakumulovat ve vodním organismu než hodnoty odhadnuté výpočtem ze známých vlastností sloučenin (např. QSAR, quantitative structure-activity relationship, Vilar a Costanzi, 2012). Sloučenina má schopnost biokoncentrace/bioakumulace, když je $BCF/BAF > 500$ (OECD, 2002). Stanovisko americké Agentury pro ochrany životního prostředí (US EPA) je benevolentnější, sloučenina je považována za bioakumulativní s $BCF/BAF > 1000$ a za velmi bioakumulativní s $BCF/BAF > 5000$ (Gobas a kol., 2009; US EPA, 2012).

V poslední době se výzkum zaměřuje na další parametr známý z lékařské farmakologie, a to zdánlivý distribuční objem (V_D , apparent distribution volume), který je vypočítán z poměru množství analytu v homogenátu celého těla (body burden) ku koncentraci dané látky v plazmě. Tento farmakokinetický parametr je více spolehlivý pro odhad bioakumulace ionizovatelných sloučenin než výše zmíněný $\log K_{ow}$ (Brooks a Steele, 2018; Carter a kol., 2022; Du a kol., 2016; Nichols a kol., 2015).

Bylo zjištěno, že bioakumulace léčiv je rozdílná v závislosti na druhu tkáně (shrnuje např. v Gómez-Regalado a kol., 2023) – léčiva se nejvíce bioakumulují v játrech/hepatopankreatu a ledvinách, orgánech zodpovědných za metabolismus a vyloučení cizorodých látek, dále pak v mozku, kde jsou nalézány převážně psychoaktivní látky s cílovým působením právě v této tkáni. Nejnížší koncentrace léčiv a jejich metabolitů jsou nalézány v plazmě a svalovině, což je pro konzumenty ryb a celkově pro akvakulturu dobrou zprávou (Arnnok a kol., 2017; Bertram a kol., 2022; Brooks a kol., 2005; Grabicova a kol., 2017; Grabicová a kol., 2020b; Grabicova a kol., 2014; Manjarrés-López a kol., 2024; Manjarrés-López a kol., 2023; Sims a kol., 2024). Někteří autoři však našli vyšší koncentrace v rybí plazmě v porovnání s ostatními tkáněmi (Castillo a kol., 2024b), což opět může být způsobeno metodikou odběru vzorků (Grabicová a kol., 2022a). Pro monitorování vodního prostředí, pro zhodnocení rizika přítomnosti léčiv na

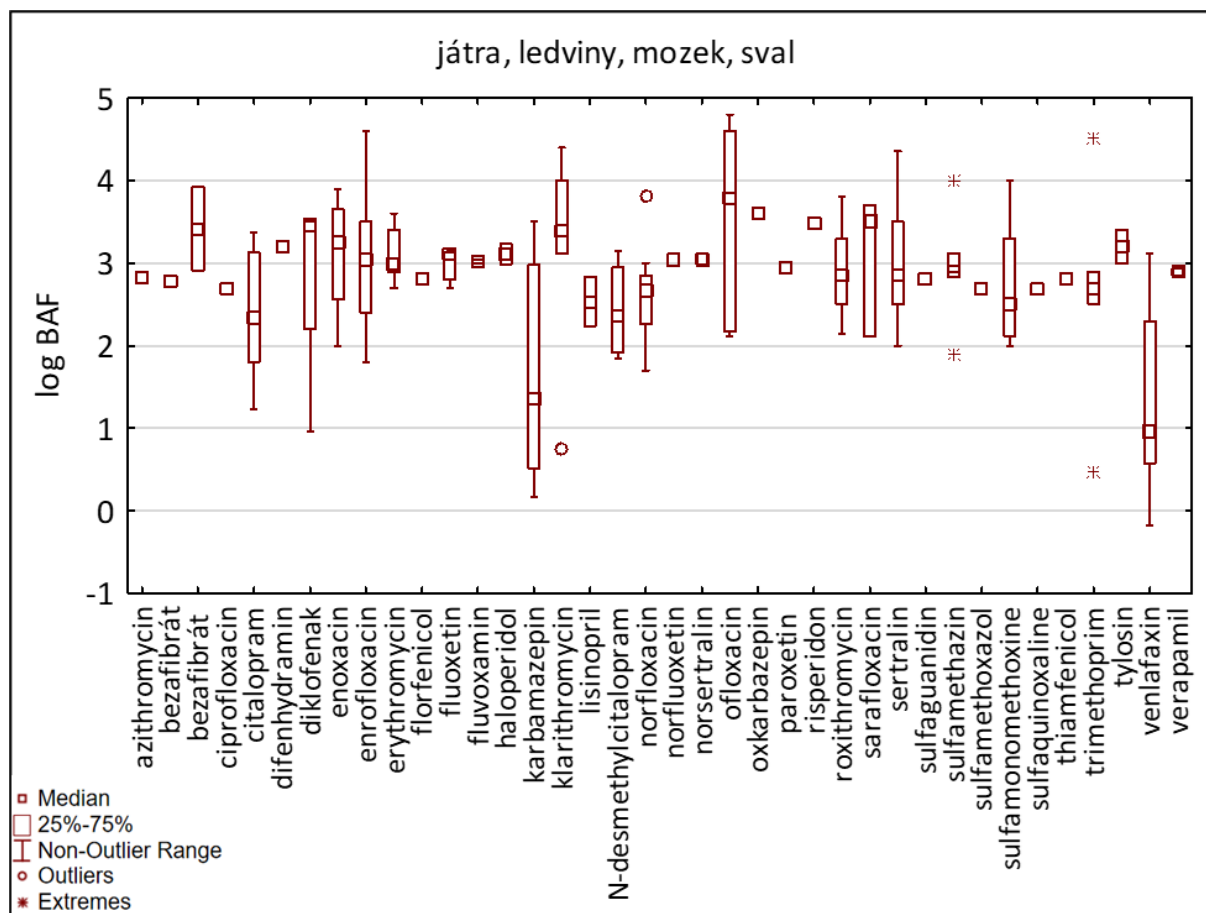
vodní organismy a porovnání mezi studiemi je proto důležitý výběr vhodné matrice (Castillo a kol., 2024b).

Rozdíly v bioakumulaci byly nalezeny i mezi jednotlivými druhy ryb (Grabicová a kol., 2020b; Sims a kol., 2024) a bezobratlých (Grabicová a kol., 2015), kdy záleží na způsobu příjmu potravy, ale i na složitosti a rychlosti metabolismu.

Bioakumulace se liší u organismů na jiné trofické úrovni – organismy na nižší trofické úrovni obecně bioakumulují léčiva a metabolity více v porovnání s organismy na vyšší trofické úrovni (Du a kol., 2014; Haddad a kol., 2018; Lagesson a kol., 2016; Miller a kol., 2018; Rojo a kol., 2019; Ruan a kol., 2020; Ruhi a kol., 2016; Zenker a kol., 2014). Toto ovšem neplatí pro všechna léčiva, najdou se i taková, která jsou přítomná ve vyšší koncentraci u vrcholového predátora v porovnání s jeho kořistí (pak hovoříme o schopnosti biomagnifikace) – jedná se například o benzodiazepin oxazepam (Lagesson a kol., 2016) či antiepileptikum karbamazepin (Du a kol., 2014). Pokud porovnáme koncentrace v plazmě mořské ryby albuly liščí (*Albula vulpes*) a homogenátech celých těl její kořisti, koncentrace tří léčiv, antihistaminika hydroxyzinu, antidepresiva amitriptylinu a kardiovaskulárního irbesartanu, byla vyšší v predátorovi oproti kořisti (Castillo a kol., 2024a).

Mezi nejvíce studovaná léčiva z hlediska bioakumulace patří antihistaminikum difenhydramin, psychoaktivní léčiva karbamazepin, venlafaxin, citalopram, sertralin a jeho metabolit norsertralin, fluoxetin a norfluoxetin, nesteroidní protizánětlivé léčivo diklofenak a antibiotikum sulfamethoxazol (Gómez-Regalado a kol., 2023). Souhrn BAF získaných z terénních studií je znázorněn na obrázku 2. Podle publikovaných dat z terénních studií (studie zahrnuté v tomto grafu jsou uvedeny v popisu obrázku 2) mají nejvyšší bioakumulační faktor antibiotika ve svalovině ryb pocházejících z čínských řek (Hu a kol., 2023). V Evropských studiích jsou hodnoty BAF ve svalovině publikovaných léčiv <1000 ve všech případech. Nejvyšší BAF v ledvinách byl nalezen pro N-desmethylocitalopram, metabolit antidepresiva

citalopramu (Grabicová a kol., 2020b), v játrech a mozku pro antidepresivum sertralin (Sims a kol., 2024).



Obrázek 2. Bioakumulační faktory (BAF) léčiv a jejich metabolitů – terénní studie, 2020-2025.

BAF = koncentrace v tkáni [ng/g] / koncentrací ve vodě [ng/l] * 1000. Do grafu jsou zahrnuta pouze léčiva s minimálně jednou hodnotou BAF > 500 (což odpovídá log BAF > 2,7) a s detekční frekvencí > 50 %. Graf byl připraven z dat uvedených ve studiích: Grabicová a kol., 2020a; Grabicová a kol., 2020b; Hu a kol., 2023; Ivankovic a kol., 2023; Manjarrés-López a kol., 2024; Sims a kol., 2024; Tanoue a kol., 2020; Weng a kol., 2023; Wu a kol., 2021; Zhang a kol., 2022.

1.3. Vliv léčiv na vodní organismy

Na rozdíl od laboratorních a akvarijních experimentů, kdy se k vyvolání efektu používá limitované množství sloučenin o definované koncentraci, se v životním prostředí vyskytuje celá řada cizorodých látek se širokým rozsahem fyzikálně-chemických vlastností (nejen ze skupiny léčiv a jejich metabolitů). Tyto látky mohou mít navzájem synergický/antagonický účinek, který není možné předvídat na základě laboratorních experimentů. Ani stálost jednotlivých

léčiv v laboratorních a přirozených podmínkách není stejná, vliv na stabilitu/degradaci má řada abiotických faktorů jako je teplota, UV záření, přítomnost dalších organických složek (nutrientů) či přítomnost/absence sedimentu (Fahlman a kol., 2018). Antropogenní organické znečištění má proto odlišný vliv na vodní organismy exponované v laboratorních podmínkách v porovnání s přirozeným ekosystémem (Vossen a kol., 2020b).

Vodní organismy vystavené působení léčiv vykazují odlišnosti už během jejich vývoje, který je pomalejší a často jsou pozorovány deformace a vyšší mortalita (Kim a kol., 2023; Qiang a kol., 2016; Yang a kol., 2021; Zhang a kol., 2024; Zhang a kol., 2025). Znečištění vodního prostředí ovlivňuje i reprodukční funkce exponovaných organismů (shrnutí v Aulsebrook a kol., 2020; Świacka a kol., 2022). Poměr pohlaví u exponovaných skupin není vyrovnaný v porovnání s kontrolními skupinami, vyskytuje se vyšší podíl samic (Wang a kol., 2020; Zhang a kol., 2025). Další změny se týkají změn v histologii jejich orgánů (Beghin a kol., 2022; Hanson a kol., 2021; Hodkovicova a kol., 2022; Naslund a kol., 2017; Pérez a kol., 2018; Priyadarshinee a kol., 2023; Rodrigues a kol., 2019; Sancho Santos a kol., 2020; Sancho Santos a kol., 2023; Vaclavik a kol., 2020; Zhong a kol., 2021), změn v biochemických parametrech (Hodkovicova a kol., 2022; Steinbach a kol., 2016; Vaclavik a kol., 2020) i zvýšení markerů oxidativního stresu (Beghin a kol., 2022; Bisognin a kol., 2020; Gayen a kol., 2023; Guerreiro a kol., 2025; Hodkovicova a kol., 2022; Koubová a kol., 2025; Koubová a kol., 2022; Liang a kol., 2022; Priyadarshinee a kol., 2023; Van Nguyen a kol., 2023; Van Nguyen a kol., 2022).

Metabolomika je jedním z nových „omics“ přístupů, který studuje, jak endogenních metabolity (na úrovni orgánů či buněk) odpovídají na vnější stresory a podněty (Bundy a kol., 2009; Skelton a kol., 2014). Souhrn metabolitů formuje metabolom, který je výsledkem genové exprese a konečných produktů metabolismu (Hani a kol., 2021; Krumsiek a kol., 2016). S tímto pojmem souvisí i pojem exposom, který popisuje sloučeniny, se kterými se jedinec setkává v průběhu života a jak expozice těmto látkám ovlivňuje jeho zdraví a biologické aktivity (Wild,

2005). Zhodnocením/stanovením/zkoumáním metabolomu a exposomu získáme celkový obraz o vlivu antropogenního znečištění okolního prostředí na vodní organismy (Bedia, 2022; Dumas a kol., 2020; Hani a kol., 2021). Laboratorní expozice environmentálními koncentracemi léčiv ovlivnily metabolom/exposom vodních organismů na různých trofických úrovních v porovnání s kontrolou (Brew a kol., 2020; Horký a kol., 2021; Sancho Santos a kol., 2023). Změny v metabolomu/exposomu byly popsány i u vodních organismů exponovaných v reálném prostředí či u volně žijících organismů odlovených v lokalitách, které jsou ovlivněné vyčištěnou odpadní vodou (Berlitz-Barbier a kol., 2018; Giebułtowicz a kol., 2024; Hani a kol., 2021; Koubková a kol., 2025; Koubková a kol., 2022; Previšić a kol., 2020; Späth a kol., 2022).

Znečištění vodního prostředí se u vodních bezobratlých i obratlovců projevuje i změnami v jejich chování. Byly popsány změny ve vztazích predátor-kořist (Bláha a kol., 2019; Bose a kol., 2022; Martin a kol., 2017; Vossen a kol., 2020a), změny ve frekvenci krmení (Brodin a kol., 2013; Hubena a kol., 2020), změny na úrovni sociálních interakcí jako je aktivita (Aich a kol., 2025; Brodin a kol., 2013; Brodin a kol., 2014; Chen a kol., 2021; Hossain a kol., 2019; Kellner a kol., 2016; Polverino a kol., 2023; Sancho Santos a kol., 2023; Späth a kol., 2022; Sundin a kol., 2019; Świacka a kol., 2022; Vaclavik a kol., 2020), agresivita (Hubená a kol., 2021, 2023; McCallum a kol., 2017), statečnost (Bikker a kol., 2024; Brodin a kol., 2013; Cervený a kol., 2020; Martin a kol., 2019; Saaristo a kol., 2019; Santos a kol., 2021; Sundin a kol., 2019), objevování (Kellner a kol., 2016; Santos a kol., 2021) či socializace (Brodin a kol., 2013). Ovlivněny byly i cirkadiánní rytmy (Melvin, 2017; Melvin a kol., 2016), reprodukční chování (Fursdon a kol., 2019; Wiles a kol., 2020) a migrační strategie (Brand a kol., 2025; Klaminder a kol., 2019). Za tyto změny mohou být zodpovědná psychoaktivní léčiva, která se bioakumulují v mozku necílových organismů (Duarte a kol., 2023; Grabicova a kol., 2017; Grabicova a kol., 2014; Horký a kol., 2021; Huerta a kol., 2016; Sancho Santos a kol., 2023) a fungují tam podobně jako u cílových pacientů. Některé studie se zabývají i chováním

organismů při následné depuraci, kdy došlo k rychlé obnově původního chování (Sundin a kol., 2019).

