

**VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO**

**FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE**

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství

**VÝZNAMNÉ EMERGENTNÍ POLUTANTY  
OBSAŽENÉ V PRODUKTECH URČENÝCH PRO  
OSOBNÍ PÉČI – POTENCIÁLNÍ RIZIKO PRO RYBY**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Autor práce**

MVDr. Jana Cahová

**Školitel**

doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D.

**Školitel specialista**

doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D.

**BRNO 2023**

**VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO**  
**Fakulta veterinární hygieny a ekologie**

---

**PROHLÁŠENÍ STUDENTA**

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci vypracoval/a zcela samostatně pod vedením školitele a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházel/a, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně dne..... 30. června 2023 .....

Podpis studenta:



**VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO**  
**Fakulta veterinární hygieny a ekologie**

---

**PROHLÁŠENÍ AUTORA**


Jsem si vědom, že

- odevzdáním závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby,
- moje závěrečná práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí,
- na moji závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jméno a příjmení autora, titul: Jana Cahová, MVDr.

Název práce: Významné emergentní polutanty obsažené v produktech určených pro osobní péči-potenciální riziko pro ryby

V Brně dne 30. června 2023

Podpis autora: 

1) zákon č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a záznamu o průběhu a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní vnitřní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 60:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez závažného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

### POTVRZENÍ AUTORA

Svým podpisem potvrzují, že písemná verze odevzdané závěrečné práce je shodná s elektronickou verzí práce, která je pod stejnojmenným názvem v pdf formě uložena v Informačním systému VETUNI (IS STAG), příp. na předaném nosiči (CD, DVD).

Jméno a příjmení autora, titul:	Jana Cahová, MVDr.
Název práce v češtině:	Významné emergentní polutanty obsažené v produktech určených pro osobní péči-potenciální
Název práce v angličtině:	Significant emergent pollutants contained in personal care products - potential risk for fish

V Brně dne ..... 30. červen 2023 .....

Podpis autora: .....  .....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům, doc. Ing. Janě Blahové, Ph.D. a doc. Mgr. Petru Maršálkovi, Ph.D., za jejich odborné rady a vždy vstřícné vedení poskytované v průběhu celého mého studia.

Prof. MVDr. Zdeňce Svobodové, DrSc. děkuji za její cenné rady. Jsem velice vděčná, že jsem měla tu čest pracovat s uznávanou kapacitou ve svém oboru.

Všem kolegům z Veterinární univerzity Brno děkuji za podporu nejen během pracovní doby, ale také za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také za poskytnutí finančních prostředků projektu 226/2019/FVHE a projektu 223/2021/FVHE Interní Grantové Agentury Veterinární univerzity Brno a také grantu FVHE/VEČEREK/ITA 2019. Rovněž děkuji za poskytnutí finanční podpory projektu PROFISH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869), projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky „CENAKVA“ (LM2018899) a projektu č. 20-04676X Grantové agentury České republiky.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 CÍL PRÁCE</b>	<b>3</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>4</b>
<b>3.1 UV filtry</b>	<b>4</b>
3.1.1 Základní charakteristika UV filtrů	4
3.1.2 Spotřeba UV filtrů ve světě	8
3.1.3 Výskyt UV filtrů v životním prostředí	9
3.1.4 Toxicita UV filtrů	11
3.1.4.1 Vliv UV filtrů na hematologické a biochemické parametry	11
3.1.4.2 Narušení antioxidantní ochrany ryb	12
3.1.4.3 Histologické změny orgánů po expozici UV filtry	14
3.1.4.4 Endokrinní disrupce thyroideálních hormonů	15
3.1.4.5 Embryotoxicita vybraných UV filtrů	17
3.1.5 Charakteristika testovaných UV filtrů	18
<b>3.2 Musk sloučeniny</b>	<b>19</b>
3.2.1 Základní charakteristika musk sloučenin	19
3.2.2 Spotřeba musk sloučenin ve světě	21
3.2.3 Výskyt musk sloučenin v životním prostředí	22
3.2.5 Toxicita musk sloučenin	23
3.2.5.1 Vliv musk sloučenin na hematologické a biochemické parametry	23
3.2.5.2 Narušení antioxidantní ochrany ryb	24
3.2.5.3 Histologické změny orgánů po expozici musk sloučeninami	25
3.2.5.4 Hodnocení xenoestrogenního potenciálu tonalidu	25
3.2.6 Charakteristika tonalidu	26
<b>4 MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Zhodnocení negativního vlivu oktinoxátu</b>	<b>28</b>
4.1.1 Subchronický <i>in vivo</i> test na pstruhu duhovém	28
4.1.2 <i>In vitro</i> analýza endokrinní disrupce oktinoxátu	28
<b>4.2 Posouzení embryotoxicity vybraných UV filtrů</b>	<b>29</b>

4.3 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro pstruha duhového	30
4.4 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro danio pruhoané	30
<b>5 VÝSLEDKY</b>	<b>32</b>
5.1 Zhodnocení negativního vlivu oktinoxátu	32
5.1.1 Subchronický <i>in vivo</i> test na pstruhu duhovém	32
5.1.2 <i>In vitro</i> analýza endokrinní disrupce oktinoxátu	34
5.2 Posouzení embryotoxicity vybraných UV filtrů	53
5.3 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro pstruha duhového	68
5.4 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro danio pruhoané	81
<b>6 DISKUZE</b>	<b>89</b>
6.1 Zhodnocení změn hematologických a biochemických parametrů ryb	89
6.2 Vliv na antioxidační status ryb	90
6.3 Narušení endokrinního systému ryb	92
6.4 Embryotoxicita UV filtrů pro danio pruhoané	94
<b>7. ZÁVĚR</b>	<b>97</b>
<b>8 ABSTRAKT</b>	<b>99</b>
<b>9 ABSTRACT</b>	<b>100</b>
<b>10 KLÍČOVÁ SLOVA</b>	<b>101</b>
<b>11 POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>102</b>
<b>12 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK</b>	<b>117</b>
<b>13 SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>118</b>

# 1 ÚVOD

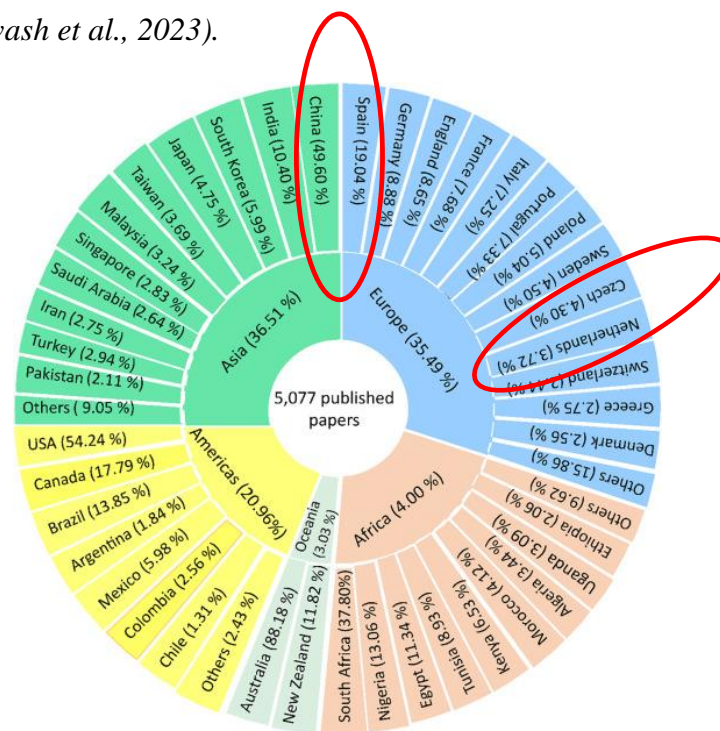
V posledních desetiletích se díky intenzivní průmyslové, zemědělské a další antropogenní činnosti významně zvýšilo používání různých chemických látek. V návaznosti na tento fakt, se současný výzkum v oblasti ekotoxikologie zaměřuje nejen na tradiční látky znečišťující vodní prostředí (např. polychlorované bifenyly, dioxiny, organochlorované a organofosforové pesticidy), ale stále častěji se pozornost věnuje tzv. emergentním polutantům. Jako emergentní polutanty definujeme chemické sloučeniny, které se v životním prostředí objevují relativně nově a nejsou v současné době zahrnuty do regulačního rámce nebo mají nově vznikající regulační normy dle vnitrostátních či mezinárodních zákonů, a zároveň vykazují potenciálně škodlivé účinky. Jedná se o látky jak syntetického, tak i přírodního původu. Důležitým aspektem hodnocení jejich toxicity je skutečnost, že do životního prostředí často vstupují kontinuálně, a tudíž jsou necílové organismy vystaveny chronické expozici těmto látkám po celý život. Přestože jejich koncentrace jsou relativně nízké, často řádově v ng/l, mohou tyto sloučeniny vykazovat vysokou biologickou aktivitu a mít potenciálně negativní dopad na vodní a suchozemské ekosystémy včetně lidského zdraví (Ahmad et al., 2022). Intenzivně je diskutována například problematika endokrinní disrupce, která již byla u řady zástupců prokázána. Mezi emergentní polutanty řadíme různé průmyslové látky, např. bisfenoly, perfluorované sloučeniny, ftaláty, moderní typy pesticidů, mikroplasty či nanočástice. Významnou skupinou mikropolutantů jsou také léčiva a látky obsažené v produktech určených pro osobní péči, tzv. PPCPs – „*Pharmaceuticals and Personal Care Products*“ (Ali et al., 2022).

Produkty osobní péče (PCPs) byly definovány Agenturou pro ochranu životního prostředí Spojených států amerických (US EPA) jako „*jakýkoli produkt pro osobní zdraví, péči nebo kosmetickou aplikaci*“ (Cizmas et al., 2015). Monitoringu léčiv je věnována pozornost již poměrně dlouhou dobu, avšak problematika výskytu látek, které se běžně vyskytují v produktech osobní péče, se rozvíjí až v posledních letech. Jedním z důvodů je snadný vstup látek obsažených v PCPs do životního prostředí a jejich následná kumulace a potenciálně negativní efekt na vodní ekosystém. Z důvodu jejich hojného využití v domácnostech dochází následně k jejich kontinuálnímu vstupu do odpadních vod, kde v mnoha případech dochází pouze k jejich minimálnímu odstranění v rámci běžných čistírenských procesů (Ahmad et al., 2022). Mezi PCPs řadíme širokou škálu přípravků, jako jsou například krémy, šampóny, mýdla, zubní pasty, detergenty, vonné esence nebo bytové parfémů. V důsledku jejich nadužívání

během posledních desítek let, jsou tyto nové druhy polutantů v životním prostředí detekovány čím dál častěji. U řady těchto kontaminantů jsou jejich negativní účinky odhalovány průběžně, proto lze v případě jejich využití zaznamenat i různé legislativní změny, které omezují jejich použití (Zicarelli et al., 2022).

Hawash et al. (2023) provedli analýzu publikovaných studií na téma léčiv a sloučenin obsažených v produktech osobní péče. Studie monitorovala četnost publikací od roku 2014 do roku 2022. V uvedeném období bylo více jak 72 % prací původem z Asie a Evropy. Nejvíce studií bylo realizováno v Číně a ve Španělsku. Množství publikací reflektuje aktuálnost dané problematiky a také zájem vědců a mnohých nadnárodních organizací, se tomuto tématu v zájmu ochrany životního prostředí intenzivně věnovat. Je významný předpoklad, že tento trend bude dále pokračovat (Obr. 1).

**Obrázek 1.** Počet studií publikovaných v jednotlivých státech a regionech na téma „léčiv a produktů osobní péče ve vodním prostředí“ v průběhu let 2014 až 2022. *Upraveno pro účely předkládané práce (Hawash et al., 2023).*



Předkládaná disertační práce se věnuje dvěma významným skupinám emergentních polutantů ze skupin látek obsažených v produktech pro osobní péči – UV filtrům a musk sloučeninám. V posledních letech jsou zástupci těchto dvou kategorií vnímány jako jedny z neaktuálnější se vyskytujících mikropolutantů.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce je posouzení potenciálního rizika běžně se vyskytujících emergentních polutantů pro ryby. V průběhu našeho výzkumu jsme se zaměřili na dvě významné skupiny mikropolutantů, které se hojně vyskytují v produktech určených pro osobní péči, jedná se o vybrané zástupce ze skupiny ultrafialových (UV) filtrů a musk sloučenin.

*Dílčí cíle předkládané disertační práce byly následující:*

- realizovat testy toxicity s běžně užívanými zástupci ze skupiny produktů určených pro osobní péči, které se mohou vyskytovat v přirozeném prostředí ryb a posoudit jejich nežádoucí účinky na základní fyziologické funkce ryb;
- zhodnotit potenciální endokrinní disrupci vybraných emergentních polutantů;
- zhodnotit účinky testovaných mikropolutantů v environmentálně relevantních koncentracích a posoudit výskyt nežádoucích účinků ve vyšších koncentracích v porovnání s environmentálními koncentracemi;
- zhodnotit embryotoxicitu vybraných zástupců UV filtrů a posoudit míru nežádoucích účinků po expozici jednotlivými zástupci, tak i jejich kombinacemi.

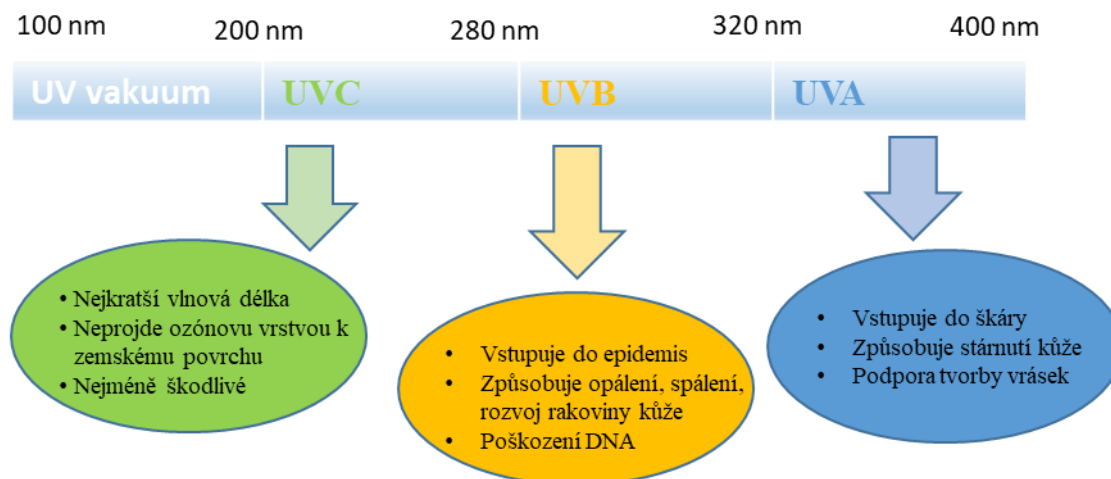
## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 UV filtry

#### 3.1.1 Základní charakteristika UV filtrů

Vystavení organismu UV záření může vést k poškození kožních buněk a následně k rozvoji rakoviny kůže. UV záření můžeme na základě vlnové délky a efektu rozdělit do tří skupin. **UVC** záření, které je kratší než 280 nm, je považováno za nejnebezpečnější. Jelikož je ale v současnosti zcela pohlceno ozónovou vrstvou, není mu věnována velká pozornost. **UVB** záření (320 až 280 nm) ovlivňuje epidermis a nadměrné vystavení tomuto druhu záření způsobuje spálení kůže, které se může později rozvinout v melanogenezi. **UVA** záření o vlnové délce 400 až 320 nm proniká do dermis pokožky a může vést k poškození DNA kožních buněk v důsledku nadprodukce volných radikálů (Obr. 2). Z celkového množství slunečních paprsků na zemský povrch proniká až 90 % UVA záření a zbytek tvoří složka UVB (Abou-Dahech et al., 2022).

**Obrázek 2.** Elektromagnetické spektrum slunečního záření a jeho účinky. *Upraveno pro účely disertační práce dle Abou-Dahech et al. (2022).*



Účinnou ochranou před UV zářením jsou UV filtry, které se hojně používají v různých produktech. UV filtry můžeme rozdělit do dvou základních skupin – anorganické a organické. **Anorganické UV filtry** chrání pokožku před zářením především na principu odrazu a mezi tyto se například řadí oxid titaničitý nebo oxid zinečnatý. **Organické UV filtry** mají schopnost UV

záření absorbovat. V této skupině najdeme zástupce aminobenzoátů, benzofenonů, deriváty kafry a kyseliny skořicové, salicyláty, benzimidazoly a další.

Organické látky pohlcující UV záření jako jsou UV stabilizátory a UV filtry, našly své uplatnění v různých druzích plastů, textilií, barvách a dalších průmyslových výrobcích. Jejich hlavním úkolem je zajistit stabilitu uvedených produktů proti UV záření a s ním spojenou fotoindukovanou degradaci, která by vedla k opotřebení výrobku. Navíc jsou tyto látky běžnými složkami kosmetických a opalovacích přípravků, aby snížily negativní účinky UV záření na pokožku a vlasy (Apel et al., 2018). Opalovací přípravky jsou používány celosvětově, ovšem v různých zemích se setkáváme s rozdílnými definicemi a klasifikacemi látek v nich obsažených. Ve Spojených státech amerických, na Novém Zélandu, v Kanadě a Austrálii jsou opalovací přípravky definované jako volně prodejné léky. Naopak v Číně, Japonsku, Jižní Africe a v Evropské unii (EU) jsou tyto produkty řazeny mezi kosmetické přípravky (Chisvert and Salvador, 2007). UV filtry jsou v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích (EU) definovány jako látky, které jsou výhradně nebo převážně určeny k ochraně kůže před ultrafialovým zářením prostřednictvím absorpce, odrazu nebo rozptýlení tohoto záření. V Příloze VI tohoto nařízení je uveden seznam UV filtrů, které jsou bezpečné a povolené ve svých maximálních koncentracích pro užití v kosmetických přípravcích, včetně dvou anorganických sloučenin. Vybrané UV filtry jsou zkoumány z hlediska jejich toxikologické bezpečnosti a jsou také podrobeny komplexním testům. Výrobci musí prokázat zdravotní nezávadnost svých produktů, a tudíž jsou schválené UV filtry v případě nových zjištění přezkoumávány a seznam povolených UV filtrů poté může být upraven. V posledních letech došlo k úpravě seznamu těchto látek. V roce 2008 bylo na základě Směrnice Komise 2008/123/ES zakázáno na evropském trhu použití paraaminobenzoové kyseliny jako UV filtru (Jesus et al., 2022). Výzkum prokázal její nízkou fotostabilitu a zároveň potvrdil její toxické účinky a schopnost vyvolání mnohých alergických reakcí. V roce 2015 byl z tohoto seznamu vymazán 3-benzyliden kafra, a to z důvodu prokázání toxicity u mořských živočichů a narušení endokrinního systému (Scheil et al., 2008; Holbech et al., 2002). Na druhou stranu, v roce 2016 byl do seznamu doplněn anorganický zástupce oxid zinečnatý (Tab. 1).

Tabulka 1. Seznam UV filtrů povolených v kosmetických přípravcích. *Upraveno a zkráceno dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích (EU), Nařízení Komise (EU) č. 621/2016, Nařízení Komise (EU) č. 1298/2015 a dle Santos et al. (2012) pro účely předkládané práce.*

Skupina	Název UV filtru	Max. povolená koncentrace
Paraaminobenzoáty	PEG-25-PABA	10 %
	Ethylhexyl Dimethyl PABA	8 %
Deriváty kafru	Camphor Benzalkonium Methosulfate	6 %
	Terephtalylidene Dicamphor Sulfonic Acid	10 % <sup>1</sup>
	Benzylidene Camphor Sulfonic Acid	6 % <sup>1</sup>
	Polyacrylamidomethyl Benzyliden Camphor	6 %
	<b>4-Methylbenzylidene Camphor</b>	<b>4 %</b>
Salicyláty	Homosalate	10 %
	Ethylhexyl Salicylate	5 %
Benzofenony	<b>Benzophenone-3*</b>	<b>10 %</b>
	Benzophenone-4, Benzophenone-5	5 % <sup>1</sup>
	Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate	10 % <sup>2</sup>
Benzimidazoly	<b>Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid</b>	<b>8 %<sup>1</sup></b>
	Drometrizole Trisiloxane	15 %
	Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate	10 % <sup>1</sup>
Dibenzoylbutany	Butyl Methoxydibenzoylmethane	5 %
Cinamáty	<b>Octocrylen</b>	<b>10 %<sup>1</sup></b>
	<b>Ethylhexyl Methoxycinnamate</b>	<b>10 %</b>
	Isoamyl <i>p</i> -methoxycinnamate	10 %
	Polysilicone-15	10 %
Triaziny	Ethylhexyl Triazone	5 %
	Diethylhexyl Butamido Triazone	10 %
	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	10 %
	Tris-biphenyl triazine/tris-biphenyl triazine (nano)	10 %
	Phenylene Bis-Diphenyl-triazine	5 %
	Methoxypropylamino Cyclohexenylidene Ethoxyethylcyanoacetate	3 %
Organické nerozpustné pigmenty	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol	10 %
	Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (nano)	10 %
Minerální UV filtry	Oxid titaničitý	25 % <sup>4</sup>
	Oxid titaničitý (nano)	25 % <sup>4</sup>
	Oxid zinečnatý	25 % <sup>3</sup>
	Oxid zinečnatý (nano)	25 % <sup>3</sup>

Pozn.: \* – Upozornění: obsahuje oxybenzon; <sup>1</sup> – jako kyselina; <sup>2</sup> – v přípravcích ke slunění; <sup>3</sup> – v případě kombinace použití oxidu zinečnatého a oxidu zinečnatého v nanoformě nesmí součet překročit stanovený limit; <sup>4</sup> – v případě kombinace použití oxidu titaničitého a oxidu titaničitého v nanoformě nesmí součet překročit stanovený limit; 4-Methylbenzylidene Camphor – 4-methylbenzyliden kafir/4-MBC; Benzophenone-3 – benzofenon-3/BP-3; Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid – PBSA; Octocrylen – oktokrylen/OC; Ethylhexyl Methoxycinnamate – oktinoxát/EHMC; Tučně jsou zvýrazněné UV filtry zkoumané v rámci našich ekotoxilogických experimentů.

Z důvodu zvyšující se frekvence používání UV filtrů v kosmetických přípravcích v poslední době, je nutné, aby docházelo k monitoringu těchto sloučenin a sledovala se potenciální toxicita jednotlivých substancí. V návaznosti na výsledky ekotoxikologických výzkumů a na průkazné narušení endokrinního systému u vodních organismů, došlo v Nařízení Komise (EU) č. 1176/2022 ke změně limitů povolených koncentrací (tzn. snížení maximální možné koncentrace v % v různých formách PCPs) pro následující dva organické UV filtry – benzofenon-3 (BP-3) a oktokrylen (OC) (Obr. 3). V roce 2019 zakázaly státy Havaj, Key West na Floridě a Panenské ostrovy dovoz a prodej opalovacích přípravků s obsahem BP-3 a oktinoxátu (EHMC) z důvodu jejich prokázané toxicity na mořský ekosystém. Tento zákaz vzešel v platnost v roce 2021 (Abou-Dahech et al., 2022). Nutno podotknout, že tyto UV filtry jsou obsaženy v 70–80 % opalovacích přípravků na trhu (Raffa et al., 2019).

**Obrázek 3.** Změna limitu povolených koncentrací benzofenonu-3 a oktokrylenu v kosmetických přípravcích. *Upraveno pro účely předkládané práce (Příloha Nařízení Komise (EU) č. 1176/2022).*

V příloze VI nařízení (ES) č. 1223/2009 se položky 4 a 10 nahrazují tímto:

Referenční číslo	Identifikace látky				Podmínky			Znění podmínek použití a upozornění
	Chemický název/INN	Název v seznamu přísad podle společné nomenklatury	Číslo CAS	Číslo ES	Druh výrobku, části těla	Nejvyšší koncentrace v přípravku připraveném k použití	Jiné	
a	b	c	d	e	f	G	h	i
4	2-Hydroxy-4-methoxybenzofenon/ Oxybenzon (*)	Benzophenone-3	131-57-7	205-031-5	a) Přípravky na obličej, na ruce a na rty, kromě přípravků ve formě sprejového rozstřikovače a pumpičkového spreje b) Přípravky na tělo, včetně přípravků ve formě sprejového rozstřikovače a pumpičkového spreje c) Jiné přípravky	a) 6 % b) 2,2 % c) 0,5 %	Pro a) a b) ne více než 0,5 % za účelem ochrany složení přípravku  a) použije-li se v množství 0,5 % za účelem ochrany složení přípravku, nesmí rovněž použít jako filtr ultrafialového záření přesáhnout 5,5 %.  b) použije-li se v množství 0,5 % za účelem ochrany složení přípravku, nesmí rovněž použít jako filtr ultrafialového záření přesáhnout 1,7 %.	Pro a) a b): obsahuje Benzophenone-3 (**)
10	2-Ethylhexyl-3,3-difenyl-2-kyanoprop-2-enoát/ Oktokrylen (*), (***)	Octocrylene	6197-30-4	228-250-8	a) Přípravky ve sprejovém rozstřikovači b) Jiné přípravky	a) 9 % b) 10 %		

(\*) Kosmetické přípravky, které tuto látku obsahují a jsou v souladu s omezeními stanovenými v nařízení (ES) č. 1223/2009 ve znění platném ke dni 27. července 2022, však mohou být uváděny na trh Unie do 28. ledna 2023 a mohou být dodávány na trh Unie do 28. července 2023.

(\*\*) Nevyžaduje se, je-li koncentrace 0,5 % nebo nižší a je-li látka použita pouze pro účely ochrany výrobku.

(\*\*\*) Benzofenon jako nečistota a/nebo produkt rozkladu oktokrylenu se zachovává na stopové úrovni.

### 3.1.2 Spotřeba UV filtrů ve světě

Vzhledem k prokázaným karcinogenním účinkům UV záření, se poptávka po produktech na ochranu proti škodlivým UV paprskům stále zvyšuje. V neposlední řadě se však zohledňují výsledky nejnovějších toxikologických studií a seznam povolených UV filtrů podléhá supervizi a poté aktualizaci. V EU je dbán zřetel na to, aby kosmetické produkty obsahovaly účinnou UV ochranu, ovšem ani Světová zdravotnická organizace (WHO) nezůstává pozadu a dohlíží na edukaci ohledně škodlivosti slunečního záření, a to především u dětí. Dle WHO jsou právě děti nejzranitelnější skupinou, neboť spálení sluncem v dětském věku zvyšuje riziko vzniku rakoviny kůže a poškození očí v dospělosti (WHO, 2003).

Jak už bylo uvedeno, UV filtry používané v kosmetických přípravcích se vyskytují buď v organické, anebo anorganické formě. Dle výsledků studie prováděné v roce 2021, která se zaměřila na analýzu nejčastěji použitých UV filtrů v komerčně dostupných opalovacích přípravcích v EU, převládají na evropském trhu 3 druhy organických UV filtrů – butyl methoxydibenzoylmethan OC a UV filtr ze zástupců triazinů – bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl, a to v četnosti použití mezi 45 až 75 %. Jednou z možností, aby se docílilo požadované UV ochrany, bezpečnosti a fotostability, je použití více druhů UV filtrů v jednom kosmetickém přípravku. Například UV filtr butyl methoxydibenzoylmethan zajišťuje ochranu proti UVA záření, které je považováno za nejškodlivější. Ovšem tento UV filtr podléhá fotodegradaci, a tudíž je vzhledem ke své nedostatečné fotostabilitě často používán v kombinaci s jiným UV filtrem, který ho dokáže stabilizovat. Jedná se konkrétně o OC, který nejenom že butyl methoxydibenzoylmethan stabilizuje, ale zároveň chrání proti UVB záření, čímž pokryje účinky v rozsáhlejší UV spektru. Dle výsledků zmíněné studie můžeme pozorovat u dětských opalovacích prostředků trend společného použití organických a anorganických UV filtrů (např. oxid titaničitý). Tato kombinace zajišťuje zvýšení síly ochranného faktoru proti UV záření (SPF) a minimalizuje alergickou reakci. Navíc se všeobecně zvyšuje hranice UV ochrany u dětských opalovacích přípravků na SPF 50+, což značí snahu výrobců zajistit co nejvyšší protekci proti UV záření. Tudíž by se dalo konstatovat, že povědomí o rizicích jak UV záření, tak i jednotlivých UV filtrů stoupá a výrobci kosmetických produktů se snaží ochránit jak lidské zdraví, tak i životní prostředí. V posledních letech zaznamenáváme všeobecně znatelný trend snižování používání anorganických UV filtrů v nanoformě, zřejmě v důsledku osvěty ohledně negativních účinků těchto UV filtrů na vodní ekosystém a necílové organismy. Na druhou stranu se dle provedeného průzkumu používání

anorganického oxidu titaničitého, jako účinného UV filtru, čím dál víc zvyšuje (Jesus et al., 2022).

### 3.1.3 Výskyt UV filtrů v životním prostředí

Problematika emergentních polutantů a jejich detekce v životním prostředí se dá hodnotit z různých pohledů. Vstup těchto látek do životního prostředí je složitě kontrolovatelný, neboť jsou tyto látky používány dennodenně a také celosvětově. Řadíme mezi ně také UV filtry. UV filtry v PCPs jsou v našich podmínkách používány především sezónně, během rekreačních aktivit, ovšem v jiných podnebných pásech, kde panuje obecněji teplejší a slunečnější celoroční klima, se setkáváme s častějším použitím opalovacích přípravků. Je důležité zdůraznit, že nezávisle na ročním období se UV filtry ve své podstatě vyskytují v životním prostředí během celého roku.

Dalším důležitým aspektem je detekce jak původních forem sloučenin emergentních polutantů, tak i jejich degradačních produktů. Některé UV filtry podléhají biologické a chemické degradaci a do vodního ekosystému vstupují nejen mateřské sloučeniny, ale také jejich transformační produkty (Jentzsch et al., 2019; Zhou et al., 2019). UV filtry se do životního prostředí dostávají dvěma základními cestami a) **přímo**, během rekreačních aktivit v důsledku omývání pokožky těla v bazénech, jezerech, mořské vodě a b) **nepřímo**, v důsledku nedostatečné eliminace v čistírnách odpadních vod (Schneider and Lim, 2019). Současné čistírny odpadních vod nejsou speciálně navrženy pro eliminaci mikropolutantů. Mnoho z těchto látek není eliminováno procesy čištění, a tudíž jsou výtoky z těchto čistíren jedním z hlavních zdrojů znečištění povrchových vod a emergentní polutanty poté mohou kolovat celým ekosystémem (Bell et al., 2011; Luo et al., 2014). UV filtry jsou považovány za látky lipofilní povahy se silným sorpčním potenciálem. Během procesu čištění odpadních vod ulpívají a adsorbují se na částicích kalu (Košnář et al., 2021). Kontaminovaný kal může potenciálně škodit necílovým organismům (Hajšlová a Šetková, 2004; Liu et al., 2021).

Zajímavým tématem je výskyt těchto polutantů v lidské adipózní tkáni, mateřském mléce či v moči dětí. Mateřské mléko a adipózní tkáň jsou často používaným bioindikátorem lipofilních perzistentních polutantů, kdy hlavním vstupem těchto polutantů do organismu je především kožní absorpce. UV filtry jsou obsaženy v kosmetických produktech, které dennodenně používáme, tudíž je naše pokožka v nepřetržitém kontaktu s těmito látkami. Je navíc prokázáno, že UV filtry jsou v organismu metabolizovány a vylučovány především močí, tudíž detekcí v této matrici lze odrazit míru expozice těmito polutanty (Li et al., 2019).

Diskutovaným tématem je také vystavení dětí negativnímu působení organických UV filtrů. Děti mají menší schopnost metabolizovat a vylučovat xenobiotika. Navíc mají relativně větší povrch těla vzhledem ke své hmotnosti v porovnání s dospělým, a tudíž mohou být citlivější k negativnímu působení endokrinních disruptorů a také obtížněji regulují negativní účinky těchto polutantů (Manová et al., 2013).

Jak už bylo uvedeno, hlavním zdrojem výskytu UV filtrů v životním prostředí je především antropogenní činnost. Dalo by se konstatovat, že v oblastech s vysokou hustotou obyvatelstva je míra detekce těchto polutantů vyšší než v místech, kde je obyvatelstva znatelně méně. Logicky lze také očekávat minoritní nálezy v oblastech pokrytých ledem. Navzdory snaze ochránit arktické oblasti od znečištění cizorodými látkami, se v posledních desetiletích nedaří zprostit tyto oblasti od důsledků antropogenní činnosti. Jedním z hlavních důvodů znečištění jak „starými“, tak „novými“ polutanty jsou různé pozemní operace, likvidace odpadních vod či nárůst cestovního ruchu. Neopomenutelným faktem je také dálkový vzdušný transport. Nejnovější studie zaměřené na výskyt hojně používaného UV filtru EHMC prokazují, že je tento UV filtr přítomen v atmosféře jak v plynné, tak i pevné částicové fázi, což umožňuje vzdušný transport z místa zdroje znečištění. Výskyt této sloučeniny byl prokázán nejen v povrchové vodě Severního ledového oceánu, ale také ve sněhu arktických oblastí a v místech, kde již sníh roztál (D'Amico et al., 2022).

V tabulce č. 2 jsou uvedeny koncentrace vybraných UV filtrů, které byly předmětem našeho výzkumu. Z tabulky je patrné, že tyto běžně používané UV filtry se staly součástí životního prostředí, a tudíž je lze detekovat jak v biotických, tak abiotických matricích.

**Tabulka 2.** Koncentrace vybraných UV filtrů v a/biotických maticích.

Země	Matrice	Koncentrace/analyt	Reference
Havaj	mořská voda	4 043 ng/l EHMC	Mitchelmore et al. (2019)
Čína	pitná voda	2,2–9,9 ng/l EHMC	Wu et al. (2019)
	dětská moč	5,91 ng/l EHMC	Li et al. (2019)
		68,4 ng/l BP-3	
	pitná voda	16,5 ng/l 4-MBC	
0,19 ng/l EHMC 11,0 ng/l BP-3			
Korea	ryby	9,82 ng/g l.w. EHMC	Wang et al. (2022)
	sediment	15,0 ng/g lw EHMC	
Španělsko	sediment	82,4 ng/g d.w. EHMC	Gago-Ferrero et al. (2015)
	odpadní voda	0,20 µg/l PBSA	Rodil et al. (2012)
	rybí tkáň-parma	241,7 ng/g d.w. EHMC	Gago-Ferrero et al. (2015)
		24,3 ng/g d.w. BP-3	
		2,7 ng/g d.w. 4-MBC	
25,7 ng/g d.w. OC			
Baltské moře	sediment	0,32 ng/g d.w. EHMC	Apel et al. (2018)
	řeka mořská voda	1,3 ng/g d.w. OC	Fisch et al. (2017)
		0,54–2,7 ng/g dw OC	
	5,5 ng/l PBSA		
Norsko	čistírenský kal	2 501–4 689 ng/g d.w. EHMC	Langford et al. (2015)
		26 823–41 610 ng/g d.w. OC	
		824–2 116 ng/g d.w. BP-3	
	sediment	9,9–19,8 ng/g d.w. EHMC	
	rybí tkáň-treska	30–30,9 ng/g EHMC	
Portugalsko	mušle	36,3 ng/g d.w. EHMC	Castro et al. (2018)
		622,1 ng/g d.w. BP-3	
		40,8–88,3 ng/g d.w. 4-MBC	
	mušle	1 765 ng/g d.w. EHMC	Picot Groz et al. (2014)
Východní středomoří	sediment	45 ng/g d.w. EHMC	Amine et al. (2012)
Itálie	mořská voda	25–83 ng/l EHMC	Nguyen et al. (2011)
		25–216 ng/l BP-3	
Brazílie	ryba-sval	33,3 ng/g d.w. EHMC	Molins-Delgado et al. (2018)
Antarktida	polární sníh	0,4–3,1 ng/l EHMC	D'Amico et al. (2022)

Pozn.: d.w. – hmotnost sušiny; l.w. – hmotnost tuků, 4-MBC – 4-methylbenzyliden kafr; PBSA - 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina; BP– 3 benzofenon-3; EHMC – oktinoxát; OC– oktokrylen.