Rozdílné chování (reakce na poplachový feromon) bylo pozorované po expozici volně odlovených danií pruhovaných (*Danio rerio*) v porovnání s danií laboratorně chovanými, kdy došlo k adaptaci na laboratorní podmínky (Vossen a kol., 2020b). Laboratorně chované druhy ryb neposkytují tedy relevantní informace o změnách chování, které jsou plně přenositelné na přirozený ekosystém.

K simulaci bioakumulace léčiv vodními organismy využitelné pro další ekotoxikologické výzkumy a sledování ryb v přirozeném prostředí se vědci v nedávné době zaměřili na nový přístup, a to zavedení implantátu s pomalu uvolňujícím se léčivem/léčivou injekčně přímo do dutiny břišní (Bertram a kol., 2025; Brand a kol., 2024; Brand a kol., 2025).

Kromě změn pozorovaných na individuální úrovni dochází i k ovlivnění vzájemných interakcí a složení společenstva, což může vést k ekologickým důsledkům spojeným s dysbalancí volně žijících organismů a s rozpadem celého vodního ekosystému (Berger a kol., 2016; Brodin a kol., 2014; Duchet a kol., 2024; Saaristo a kol., 2018; Time_to_get_clean, 2015).

1.4.Cíle práce

Cílem této práce bylo i) vyvinout a validovat metodu pro multireziduální analýzu léčiv a jejich metabolitů v biologické matrici, ii) získat nové informace o bioakumulaci těchto mikropolutantů ve vodních organismech na různé trofické úrovni z rozdílných prostředí a iii) popsat změny v metabolomu a exposomu v rybách pocházejících/exponovaných z prostředí s výskytem léčiv.

Výsledky výše zmíněných cílů jsou stručně shrnuty v následujících kapitolách a podrobně popsány v publikovaných článcích, které jsou přílohou této habilitační práce.

2. Výsledky a diskuze

2.1. Léčiva přítomná ve vodních organismech – metoda jejich stanovení

Jak již bylo popsáno výše v úvodu práce, k získání relevantních výsledků (s následným vyvozením závěrů a eventuálního zhodnocení rizik) je potřeba použít citlivou, selektivní a ověřenou metodu stanovení. V první studii (Grabicova a kol., 2018, **příloha 1**) jsme se zaměřili na vývoj robustní jednokrokové extrakční metody pro následnou multireziduální LC-HRMS (kapalinová chromatografie s vysoko-rozlišující hmotnostně-spektrometrickou detekcí) analýzu léčiv na environmentálně relevantních koncentračních hladinách. Pro extrakci bylo vyzkoušeno několik organických rozpouštědel v různém poměru, a to acetonitril okyselený kyselinou mravenčí (0,1 %), acetonitril s isopropanolem v objemovém poměru 1:1, 2:1 a 3:1 (vždy okyseleno kyselinou mravenčí, 0,1 %) a acetonitril s ethanolem v poměru 1:1 (také okyseleno kyselinou mravenčí, 0,1 %). Na základě výsledků výtěžnosti se jako nejvhodnější extrakční rozpouštědlo zdála být směs okyseleného acetonitrilu s isopropanolem (3:1), proto byla další validace vyvinuté metody provedena s tímto rozpouštědlem. Validace metody proběhla na pěti tkáních kapra obecného – svalovina, hepatopankreas, ledviny, mozek a plazma. Validováno bylo několik parametrů. Lineární odezva byla prokázána pro většinu analytů v rozmezí kalibrační přímky 0,1-50 ng/ml, pouze pro 11 léčiv ze 74 stanovovaných byla odezva lineární v rozmezí 0,5-50 ng/ml a pro antibiotikum azithromycin jen v rozsahu 5-50 ng/ml. Výtěžnost byla testována na třech koncentračních hladinách (5, 20 a 50 ng/g). Přijatelné výsledky výtěžnosti (60-130 %) splňovalo 63 až 74 léčiv v závislosti na druhu matrice. V případě plazmy kritérium výtěžnosti 60-130 % splňovalo pouze 28-60 léčiv v závislosti na koncentrační hladině, proto pro další validaci a ověření metody bylo pro plazmu použito jiné extrakční rozpouštědlo, a to okyselený acetonitril, kdy se počet léčiv v požadovaném rozsahu výtěžnosti zvýšil na 58-68 léčiv.

Stabilita použité LC metody byla dokumentována pomocí variability retenčního času, která byla nízká (relativní směrodatná odchylka 3,4 % v průběhu analýzy validačních vzorků všech matric). Robustnost metody byla zhodnocena na základě stability odezvového faktoru získaného z bodů kalibrační přímky měřenou na začátku a konci sekvence, kdy nebyly pozorovány rozdíly. Důraz byl kladen i na matricové efekty. Pro těžší tkáně (hepatopankreas, ledviny a mozek) byl pozorován větší vliv matrice (tj. potlačení ionizace) v porovnání s plazmou a svalovinou, kde vliv matrice nebyl tak patrný a když ano, tak došlo spíše ke zvýšení ionizace. Metoda byla ověřena analýzou sady vzorků jednotlivých tkání ryb pocházejících z reálného prostředí. Limity kvantifikace se pohybovaly v rozmezí desetin ng/g až nižších desítek ng/g pro všechna léčiva ve všech matricích.

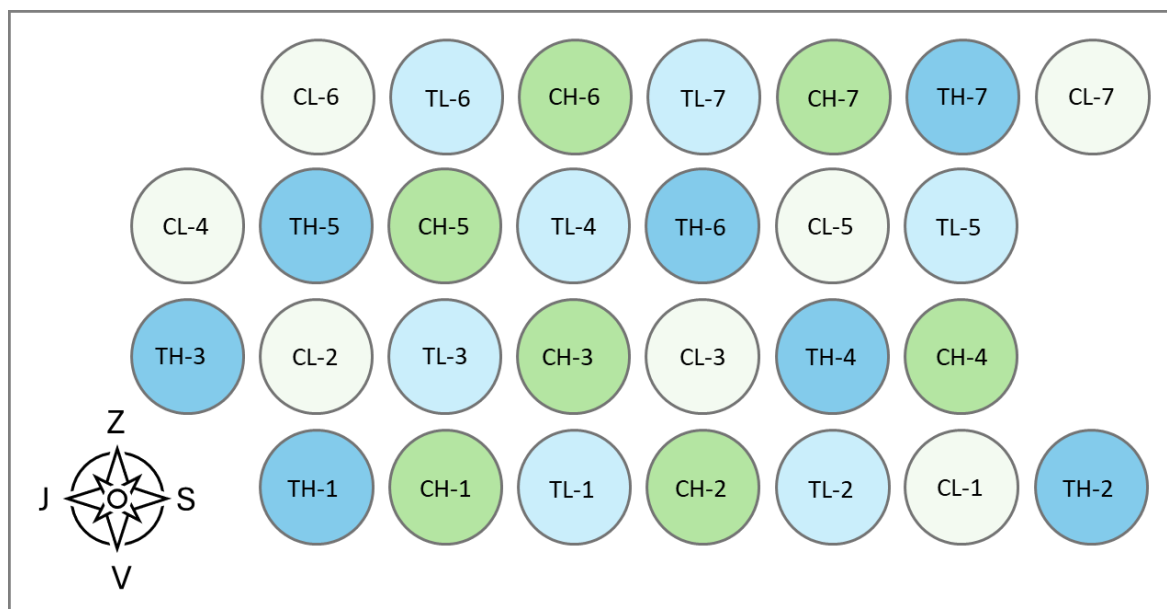
Jedním z nejdůležitějších kroků k získání relevantních výsledků je vhodné a správně provedené vzorkování vzhledem k účelu experimentu. V další studii (Grabicová a kol., 2022a, **příloha 2**) jsme proto chtěli získat odpověď na otázku, zda transport ryb z terénu do laboratoře a opožděné vzorkování ovlivní koncentraci cizorodých látek v plazmě ryb. Po měsíční expozici kapra obecného v rybníku Čezárka, kam ústí vyčištěná odpadní voda z ČOV Vodňany, jsme odlovili 45 ryb. 15 rybám jsme hned po odlovu odebrali krev (k získání plazmy), zbylých 30 jsme převezli do laboratoře a umístili je do kádě s čistou vodou. 15 ryb jsme vzorkovali po 3 hodinách a posledních 15 po 20 hodinách. Zde je potřeba zmínit výhodu odběru plazmy z větších ryb, kdy všechny ryby vzorkování přežily a byly vráceny zpět do rybníka. V plazmě ryb jsme detekovali 15 léčiv a jejich metabolitů (z 81 stanovovaných) a 13 per- a polyfluorovaných sloučenin (z 25 analyzovaných). V případě per- a polyfluorovaných sloučenin přechovávání ryb v čisté vodě a opožděné vzorkování nemělo na jejich koncentraci ani frekvenci detekce vliv. Ovšem v případě léčiv a jejich metabolitů jsme pozorovali významný pokles nejen v koncentraci, ale i v detekční frekvenci u několika léčiv. Statisticky významný pokles ($p < 0,05$) se projevil u kardiovaskulárních bisoprololu, metoprololové

kyseliny (metabolit atenololu a metoprololu) a telmisartanu, u psychoaktivních citalopramu a jeho metabolitu N-desmethylocitalopramu, mirtazapinu, norsertralinu, tramadolu a venlafaxinu. Psychoaktivní trazodon nezměnil koncentraci ani detekční frekvenci. Stejně jako kofein, který patří do skupiny stimulantů, ale zároveň je i složkou některých léčivých přípravků. Antiepileptikum karbamazepin nebyl po třech hodinách v čisté vodě detekován v plazmě ani u jedné ryby, původní koncentrace po odlovu $0,049 \pm 0,011$ ng/ml (detekováno u 11 z 15 testovaných individuí) klesla pod rozmezí limitu kvantifikace 0,023-0,030 ng/ml. Kromě koncentrací léčiv byl ovlivněn i metabolom ryb (Giebułtowicz a kol., 2024, **příloha 10**; více v kapitole 2.3). Z této studie můžeme dovodit, že nejvhodnějším přístupem k získání spolehlivých výsledků o bioakumulaci léčiv v rybí plazmě je odběr plazmy hned po odlovu bez jakýchkoliv prodlev či přechování v čistém médiu.

2.2.Sledování léčiv ve vodních organismech

Přechodovým stupněm mezi plně kontrolovaným laboratorním testem a terénní studií je mesokosmové měřítko. V práci Grabicová a kol. (2024, **příloha 3**) jsme osídlili venkovní mesokosmové bazény několika druhy vodních bezobratlých s rozdílnou preferencí potravy – rozkladače (beruška vodní *Asselus aquaticus*), filtrátory (mlže druhu *Pisidium*), spásáče (mlže druhu *Lymnaea* a *Planorbarius*) a predátory (pijavky *Hirudinea*, larvy vážek *Anax*, *Libellula* a *Zygoptera* a znakoplavky *Notonecta*). Do poloviny bazénů byla jednorázově přidána směs 15 léčiv na environmentálně relevantních koncentracích (20-500 ng/l), tento přídavek simuloval např. situaci u tůní nebo rybníků, kam se při jarním tání nebo napuštění dostane voda a pak už je tento útvar oddělený od napájení. Kromě vlivu znečištění byl sledován i vliv klimatických změn, a to zvýšením teploty o +4 °C oproti okolní teplotě. Uspořádání jednotlivých experimentálních bazénů je uvedeno na obrázku 3. Poprvé probíhal experiment v chladném

období roku (říjen až březen), podruhé v teplém (červen až srpen). Na konci experimentu byl makrozoobentos vzorkován.



Obrázek 3. Uspořádání experimentálních mesokosmových bazénů.

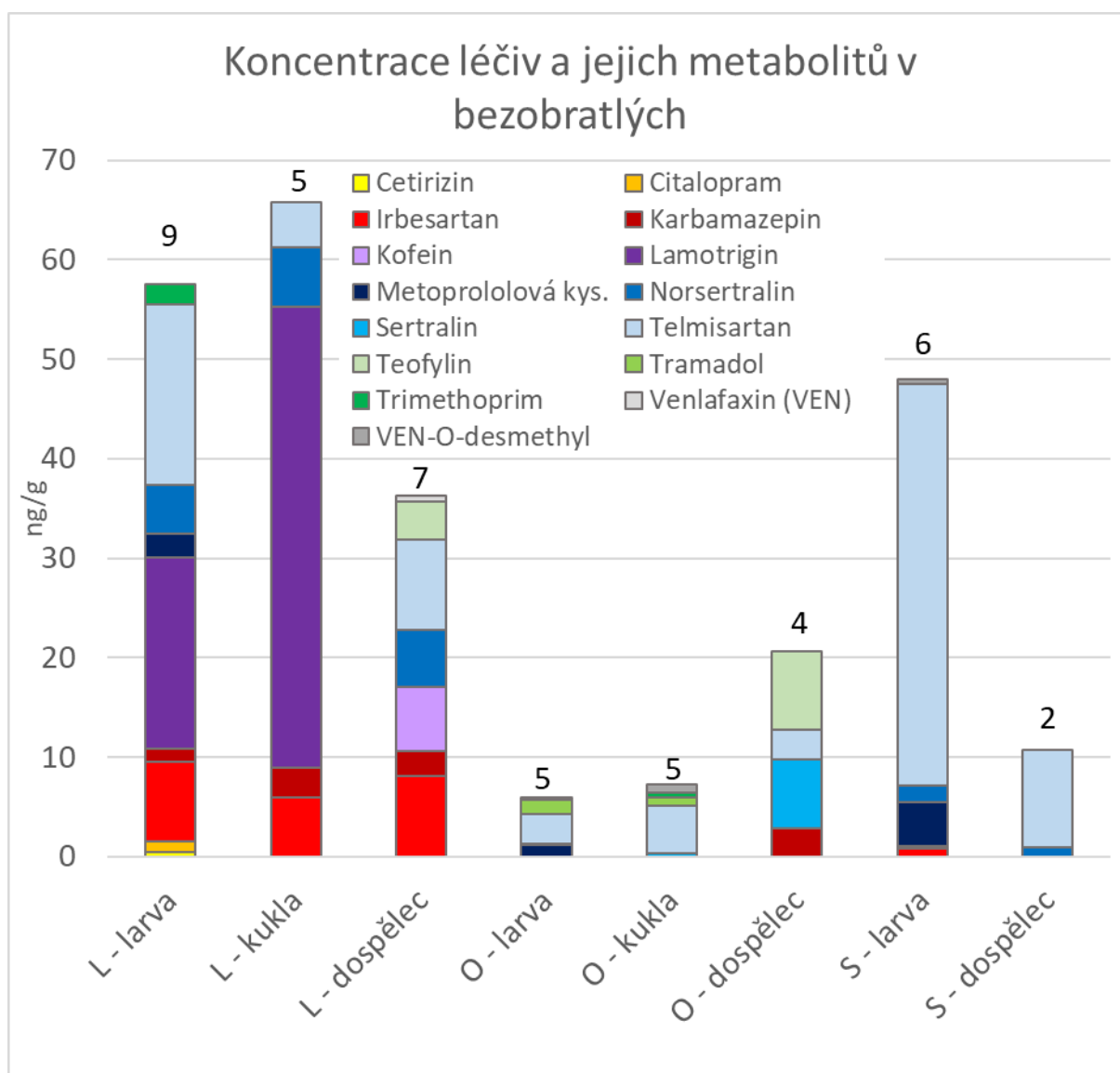
Zkratky: C ... kontrolní mesokosm, T ... experimentální mesokosm s jednorázovým přidavkem směsi 15 léčiv, L ... okolní teplota, H ... teplota zvýšení o +4 °C oproti teplotě L, 1-7 ... počet replikátů v dané skupině. Převzato z Grabicová a kol. (2024).

Nejvyšší celková koncentrace přidaných léčiv a jejich metabolitů byla nalezena ve vodních беруškách, coby zástupce detritivorů (rozkladačů). Nejčastěji nalezeným léčivem byl tramadol, který byl nalezen v sedmi z osmi analyzovaných druhů v chladném období a třech ze čtyř analyzovaných druhů v letním období, dále karbamazepin a telmisartan. Naopak některá léčiva bioakumulovala pouze v některých druzích, například atenolol a N+O-desmethyltramadol v беруškách, lamotrigin a O-desmethylvenlafaxin v mlžích *Planorbarius* či antibiotikum trimethoprim v pijavkách. Největší počet léčiv (6-8) byl nalezen v mlžích *Planorbarius*, беруškách a larvách vážek *Libellula*. Porovnání bioakumulace v chladném a teplém období bylo možno pouze u tří druhů, a to беруšek, mlžů *Planorbarius* a znakoplavek. Z našich výsledků vyplývá, že i jednorázový přídavek léčiv má dlouhodobý vliv na jejich přítomnost ve vodních bezobratlých. Bioakumulace závisí na druhu vodního organismu (i díky způsobu příjmu

potravy) a na teplotě. Sezóna (chladné versus teplé roční období) má ale větší vliv než simulované klimatické změny (navýšení teploty o +4 °C).

Další studie týkající se vodních bezobratlých byla zaměřena na bioakumulaci léčiv přítomných ve vyčištěné odpadní vodě ve dvou druzích chrostíků (*Limnephilus* a *Oligotrichae*) a jednom druhu jepic (*Siphonurus*). Sledována byla vývojová stádia larva a dospělec, u chrostíků i stádium kukly. 15 různých léčiv a jejich metabolitů bylo nalezeno v alespoň jedné matrici v rozmezí celkové koncentrace 6,0 – 66 ng/g (obrázek 4).

Profil bioakumulovaných léčiv byl rozdílný mezi druhy a vývojovými stádii. Pouze telmisartan byl nalezen ve všech druzích i stádiích, s maximálním BAF pouze 13. Nejvyšší BAF byl získán pro norsertralin, ale všechny hodnoty byly nižší než 500, což neznačí bioakumulaci, ale jen rovnovážný stav mezi příjmem, metabolickou přeměnou a vyloučením. U některých léčiv byla pozorována bioamplifikace (nárůst koncentrace ve vyšším vývojovém stádiu oproti nižšímu) – jednalo se o karbamazepin, sertralin a jeho metabolit norsertralin, venlafaxin v chrostících. V jepicích měla všechna léčiva vyšší koncentraci v larvách v porovnání s dospělci. Některá léčiva se bioakumulují nejen ve vodním hmyzu, ale i v dospělciích žijících mimo vodní prostředí, čímž může docházet k přenosu kontaminace vodního prostředí do prostředí terestriálního.



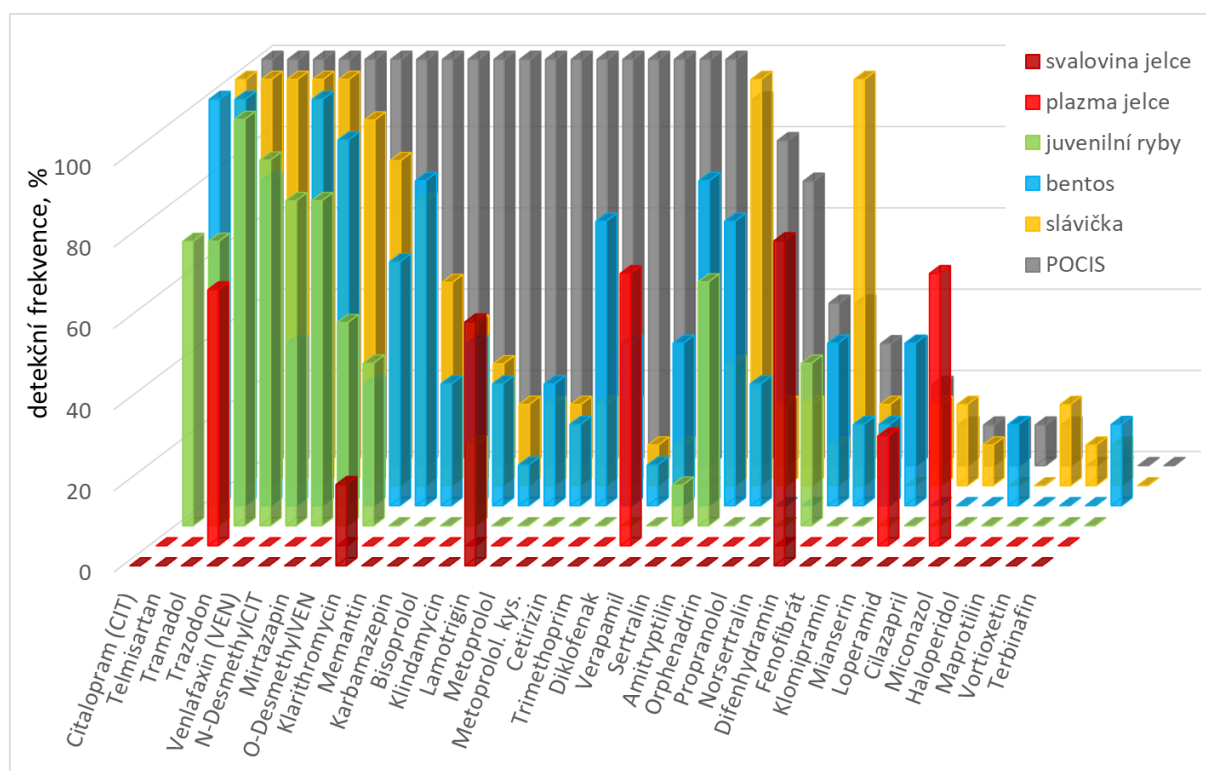
Obrázek 4. Celková koncentrace léčiv a jejich metabolitů v jednotlivých vývojových stádiích chrostíků a jepic exponovaných vyčištěné odpadní vodě.

Zkratky: L ... chrostík *Limnephilus*, O ... chrostík *Oligotrichae*, S ... jepice *Siphonurus*. Čísla nad sloupci značí počet léčiv nalezených nad limitem kvantifikace. Zpracováno na základě dat publikovaných v Let a kol. (2025).

S dalšími studiemi jsme se přesunuli do reálného prostředí.

Nejprve jsme sledovali bioakumulaci cizorodých látek v bezobratlých a rybách v deseti tocích České republiky. Vybrané toky byly méně (např. Ohře, Otava), více (např. Vltava, Labe) či velmi (např. Bílina, Svratka) ovlivněné vyčištěnou komunální vodou. Vzorkování vodních organismů proběhlo ve spolupráci Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ) v rámci každoročního monitoringu. Ve studii Grabicová a kol. (2022b, **příloha 5**) byla bioakumulace

léčiv a jejich metabolitů z různých terapeutických tříd stanovována v bentosu (larvy chrostíků, pijavky, mlži či larvy vážek – odebraný druh závisel na dostupnosti druhu v dané lokalitě), v mlžích druhu slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*, slávičky pocházející z nezatížené lokality byly v dané lokalitě exponované v klecích po dobu dvou měsíců), v juvenilních rybách a v plazmě a svalovině dospělého jelce tlouště. Kromě bioty jsme na daných lokalitách exponovali pasivní vzorkovače (POCIS, Polar Organic Chemicals Integrative Samplers). Porovnání detekčních frekvencí léčiv nalezených v jednotlivých matricích je uvedeno na obrázku 5. Nejvíce léčiv na největším počtu lokalit bylo detekováno v extraktech pasivních vzorkovačů, dále v bentosu a slávičkách, pak v juvenilních rybách a nejméně pak v plazmě a svalovině tlouště. Trend znečištění byl v obou matricích (biota a pasivní vzorkovače) podobný.



Obrázek 5. Detekční frekvence [%] léčiv a jejich metabolitů v jednotlivých vzorkovaných matricích (zahrnuta léčiva nalezená alespoň v jedné biologické matrici). Zpracováno na základě dat publikovaných v Grabicová a kol. (2022b).

Volně žijící bezobratlí a exponované slávičky bioakumulovali větší počet léčiv v celkové vyšší koncentraci v porovnání s juvenilními rybami a vybranými tkáněmi dospělých ryb. Sertralin a jeho metabolit norsertralin byl nalezený v nejvyšší koncentraci ve slávičkách exponovaných ve Svatce (83 a 43 ng/g), telmisartan v bentosu pocházejícího z Vltavy (31 ng/g) a citalopram v homogenátu celých těl juvenilních ryb odlovených ve Svatce (3,5 ng/g). V plazmě a svalovině dospělých jelců byla nalezena 3-4 léčiva na koncentrační hladině limitu kvantifikace. Bioakumulace léčiv je druhově závislá, organismy na nižší trofické úrovni (jako je bentos, trofická úroveň ale nebyla potvrzena stabilní izotopovou analýzou) bioakumulovaly více léčiv než ryby z vyšší trofické úrovně. Klecová expozice sláviček představuje vhodný přístup ke zhodnocení bioakumulace v organismech na nižší trofické úrovni i z důvodu porovnání stejného druhu mezi lokalitami, což sběrem volně žijících bezobratlých nemusí být zajištěno.

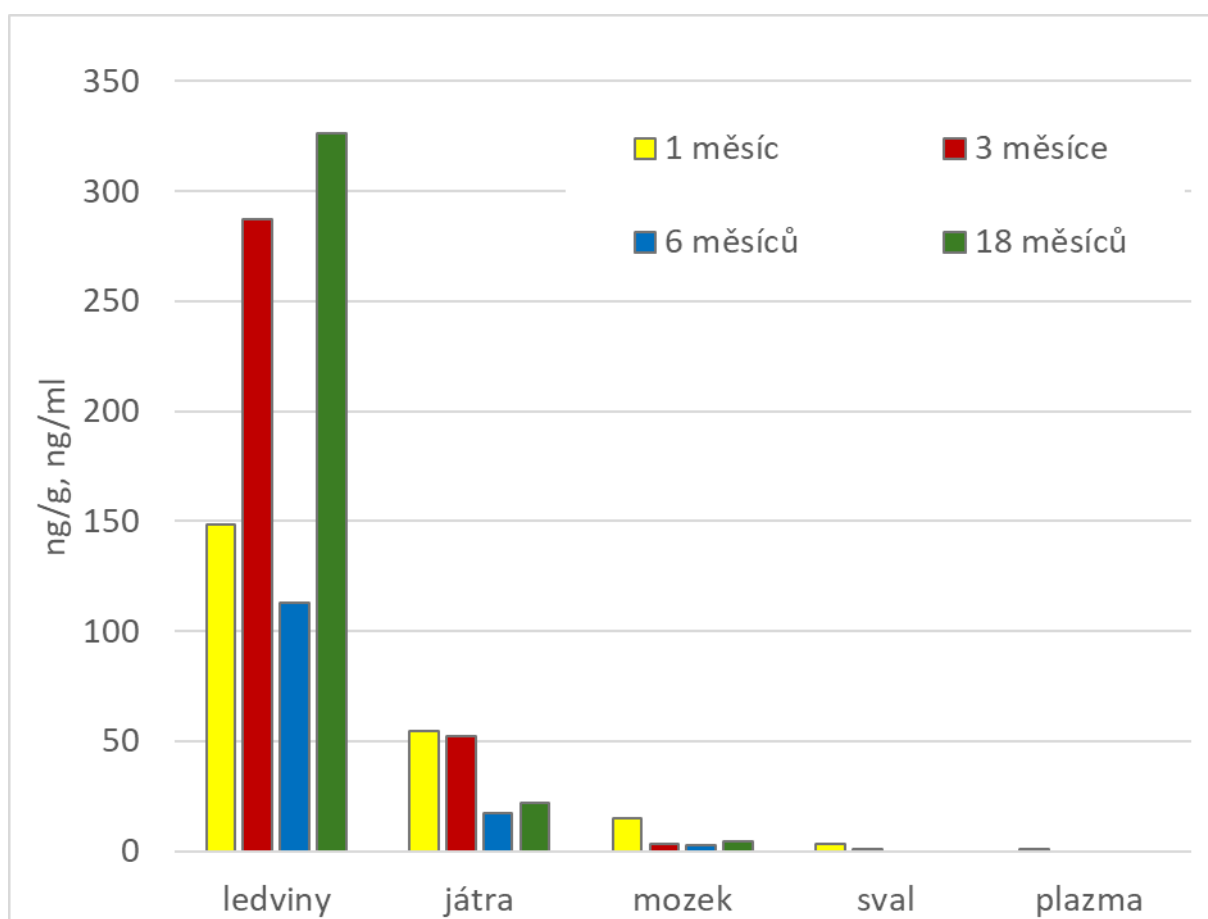
Další celorepubliková studie byla zaměřena na sledování pouze psychoaktivních látek ve vodě (pasivní vzorkovače, bodové odběry vody) a biotě (směsné homogenáty celých těl juvenilních ryb a vybrané tkáně dospělých jelce tlouště, Grabicová a kol., 2020a, **příloha 6**). Z hlediska koncentrace léčiv a jejich metabolitů ve vodě (vzorkování pomocí pasivních vzorkovačů) byly nejvíce znečištěným tokem Litavka a Bílina (>1400 ng/POCIS), řeky s nízkým průtokem, dále pak Odra a Svatka, kam ústí vyčištěná odpadní voda z velkých měst (Ostrava a Brno). Ačkoli do Vltavy ústí vyčištěná odpadní voda z hlavního města, díky vysokému průtoku není Vltava pod Prahou tolik zatížena (<400 ng/POCIS). Při porovnání koncentrace analyzovaných cizorodých látek získaných bodovými odběry a pasivním vzorkováním byl nalezen statisticky významný vztah mezi těmito dvěma přístupy. Jedinou výjimkou byla Svatka, kdy koncentrace z bodových odběrů vody byla mnohem nižší než koncentrace v extraktech pasivních vzorkovačů, což bylo způsobeno nejspíš nestabilním průtokem ve Svatce způsobeným vodní elektrárnou.