### 3.1.4 Toxicita UV filtrů

#### 3.1.4.1 Vliv UV filtrů na hematologické a biochemické parametry

Ryby jsou velice citlivým ukazatelem kvality vodního ekosystému a mohou vypovídat o stavu životního prostředí a jeho znečištění cizorodými látkami. Jedním z často využívaných biologických materiálů pro hodnocení zdraví organismu slouží krev a její deriváty. Krví je

přenášeno mnoho důležitých látek, jako jsou plyny, živiny, minerály, hormony, toxiny a odpadní produkty. Parametry, které jsou analyzované v krvi, jsou běžně využívané k diagnostice zdraví organismu ryb. Kombinace hematologicko-biochemického vyšetření slouží jako indikátor narušení homeostázy organismu, která koreluje se změnami životního prostředí také v souvislosti s expozicí mikropolutanty, mezi které řadíme i UV filtry. K posouzení **hematologických parametrů** se využívá stanovení krevního obrazu. Mezi nejčastěji hodnocené parametry patří počet červených a bílých krvinek, diferenciální rozpočet leukocytů, jednotlivé erytrocytární indexy, koncentrace hemoglobinu, hematokrit nebo počet trombocytů. Stanovení **biochemických parametrů** slouží k doplnění hematologického vyšetření a má nemalou diagnostickou hodnotu při posouzení stavu zdraví. Mezi základní ukazatele řadíme koncentraci glukózy, laktátu, celkového proteinu, triacylglycerolů, cholesterolu a různých enzymů souvisejících s metabolismem celého organismu. Jakékoli změny ve zmiňovaných parametrech krve se odrážejí na fyziologii ryb a mohou sloužit k diagnostice vážných alterací organismu (Islam et al., 2020; Shahjahan et al., 2022).

Počet publikací zaměřujících se na hematologicko-biochemický profil ryb po expozici UV filtry je poměrně limitní. Nicméně, z výsledků provedených experimentů je patrné, že expozice UV filtry má negativní vliv na zdraví a welfare ryb. Po expozici organickými UV filtry byly zaznamenány změny v hematologicko-biochemickém profilu u ryb. Po 42-denní expozici 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonovou kyselinou (PBSA) byla zjištěna zvýšená koncentrace glukózy v krvi pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), což může poukazovat na rozvoj metabolického stresu. Dále byly zaznamenány změny v aktivitě enzymu kreatinkinázy, která stoupala se zvyšující se testovanou koncentrací. Nicméně po vystavení tomuto UV filtru nebyla během celého experimentu zaznamenána statisticky významná změna v krevním obrazu (Grabicova et al., 2013). Po expozici dalším významným zástupcem organických UV filtrů, látkou OC, bylo prokázáno narušení hematopoezi u dospělců dania pruhovaného (*Danio rerio*) (Blüthgen et al., 2014).

#### 3.1.4.2 *Narušení antioxidační ochrany ryb*

V návaznosti na výskyt UV filtrů ve vodním prostředí, se zvyšuje počet vědeckých prací zabývajících se toxicitou těchto látek pro vodní organismy. Následující kapitola se věnuje jednomu z hodnotících faktorů toxicity cizorodých látek, a to je posouzením antioxidační obrany organismu. Náš experiment se zabýval problematikou narušení antioxidační obrany a

nastolení oxidativního stresu po expozici EHMC, a tudíž je i další text věnován tomuto UV filtru.

Oxidativní stres je definovaný jako nerovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a antioxidační ochranou organismu. Z reaktivních forem kyslíku jsou nejvíce sledované především volné radikály (např. hydroxylový radikál), které obsahují nepárový elektron a z toho důvodu jsou velmi nestabilní. Oxidativní stres může spustit sled reakcí, které mohou vést k oxidaci mastných kyselin, což má za následek peroxidaci lipidů a poškození membránových struktur buněk. Malondialdehyd (MDA) je jedním ze sekundárních produktů oxidace nenasycených mastných kyselin a slouží jako biomarker peroxidace lipidů. K tomuto průkazu se využívá reakce s kyselinou thiobarbiturovou, tzv. TBARS testu, kdy vznikají barevné komplexy, které je možné stanovit spektrofotometricky (Birben et al., 2012).

Organismus je vybaven různými antioxidačními systémy, které zmírňují nebo eliminují působení reaktivních forem kyslíku a dusíku. Pro zhodnocení míry oxidativního stresu lze využít stanovení specifických parametrů v krevní plazmě nebo tkáních. V plazmě lze sledovat například redukční potenciál plazmy (FRAP), který reprezentuje schopnost plazmy redukovat železité ionty a působit jako antioxidant. Dalším významným parametrem hodnocení narušení antioxidační ochrany je analýza ceruloplazminu. Ceruloplazmin je plazmatická bílkovina syntetizovaná játry a různými nehepatálními tkáněmi včetně plic. Díky své schopnosti inhibovat peroxidaci lipidů a Fentonovu reakci působí jako cirkulující „vychytávač“ superoxidových aniontových radikálů a chrání buňky a tkáně před škodlivými účinky těchto reaktivních látek (Landi et al., 2021). Z tkání se jako indikátoru oxidativního stresu využívá dále stanovení aktivit enzymů, které jsou schopny vychytávat vytvořené volné radikály nebo se účastnit různých opravných procesů poškozených struktur. Mezi tyto řadíme například: superoxidismutázu (SOD), katalázu (KAT), glutathionperoxidázu (GPx), glutathionreduktázu (GR), případně i detoxikační enzym glutathion-S-transferázu (GST).

Enzym SOD reguluje hladinu volných radikálů katalyzací přeměny superoxidových radikálů na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je poté přeměněn působením enzymu KAT na vodu a kyslík. Enzym GPx katalyzuje přeměnu peroxidů vzniklých během procesu lipoperoxidace nenasycených mastných kyselin za současné přeměny redukováného glutathionu na jeho oxidovanou formu. Enzym GR katalyzuje regeneraci oxidovaného glutathionu na redukovaný glutathion. Jednotlivé mechanismy na sebe navazují a vzájemně spolupracují na udržení rovnovážného stavu organismu (Birben et al., 2012). Výše uvedené parametry se využívají jako

vhodné indikátory oxidativního stresu, který může v konečném důsledku poškodit bílkoviny a strukturu DNA (Blahova et al., 2018).

Nejnovější studie potvrzují narušení antioxidantní ochrany po expozici EHMC jak u bezobratlých, tak i u vyšších živočichů. Cuccaro et al. (2022) detekovali zvýšenou lipidní peroxidaci u australského kroužkovce (*Ficopomatus enigmaticus*) po expozici 0,5 mg/l EHMC. Signifikantní down-regulaci exprese genů odpovědných za antioxidantní ochranu prokázali také Nataraj et al. (2022) během experimentu s dospělci dania pruhovaného (*Danio rerio*) po expozici environmentálně relevantní koncentrací EHMC (3 µg/l). Zhou et al. (2019) studovali parenterální přenos účinků EHMC u dania pruhovaného (*Danio rerio*). Perzistentní polutanty, které mohou přenášet toxické účinky z rodičů na potomky, se vyznačují tzv. parenterálním přenosem (Kaiser et al., 2012). V experimentu realizovaném kolektivem autorů Zhou et al. (2019) byla generace F0 vystavena účinkům 1, 10 a 100 µg/l EHMC až do doby sexuální maturity (120 dní). U následující generace F1 byla detekována přítomnost EHMC, což dokazuje parenterální přenos tohoto UV filtru. U generace F0 byla zároveň stanovena zvýšená aktivita SOD, KAT, GR, koncentrace MDA a glutathionu. Generace F1 navíc vykazovala podobné či ještě závažnější narušení antioxidantních parametrů. Všechny tyto markery odkazují na vystavení organismu oxidativnímu stresu a narušení jeho antioxidantní ochrany.

#### 3.1.4.3 Histologické změny orgánů po expozici UV filtry

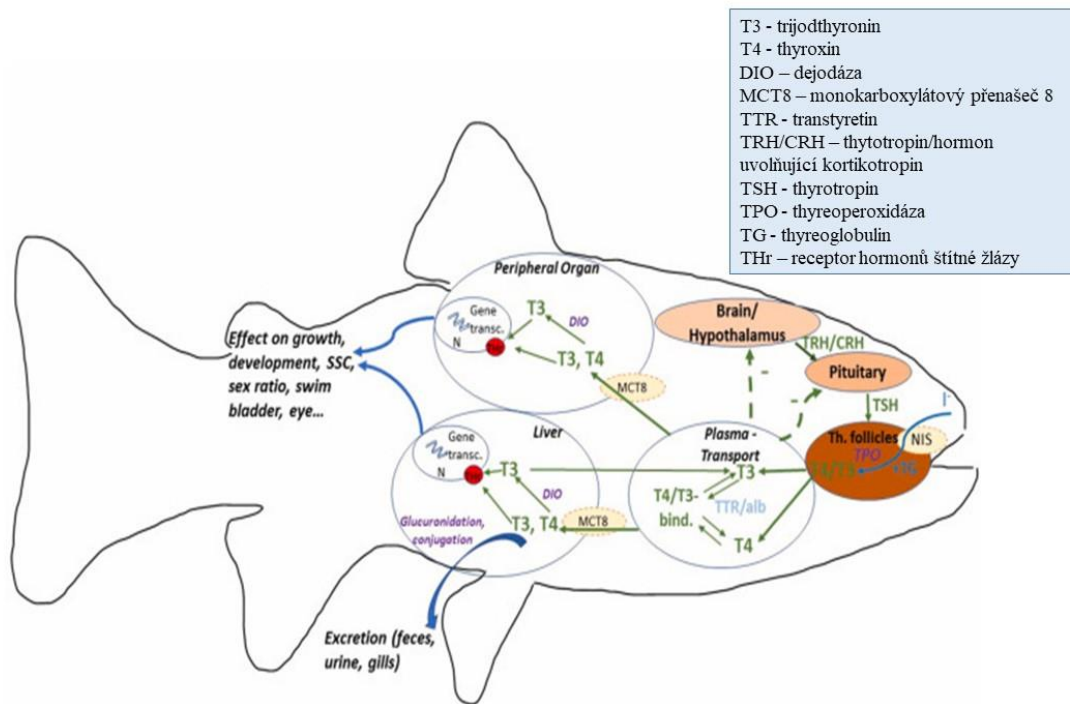
Expozice organickými UV filtry může mít dopad nejen na změnu parametrů krve, ale může ve svém důsledku ovlivnit strukturální změny jednotlivých orgánů. Histologicko-patologické vyšetření umožňuje hodnocení změn tkání na mikroskopické úrovni. Dostupné výsledky histologicko-patologických vyšetření po expozici organickými UV filtry se poměrně liší v závislosti na druhu zkoumané látky a testovaného jedince. Zhou et al. (2019) uvádějí, že expozice EHMC způsobila významné apoptické změny jaterních buněk u dania pruhovaného (*Danio rerio*), které byly pravděpodobně způsobené rozvojem oxidativního stresu a následným poškozením struktur jaterních buněk volnými radikály. Nataraj et al. (2020) poukazují u embryí dania pruhovaného (*Danio rerio*) na poškození svalových buněk po 96 hodinové expozici EHMC. Christen et al. (2011) uvádějí negativní ovlivnění buněk ovarií a varlat u jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) po expozici EHMC, doprovázenou sníženým množstvím spermatocytů a oocytů. Oproti tomu po expozici jiným organickým UV filtrem – BP-3 nezaznamenali Blüthgen et al. (2012) změny na varlatech dospělců dania pruhovaného (*Danio rerio*).

#### 3.1.4.4 Endokrinní disrupce thyroidních hormonů

V našem experimentu bylo jedním z hodnotících bodů negativních účinků EHMC jeho posouzení jako potenciálního endokrinního disruptora. V našem výzkumu jsme se zaměřili na narušení fyziologické funkce hormonů štítné žlázy po expozici EHMC. Thyroidní žláza ryb se na rozdíl od savčí štítné žlázy skládá z difúzně rozptýlených folikulů ve ventrální oblasti hltanu a podél ventrální aorty. Heterotopické folikuly štítné žlázy byly u ryb pozorovány i v různých tkáních včetně přední ledviny, srdce, sleziny, jater, jícnu a mozku. Jód je nepostradatelným prvkem pro správnou funkci štítné žlázy. Nedostatkem jódu trpí především suchozemští obratlovci, neboť půda a potrava neobsahuje dostatečné množství tohoto prvku. Opačný trend zaznamenáváme u ryb. Tito živočichové vstřebávají jód nejen potravou, ale také žábry z vody. Tento způsob suplementace zaujímá dominantní roli v příjmu dostatečného množství jódu, a tudíž deplece jódu u ryb není tak častá (Eales and Brown, 2005).

Osa hypotalamus-hypofýza-štítná žláza zaštituje centrální kontrolu produkce a metabolismu hormonů štítné žlázy (Obr. 4). Folikuly štítné žlázy jsou zodpovědné za zachycení jódu z vody a z potravy prostřednictvím sodíkovo-jodidového symportu. Pomocí enzymu thyreoperoxidázy se jód inkorporuje do thyreoglobulinu, glykoproteinu, který se přímo účastní produkce thyroidních hormonů. Hormon stimulující štítnou žlázu neboli thyrotropin (TSH) je produkován hypofýzou a koriguje syntézu a uvolňování hormonu thyroxinu (T4) a trijódthyroninu (T3) ve folikulech štítné žlázy. Biologicky aktivní formou hormonu štítné žlázy je T3. V závislosti na druhu ryb je hormon uvolňující thyrotropin a hormon uvolňující kortikotropin hlavním regulátorem TSH. Předními vazebnými proteiny thyroidních hormonů jsou transtyretin (TTR) a albumin, ale také monokarboxylátový přenašeč 8 a lipoproteiny (Babin, 1992). Aktivaci a deaktivaci hormonů štítné žlázy mají na starosti enzymy dejodázy (DIO), které jsou přítomny v orgánech, jako jsou mozek, ledviny, žábry a játra. Hormony štítné žlázy se poté vážou na receptory hormonů štítné žlázy (THr) v cílových orgánech (plynový měchýř, oko a reprodukční orgány), kde se aktivuje jejich funkce (Dang et al., 2021).

**Obrázek 4.** Nástin osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza u ryb. *Upraveno pro účely předkládané práce dle Dang et al. (2021).*



Thyroidní hormony hrají velice důležitou roli v mnoha důležitých fázích vývoje obratlovců. Tyto hormony jsou nepostradatelné během embryogeneze a brzkého vývoje ryb, vývoje reprodukčních orgánů a v neposlední řadě se účastní regulace celého metabolismu. U obojživelníků, platýsů a ploutvonožců bylo prokázáno, že metamorfóza (přeměna larvy v juvenilního jedince) je zcela závislá na hormonech štítné žlázy a dá se blokovat thyreoidektomií (Power et al., 2001; Shi, 2013; Ferraris et al., 2020).

Thyroidní hormony jsou také schopny interagovat s buňkami imunitního systému a mohou ovlivnit mnohé zánětlivé procesy jako je např. chemotaxe, fagocytóza a produkce cytokinů. Změny v koncentracích thyroidních hormonů se tedy mohou odrazit na schopnosti organismu bojovat s infektem (Jara et al., 2017).

Studium účinků xenobiotik na endokrinní systém, konkrétně na hormony štítné žlázy je zcela zásadní. Chemikálie, které mohou ovlivnit fyziologickou funkci hormonů štítné žlázy, mohou následně negativně postihnout metabolické procesy, imunitní systém a taktéž celkový vývoj ryb. V posledních letech se rozšiřují studie zkoumající vliv UV filtrů na narušení fyziologické funkce thyroidních hormonů. Většina toxikologických studií je zaměřena na savce, pouze minimum se věnuje problematice narušení hormonů štítné žlázy u ryb. Ferraris et

al. (2020) studovali vliv EHMC na imunitní systém a na endokrinní disrupci u myší, a to jak u generace F0, tak následně i u generace F1. Tato látka byla podávána samicím během období laktace v koncentraci 1 000 mg/kg/den. Následně byla u jejich potomků prokázána snížená koncentrace hormonu T4, s průkazným opožděním otevírání očí a nižším přírůstkem hmotnosti, čímž byl potvrzen parenterální přenos EHMC z matek na potomky.

Pokud se zaměříme na vodní živočichy, EHMC významně snížil koncentraci T3 u dospělců danií pruhovaných (*Danio rerio*) po 21-denní expozici. Navíc byla snížena mRNA exprese genů související s thyroïdními hormony v mozku, játrech a štítné žláze exponovaných jedinců (Chu et al., 2021). Lee et al. (2019) prokázali snížení T3 a T4 v plazmě medaky japonské (*Oryzias latipes*) po 5-ti měsíční expozici EHMC ve vodě. Ve stejném experimentu byla navíc odhalena down-regulace exprese genu pro dejodázu 2, *dio2*, a stejně tak up-regulace exprese genu pro hormon uvolňující thyrotropin, který je předním regulátorem TSH.

Analýzy prováděné *in vitro*, které se zaměřily na agonistické či antagonistické chování EHMC, odhalily agonistické chování EHMC v mikromolárních koncentracích pro thyroïdní receptory. Ve stejné studii *in vitro* analýza poukazuje na inhibici inkorporace jodidového iontu do buněk štítné žlázy (tyreocytů), které byly vystaveny účinkům EHMC. Jodidový iont je důležitý pro správnou funkci štítné žlázy, neboť je následnými metabolickými drahami přeměněn na jód, který je nepostradatelný pro produkci thyroïdních hormonů (Schmutzler et al., 2007). Výše zmíněné analýzy naznačují potenciál EHMC jakožto disruptora thyroïdních hormonů.

#### 3.1.4.5 Embryotoxicita vybraných UV filtrů

Dalším tématem, kterému jsme se během našeho výzkumu věnovali, bylo hodnocení embryotoxicity vybraných UV filtrů. Narušení embryonálního vývoje může mít pro jedince fatální následky. Pokud dojde k malformacím během raného vývoje, nedokáže se daný organismus uplatnit v potravním řetězci, ani jako plnohodnotný reprodukční partner. Jakékoliv odchylky v raném vývoji (např. pozdější líhnutí či vývojové malformace), mohou tedy ohrozit životaschopnost organismu a později vést až ke smrti jedince (Balász et al., 2016).

V experimentu vedeném Zhou et al. (2019) byla generace F0 dania pruhovaného (*Danio rerio*) vystavena účinkům 1, 10 a 100 µg/l koncentrace EHMC po dobu 4 měsíců. Studie se navíc mimo jiné zaměřila i na parenterální přenos účinků tohoto UV filtru. Testovaná látka byla detekována jak u rodičů, tak u potomků, což dokazuje akumulaci a reprodukční přenos EHMC na potomky. Po expozici nejvyšší koncentrací EHMC byla u testovaných embryí prokázána

snížená míra líhnutí a zvýšená incidence malformací. U všech testovaných skupin generace F0 navíc došlo k narušení antioxidační ochrany, u potomků byla detekována podobná nebo dokonce i výraznější míra oxidativního stresu.

Toxický efekt na embryonální vývoj jedince byl prokázán i u jiných zástupců organických UV filtrů. Embyroroxita byla sledována také po expozici UV filtrem BP-3. Tento organický UV filtr způsobil sníženou míru líhnutí, zvýšený výskyt deformací ocasu a hlavové části po 96 hodinové expozici (Balász et al., 2016). Dále bylo prokázáno, že další zástupce UV filtrů OC může negativně ovlivnit transkripci genů souvisejících s vývojovými procesy v mozku a játrech. Stejně tak expozice tímto UV filtrem může mít dopad na hematopoézu a vývoj cévního systému u dania pruhovaného (*Danio rerio*) (Blüthgen et al., 2012). Quintaneiro et al. (2019) prokázali negativní efekt UV filtru 4-methylbenzyliden kafr (4-MBC) na embrya dania pruhovaného (*Danio rerio*), kdy byl po 48 hodinové expozici pozorován signifikantně snížený srdeční tep. Dále byla zaznamenána snížená míra líhnutí, edém perikardu a opožděné vstřebávání žloutkového vaku.

### 3.1.5 Charakteristika testovaných UV filtrů

Do studií, které jsou součástí předkládané disertační práce, byli vybráni běžně používaní zástupci organických UV filtrů. Pro subchronický test toxicity na juvenilních jedincích pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) byl zvolen UV filtr **EHMC**. Látka EHMC je poměrně diskutovanou sloučeninou pro své potenciálně negativní účinky na necílové organismy. Navíc je známo, že po účincích UV záření podléhá izomerizaci a její *trans*-forma se po vystavení slunečním paprskům může přeměnit v méně stabilní *cis*-formu. Výsledky studie vedené kolektivem autorů Nečasová et al. (2017) odhalily, že izomerizace může mít vliv na toxicitu látky, kdy se po fotoizomerizaci projeví genotoxické účinky *cis*-formy EHMC. Na základě výsledků nejnovějších studií je EHMC pro své nežádoucí účinky součástí „*Watch listu*“ v rámci EU. Tento seznam látek shromažďuje sledované potenciální polutanty vodního prostředí podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES Směrnice o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky. Obsahem této směrnice je mimo jiné doporučení monitorování EHMC nejenom ve vodě, jak je tomu doposud, ale také v sedimentech (Apel et al., 2018).

V embryonálním testu toxicity jsme posuzovali potenciálně negativní efekty vybraných UV filtrů (**EHMC**, **4-MBC**, **BP-3**, **PBSA** a **OC**) na embrya dania pruhovaného (*Danio rerio*). Hodnoceny byly jak účinky jednotlivých látek, tak jejich kombinací. Zástupci UV filtrů vybraných pro realizované experimenty se řadí mezi běžně používané UV filtry v PCPs.

V důsledku jejich hojné spotřeby se dostávají do životního prostředí a následně jsou detekované v různých matricích vodního ekosystému. V tabulce č. 3 jsou uvedeny fyzikálně-chemické charakteristiky jednotlivých testovaných UV filtrů. Velká část námi testovaných UV filtrů pokrývá oblast UVB spektra, které má spojitost s rozvojem rakoviny kůže a poškozením DNA buněk. Většina těchto UV filtrů disponuje vyšším rozdělovacím koeficientem oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ). Tento rozdělovací koeficient hraje klíčovou roli při určování hydrofobnosti látek a je jedním z rozhodujících faktorů při určování osudu organických polutantů v životním prostředí. Látky s vyšší hodnotou  $\log K_{ow}$  jsou posuzovány jako hydrofobní a mají tedy větší potenciál k adsorbování do složek sedimentů, k bioakumulaci a v neposlední řadě souvisí také s obtížnou degradací v životním prostředí (Kang et al., 2022).

**Tabulka 3.** Základní charakteristika a fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných UV filtrů. Zkráceno a upraveno pro účely disertační práce dle Santos et al., 2012.

Název	UV spektrum	Rozpustnost ve vodě (g/l)	Molární hmotnost (g/mol)	Log $K_{ow}$
<b>EHMC</b>	UVB	0,15	290,4	5,8
<b>4-MBC</b>	UVB	$5,1 \times 10^{-3}$	254,37	4,95
<b>BP-3</b>	UVA/UVB	0,21	228,24	3,79
<b>PBSA</b>	UVB	0,26	274,30	0,01
<b>OC</b>	UVB	$2,0 \times 10^{-4}$	361,49	7,35

Pozn.: EHMC – oktinoxát; 4-MBC – 4-methylbenzyliden kafr; BP-3 – benzofenon-3; PBSA - 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina; OC – oktokrylen.

## 3.2 Musk sloučeniny

### 3.2.1 Základní charakteristika musk sloučenin

Přírodní pižmo je získávané z břišní žlázy samců kabarů pižmových. Tato žláza produkuje tmavou, voskovitou a pronikavě štiplavou látku neboli pižmo, které je ceněno pro své vynikající schopnosti coby nosič vůně používaný především v luxusních parfémeh. Poptávka po této cenné látce však převyšuje svoji nabídku, a tak bylo nutné, i z hlediska ochrany tohoto živočišného druhu, přistoupit k výrobě syntetických náhražek pižma. **Musk sloučeniny** jsou syntetické analogy pižma a používají se jako vonné složky v široké škále PCPs. Jejich obliba vzrostla především v posledních desetiletích, kdy byly vyrobeny jako náhrada

drahých a obtížně získatelných přírodních esencí (Nakata et al., 2015; Wong et al., 2019). Jejich výhody spočívají především v nižších finančních nákladech, lepší vůni a větší stabilitě (Chen et al., 2010). Musk sloučeniny se dělí do čtyř skupin: nitromusk sloučeniny, polycyklické musk sloučeniny, makrocyclické musk sloučeniny a alicyklické musk sloučeniny (Wong et al., 2019).

**Nitromusk sloučeniny** se staly prvními svého druhu a sestávají se především z alkylem substituovaných nitrobenzenových sloučenin. Ačkoli mají syntetické nitro musk sloučeniny zcela odlišnou strukturu od své přírodní předlohy, disponují typickým pižmovým zápachem. Mezi nitromusk sloučeniny patří především musk xylen, musk keton, musk tibeten, musk ambrette a musk mosken. Tyto látky se jako první náhražky přírodního pižma dostaly do hledáčku vědeckých studií a na základě prokázaných negativních účinků, jako je neurotoxicita (musk ambrette) nebo karcinogenita (musk xylen), se Evropská Komise rozhodla zakázat používání těchto syntetických musk sloučenin v kosmetických přípravcích (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006). Produkce nitromusk sloučenin nadále klesala a tržní podíl byl postupně nahrazován především polycyklickými musk sloučeninami (Li et al., 2018a).

**Polycyklické musk sloučeniny** jsou tvořeny z více než jedné cyklické struktury a ve své molekule neobsahují žádnou nitroskupinu. Do této skupiny řadíme musk phantolid, cashmeran, celestolid, traseolid a nejvýznamnějšími zástupci jsou galaxolid a tonalid (AHTN). Polycyklické musk sloučeniny patří k nejčastěji používaným zástupcům syntetických musk sloučenin.

Vzhledem k závěrům toxikologických studií týkajících se nepříznivého působení na necílové organismy, se v posledních letech stále častěji využívají zástupci ze skupiny makrocyclických a alicyklických musk sloučenin. **Makrocyclické musk sloučeniny** jsou vyrobeny z přírodních zvířecích a rostlinných složek a vyznačují se výraznějším odérem, díky čemuž stačí pro stejný efekt použít menší množství těchto látek. Ovšem výroba těchto sloučenin je finančně náročnější, a proto jsou spíše používány v kvalitnějších parfémeh. Na druhou stranu byl prokázán jejich příznivější efekt na necílové organismy, a tudíž můžeme předpokládat jejich častější použití v budoucnosti.

**Alicyklické musk sloučeniny** jsou poměrně novou kategorií syntetických pižem. Jejich chemická struktura sestává z alkylovaných esterů. Vzhledem k tomu, že se jedná o novější skupinu syntetických musk sloučenin, nestávají se tak často předmětem výzkumu, a tudíž je i jejich použití v PCPs poměrně limitované. Nicméně vzhledem k jejich nízké či prozatím neprokázané toxicitě v kombinaci s jejich stabilitou a lehce dispergovaným aroma, mohou mít

v blízké budoucnosti široké uplatnění v rozličných průmyslových odvětvích (Li et al., 2018a). Je ovšem nutné zdůraznit, že je ještě stále třeba pokračovat ve výzkumu toxicity těchto látek, než by mohly zcela nahradit nepoužívanější skupinu polycyklických musk sloučenin (Abramsson-Zetterberg and Slanina, 2002).

### 3.2.2 Spotřeba musk sloučenin ve světě

Produkce musk sloučenin se v posledních desetiletích rapidně zvyšovala. Od roku 1987, kdy jejich produkce byla přibližně 4 500 tun ročně, se v roce 1997 jejich produkce zvýšila na 5 600 tun/rok (Rimkus, 1999). V roce 2004 se vyprodukovalo až 6 000 tun musk sloučenin (konkrétně galaxolid 1 000 tun, tonalid 5 000 tun). Nejnovější data odhadují, že se polycyklické musk sloučeniny vyrábí nebo dováží do EU v množství 1 000 až 10 000 tun/rok (Aminot et al., 2021). Polycyklické musk sloučeniny pokryly spotřebu evropského trhu z 95 %, v případě amerického trhu je uváděno až 90 % (Tumová et al., 2019). Tyto sloučeniny se na americkém trhu začaly postupně regulovat a galaxolid a tonalid jsou uvedeny na seznamu látek s vysokou produkcí na trhu, který zaštiťuje US EPA (USEPA, 2006). V EU se výše zmíněné musk sloučeniny staly součástí Seznamu látek s vysokým objemem výroby (OECD, 2007), ve kterém jsou uvedeny látky, které byly importovány nebo vyrobeny v množství větším než 1 000 tun/rok alespoň v jednom členském státě. Látky, které jsou uvedeny na těchto seznamech, jsou považovány jako prioritní pro posouzení jejich vlastností a s nimi spojených rizik pro životní prostředí.

Vzhledem k široce rozšířenému používání musk sloučenin a následné detekci těchto látek v životním prostředí, jsou tyto sloučeniny podrobovány stále častějšímu výzkumu pro zhodnocení toxického účinku na necílových organismech. V návaznosti na výsledky studií a prokázání neurotoxického účinku musk sloučeniny versalid, byla tato látka v 80. letech 20. století zakázána (Heberer et al., 2002). Navíc byly nitromusk sloučeniny z důvodu prokázání karcinogenních a neurotoxických účinků nahrazeny polycyklickými musk sloučeninami (Brausch et al., 2011).

Předmětem našeho výzkumu byl jeden z nejčastěji používaných zástupců polycyklických musk sloučenin – tonalid. Jeho přítomnost byla potvrzena napříč akvatickým ekosystémem, a tudíž může mít potenciálně negativní vliv na vodní organismy. Pro evropský trh je legislativní použití tonalidu upraveno v Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) 1223/2009 o kosmetických přípravcích v Příloze III. Tonalid se smí používat v kosmetických přípravcích, pokud jsou dodržena stanovená omezení. Ta se konkrétně týkají přípravků, které

se neoplachují. Zde může být tonalid použit v koncentraci 0,1% s výjimkou vodně-alkoholických přípravků, ve kterých smí být použit v koncentraci 1%, v parfémeh o koncentraci 2,5% a ve vonných krémech v koncentraci 0,5%. V přípravcích, které se oplachují, může být tonalid obsažen v koncentraci 0,2 %.

### 3.2.3 Výskyt musk sloučenin v životním prostředí

Musk sloučeniny jsou součástí každodenně používaných PCPs (mýdla, sprchové gely, parfémů apod.), ale také různých čisticích prostředků, pesticidů a návnad. Antropogenní činnost tvoří majoritní podíl na vstupu musk sloučenin do vodního ekosystému. Odpadní vody jsou hlavním zdrojem znečištění životního prostředí musk sloučeninami, na rozdíl od jiných perzistentních organických polutantů (Aminot et al., 2021). Po jejich použití v PCPs, jich je přibližně 77 % spláchnuto do kanalizace a následně jsou odstraňovány v čistírnách odpadních vod (Reiner et al., 2007). Do toku odpadních vod se tedy dostávají v důsledku přímého vypouštění z domácností nebo průmyslové výroby (Košnář et al., 2021). Uvádí se, že účinnost jejich odstranění z odpadních vod se pohybuje kolem 90 % (Fang et al., 2017). Vzhledem k tomu, že jsou tyto látky převážně lipofilní povahy, ulpívají podobně jako hydrofobní UV filtry na částicích čistírenského kalu a persistují v celém ekosystému, s nemalým podílem akumulace v živých organismech (Castro et al., 2019). Tyto sloučeniny jsou významným rizikem i pro bentické organismy, neboť jejich lipofilní povaha usnadňuje absorbování a kumulaci v sedimentech (Huang et al., 2016).

Musk sloučeniny jsou znečišťující látky moderní doby a vzhledem k jejich celosvětovému nadužívání se s těmito polutanty setkáváme napříč celým ekosystémem. Jelikož jsou musk sloučeniny „evolučně novými znečišťujícími látkami“, biota ani mikroorganismy se ještě nezvládli adaptovat na jejich metabolizaci a degradaci. Tudíž se tyto látky nadále kumulují v životním prostředí a představují významné riziko. Jejich rezistence souvisí také s jejich lipofilním charakterem, který je předurčuje k akumulaci v nepolární tukové tkáni, což zapříčiňuje jejich status perzistentního polutantu životního prostředí. Navíc jejich magnifikace napříč potravním řetězcem ohrožuje nejen živočišnou říši, ale může značit riziko i pro lidskou populaci (Zeng et al., 2005; Cavalheiro et al., 2013; Raineri et al., 2017)

V tabulce č. 4 jsou uvedeny detekované koncentrace musk sloučeniny tonalid v biotických a abiotických matricích. Jak je patrné, tonalid byl identifikován nejen v povrchových vodách, ale také v sedimentech, v odpadních vodách a čistírenských kalech. Přítomnost tohoto polutantu byla prokázána také v živočišné říši napříč potravním řetězcem a

v neposlední řadě také u lidí. Nutno podotknout, že syntetické vonné esence jsou obsaženy i ve vypraném oblečení, které dennodenně nosíme, čímž expozici těmito polutanty ještě podporujeme (Hajšlová a Šetková, 2004). V neposlední řadě byl tonalid zaznamenán i ve vzduchu a v prachových částicích vnitřních prostor (Balci et al., 2020).

**Tabulka 4.** Koncentrace musk sloučeniny tonalidu v a/biotických matricích.

Země	Matrice	Koncentrace tonalidu	Reference
Texas, USA	přítok ČOV	509–2 337 ng/l	Chase et al. (2012)
	odtok ČOV	328–1754 ng/l	Chase et al. (2012)
Čína	sediment	99,75 µg/kg	Sang et al. (2012)
Korea	člověk (tuková tkáň)	9,9 ng/g l.w.	Moon et al. (2012)
pobřeží Asie a USA	mušle	37–860 ng/g d.w.	Nakata et al. (2012)
Itálie	povrchová voda	0,25–364,42 ng/l	Villa et al. (2012)
	sediment	100 ng/g d.w.	Villa et al. (2012)
Portugalsko	mušle	31,7 ng/g	Castro et al. (2018)
Španělsko	chobotnice	15,2 ng/g d.w.	Trabalón et al. (2015)
Jižní Evropa	mořské plody	6,85 ng/g	Saraiva et al. (2016)
Německo	ryby	382 ng/g l.w.	Subedi et al. (2012)
Nizozemí	ČOV – odpadní kal	12 890 ng/l	Artola-Garicano et al. (2003)
ČR	odpadní kal	245,7–1 980 µg/kg d.w.	Košnář et al. (2021)
	mateřské mléko	112 µg/kg l.w.	Hajšlová a Šetková (2004)

Pozn.: d.w. – hmotnost sušiny; l.w. – hmotnost tuků; ČOV – čistírna odpadních vod.

### 3.2.5 Toxicita musk sloučenin

V posledních desetiletích lze zaznamenat zvyšující se počet vědeckých publikací, které se věnují negativnímu působení musk sloučenin. Vzhledem k tomu, že jejich výskyt je ubikvitární a jedná se o lipofilní a poměrně stabilní látky, je jejich přítomnost úzce spjata s prokazatelnými negativními účinky, které zahrnují jak krátkodobou, tak i dlouhodobou toxicitu či endokrinní disrupci (Rainieri et al., 2017; Abou-Dahech et al., 2022; Zicarelli et al., 2022).

#### 3.2.5.1 Vliv musk sloučenin na hematologické a biochemické parametry

Parametry analyzované v krvi jsou užitečným indikátorem narušení rovnováhy a zdraví organismu. Hodnocením změn v hematologicko-biochemickém profilu po expozici tonalidem se zabývali také Ehiguese et al. (2021), kteří sledovali změny těchto hodnot v návaznosti na vytvořený stres v organismu. Uvádějí, že v důsledku boje s volnými radikály může dojít ke

snížení či úplnému vyčerpání energetických zásob pro organismus. Jako hodnotící parametr byla vybrána koncentrace celkových lipidů v gonádách. U dospělců škeble venušky filipínské (*Ruditapes philippinarum*) bylo zaznamenáno snížení celkových lipidů po 21-denní expozici tonalidem. Výzkum vedený Peng et al. (2019) poukázal na negativní efekt galaxolidu na organismy sedimentu. Tato látka se řadí mezi nejvýznamnější zástupce polycyklických musk sloučenin. Jako testovací organismus byl zvolen půdní bezobratlý nitěnka (*Branchiura sowerbyi*). Po 28-denní expozici galaxolidem byl prokázán negativní efekt především na metabolismus proteinů, polysacharidů a fosfolipidů. Testy toxicity na vyšších organismech prokázaly negativní dopad isoamyl salicylátu, který patří mezi alicyklické musk sloučeniny. Po orální dávce této látky (46 mg/kg a vyšší) došlo u potkanů ke sníženému počtu erytrocytů (Drake et al., 1975). Po orální aplikaci tonalidu v environmentálně relevantních koncentracích byla u potkanů zaznamenána především anémie, naproti tomu ve vyšších koncentracích se žádné změny v hematologicko-biochemickém profilu neobjevily. Tento jev byl vysvětlován adaptací organismu na vzniklé nepříznivé podmínky (Api et al., 2004).

#### 3.2.5.2 Narušení antioxidační ochrany ryb

Ačkoli se tonalid vyskytuje v životním prostředí především v nízkých koncentracích, je prokázáno, že díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem může přetrvávat v životním prostředí, a tudíž se v posledních letech dbá na sledování jeho možného toxického účinku. Dle výsledků nejnovějších studií bylo narušení antioxidační ochrany pozorováno po expozici tonalidem nejen u bezobratlých, ale také u ryb. Nicméně studie zabírající se narušením antioxidační rovnováhy u ryb jsou stále limitní. Například u škeblí druhu *Ruditapes philippinarum* došlo ke zvýšení markerů oxidativního stresu po 21-denní expozici tonalidem již v environmentálně relevantní koncentraci (Ehiguese et al., 2020). K podobným závěrům došli také Li et al. (2020) po vystavení účinkům tonalidu u krevet druhu *Macrobrachium nipponense*. Parolini et al. (2015) prokázali zvýšenou karboxylaci proteinů, u slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*). Narušení antioxidační obrany bylo prokázáno i u vyšších živočichů. Signifikantní zvýšení aktivity detoxifikačních enzymů a narušení antioxidační ochrany bylo zaznamenáno také u juvenilních danií pruhovaných (*Danio rerio*) po 28-denní expozici tonalidem (Blahova et al., 2018).

### 3.2.5.3 Histologické změny orgánů po expozici musk sloučeninami

Změny orgánů na tkáňové úrovni dokáží přiblížit míru a závažnost poškození organismu. Nicméně pouze omezené množství vědeckých prací se zabývá konkrétním poškozením tkání na mikroskopické úrovni. Experimenty vedené Carlsson et al. (2000) poukazují na edém vzniklý u dospělců danií pruhovaných (*Danio rerio*) po 8-týdenní expozici musk ketonem. Navíc byl v histologických preparátech pozorován snížený počet zralých ovarií oproti kontrole, který dokládal nepříznivý efekt musk ketonu na reprodukční soustavu tohoto druhu ryb. Oproti tomu, na základě histologicko-patologického vyšetření nebyla u juvenilních jedinců danií (*Danio rerio*) prokázána žádná statisticky významná změna po 28-denní expozici tonalidem (Blahova et al., 2018). Expozice tonalidem vyvolala u vyšších druhů živočichů histologicko-patologické změny jaterních buněk. U potkanů byly zaznamenány rozšíření a nekróza jaterních buněk po 7 dnech po intraperitoneální aplikaci tonalidu v dávce 100 mg/kg hmotnosti, což by mohlo vypovídat o zánětu jater a hepatotoxických účincích tonalidu (Steinberg et al., 1999). Hypotéze hepatotoxicity tonalidu později oponovali Api et al. (2004), kteří nepotvrdili po dietární expozici tonalidem změny v jaterní tkáni jak z biochemického, tak i histopatologického profilu testovaných potkanů.

### 3.2.5.4 Hodnocení xenoestrogenního potenciálu tonalidu

Jelikož je tonalid posuzován jako potenciální endokrinní disruptor, věnovali jsme se v našem výzkumu hodnocení jeho xenoestrogenního účinku. K hodnocení xenoestrogenního potenciálu cizorodých látek ve vodním prostředí je často využíváno stanovení vitellogeninu, neboť látky s xenoestrogenním účinkem mají schopnost napodobovat funkce estrogenu v reprodukčním systému (Yamaguchi et al., 2005). Vitellogenin je prekurzorem žlutkového proteinu, jedná se o fosfolipoprotein, který je fyziologicky syntetizovaný především dospělými samicemi. Pokud se ovšem organismus dostane do kontaktu s xenoestrogenní látkou, může být vitellogenin produkován dospělými samci a juvenilními jedinci. Syntéza vitellogeninu je spuštěna aktivací hypothalamo-hypofýzo-ovariální osy. Aktivace této osy začíná produkcí gonadotropin-uvolňujícího hormonu v hypothalamu. Na základě uvolnění tohoto hormonu začne hypofýza produkovat folikuly stimulující hormon, který indukuje tvorbu 17 $\beta$ -estradiolu v ovariálních folikulech. Hormon 17 $\beta$ -estradiol následně spustí syntézu vitellogeninu v játrech, který je poté transportován do krevního řečiště. Z krevního řečiště se vitellogenin dostává přes receptory do oocytů a poté je inkorporován do vaječného žloutku. Hlavní funkcí vitellogeninu je vyživovat a zásobovat energií embrya během embryogeneze (Koutková et al., 2020). Ačkoli

je vitellogenin používán jako spolehlivý biomarker znečištění xenoestrogenními látkami, jeho zvýšení nemusí být nutně spjato s poruchou reprodukčních orgánů. Některé studie přímo nepotvrzují při zvýšené produkci vitellogeninu změny v reprodukčním systému, jako jsou například poruchy plodnosti (Ishibashi et al., 2005). Nicméně je změna v syntéze vitellogeninu u samců nebo juvenilních jedinců vhodným biomarkerem pro stanovení přítomnosti estrogenních polutantů v životním prostředí (Yamauchi et al., 2008; Hara et al., 2016; Ehiguese et al., 2021). Yamauchi et al. (2008) uvádějí, že tonalid prokazatelně zvýšil expresi jaterního vitellogeninu u samců medaky japonské (*Oryzias latipes*). U jiného druhu ryb, konkrétně u danií pruhovaných (*Danio rerio*), byl prokázán antiestrogenní efekt po expozici tonalidem (Schreurs et al., 2004). Dále byla u halančíkovce diamantového (*Cyprinodon variegatus*) signifikantně snižena exprese genu *vtg1* v žloutkovém váčku po expozici stejnou látkou (Ehiguese et al., 2021).

### 3.2.6 Charakteristika tonalidu

Tonalid je významným zástupcem polycyklických musk sloučenin. Chemicky se jedná o 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyltetrahydronaftalen. Tonalid se skládá z aromatických struktur sestávajících z acetylovaných a methylovaných pyranových a tetralinových bází. Podobně jako EHMC, i tonalid disponuje vysokou hodnotou log  $K_{ow}$ , tudíž má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (Obr. 5). Jedná se o lipofilní látku, která je relativně stabilní a má potenciál bioakumulace v životním prostředí (Rimkus, 1999).

**Obrázek 5.** Základní fyzikálně-chemické vlastnosti tonalidu. *Upravemo dle Rimkus, 1999.*

Název	CAS číslo	Rozpustnost ve vodě	Molární hmotnost (g/mol)	Log $K_{ow}$
<b>Tonalid</b>	21145-7-7	1,25	258,4	5,7

## 4 MATERIÁL A METODIKA

V následující kapitole jsou uvedeny metodiky stanovení negativních účinků vybraných emergentních polutantů. Ze zástupců UV filtrů byly pro účely předkládané práce vybrány běžně používané organické UV filtry, konkrétně **EHMC**, **BP-3**, **OC**, **4-MBC** a **PBSA**. Zástupce musk sloučenin reprezentoval **tonalid**. Experiment byl zaměřen na hodnocení negativních účinků pro ryby, neboť jsou přirozeně v přímém kontaktu s testovanými polutanty. Jako testovací organismy byli zvoleni pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a danio pruhované (*Danio rerio*), které jsou běžně využívanými organismy pro stanovení toxicity environmentálních polutantů podle norem OECD (Grabicova et al. 2013; Jang et al., 2016; Plhalova et al., 2018; Li et al., 2018b; Zicarelli et al., 2022).

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) je sladkovodní ryba z čeledi *Salmonidae*, která se vyskytuje i v našich vodách. Má své nezastupitelné místo jako bioindikátor znečištění vod, neboť lososovité ryby jsou velice citlivé na změny podmínek vodního prostředí (Svobodová et al., 1995). Tento druh byl vybrán jako testovací organismus také z důvodu, že se jedná o dravou rybu, která ochotně přijímá krmivo. Rybám byla zkoumaná látka podávána jako součást krmných pelet. Dietární expozice byla zvolena za účelem simulování přirozených podmínek expozice dravých ryb.

Danio pruhované (*Danio rerio*) je sladkovodní ryba z čeledi *Cyprinidae*, přirozenými podmínkami *D. rerio* jsou vody jižní Asie, nicméně vzhledem k velké toleranci podmínek vodního prostředí našel tento druh uplatnění jako jeden z modelových organismů pro testy toxicity. Tento druh se navíc vyznačuje vysokou fertilitou, jeden pár je schopen vyprodukovat až 500 embryí týdně. Navíc jsou tato embrya průhledná, čehož lze využít při posuzování jejich vývoje pod mikroskopem. Organogeneze *D. rerio* probíhá již 24 hodin po oplodnění a po 72 hodinách se z embryí líhnou larvy (Khan and Alhewairini, 2019). V neposlední řadě *D. rerio* disponuje strukturálně podobnými orgány jako savci (např. dvoukomorové srdce, struktura jater) včetně metabolických drah, a tudíž lze výsledky experimentů částečně reprodukovat i do savčí říše.

## 4.1 Zhodnocení negativního vlivu oktinoxátu

### 4.1.1 Subchronický *in vivo* test na pstruhu duhovém

Hodnocení negativního vlivu organického UV filtru EHMC bylo realizováno na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) po dobu šesti týdnů. K testování bylo použito celkem 80 kusů ryb, které byly vystaveny účinkům EHMC ve třech koncentracích, každá testovací skupina obsahovala 20 jedinců. Nejnižší testovaná koncentrace (6,9 µg/kg) reprezentovala environmentální koncentraci a vyšší dávky (96,0 µg/kg a 395,6 µg/kg) odrážely vztah mezi toxickým účinkem a zvyšující se koncentrací EHMC. Testované skupiny byly doplněny kontrolní skupinou bez přídavku EHMC. Unikátnost dané studie spočívala také v typu expozice EHMC, kdy testovaná látka byla podávána jako součást krmných pelet. Jelikož se jedná o dravou rybu, reprezentovala dietární expozice přirozené podmínky vystavení tomuto polutantu. Hodnotícími parametry toxického účinku EHMC bylo sledování změn biochemických a hematologických parametrů, doprovázených analýzou vybraných ukazatelů oxidativního stresu. Jednotlivé analýzy byly doplněny o histopatologické vyšetření k bližšímu prozkoumání případných změn na tkáňové úrovni. Jelikož je testovaný UV filtr považován za potenciálního endokrinního disruptora, zaměřili jsme se mimo jiné na hodnocení narušení fyziologické funkce hormonů štítné žlázy. Analýza byla realizována stanovením koncentrací thyroidních hormonů v plazmě. K posouzení endokrinní disrupce také sloužilo hodnocení exprese genů souvisejících s produkcí a regulací hormonů štítné žlázy pomocí reverzní transkripce a kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR).

Podrobné metodiky jednotlivých testů využitých v experimentu jsou detailně popsány v publikacích Cahova et al. (2021a) a Cahova et al. (2023a).

### 4.1.2 *In vitro* analýza endokrinní disrupce oktinoxátu

Na základě *in vitro* analýzy byla posouzena agonistická a antagonistická aktivita EHMC. Společně s hodnocením koncentrací plazmatických hormonů štítné žlázy slouží tato analýza k doplnění *in vivo* testování ovlivnění dráhy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza po expozici EHMC u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Pomocí *in vitro* biotestů (TRβ-CALUX, anti-TRβ-CALUX) založených na expresi reportérového genu (světluščí luciferázy) byla měřena agonistická a antagonistická aktivita EHMC na beta izoformě thyroidního hormonálního receptoru (TRβ). Dále byl zjišťován pomocí testu TTR-TRβ-CALUX potenciál EHMC, zda je v kompetici s thyroxinem o vazebná místa na transportním proteinu

transthyretinu (TTR; známém také jako prealbumin). Jako referenční látky byl pro agonismus na TR $\beta$  využit trijódthyronin, pro antagonismus na TR $\beta$  byl použit deoxynivalenol a pro test vazby na TTR se použil tetrabromobisfenol A. Tato analýza byla doplněna o stanovení potenciálního cytotoxického účinku EHMC za využití testu redukce resazurinu. Detailní popsání metodik jednotlivých *in vitro* analýz jsou uvedeny v publikaci Cahova et al. (2023a), která je součástí této disertační práce.

## 4.2 Posouzení embryotoxicity vybraných UV filtrů

Pro stanovení embryotoxicity UV filtrů a jejich směsí byl využit modifikovaný Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) dle metodiky OECD 236 (OECD, 2013). Testované UV filtry byly vybrány ze zástupců běžně používaných UV filtrů v PCPs. Zároveň bylo přihlíženo i k jejich výskytu ve vodním prostředí, aby byli zvoleni ti zástupci, kteří se běžně ve vodním ekosystému vyskytují. Konkrétně bylo provedeno hodnocení následujících zástupců: EHMC, BP-3, OC, PBSA a 4-MBC. Embryotoxicita UV filtrů byla hodnocena jak po expozici jednotlivými substancemi, tak po působení látek ve směších. Směsi UV filtrů byly vybrány na základě svých fyzikálně-chemických vlastností a rozpustnosti. Jako modelový organismus byla použita embrya dania pruhovaného (*Danio rerio*).

Testované koncentrace byly pro každý UV filtr vybrány na základě jeho výskytu v životním prostředí a vyšší koncentrace odrážely efekt se stoupající dávkou UV filtru.

Testované koncentrace jednotlivých UV filtrů byly následující:

- **PBSA** – 0,1; 1; 10; 100; 500; 1000 a 2 000  $\mu\text{g/l}$ ;
- **EHMC** – 0,1; 1; 10; 50; 100; 500; 1 000 a 2 000  $\mu\text{g/l}$ ;
- **OC** – 0,1; 1; 10; 50; 100 a 250  $\mu\text{g/l}$ ;
- **4-MBC** – 0,1; 1; 10; 50; 100 a 250  $\mu\text{g/l}$ ;
- **BP-3** – 0,1; 1; 10; 50; 100; 5 000; 1 000 a 2 000  $\mu\text{g/l}$ .

Směsi UV filtrů byly rozděleny do 3 skupin. První skupina obsahovala **OC a 4-MBC**, druhá byla kombinací **PBSA, EHMC a BP-3** a poslední se skládala z kombinace **všech pěti UV filtrů**. Koncentrace použité po jednotlivé směsi byly 0,1; 10 a 100  $\mu\text{g/l}$ .

Jednotlivá embrya byla vystavena testovaným koncentracím po dobu 96 hodin. Pro každou testovací skupinu bylo použito 24 embryí, celý test byl proveden v duplikátu. Zároveň byla provedena kontrola s ředící vodou a kontrola s příslušným ředícím roztokem. Embrya byla

sledována pomocí stereomikroskopu 24, 48, 72 a 96 hodin po oplození (hpf) a následně byly zaznamenávány a vyhodnoceny jednotlivé změny. Sledované parametry zahrnovaly mortalitu a subletální změny jako jsou koagulace oplozených jiker, absence somitů, nedostatečné oddělení ocasu od žloutkového vaku a aktivní srdeční činnost embryí. Detailní popsání metodiky experimentu je uvedeno v publikaci Cahova et al. (2021b), která je součástí předkládané práce.

#### 4.3 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro pstruha duhového

Pro hodnocení negativního účinku musk sloučeniny tonalidu byl jako modelový organismus zvolen pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Pstruzi byli vystaveni účinkům této látky po dobu 6 týdnů. Podobně jako EHMC, byl tonalid inkorporován do krmných pelet, aby se simulovaly podmínky přirozené expozice tímto polutantem. K experimentu bylo využito 60 jedinců samčího pohlaví, testovaná látka byla aplikovaná ve dvou koncentracích. První, nízká koncentrace (854  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) reprezentovala environmentální koncentraci a druhá, stokrát vyšší (8 699  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), sloužila k posouzení účinku se zvyšující se koncentrací. Narušení fyziologických funkcí bylo hodnoceno z pohledu změn biochemických a hematologických parametrů, aktivit detoxifikačních enzymů společně s posouzením narušením antioxidační ochrany a markerů oxidativního stresu. Jelikož je tonalid považován za endokrinního disruptora, byly analýzy doplněny o hodnocení jeho xenoestrogenního potenciálu pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). K této analýze sloužilo stanovení koncentrace vitellogeninu v plazmě ryb. Celý experiment byl doplněn histologicko-patologickým vyšetřením k posouzení změn jednotlivých tkání po expozici testovaným polutantem. Jednotlivé metodiky jsou uvedeny v publikaci Hodkovicova et al. (2020), která je součástí předkládané disertační práce.

#### 4.4 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro danio pruhované

Pro následující experiment byl vybrán jako testovaný organismus danio pruhované (*Danio rerio*), jakožto významný zástupce modelových organismů pro testy toxicity. Experiment trval 2 měsíce, tato doba umožnila náhled na vývoj změn sledovaných parametrů během dlouhodobé expozice tomuto polutantem. Subchronický test toxicity byl veden podle metodiky Juvenilního růstového testu OECD č. 215 (OECD, 2000). Testované látky bylo vystaveno celkem 600 jedinců dania pruhovaného (*Danio rerio*) v juvenilním stádiu vývoje. Tonalid dávkovaný ve vodě byl testován ve 4 koncentracích, kdy nejnižší z nich (50  $\text{ng}/\text{l}$ )

reprezentovala environmentální koncentraci v povrchové vodě a vyšší hodnoty (500; 5 000; 50 000 ng/l) pak odrážely vztah mezi toxickým účinkem a zvyšující se koncentrací. Celý experiment byl doplněn o dvě kontrolní skupiny. Jedna obsahovala aceton, který byl použit jako rozpouštědlo tonalidu, a druhá kontrolní skupina byla pouze s vodou.

Sledovanými parametry byly ukazatele oxidativního stresu doplněné o histologicko-patologické vyšetření pro zhodnocení míry poškození orgánů na tkáňové úrovni. Dalším důležitým hodnotícím bodem bylo určení xenoestrogenního potenciálu tonalidu. K tomuto účelu bylo využito stanovení koncentrace vitellogeninu v celotělním homogenátu. Všechny metodiky jsou podrobně popsány v publikaci Cahova et al. (2023b), která je součástí předkládané disertační práce.

## 5 VÝSLEDKY

Obsahem této kapitoly jsou jednotlivé vědecké práce týkající se tématu předkládané disertační práce. Úvodem každé kapitoly je krátké shrnutí cílů a výsledků experimentu, dále jsou vloženy vlastní vědecké práce, které byly publikovány ve vědeckých časopisech s impakt faktorem.

### 5.1 Zhodnocení negativního vlivu oktinoxátu

#### 5.1.1 Subchronický *in vivo* test na pstruhu duhovém

Hlavním cílem experimentu bylo zhodnocení negativního účinku EHMC na necílový organismus se zaměřením na stanovení vybraných biochemických parametrů, narušení antioxidační ochrany a hematologického profilu ryb. Součástí výzkumu bylo také histopatologické vyšetření vybraných tkání k posouzení poškození na mikroskopické úrovni.

Výsledky tohoto experimentu zahrnují změny jak v hematologickém, tak i biochemickém profilu ryb s prokázaným narušením antioxidační ochrany. Na základě hematologického vyšetření byl sledován snížený počet leukocytů u testované skupiny s nejvyšší koncentrací EHMC (395,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), což může značit potenciální narušení obranyschopnosti organismu s následným postižením imunitního systému. Biochemický profil byl změněn po expozici střední (96,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a nejvyšší dávky (395,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) testované látky, jednalo se o signifikantní změny v koncentracích glukózy, laktátu, celkového proteinu, albuminu, cholesterolu, triacylglycerolů a amoniaku. Ačkoli na základě zjištěných výsledků bylo prokázáno narušení sacharidového, lipidového a proteinového metabolismu, změny biochemických parametrů neměly dopad na změnu chování, příjem krmiva a v průběhu celého experimentu nebyla zaznamenána mortalita. Střední (96,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a nejvyšší koncentrace EHMC (395,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) vyvolaly také změny v aktivitách detoxifikačních enzymů a parametrech souvisejících s hodnocením oxidativního stresu. Konkrétně se jednalo o následující parametry – GPx, GST, TBARS, a FRAP. Aktivita enzymu GPx byla statisticky zvýšená v játrech po expozici nejnižší (6,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a střední dávky EHMC (96,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). V žábrech byla zaznamenána snížená aktivita GST, a to pro střední koncentraci EHMC (96,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Hodnoty TBARS v ledvinách byly taktéž signifikantně zvýšeny pro nejvyšší (395,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) koncentraci EHMC a pro nejnižší (6,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) koncentraci EHMC vzhledem ke koncentraci nejvyšší. Ve všech testovaných koncentracích byla detekována snížená schopnost plazmy redukovat železité ionty,

jejímž ukazatelem byla hodnota FRAP. Sledovaný parametr poukazuje na oslabenou antioxidační ochranu, což v kombinaci s dalšími výsledky může značit zvýšený oxidativní stres vyvolaný šestitýdenní expozicí EHMC u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

Jedním z dalších cílů této studie bylo posouzení potenciálů EHMC jakožto endokrinního disruptora thyroïdních hormonů u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Sledovanými biomarkery v *in vivo* pokusu byla plazmatická hladina hormonů štítné žlázy. K doplnění analýzy disrupce hormonů štítné žlázy sloužila metoda RT-qPCR, pomocí které byla hodnocena mRNA exprese genů pro *dio2*, paired box proteinu pax-8 (*pax8a*) a genů thyroïdních receptorů *thra* a *thrβ*.

Po ukončení *in vivo* experimentu byla zaznamenaná zvýšená koncentrace hormonu T4 v plazmě po expozici nejvyšší dávkou EHMC, tj. 395,6 μg/kg. Vyšetření tkání pomocí PCR metody odhalilo down-regulaci exprese genu *dio2* v nejvyšší použité koncentraci (tj. 395,6 μg/kg) a genu *pax8a* u střední (96 μg/kg) a nejvyšší dávky EHMC (395,6 μg/kg).

### 5.1.2 *In vitro* analýza endokrinní disrupce oktinoxátu

Součástí našeho experimentu byla také *in vitro* analýza, která se skládala z metody RGA (Reporter Gene Bioassay) a testu cytotoxicity. Data získaná z *in vivo* experimentu se porovnávala s daty z *in vitro* testu, aby se objasnil mechanismus toxického účinku EHMC na úrovni ovlivnění hormonů štítné žlázy.

*In vitro* analýza neprokázala anti-thyroidní aktivitu EHMC pomocí THR $\beta$ . Tento UV filtr se také neprojevil jako ligand TTR. Na základě zhodnocení výsledků *in vivo* a *in vitro* testů toxicity může být EHMC považován za potenciálního endokrinního disruptora. Nicméně je třeba realizovat další analýzy, aby se tato hypotéza mohla potvrdit a aby se zároveň mohly řádně popsat jednotlivé kroky celého toxického mechanismu účinku.

Provedení *in vivo* a *in vitro* experimentu společně s výsledky je uvedeno v následujících publikacích – Cahova et al. (2021a) a Cahova et al. (2023a).

- **Cahova, J.**, Blahova, J., Marsalek, P., Doubkova, V., Franc, A., Garajová, M., Tichy, F., Mares, J., & Svobodova, Z. (2021a). The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Science of The Total Environment, 774, 145570. **IF**<sub>2021</sub> = 10,754; Q1

- **Cahova, J.**, Blahova, J., Mares, J., Hodkovicova, N., Sauer, P., Kroupova, H. K., & Svobodova, Z. (2023a). Octinoxate as a potential thyroid hormone disruptor – A combination of *in vivo* and *in vitro* data. Science of The Total Environment, 856, 159074. **IF**<sub>2021</sub>= 10,754; Q1



## The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)



Jana Cahova<sup>a</sup>, Jana Blahova<sup>a,\*</sup>, Petr Marsalek<sup>a</sup>, Veronika Doubkova<sup>a</sup>, Ales Franc<sup>b</sup>, Michaela Garajová<sup>b</sup>, Frantisek Tichy<sup>c</sup>, Jan Mares<sup>d</sup>, Zdenka Svobodova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Brno, Czech Republic

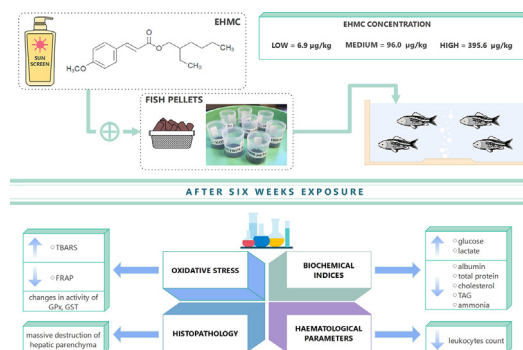
<sup>c</sup> Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- Subchronic EHMC exposure disturbs saccharide, lipid and protein metabolism.
- Subchronic EHMC exposure causes oxidative stress in various tissues of trout.
- EHMC exposure results in hepatic parenchyma extensive damage.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 November 2020

Received in revised form 26 January 2021

Accepted 28 January 2021

Available online 5 February 2021

Editor: Damia Barcelo

#### Keywords:

EHMC

Fish

Aquatic ecosystem

### ABSTRACT

UV filters are able to enter the aquatic environment and negatively affect non-target organisms. The aim of this study was to evaluate subchronic exposure to ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) in rainbow trout. The tested EHMC concentrations of 6.9 (low), 96.0 (medium) and 395.6 µg/kg (high) were used. The lowest concentration was based on environmentally relevant concentrations. The higher concentrations were chosen as a multiple of the lowest one to determine the dose-response relationship. EHMC was incorporated into feed pellets. The experiment was conducted for six weeks in a semi-static system. Haematological, biochemical and oxidative stress indices were determined at the end of the experiment and supplemented by histological examination. Significant changes were proven at medium and high concentrations of EHMC. Specifically, increases of glucose, lactate and decrease of albumin and total protein in plasma indicate a stress etiology. Moreover, a decrease of plasma cholesterol, triacylglycerols and ammonia were observed even in the experimental group exposed to the lowest concentration of EHMC, perceived as an environmentally relevant concentration. The ferric reducing

**Abbreviations:** ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BP-1, benzophenone-1; BP-2, benzophenone-2; BP-3, benzophenone-3; BP-4, benzophenone-4; BP-8, benzophenone-8; CAT, catalase; CECs, contaminants of emerging concern; DM-DBM, butyl methoxydibenzoylmethane; DW, dry weight; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EHMC, ethylhexyl methoxycinnamate; EHS, ethylhexyl salicylate; FCF, Fulton's condition factor; FRAP, ferric reducing ability of plasma; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-transferase; HMS, homosalate; HIS, hepatosomatic index; LC/MS, liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry; LDH, lactate dehydrogenase; LOQ, limit of quantification; 4-DHB, 4-dihydroxybenzophenone; 4-HB, 4-hydroxybenzophenone; 4-MBC, 4-methylbenzylidene camphor; ME, matrix effect; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MDA, malondialdehyde; OC, octocrylene; OD-PABA, octyl dimethyl *p*-aminobenzoate; PABA, *p*-aminobenzoic acid; PBSA, 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid; PE, process efficiency; OS, octisalate; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; RE, extraction recovery; SEM, standard error of mean; SOD, superoxide dismutase; TAG, triacylglycerols; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; UV, ultraviolet; UVs, UV filters.

\* Corresponding author at: Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic.

E-mail address: [blahovaj@vfu.cz](mailto:blahovaj@vfu.cz) (J. Blahova).

Oxidative stress  
Haematological and biochemical indices  
Histopathology

ability of plasma was decreased in all tested concentrations. Exposure to the highest concentration of EHMC resulted in a decrease in leukocyte counts. Increased activity of glutathione peroxidase in liver was recorded for the medium and the highest concentration of EHMC. The level of the thiobarbituric acid reactive substances in kidney was elevated for the highest concentration. Decrease of the activity of glutathione-S-transferase in gills for medium concentration of EHMC was registered. Histopathological examination revealed massive destruction of hepatic parenchyma at the highest concentration of EHMC. All these results support the finding of a stress load on the fish organism. In summary, although subchronic exposure to EHMC had no effect on behaviour, mortality or feed intake, this exposure resulted in the alteration of saccharide, lipid and protein metabolism and weakened antioxidant capacity.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ultraviolet (UV) radiation is a known carcinogen and the main source of this radiation is the sun. UV radiation is divided into three types (UV A, UV B, UV C) according to its wavelength and effect. UV filters (UVs) are able to alleviate the damage caused by UV radiation and are nowadays well known as significant pollutants of the environment (Fent et al., 2010).

Chemically, UVs are organic or inorganic substances. Representatives of inorganic UVs are zinc oxide nanoparticles and titanium dioxide. Organic UVs belong to the group of aminobenzoates, benzophenones, derivatives of camphor and acid cinnamate, salicylates, benzimidazoles, etc. UVs are often used in common cosmetic products (skin products and haircare products). Twenty-eight UVs allowed in cosmetic products in the EU are listed in Annex VI to the EU Cosmetic Products Regulation (EC) No. 1223/2009.

Due to the huge consumption of these products, especially during recreational activity in the summer, these compounds are released in the water ecosystem by two possible pathways. Directly, UVs enter into the aquatic environment by washing off the skin. Indirectly, they become part of our environment after insufficient purification at wastewater treatment plants and can negatively affect non-target aquatic organisms (i.e. organism other than the one for which are UV sintend). These compounds are detected worldwide due to their poor degradability in the environment. Many UVs are characterised by lipophilic properties that could lead to resistance in the environment and results in bioaccumulation in organisms (Fent et al., 2010).

The occurrence of UVs has been confirmed in a huge range of biotic and abiotic matrices. The derivate of cinnamic acid – ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) – has been detected in fresh water at a concentration of 7552 ng/l (Sousa et al., 2019). Surface seawater contained diverse representatives of UVs – benzophenone-3 (BP-3), octocrylene (OC), homosalate (HMS), octisalate (OS) at concentrations of tens to hundreds ng/l (Mitchellmore et al., 2019). The greatest concentration found in drinking water was 17.8 ng/l for BP-3 (Li et al., 2019), tap water in Spain was found to have concentrations of 260 ng/l for EHMC, 290 ng/l for BP-3, 35 ng/l for 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), 110 ng/l for octyl dimethyl *p*-aminobenzoate (OD-PABA) and 170 ng/l for OC (Díaz-Cruz et al., 2012), while UVs have been detected at levels of between 0.27 and 8.9 µg/l in untreated municipal wastewater in different countries (Fent et al. 2009; Langford et al., 2015; O'Malley et al., 2019). OC, EHMC and BP-3 are lipophilic substances with low water solubility and high octanol-water partition coefficients, for which reason these compounds tend to persist in sediments in a range of concentrations of between 5.6 and 322.2 ng/g dry weight (DW) (Apel et al., 2018; Mizukawa et al., 2017). Samples of beach sand contained 4-MBC, EHMC and BP at concentrations from 0.03 to 373 ng/g DW (Capela et al., 2019).

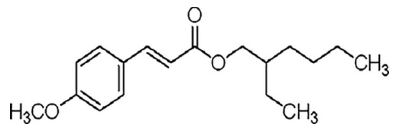
Due to their presence in the water environment and the chemical properties of UVs, these compounds are also found in biotic matrices. UVs have been detected in blue mussels (*Mytilus* sp.), an organism suitable as a bioindicator for monitoring water pollution (Beyer et al., 2017). Sunscreens, with the most prevalent being ethylhexyl salicylate (EHS)

and EHMC, have been detected in mussels at average total concentrations of 1155.8 ng/g (Castro et al., 2018). Fish are one of the non-target organisms most exposed to sunscreens. The most frequent UVs detected in the Lebranche mullet (*Mugil liza*) were BP-3 and its metabolites 4-dihydroxybenzophenone (4-DHB) and 4-hydroxybenzophenone (4-HB). The UVs 4-MBC, EHMC and OC ranged at concentrations of between 4.42 and 98.8 ng/g DW. Liver was the most contaminated tissue, with the gills and muscles less affected in comparison (Molins-Delgado et al., 2018b). Pico et al. (2019) detected EHMC in whole fish homogenate at a concentration of 242 ng/g DW; the occurrence of other sunscreens (BP-3, OC) ranged from non-detected to 31 ng/g DW. Fent et al. (2010) revealed the food-chain accumulation trend of EHMC in biota. In their study, EHMC was detected at concentrations of between 22 and 150 ng/g lipids in mussels (*Dreissena polymorpha*), at concentrations of 337 ng/g lipids in barb (*Barbus barbus*) and in a range of 16 to 701 ng/g lipids in cormorants (*Phalacrocorax* sp.). Due to their lipophilic properties, metabolites of sunscreens have been detected in breast milk at a concentration of 779.9 ng/g (Molins-Delgado et al., 2018a) and in human urine (Bury et al., 2019). The concentration of BPs (benzophenone-1, BP-1; benzophenone-2, BP-2; benzophenone-3, BP-3; benzophenone-4, BP-4) detected in children's urine ranged from 43.0 to 76.7 ng/ml (Li et al., 2019).

Organic UVs do not generally cause acute toxicity for fish. However, on the base of the recent studies, was proved that UVs can cause some damage for invertebrates, e.g. corals (Corinaldesi et al., 2018; Tsui et al., 2017). Moreover, for some UVs has been proven embryotoxicity. The UV filter BP-3 negatively affects the development of zebrafish embryos (Jang et al., 2016). Quintaneiro et al. (2019) conducted a fish embryo toxicity test with *Danio rerio*. Notochord curvature of embryos, delayed absorption of the yolk sac and pericardial oedema were proven after exposure to 4-MBC. Moreover, 4-MBC induced the detoxification system by activating glutathione-S-transferase (GST). In the study performed by Zhou et al. (2019a) EHMC weakened antioxidant capacity in zebrafish (*D. rerio*). Recent studies have shown that the UVs EHMC, OC, benzophenone-8 (BP-8) and BP-1 negatively influence the marine ecosystem and are responsible for coral bleaching (He et al., 2019a; He et al., 2019b). The State of Hawaii has introduced restrictions on the usage of sunscreens containing these compounds (Hawaii State Legislature. S.B. No. 2571, 2018).