V biotě bylo nalezeno šest z 19 analyzovaných psychoaktivních látek, dva selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI, sertralin, citalopram a jeho metabolit N-desmethylocitalopram), dva inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a norepinefrinu (SNRI, venlafaxin a jeho metabolit O-desmethylenlafaxin) a jedno tricyklické antidepresivum (mirtazapin), nicméně BAF byly nižší než 500 pro všechny nalezené látky ve všech biologických matricích. Sertralin byl nalezen v mozcích ryb ze všech testovaných lokalit s výjimkou horního toku Vltavy, která je lidskou činností zatím ovlivněná jen málo.

Pasivní vzorkovač by měl napodobit biodostupnost s přístupem 3R (replacement, reduction, refinement, Kern, 2014) živých organismů. Ale pasivní vzorkovače nemusí přesně nahrazovat mechanismus, frekvenci a trvání doby expozice vodních organismů, a tím i zhodnocení ovlivnění celého ekosystému. Navíc membránou pasivního vzorkovače projdou jen částice do velikosti 0,1 μm , tudíž získáme informace jen o frakci sloučenin ve vodě rozpuštěných či adsorbovaných na menší částice. Žádný statisticky významný vztah mezi koncentrací léčiv a jejich metabolitů v pasivních vzorkovačích a jednotlivých tkáních ryb nebyl nalezen. Příčinou by mohla být rozdílná rychlost v příjmu cizorodých látek, jejich distribuci, metabolismu a eliminaci a také věku ryb. Pasivní vzorkovače se tedy nezdají být vhodnou náhradou vodních živočichů z hlediska výskytu cizorodých látek v biotě. Nicméně mohou pomoci při hodnocení rizika.

Přítomností psychoaktivních látek ve vodním prostředí jsme se zabývali i v další studii (Grabicova a kol., 2017, **příloha 7**), kdy jsme odlovili pstruhy obecné z horního toku Živného potoka, označili je, část přesadili do stejného toku, ale pod místo, kam ústí vyčištěná odpadní voda (exponovaná skupina). Druhou část jsme ponechali na původním místě (kontrolní skupina). Průměrný roční průtok v Živném potoce je 39 l/s, průtok vyčištěné odpadní vody je průměrně 70 l/s, vyčištěná odpadní voda je tedy významným přispěvovatelem do tohoto toku. Ryby jsme vzorkovali po jednom, třech a šesti měsících od přesazení. Výhodou tohoto přístupu

byl fakt, že i) pstruzi pocházeli z toku (byli tedy na tok adaptováni a odpadl vliv transportu), ii) díky značení nemuseli být exponováni jedinci v klecích (nebyli tudíž ve stresu, mohli přijímat potravu a my jsme mohli zhodnotit bioakumulaci a ne jen biokoncentraci jako v případě laboratorní expozice), iii) díky uspořádání lokality (jezy, bariéry) bylo známé i místo i čas expozice a iv) pstruzi byli exponováni v reálném toku reálným koncentracím (ne jen vybrané směsi jako v případě laboratorních experimentů). Časový průběh bioakumulace a zatížení jednotlivých orgánů je znázorněn na obrázku 6.

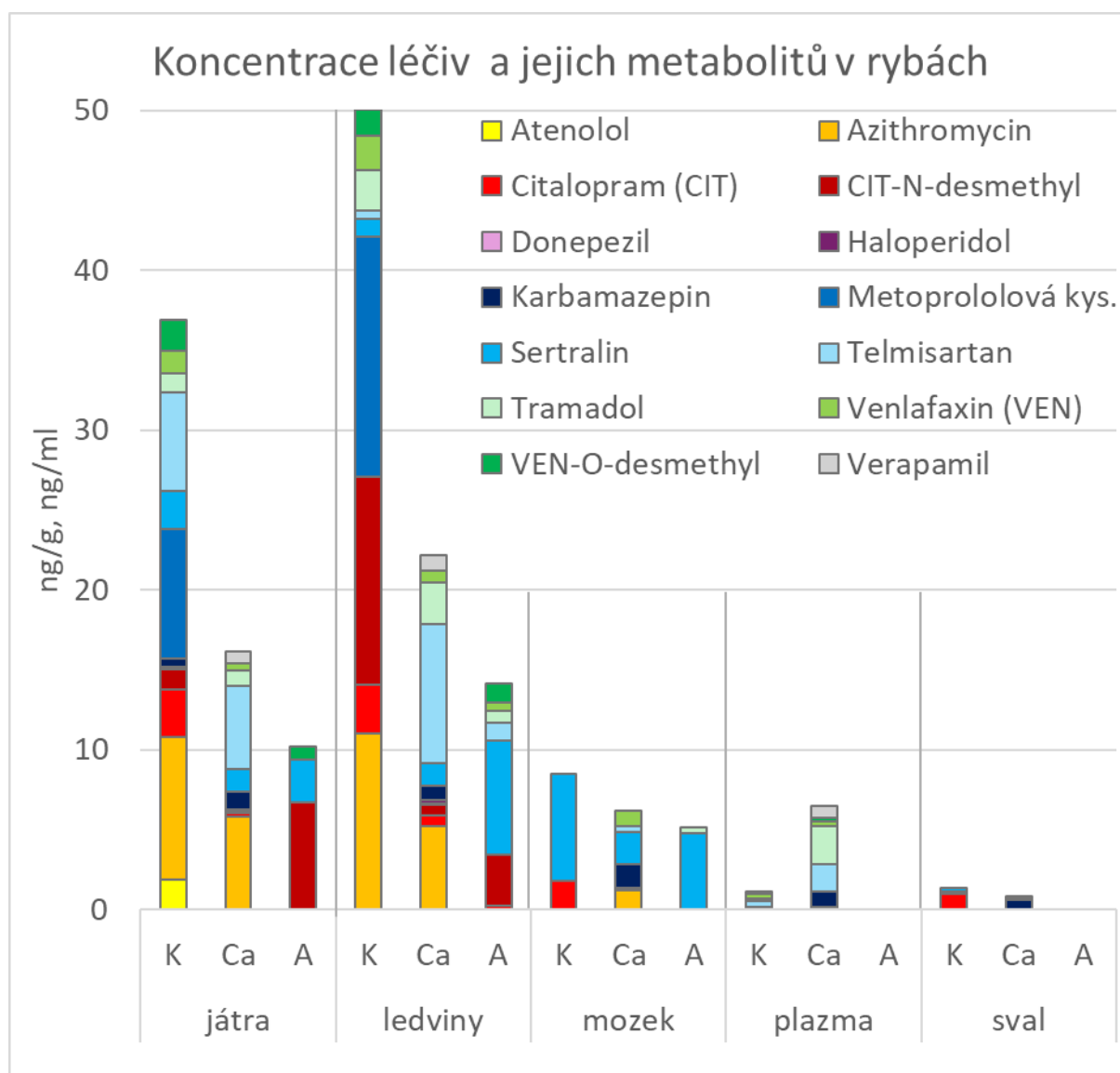


Obrázek 6. Celková koncentrace psychoaktivních léčiv v jednotlivých tkáních pstruha obecného exponovaného v Živném potoce ovlivněném vyčištěnou odpadní vodou. Zpracováno na základě dat publikovaných v Grabicova a kol. (2017).

Bioakumulace těchto látek je závislá na orgánu/tkáni, nejvyšší záchyt byl zaznamenán v ledvinách a játrech, menší pak v mozku, svalovině a plazmě exponovaných ryb. V játrech,

mozku, svalovině a plazmě došlo k poklesu celkové koncentrace s narůstající dobou expozice, což bylo pravděpodobně způsobeno aktivací obranných mechanismů ryb (Koubová a kol., 2025; Koubová a kol., 2022). V ledvinách došlo k nárustu koncentrace po třech a 18 měsících expozice v porovnání s prvním odběrem po jednom měsíci, což naznačuje zpožděnou eliminaci či velmi nízké vylučování močí. V mozku ryb byl nalezen pouze sertralin, který byl také nalezen v mozku jelce tlouště ze všech vzorkovaných lokalit ČR (Grabíková a kol., 2020a). Pro některá léčiva (tramadol a venlafaxin) odpovídal získaný BAF (expozice přes vodu i přes potravu) předpovězenému BCF (expozice pouze přes vodu; obrázek 4 v publikaci Grabíková a kol. (2017), příloha 7), což odpovídá hlavní expoziční cestě biokoncentrací z vody (jejich koncentrace ve vodě byla nejvyšší ze všech analyzovaných). Naopak BAF pro citalopram, mianserin, mirtazapin a sertralin byly vyšší než BCF, z čehož plyne významný podíl potravy na jejich bioakumulaci.

Poslední studie týkající se bioakumulace byla zaměřena na ryby přesazené do rybníka Čezárka, který slouží jako dočišťovací nádrž (terciární čištění) pro vyčištěnou odpadní vodu (Grabíková a kol., 2020b). V tomto rybníce byly po dobu šesti měsíců exponované dva druhy ryb, kapr obecný (všežravec) a candát obecný (rybožravý predátor). Bioakumulace léčiv a jejich metabolitů byla sledována nejen v jednotlivých tkáních těchto ryb, ale i v homogenátu střevličky východní (potrava candáta) a planktonu (část potravy kapra). Nejvíce léčiv (26) bylo nalezeno v planktonu (nižší trofická úroveň) s celkovou koncentrací 290 ng/g (telmisartan 72 ng/g, citalopram 66 ng/g, N-desmethylocitalopram 25 ng/g). V homogenátu střevličky bylo nalezeno 12 léčiv s celkovou koncentrací 16 ng/g (telmisartan 9,4 ng/g). V kaprovi bylo detekováno devět léčiv a v candátovi jedenáct. Nejvyšší celková koncentrace v kaprovi byla nalezena v játrech, zatímco u predátora candáta v ledvinách (obrázek 7).



Obrázek 7. Koncentrace léčiv a jejich metabolitů v jednotlivých orgánech tří druhů ryb 6 měsíců exponovaných v rybníku Čezárka, Vodňany.
Zkratky: K ... kapr obecný, Ca ... candát obecný, A ... amur bílý. Převzato z Grabicová a kol. (2020b) a nepublikovaná data.

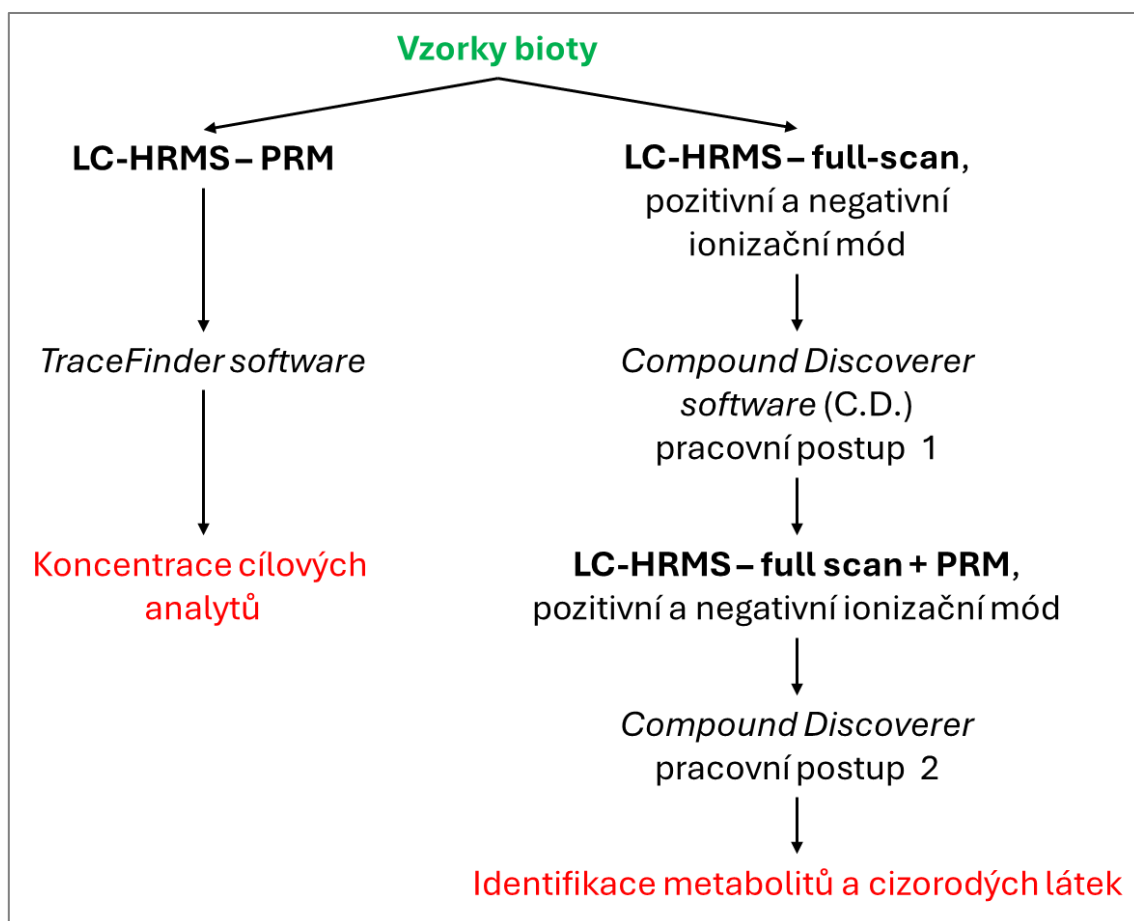
Svalovina ryb byla zatížena léčivý nejmeně, s celkovou reziduální koncentrací do 2,0 ng/g, což je dobrá zpráva pro akvakulturu a konzumenty ryb. Některá léčiva byla nalezena v obou druzích (citalopram a N-desmethylocitalopram, sertralin, telmisartan, venlafaxin a O-desmethylvenlafaxin), jiná byla orgánově (atenolol, metoprololová kyselina) a druhově (atenolol a jeho metabolit metoprololová kyselina a tramadol byly nalezeny jen v kaprovi, pouze v candátovi azithromycin, donepezil, haloperidol, karbamazepin a verapamil) specifická. Bioakumulace byla sledována i v amurovi bílém (*Ctenopharyngodon idella*, zástupce

býložravých ryb), který byl exponován stejnou dobu, ale v jiném roce. Celková koncentrace v jednotlivých tkáních býložravého amura byla nižší v porovnání se všežravým kaprem i predátorem candátem (obrázek 7). Tyto výsledky podporují teorii, že bioakumulace je závislá i na druhu přijímané potravy.

2.3.Změny metabolomu způsobené vlivem léčiv

Poslední dva články této habilitační práce se týkají vlivu léčiv na metabolom a exposom vodních organismů. Sledovali jsme tedy jednak odpovědi endogenních metabolitů a jednak cizorodé látky, které se do organismu dostaly expozicí přes vodu a/nebo potravu.

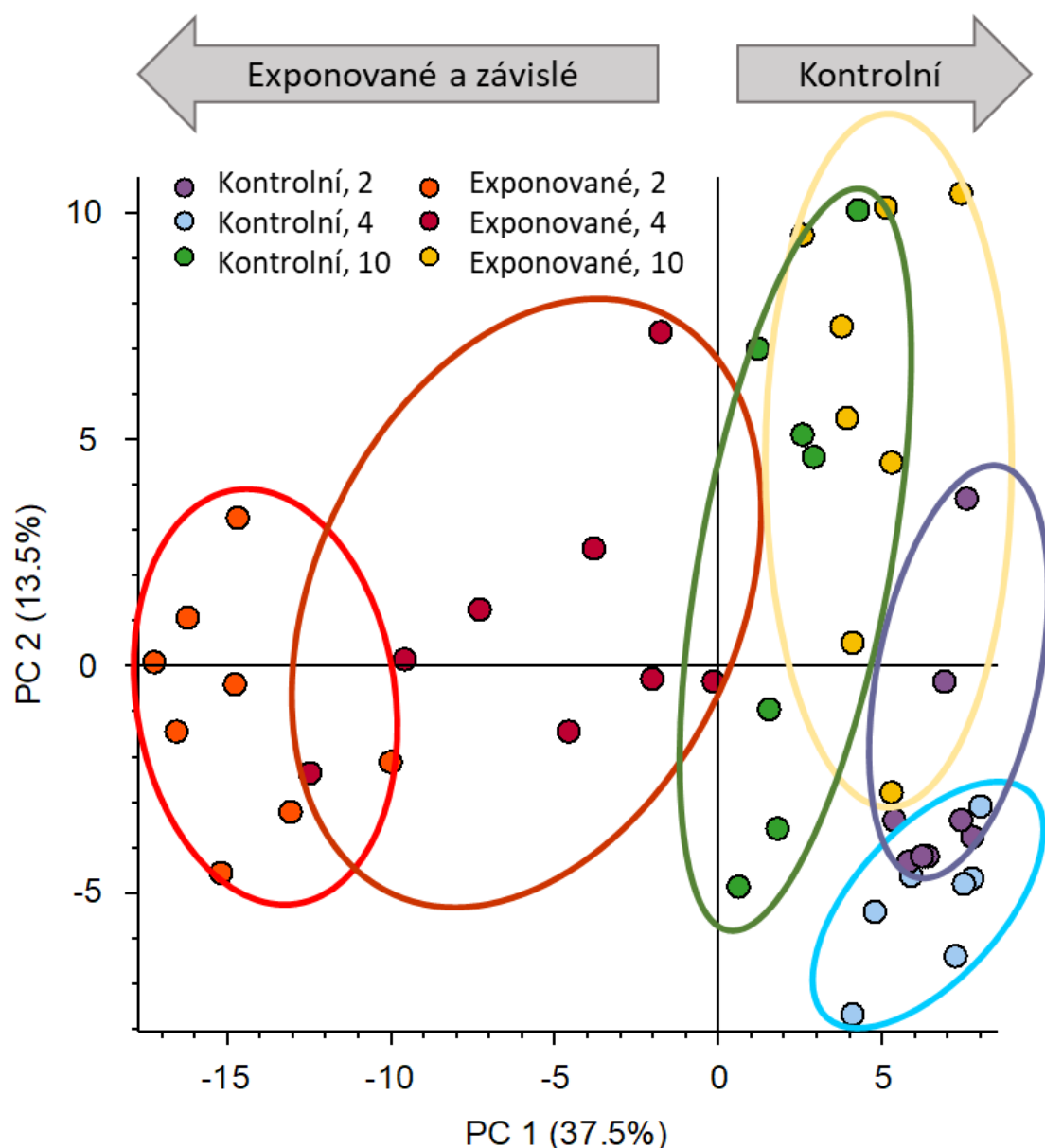
Cílená LC-HRMS analýza pro získání koncentrace známých analytů byla provedena v PRM (parallel reaction monitoring) módu se seznamem molární hmotnosti ku náboji (m/z) požadovaných analytů. V tomto režimu byla získána data ve výše uvedených publikacích (přílohy 1-8). Pro získání dat použitých pro metabolomické studie byly vyextrahované vzorky bioty analyzovány necílenou analýzou, tzn. pomocí LC-HRMS ve full-scanu, v pozitivním i negativním ionizačním módu. Data byla následně zpracována pomocí Compound Discoverer softwaru (verze 2.0 či 3.1, Thermo Fisher Scientific, pracovní postup 1). Na základě diferenční analýzy byl vytvořen seznam m/z podezřelých kandidátů, který byl použit při následné LC-HRMS analýze ve full-scan a PRM módu. Získaná data byla znovu zpracována pomocí Compound Discovereru (pracovní postup 2). Schéma postupné analýzy vzorků je uvedeno na obrázku 8.



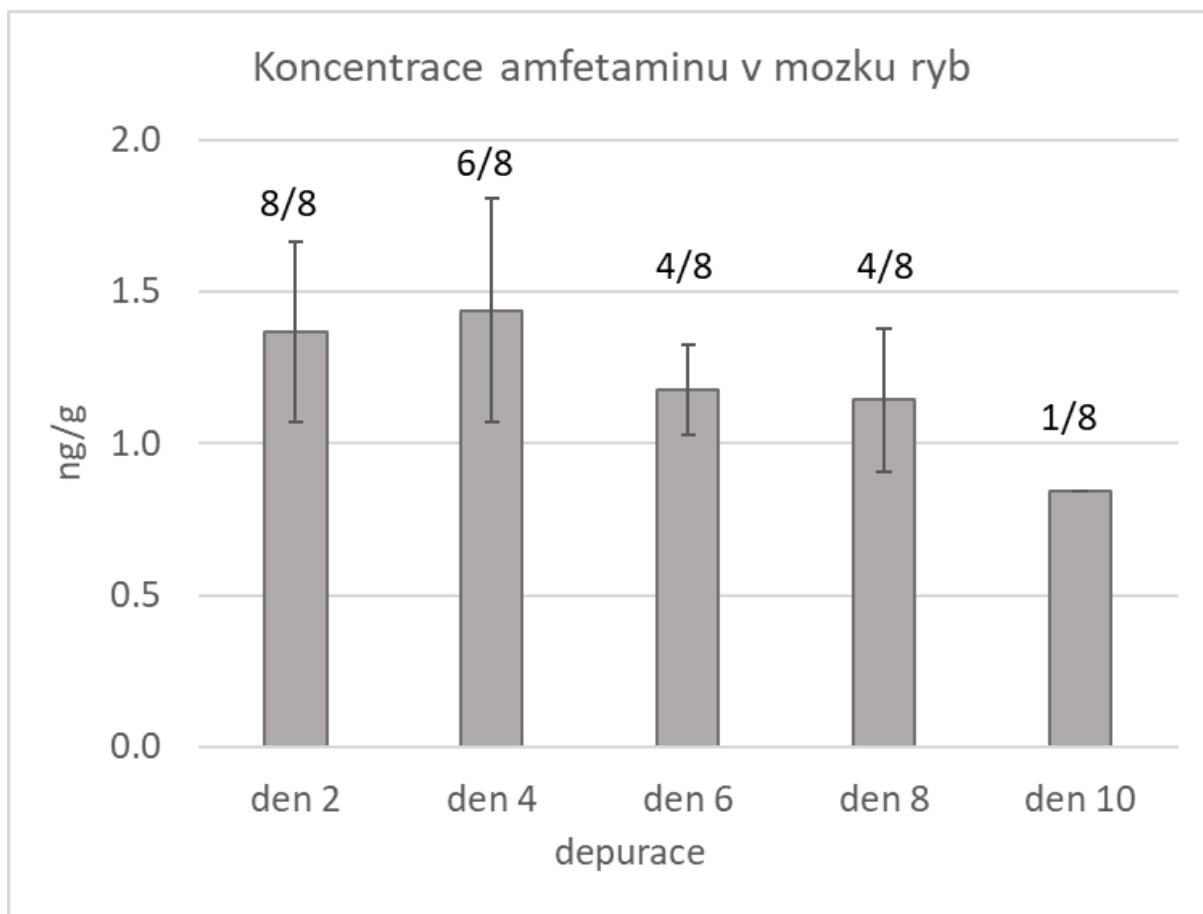
Obrázek 8. Schéma analýzy vzorků při cílené a necílené analýze.

Ve studii publikované v článku Horký a kol. (2021, **příloha 9**) jsme jednoleté pstruhy obecně exponovali environmentálně relevantní koncentraci 1 µg/l metamfetaminu, nelegálně používané droze. Po osmi týdenní expozici následovala fáze depurace, kdy byly ryby odebrané po 2, 4, 6, 8 a 10 dnech. Kromě pokusů chování zaměřené na preferenci proudu s metamfetaminem či bez něj, byl odebrán a analyzován mozek. Na základě diferenční analýzy byly získány významně zvýšené a snížené signály, počet těchto signálů se vzrůstající dobou depurace klesal. Po dvoudenní depuraci bylo nalezeno celkem 210 signálů, po desetidenní expozici pouze 36 signálů. Nejvyšší rozdíly v metabolomu mozku exponovaných ryb v porovnání s kontrolními byly pozorovány v prvních čtyřech dnech depurace, což je vidět z grafu analýzy základních komponent (PCA) na obrázku 9. Exponované ryby po desetidenní depuraci měly v grafu stejnou pozici jako kontrolní ryby. I rychlost metabolismu byla rozdílná

mezi jednotlivými rybami, což lze zhodnotit i koncentrací amfetaminu, aktivního metabolitu metamfetaminu, v mozku ryb během depurační fáze (obrázek 10). V čase klesala nejen koncentrace amfetaminu, ale i jeho frekvenční detekce. Po dvou dnech depurace byl amfetamin přítomen nad limitem kvantifikace u všech analyzovaných ryb, po čtyřech dnech u 75 % ryb, po 6 a 8 dnech jen u 50 % a po deseti dnech pouze u jednoho jedince (13 %).



Obrázek 9. Analýza základních komponent (PCA) výsledků diferenční analýzy u kontrolních a exponovaných ryb v depurační fázi (2., 4.- a 10. den depurace); byly zahrnuty pouze statisticky významně rozdílné signály z 2. dne depurace ($p < 0,05$, minimálně dvojnásobný rozdíl v intenzitě signálu mezi kontrolní a exponovanou skupinou). Převzato z Horký a kol. (2021).



Obrázek 10. Koncentrace amfetaminu (průměr a směrodatná odchylka) v mozku exponovaných ryb v průběhu depurační fáze. Čísla nad sloupci značí počet ryb s koncentrací nad limitem kvantifikace/všech analyzovaných v dané skupině. Zpracováno na základě dat publikovaných v Horký a kol. (2021).

V rámci studie zabývající se správným vzorkováním (Grabicová a kol., 2022a, příloha 2) jsme se zabývali i změnou metabolomu a exposomu v plazmě ryb odebrané hned po odlovu, za tři a 20 hodin po přemístění do čisté vody (Giebułtowicz a kol., 2024, **příloha 10**). Do diferenční analýzy byla zahrnuta full-scan data získaná ze dvou analytických kolon – Hypersil Gold aQ (50 x 2,1 mm, 5 μ m částice) a Synchronis HILIC (50 x 2,1 mm, 3 μ m částice, obě z Thermo Fisher Scientific). Kolona typu HILIC dobře separuje vysoce polární a iontové sloučeniny, zatímco kolona Hypersil Gold aQ představuje chromatografii na reverzní fázi a dobře separuje středně polární až nepochopitelné analyty. Separace na těchto dvou kolonách se doplňuje a dochází k pokrytí širokého spektra látek. Z celkových 12 904 signálů/sloučenin jich bylo 6143 statisticky významně rozdílných ($p < 0,01$) mezi testovanými skupinami.

U 1549 signálů plocha píku pozvolně klesala s časem odběru, u 314 signálů byl s časem pozorován naopak nárůst plochy píku. Na Schymanski úrovni jistoty identifikace 2 a 3 (Schymanski a kol., 2014) bylo identifikováno 45 endogenních metabolitů a 9 cizorodých látek ($p < 0,01$, minimálně čtyřnásobný rozdíl v intenzitě signálu mezi skupinami).

Z cizorodých látek byla v plazmě nalezena například kyselina skořicová a její metabolit 4-hydroxyskořicová kyselina (používané v kosmetice) či průmyslové inhibitory koroze a surfaktanty (2-ethylhexylsulfát, N-3,7-dimethyl-2,6-oktadienylcyklopropylkarboxamid, 5-ethyl-2-hydroxyfenylhydrogensulfát, 6-chloro-5-methyl-1H-benzotriazol a triethanolamin).

Necílenou analýzou bylo potvrzeno ovlivnění metabolických drah biotinu, purinů, mastných kyselin a jejich derivátů, glycerofosfolipidů, steroidů a sfingolipidů. Tyto změny mohou být způsobeny jednak expozicí vyčištěné odpadní vodě (výsledky naznačují poruchy jaterních buněk, neboť v játrech dochází k metabolické přeměně cizorodých látek), ale také oxidativním stresem, který mohl být vyvolán manipulací s rybami a jejich následným přesazením do neznámého prostředí.

3. Závěry

3.1. Význam výsledků pro vědní obor a možnosti dalšího výzkumu

Vyvinutá vysoce citlivá a selektivní metoda pro detekci léčiv a jejich metabolitů v rybích tkáních (příloha 1) výrazně přispěla k možnostem analýzy těchto sloučenin ve vodních organismech. Tato extrakční a analytická metoda byla využita v dalších studiích (přílohy 3 až 9), které pomohly zaplnit mezery ve znalostech bioakumulace léčiv v rybách a bezobratlých. Práce pojednávající o bioakumulaci léčiv v divokých pstruzích obecných (příloha 7) byla od jejího publikování citována 171. Také publikace uvedené v přílohách 6 a 8 jsou vzhledem k relativně nedávné publikaci (2020) citovány poměrně často (46 a 40 citací). Tyto publikace významně přispěly k vytipování relevantních sloučenin, které se nacházejí ve vodních organismech žijících v reálných vodních ekosystémech, a následnému studiu jejich vlivu na vodní organismy.

Práce o vlivu zpožděného odběru vzorků na koncentraci léčiv a per- a polyfluorovaných sloučenin a na metabolom ryb (přílohy 2 a 10) dokládají zásadní význam vzorkování pro dosažení důvěryhodných výsledků. Pro monitorování vodního prostředí je tedy nezbytné použít relevantní vzorkování a také co nejjednodušší, rychlou a spolehlivou metodu pro přípravu a analýzu vzorků biologické matrice. Zásadní informace pro organizaci monitoringu či obecně pro návrh experimentu, který zahrnuje více složek vodního prostředí, pak byly prezentovány v publikacích prezentovaných jako přílohy 5, 6 a 8. V těchto publikacích jsou doloženy rozdíly mezi trofickými úrovněmi i mezi druhy bezobratlých.