We decided to research the impact of the organic UV filter EHMC on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in view of the ubiquitous occurrence of UVs in the environment. EHMC (Table 1) is a common component of various personal care products as a UVB blocker (lip balm, creams, sunscreen lotion, shampoo, etc.) to protect skin from the malign effects of UV rays. This organic UV filter is listed in "The Watch List" of contaminants of emerging concern (CECs). "The Watch List" is published as part of Directive 39/2013/EU in Decision 2015/495/EU (2015). Substances on this list are monitored all over the EU and data are gathered to help secure preventive measures if needed. UVs are now of particular interest because of their ability to disrupt the endocrine system (Christen et al., 2011; Inui, 2003). EHMC is considered as an endocrine disruptor with different scales of effect. Christen et al.

**Table 1**  
Chemical structure and basic physical and chemical characteristics of EHMC (Díaz-Cruz et al., 2012).



Name	CAS No	Molecular weight (g/mol)	Log K <sub>ow</sub>	Solubility (g/l)
EHMC	5466-77-3	290.4	5.8	0.15

(2011) proved the estrogenic and antiandrogenic effect of EHMC on fathead minnows (*Pimephales promelas*). *In vitro* testing pointed to antiestrogenic, antiandrogenic and weak androgenic activity (Kunz and Fent, 2006). Disruption of the thyroid hormonal balance was observed in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after 5 months of exposure to EHMC; specifically, a significant decrease was seen in triiodothyronine and thyroxine hormones (Lee et al., 2019).

The aim of this study was to evaluate the influence of EHMC on non-target aquatic organisms. Due to the detection of EHMC in the aquatic environment, we chose the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as the experimental organism. EHMC was incorporated into feed pellets to simulate dietary exposure. Evaluation of the toxicological effect was defined by changes to haematological and biochemical indices and alterations to the antioxidant defence system. In addition, part of our experiment also focused on histopathological changes to selected tissues after EHMC exposure.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and design of the experiment

All experimental procedures were approved by the institutional ethical committee and carried out in compliance with the national legislation – Act No. 246/1992 Coll., on the Protection of Animals against Cruelty and Decree No. 419/2012 Coll., on the Protection, Breeding and Use of Experimental Animals. Juvenile rainbow trout (*O. mykiss*) were obtained as an experimental fish organism from Mendel University in Brno, Czech Republic. The total number of 80 fish was divided into eight 200 l aquaria with dechlorinated tap water. During an acclimatisation period of two weeks, the fish were fed with pellets with no EHMC content. After this time, the fish were divided into 3 experimental groups ( $n = 20$  in each group) with EHMC concentrations of 6.9 µg/kg (low), 96 µg/kg (medium) and 395.6 µg/kg (high) and 1 control group ( $n = 20$ ) without EHMC. The lowest concentration represented an environmental concentration and its multiples should reflect the effect of increasing concentrations. All the fish were weighed at the beginning of the experiment to determine the feed dose for each experimental group. Checkweighing was performed at a frequency of two weeks during the experiment. The feeding was performed daily, twice a day. The consumed amount was checked and recorded. The experiment was performed in a semi-static system for six weeks. The water in the aquaria was changed daily, at 12-h intervals and water parameters (oxygen; pH; temperature; concentration of nitrite nitrogen, ammoniac nitrogen and chlorides) were checked at the same time. The exact water parameters are shown in Table S1.

### 2.2. Preparation of fish pellets

EHMC was obtained from Merck, Germany; Eudragit® E 100 (dimethylaminoethyl methacrylate) from Evonik Industries, Germany; Aerosil® 200 (colloidal silicon dioxide) from Evonik Industries, Germany; 96% ethanol from Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové. Fish pellets were obtained from Biomar, Denmark. Feed premixes were

prepared by dry coating technology in three different EHMC concentrations of 6.9 µg/kg, 96.0 µg/kg and 395.6 µg/kg and the weight of each sample was 4 kg. A 9 kg control sample (without EHMC) was also prepared. Three solutions of EHMC in ethanol were prepared: A (0.5 mg/ml); B (0.05 mg/ml); C (0.005 mg/ml). D was an ethanolic solution of Eudragit® E 100 (14.5%). The preparation of each concentration was the same: 1976.6 g of pellets and 10.4 g of Aerosil® 200 were mixed in a cubic blender (Erweka KB 5 I, Germany) for 5 min at 40 rpm. 6.0 ml of solution A, B or C was mixed with 89.67 g of solution D, poured into pellets and mixed again for 5 min at 40 rpm. The mixture was dried in a HORO-048B hot-air oven (Dr. Ing. A. Hoffmann, Germany) for 4 h at 50 °C. This procedure was repeated two times. The amount of EHMC is 50% higher because of the loss factor as obtained from previous studies (Vaclavik et al., 2020; Modra et al., 2018). 2964.9 g of pellets, 15.6 g of Aerosil® 200 and 134.5 g of solution D with the same parameters were used to prepare a control sample. This procedure was repeated three times. Prepared pellets were tested for physicochemical properties (Table S2). The friability, which indicates the quality of the coating level was evaluated according to Ph. Eur. [2.9.7.]; the resistance to crushing, which is necessary for the assessment of the mechanical resistance during the transport of the feed mixture, was evaluated according to Ph. Eur. [2.9.8]; bulk density and taped density, which indicate changes in the volume of the feed mixture during transport and storage, were evaluated according to Ph. Eur. [2.9.34.]; mass uniformity, which declares the uniformity of the coating level was evaluated according to Ph. Eur. [2.9.27.]; pycnometric density, which relates to the density of the pellet core and coating level, was evaluated using a Pycnomatic-ATC helium pycnometer (POROTEC GmbH, Germany) according to Ph. Eur. [2.9.23.]. The electrostatic charge characterizing the change in electric charge after coating was determined using a JCI 150 Faraday cage and a JCI 178 charge measuring unit (Chilworth Technology Ltd., UK) and moisture content was evaluated using a halogen moisture analyzer (HX204, Mettler Toledo, Switzerland) according to Svačinová et al. (2019). Dimensions of pellet cores and coated pellets were determined using a Nikon SZM 1500 optical microscope (Nikon, Japan). The morphology of samples was assessed by SEM using MIRA 3 (Tescan Orsay Holding, Czech Republic). The exact procedures of above-mentioned tests are described in detail in the individual cited articles of European Pharmacopoeia and the cited literature. The units of measurement are listed in Table S2.

### 2.3. Determination of EHMC in fish pellets

The determination of EHMC was conducted using liquid chromatography – electrospray ionization - tandem mass spectrometry (LC/MS). A sample of feed (0.5 g) was vortexed in glass test tube with acetonitrile (2 ml) for 2 min. After extraction, sample was centrifuged at 800 ×g for 15 min at 20 °C, supernatant was filtered through a 0.2 mm nylon filter (Millipore, USA) and used for LC/MS analysis. A Thermo Scientific UHPLC Accela 1250 chromatographic pump was connected to a Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX Triple Quadrupole Instrument (Thermo Scientific, USA) equipped with heated electrospray ionization probe. A Titan C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm) column (Merck, Germany) was used at a constant flow rate of 300 µl/min. Mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid (v/v) (solvent A) and methanol (solvent B). The gradient used was: 0–2.0 min linear gradient from 50 to 95% B; 2.0–7.5 min held at 95% B; 7.5–8.0 min from 95 to 50% B and 8.0–8.5 min held at 50% B. The full loop injection volume of the sample was set at 10 µl. The heated electrospray ionization was operated in the positive mode under the following conditions: Capillary Temperature: 325.0 °C; Vaporizer Temperature 300.0 °C; Sheath Gas Pressure 35.0 psi; Auxiliary (drying) gas 10 a.u.; Spray Voltage 3300 V. The instrument was calibrated daily with multi-level matrix-matched calibration curves. The retention time of EHMC was 5.75 min ± 0.03 min. Procedural blank was analysed for every set of 10 samples. To evaluate method process efficiency (PE), extraction

recovery (RE) and matrix effect (ME), ten feed samples and ten feed extracts were spiked with standard solution at target level 100 ng/g. The matrix effect was calculated as  $ME (\%) = (B/A - 1) \times 100$ , where A is the peak area of the standard solution and B is the peak area of the post-extraction standard addition. The extraction recovery was calculated as  $RE (\%) = C/B \times 100$ , where C is the peak area of the pre-extraction standard addition and the process efficiency was calculated as  $PE (\%) = C/A \times 100$ . The method process efficiency was 85.4%; extraction recovery was 90.2% and matrix effect was -5.3%. The inter-day precision expressed as a relative standard deviation was 5.6% and the inter-day accuracy was 4.1%. The limit of detection determined as 3:1 signal versus noise value was 0.63 ng/g. The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration level of calibration curve (2.5 ng/g) with the corresponding signal/noise ratio greater than 10. Standard of EHMC and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All solvents were residual analysis purity (Chromservis, Czech Republic).

Fourteen samples from each group were tested. The tested concentrations of EHMC were  $6.9 \pm 0.8 \mu\text{g/kg}$  (low),  $96 \pm 1.8 \mu\text{g/kg}$  (medium),  $395.6 \pm 18.5 \mu\text{g/kg}$  (high), and the control group did not contain any EHMC.

#### 2.4. Sampling

At the end of the experiment, peripheral blood was taken from the tail vessel of each fish for further analysis. Blood for biochemical ( $n = 10$ ) and haematological ( $n = 10$ ) analysis for every concentration was placed in tubes containing lithium heparin (10  $\mu\text{l}$  of anticoagulant and 1 ml of blood) and then chilled. All the fish were measured for morphological parameters (body length; body weight; liver weight) for Fulton's condition factor (FCF) and hepatosomatic index (HSI). FCF was calculated according to the formula  $FCF = (\text{body weight} \times \text{body length}^3) \times 100$  and HSI was calculated according to the formula  $HSI = (\text{liver weight} / \text{body weight}) \times 100$  ( $n = 20$  in each group). The fish were sacrificed by stunning with the blow to the back of the head, immediately followed by spinal cord transection to minimize the stress. Samples of spleen, liver, cranial and caudal kidney, skin and gill were taken representatively for each group for histological examination ( $n = 6$ ). Samples of caudal kidney, liver and gills for oxidative stress analysis for every concentration ( $n = 20$ ) were frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Measurement was performed on the same tissue sample in triplicate because of the small amount of the biological material.

#### 2.5. Haematological and biochemical profile

Parameters for the red blood profile (count of erythrocytes, haematocrits and haemoglobin) and white blood profile (count of leucocytes), corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) were determined for haematological analysis. Methods for haematological examination were executed by the unified method for the haematological examination of fish by the authors Svobodová et al. (2012). Erythrocyte and leucocyte counting was performed by a manual method in a Bürker chamber with the use of a microscope. Natt-Herrick's Stain Solution was used as a diluent solution. Haematocrit was determined by centrifugation with the use of microhaematocrit capillaries. Quantitative determination of haemoglobin was performed spectrophotometrically by the cyanohaemoglobin method. Blood was centrifuged for biochemical analysis (10 min,  $4^\circ\text{C}$ ,  $800 \times g$ ) and the separated plasma was stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Biochemical indices in plasma were determined spectrophotometrically, including concentration of glucose, lactate, total protein, albumin, cholesterol, triacylglycerols (TAG), ammonia, creatinine, calcium and phosphorus. The enzymes examined were alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH). These parameters were determined using a Konelab 20i

biochemical analyzer and commercial test kits (BioVendor, Czech Republic).

#### 2.6. Oxidative stress indices and detoxifying enzyme

The quantification of oxidative stress was conducted in plasma (ferric reducing ability of plasma, FRAP; ceruloplasmin) and in various tissues (liver, caudal kidney and gill). The ferric reducing ability of plasma was measured by reducing ferric to ferrous ions at low pH using a Konelab 20i biochemical analyzer. The activity of plasma ceruloplasmin was determined using *p*-phenylenediamine and the concentration was expressed by the absorbance increase per minute  $\times 10,000$  (Haluzová et al., 2010). Samples of tissues were spectrophotometrically analysed for the activity of enzymes such as catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) and lipid peroxidation using the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). First, the tissue samples (liver, caudal kidney and gill) were homogenised (1:10 *w/v*) with the use of phosphate buffer containing antioxidant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for a compliance pH of 7.2. One part of the samples was used for the analysis of lipid peroxidation and the results were expressed as nmol of TBARS per gram of tissue of wet weight. The second part of the samples was centrifuged ( $10,500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 20 min) and the supernatant fraction was examined for enzyme activities (Habig et al., 1974; Carlberg and Mannervik, 1975; Aebi, 1984; Flohe and Gunzler, 1984). The final enzyme activities were normalised to protein concentration determined using bicinchoninic acid (Smith et al., 1985).

#### 2.7. Histopathological examination

Six samples of each tissue (gills, skin, cranial and caudal kidney, liver and spleen) were examined for histopathological analysis. Tissue samples were fixed in buffered 10% neutral formalin, dehydrated, placed in paraffin wax and sectioned on a microtome (thickness of 4  $\mu\text{m}$ ). The sections were stained with haematoxylin and eosin and examined using light microscopy.

#### 2.8. Statistical analysis

The statistical program Unistat for Excel 6.5. was used for statistical evaluation. All data were first checked for normality of distribution by the Shapiro-Wilk test. If the data met the condition of normal distribution, a parametric Tukey-HSD test was used for further testing. If the data did not meet the condition of normality, a nonparametric multi-selective median test was used. Statistical evaluation was performed among all groups. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ . All results are reported as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Behaviour and biometric indices

No alterations of behaviour, abnormal feed intake or mortality were detected during the entire experiment. No significant differences were observed in body length, body weight or liver weight between the control and the experimental groups. FCF and HSI were determined for each group for evaluation of morphological parameters. No significant changes were evaluated in any tested group (Table 2).

#### 3.2. Haematological examination

Haematological data are presented in Table 3. No significant changes were observed in the red blood cell profile. The only altered parameter was seen in the white blood cell profile. The leucocyte count was decreased at the highest concentration of EHMC. An altered haematological profile could disrupt the function of the immune system. The study

by Muona and Soivio (1992) focused on the correlation between smoltification and alteration of immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.). Their results demonstrated a decrease of total white blood cells, which could correlate with an increase of corticosteroid during stressful situations and could lead to impaired resistance to disease. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as another substance that adversely affects the environment, on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) was investigated by Danion et al. (2011). This study revealed a decrease in the white blood cell profile caused by the cytotoxicity of PAHs. Other environmental pollutants are also able to alter the immune system. Iheanacho and Odo (2020) focused on the influence of polyvinyl chloride microparticles on African catfish (*Clarias gariepinus*). The results of the haematological profile showed a decrease in the leukocyte count with no effect on the red blood cell count. Similarly, the final data in our experiment showed a decrease in white blood cells, statistically significant at the higher concentration, that could lead to alteration of the defence of the organism.

### 3.3. Plasma biochemical profile

Biochemical examination showed that the whole metabolism was disrupted, despite the lack of any alterations in behaviour or feed intake during the experiment. The results for biochemical parameters are shown in Table 4. Briefly, the greatest effect was recorded at medium and high concentrations of EHMC. Statistically significant changes of concentration were registered for glucose, lactate, total protein, albumin, cholesterol, TAG and ammonia. Elevation of the glucose plasma concentration could be relevant to a stressful situation since saccharides are the primary source of energy during stressful situations. The authors Nakano et al. (2014) explained the increase of glucose plasma concentration in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) after cortisol and catecholamine stimulation caused by stressful conditions. An increase in lactate concentration could also be related to stress ethology. When depletion of carbohydrate resources occurs, the organism induces anaerobic glycolysis and subsequently the concentration of plasma lactate increases (Yang et al., 2019). Furthermore, if the stress situation continues, the organism needs more energy to fight the stressor. Proteins and lipids conceal a huge energy pool relatively easily to utilise. The most extensive changes after EHMC exposure were recorded for lipid metabolism. A significant decrease in the plasma concentration of TAG and cholesterol at all tested concentrations indicates the fight of the

**Table 2**  
Morphological parameters of rainbow trout after EHMC exposure (mean ± SEM). No significant changes were observed between control and experimental groups. Fulton's condition factor – FCF, hepatosomatic index – HSI.

Indices	Group	Mean ± SEM
Body length (cm)	Control	182.2 ± 4.2
	Low	184.3 ± 2.8
	Medium	184.8 ± 2.0
	High	184.8 ± 3.2
Liver weight (g)	Control	113.3 ± 8.1
	Low	114.2 ± 5.7
	Medium	112.1 ± 3.8
	High	113.7 ± 5.8
Body weight (g)	Control	126.9 ± 9.0
	Low	128.0 ± 6.4
	Medium	126.6 ± 4.2
	High	128.4 ± 6.6
FCF	Control	2.02 ± 0.13
	Low	2.02 ± 0.11
	Medium	2.00 ± 0.10
	High	2.00 ± 0.17
HSI	Control	0.85 ± 0.15
	Low	0.83 ± 0.12
	Medium	0.92 ± 0.20
	High	0.95 ± 0.26

**Table 3**  
Results of haematological examination (mean ± SEM) in rainbow trout after EHMC exposure (n = 10 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetical superscripts and bold font. Mean corpuscular volume – MCV, mean corpuscular haemoglobin – MCH, mean corpuscular haemoglobin concentration – MCHC.

Indices	Group	Mean ± SEM
Leukocytes (10 <sup>9</sup> /l)	<b>Control</b>	<b>49.06 ± 4.84<sup>a</sup></b>
	<b>Low</b>	<b>47.20 ± 3.14<sup>a</sup></b>
	<b>Medium</b>	<b>41.30 ± 3.00<sup>a</sup></b>
	<b>High</b>	<b>35.06 ± 2.34<sup>b</sup></b>
Erythrocytes (10 <sup>12</sup> /l)	Control	1.53 ± 0.14 <sup>a</sup>
	Low	1.52 ± 0.13 <sup>a</sup>
	Medium	1.48 ± 0.10 <sup>a</sup>
	High	1.25 ± 0.06 <sup>a</sup>
Haematocrit (%)	Control	34.55 ± 0.80 <sup>a</sup>
	Low	32.40 ± 0.76 <sup>a</sup>
	Medium	33.00 ± 1.26 <sup>a</sup>
	High	31.70 ± 0.86 <sup>a</sup>
Haemoglobin (g/l)	Control	62.90 ± 3.30 <sup>a</sup>
	Low	60.15 ± 1.54 <sup>a</sup>
	Medium	56.20 ± 1.34 <sup>a</sup>
	High	62.55 ± 3.50 <sup>a</sup>
MCV (fl)	Control	241.13 ± 1.99 <sup>a</sup>
	Low	225.24 ± 1.60 <sup>a</sup>
	Medium	229.24 ± 1.42 <sup>a</sup>
	High	261.58 ± 1.42 <sup>a</sup>
MCH (pg)	Control	39.01 ± 6.19 <sup>a</sup>
	Low	41.88 ± 3.27 <sup>a</sup>
	Medium	39.46 ± 2.73 <sup>a</sup>
	High	51.76 ± 3.96 <sup>a</sup>
MCHC (l/l)	Control	1.63 ± 0.20 <sup>a</sup>
	Low	1.87 ± 0.07 <sup>a</sup>
	Medium	1.72 ± 0.07 <sup>a</sup>
	High	1.97 ± 0.09 <sup>a</sup>

organism with the stressor. In our experiment, a decrease in the total protein and albumin concentration indicated a huge consumption of the energy pool. In addition, free radicals generated during oxidative stress damage protein molecules and lesions could be manifested as a decrease of these substances in plasma (Yang et al., 2020). Another parameter that was significantly changed in all tested groups was the concentration of ammonia. The authors Eom et al. (2020) explained the decrease of plasma ammonia as a reaction of the organism to stress by increasing ventilation and elimination of ammonia through the gills. The concentrations of creatinine, calcium, phosphorus and enzyme activities (ALP, AST, ALP and LDH) were not detected as statistically significant as compared to the control.

### 3.4. Oxidative stress indices and detoxifying enzyme activity

The study of biochemical and oxidative stress markers induced by pollutants have been a point of interest in recent research. The stress condition would be manifested by changes of oxidative stress indices in fish. Zhou et al. (2019a, 2019b) pointed out the disruption of biological antioxidant defence in four-month-old zebrafish after EHMC exposure. In our experiment, the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation were determined in caudal kidney, liver and gills. The results are shown in Figs. 1–3 and Figs. S1–S3. Low and medium concentrations of EHMC caused a significant increase of GPx activity in the liver. In the same tissue, other antioxidant enzymes (GST, GR, CAT) and TBARS were not changed. The previous study by Huang et al. (2020) revealed alteration of the antioxidant response in zebrafish embryos (*D. rerio*) after BP-4, PABA and 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA) exposure. The activity of GST was significantly increased in the liver after 7 days of exposure. This enzyme plays a crucial role in the detoxification of pollutants. The same study also focused on markers of lipid peroxidation, particularly the evaluation of malondialdehyde (MDA) by the TBARS method in zebrafish embryos. The concentration

**Table 4**

Results of biochemical examination (mean ± SEM) of rainbow trout after EHMC exposure (n = 10 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetic superscripts and bold font. ALP – alkaline phosphatase, ALT – alanine aminotransferase, AST – aspartate aminotransferase, LDH – lactate dehydrogenase, TAG – triacylglycerols.

Parameter	Group			
	Control	Low	Medium	High
ALP (µkat/l)	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
ALT (µkat/l)	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>
AST (µkat/l)	5.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.6 <sup>a</sup>
LDH (µkat/l)	3.4 ± 7.0 <sup>a</sup>	32.3 ± 3.3 <sup>a</sup>	34.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	45.3 ± 5.1 <sup>a</sup>
<b>Total protein (g/l)</b>	<b>37.5 ± 0.7<sup>a</sup></b>	<b>34.7 ± 0.9<sup>a,b</sup></b>	<b>33.3 ± 1.1<sup>b</sup></b>	<b>31.6 ± 1.1<sup>b</sup></b>
<b>Albumin (g/l)</b>	<b>12.8 ± 0.4<sup>a</sup></b>	<b>10.6 ± 0.5<sup>a,b</sup></b>	<b>10.3 ± 0.7<sup>b</sup></b>	<b>9.8 ± 0.7<sup>b</sup></b>
<b>Ammonia (µmol/l)</b>	<b>513.3 ± 21.6<sup>a</sup></b>	<b>418.0 ± 26.2<sup>b</sup></b>	<b>371.0 ± 16.6<sup>b</sup></b>	<b>376.8 ± 13.3<sup>b</sup></b>
Creatinine (µmol/l)	25.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	28.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	25.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	23.0 ± 1.9 <sup>a</sup>
<b>Cholesterol (mmol/l)</b>	<b>8.7 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>7.3 ± 0.4<sup>b</sup></b>	<b>7.1 ± 0.3<sup>b</sup></b>	<b>6.7 ± 0.4<sup>b</sup></b>
<b>TAG (mmol/l)</b>	<b>2.9 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>2.1 ± 0.2<sup>b</sup></b>	<b>2.0 ± 0.2<sup>b</sup></b>	<b>2.0 ± 0.2<sup>b</sup></b>
<b>Glucose (mmol/l)</b>	<b>4.3 ± 0.2<sup>a</sup></b>	<b>4.8 ± 0.2<sup>a,c</sup></b>	<b>5.2 ± 0.2<sup>b,c</sup></b>	<b>5.8 ± 0.3<sup>b</sup></b>
<b>Lactate (mmol/l)</b>	<b>3.1 ± 0.4<sup>a</sup></b>	<b>4.1 ± 0.5<sup>a</sup></b>	<b>4.0 ± 0.4<sup>a</sup></b>	<b>5.0 ± 0.5<sup>b</sup></b>
Phosphorus (mmol/l)	3.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
Calcium (mmol/l)	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>

of MDA in the liver increased after PBSA exposure, though in contrast it decreased after BP-4 and PABA exposure. An increase of lipid peroxidation products causes increased production of free oxygen radicals that could lead to damage to the cell membrane and weaken the whole antioxidant defence of the organism. In crucian carp (*Carassius auratus*), a mixture of the organic UVs OD-PABA and butyl methoxydibenzoylmethane (DM-DBM) resulted in a significant increase in the activity of superoxide dismutase (SOD) and GR, while inhibiting the activity of catalase (Ma et al., 2017). Quintaneiro et al. (2019) reached similar conclusions. An early life stage of *D. rerio* embryos was exposed to the organic UV filter 4-MBC in their study. The results showed increasing production of free oxidative radicals consequently activating the detoxification system by increasing GST to protect the organism against oxidative damage.

In our study, TBARS in the kidney were the only increased parameter for the highest concentration of EHMC and for low concentration compared to the highest, other indices were not changed (GPx, GST and GR).

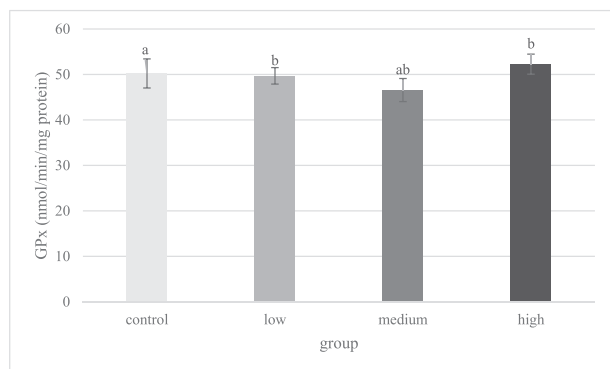
The only significantly decreased parameter in the gills was the activity of GST, specifically for the medium concentration of EHMC. The activity of GR, GPx and TBARS was not changed.

A statistically significant decrease of the ferric reducing ability of plasma (FRAP) was detected in plasma at all tested concentrations (Fig. 4). FRAP is a non-specific assay that measures the reduction of ferric to ferrous ion. This transformation is enabled by non-protein antioxidants. FRAP was also decreased in rainbow trout (*O. mykiss*) after 10 days of exposure to cyanobacteria (Kopp et al., 2018). After EHMC exposure, the plasma concentration of ceruloplasmin did not change in any experimental group (Fig. S4). The elevated activity of GPx in the liver and

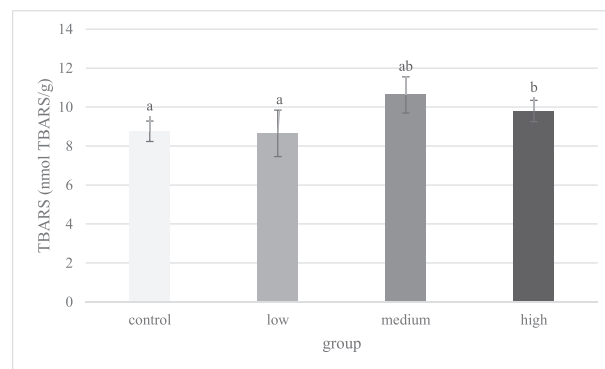
the increase of TBARS in the kidneys, as well as the decrease of GST activity in the gills, points to the stress load on the fish organism.

### 3.5. Histopathological examination

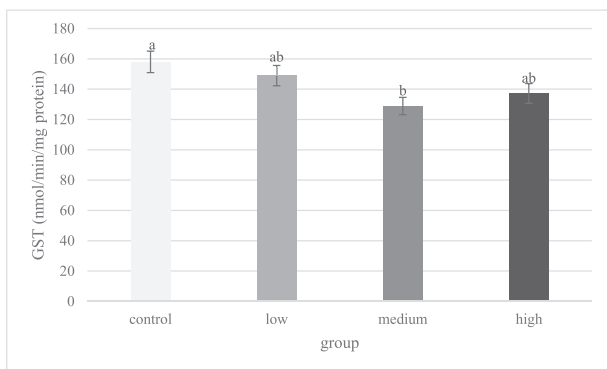
The results of histopathological examination revealed extensive damage to the hepatic parenchyma with the increasing concentration of the tested UV filter. Hepatodystrophy with a multifocal district of parenchymal destruction was recorded at the lowest concentration, districts of steatosis dystrophy were detected at the medium concentration of EHMC, and obvious massive destruction of parenchyma was found at the highest concentration (Fig. 5). Zhou et al. (2019b) came to a similar conclusion. In their study, apoptosis of liver cells caused by oxidative stress was detected in zebrafish after EHMC exposure. Other histological damage caused by EHMC was also proven in the recent study by Nataraj et al. (2020). Severe muscle damage was observed in zebrafish embryos after 96 h of exposure to EHMC. Histological changes were also observed in fathead minnows (*Pimephales promelas*) after EHMC exposure, specifically alteration of cells in the testes and ovaries manifested as a decrease in spermatocytes and oocytes (Christen et al., 2011). In our experiment, histopathological examination performed in the spleen, cranial and caudal kidney, skin and gills was evaluated without significant changes between the control and the test groups. It is obvious from our results that biochemical parameters were negatively affected due to widespread destruction of the liver, particularly for carbohydrates and ammonia, and these lesions could be responsible for the disruption of metabolic pathways.



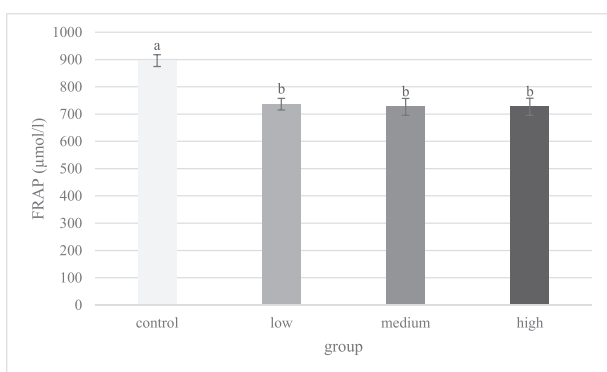
**Fig. 1.** Activity of glutathione peroxidase (GPx) in liver (mean ± SEM) of rainbow trout after EHMC exposure (n = 20 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetic superscripts.



**Fig. 2.** Concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in caudal kidney (mean ± SEM) of rainbow trout after EHMC exposure (n = 20 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetic superscripts.



**Fig. 3.** Activity of glutathione-S-transferase (GST) in gills (mean ± SEM) of rainbow trout after EHMC exposure (n = 20 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetic superscripts.



**Fig. 4.** Ferric reducing ability of plasma (FRAP) in rainbow trout after EHMC exposure (mean ± SEM, n = 10 in each group). Significant differences between control and experimental groups (p < 0.05) are indicated by different alphabetic superscripts.

#### 4. Conclusion

Organic UVs are used excessively in personal care products to protect the skin from damaging UV radiation. Worldwide consumption of sunscreens may lead to contamination of the aquatic environment. Research is needed considering that sunscreen is a potential toxicological agent. Although EHMC is considered one of the proven organic UVs, it is still a subject of interest in research because of its potential risk to non-target organisms. Extensive changes of indices for the metabolic pathways disruption and increase in white blood cells were identified after subchronic exposure to EHMC, even at an environmentally relevant concentration. Moreover, the extensive destruction of hepatic parenchyma at all concentrations of EHMC would imply a dose-dependent effect on the liver histology. The antioxidant defence of the organism was, not surprisingly, disrupted by oxidative stress and EHMC could be indicated as a stress trigger.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145570>.

#### CRediT authorship contribution statement

**Jana Cahova** – writing - original draft preparation, test methodology, analysis of oxidative stress indices.

**Jana Blahova** – biochemical and hematological analysis, statistical analysis, corresponding author, reviewing and editing of manuscript.

**Petr Marsalek** – analysis of EHMC in feed pellets.

**Veronika Doubkova** – analysis of oxidative stress indices.

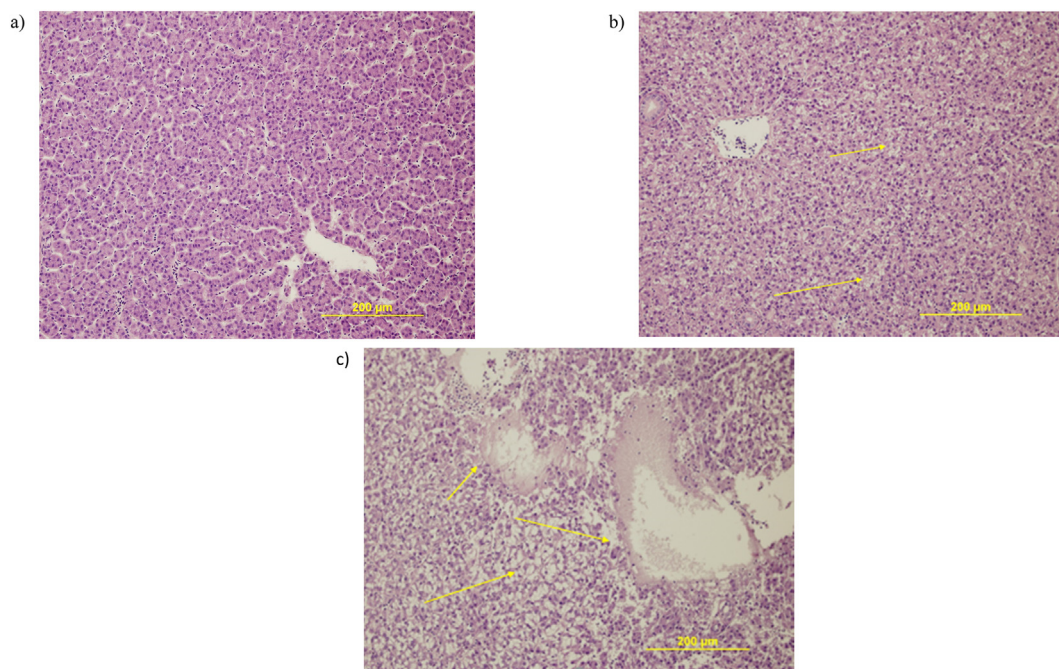
**Ales Franc** – preparation of fish pellets and analysis of their physicochemical properties.

**Michaela Garajova** – preparation of fish pellets and analysis of their physicochemical properties.

**Frantisek Tichy** – histopathological examination.

**Jan Mares** – test methodology, reviewing and final editing of manuscript.

**Zdenka Svobodova** – supervisor, reviewing and final editing of manuscript.



**Fig. 5.** a) Histological section of the intact hepatic parenchyma in control group rainbow trout; b) histological section of hepatic parenchyma (hepatodystrophy) in rainbow trout exposed to the low concentration of EHMC; c) histological section of massive dystrophy of hepatic parenchyma with loci of destruction in rainbow trout exposed to the highest concentration of EHMC.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgement

This work was supported by internal grant IGA 226/2019/FVHE of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (Czech Republic) and by the grant PROFISH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869). The authors thank Mr. James Fisher for manuscript improvement and for language editing.

## References

- Decision 2015/495/EU, 2015. Commission implementing decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. Off. J. Eur. Union 78, 40–42.
- Hawaii State Legislature. S.B. No. 2571. 2018. Relating to water pollution. [https://www.capitol.hawaii.gov/session2018/bills/SB2571\\_CD1\\_.htm](https://www.capitol.hawaii.gov/session2018/bills/SB2571_CD1_.htm). Accessed July 27 2020.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology. 105, 121–126.
- Apel, C., Joerss, H., Ebinghaus, R., 2018. Environmental occurrence and hazard of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of European North and Baltic Seas. Chemosphere 212, 254–261.
- Beyer, J., Green, N.W., Brooks, S., Allan, I.J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, L.L.N., Schøyen, M., 2017. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. Mar. Environ. Res. 130, 338–365.
- Bury, D., Griem, P., Wildemann, T., Brüning, T., Koch, H.M., 2019. Urinary metabolites of the UV filter 2-ethylhexyl salicylate as biomarkers of exposure in humans. Toxicol. Lett. 309, 35–41.
- Capela, D., Vila, M., Llupart, M., Dagnac, T., García-Jares, C., Alves, A., Homem, V., 2019. Footprints in the sand – assessing the seasonal trends of volatile methylsiloxanes and UV-filters. Mar. Pollut. Bull. 140, 9–16.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 250, 5475–5480.
- Castro, M., Fernandes, J.O., Pena, A., Cunha, S.C., 2018. Occurrence, profile and spatial distribution of UV-filters and musk fragrances in mussels from Portuguese coastline. Mar. Environ. Res. 138, 110–118.
- Christen, V., Zucchi, S., Fent, K., 2011. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. Aquat. Toxicol. 102, 167–176.
- Corinaldesi, C., Marcellini, F., Nepote, E., Damiani, E., Danovaro, R., 2018. Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.). Sci. Total Environ. 637–638, 1279–1285.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2011. Effects of *in vivo* chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquat. Toxicol. 105, 300–311.
- Díaz-Cruz, M.S., Gago-Ferrero, P., Llorca, M., Barceló, D., 2012. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. Anal. Bioanal. Chem. 402, 2325–2333.
- Eom, J., Fehsenfeld, S., Wood, C.M., 2020. Is ammonia excretion affected by gill ventilation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? Respir. Physiol. Neurobiol. 275, 103385.
- Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. Environ. Pollut. 158, 1817–1824.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114–112.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. First enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biology and Chemistry 249, 7130–7139.
- Haluzová, I., Modra, H., Blahová, J., Marsalek, P., SirokA, Z., Groch, L., Svobodova, Z., 2010. Effects of subchronic exposure to Spartakus (prochloraz) on common carp *Cyprinus carpio*. Neuroendocrinol. Lett. 31, 105–113.
- He, T., Tsui, M.M.P., Tan, C.J., Ma, C.Y., Yiu, S.K.F., Wang, L.H., Chen, T.H., Fan, T.Y., Lam, P.K.S., Murphy, M.B., 2019a. Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. Environ. Pollut. 245, 462–471.
- He, T., Tsui, M.M.P., Tan, C.J., Ng, K.Y., Guo, F.W., Wang, L.H., Chen, T.H., Fan, T.Y., Lam, P.K.S., Murphy, M.B., 2019b. Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two life stages of two coral species. Sci. Total Environ. 651, 2391–2399.
- Huang, X., Li, Y., Wang, T., Liu, H., Shi, J., Zhang, X., 2020. Evaluation of the oxidative stress status in zebrafish (*Danio rerio*) liver induced by three typical organic UV filters (BP-4, PABA and PBSA). Int. J. Environ. Res. Public Health 17, 651.
- Iheanacho, S.C., Odo, G.E., 2020. Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 232, 108741.
- Inui, M., 2003. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). Toxicology 194, 43–50.
- Jang, G.H., Park, C.B., Kang, B.J., Kim, Y.J., Lee, K.H., 2016. Sequential assessment via daphnia and zebrafish for systematic toxicity screening of heterogeneous substances. Environ. Pollut. 216, 292–303.
- Kopp, R., Palíková, M., Papežiková, I., Mareš, J., Navrátil, S., Pikula, J., Pohanka, M., 2018. Oxidative stress response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to multiple stressors. Acta Vet. Brno 87, 55–64.
- Kunz, P.Y., Fent, K., 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. Toxicol. Appl. Pharmacol. 217, 86–99.
- Langford, K.H., Reid, M.J., Fjeld, E., Øxnevad, S., Thomas, K.V., 2015. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. Environ. Int. 80, 1–7.
- Lee, I., Lee, J., Jung, D., Kim, S., Choi, K., 2019. Two-generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. Chemosphere 228, 478–484.
- Li, N., Ho, W., Wu, R.S.S., Tsang, E.P.K., Ying, G.-G., Deng, W.J., 2019. Ultra violet filters in the urine of preschool children and drinking water. Environ. Int. 133, 105246.
- Ma, B., Lu, G., Liu, J., Yan, Z., Yang, H., Pan, T., 2017. Bioconcentration and multi-biomarkers of organic UV filters (BM-DBM and OD-PABA) in crucian carp. Ecotoxicol. Environ. Saf. 141, 178–187.
- Mitchellmore, C.L., He, K., Gonsior, M., Hain, E., Heyes, A., Clark, C., Younger, R., Schmitt-Kopplin, P., Feerick, A., Conway, A., Blaney, L., 2019. Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. Sci. Total Environ. 670, 398–410.
- Mizukawa, A., Molins-Delgado, D., de Azevedo, J.C.R., Fernandes, C.V.S., Díaz-Cruz, S., Barceló, D., 2017. Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguazu watershed, Curitiba (Brazil). Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 18284–18294.
- Modra, H., Sisperova, E., Blahova, J., Enevoval, V., Fictum, P., Franc, A., Mares, J., Svobodova, Z., 2018. Elevated concentrations of T-2 toxin cause oxidative stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Nutr. 24, 842–849.
- Molins-Delgado, D., del M. Olmo-Campos, M., Valeta-Juan, G., Pleguezuelos-Hernández, V., Barceló, D., Díaz-Cruz, M.S., 2018a. Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation. Environ. Res. 161, 532–539.
- Molins-Delgado, D., Muñoz, R., Nogueira, S., Alonso, M.B., Torres, J.P., Malm, O., Zioli, R.L., Hauser-Davis, R.A., Eljarrat, E., Barceló, D., Díaz-Cruz, M.S., 2018b. Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. Sci. Total Environ. 618, 451–459.
- Muona, M., Soivio, A., 1992. Changes in plasma lysozyme and blood leucocytes levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation. Aquaculture 106, 75–87.
- Nakano, T., Kameda, M., Shoji, Y., Hayashi, S., Yamaguchi, T., Sato, M., 2014. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. Redox Biol. 2, 772–776.
- Nataraj, B., Maharajan, K., Hemalatha, D., Rangasamy, B., Arul, N., Ramesh, M., 2020. Comparative toxicity of UV-filter Octyl methoxycinnamate and its photoproducts on zebrafish development. Sci. Total Environ. 718, 134546.
- O'Malley, E., O'Brien, J.W., Tscharke, B., Thomas, K.V., Mueller, J.F., 2019. Per capita loads of organic UV filters in Australian wastewater influent. Sci. Total Environ. 662, 134–140.
- Pico, Y., Belenguer, V., Corcellas, C., Diaz-Cruz, M.S., Eljarrat, E., Farré, M., Gago-Ferrero, P., Huerta, B., Navarro-Ortega, A., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, L., Santín, G., Barceló, D., 2019. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. Sci. Total Environ. 659, 1186–1198.
- Quintaneiro, C., Teixeira, B., Benedé, J.L., Chisvert, A., Soares, A.M.V.M., Monteiro, M.S., 2019. Toxicity effects of the organic UV-filter 4-methylbenzylidene camphor in zebrafish embryos. Chemosphere 218, 273–281.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76–85.
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2019. Monitoring of the 17 EU watch list contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. Sci. Total Environ. 649, 1083–1095.
- Svačinová, P., Vraníková, B., Dominik, M., Elbl, J., Pavloková, S., Kubalák, R., Kopecká, P., Franc, A., 2019. Comprehensive study of co-processed excipients F-melts®: flow, viscoelastic and compacts properties. Powder Technol. 355, 675–687.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Methods of Haematological Examination in Fish (in Czech). Vodňany. Jihočeská univerzita 978-80-87437-62-9.
- Tsui, M.M.P., Lam, J.C.W., Ng, T.Y., Ang, P.O., Murphy, M.B., Lam, P.K.S., 2017. Occurrence, distribution, and fate of organic UV filters in coral communities. Environ. Sci. Technol. 51 (8), 4182–4190.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Hodkovicova, N., Vecerkova, L., Blahova, J., Franc, A., Marsalek, P., Mares, J., Tichy, F., Svobodova, Z., Faggio, C., 2020. The effect of foodborne sertraline on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sci. Total Environ. 708, 135082.
- Yang, S., Wu, H., He, K., Yan, T., Zhou, J., Zhao, L.L., Sun, J.L., Lian, W.Q., Zhang, D.M., Du, Z.J., Luo, W., He, Z., Ye, X., Li, S.J., 2019. Response of AMP-activated protein kinase and lactate metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under acute hypoxic stress. Sci. Total Environ. 666, 1071–1079.
- Yang, C., Lim, W., Song, G., 2020. Review: mediation of oxidative stress toxicity induced by Pyrethroid pesticides in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 234, 108758.
- Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Bao, X., Zhang, P., Jiang, R., 2019a. Bioaccumulation and biochemical effects of ethylhexyl methoxy cinnamate and its main transformation products in zebrafish. Aquat. Toxicol. 214, 105241.
- Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Jiang, R., Shen, J., Bao, X., 2019b. Parental transfer of ethylhexyl methoxy cinnamate and induced biochemical responses in zebrafish. Aquat. Toxicol. 206, 24–32.



## Octinoxate as a potential thyroid hormone disruptor – A combination of in vivo and in vitro data



Jana Cahova<sup>a</sup>, Jana Blahova<sup>a,\*</sup>, Jan Mares<sup>b</sup>, Nikola Hodkovicova<sup>c</sup>, Pavel Sauer<sup>d</sup>, Hana Kocour Kroupova<sup>d</sup>, Zdenka Svobodova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno, Czech Republic

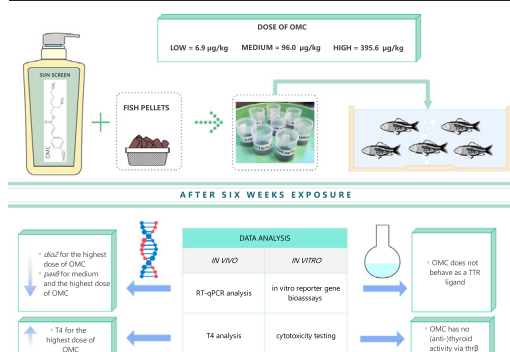
<sup>c</sup> Department of Infectious Diseases and Preventive Medicine, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Vodňany, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- Subchronic OMC exposure increased T4 plasma level.
- Subchronic OMC exposure disrupted transcription of several thyroid-hormone regulating genes.
- OMC did not elicit (anti-)thyroid activity via *thrβ* and does not behave as a transthyretin (TTR) ligand.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Fish  
Gene expression  
*Oncorhynchus mykiss*  
Thyroxine  
UV filter

### ABSTRACT

Ultraviolet filters are commonly used in various cosmetic products. Due to their huge consumption ultraviolet filters become a part of the environment. Octinoxate is a commonly used ultraviolet filter that is widely detected in the aquatic environment. In our study, we investigated whether this ultraviolet filter is able to disrupt thyroid hormone regulation after six weeks of exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thyroid hormones play crucial role in development and regulation of the organism and its disruption could cause the whole-body imbalance. Our study includes a compilation of in vivo and in vitro tests. The results of the in vivo experiment revealed a significant increase in thyroxine hormone in plasma for the highest tested dose of octinoxate (i.e. 395.6 µg/kg). We examined selected tissues (liver and cranial kidney) to determine the mRNA expression of genes involved in thyroid hormones regulation. The analysis confirmed downregulation of deiodinase 2 mRNA expression for the highest tested dose (i.e. 395.6 µg/kg) and downregulation of paired box 8 mRNA for medium (96 µg/kg) and the highest octinoxate dose (395.6 µg/kg.) only in cranial kidney. In vitro analysis indicated that octinoxate does not elicit (anti-)thyroid activity via *thrβ* and does not behave as a transthyretin ligand. Based on our results, octinoxate has a potential to act as a thyroid hormone disruptor, but further research required to better understand the entire regulatory mechanism.

**Abbreviations:** 3,5DCI2HAcP, 3,5-dichloro-2-hydroxyacetophenone; 60s, 60s ribosomal protein; 4-MBC, 4-methylbenzylidene camphor; BP-3, benzophenone-3; cDNA, complementary DNA; *dio2*, iodothyronine 5'-deiodinase; d.w., dry weight; GOL, gene of interest; HPT axis, hypothalamic–pituitary–thyroid axis; mRNA, messenger RNA; PAX8a, paired box gene 8a; PCR, polymerase chain reaction; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction; SEM, standard error of mean; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; *thra*, thyroid hormone receptor  $\alpha$ ; *thrβ*, thyroid hormone receptor  $\beta$ ; TRH, thyrotropin-releasing hormone; TTR, transthyretin; UV, ultraviolet; UVs, UV filters.

\* Corresponding author at: Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences, Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic.

E-mail address: [blahovaj@vfu.cz](mailto:blahovaj@vfu.cz) (J. Blahova).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159074>

Received 1 August 2022; Received in revised form 19 September 2022; Accepted 23 September 2022

Available online 29 September 2022

0048-9697/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Octinoxate, also known as an ethylhexyl methoxycinnamate, is one of the most commonly used organic ultraviolet (UV) filter in sunscreens. Basic physico-chemical properties of this substance are listed in Table 1. Octinoxate as a UVB blocker is one of 28 proven UV filters (UVs) listed in Annex VI to the EU Cosmetic Products Regulation (EC) No, 1223/2009. This compound could be used in cosmetic products in the European Union at a maximum permissible concentration of 10 % (Gilbert et al., 2013) and in the USA at a maximum concentration of 7.5 % (Janjua et al., 2008). This lipophilic compound to be absorbed through the skin and enter the circulation without being metabolized by the liver. On the other hand, compared to other UVs (e.g. benzophenone-3 – BP-3), it shows lower dermal penetration and systematic absorption. Thus, octinoxate could be considered a safer UV blocker (Suh et al., 2020).

In general, UVs are used in many personal care products (e.g. sunscreens, lotions, shampoos, decorative cosmetics, etc.). They are present in the environment due to their huge consumption (Mitchellmore et al., 2019). They become part of the aquatic environment in two different ways – (a) directly by the washing off from the skin, especially during recreational activities or (b) indirectly via the insufficient elimination in wastewater plants. Many of UVs are lipophilic substances, so they tend to persist in the environment. UVs are reported worldwide in various compartments of the environment (Fent et al., 2010; Kameda et al., 2011a, 2011b; Langford et al., 2015; Mizukawa et al., 2017; Apel et al., 2018). If we focused solely on octinoxate, this substance was detected in wastewater in Greece at concentration of 4.1 ng/l (Giokas et al., 2004) and in China in waste water reclamation plant at concentrations of 54–116 ng/l in influent (Li et al., 2007). Ekpeghere et al. (2016) detected octinoxate at the level of 120–849 ng/l in treated waste water in Korea. In the river water in China octinoxate was detected at concentration of 2.2 to 9.9 ng/l (Wu et al., 2019), up to 56 ng/l in the sea water and 79 ng/l in the surface water (Tsui et al., 2019). In Japan, octinoxate was detected in the surface water at concentration of 125–1040 ng/l (Kameda et al., 2011a, 2011b). Fent et al. (2010) detected octinoxate in the river water in Switzerland at concentration of 6 ng/l, while Negreira et al. (2010) found this UV in the river water in Spain at concentration of 813 ng/l. Moreover, the presence of octinoxate was revealed in the tap water at a concentration of 126 ng/l (Román et al., 2011). UVs were also detected in another type of abiotic matrices, i.e. sediments. In Lebanon, river sediments contained octinoxate at a concentration of 35.8 ng/g dry weight (d.w.) (Amine et al., 2012). Octinoxate was found at concentrations of 2.2–9.6 ng/g d.w. in river sediments in Japan (Kameda et al., 2011a, 2011b). Due to lipophilic properties of octinoxate, we can also detect this UV in biota, especially in fish, often in tens of ng/g d.w. (Gago-Ferrero et al., 2015; Langford et al., 2015; Peng et al., 2015). Pico et al. (2019) revealed octinoxate at a concentration of 242 ng/g d.w. in fish from four Spain Mediterranean river basins. Moreover, octinoxate is known for its food-chain accumulation in biota. Fent et al. (2010) revealed octinoxate at concentrations of between 22 and 150 ng/g lipids in mussels (*Dreissena polymorpha*), at a concentration of 337 ng/g lipids in barb (*Barbus barbus*)

and in the range of 16 to 701 ng/g lipids in cormorants (*Phalacrocorax* sp.). Thus, the data suggest food-chain accumulation. Octinoxate was one of the predominant UVs detected in marine matrices, i.e. sediment and seawater and also in biota in South Korea (Wang et al., 2022).

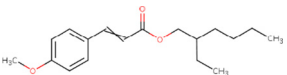
Toxicological risk or adverse health effects on humans have not been confirmed yet (Lorigo et al., 2018; Suh et al., 2020). However, there are some studies investigating the negative effects of UVs on animals. In our previous study (Cahova et al., 2021b), toxic effects of octinoxate on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were observed, including impaired antioxidant defence, changes in white blood cell counts, adverse effects on various metabolic pathways, and even histopathological changes, especially in liver cells. The ability of UVs to disrupt the hormonal system is also a current topic (Ghazipura et al., 2017; Zhou et al., 2019). Moreover, octinoxate is considered as an endocrine disruptor and listed in “The Watch List” of contaminants of emerging concern (CECs). “The Watch List” was published as part of the Directive 39/2013/EU in Decision 2015/495/EU (2013) to monitor selected substances all over the EU and gather data to help secure preventive measures if needed.

Toxicological studies in various organisms have confirmed (anti-)estrogenic or (anti-)androgenic effects after UVs exposure. The commonly used UVs, such as BP-3, 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), homosalate and octinoxate, showed a significant dose-dependent estrogenic activity in vitro with MCF-7 breast cancer cell, and also after oral administration of 4-MBC, octinoxate and BP-3 mixture, the estrogenic effect was demonstrated by an increase in uterine weight gain in juvenile rats (Schlumpf et al., 2001). Octinoxate and its main metabolic product 3,5-dichloro-2-hydroxyacetophenone (3,5DCI2HAcP) were tested for estrogenic and androgenic effects in four-month-old zebrafish (*Danio rerio*) after 21-days exposure in water. Octinoxate tested separately caused a decrease in estradiol concentration and increased testosterone level. These data indicate that octinoxate can produce anti-estrogenic and androgenic effects. 3,5DCI2HAcP caused a complex androgenic and estrogenic effect. The results in the group exposed to octinoxate and 3,5DCI2HAcP in mixture showed that 3,5DCI2HAcP might weaken the estrogenic effect and stimulate the androgenic effect of octinoxate (Zhou et al., 2019). The exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to octinoxate (37.5 µg/l; 244.5 µg/l; 394 µg/l) led to changes in the mRNA expression of genes involved in hormonal pathways (androgen receptor, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase) and an increase of vitellogenin plasma concentration in males. Histological changes in gonads (i.e. reduced number of primary oocytes, decrease in spermatocytes) also pointed to the estrogenic and the antiandrogenic activities (Christen et al., 2011). Concentration of plasma vitellogenin increased after octinoxate exposure in male medaka (*Oryzias latipes*). This exposure also caused increasing mRNA expression levels of vitellogenin and choriogenin subtypes, complemented by increasing mRNA expression of sex hormone receptors and estrogen receptor α. These results suggest the estrogenic effect of octinoxate (Inui, 2003).

Thyroid hormones play a crucial role in regulating childbirth, stimulation and development of various tissues during the growth and, last but not least, regulate the metabolism of the whole body (Ferraris et al., 2020). Thyroid hormones are also able to activate responses in various immune cells (e.g. monocytes, macrophages, natural killer cells, and lymphocytes), and affect several inflammation-related processes (chemotaxis, phagocytosis, reactive oxygen species generation, cytokines production). These interactions are related to pathological conditions, including sepsis, inflammation, autoimmune diseases, and viral infections (Jara et al., 2017). Thus, chemicals that are able to disrupt the normal function of the thyroid gland could adversely affect the development, immune system and metabolism of the whole body.

Ferraris et al. (2020) pointed out the role of thyroid hormones in the mouse immune system and subsequent thyroid dysregulation after octinoxate administration to female mice during the lactational period. Thyroxine (T4) concentration in mouse pup blood was decreased after indirect exposure to octinoxate (1000 mg/kg/day), this effect was associated with delayed eye-opening and weight gain. Moreover, the number of lymphocytes increased in the spleen after octinoxate exposure. Axelstad et al. (2011) reported

**Table 1**  
Physico-chemical properties of the octinoxate.

Trivial names	Ethylhexyl methoxycinnamate, octyl methoxycinnamate, octinoxate
Acronyms	EHMC, OMC
Molar mass (g/mol)	290.403
Molecular formula	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>
CAS number	5466-77-3
log Kow <sup>a</sup>	5.8
Water solubility (mg/l) <sup>a</sup>	0.16
Structure <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> USEPA (2010).

<sup>b</sup> USEPA (2020).

changes in thyroid hormone levels (reduction of T4 in plasma) after octinoxate exposure which could be related to reproductive and neurological development of rat offspring. In males, a reduction in sperm count and a dose-dependent reduction in testosterone levels in 8-month-old males were observed. Lower motor activity was observed in offspring of exposed females. Klammer et al. (2007) investigated the effect of octinoxate in rats. They focused on thyroid hormone regulation within the hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis related to the reproductive system. Ovariectomised rats were treated with octinoxate or 17 $\beta$ -estradiol. While estradiol treatment did not change any of the tested thyroid hormones, in the octinoxate exposure group, the levels of serum thyroid hormones decreased and the activity of T3-responsive hepatic type I-5-deiodinase was reduced. These results point to non-estrogenic interference of octinoxate within the rodent HPT axis.

In experiment on adult zebrafish, plasma triiodothyronine (T3) was significantly reduced after 21 days of octinoxate exposure. In addition, mRNA expression of genes related to thyroid hormone regulation were downregulated in the brain, thyroid and liver tissues (Chu et al., 2021). Lee et al. (2019) observed a decrease in the blood levels of thyroid hormones (T3, T4) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after a 5-months-long octinoxate exposure in water. Based on these results, octinoxate could be considered as a UV filter with multiple hormonal activities. Nevertheless, octinoxate and its hormonal effects still need to be studied to better understand the mechanism of its action on the organism.

Recent studies pointing to the importance of the interaction between heterogeneous mixtures of substances and the aquatic organisms. These chemicals could have an additional toxic effect when interacting with each other, and consequently these mixtures could be more dangerous to non-target organisms (Spurgeon et al., 2010; Jang et al., 2016; Park et al., 2017; Cahova et al., 2021a). Li et al., 2018 study impact of UVs mixture to embryo development and their impact on the next generation. The development of zebrafish embryos was effected after 47 days of exposure to the mixture of UVs (BP-3, octinoxate, octocrylene); embryo mortality increased and the hatching rate decreased in the F1 generation. This effect was not observed in the parental experimental group; nevertheless, negative effect was reported in the next generation even in the environmentally relevant concentration.

To our knowledge, very few articles have been published on the effects of octinoxate on fish HPT axis. There are a number of ecotoxicological studies in the scientific literature to monitor endocrine disruption in fish, but most are focused to the issue of sex hormones. Due to the huge presence of this UV filter in the aquatic environment, we believe that it is necessary to raise awareness of its impact on the fish hormonal system. The aim of this study was to investigate the thyroid hormone disrupting properties after dietary exposure to octinoxate. We examined plasma thyroid hormones in combination with the analysis of gene expression related to thyroid hormone regulation in the cranial kidney and liver. This study is supplemented by *in vitro* analysis to identify three specific modes of action of octinoxate on endpoints crucially affecting HPT axis-mediated signalling. They particularly involve thyroid agonistic and antagonistic activities and its potential to compete with T4 for binding to transport protein transthyretin (TTR). The results of this study will expand knowledge about the toxicological potential of octinoxate and obtain more comprehensive information about the effect of octinoxate on the regulation of thyroid hormones.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *In vivo* toxicity test

#### 2.1.1. Design of the experiment

Toxicity test was conducted on female rainbow trout (*O. mykiss*) in a semistatic system for six weeks. The experiment was approved by the institutional ethical committee and carried out in compliance with the national legislation – Act No. 246/1992 Coll., on the Protection of Animals against Cruelty and Decree No. 419/2012 Coll., on the Protection, Breeding and Use of Experimental Animals. A total number of 80 fish was obtained from Mendel University in Brno (Czech Republic). The fish were randomly distributed into eight aquaria (10 fish in each aquarium) with a total

volume 200 l. The aquaria were filled with dechlorinated water. At first, the acclimatization occurred over a period of two weeks and the fish were fed with pellets with no octinoxate content. After the acclimatization fish were randomly allocated into three experimental groups ( $n = 20$  in each group) – with low (6.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), medium (96.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or high (395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) dose of octinoxate and one control group without octinoxate. The lowest dose represented an environmental concentration and its multiples should reflect the effect of increasing dose. Octinoxate (CAS number – 5466-77-3, 98 %, Merck, Germany) was incorporated into fish pellets to simulate dietary exposure. The methodology of fish pellet preparation and verification of the content of the active substance in the feed are described in our previous paper (Cahova et al., 2021b).

At the beginning of the experiment, all fish were weighed to determine the feed dose. After two weeks, fish were weighed to consider the weight gain and regulate the feed dose, weighing was repeated every two weeks. Fish were fed twice a day, and the daily feeding rate was determined as 2 % of the actual fish weight. The amount consumed was checked and recorded. The daily photoperiod consisted of 12 h of light and 12 h of darkness. Aquarium water quality was checked daily in 12-h intervals (concentration of nitrite nitrogen: 0.2 mg/l, ammonia nitrogen: 1.3–1.4 mg/l; chlorides: 115.5–116.5 mg/l; oxygen: 93.1–94.1 %; pH: 8.0–8.1; temperature: 16.1–16.2 °C) and the most part of the water was changed at the same time.

After six weeks of exposure, peripheral blood of each individual fish was taken from the tail vessel. Whole heparinized blood samples were centrifuged (800  $\times$  g, 10 min, 4 °C) for obtaining plasma. Plasma samples were stored for analysis of thyroid hormone at –80 °C. The fish were sacrificed by stunning with the blow to the back of the head, immediately followed by spinal cord transection to minimize the stress. Further, selected tissues (cranial kidney and liver) were sampled for further reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). After sampling, tissues were immediately fixed in RNA later (Thermo Fisher Scientific, Czech Republic), left for one day at 4 °C and then stored at –80 °C.

#### 2.1.2. Analysis of thyroid hormones in plasma

Plasma thyroid hormones (T3, T4) were analysed using commercial competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kits according to the manufacturer's instructions (MyBioSource, USA, MBS2000107 for T4 and MBS1601698 for T3). For each microplate desk, five-point calibration curves for T4 or T3 were prepared at concentrations from 3.7 to 300 ng/ml and from 2 to 32 ng/ml, respectively. The plates have been pre-coated with specific antibodies. Thyroid hormones present in plasma samples were added and bound to antibodies coated on the wells. Next, biotinylated antibody was added and bound to hormone in the sample. Then streptavidin-horseradish peroxidase was added to each well and bound to the biotinylated antibody. After incubation unbound streptavidin-horseradish peroxidase was washed away, substrate solution was added and optical density at 450 nm was read using a Varioskan Flash Reader (Thermo Fisher Scientific, USA). The concentrations of T3 and T4 were expressed as ng/ml.

#### 2.1.3. RT-qPCR analysis

Samples of the cranial kidney and liver in each tested group were individually homogenised on the MagNaLyser (Roche, Germany) in TRI Reagent RT (Molecular Research Center, USA). The total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations, purity and total amounts were verified spectrophotometrically using the 260/280 and 230/280 ratios quantified with DeNovix DS-11 FX (Lab Mark Ltd., Czech Republic); purity of all samples was kept between 1.8 and 2. The messenger RNA was reversely transcribed to complementary RNA using the LunaScript RT SuperMix Kit (New England BioLabs Inc., USA) according to manufacturer's instructions. The reverse transcription, dilution of samples, qPCR and gene expression analysis were performed as described in detail by Hodkovicova et al. (2021). The normalised expression of the target genes is presented as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) relative to the control.

Sequences for primers of iodothyronine deiodinase 2 (*dio2*), paired box protein pax-8-like (*pax8a*) (only in kidney), thyroid hormone receptor

alpha (*thra*) and thyroid hormone receptor beta (*thrβ*) were designed using the NCBI primer-blast design tool available online at <https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. The expression of these genes was analysed using the 60S ribosomal protein (60s) as a reference gene for normalisation of data. The specific primer data are given in Table 2.

## 2.2. In vitro toxicity test

### 2.2.1. Chemicals and material

Octinoxate (98 % pure), triiodothyronine (T3; ≥ 95 % pure, CAS number – 6893-02-3), thyroxine (T4; ≥ 98 % pure, CAS number – 51-48-9), transthyretin (TTR, ≥ 95 % pure, CAS number – 87090-18-4), tetrabromobisphenol A (≥ 97 % pure, CAS number –

79–94-7), acetic acid (≥ 99.8 % pure, CAS number – 64-19-7), and in vitro toxicology assay kit (for resazurin reduction assay) were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic). Pierce™ BCA Protein Assay Kit was purchased from Fischer Scientific (Czech Republic). TRβ-CALUX cells, deoxyvalenol calibration standard prepared in dimethyl sulfoxide, illuminate mix, and lysis mix were obtained from BioDetection Systems (the Netherlands). Stock solution for in vitro bioassays was prepared in dimethyl sulfoxide at a concentration of  $1 \times 10^{-3}$  μmol/l and stored at – 20 °C. It was further serially diluted to construct a concentration row. The working solutions of octinoxate tested in in vitro bioassays were in the range of  $1 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-3}$  μmol/l.

### 2.2.2. In vitro reporter gene bioassays and cytotoxicity testing

To determine thyroid agonistic and antagonistic activities of octinoxate through *thrβ*, we carried out in vitro TRβ-CALUX and anti-TRβ-CALUX reporter gene assays, respectively. The (anti-) TRβ-CALUX assays are based on transgenic U2-OS cells which specifically respond to TRβ ligands. Furthermore, we investigated whether octinoxate can compete with natural thyroid hormone T4 for binding to transport protein TTR, using the TTR-TRβ-CALUX assay. All assays were performed according to the manufacturer's (BioDetection Systems, the Netherlands) instructions and as described elsewhere (Collet et al., 2020; Sonneveld et al., 2005).

Briefly, growth medium used for cell culture contained the pH indicator phenol red, while phenol red-free assay medium was used for testing and did not contain dextran-coated charcoal-stripped fetal calf serum (DCC FCS). The medium used for antagonism testing contained the additional reference agonist T3 to reach its EC<sub>50</sub> ( $7.9 \times 10^{-10}$  μmol/l) in the wells of 96-well microtiter plates (Corning, the Netherlands) during exposure. Reference compounds for thyroid receptor agonism, antagonism, and binding to TTR were T3, deoxyvalenol, and tetrabromobisphenol A, respectively. Full calibration row of each respective reference compound was included in each experiment. After the exposure, the cells were lysed and the luciferase activity was measured with a luminometer equipped with injectors (M200 Infinite Plus, Tecan, Switzerland) after reaction of illuminate mix (containing D-luciferin) with firefly's (*Photinus pyralis*) luciferase expressed by the cells. More detail information is listed in supplementary material Chapter S1.

**Table 2**

List of target genes and their accession numbers, primer sequences, melting temperatures (T<sub>m</sub>) and product sizes in base pair (bp).

Gene name Accession no.	Primer	F/R	Sequence (5'–3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size (bp)
60S ribosomal protein NM_001165047.2	60s	F R	AGCCACCAAGTATGCTAACCACT TGTGATTGCACATTGACAAAAA	62.67 62.43	147
Iodothyronine deiodinase 2 NM_001124268.1	dio2	F R	GTCCCTCAGTCTGCCATCTCAGT CTCCAAGGTAGGCGATCTTCTC	61.94 62.11	128
Paired box protein Pax-8-like XM_021602384.1	pax8a	F R	CATTCCCCCATGCCTTCAACTC GCTAACCATGTCCCTTCTGCTA	62.00 62.02	96
Thyroid hormone receptor α AF302245	thra	F R	TGGGAGCTGATCCGCATG CCTGTCTCCGTCGCAC	61.97 62.01	136
Thyroid hormone receptor β AF302246	thrβ	F R	TGGGAGCTGATCCGCATG GCTCCCTCAGGTGCATTTATG	61.89 61.93	160
XM_021599796.1		R	TCTTGCCATAATAGCAGCCTGGA	61.78	

The cells were routinely visually inspected under a microscope for signs of cytotoxicity. In order to reveal potential effect of the samples on cell viability, we performed the resazurin reduction assay according to O'Brien et al. (2000) and the results were evaluated as described in detail in Šauer et al. (2018). More detailed information is listed in the supplementary material Chapter S2.

## 2.3. Data analysis

### 2.3.1. Data analysis for in vivo test

The statistical software Unistat for Excel 6.5. (Unistat Ltd., England) was used for statistical evaluation. Firstly, all results of in vivo studies were examined for normal distribution by the Shapiro-Wilk test. The data with normal distribution were tested by one-way analysis of variance and the post hoc test Tukey-HSD. Data with not a condition of normality were evaluated by nonparametric multi-selective median test. Statistical significance was accepted at a level of  $p < 0.05$ . All results are reported as mean ± standard error of mean (SEM).

### 2.3.2. Data analysis for in vitro test

Data from the reporter gene bioassays were evaluated as according to the manufacturer's (BioDetection Systems, Amsterdam, the Netherlands) instructions and as described in detail by Sonneveld et al. (2005) and Šauer et al. (2021). In short, the luciferase signal in in vitro reporter gene bioassays has been quantified as relative light units and the background signal from solvent control was subtracted. The maximal induction produced by T3 (TRβ-CALUX assay) or EC<sub>50</sub> of T3 (anti-TRβ-CALUX assay) or EC<sub>50</sub> of T4 (TTR-TRβ-CALUX assay) has been set at 100 %. The relative light units were converted into the percentage of the maximal response (relative induction in the case of the tested compound). Then, the data points were fitted with non-linear robust regression with four parameters using Prism 7 program (GraphPad, USA). Octinoxate was considered as biologically active if at least its two non-cytotoxic consecutive dilutions displayed relative induction higher than 10 % in TRβ-CALUX assay or <80 % in anti-TRβ-CALUX and TTR-TRβ-CALUX assays.

## 3. Results

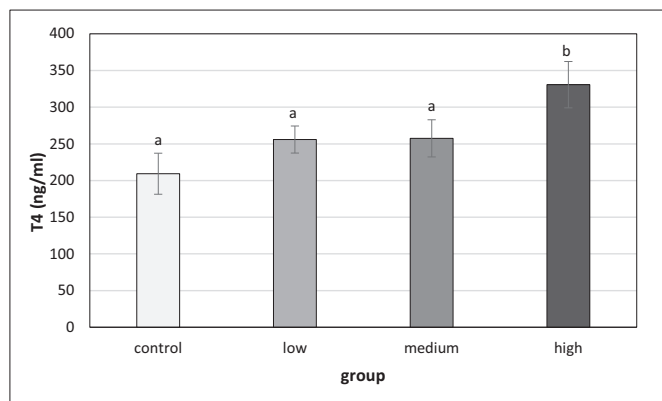
### 3.1. In vivo toxicity test

#### 3.1.1. Behaviour mortality and biometric indices

No alterations of behaviour, abnormal feed intake or mortality were observed during the exposure time. No significant differences were observed in body weight or liver weight, even in body length between the control and the experimental groups. More detailed morphological parameters are listed in our previous study (Cahova et al., 2021b).

#### 3.1.2. Analysis of plasma thyroid hormones

Results of T4 in plasma are presented in Fig. 1. They showed an increasing trend with the increasing dose of octinoxate. A statistically significant



**Fig. 1.** Thyroxine (T4) concentration in plasma of rainbow trout after six weeks exposure to octinoxate ( $n = 8$  in each group). Data is presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Significant differences among groups ( $p < 0.05$ ) are indicated by different alphabetic superscripts.

low – 6.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate, medium – 96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate, high – 395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate.

increase ( $p < 0.05$ ) compared to the control was reported only for the highest tested dose of octinoxate (i.e. 395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Plasma T3 concentration was below the limit of quantification (2 ng/ml) in all samples.