V nejnovějších pracích (přílohy 3 a 4) jsou prezentovány výsledky experimentů zaměřených na bioakumulaci cizorodých látek na různé druhy vodních bezobratlých. Věříme, že tyto práce přispějí k většímu pochopení reálných ekosystémů, expozičním scénářům a následně také ke změně v přístupu hodnocení rizik způsobených léčivy.

Z hlediska směřování dalšího výzkumu je perspektivním zaměřením necílená analýza (necílený screening) pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem. Po analýze s následným využitím specializovaného softwaru (Compound Discoverer, Thermo Fisher) lze získat nejen počet významně zvýšených a snížených signálů/látek, pomocí nichž lze popsat intenzitu a kinetiku změn, ale také je možné jednotlivé látky identifikovat a získat informace o změnách na úrovni metabolických drah. Tato metoda, aplikovaná v publikacích uvedených jako přílohy 9 a 10, ukazuje důležitost širšího zaměření analýz biologických vzorků než jen na látky přítomné ve vodě. V článku v příloze 9 je doložena změna chování s koncentrací nikoliv látky, které byla ryba exponována, ale s koncentrací jejího metabolitu. Tato práce tak narušuje dogma modelu Huggetta a kol. (2003), že efekt je možné odvodit od koncentrace dané látky v rybí plazmě. Necílená analýza metabolomu a exposomu, je možností, jak vysvětlit efekt expozice vodních organismů cizorodým látkám nejen v laboratorním, ale i v terénním měřítku experimentu.

3.2. Využití dosažených výsledků při výuce

Teoretické i praktické poznatky získané při řešení prezentované problematiky byly začleněny do předmětu „Chemie životního prostředí“ vyučovaného v rámci navazujícího magisterského studia oboru „Rybářství a ochrana vod“ a do předmětu „Environmentální analytická chemie“ určeného pro studenty doktorského studia „Ochrana vodních ekosystémů“ vyučovaného v českém i anglickém jazyce. V rámci praktických cvičení si studenti připraví a zanalyzují vlastní vzorky a poté vypočítají a interpretují výsledky, což jim přiblíží práci v naší laboratoři.

V tomto uspořádání (teoretický úvod a laboratorní praxe) je tato problematika prezentována i středoškolským studentům v rámci jednodenních či vícedenních kurzů (např. Juniorská univerzita, exkurze českobudějovického Gymnázia Jírovce v rámci Semináře z chemie,

exkurze středoškolských řešitelů Korespondenčního Semináře Inspirovaného Chemickou Tématikou pořádanou Přírodovědeckou fakultou Karlovy univerzity či spolupráce při řešení maturitních prací).

Na získání výsledků publikovaných v této práci se podíleli i studenti doktorského studia MSc. Maria Eugenia Sancho Santos (příloha 9) a Ing. Adam Bořík (příloha 1), jimž byla autorka této práce konzultantkou. Do přípravy a analýzy vzorků byla zapojena i studentka bakalářského studia Veronika Lexová.

3.3. Využití dosažených výsledků pro praxi

Vyvinutá a validovaná metoda pro analýzu širokého rozsahu léčiv v biologických vzorcích byla použita v kontrahovaném výzkumu zaměřeném na rozsáhlý screening nových polutantů (včetně léčiv) napříč složkami životního prostředí. Tento projekt jsme realizovali v konsorciu s mezinárodní společností COWI AB a státním podnikem Povodí Labe pro Norský úřad životního prostředí (NEA), jehož výsledky jsou veřejně dostupné na jejich webových stránkách (m1063.pdf, m10632.pdf).

Studie uvedené v přílohách 5 a 6 byly realizovány ve spolupráci s ČHMÚ a získané výsledky byly implementovány do strategie vzorkování biotických matric, které ČHMÚ provádí.

Výsledky experimentů, zvláště těch, které jsou zaměřené na monitoring znečištění, jsou pravidelně přednášeny na konferencích pro odbornou veřejnost a publikovány v profesně zaměřených periodících (Vodní hospodářství).

4. Seznam použité literatury

- Aich, U., Polverino, G., Yazdan Parast, F., Melo, G.C., Tan, H., Howells, J., Nosrati, R., Wong, B.B.M., 2025. Long-term effects of widespread pharmaceutical pollution on trade-offs between behavioural, life-history and reproductive traits in fish. *Journal of Animal Ecology* 94, 340-355.
- Alexander, D.E., 1999. Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification, *Environmental Geology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 43-44.
- Arnnok, P., Singh, R.R., Burakham, R., Pérez-Fuentetaja, A., Aga, D.S., 2017. Selective Uptake and Bioaccumulation of Antidepressants in Fish from Effluent-Impacted Niagara River. *Environmental Science & Technology* 51, 10652-10662.
- Aulsebrook, L.C., Bertram, M.G., Martin, J.M., Aulsebrook, A.E., Brodin, T., Evans, J.P., Hall, M.D., O'Bryan, M.K., Pask, A.J., Tyler, C.R., Wong, B.B.M., 2020. Reproduction in a polluted world: implications for wildlife. *Reproduction* 160, R13-R23.
- aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Kuster, A., 2016. Pharmaceuticals in the Environment - Global Occurrences and Perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 823-835.
- Baduel, C., Mueller, J.F., Tsai, H.H., Ramos, M.J.G., 2015. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1426, 33-47.
- Bedia, C., 2022. Metabolomics in environmental toxicology: Applications and challenges. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 34, e00161.
- Beghin, M., Paris-Palacios, S., Mandiki, S.N.M., Schmitz, M., Palluel, O., Gillet, E., Bonnard, I., Nott, K., Robert, C., Porcher, J.-M., Ronkart, S., Kestemont, P., 2022. Integrative multi-biomarker approach on caged rainbow trout: A biomonitoring tool for wastewater treatment plant effluents toxicity assessment. *Science of the Total Environment* 838, 155912.
- Berger, E., Haase, P., Oetken, M., Sundermann, A., 2016. Field data reveal low critical chemical concentrations for river benthic invertebrates. *Science of the Total Environment* 544, 864-873.
- Berlioz-Barbier, A., Buleté, A., Fildier, A., Garric, J., Vulliet, E., 2018. Non-targeted investigation of benthic invertebrates (*Chironomus riparius*) exposed to wastewater treatment plant effluents using nanoliquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 196, 347-353.
- Bertram, M.G., Brand, J.A., Thoré, E.S.J., Cervený, D., McCallum, E.S., Michelangeli, M., Martin, J.M., Fick, J., Brodin, T., 2025. Slow-Release Pharmaceutical Implants in Ecotoxicology: Validating Functionality across Exposure Scenarios. *ACS Environmental Au* 5, 69-75.
- Bertram, M.G., Gore, A.C., Tyler, C.R., Brodin, T., 2022. Endocrine-disrupting chemicals. *Current Biology* 32, R727-R730.
- Bikker, J., MacDougall-Shackleton, H., Bragg, L.M., Servos, M.R., Wong, B.B.M., Balshine, S., 2024. Impacts of caffeine on fathead minnow behaviour and physiology. *Aquatic Toxicology* 273, 106982.
- Bisognin, R.P., Wolff, D.B., Carissimi, E., Prestes, O.D., Zanella, R., Storck, T.R., Clasen, B., 2020. Potential environmental toxicity of sewage effluent with pharmaceuticals. *Ecotoxicology* 29, 1315-1326.
- Bláha, M., Grabicova, K., Shaliutina, O., Kubec, J., Randák, T., Zlabek, V., Buřič, M., Veselý, L., 2019. Foraging behaviour of top predators mediated by pollution of psychoactive pharmaceuticals and effects on ecosystem stability. *Science of the Total Environment* 662, 655-661.
- Bose, A.P.H., McCallum, E.S., Avramović, M., Bertram, M.G., Blom, E.-L., Cervený, D., Grønlund, S.N., Leander, J., Lundberg, P., Martin, J.M., Michelangeli, M., Persson, L., Brodin, T., 2022.

- Pharmaceutical pollution disrupts the behavior and predator-prey interactions of two widespread aquatic insects. *iScience* 25, 105672.
- Brand, J.A., Bertram, M.G., Cervený, D., McCallum, E.S., Hellström, G., Michelangeli, M., Palm, D., Brodin, T., 2024. Psychoactive pollutant alters movement dynamics of fish in a natural lake system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 291, 20241760.
- Brand, J.A., Michelangeli, M., Shry, S.J., Moore, E.R., Bose, A.P.H., Cervený, D., Martin, J.M., Hellström, G., McCallum, E.S., Holmgren, A., Thoré, E.S.J., Fick, J., Brodin, T., Bertram, M.G., 2025. Pharmaceutical pollution influences river-to-sea migration in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Science* 388, 217-222.
- Brew, D.W., Black, M.C., Santos, M., Rodgers, J., Henderson, W.M., 2020. Metabolomic Investigations of the Temporal Effects of Exposure to Pharmaceuticals and Personal Care Products and Their Mixture in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 39, 419-436.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339, 814-815.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems-impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 369.
- Brooks, B.W., 2018. Urbanization, environment and pharmaceuticals: advancing comparative physiology, pharmacology and toxicology. *Conservation Physiology* 6.
- 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* 24, 464-469.
- Brooks, B.W., Huggett, D.B., Boxall, A.B.A., 2009. Pharmaceuticals and Personal Care Products: Research Needs for the next Decade. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2469-2472.
- Brooks, B.W., Steele, W.B., 2018. Ecotoxicological Perspectives on Healthcare and the Environment. Chapter 4 in: Boxall ABA, Kookana R (Eds). *Healthcare and Environmental Contaminants*. Elsevier, London, UK, pp. 41-66.
- Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3-21.
- Bussy, U., Li, K., Li, W.M., 2016. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantitative bioanalyses of organic molecules in aquatic environment and organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 9459-9479.
- Carter, L.J., Armitage, J.M., Brooks, B.W., Nichols, J.W., Trapp, S., 2022. Predicting the Accumulation of Ionizable Pharmaceuticals and Personal Care Products in Aquatic and Terrestrial Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* in press.
- Castillo, N.A., James, W.R., Santos, R.O., Rezek, R., Cervený, D., Boucek, R.E., Adams, A.J., Trabelsi, S., Distrubell, A., Sandquist, M., Fick, J., Brodin, T., Rehage, J.S., 2024a. Identifying pathways of pharmaceutical exposure in a mesoconsumer marine fish. *Journal of Hazardous Materials* 477, 135382.
- Castillo, N.A., Santos, R.O., James, W.R., Rezek, R., Cervený, D., Boucek, R.E., Adams, A.J., Fick, J., Brodin, T., Rehage, J.S., 2024b. Differential tissue distribution of pharmaceuticals in a wild subtropical marine fish. *Aquatic Toxicology* 275, 107064.
- Cervený, D., Brodin, T., Cisar, P., McCallum, E.S., Fick, J., 2020. Bioconcentration and behavioral effects of four benzodiazepines and their environmentally relevant mixture in wild fish. *Science of the Total Environment* 702, 134780.

- Chen, K., Wu, M., Chen, C., Xu, H., Wu, X., Qiu, X., 2021. Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111747.
- Constantine, L.A., Burden, N., Davidson, T., Dolan, D.G., Janer, G., Häner, A., Lee, M.R., Maynard, S.K., Nfon, E., Perkins, A.N., Ryan, J.J., Tell, J., 2024. Evaluation of the EMA log kow trigger for fish BCF testing based on data for several human pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 151, 11.
- Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., Laffont-Schwob, I., 2018. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of the Total Environment* 639, 1334-1348.
- Dimpe, K.M., Nomngongo, P.N., 2016. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 82, 199-207.
- Du, B., Haddad, S.P., Luek, A., Scott, W.C., Saari, G.N., Burket, S.R., Breed, C.S., Kelly, M., Broach, L., Rasmussen, J.B., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2016. Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 966-974.
- Du, B., Haddad, S.P., Luek, A., Scott, W.C., Saari, G.N., Kristofco, L.A., Connors, K.A., Rash, C., Rasmussen, J.B., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2014. Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 369.
- Duarte, I.A., Reis-Santos, P., Fick, J., Cabral, H.N., Duarte, B., Fonseca, V.F., 2023. Neuroactive pharmaceuticals in estuaries: Occurrence and tissue-specific bioaccumulation in multiple fish species. *Environmental Pollution* 316, 120531.
- Duchet, C., Grabicová, K., Kolar, V., Lepšová, O., Švecová, H., Csercsa, A., Zdvihalová, B., Randák, T., Boukal, D.S., 2024. Combined effects of climate warming and pharmaceuticals on a tri-trophic freshwater food web. *Water Research* 250, 121053.
- Dumas, T., Bonnefille, B., Gomez, E., Boccard, J., Castro, N.A., Fenet, H., Courant, F., 2020. Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to a WWTP effluent extract. *Science of the Total Environment* 712, 136551.
- Fahlman, J., Fick, J., Karlsson, J., Jonsson, M., Brodin, T., Klaminder, J., 2018. Using laboratory incubations to predict the fate of pharmaceuticals in aquatic ecosystems. *Environmental Chemistry* 15, 463-471.
- Fairbairn, D.J., Karpuzcu, M.E., Arnold, W.A., Barber, B.L., Kaufenberg, E.F., Koskinen, W.C., Novak, P.J., Rice, P.J., Swackhamer, D.L., 2016. Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. *Science of the Total Environment* 551, 605-613.
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment* 654, 324-337.
- Fick, J., Lindberg, R.H., Parkkonen, J., Arvidsson, B., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2010a. Therapeutic Levels of Levonorgestrel Detected in Blood Plasma of Fish: Results from Screening Rainbow Trout Exposed to Treated Sewage Effluents. *Environmental Science & Technology* 44, 2661-2666.
- Fick, J., Lindberg, R.H., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2010b. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58, 516-523.