### 3.1.3. PCR analysis

The results for mRNA expression in cranial kidney are shown in Fig. 2. The mRNA expression of *dio2* gene was statistically significantly ( $p < 0.05$ ) downregulated in the tested group exposed to the highest

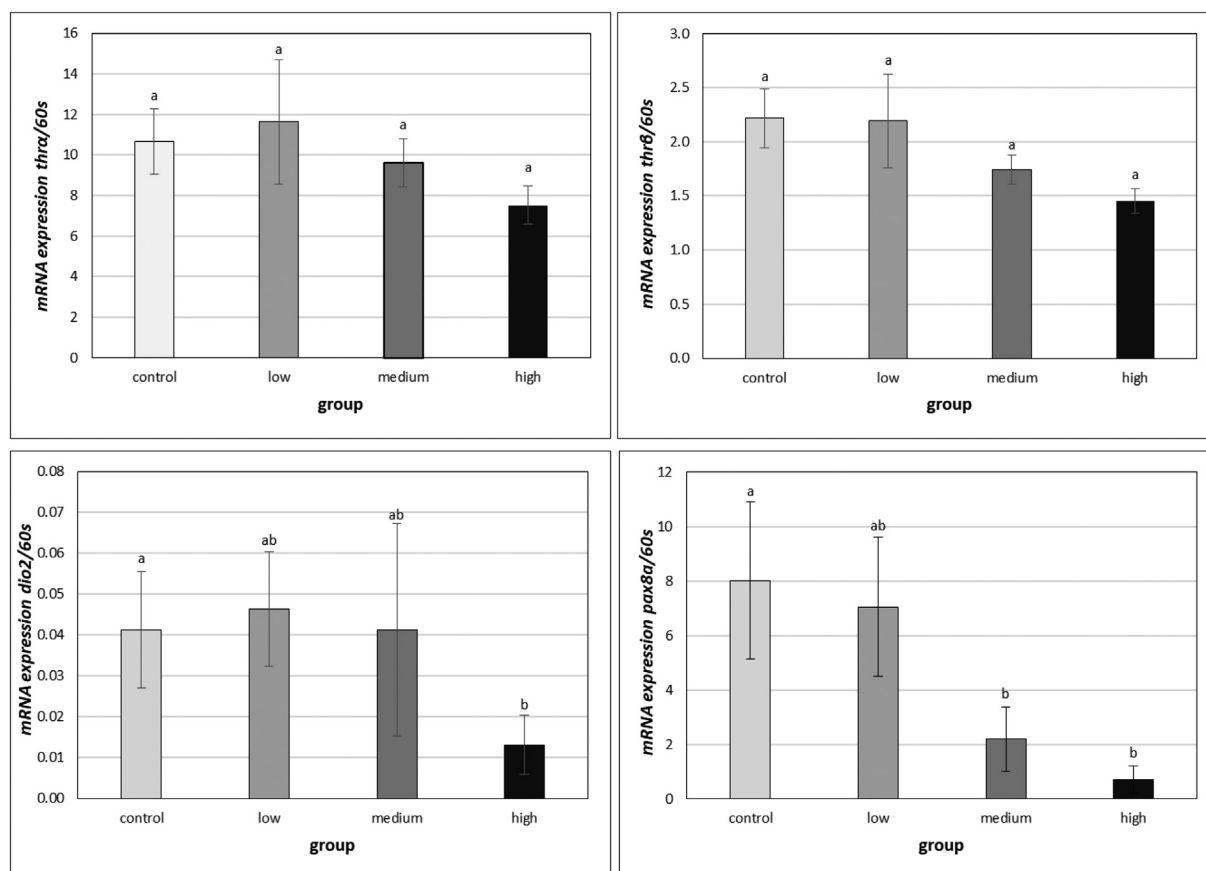
octinoxate dose (i.e. 395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The mRNA expression of *pax8a* was significantly ( $p < 0.05$ ) downregulated in the tested group with the medium (96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the highest octinoxate dose (i.e. 395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Otherwise, the mRNA expression of *thra* and *thr $\beta$*  was not altered in the cranial kidney. The results of mRNA expression in the liver are given in Fig. 3. This analysis did not reveal changes of *thra* and *thr $\beta$*  mRNA expression in any tested group.

### 3.2. In vitro bioassays

Results of the resazurin reduction assay showed no effect of the tested compound on cell viability in either agonistic (Fig. 4A) or antagonistic (Fig. 4B) assay media. In vitro reporter gene bioassays, each using the reference compounds (T3, deoxynivalenol, and tetrabromobisphenol A) produced a full concentration-response curve. The reference agonist T3 exhibited thyroid activity with  $\text{EC}_{50}$  of  $7.9 \times 10^{-10}$   $\mu\text{mol}/\text{l}$ . The reference antagonist, deoxynivalenol, had  $\text{IC}_{50}$  value as high as  $5.1 \times 10^{-7}$   $\mu\text{mol}/\text{l}$ . The reference compound for competing with T4 to bind to TTR, tetrabromobisphenol A, displayed  $\text{IC}_{50}$  of  $3.8 \times 10^{-8}$   $\mu\text{mol}/\text{l}$ . Neither thyroid agonistic (Fig. 5) and antagonistic (Fig. 6) activities were exhibited by the tested compound, nor was it a ligand of TTR (Fig. 7).

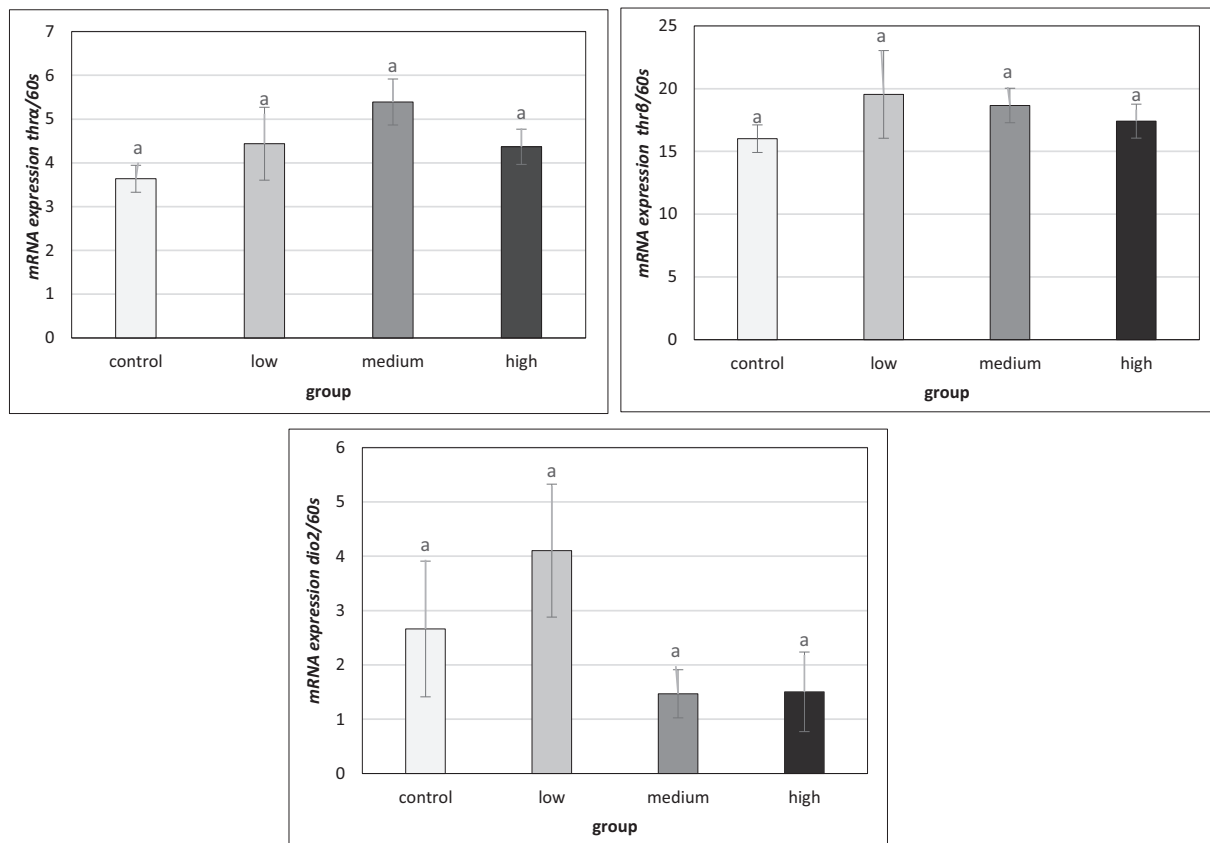
## 4. Discussion

Thyroid hormones play a crucial role in the whole metabolism of vertebrates. These hormones promote metamorphosis, development, reproduction, skin pigmentation and behaviour. Exposure to various pollutants has led to hormonal imbalances in the thyroid gland, which could impair the condition and survival of the fish (Nugegoda and Kibria, 2017). UVs as known pollutants are able to disturb the balance of thyroid hormones not



**Fig. 2.** Analysis of mRNA expression in rainbow trout cranial kidney after six weeks' exposure to octinoxate ( $n = 14$  in each group). Data is presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Significant differences among groups ( $p < 0.05$ ) are indicated by different alphabetic superscripts.

low – 6.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate, medium – 96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate, high – 395.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of octinoxate.

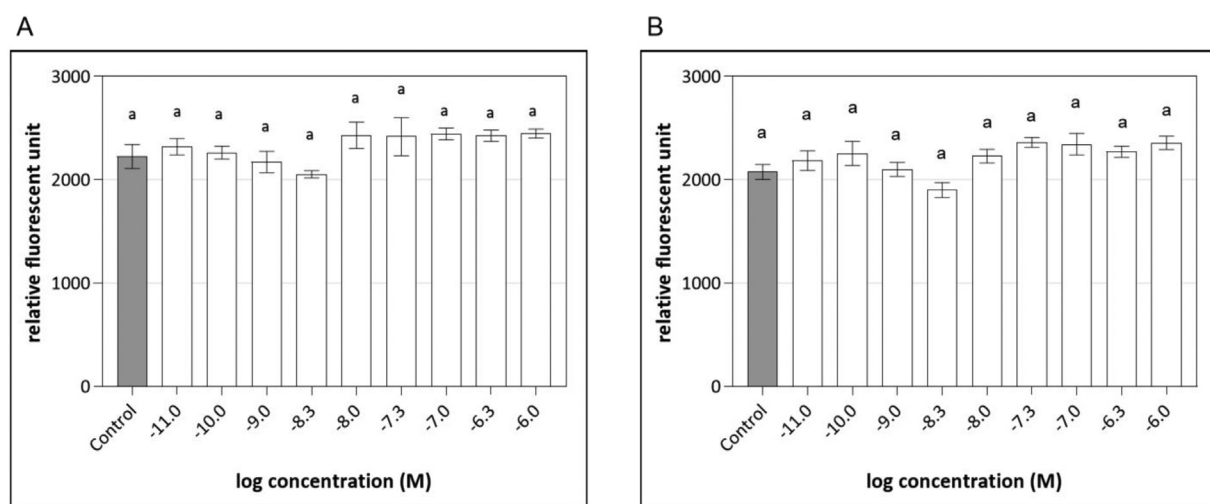


**Fig. 3.** Analysis of mRNA expression in rainbow trout liver after six weeks' exposure to octinoxate (n = 14 in each group). Data is presented as mean ± standard error of mean. No significant differences were found among groups ( $p > 0.05$ ). low – 6.9 µg/kg of octinoxate, medium – 96 µg/kg of octinoxate, high – 395.6 µg/kg of octinoxate.

only in mammals (Klammer et al., 2007; Axelstad et al., 2011; Ferraris et al., 2020) but also in fish (Lee et al., 2019; Chu et al., 2021). However, if we focus solely on aquatic animals, limited number of scientific publications have addressed the impact of octinoxate on fish thyroid function in more detail.

In the present study, octinoxate exposure increased T4 levels in plasma and disrupted transcription of several thyroid-hormone regulating genes in

rainbow trout after 6 weeks of octinoxate exposure. Several toxicological studies carried out in aquatic animals have described thyroid hormone changes after exposure to various pollutants. Our observations are comparable, e.g. to the study dealing with polybrominated diphenyl ethers, which are known pollutants of the environment. These chemicals have similar physico-chemical properties as UVs, meaning low solubility in water, adsorption on sediments and bioaccumulation (Khan et al., 2023).



**Fig. 4.** Results from testing cell viability after exposure to octinoxate in resazurin reduction assay. Assay medium (A) and assay medium used for antagonism testing (B). No statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between the tested sample and solvent control was found and is denoted with the letter (a). Values are expressed as means ± standard error of the mean from three independent experiments and each calibration point was measured in triplicate.

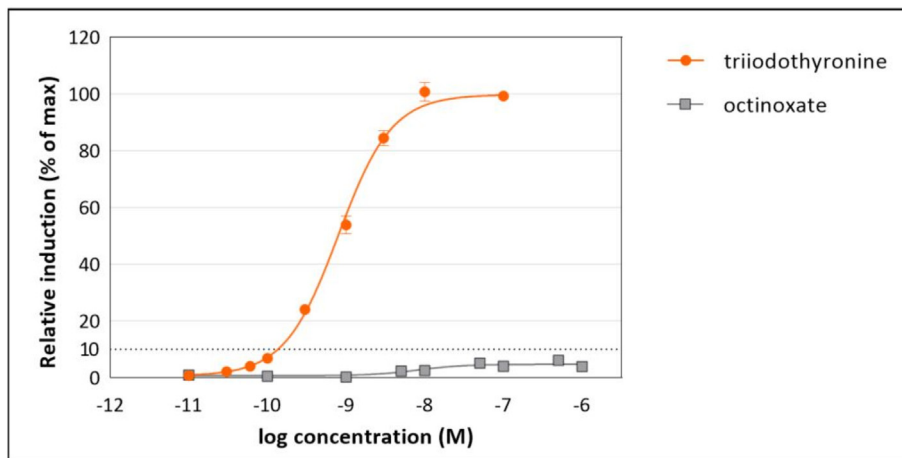


Fig. 5. Thyroid activity of triiodothyronine (reference compound) and octinoxate in TRβ-CALUX assay. Dotted line indicates 10 % induction caused by the reference compound. Values are expressed as mean ± standard error of the mean from three independent experiments and each calibration point was measured in triplicate.

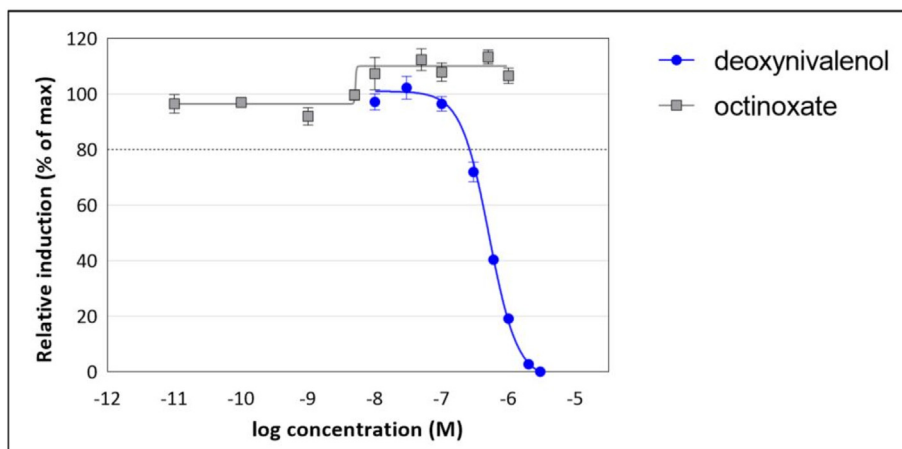


Fig. 6. Anti-thyroid activity of deoxynivalenol (reference compound) and octinoxate in anti-TRβ-CALUX assay. Dotted line indicates 20 % inhibition (antagonistic response) caused by the reference compound. The assay medium was spiked with non-saturating concentration of T3 ( $7.9 \times 10^{-10}$  μmol/l). Values are expressed as mean ± standard deviation from three independent experiments and each calibration point was measured in triplicate.

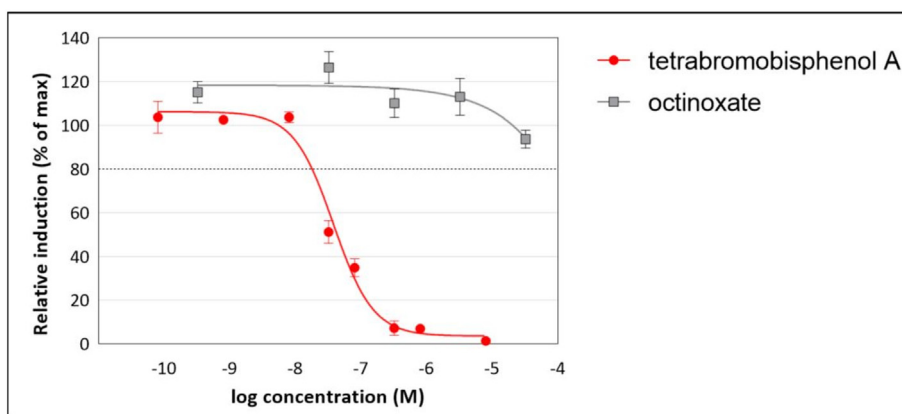


Fig. 7. Transthyretin transporter disrupting activity of tetrabromobisphenol A (reference compound) and octinoxate in TTR-TRβ-CALUX assay. Dotted line indicates 20 % decrease of the maximal signal caused by the reference compound. The assay medium was spiked with T4 to produce signal. Values are expressed as mean ± standard error of the mean from three independent experiments and each calibration point was measured in triplicate.

These substances could therefore have a similar effect on non-target organisms as UVs. Exposure to these chemicals increased T4 plasma concentration and caused altered mRNA expression of corticotropin-releasing hormone and thyrotropin  $\beta$ -subunit in zebrafish (Yu et al., 2011). In contrast, toxicological studies focusing on the effect of UV filters (especially on octinoxate) on other animal species reported a decrease in T4 plasma concentration. In mammals, i.e. rats, perinatal octinoxate exposure caused a significant decrease in T4 and negatively affected the reproductive and neurological development of the offspring (Axelstad et al., 2011). Similarly, a decrease in T4 levels and the impairment in neurodevelopmental parameters were observed in pup mice after administration of octinoxate to female mice during the lactation period (Klammer et al., 2007; Ferraris et al., 2020). In fish, Lee et al. (2019) reported a decrease of thyroid hormones (T3, T4) after a long-term octinoxate exposure in Japanese medaka. In contrast to that, in our experiment, T4 concentration increased significantly after the exposure to the highest dose tested. In addition, our RT-qPCR analysis revealed a downregulation of mRNA expression of *dio2*. We hypothesize that this downregulation could be related to higher plasma T4 concentrations. The enzyme deiodinase is responsible for the conversion of T4 to biologically active T3 in peripheral tissues and liver. In agreement with our findings, the increased plasma levels of T4 were also observed in *dio2* gene-knock out mice, which resulted in decreased *dio2* enzymatic activity (Schneider et al., 2001). The increased levels of T4 in plasma and downregulation of *dio2* mRNA expression of together suggest a reduced clearance of T4. The levels of T3 were measured only in plasma in this study but considering the elevated levels of T4 and the likely reduced *dio2* enzymatic activity, we may hypothesize that there was a reduced conversion of T4 into T3 in peripheral tissues. On the other hand, our experiment lasted 6 weeks, so we assume that the length of exposure and fish species are decisive factors.

In our experiments, we analysed mRNA expression of receptors *thra* and *thr $\beta$*  in the liver and cranial kidney. *Thra* and *thr $\beta$*  are two isoforms of thyroid receptors, the first-mentioned is more often expressed in immune cells, the second one in nonimmune cells. In our experiment, we did not observe any changes in the mRNA expression of these genes.

*Pax8a* plays a very important role in the formation of organs and tissues, including the thyroid gland, during embryonic development. It is also required for thyroid-stimulating hormone induced upregulation of the mRNA expression of crucial genes involved in the HPT axis, including *dio2* (Katagiri et al., 2014; Jang et al., 2020). In the present study, downregulation of *pax8a* in the kidneys at the medium and even at the highest octinoxate doses correlated well with the down-regulation of *dio2* in the same tissue. The results collectively indicate a disruption of the thyroid hormone balance in exposed fish.

In the present study, octinoxate did not elicit (anti-)thyroid activity via *thr $\beta$*  in in vitro bioassays (Figs. 5 and 6). Schmutzler et al. (2007) reported that octinoxate acts as a thyroid hormone receptor agonist. However, they expressed the results semi-quantitatively and the thyroid agonistic activity was observed at high  $\mu\text{mol/l}$  concentrations. The highest concentration of octinoxate that we tested in TR $\beta$ -CALUX assay was 1  $\mu\text{mol/l}$  and octinoxate slightly increased the signal. Nevertheless, the response of octinoxate did not exceed 10 % relative induction in two consecutive dilution points and, therefore, such a response has not been considered as thyroid agonistic activity. Given that the highest measured concentration of octinoxate in surface waters (1  $\mu\text{g/l}$ ; 3.4 nmol/l; Kameda et al., 2011a, 2011b) is far lower than the highest tested concentration in our study (290  $\mu\text{g/l}$ ; 1  $\mu\text{mol/l}$ ), we anticipate that activation of the nuclear receptor *thr $\beta$*  in the present in vivo experiment with rainbow trout was unlikely. In our opinion, this statement was confirmed by in vivo testing when mRNA expression of *thr $\beta$*  was not significantly increased in exposed fish compared to the control.

To the best of our knowledge, this in vitro study is the first to determine the potential of octinoxate to bind the TTR transporter. Octinoxate did not behave as a TTR ligand in our experiments. Therefore, interference of octinoxate with T4-TTR binding is also unlikely to be a mechanism by which HPT axis can be affected following exposure to octinoxate at environmental concentrations. Thus, an increase of T4 in plasma has likely no connection with a TTR

binding protein. It bears emphasizing that TTR (also known as prealbumin) is not the only transporter of thyroid hormones. The other major binding protein in fish is albumin (Dang et al., 2021). We hypothesize that further investigation of albumin levels after octinoxate exposure would help to understand the process of thyroid hormone regulation. In summary, the data from in vivo and in vitro analyses support the hypothesis of thyroid hormone disruption after octinoxate exposure in fish. However, the regulatory mechanism requires further investigation in order to better understand the full mode of action.

## 5. Conclusion

Octinoxate is a commonly used UV filter that protect the skin from the sunburn and prevents damage to the skin cells. Octinoxate is detected throughout the aquatic environment and can negatively affect aquatic animals. In last years, number of studies about effects of UVs in mixtures and as a single component has been increasing. However, the comprehensive information about effects of UVs as a significant micropollutant of aquatic environment are still not available. The necessity of deeper research is also proved by the fact of legislative restriction on some UVs. This study revealed the effect of octinoxate on thyroid hormone disruption in fish after six weeks of exposure. Plasma T4 levels were increased significantly only at the highest dose of octinoxate tested (i.e. 395.6  $\mu\text{g/kg}$ ). The mRNA expression of genes involved in regulation of thyroid hormones levels was also affected. Increased plasma T4 levels, which was probably caused by downregulation of mRNA expression of *pax8* together with *dio2*, suggest a reduced clearance of T4 and potentially diminished rate of T4 to T3 conversion in peripheral tissues. Based on these results, octinoxate could be considered a potential thyroid disrupting compound. The combination of in vitro and in vivo data revealed the part of the mechanisms by which HPT axis can be affected following exposure to octinoxate in fish. However, the mechanism by which octinoxate can affect thyroid hormone regulation appears to be more complex and requires further study. To the best of our knowledge, this study is unique in its type of field. Based on current toxicological trends, another interesting purpose of this study could be investigation of UVs mixtures and their effect on the hormonal system of fish to obtain more comprehensive information on the extent of hormonal influence.

## CRedit authorship contribution statement

**Jana Cahova** – writing - original draft preparation, test methodology, analysis of T3 and T4 in plasma.

**Jana Blahova** – test methodology, T3 and T4 analysis in plasma, statistical analysis, corresponding author, reviewing and editing of manuscript.

**Jan Mares** – test methodology, reviewing and final editing of manuscript.

**Nikola Hodkovicova** – RT-qPCR analysis.

**Pavel Sauer** – in vitro reporter gene bioassays, cytotoxicity testing.

**Hana Kocour Kroupova** – test methodology, reviewing and final editing of manuscript.

**Zdenka Svobodova** – supervisor, reviewing and final editing of manuscript.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgement

The study was financially supported by the grant ERD/ESF PROFISH [no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869], internal grant IGA 223/2021/FVHE of the University of Veterinary Sciences Brno (Czech Republic) and by the

Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic – the projects ‘CENAKVA’ (LM2018099 and the Czech Science Foundation [project No. 20-04676X]. We would like to thank Ing. Marie Šandová for technical support and Mrs. Ludmila Faldíková for language correction.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159074>.

## References

- Amine, H., Gomez, E., Halwani, J., Casellas, C., Fenet, H., 2012. UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (11), 2435–2442.
- Apel, C., Joeris, H., Ebinghaus, R., 2018. Environmental occurrence and hazard of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of European North and Baltic seas. *Chemosphere* 212, 254–261.
- Axelstad, M., Boberg, J., Hougaard, K.S., Christiansen, S., Jacobsen, P.R., Mandrup, K.R., Nellemann, C., Lund, S.P., Hass, U., 2011. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250 (3), 278–290.
- Cahova, J., Blahova, J., Marsalek, P., Doubkova, V., Franc, A., Garajova, M., Tichy, F., Mares, J., Svobodova, Z., 2021b. The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 774, 145570.
- Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z., Faggio, C., 2021a. Do single-component and mixtures selected organic UV filters induce embryotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*)? *Water* 13, 2203.
- Christen, V., Zucchi, S., Fent, K., 2011. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquat. Toxicol.* 102 (3–4), 167–176.
- Chu, S., Kwon, B.R., Lee, Y.M., Zoh, K.D., Choi, K., 2021. Effects of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) on thyroid hormones and genes associated with thyroid, neurotoxic, and nephrotoxic responses in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 263, 128176.
- Collet, B., Simon, E., van der Linden, S., El Abdellaoui, N., Naderman, M., Man, H.Y., Middelhof, I., van der Burg, B., Besselink, H., Brouwer, A., 2020. Evaluation of a panel of in vitro methods for assessing thyroid receptor  $\beta$  and transthyretin transporter disrupting activities. *Reprod. Toxicol.* 96, 432–444.
- Dang, Z., Arena, M., Kienzler, A., 2021. Fish toxicity testing for identification of thyroid disrupting chemicals. *Environ. Pollut.* 284, 117374.
- Directive 2013/39/EU, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union* 226, 1–17.
- Ekpeghere, K.I., Kim, U.J., Kim, H.Y., Oh, J.E., O, S.H., 2016. Distribution and seasonal occurrence of UV filters in rivers and wastewater treatment plants in Korea. *Sci. Total Environ.* 542, 121–128.
- Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* 158, 1817–1824.
- Ferraris, F.K., Garcia, E.B., Chaves, A.da S., Brito, T.M.de, Doro, L.H., Félix da Silva, N.M., Alves, A.S., Pádua, T.A., Henriques, M.das G.M.O., Cardoso Machado, T.S., Amendoeira, F.C., 2020. Exposure to the UV filter octyl methoxy cinnamate in the post-natal period induces thyroid dysregulation and perturbs the immune system of mice. *Front. Endocrinol.* 10, 943.
- Gago-Ferrero, P., Diaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2015. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Sci. Total Environ.* 518–519, 518–525.
- Ghazipura, M., McGowan, R., Arslan, A., Hossain, T., 2017. Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity: a systematic review of human and animal studies. *Reprod. Toxicol.* 73, 175–183.
- Gilbert, E., Pirot, F., Bertholle, V., Roussel, L., Falson, F., Padois, K., 2013. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 208–219.
- Giokas, D.L., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2004. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–photodiode array detection and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1026 (1–2), 289–293.
- Hodkovicova, N., Hollerova, A., Caloudova, H., Blahova, J., Franc, A., Garajova, M., Lenz, J., Tichy, F., Faldyna, M., Kulich, P., Mares, J., Machat, R., Enevova, V., Svobodova, Z., 2021. Do foodborne polyethylene microparticles affect the health of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *Sci. Total Environ.* 793, 148490.
- Inui, M., 2003. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* 194 (1–2), 43–50.
- Jang, G.H., Park, C.B., Kang, B.J., Kim, Y.J., Lee, K.H., 2016. Sequential assessment via daphnia and zebrafish for systematic toxicity screening of heterogeneous substances. *Environ. Pollut.* 216, 292–303.
- Jang, D., Marcus-Samuels, B., Morgan, S.J., Klubo-Gwiedzinska, J., Neumann, S., Gershengorn, M.C., 2020. Thyrotropin regulation of differentiated gene transcription in adult human thyrocytes in primary culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518, 111032.
- Janjua, N., Kongshoj, B., Andersson, A.M., Wulf, H., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22, 456–461.
- Jara, E.L., Muñoz-Durango, N., Llanos, C., Fardella, C., González, P.A., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., Riedel, C.A., 2017. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunol. Lett.* 184, 76–83.
- Kameda, Y., Kimura, K., Miyazaki, M., 2011. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environ. Pollut.* 159 (6), 1570–1576.
- Kameda, Y., Kimura, K., Miyazaki, M., 2011. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environ. Pollut.* 159, 1570–1576.
- Katagiri, N., Uemae, Y., Sakamoto, J., Hidaka, Y., Susa, T., Kato, Y., Kimura, S., Suzuki, M., 2014. Molecular cloning and functional characterization of two forms of Pax8 in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 198, 22–31.
- Khan, A.U.H., Naidu, R., Dharmarajan, R., Fang, C., Shon, H., Dong, Z., Liu, Y., 2023. The interaction mechanisms of co-existing polybrominated diphenyl ethers and engineered nanoparticles in environmental waters: a critical review. *J. Environ. Sci.* 124, 227–252.
- Klammer, H., Schlecht, C., Wuttke, W., Schmutzler, C., Gotthardt, I., Kohrle, J., Jarry, H., 2007. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. *Toxicology* 238 (2–3), 192–199.
- Langford, K.H., Reid, M.J., Fjeld, E., Øxnevad, S., Thomas, K.V., 2015. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environ. Int.* 80, 1–7.
- Lee, I., Lee, J., Jung, D., Kim, S., Choi, K., 2019. Two-generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. *Chemosphere* 228, 478–484.
- Li, W., Ma, Y., Guo, C., Hu, W., Liu, K., Wang, Y., Zhu, T., 2007. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. *Water Res.* 41, 3506–3512.
- Li, A.J., Law, J.C.F., Chow, C.H., Huang, Y., Li, K., Leung, K.S.Y., 2018. Joint effects of multiple UV filters on zebrafish embryo development. *Environ. Sci. Technol.* 52, 9460–9467.
- Lorigo, M., Mariana, M., Cairrao, E., 2018. Photoprotection of ultraviolet-B filters: updated review of endocrine disrupting properties. *Steroids* 131, 46–58.
- Mitchellmore, C.L., He, K., Gonsior, M., Hain, E., Heyes, A., Clark, C., Younger, R., Schmitt-Kopplin, P., Feerick, A., Conway, A., Blaney, L., 2019. Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. *Sci. Total Environ.* 670, 398–410.
- Mizukawa, A., Molins-Delgado, D., de Azevedo, J.C.R., Fernandes, C.V.S., Díaz-Cruz, S., Barceló, D., 2017. Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguaçu watershed, Curitiba (Brazil). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (22), 18284–18294.
- Negreira, N., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., 2010. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of UV filters in environmental water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2), 995–1004.
- Nugegoda, D., Kibria, G., 2017. Effects of environmental chemicals on fish thyroid function: implications for fisheries and aquaculture in Australia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 244, 40–53.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426.
- Park, C.B., Jang, J., Kim, S., Kim, Y.J., 2017. Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 57–63.
- Peng, X., Jin, J., Wang, C., Ou, W., Tang, C., 2015. Multi-target determination of organic ultraviolet absorbents in organism tissues by ultrasonic assisted extraction and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1384, 97–106.
- Pico, Y., Belenguer, V., Corcellas, C., Diaz-Cruz, M.S., Eljarrat, E., Farré, M., Gago-Ferrero, P., Huerta, B., Navarro-Ortega, A., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, L., Santín, G., Barceló, D., 2019. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Sci. Total Environ.* 659, 1186–1198.
- Regulation (EC) No 1223/2009/Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union* L, 342/59.
- Román, I.P., Chisvert, A., Canals, A., 2011. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *J. Chromatogr. A* 1218 (18), 2467–2475.
- Šauer, P., Bořík, A., Golovko, O., Grabic, R., Vojs Staňová, A., Valentová, O., Stará, A., Šandová, M., Kocour Kroupová, H., 2018. Do progestins contribute to (anti-)androgenic activities in aquatic environments? *Environ. Pollut.* 242, 417–425.
- Šauer, P., Švecová, H., Grabicová, K., Gönül Aydın, F., Mackulak, T., Kodeš, V., Blytt, L.D., Henninge, L.B., Grabic, R., Kocour Kroupová, H., 2021. Bisphenols emerging in Norwegian and Czech aquatic environments show transthyretin binding potency and other less-studied endocrine-disrupting activities. *Sci. Total Environ.* 751, 141801.
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109 (3), 239–244.
- Schmutzler, C., Gotthardt, I., Hofmann, P.J., Radovic, B., Kovacs, G., Stemmler, L., Nobis, I., Bacinski, A., Mentrup, B., Ambruger, P., Grüters, A., Malendowicz, L.K., Christoffel, J., Jarry, H., Seidlová-Wuttke, D., Wuttke, W., Köhrle, J., 2007. Endocrine disruptors and the thyroid gland – a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ. Health Perspect.* 115, 77–83.

- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Pallud, S.E., Parlow, A.F., St. Germain, D.L., Galton, V.A., 2001. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO 2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol. Endocrinol.* 15, 2137–2148.
- Sonneveld, E., Jansen, H.J., Ritco, J.A., Brouwer, A., van der Burg, B., 2005. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol. Sci.* 83, 136–148.
- Spurgeon, D.J., Jones, O.A.H., Dorne, J.L.C.M., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum, S.R., 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ.* 408, 3725–3734.
- Suh, S., Pham, C., Smith, J., Mesinkovska, N.A., 2020. The banned sunscreen ingredients and their impact on human health: a systematic review. *Int. J. Dermatol.* 59 (9), 1033–1042.
- Tsui, M.M.P., Chen, L., He, T., Wang, Q., Hu, C., Lam, J.C.W., Lam, P.K.S., 2019. Organic ultraviolet (UV) filters in the South China Sea coastal region: environmental occurrence, toxicological effects and risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 181, 26–33.
- USEPA, 2010. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft Windows, v 4.00. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- USEPA, 2020. Chemistry dashboard. Available from United States Environmental Protection Agency, Washington DC. <https://comptox.epa.gov/dashboard/>. (Accessed 3 January 2020).
- Wang, W., Lee, I.S., Oh, J.E., 2022. Specific-accumulation and trophic transfer of UV filters and stabilizers in marine food web. *Sci. Total Environ.* 825, 154079.
- Wu, D., Zhou, Y., Lu, G., Hu, K., Yao, J., Shen, X., Wei, L., 2019. The occurrence and risks of selected emerging pollutants in drinking water source areas in Henan, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16 (21), 4109.
- Yu, L., Lam, J.C.W., Guo, Y., Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., Zhou, B., 2011. Parental transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and thyroid endocrine disruption in zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 45 (24), 10652–10659.
- Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Bao, X., Zhang, P., Jiang, R., 2019. Bioaccumulation and biochemical effects of ethylhexyl methoxy cinnamate and its main transformation products in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 214, 105241.

## 5.2 Posouzení embryotoxicity vybraných UV filtrů

V následující studii jsme se zaměřili na hodnocení embryotoxického účinku jednotlivých UV filtrů na danio pruhované (*Danio rerio*). Abychom mohli posoudit potenciální interakce mezi toxickými účinky testovaných látek, vystavili jsme embrya také působení UV filtrům ve směsích. K tomuto hodnocení jsme využili FET test dle metodiky OECD 236. Embrya *D. rerio* byla exponována organickými UV filtry, které jsou běžně používány v PCPs a také detekovány ve vodním ekosystému. Konkrétně se jednalo o látky PBSA, EHMC, OC, 4-MBC a BP-3. Směsi UV filtrů byly vybrány na základě svých chemických vlastností a rozděleny do skupin směsí OC a 4-MBC; PBSA, EHMC a BP-3; tyto dvě skupiny byly doplněny směsí všech pěti UV filtrů.

Výsledky studie odhalily zvýšenou mortalitu embryí i larev, konkrétně pro směs UV filtrů OC a 4-MBC v koncentraci 10 µg/l po 48, 72 a 96 hpf. Dále byly zaznamenány změny v líhnutí. Dřívější líhnutí bylo zaznamenáno především ve směsích UV filtrů OC a 4-MBC v koncentraci 100 µg/l, dále ve směsi PBSA, BP-3 a EHMC v koncentracích 10 a 100 µg/l a také ve směsi všech pěti UV filtrů v 0,1 a 10 µg/l koncentraci. Zrychlené líhnutí bylo pozorováno také v testovací skupině s 0,1 µg/l OC. Na rozdíl od těchto výsledků bylo zaznamenáno zpomalené líhnutí ve skupinách s 4-MBC a BP-3, které byly testované jako jednotlivé substance. Statisticky vysoce významný rozdíl opožděného líhnutí ( $p < 0,01$ ) byl v porovnání s kontrolní skupinou pozorován v experimentálních skupinách vystavených 10, 50, 100 a 250 µg/l 4-MBC, případně 2 000 µg/l BP-3.


Během experimentu byly identifikovány také mnohé malformace embryí (edém perikardu, zakřivení páteře, edém žloutkového váčku), nicméně se nejednalo o statisticky významné změny v porovnání s kontrolní skupinou.

Podrobné výsledky experimentu jsou uvedeny v publikaci Cahova et al. (2021b).

- **Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2021b).** Do single-component and mixtures selected organic UV filters induce embryotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*)? *Water*, 13(16), 2203. **IF<sub>2021</sub>=3,53, Q2**

## Article

# Do Single-Component and Mixtures Selected Organic UV Filters Induce Embryotoxic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*)?

Jana Cahova<sup>1</sup>, Jana Blahova<sup>1,\*</sup>, Lucie Plhalova<sup>1</sup>, Zdenka Svobodova<sup>1</sup> and Caterina Faggio<sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, University of Veterinary Sciences Brno, 61242 Brno, Czech Republic; cahovaj@vfu.cz (J.C.); plhaloval@vfu.cz (L.P.); svobodovaz@vfu.cz (Z.S.)

<sup>2</sup> Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98166 Messina, Italy

\* Correspondence: blahovaj@vfu.cz (J.B.); cfaggio@unime.it (C.F.)

**Abstract:** UVs are important ingredients in common cosmetic products (e.g., sunscreens, hairsprays, soap). After their use, they can enter the aquatic ecosystem and negatively affect non-target aquatic organisms. The aim of our study was to evaluate acute embryotoxicity of selected organic UVs 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA), ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC), octocrylene (OC), 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) and benzophenone-3 (BP-3). The chemicals were tested both as a single substance and their mixtures. The types of mixtures were chosen as follows: the combination of OC and 4-MBC; the combination of PBSA, EHMC and BP-3 and the combination of all five UV filters. The embryotoxicity was evaluated using a modified method of the Fish Embryo Acute Toxicity Test-OECD guideline 236 and zebrafish (*Danio rerio*) was selected as a suitable fish model organism. The toxic effects were studied by assessing mortality, hatching and the occurrence of malformations at 24, 48, 72 and 96 h post fertilization. The obtained results indicate that especially the mixture of OC and 4-MBC presents a potential risk of embryotoxicity for zebrafish due to a significant increase in mortality, which was 41.7% in the experimental group exposed to 10 µg/L at 96 h post fertilization. Based on our results, the most effected sub-lethal endpoints were hatching and malformation (e.g., edema of pericard, bent spine, yolk edema), but with no statistically significant effect. These results differ within groups with single UVs and with their mixtures, suggesting the interaction of these substances when they are exposed together.

**Keywords:** personal care products; embryotoxicity; mortality; hatching; sublethal endpoints



**Citation:** Cahova, J.; Blahova, J.; Plhalova, L.; Svobodova, Z.; Faggio, C. Do Single-Component and Mixtures Selected Organic UV Filters Induce Embryotoxic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*)? *Water* **2021**, *13*, 2203. <https://doi.org/10.3390/w13162203>

Academic Editor: Rui Cortes

Received: 21 July 2021

Accepted: 5 August 2021

Published: 13 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. Ultraviolet Radiation and Ultraviolet Filters

The exposure to the ultraviolet (UV) radiation has been related to the development of skin cancer. The UV radiation is according to its wavelength and effect divided into three types. UV A radiation (400 to 320 nm) enters skin cells and induces the production of oxidative radicals that can lead to skin aging. UV B radiation (320 to 280 nm) influences the epidermis and DNA cells. UV C radiation is the most dangerous and most absorbed by the ozone layer [1,2]. UV filters (UVs) can minimize the damage caused by the UV radiation. The UV filters used in personal care products (PCPs) (shampoos, skin lotions, creams, sunscreens, etc.) were developed for the protection of the skin against UV radiation [2,3]. In the Annex VI of EU Cosmetics Products Regulation (EC) No. 1223/2009, 28 UV filters are listed that are allowed in cosmetic products in EU [4]. UVs are of an organic or inorganic origin. Zinc oxide nanoparticles and titanium dioxide belong to inorganic UVs and can reflect the UV radiation. Organic UVs protect skin cells by absorbing the UV rays and their structure contains at least one benzene. Organic UVs belong to the group of aminobenzoates, benzophenones, derivatives of camphor and acid cinnamate, salicylates, benzimidazoles, etc. [2].

## 1.2. Literature Review

Due to a huge consumption of PCPs, UVs have become significant pollutants of the environment [3]. The UVs can enter the aquatic ecosystem by two ways: (a) directly by washing off the sunscreen from the skin, especially during recreational activities or (b) indirectly via the wastewater plants that are not able to eliminate all the micropollutants. Many UVs are lipophilic and due to their physicochemical properties can resist in the aquatic environment. The occurrence of UVs is recorded worldwide, and the UVs are a relevant group of ubiquitously present contaminants of the environment [5,6]. UVs were detected in many biotic (e.g., animal tissues, corals) and abiotic matrices (e.g., surface water, wastewater, beach sand). In surface water, containment of benzophenone-3 (BP-3), octocrylene (OC), homosalate (HMS) and octisalate (OS) was recorded at concentrations of tens to hundreds ng/L [5]. On the base of indirect entering the environment, UVs are detected in municipal wastewater in different countries; in Norway in wastewater effluent between 300 and 8900 ng/L of OC, BP-3 and ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC); however, the total concentration of UVs in the sludge was two orders of magnitude higher, between 5 and 51 µg/g, predominantly OC and EHMC [7]. In Portugal, the tested beach sand contained a huge range of UVs (4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), EHMC and BP-3) at concentrations of ng/g of the dry weight (DW) [6]. UVs are often detected even in coastal and marine sediments. In the North and Baltic Sea surface sediments, OC was the mainly recorded UV filter with the frequency detection of 79% and it was detected at the concentration of up to 9.7 ng/g DW [8]. In Spain, residues of EHMC, BP-3, OC and 4-MBC were detected in the tap water from metropolitan areas and the city of Barcelona [9].

The aquatic organisms are significant elements for monitoring persistent lipophilic contaminants such as organic UVs. In invertebrates, e.g., corals [5] and mussels [10], various representatives of organic UVs (HMS; OC; EHMC; BP-3) were detected. Moreover, many organic UVs (EHMC; OC; 4-MBC; BP-3) were detected in fish, confirmatory ubiquitous presence of organic UVs in aquatic biota [11,12]. Fent et al. [3] monitored the occurrence of UVs at different trophic levels. EHMC was detected at the concentrations between 22 and 150 ng/g lipids in mussels (*Dreissena polymorpha*), at the concentrations of 337 ng/g lipids in barb (*Barbus barbus*) and within a range of 16 to 701 ng/g lipids in cormorants (*Phalacrocorax* sp.). This increasing concentration of EHMC suggests food-chain accumulation. Many studies are focused on investigating the effect of UVs on non-target organisms (i.e., organism other than the one for which are UVs intend). Recently it was proved that UVs can impair biochemical processes and antioxidant and detoxifying system of the organism. Nataraj et al. [13] proved an increase in lipid peroxidation and a decrease in glutathione-S-transferase (GST) activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryo after a 96-h EHMC exposure. Benzophenones (BPs) can induce oxidative stress in liver of carp (*Cyprinus carpio*), especially by decreasing superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and GST activities. The level of reduced glutathione (GSH) was significantly induced. Induction of oxidative damage and inhibition of CAT activity were observed after 4-MBC exposure in *Solea senegalensis* [14]. All these results point on activating of detoxification process in fish [15].

Due to their ability to impair hormonal pathways, some of the organic UVs are considered as endocrine disruptors. Blüthgen et al. [16] proved an anti-androgenic effect of BPs in adult male zebrafish (*D. rerio*) by the down-regulation of genes involved in steroidogenesis. 4-MBC caused in zebrafish (*D. rerio*) embryo after 96 h of exposure a downregulation of brain aromatase gene that is involved in normal functioning of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis [17]. EHMC showed anti-estrogen and androgen effects on zebrafish (*D. rerio*) in F0 generation after 40 d post fertilization; moreover, this UV filter can accumulate in zebrafish (*D. rerio*) and transfer to the offspring through reproduction and disrupt the nervous and weakened antioxidant capacity of F0 parents and F1 offspring via parental transfer [18]. The neurotoxic potential of EHMC was proved in larval zebrafish by inducing of hypothyroidism [19]. Noteworthy is that recent papers point out the negative influence of EHMC, OC, benzophenone-8 (BP-8) and benzophenone-1

(BP-1) on the marine ecosystem and their responsibility for coral bleaching [20,21]. Based on the recent studies, the State of Hawaii has introduced restrictions on the usage of sunscreens containing EHMC, OC, BP-8 and BP-1 [22].

Some UVs reported an impairment of the embryo development and caused embryotoxicity. Balász et al. [23] proved that the BP-3 decreases the number of hatched embryos (*D. rerio*) and brings about tail and jaw deformation after a 96-h exposure. This delayed hatching and impairment of the embryo development would later lead to the death of the fish. Another representative of benzophenones family, benzophenone-2 (BP-2), causes heart and yolk edema in 5 d after fertilization, reduces the heart rate, erupts blood circulation, enlarges yolk by the accumulation of lipid droplets and disrupts the craniofacial development [24]. The OC affected the transcription of genes related to developmental processes in brain and liver in zebrafish embryo. Moreover, the OC has an impact on hematopoiesis, the formation of blood vessels, blood circulation and fat cell differentiation [25]. The 4-MBC influences the neuronal and muscular development in *D. rerio* embryos after a 3-day exposure. Specifically, the 4-MBC caused abnormal axial curvature in embryos and impaired mobility by disrupting the slow muscle fiber pattern [26]. Quintaneiro et al. [17] studied the effect of the 4-MBC on hatching, heart rate and malformation in zebrafish embryos. The results showed that the 4-MBC delayed the absorption of the yolk sac and pericardial edema and decreased the heart and hatching rate after 48 h of exposure for the highest tested concentration. Torres et al. [27] came to a similar conclusion that the highest tested concentration of 4-MBC decreased the heart and hatching rate. They even observed an abnormal involuntary muscular contraction that could signalize impaired mobility of embryos.

Aquatic organisms are exposed to heterogeneous mixtures of substances, not only to single pollutants [28,29]. These chemicals interact with each other and have potentially additional toxic effect and subsequently could be more environmentally unfriendly when are mixed together [30–32]. Li et al. [33] revealed an adverse effect of a mixture of UVs (BP-3, EHMC, OC) on the development of zebrafish embryos and their impact on the next generation. After 47 days of exposure, the embryo mortality increased and simultaneously the hatching rate in the F1 generation decreased. A mixture of the mentioned UVs did not exhibit any significant effect in the environmentally relevant concentration; however, a negative impact was shown in the next generation even in the environmentally relevant concentration. Worth mentioning is a fact that embryos exposed to UVs in water reported a decreased heart rate in all tested groups.

### 1.3. Aims of Our Study

The objectives of our study were twofold: (i) to evaluate the effect of UVs as a single-substance and selected organic UVs in mixture on the embryonic development of zebrafish; (ii) due to the lack of literature focused on the interaction in mixtures of UVs we investigate joint toxic effect of tested UV filters.

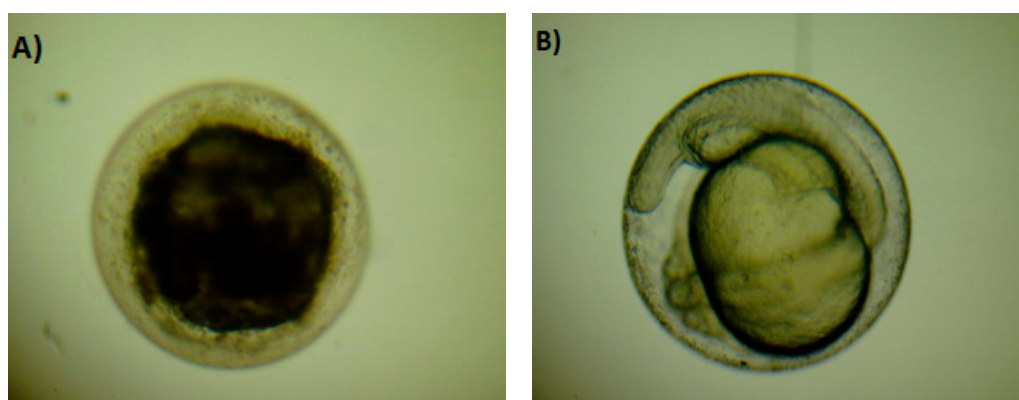
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design and Description of Critical Methods

The embryotoxicity of single UV filters and their mixtures was evaluated using a modified method of the Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET)–OECD guideline 236 [34]. FET determines toxicity of chemicals on fish embryonic stages. Organisms were exposed to tested pollutants in increasing concentrations for 96 h. During the test, indicated parameters (coagulation of eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tail bud from the yolk sac, changes in pigmentation, edema of pericard, etc.) were recorded every 24 h. Zebrafish (*D. rerio*) is standard model for fish toxicity research and therefore this fish was selected as a suitable model organism. Fertilized eggs were purchased from a commercial producer (Mendel University in Brno, Czech Republic). At first, eggs were rinsed in water and stereomicroscope (StereoBlue, Euromex) was used for checking of egg quality control and the determination of the development stage as well. For a subsequent use in the

embryonic toxicity test, only fertilized eggs of a maximal 16-cell stage without any obvious irregularities during cleavage were selected.

The fertilized eggs were randomly distributed on 48-well microwell plates, one embryo in each well. Tested eggs were filled up the tested concentrations of solutions with 1 mL. Twenty-four eggs were used for each experimental group (test was performed in duplicate). Simultaneously with the exposure to the tested substances, the control group (only dilution water) and the control group with an appropriate solvent (dilution water with a solvent at concentration 0.01%) were also tested. The test solution and dilution water in the control group were renewed every 24 h by gently draining each chamber and adding a new solution. The individual steps were performed very carefully to avoid potential disturbing of the test embryos. The microwell plates with embryos were stored in the thermostat with parameters set as follows: temperature  $26 \pm 1$  °C and photoperiod 12 h of light and 12 h of darkness. The embryos were monitored at 24, 48, 72 and 96 h post fertilization (hpf). The toxicological impact was represented by the lethal endpoints and development disorders. Mortality, hatching rate and the occurrence of malformations such as changes in pigmentation, body deformation, edema etc. were recorded. The embryo was considered dead if the embryo coagulation (Figure 1), a lack of somite formation, non-detachment of the tail and a lack of heartbeat were detected. All observation was performed according to Nagel [35].



**Figure 1.** Coagulation of embryo exposed to 10 µg/L of PBSA after 48 h post fertilization (hpf) (A). Physiological development of embryo in the control group at 48 hpf (B).

## 2.2. Overview of Tested Chemicals

The selected eggs of zebrafish were exposed to a broad range of concentrations of various organic UV filters 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA), EHMC, OC, 4-MBC, BP-3, which can be commonly detected in surface water worldwide [5,8]. All standards were obtained from Sigma-Aldrich (Czech Republic) with chemical purity  $\geq 99\%$ . Because of pure solubility of the individual substances, suitable solvents were used for preparing the stock solutions (dimethyl sulfoxide for the solution of PBSA, EHMC and BP-3; ethanol for the solution of 4-MBC and OC). The total concentration of the solvents was always 0.01% (10 µL in 100 mL). The stock solution was prepared daily in dilution water in dark glass. The dilution water (pH = 7.8) was prepared according to ISO 7346 [36]. The tested concentrations of the individual UV filters were as follows: PBSA—0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 and 2000 µg/L; EHMC—0.1, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 and 2000 µg/L; OC—0.1, 1, 10, 50, 100 and 250 µg/L; 4-MBC—0.1, 1, 10, 50, 100 and 250 µg/L; BP-3—0.1, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 and 2000 µg/L. In addition to the individual substances, various mixtures of these UV filters were tested. The types of mixtures were chosen as follows: the combination of OC and 4-MBC; the combination of PBSA, EHMC and BP-3 and the combination of all five UV filters. The used concentrations of these individual UV filters in mixtures were 0.1; 10 and 100 µg/L. The lowest concentrations used in our embryonic toxicity test corresponded to the environmentally relevant concentrations of these substances in surface

water. Higher concentrations were chosen as a multiple of the lowest one to determine the potential concentration-dependent relationship. A restriction in the choice of the used concentrations was also the limited solubility of the selected UV filters.

### 2.3. Statistical Evaluation

The statistical analysis was carried out using statistical software Unistat for Excel 6.5. (Czech Republic). The chi-square ( $\chi^2$ ) test of independence was used to determine if there is a significant difference between monitored variables (mortality, hatching rate and occurrence of malformations). Pearson's chi-squared test (contingency table— $k \times m$ ) and Yates correction (contingency table— $2 \times 2$ ) were used to determine whether there is a statistically significant difference between frequencies of monitored variables. The statistically significant difference was considered when  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*). All data are expressed in percentage and the data of the hatching rate and the occurrence of malformations are always based on the surviving embryos at a given time. Due to a non-significant difference in all monitored indices between the control group and the control groups with a solvent, for next evaluation only the control group was used.

## 3. Results

### 3.1. Mortality

The cumulative mortality of embryos after the exposure to single substances of UVs and their mixtures was recorded at 24, 48, 72 and 96 hpf. Results including the statistical evaluation are shown in Table 1 and in Supplementary Materials S1 and S2.

**Table 1.** Cumulative mortality (%) of zebrafish embryos exposed to various mixtures of UV filters during 96 h. The bold font and asterisk indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure. \*—no mortality was observed in both control group and control groups with solvents.

Test Substance	Group	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
-	control *	0	0	0	0
OC + 4-MBC	0.1 µg/L	12.5	20.8	20.8	20.8
	10 µg/L	20.8	<b>29.2 *</b>	<b>33.3 *</b>	<b>41.7 *</b>
	100 µg/L	0	0	4.2	4.2
PBSA + BP-3 + EHMC	0.1 µg/L	4.2	4.2	4.2	4.2
	10 µg/L	0	0	0	0
	100 µg/L	0	0	0	0
PBSA + EHMC + OC + 4-MBC + BP-3	0.1 µg/L	4.2	4.2	4.2	4.2
	10 µg/L	0	0	0	0
	100 µg/L	8.3	8.3	8.3	8.3

Abbreviations: BP-3—benzophenone-3; EHMC—ethylhexyl methoxycinnamate; hpf—hours post fertilization; 4-MBC—4-methylbenzylidene camphor; OC—octocrylene; PBSA—2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid.

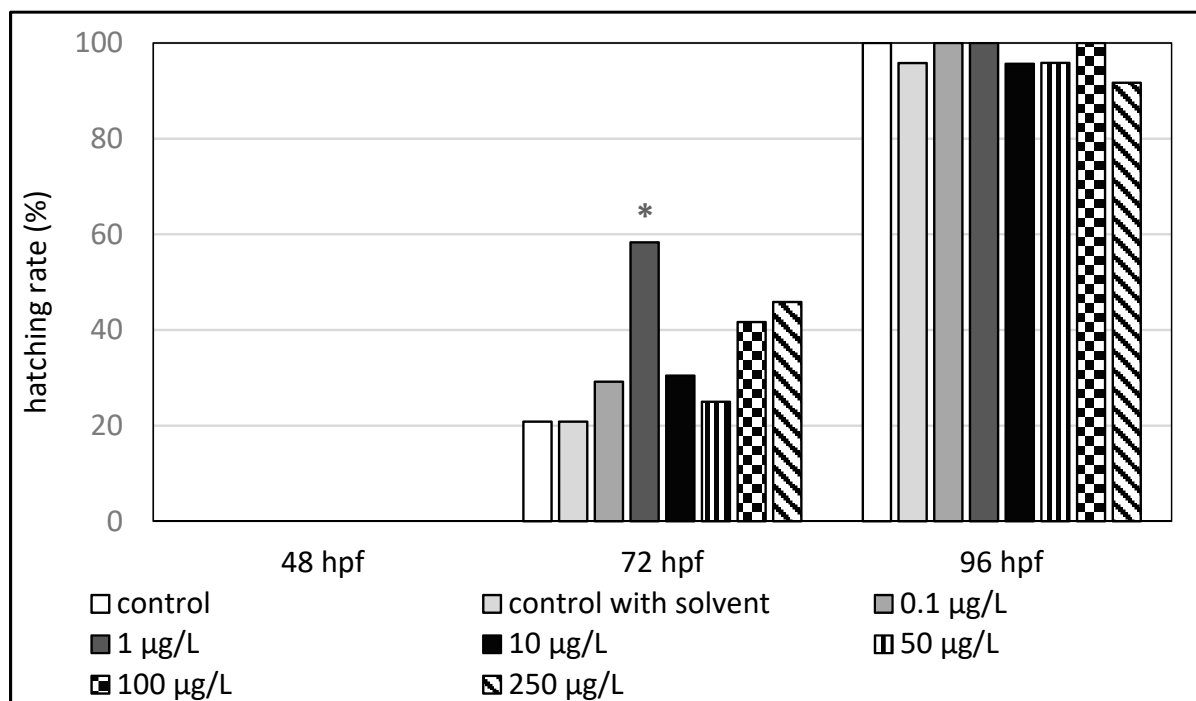
No mortality was observed in both control group and control groups with solvents. Similarly, no mortality was recorded in the embryonic toxicity test with BP-3 (data not shown). Rare mortality was observed in other embryonic toxicity tests with single substances of organic UV filters. The highest mortality was found in the embryonic toxicity test with 4-MBC in the experimental group exposed to 100 µg/L (12.5%). But this difference was tested as non-significant compared to the control group. On the other hand, more frequent mortality was found in the embryonic toxicity tests with mixtures of organic UV filters, especially in the toxicity test with the combination of OC and 4-MBC in the experimental group exposed to 10 µg/L. The statistical analysis revealed significant differences between the control and this experimental group at 48, 72 and 96 hpf as well.

### 3.2. Hatching

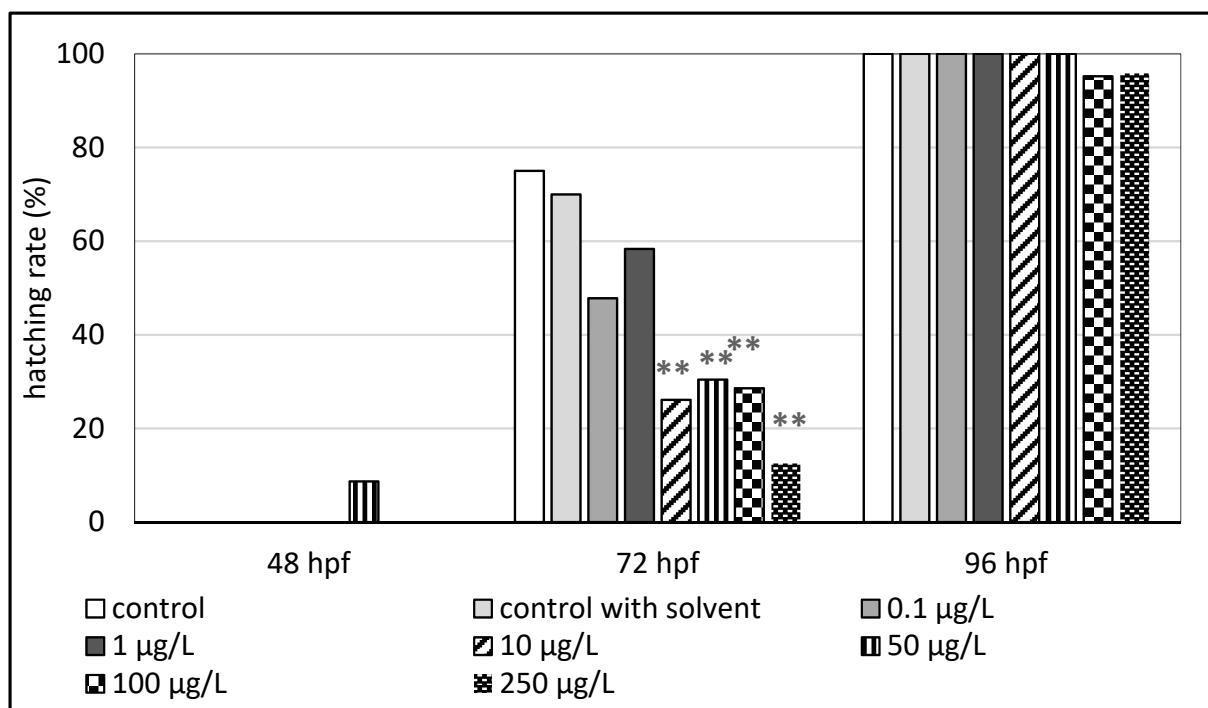
The results of the hatching rate (expressed in %) in the individual embryonic toxicity tests are highlighted in Figures 2–7 and in Supplementary Materials S1 and S2.

In almost all experimental groups, hatching was recorded at 72 hpf. Earlier hatching at 48 hpf was observed only in few experimental groups exposed to individual substances of selected UV filters (4-MBC—50 µg/L; PBSA—10 µg/L and EHMC—2000 µg/L), but no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found compared to the control group and experimental groups at this observation time. The first hatching in the control groups was recorded at 72 hpf, but all control embryos were hatched at 96 hpf. Similarly, most embryos in the groups exposed to single substances or mixtures of UV filters finished their hatching at 96 hpf. No significant differences ( $p > 0.05$ ) in the hatching rate were found between the control and experimental groups at 96 hpf.

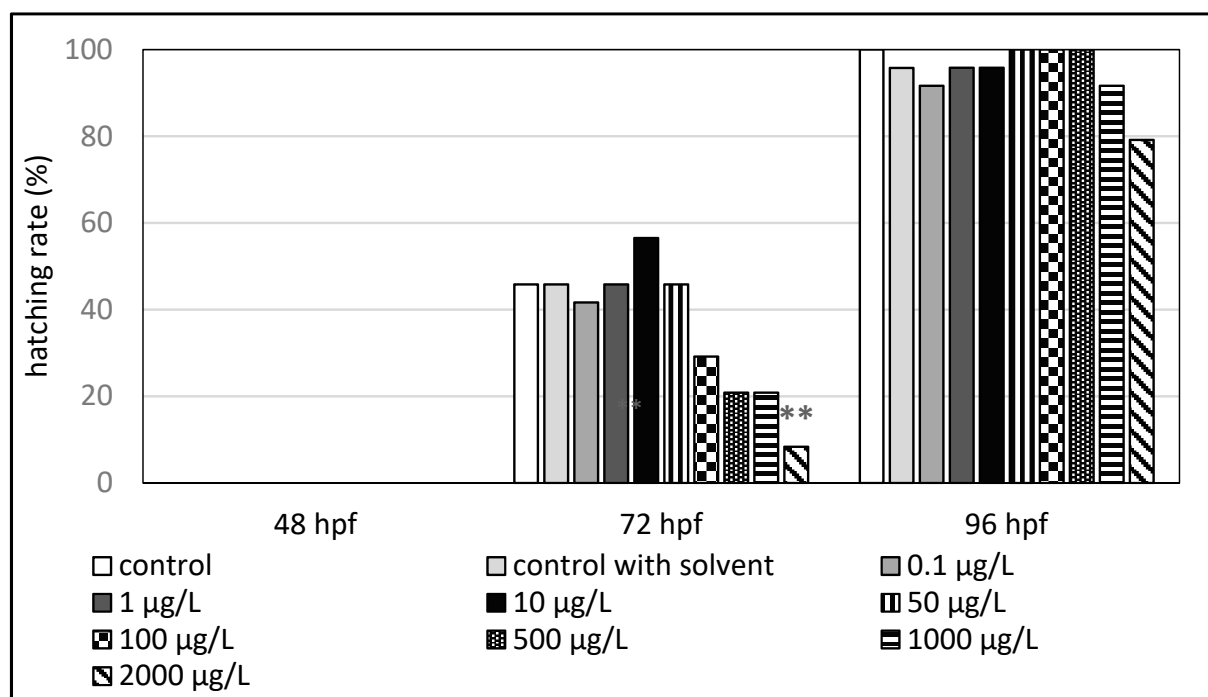
Earlier hatching was recorded especially in the experimental groups exposed to various mixtures of UV filters at 72 hpf. Significant differences compared to the control group were found in the experimental groups exposed to the mixture of OC and 4-MBC at the concentration of 100 µg/L ( $p < 0.05$ ), further to the mixture of PBSA, BP-3 and EHMC at the concentrations of 10 and 100 µg/L (both at  $p < 0.05$ ) and to the mixture of all five UV filters at the concentrations of 0.1 ( $p < 0.01$ ) and 10 µg/L ( $p < 0.05$ ). Accelerated hatching was revealed also in the groups treated by a single substance of organic UV filters. A significant difference in the hatching rate was noted after the exposure to OC at the concentration of 1 µg/L. On the other hand, hatching retardation was found in embryos exposed to selected concentrations of 4-MBC and BP-3 as single test substances. Highly significant delay in hatching ( $p < 0.01$ ) was observed especially in the highest concentrations of the test substances (4-MBC—10, 50, 100 and 250 µg/L; BP-3—2000 µg/L). No significant changes in the hatching rate ( $p > 0.05$ ) were observed in the embryonic toxicity tests with PBSA and EHMC as single substances at 72 hpf.



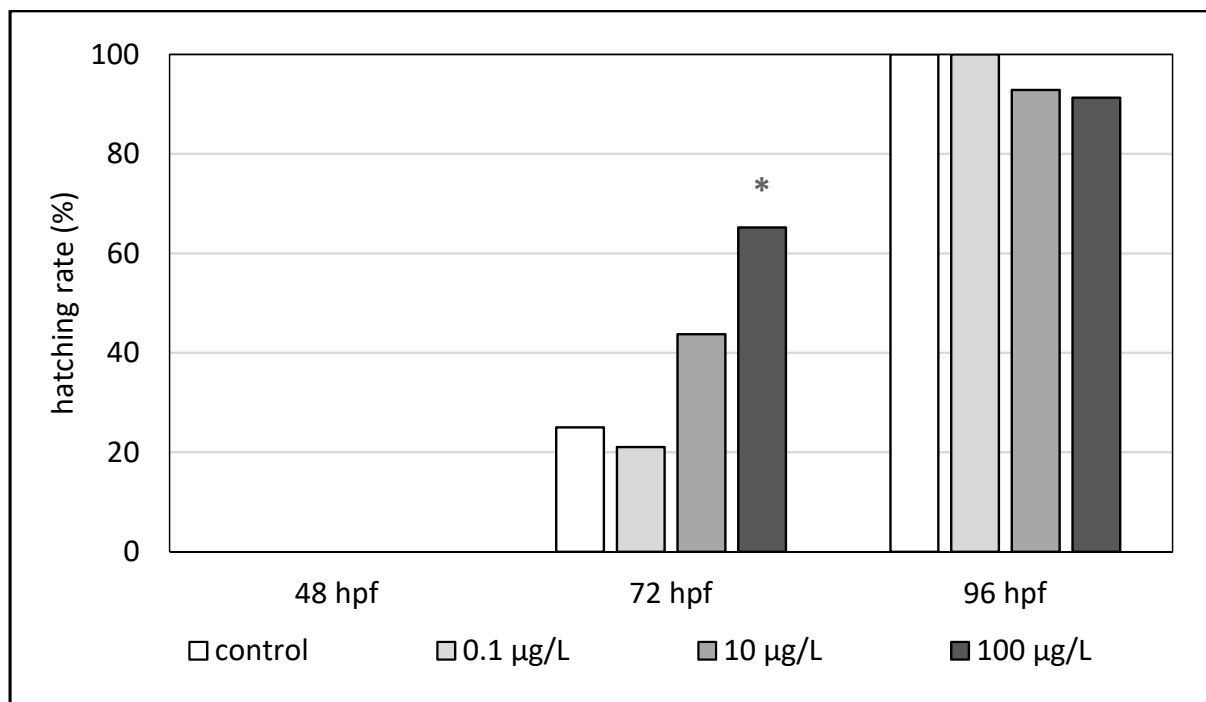
**Figure 2.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to octocrylene (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference ( $* p < 0.05$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.



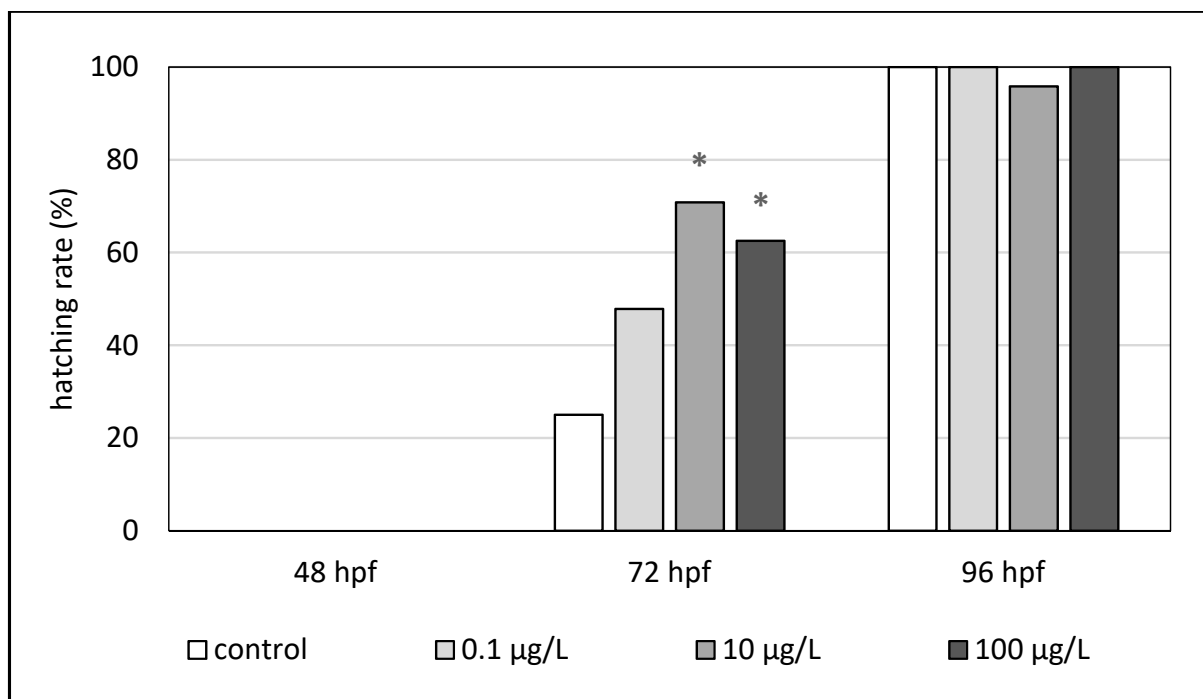
**Figure 3.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to 4-methylbenzylidene camphor (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference (\*\*  $p < 0.01$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.