- Fursdon, J.B., Martin, J.M., Bertram, M.G., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2019. The pharmaceutical pollutant fluoxetine alters reproductive behaviour in a fish independent of predation risk. *Science of the Total Environment* 650, 642-652.
- Gayen, T., Tripathi, A., Kumari, U., Mittal, S., Mittal, A.K., 2023. Ecotoxicological impacts of environmentally relevant concentrations of aspirin in the liver of *Labeo rohita*: Biochemical and histopathological investigation. *Chemosphere* 333, 138921.
- Giebułtowski, J., Grabicová, K., Brooks, B.W., Grabic, R., 2024. Influence of time-dependent sampling on the plasma metabolome and exposome of fish collected from an effluent-dependent pond. *Science of the Total Environment* 906, 167446.
- Gobas, F.A., de Wolf, W., Burkhard, L.P., Verbruggen, E., Plotzke, K., 2009. Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr Environ Assess Manag* 5, 624-637.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R., 2014a. Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 7578-7585.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R., 2014b. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 111, 418-426.
- Gómez-Regalado, M.d.C., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., Zafra-Gómez, A., 2023. Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database. *Science of the Total Environment* 861, 160638.
- Grabic, R., Fick, J., Lindberg, R.H., Fedorova, G., Tysklind, M., 2012. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 100, 183-195.
- Grabicová, K., Duchet, C., Švecová, H., Randák, T., Boukal, D.S., Grabic, R., 2024. The effect of warming and seasonality on bioaccumulation of selected pharmaceuticals in freshwater invertebrates. *Water Research* 254, 121360.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cervený, D., Fedorova, G., Randak, T., 2015. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 72, 145-153.
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cervený, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T., 2017. Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. *Water Research* 124, 654-662.
- Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Kolářová, J., Turek, J., Brooks, B.W., Randák, T., 2020a. Psychoactive pharmaceuticals in aquatic systems: A comparative assessment of environmental monitoring approaches for water and fish. *Environmental Pollution* 261, 114150.
- Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Vojs Staňová, A., Bláha, M., Randák, T., Brooks, B.W., Žlábek, V., 2020b. Water reuse and aquaculture: Pharmaceutical bioaccumulation by fish during tertiary treatment in a wastewater stabilization pond. *Environmental Pollution* 267, 115593.
- Grabicova, K., Lindberg, R.H., Östman, M., Grabic, R., Randak, T., Joakim Larsson, D.G., Fick, J., 2014. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment* 488-489, 46-50.
- Grabicová, K., Randák, T., Cervený, D., Turek, J., Kolářová, J., Brooks, B.W., Grabic, R., 2022a. Influence of time-dependent sampling on fish plasma levels of select pharmaceuticals and per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *Environmental Pollution* 315, 120338.
- Grabicova, K., Vojs Staňová, A., Koba Ucin, O., Borik, A., Randak, T., Grabic, R., 2018. Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples. *Analytica Chimica Acta* 1022, 53-60.

- Grabicová, K., Vojs Staňová, A., Švecová, H., Nováková, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Brooks, B.W., Grabic, R., 2022b. Invertebrates differentially bioaccumulate pharmaceuticals: Implications for routine biomonitoring. *Environmental Pollution* 309, 119715.
- Guerreiro, A.d.S., de Aguiar, G., Bertacini, C., Godoi, F.G.A.d., Branco, G.S., Honji, R.M., Caminhas, L., Rath, S., Moreira, R.G., 2025. Multi-biomarker approach to assess the toxicity of carbamazepine, a neuropharmaceutical, in the female fish *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 114, 104653.
- 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. *Environmental Science & Technology* 42, 5807-5813.
- Haddad, S.P., Luek, A., Scott, W.C., Saari, G.N., Burket, S.R., Kristofco, L.A., Corrales, J., Rasmussen, J.B., Chambliss, C.K., Luers, M., Rogers, C., Brooks, B.W., 2018. Spatio-temporal bioaccumulation and trophic transfer of ionizable pharmaceuticals in a semi-arid urban river influenced by snowmelt. *Journal of Hazardous Materials* 359, 231-240.
- Hani, Y.M.I., Prud'Homme, S.M., Nuzillard, J.-M., Bonnard, I., Robert, C., Nott, K., Ronkart, S., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., 2021. ¹H-NMR metabolomics profiling of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): A field-scale monitoring tool in ecotoxicological studies. *Environmental Pollution* 270, 116048.
- Hanson, S., Steeves, K., Bagatim, T., Hogan, N., Wiseman, S., Hontela, A., Giesy, J.P., Jones, P.D., Hecker, M., 2021. Health status of fathead minnow (*Pimephales promelas*) populations in a municipal wastewater effluent-dominated stream in the Canadian prairies, Wascana Creek, Saskatchewan. *Aquatic Toxicology* 238.
- Hodkovicova, N., Hollerova, A., Blahova, J., Mikula, P., Crhanova, M., Karasova, D., Franc, A., Pavlova, S., Mares, J., Postulkova, E., Tichy, F., Marsalek, P., Lanikova, J., Faldyna, M., Svobodova, Z., 2022. Non-steroidal anti-inflammatory drugs caused an outbreak of inflammation and oxidative stress with changes in the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment* 849, 157921.
- Horký, P., Grabic, R., Grabicová, K., Brooks, B.W., Douda, K., Slavík, O., Hubená, P., Sancho Santos, E.M., Randák, T., 2021. Methamphetamine pollution elicits addiction in wild fish. *Journal of Experimental Biology* 224.
- Hossain, M.S., Kubec, J., Grabicová, K., Grabic, R., Randák, T., Guo, W., Kouba, A., Buřič, M., 2019. Environmentally relevant concentrations of methamphetamine and sertraline modify the behavior and life history traits of an aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology* 213, 105222.
- Hu, T., Zhang, J., Xu, X., Wang, X., Yang, C., Song, C., Wang, S., Zhao, S., 2023. Bioaccumulation and trophic transfer of antibiotics in the aquatic and terrestrial food webs of the Yellow River Delta. *Chemosphere* 323, 138211.
- Hubená, P., Horký, P., Grabic, R., Grabicová, K., Douda, K., Slavík, O., Randák, T., 2021. Prescribed aggression of fishes: Pharmaceuticals modify aggression in environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 227, 112944.
- Hubená, P., Horký, P., Grabic, R., Grabicová, K., Douda, K., Slavík, O., Randák, T., 2023. Aggression repeatability in stressed fish in response to an environmental concentration of sertraline and lunar cycle as evidenced by brain metabolomics. *Aquatic Toxicology* 264, 106707.
- Hubena, P., Horky, P., Grabic, R., Grabicova, K., Slavik, O., Randak, T., 2020. Environmentally relevant levels of four psychoactive compounds vary in their effects on freshwater fish condition: a brain concentration evidence approach. *PeerJ* 8, 23.
- Huerta, B., Margiotto-Casaluci, L., Rodriguez-Mozaz, S., Scholze, M., Winter, M.J., Barcelo, D., Sumpter, J.P., 2016. ANTI-ANXIETY DRUGS AND FISH BEHAVIOR: ESTABLISHING THE

- LINK BETWEEN INTERNAL CONCENTRATIONS OF OXAZEPAM AND BEHAVIORAL EFFECTS. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 2782-2790.
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2611-2624.
- Huggett, D.B., Cook, J.C., Ericson, J.F., 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.
- Ivankovic, K., Jambrosic, K., Mikac, I., Kapetanovic, D., Ahel, M., Terzic, S., 2023. Multiclass determination of drug residues in water and fish for bioaccumulation potential assessment. *Talanta* 264, 11.
- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hallstrom, I., Hansen, S.H., Olsen, K.H., 2016. Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 173, 19-28.
- Kelly, K.R., Brooks, B.W., 2018. Global Aquatic Hazard Assessment of Ciprofloxacin: Exceedances of Antibiotic Resistance Development and Ecotoxicological Thresholds, in: Teplow, D.B. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol 159, pp. 59-77.
- Kern, K., 2014. New Standards for the Chemical Quality of Water in Europe under the New Directive 2013/39/EU. *Journal for European Environmental & Planning Law* 11, 31-48.
- Kim, J., Bang, J., Ryu, B., Kim, C.Y., Park, J.-H., 2023. Flubendazole exposure disrupts neural development and function of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment* 898, 165376.
- Klaminder, J., Jonsson, M., Leander, J., Fahlman, J., Brodin, T., Fick, J., Hellström, G., 2019. Less anxious salmon smolt become easy prey during downstream migration. *Science of the Total Environment* 687, 488-493.
- Klatte, S., Schaefer, H.-C., Hempel, M., 2017. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 5, 61-66.
- Koubová, A., Toušová, Z., Šauer, P., de Sales-Ribeiro, C., Vrana, B., Smutná, M., Kocour Kroupová, H., Grabicová, K., Schmidt-Posthaus, H., Randák, T., Grabic, R., Hilscherová, K., Žlábek, V., 2025. Biomarker responses in wild brown trout from a headwater stream and their causal link to water pollution assessed through chemical analysis and in vitro reporter gene bioassays. *Journal of Hazardous Materials* 494, 138433.
- Koubová, A., Van Nguyen, T., Grabicová, K., Burkina, V., Aydin, F.G., Grabic, R., Nováková, P., Švecová, H., Lepič, P., Fedorova, G., Randák, T., Žlábek, V., 2022. Metabolome adaptation and oxidative stress response of common carp (*Cyprinus carpio*) to altered water pollution levels. *Environmental Pollution* 303, 119117.
- Kristofco, L.A., Brooks, B.W., 2017. Global scanning of antihistamines in the environment: Analysis of occurrence and hazards in aquatic systems. *Science of the Total Environment* 592, 477-487.
- Krumsiek, J., Bartel, J., Theis, F.J., 2016. Computational approaches for systems metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* 39, 198-206.
- Lagesson, A., Fahlman, J., Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Bystrom, P., Klaminder, J., 2016. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Science of the Total Environment* 568, 208-215.
- Let, M., Grabicová, K., Balzani, P., Musil, M., Roje, S., Bláha, M., 2025. Bioaccumulation of Pharmaceutically Active Compounds from Treated Urban Wastewaters in Aquatic Insect Larvae and Aerial Adults. *Environmental Science & Technology*.

- Liang, X., Csenki, Z., Ivánovics, B., Bock, I., Csorbai, B., Molnár, J., Vásárhelyi, E., Griffiths, J., Ferincz, Á., Urbányi, B., Ács, A., 2022. Biochemical Marker Assessment of Chronic Carbamazepine Exposure at Environmentally Relevant Concentrations in Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Antioxidants* 11, 1136.
- Lindberg, R.H., Östman, M., Olofsson, U., Grabic, R., Fick, J., 2014. Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. *Water Research* 58, 221-229.
- Manjarrés-López, D.P., Montemurro, N., Ulrich, N., Ebert, R.-U., Jahnke, A., Pérez, S., 2024. Assessment, distribution, and ecological risk of contaminants of emerging concern in a surface water-sediment-fish system impacted by wastewater. *Science of the Total Environment* 935, 173358.
- Manjarrés-López, D.P., Peña-Herrera, J.M., Benejam, L., Montemurro, N., Pérez, S., 2023. Assessment of wastewater-borne pharmaceuticals in tissues and body fluids from riverine fish. *Environmental Pollution* 324, 121374.
- Martin, J.M., Bertram, M.G., Saaristo, M., Fursdon, J.B., Hanninton, S.L., Brooks, B.W., Burket, S.R., Mole, R.A., Deal, N.D.S., Wong, B.B.M., 2019. Antidepressants in Surface Waters: Fluoxetine Influences Mosquitofish Anxiety-Related Behavior at Environmentally Relevant Levels. *Environmental Science & Technology* 53, 6035-6043.
- Martin, J.M., Saaristo, M., Bertram, M.G., Lewis, P.J., Coggan, T.L., Clarke, B.O., Wong, B.B.M., 2017. The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish. *Environmental Pollution* 222, 592-599.
- McCallum, E.S., Krutzelmann, E., Brodin, T., Fick, J., Sundelin, A., Balshine, S., 2017. Exposure to wastewater effluent affects fish behaviour and tissue-specific uptake of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 605, 578-588.
- 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.
- Melvin, S.D., Buck, D.R., Fabbro, L.D., 2016. Diurnal activity patterns as a sensitive behavioural outcome in fish: effect of short-term exposure to treated sewage and a sub-lethal PPCP mixture. *Journal of Applied Toxicology* 36, 1173-1182.
- Miller, T.H., Bury, N.R., Owen, S.F., MacRae, J.I., Barron, L.P., 2018. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution* 239, 129-146.
- Mole, R.A., Brooks, B.W., 2019. Global scanning of selective serotonin reuptake inhibitors: occurrence, wastewater treatment and hazards in aquatic systems. *Environmental Pollution* 250, 1019-1031.
- Naslund, J., Fick, J., Asker, N., Ekman, E., Larsson, D.G.J., Norrgren, L., 2017. Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low $\mu\text{g/L}$ concentrations. *Aquatic Toxicology* 189, 87-96.
- Nichols, J.W., Du, B.W., Berninger, J.P., Connors, K.A., Chambliss, C.K., Erickson, R.J., Hoffman, A.D., Brooks, B.W., 2015. Observed and modeled effects of pH on bioconcentration of diphenhydramine, a weakly basic pharmaceutical, in fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1425-1435.
- Nunez, M., Borrull, F., Pocurull, E., Fontanals, N., 2017. Sample treatment for the determination of emerging organic contaminants in aquatic organisms. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 97, 136-145.
- OECD, 2002. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures, <https://doi.org/10.1787/9789264078475-en>.
- Perez-Fernandez, V., Rocca, L.M., Tomai, P., Fanali, S., Gentili, A., 2017. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 983, 9-41.

- Pérez, M.R., Rossi, A.S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., Cazenave, J., 2018. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 84, 345-353.
- Polverino, G., Aich, U., Brand, J.A., Bertram, M.G., Martin, J.M., Tan, H., Soman, V.R., Mason, R.T., Wong, B.B.M., 2023. Sex-specific effects of psychoactive pollution on behavioral individuality and plasticity in fish. *Behavioral Ecology* 34, 969-978.
- Previšić, A., Rožman, M., Mor, J.-R., Acuña, V., Serra-Compte, A., Petrović, M., Sabater, S., 2020. Aquatic macroinvertebrates under stress: Bioaccumulation of emerging contaminants and metabolomics implications. *Science of the Total Environment* 704, 135333.
- Priyadarshinee, S., Umamaheswari, S., Ramesh, M., 2023. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Naproxen-Induced Hepatotoxicity in a Freshwater Fish *Labeo rohita*. *Water, Air, & Soil Pollution* 234, 28.
- Qiang, L., Cheng, J., Yi, J., Rotchell, J.M., Zhu, X., Zhou, J., 2016. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology* 25, 1426-1437.
- Roberts, J., Kumar, A., Du, J., Hepplewhite, C., Ellis, D.J., Christy, A.G., Beavis, S.G., 2016. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. *Science of the Total Environment* 541, 1625-1637.
- Rodrigues, S., Antunes, S.C., Nunes, B., Correia, A.T., 2019. Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 181, 1-10.
- Rojo, M., Álvarez-Muñoz, D., Dománico, A., Foti, R., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Carriquiriborde, P., 2019. Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution* 252, 146-154.
- Ruan, Y., Lin, H., Zhang, X., Wu, R., Zhang, K., Leung, K.M.Y., Lam, J.C.W., Lam, P.K.S., 2020. Enantiomer-specific bioaccumulation and distribution of chiral pharmaceuticals in a subtropical marine food web. *Journal of Hazardous Materials* 394, 122589.
- Ruhi, A., Acuna, V., Barcelo, D., Huerta, B., Mor, J.R., Rodriguez-Mozaz, S., Sabater, S., 2016. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Science of the Total Environment* 540, 250-259.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M., Arnold, K.E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 285.
- Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M.G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C.P., Wong, B.B.M., Brodin, T., 2019. Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment. *Science of the Total Environment* 655, 1311-1320.
- Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Dagnac, T., Llompart, M., 2015. Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 71, 119-143.
- Sancho Santos, M.E., Grabicová, K., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Šálková, E., Kolářová, J., Vojs Staňová, A., Grabic, R., Randák, T., 2020. Environmental concentration of methamphetamine induces pathological changes in brown trout (*Salmo trutta fario*). *Chemosphere* 254, 126882.
- Sancho Santos, M.E., Horký, P., Grabicová, K., Steinbach, C., Hubená, P., Šálková, E., Slavík, O., Grabic, R., Randák, T., 2023. From metabolism to behaviour – Multilevel effects of environmental methamphetamine concentrations on fish. *Science of the Total Environment* 878, 163167.

- Santos, M.E.S., Horký, P., Grabicová, K., Hubená, P., Slavík, O., Grabic, R., Douda, K., Randák, T., 2021. Traces of tramadol in water impact behaviour in a native European fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 212, 111999.
- Schroder, P., Helmreich, B., Skrbic, B., Carballa, M., Papa, M., Pastore, C., Emre, Z., Oehmen, A., Langenhoff, A., Molinos, M., Dvarioniene, J., Huber, C., Tsagarakis, K., Martinez-Lopez, E., Pagano, S., Vogelsang, C., Mascolo, G., 2016. Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states-considerations for the EU watch list concerning estradiols and diclofenac. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 12835-12866.
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology* 48, 2097-2098.
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., Faggio, C., 2018. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment* 631-632, 789-794.
- Sims, J.L., Cole, A.R., Moran, Z.S., Mansfield, C.M., Possamai, B., Rojo, M., King, R.S., Matson, C.W., Brooks, B.W., 2024. The Tissue-Specific Eco-Exposome: Differential Pharmaceutical Bioaccumulation and Disposition in Fish among Trophic Positions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9.
- Skelton, D.M., Ekman, D.R., Martinović-Weigelt, D., Ankley, G.T., Villeneuve, D.L., Teng, Q., Collette, T.W., 2014. Metabolomics for in Situ Environmental Monitoring of Surface Waters Impacted by Contaminants from Both Point and Nonpoint Sources. *Environmental Science & Technology* 48, 2395-2403.
- Späth, J., Fick, J., McCallum, E., Cervený, D., Nording, M.L., Brodin, T., 2022. Wastewater effluent affects behaviour and metabolomic endpoints in damselfly larvae. *Scientific Reports* 12, 6830.
- Steinbach, C., Burkina, V., Schmidt-Posthaus, H., Stara, A., Kolarova, J., Velisek, J., Randak, T., Kroupova, H.K., 2016. Effect of the human therapeutic drug diltiazem on the haematological parameters, histology and selected enzymatic activities of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere* 157, 57-64.
- Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J., Brodin, T., 2019. Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Science of the Total Environment* 665, 390-399.
- Świacka, K., Maculewicz, J., Kowalska, D., Caban, M., Smolarz, K., Świeżak, J., 2022. Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms – Current state of knowledge. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127350.
- Tanoue, R., Nozaki, K., Nomiyama, K., Kunisue, T., Tanabe, S., 2020. Rapid analysis of 65 pharmaceuticals and 7 personal care products in plasma and whole-body tissue samples of fish using acidic extraction, zirconia-coated silica cleanup, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1631, 461586.
- Time_to_get_clean, 2015. Time to get clean. *Nature* 526, 164-164.
- US EPA, 2012. Estimating Persistence, Bioaccumulation, and Toxicity Using the PBT Profiler. United States Environmental Protecting Agency, <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-05/documents/07.pdf>.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Hodkovicova, N., Vecerkova, L., Blahova, J., Franc, A., Marsalek, P., Mares, J., Tichý, F., Svobodova, Z., Faggio, C., 2020. The effect of foodborne sertraline on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment* 708, 135082.
- Van Nguyen, T., Bořík, A., Sims, J.L., Kouba, A., Žlábek, V., Koubová, A., 2023. Toxicological effects of diclofenac on signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) as related to weakly acidic and basic water pH. *Aquatic Toxicology* 265, 106777.

- Van Nguyen, T., Bořík, A., Velíšek, J., Kouba, A., Žlábek, V., Koubová, A., 2022. Integrated biomarker response in signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* exposed to diphenhydramine. *Chemosphere* 308, 136382.
- Vilar, S., Costanzi, S., 2012. Predicting the biological activities through QSAR analysis and docking-based scoring. *Methods Mol Biol* 914, 271-284.
- Vossen, L.E., Cervený, D., Österkrans, M., Thörnqvist, P.-O., Jutfelt, F., Fick, J., Brodin, T., Winberg, S., 2020a. Chronic Exposure to Oxazepam Pollution Produces Tolerance to Anxiolytic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 54, 1760-1769.
- Vossen, L.E., Červený, D., Sen Sarma, O., Thörnqvist, P.-O., Jutfelt, F., Fick, J., Brodin, T., Winberg, S., 2020b. Low concentrations of the benzodiazepine drug oxazepam induce anxiolytic effects in wild-caught but not in laboratory zebrafish. *Science of the Total Environment* 703, 134701.
- Wang, P., Sun, Q., Wan, R., Du, Q., Xia, X., 2020. Progesterone affects the transcription of genes in the circadian rhythm signaling and hypothalamic-pituitary-gonadal axes and changes the sex ratio in crucian carp (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 77, 103378.
- Weng, Y., Yang, H., Chen, H., Xu, Y., Gu, X., Zhao, Z., Jin, M., Mao, Z., Zeng, Q., Zha, J., Martyniuk, C.J., 2023. Occurrence and Bioaccumulation of Psychotropic Pharmaceuticals and Their Metabolites in Water and Fish in a Shallow Lake in China: Implications for Ecological and Human Health Risks. *ACS ES&T Water* 3, 520-531.
- Wild, C.P., 2005. Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14, 1847-1850.
- Wiles, S.C., Bertram, M.G., Martin, J.M., Tan, H., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2020. Long-Term Pharmaceutical Contamination and Temperature Stress Disrupt Fish Behavior. *Environmental Science & Technology* 54, 8072-8082.
- Wu, Q., Pan, C.-G., Wang, Y.-H., Xiao, S.-K., Yu, K.-F., 2021. Antibiotics in a subtropical food web from the Beibu Gulf, South China: Occurrence, bioaccumulation and trophic transfer. *Science of the Total Environment* 751, 141718.
- Yang, H., Liang, X., Zhao, Y., Gu, X., Mao, Z., Zeng, Q., Chen, H., Martyniuk, C.J., 2021. Molecular and behavioral responses of zebrafish embryos/larvae after sertraline exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111700.
- Yue, M., Zhou, X., Fan, J., Gao, S., Zhao, X.-E., Zhu, S., Liu, Q., Jiang, G., 2024. Recent advances of mass spectrometry-based analytical methods for endocrine disrupting chemicals in human matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 171, 117523.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management* 133, 378-387.
- Zhang, L., Du, S., Liu, D., Dong, D., Zhang, W., Guo, Z., 2022. Antibiotics in fish caught from ice-sealed waters: Spatial and species variations, tissue distribution, bioaccumulation, and human health risk. *Science of the Total Environment* 821, 153354.
- Zhang, L., Li, X., Yuan, Q., Sun, S., Liu, F., Liao, X., Lu, H., Chen, J., Cao, Z., 2024. Isavuconazole Induces Neurodevelopment Defects and Motor Behaviour Impairment in Zebrafish Larvae. *Molecular Neurobiology* 61, 10072-10082.
- Zhang, N., Grabicová, K., Horký, P., Toušová, Z., Douda, K., Linhartová, Z., Turek, J., Pšenička, M., Hilscherová, K., Grabic, R., Randák, T., 2025. Early life development and sex determination of brown trout affected by treated wastewater discharge. *Environmental Research* 271, 121135.
- Zhong, L., Liang, Y.-Q., Lu, M., Pan, C.-G., Dong, Z., Zhao, H., Li, C., Lin, Z., Yao, L., 2021. Effects of dexamethasone on the morphology, gene expression and hepatic histology in adult female mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Chemosphere* 274, 129797.

5. Seznam prací autorky, které jsou součástí habilitační práce

Součástí habilitační práce je celkem 10 publikovaných prací. Všechny práce byly publikovány v mezinárodních vědeckých časopisech s oponentním řízením a přiděleným indikátorem IF v databázi Web of Science společnosti Thomson Reuters. Práce jsou číslovány podle odkazů v jednotlivých kapitolách textu. Uvedené hodnoty IF publikací se vztahují k datu publikování článku v časopise. U každé publikace je rovněž uveden aktuální citační ohlas (SCI) v době psaní této habilitační práce (květen 2025).

Příloha č. 1: Grabicova, K., Vojs Staňová, A., Koba Uzun, O., Borik, A., Randak, T., Grabic, R., 2018. Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples. *Analytica Chimica Acta* 1022, 53-60. (IF 2018 = 5,256; SCI = 67; Q1)

Příloha č. 2: Grabicová, K., Randák, T., Cervený, D., Turek, J., Kolářová, J., Brooks, B.W., Grabic, R., 2022a. Influence of time-dependent sampling on fish plasma levels of select pharmaceuticals and per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *Environmental Pollution* 315, 120338. (IF 2022 = 8,9; SCI = 3; Q1)

Příloha č. 3: Grabicová, K., Duchet, C., Švecová, H., Randák, T., Boukal, D.S., Grabic, R., 2024. The effect of warming and seasonality on bioaccumulation of selected pharmaceuticals in freshwater invertebrates. *Water Research* 254, 121360. (IF 2023 = 11,4; SCI = 7; Q1)

Příloha č. 4: Let, M., Grabicová, K., Balzani, P., Musil, M., Roje, S., Bláha, M., 2025. Bioaccumulation of Pharmaceutically Active Compounds from Treated Urban Wastewaters in

Aquatic Insect Larvae and Aerial Adults. Environmental Science & Technology. (IF 2023 = 11,4; SCI = 0; Q1)

Příloha č. 5: Grabicová, K., Vojs Staňová, A., Švecová, H., Nováková, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Brooks, B.W., Grabic, R., 2022b. Invertebrates differentially bioaccumulate pharmaceuticals: Implications for routine biomonitoring. Environmental Pollution 309, 119715. (IF 2022 = 8,9; SCI = 11; Q1)

Příloha č. 6: Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Kolářová, J., Turek, J., Brooks, B.W., Randák, T., 2020a. Psychoactive pharmaceuticals in aquatic systems: A comparative assessment of environmental monitoring approaches for water and fish. Environmental Pollution 261, 114150. (IF 2020 = 8,071; SCI = 46; Q1)

Příloha č. 7: Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cervený, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T., 2017. Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. Water Research 124, 654-662. (IF 2017 = 7,051; SCI = 171; Q1)

Příloha č. 8: Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Vojs Staňová, A., Bláha, M., Randák, T., Brooks, B.W., Žlábek, V., 2020b. Water reuse and aquaculture: Pharmaceutical bioaccumulation by fish during tertiary treatment in a wastewater stabilization pond. Environmental Pollution 267, 115593. (IF 2020 = 8,071; SCI = 40; Q1)

Příloha č. 9: Horký, P., Grabic, R., **Grabicová, K.**, Brooks, B.W., Douda, K., Slavík, O., Hubená, P., Sancho Santos, E.M., Randák, T., 2021. Methamphetamine pollution elicits addiction in wild fish. *Journal of Experimental Biology* 224. (IF 2021 = 3,308; SCI = 33; Q2)

Příloha č. 10: Giebułtowicz, J., **Grabicová, K.**, Brooks, B.W., Grabic, R., 2024. Influence of time-dependent sampling on the plasma metabolome and exposome of fish collected from an effluent-dependent pond. *Science of the Total Environment* 906, 167446. (IF 2023 = 8,2; SCI = 3; Q1)

6. Český abstrakt

Grabicová, K., 2025: Vliv komunálního znečištění na vodní organismy se zaměřením na bioakumulaci a metabolom. Habilitační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany: 155 s.

Předložená habilitační práce je tvořena souborem deseti komentovaných publikací. Práce je rozdělena do tří částí. První část je věnována vzorkování a vývoji extrakční a analytické metody pro analýzu léčiv a jejich metabolitů. V druhé části je popsáno použití této metody pro zmapování bioakumulace těchto cizorodých látek ve vodních organismech na různé trofické úrovni. Třetí část je zaměřena na necílený screening biologických vzorků získaných po expozici ryb mikropolutantům.

V habilitační práci je doložena důležitost vzorkování a použití vhodné extrakční a analytické metody pro získání věrohodných výsledků. Pro potřeby analýzy správně odebraných vzorků byla vyvinuta relativně jednoduchá multireziduální analytická metoda využívající kapalinovou chromatografii s vysoko-rozlišující hmotnostně-spektrometrickou detekcí.

V práci jsou zdokumentovány hladiny léčiv a jejich bioakumulace v závislosti na typu matrice, na druhu organismu i na trofické úrovni. Výsledkem mesokosmových experimentů pak bylo doložení vlivu teploty prostředí na proces bioakumulace.

Necílená analýza je nově používaný přístup ke zhodnocení vlivu znečištěného prostředí na vodní organismy – ať už v jednodušším porovnání změřených signálů získaných zpracováním dat či v konkrétní identifikaci endogenních metabolitů a exogenních látek.

Klíčová slova: bioakumulační faktor, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, léčiva a jejich metabolity, necílený screening, ryby, vodní bezobratlí, vyčištěná odpadní voda

7. Anglický abstrakt

Grabicová, K., 2025: The effect of communal pollution on aquatic organisms with a focus on bioaccumulation and metabolome. Habilitation thesis, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Vodňany: 155 p. (in Czech)

The presented habilitation thesis is an annotated set of ten publications. The thesis is divided into three parts. The first part is devoted to sampling and developing an extraction and analytical method for analysing pharmaceuticals and their metabolites. In the second part, the use of this method for mapping the bioaccumulation of these micropollutants in aquatic organisms at different trophic levels is described. The third part is focused on non-targeted screening of biological samples.

The importance of proper sampling is discussed in the thesis. Using an appropriate method for obtaining reliable results resulted in the development of robust multiresidual liquid chromatography with a high-resolution mass spectrometry analytical method.

The concentration of pharmaceuticals and their bioaccumulation was shown to be dependent on the type of matrix, the organism species and the trophic position.

Non-targeted analysis was proposed as a new approach to assessing the impact of a polluted environment on aquatic organisms – whether in a simpler comparison of down- or up-regulated signals or sophisticated identification of endogenous metabolites and exogenous substances.

Keywords: aquatic invertebrates, bioaccumulation factor, fish, liquid chromatography, mass spectrometry, pharmaceuticals and their metabolites, non-targeted screening, treated wastewater

8. Poděkování

Moc děkuji své rodině za podporu, toleranci a pomoc. Mám vás moc ráda!

Kolegům z LECHB a obecně z FROV JU děkuji za skvělou spolupráci a přátelskou atmosféru na pracovišti. Ráda tu pracuji!

Tato práce mohla vzniknout díky studiím finančně podpořeným následujícími poskytovateli a projekty:

- Ministerstvo školství mládeže a tělovýchovy České republiky, OPVaVpI – projekty CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a LM2018099
- Grantová agentura České republiky (GAČR), projekty 15-04258S, 16-06498S, 18-15802S, 20-04676X, 20-09951S, 20-16111S
- Ministerstvo zemědělství České republiky v rámci projektů NAZV, projekt QK21020080
- Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, projekt 012/2016/Z