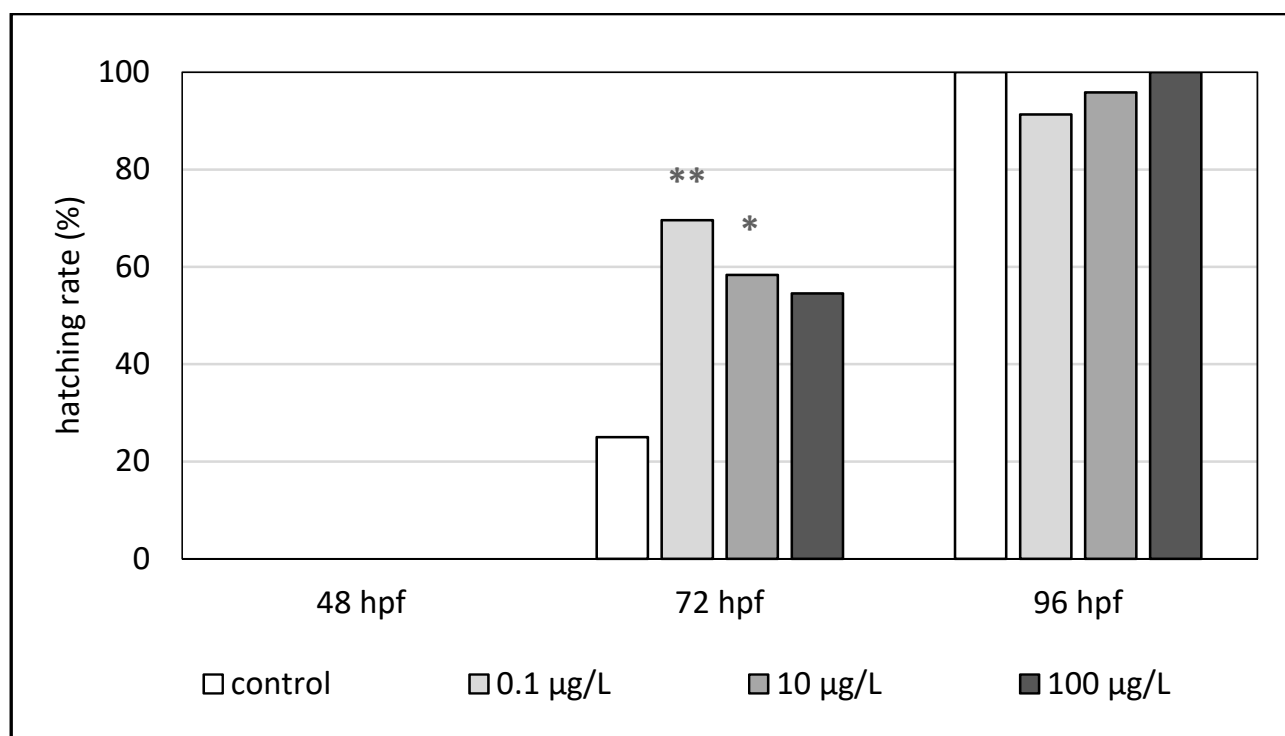
**Figure 4.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to benzophenone-3 (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference (\*\*  $p < 0.01$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.



**Figure 5.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to the combination of octocrylene and 4-methylbenzylidene camphor (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference ( $* p < 0.05$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.



**Figure 6.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to the combination of 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid, benzophenone-3 and ethylhexyl methoxycinnamate (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference ( $* p < 0.05$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

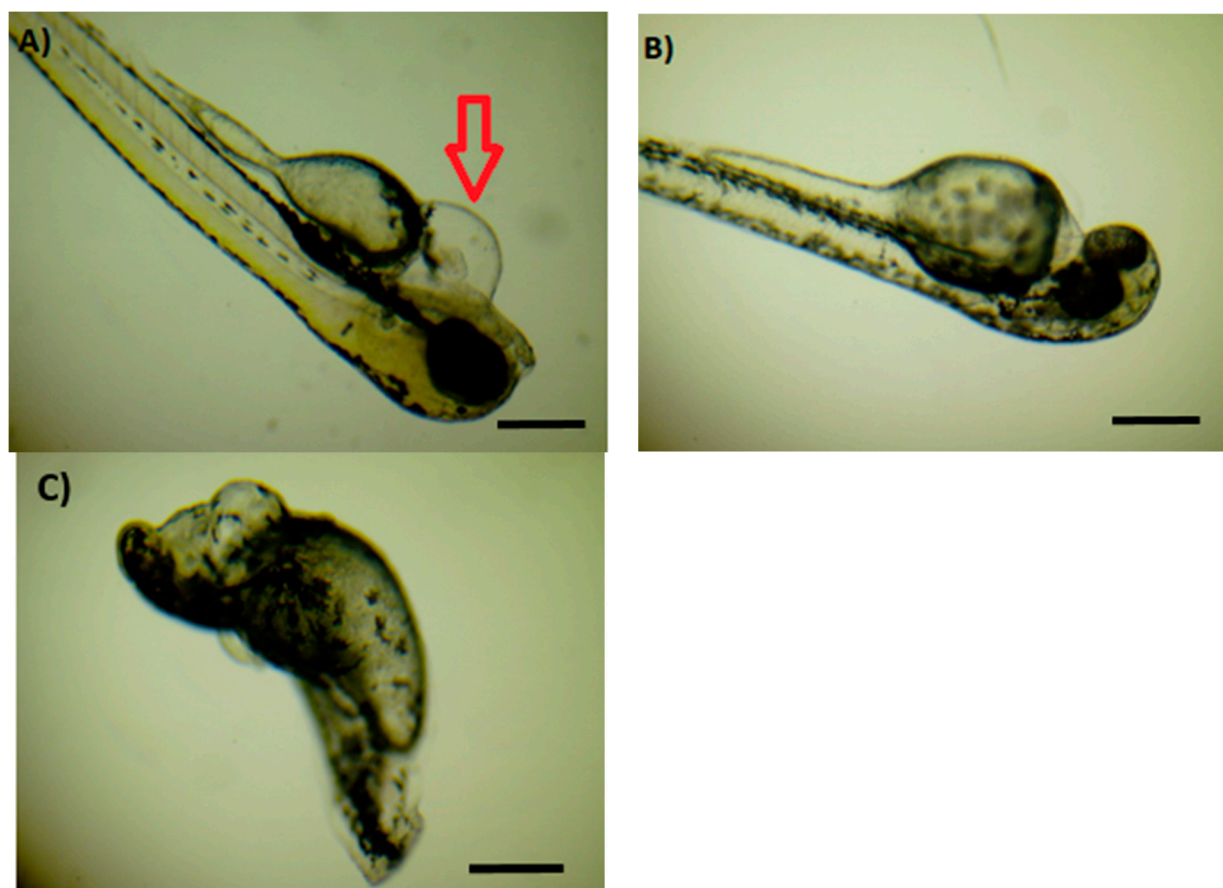


**Figure 7.** Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to the combination of all five organic UV filters (2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, 4-methylbenzylidene camphor, benzophenone-3) (hpf—hours post fertilization). The asterisk indicates a significant difference (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) between the control and experimental groups at the same time of exposure.

### 3.3. The Occurrence of Malformations

No malformations were observed in the control groups during the embryonic toxicity test. Only a rare malformation (4.2%) in the control group and control group with a solvent were observed in the embryonic toxicity test with the 4-MBC during the whole monitoring period. No malformations were also found in embryos treated by single substances of UVs such as BP-3, EHMC and OC. At 72 and 96 hpf, rare occurrence of edema of pericard (Figure 8) was found in the embryonic toxicity test with 4-MBC at the concentrations of 10 and 250 µg/L (4.2% and 8.3%, respectively) but with a non-statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) compared to the control group. Similarly, only rare ( $p > 0.05$ ) occurrence of malformations was noticed in the experimental group exposed to 10 µg/L of PBSA at 48, 72 and 96 hpf.

Surprisingly, no malformation was observed in embryos exposed to the mixture of all five organic UV filters during the whole monitoring (Supplementary Materials—Table S3). Only rare occurrence of malformations was found in embryos exposed to the mixture of PBSA, BP-3 and EHMC at the lowest test concentration at 48 hpf (4.2%) and 72 hpf (4.3%). In contrast, numerous malformations such as total deformation, curvature of the spine, yolk sac edema, edema of pericard, bent spine, undeveloped tail, but still non-significant difference ( $p > 0.05$ ) compared to the control group, were recorded in the embryonic toxicity test with the mixture of OC and 4-MBC (Figure 8).



**Figure 8.** Pericard edema of zebrafish larvae in the group exposed to 250  $\mu\text{g/L}$  of 4-methylbenzylidene camphor at 72 h post fertilization (hpf) (A). Zebrafish larvae in the control group at 72 hpf (B). Total body deformation of zebrafish larvae in group exposed to 10  $\mu\text{g/L}$  of 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene at 72 hpf (C). Scale bar = 0.4 mm.

#### 4. Discussion

Due to the extensive use of PCPs (e.g., sunscreens, lotions, shampoos, decorative cosmetics) with UVs, these substances have become a significant micro-pollutant of our environment and extensive scientific research has been performed to investigate their toxicological effect on non-target organisms (e.g., fish, corals, mussels) [37]. Aquatic organisms are exposed to various of micropollutants from their early life stage to their adulthood [38–44]. It has been revealed that UVs are able to bioaccumulate in the organism and biomagnificate through the food chain [3,43,45]. To our best knowledge, recent papers have focused mainly on the determination of embryotoxicity of single substances. Based on the data of the occurrence in aquatic ecosystem [5–9], we aimed to extend our research to the mixtures of UVs which are naturally present together in the aquatic environment and observe how these substances interact.

Our experiment was based on the examination of single UVs and their mixtures after 96 h of exposure in zebrafish embryos. The toxic effects were evaluated by the lethal endpoint and sub-lethal endpoints (i.e., the hatching rate, the formation of somites, morphological development, spontaneous movement and the occurrence of edema).

For organic UVs, high NOEC is determined since many of them (BP-3, EHMC and OC) did not report any embryotoxicity for zebrafish in the environmentally relevant concentrations [2]. In our experiment, statistically significant mortality was not recorded in any tested group with the single UVs exposure. This result is surprisingly positive regarding to the results of Jang et al. [30] experiment where the BP-3 treated group exhibited higher mortality. Li et al. [33] recorded 100% mortality of zebrafish embryos after the exposure of OC at 700  $\mu\text{g/L}$ . To compare that, in our experiment the highest tested concentration

was 250 µg/L of OC with no recorded mortality. The only recorded statistically significant mortality was for the mixture of OC and 4-MBC at the concentration of 10 µg/L after 96 hpf. This result would present a potential embryotoxicity risk of OC and 4-MBC for zebrafish.

Based on our results, we recorded the disruption of the hatching process more often than mortality. The only individually tested UV filter that caused significantly accelerated hatching was OC at the concentration of 1 µg/L. This is contrary to the research carried out by Blüthgen et al. [25], where OC did not show any toxicity effect on the hatching rate in zebrafish embryos for any tested concentration, which were even higher than we used in our experiment.

The 4-MBC and BP-3 were the only single test substances that affected the hatching process by hatching retardation. Balász et al. [23] came to a similar conclusion when the BP-3 exposure caused a decrease in the hatched embryos after 96 hpf. Delayed hatching was also recorded after benzophenone exposure in zebrafish embryos [46]. Focusing only on the 4-MBC means that when we tested the 4-MBC alone, the hatching of zebrafish embryos was retarded. However, when we tested the 4-MBC with OC in a mixture, earlier hatching was recorded. This outcome suggests an interaction of the 4-MBC and OC when they are present together, apparently with a dominant effect of OC. The interaction of UVs in a mixture was recently noticed by Li et al. [33] when they recorded an interrelation between the BP-3, EHMC and OC for zebrafish at an environmental level resulting in reduced toxic effects on the embryonic development and suggesting their antagonistic effect.

Surprisingly, the earlier hatching was recorded in the testing group treated by the mixture of all five UVs even in the environmentally relevant concentration. To conclude, all these results suggest a dominant effect of OC, considering the hatching rate. The earlier hatching recorded in the mixture of PBSA, BP-3 and EHMC would lead to the synergism or antagonism of these substances, and they need further investigation and consideration to understand the whole process and specify the accurate toxicological assessment.

If we consider the results of the observed malformation in our experiment, it is necessary to mention, that no statistically significant impairment of the development was observed, especially for each single tested UV filter. On the contrary, recent papers revealed the disruption of the development after the BPs exposure [23,24,47]. After 96 hpf, pericardial and yolk sac edema, deformed jaw, dilated gut or an impairment of craniofacial development were observed. Nataraj et al. [13] have tested the adverse effect of EHMC and its photoproduct on the development of zebrafish embryo. After the 96 hpf exposure, lesions of the muscle fibers and yolk sac, along with an increasing heart rate and hatching delay were revealed. On the other hand, in our experiment, only rare malformations were recorded in the mixture of PBSA, BP-3 and EHMC. Jang et al. (2016) [30] have tested a mixture of EHMC and BP-3 together in *Daphnia magna*. They assume that the EHMC and BP exhibit a synergistic effect and may cause a combined toxic effect. Based on our results and considering the result of testing every single UV filter, it seems that the mixture of PBSA, BP-3 and EHMC could have some potentiated effect, but this presumption need further investigation.

Our result of single 4-MBC with no significant effect on the development differs from recent papers. Quintaneiro et al. [17] observed after 4-MBC in zebrafish embryo developmental malformation including notochord curvature, delayed absorption of the yolk sac and pericardial edema, and Torres et al. [27] recorded an increase in the abnormal involuntary muscular contraction after the highest tested concentration of 4-MBC. However, if we focus on other tested mixtures of UVs (e.g., OC and 4-MBC; all five UVs together), a certain trend of interaction of these substances may be considered. After the OC and 4-MBC exposure, numerous morphological abnormalities were recorded (e.g., yolk edema, edema of pericard, bent spine, undeveloped tail), but when testing all five UVs together, the impairment of the development was not so common. These results might be pointing at a combined toxic effect of UVs when they are introduced together. This hypothesis needs to be further investigated in detail to confirm our prediction.

## 5. Conclusions

To conclude, during our experiment the organic UVs tested as a single substance did not cause the death of embryos in the early life stage and did not even impair the development of zebrafish. Although many deformations (e.g., edema of pericard, bent tail or undeveloped tail) and the decrease in hatching after UVs exposure would not be lethal for the embryo, this handicap could lead to the death of the adult fish later. On the other hand, it is important to realize that aquatic organisms are exposed to these substances in mixtures. Considering results of hatching rate and mortality after UVs mixture exposure, we suppose that UVs could have an additional toxic effect, especially mixture of OC and 4-MBC with probably dominant effect of OC. In contrast, the mixture of all five UVs did not cause such extensive changes in hatching rate or mortality. These results could lead to antagonism between tested UVs. To better understand the mixture toxicity, further research of various combination of UVs mixtures is required.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/w13162203/s1>, Table S1: Cumulative mortality (%) of zebrafish embryos exposed to octocrylene (OC) and 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) as single substances (hpf—hours post fertilization) during 96 h. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the control and experimental groups at the same time of exposure. \*—no mortality was observed in both control group and control groups with a solvent., Table S2: Cumulative mortality (%) of zebrafish embryos exposed to 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA) and ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) as single substances (hpf—hours post fertilization) during 96 h. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the control and experimental groups at the same time of exposure. \*—no mortality was observed in both control group and control groups with a solvent. Table S3: The occurrence of malformations (%) in zebrafish embryos exposed to the mixture of octocrylene and 4-methylbenzylidene camphor (hpf—hours post fertilization). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the control and experimental groups at the same time of exposure. \*—no malformations were observed in both control group and control groups with solvents. Figure S1: Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (hpf—hours post fertilization). No significant differences were observed between the control and experimental groups at the same time of exposure. Figure S2: Hatching rate (%) of zebrafish embryos exposed to ethylhexyl methoxycinnamate (hpf—hours post fertilization). No significant differences were observed between the control and experimental groups at the same time of exposure.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.C. and J.B.; methodology, L.P.; formal analysis, J.C.; investigation, J.C. and L.P.; statistical analysis, J.B.; writing—original draft preparation, J.C.; writing—review and editing, L.P., J.B. and Z.S.; visualization, J.C. and J.B.; supervision, C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This scientific work was financially supported by grant FVHE/VEČEREK/ITA 2019.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data used in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank Eva Trnkova for manuscript improvement and for language editing. The authors also thank Marie Kasparkova, Martin Klein and Jana Vrablova for laboratory work and technical support during embryonic toxicity test.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lajčíková, A.; Pekárek, L. Ultraviolet Radiation and its Health Impact. *Hygiena* **2009**, *54*, 57–61.
2. Kaiser, D.; Sieratowicz, A.; Zielke, H.; Oetken, M.; Hollert, H.; Oehlmann, J. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environ. Pollut.* **2012**, *163*, 84–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fent, K.; Zenker, A.; Rapp, M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 1817–1824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union L* **2009**, *342*, 59–209.

5. Mitchelmore, C.L.; He, K.; Gonsior, M.; Hain, E.; Heyes, A.; Clark, C.; Younger, R.; Schmitt-Kopplin, P.; Feerick, A.; Conway, A.; et al. Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. *Sci. Total Environ.* **2019**, *670*, 398–410. [[CrossRef](#)]
6. Capela, D.; Vila, M.; Llompart, M.; Dagnac, T.; García-Jares, C.; Alves, A.; Homem, V. Footprints in the sand—Assessing the seasonal trends of volatile methylsiloxanes and UV-filters. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *140*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Langford, K.H.; Reid, M.J.; Fjeld, E.; Øxnevad, S.; Thomas, K.V. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environ. Int.* **2015**, *80*, 1–7. [[CrossRef](#)]
8. Apel, C.; Joerss, H.; Ebinghaus, R. Environmental occurrence and hazard of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of European North and Baltic Seas. *Chemosphere* **2018**, *212*, 254–261. [[CrossRef](#)]
9. Díaz-Cruz, M.S.; Gago-Ferrero, P.; Llorca, M.; Barceló, D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2325–2333. [[CrossRef](#)]
10. Castro, M.; Fernandes, J.O.; Pena, A.; Cunha, S.C. Occurrence, profile and spatial distribution of UV-filters and musk fragrances in mussels from Portuguese coastline. *Mar. Environ. Res.* **2018**, *138*, 110–118. [[CrossRef](#)]
11. Molins-Delgado, D.; Muñoz, R.; Nogueira, S.; Alonso, M.B.; Torres, J.P.; Malm, O.; Ziolli, R.L.; Hauser-Davis, R.A.; Eljarrat, E.; Barceló, D.; et al. Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. *Sci. Total Environ.* **2018**, *618*, 451–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pico, Y.; Belenguer, V.; Corcellas, C.; Diaz-Cruz, M.S.; Eljarrat, E.; Farré, M.; Gago-Ferrero, P.; Huerta, B.; Navarro-Ortega, A.; Petrovic, M.; et al. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Sci. Total Environ.* **2019**, *659*, 1186–1198. [[CrossRef](#)]
13. Nataraj, B.; Maharajan, K.; Hemalatha, D.; Rangasamy, B.; Arul, N.; Ramesh, M. Comparative toxicity of UV-filter octyl methoxycinnamate and its photoproducts on zebrafish development. *Sci. Total Environ.* **2020**, *718*, 134546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Araújo, M.J.; Soares, A.M.V.M.; Monteiro, M.S. Effects of exposure to the UV-filter 4-MBC during *Solea senegalensis* metamorphosis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Liu, H.; Sun, P.; Liu, H.; Yang, S.; Wang, L.; Wang, Z. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *119*, 116–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Blüthgen, N.; Zucchi, S.; Fent, K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *263*, 184–194. [[CrossRef](#)]
17. Quintaneiro, C.; Teixeira, B.; Benedé, J.L.; Chisvert, A.; Soares, A.M.V.M.; Monteiro, M.S. Toxicity effects of the organic UV-filter 4-methylbenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere* **2019**, *218*, 273–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhou, R.; Lu, G.; Yan, Z.; Jiang, R.; Shen, J.; Bao, X. Parental transfer of ethylhexyl methoxy cinnamate and induced biochemical responses in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2019**, *206*, 24–32. [[CrossRef](#)]
19. Chu, S.; Kwon, B.R.; Lee, Y.M.; Zoh, K.D.; Choi, K. Effects of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) on thyroid hormones and genes associated with thyroid, neurotoxic, and nephrotoxic responses in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* **2021**, *263*, 128176. [[CrossRef](#)]
20. He, T.; Tsui, M.M.P.; Tan, C.J.; Ma, C.Y.; Yiu, S.K.F.; Wang, L.H.; Chen, T.H.; Fan, T.Y.; Lam, P.K.S.; Murphy, M.B. Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. *Environ. Pollut.* **2019**, *245*, 462–471. [[CrossRef](#)]
21. He, T.; Tsui, M.M.P.; Tan, C.J.; Ng, K.Y.; Guo, F.W.; Wang, L.H.; Chen, T.H.; Fan, T.Y.; Lam, P.K.S.; Murphy, M.B. Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two life stages of two coral species. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 2391–2399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hawaii State Legislature. S.B. No. 2571. Relating to Water Pollution. 2018. Available online: [https://www.capitol.hawaii.gov/session2018/bills/SB2571\\_CD1\\_.htm](https://www.capitol.hawaii.gov/session2018/bills/SB2571_CD1_.htm) (accessed on 27 July 2020).
23. Balázs, A.; Krifaton, C.; Orosz, I.; Szoboszlai, S.; Kovács, R.; Csenki, Z.; Urbányi, B.; Kriszt, B. Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *131*, 45–53. [[CrossRef](#)]
24. Fong, H.C.H.; Ho, J.C.H.; Cheung, A.H.Y.; Lai, K.P.; Tse, W.K.F. Developmental toxicity of the common UV filter, benzophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere* **2016**, *164*, 413–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Blüthgen, N.; Meili, N.; Chew, G.; Odermatt, A.; Fent, K. Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* **2014**, *476–477*, 207–217. [[CrossRef](#)]
26. Li, V.W.T.; Tsui, M.P.M.; Chen, X.; Hui, M.N.Y.; Jin, L.; Lam, R.H.W.; Yu, R.M.K.; Murphy, M.B.; Cheng, J.; Lam, P.K.S.; et al. Effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on neuronal and muscular development in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 8275–8285. [[CrossRef](#)]
27. Torres, T.; Cunha, I.; Martins, R.; Santos, M. Screening the toxicity of selected personal care products using embryo bioassays: 4-MBC, propylparaben and triclocarban. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1762. [[CrossRef](#)]
28. Sehonova, P.; Plhalova, L.; Blahova, J.; Doubkova, V.; Marsalek, P.; Prokes, M.; Tichy, F.; Skladana, M.; Fiorino, E.; Mikula, P.; et al. Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* **2017**, *185*, 1072–1080. [[CrossRef](#)]
29. Sehonova, P.; Plhalova, L.; Blahova, J.; Doubkova, V.; Prokes, M.; Tichy, F.; Fiorino, E.; Faggio, C.; Svobodova, Z. Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere* **2017**, *188*, 414–423. [[CrossRef](#)]

30. Jang, G.H.; Park, C.B.; Kang, B.J.; Kim, Y.J.; Lee, K.H. Sequential assessment via daphnia and zebrafish for systematic toxicity screening of heterogeneous substances. *Environ. Pollut.* **2016**, *216*, 292–303. [[CrossRef](#)]
31. Spurgeon, D.J.; Jones, O.A.H.; Dorne, J.-L.C.M.; Svendsen, C.; Swain, S.; Stürzenbaum, S.R. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 3725–3734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Park, C.B.; Jang, J.; Kim, S.; Kim, Y.J. Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzene on *Daphnia magna*. *Ecotoxic. Environ. Saf.* **2017**, *137*, 57–63. [[CrossRef](#)]
33. Li, A.J.; Law, J.C.F.; Chow, C.H.; Huang, Y.; Li, K.; Leung, K.S.Y. Joint effects of multiple UV filters on zebrafish embryo development. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 9460–9467. [[CrossRef](#)]
34. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*; OECD Publishing: Paris, France, 2013. [[CrossRef](#)]
35. Nagel, R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*—A general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* **2002**, *19* (Suppl. 1), 38–48.
36. ISO 7346. *Water Quality—Determination of Acute Lethal Toxicity of Substances to a Freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]—Part I: Static Method*; American National Standards Institute: New York, NY, USA, 1996.
37. Cahova, J.; Blahova, J.; Marsalek, P.; Doubkova, V.; Franc, A.; Garajova, M.; Tichy, F.; Mares, J.; Svobodova, Z. The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* **2021**, *774*, 145570. [[CrossRef](#)]
38. Chromcova, L.; Blahova, J.; Zivna, D.; Plhalova, L.; Causcelli di Tocco, F.; Divisova, L.; Prokes, M.; Faggio, C.; Tichy, F.; Svobodova, Z. Neem-Azal T/S—Toxicity to early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Med.* **2015**, *60*, 23–30. [[CrossRef](#)]
39. Blahova, J.; Cocilovo, C.; Plhalova, L.; Svobodova, Z.; Faggio, C. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Tox. Pharm.* **2020**, *77*, 103370. [[CrossRef](#)]
40. Pagano, M.; Stara, A.; Aliko, V.; Faggio, C. Impact of neonicotinoids to aquatic invertebrates—In vitro studies on *Mytilus galloprovincialis*: A review. *J. Mar. Sci. Eng.* **2020**, *8*, 801. [[CrossRef](#)]
41. Stara, A.; Pagano, M.; Capillo, G.; Fabrello, J.; Sandova, M.; Albano, M.; Zuskova, E.; Velisek, J.; Matozzo, V.; Faggio, C. Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation Calypso 480 S. *Ecotox. Environ. Saf.* **2020**, *203*, 110980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Faria, M.; Prats, E.; Ramirez, J.R.R.; Bellot, M.; Pagano, M.; Valls, A.; Gomez-Canela, C.; Porta, J.M.; Mestres, J.; Garcia-Reyero, N.; et al. Androgenic activation, impairment of the monoaminergic system and altered behavior in zebrafish larvae exposed to environmental concentrations of fenitrothion. *Sci. Total Environ.* **2021**, *775*, 145671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fiorino, E.; Sehonova, P.; Plhalova, L.; Blahova, J.; Svobodova, Z.; Faggio, C. Effect of glyphosate on early life stages: Comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2018**, *25*, 8542–8549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Prokič, M.D.; Gavrilovič, B.R.; Radovanovič, T.B.; Gavrič, J.P.; Petrovič, T.G.; Despotovič, S.G.; Faggio, C. Studying microplastics: Lessons from animal model organisms and experimental approaches. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *414*, 125476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhou, R.; Lu, G.; Yan, Z.; Bao, X.; Zhang, P.; Jiang, R. Bioaccumulation and biochemical effects of ethylhexyl methoxy cinnamate and its main transformation products in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2019**, *214*, 105241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhang, Y.; Shah, P.; Wu, F.; Liu, P.; You, J.; Goss, G. Potentiation of lethal and sub-lethal effects of benzophenone and oxybenzone by UV light in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicol.* **2021**, *235*, 105835. [[CrossRef](#)]
47. Lucas, J.; Logeux, V.; Rodrigues, A.M.S.; Stien, D.; Lebaron, P. Exposure to four chemical UV filters through contaminated sediment: Impact on survival, hatching success, cardiac frequency, and aerobic metabolic scope in embryo-larval stage of zebrafish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 29412–29420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

### 5.3 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro pstruha duhového

Předmětem této studie bylo zhodnocení toxického účinku tonalidu po dietární expozici u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) se zaměřením na stanovení biochemických a hematologických parametrů, včetně stanovení míry oxidativního stresu a histologicko-patologické analýzy vybraných tkání. Součástí experimentu bylo také posouzení xenoestrogenního potenciálu tonalidu pomocí analýzy koncentrace vitellogeninu v plazmě samců.

Výsledky experimentu poukazovaly především na indukci oxidativního stresu. Ve vzorcích tkání byly zaznamenány signifikantně významné změny hodnot TBARS v zadní ledvině pro obě testovací skupiny. Konkrétně se jednalo o signifikantně sníženou hodnotu TBARS v testovací skupině s environmentálně relevantní koncentrací tonalidu (854 µg/kg). U desetkrát vyšší testované koncentrace tonalidu (tj. 8 699 µg/kg) byla identifikována vyšší hodnota TBARS. Lipidní peroxidace tkání reprezentována hodnotami TBARS byla pozorovatelná i z histologicko-patologických preparátů, kdy se v játrech u vyšší testované koncentrace vyskytovaly rozsáhlé kongesce a v zadní ledvině byly pozorovány hyalinní degenerace, které se mohly rozvinout v důsledků poškození buněk zvýšeným množstvím volných radikálů. Hematologické vyšetření odhalilo zvýšený hematokrit pro obě testované koncentrace, tzn. jak pro environmentální koncentraci, tak i pro desetkrát vyšší koncentraci tonalidu. Důsledkem zvýšeného hematokritu byly zaznamenány také změny ve středním objemu erytrocytu (MCV) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC) a také v obsahu hemoglobinu v erytrocytu (MCH). U parametru MCV došlo u obou testovaných skupin ke zvýšení, kdežto u parametru MCH a MCHC byl zaznamenán trend opačný, tzn. snížení.

Xenoestrogenita tonalidu nebyla na základě výsledků experimentu prokázána, neboť pozitivní hodnoty koncentrace vitellogeninu byly také zaznamenány v kontrolní skupině.

Jednotlivé analýzy a výsledky studie jsou uvedeny v publikaci Hodkovicova et al. (2020).

- Hodkovicova, N., Enevova, V., **Cahova, J.**, Blahova, J., Siroka, Z., Plhalova, L., Doubkova, V., Marsalek, P., Franc, A., Fiorino, E., Faggio, C., Tichy, F., Faldyna, M., & Svobodova, Z. (2020). Could the musk compound tonalide affect physiological functions and act as an endocrine disruptor in rainbow trout? *Physiological Research*, S595–S606. **IF**<sub>2020</sub>=1,881, Q4

# Could the Musk Compound Tonalide Affect Physiological Functions and Act as an Endocrine Disruptor in Rainbow Trout?

Nikola HODKOVICOVA<sup>1</sup>, Vladimira ENEVOVA<sup>2</sup>, Jana CAHOVA<sup>2</sup>, Jana BLAHOVA<sup>2</sup>, Zuzana SIROKA<sup>2</sup>, Lucie PLHALOVA<sup>2</sup>, Veronika DOUBKOVA<sup>2</sup>, Petr MARSALEK<sup>2</sup>, Ales FRANC<sup>3</sup>, Emma FIORINO<sup>4</sup>, Caterina FAGGIO<sup>4</sup>, Frantisek TICHY<sup>5</sup>, Martin FALDYNA<sup>1</sup>, Zdenka SVOBODOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases and Preventive Medicine, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Italy, <sup>5</sup>Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Received October 8, 2020

Accepted October 24, 2020

## Summary

In the present study, the effect of polycyclic musk compound tonalide (AHTN) in two concentrations was studied in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). A feeding trial was conducted with AHTN incorporated into feed granules. One concentration was environmentally relevant (854 µg/kg); the second one was 10× higher (8699 µg/kg). The fish were fed twice a day with the amount of feed at 1 % of their body weight. After an acclimatization period, the experimental phase in duration of six weeks followed. At the end of the experiment, fish were sampled and the biometrical data were recorded. Subsequently, hematological and biochemical tests, histopathological examination, analysis of oxidative stress markers and evaluation of endocrine disruption using plasma vitellogenin were performed. In conclusion, an increase of hematocrit for both AHTN concentrations was found, but no significant changes were observed in biochemical profile. Moreover, AHTN caused lipid peroxidation in caudal kidney tissue, which was confirmed by histopathological images. The long-lasting AHTN exposure could thus be harmful for maintaining homeostasis in the rainbow trout organism. However, the vitellogenin concentration seemed not to be affected by AHTN.

## Key words

Hematology • Biochemistry • Histology • Lipid peroxidation • *Oncorhynchus mykiss*

## Corresponding author

N. Hodkovicova, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, Brno, 621 00, Czech Republic. E-mail: hodkovicova@vri.cz

## Introduction

The issue of water pollution caused by many different substances raises questions about their impact on the non-target aquatic organisms (Carlsson *et al.* 2013, Freitas *et al.* 2019, Sehonova *et al.* 2019). The musk compounds are widely used in various industries as a fragrance carrier – in perfumes, personal care products, washing powders, household detergents and sprays, candles, etc. (Nakata *et al.* 2015). They have been reported to have a potential to adversely affect non-target organisms, such as fish (Yamauchi *et al.* 2008), amphibians (Carlsson and Norrgren 2014, Pablos *et al.* 2015) and other aquatic organisms as summarized by Tumova *et al.* (2019). Both estrogenic and anti-estrogenic effects of musk have been described (Schreurs *et al.*

2004, Luckenbach and Epel 2005, Simmons *et al.* 2010) as well as genotoxicity (Parolini *et al.* 2015), neurotoxicity (Heberer 2002), photosensitive effects (Fang *et al.* 2017), the potential to cause oxidative stress (Blahova *et al.* 2018) or a change in gene expression (Shi *et al.* 2013). Due to their reported bio-cumulative effects and long-term environmental persistence caused by lipophilicity, many of them were forbidden or their usage was limited (Rimkus 1999, European Commission 2009).

In industrial sector, synthetic musk compounds are replacing the natural ones (Li *et al.* 2020). One of the main musk groups used are polycyclic musk compounds (PCMs), while tonalide (AHTN) and galaxolide (HHCB) are most abundant (Vallecillos *et al.* 2015). Their ability to enter surface water and sediment was documented in many studies (Rimkus 1999, Wong *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2020) and the waste water treatment plant's (WWTP) effluent was detected as the main environmental source of PCMs (Ramierz *et al.* 2009, Homem *et al.* 2015). At WWTP, the purification of the musk compounds is less than 100 % effective and depends on the applied technology. For example, the cleaning process for AHTN was reported not to be higher than 84 % (Ren *et al.* 2013) or 89 % (Wombacher and Hornbuckle 2009). Based on the study by Peck and Hornbuckle (2004), AHTN is adsorbed to sludge during the WWTP process. The AHTN concentration in WWTP influent was found to range between 49.9 and 64.6 µg/l (Chen *et al.* 2007, Vallecillos *et al.* 2015), while in the sludge the concentration was up to 169.3 mg/kg (Zeng *et al.* 2005).

The aim of the present study was to assess whether oral exposure to AHTN could affect hematological and biochemical indices in rainbow trout. Moreover, its effects on oxidative stress were evaluated, as well as the effects on vitellogenin (VTG) concentrations in male fish plasma due to its possible xenoestrogenic potential. The impact on selected organs was evaluated by histopathological analysis. The AHTN concentrations tested in our experiment were selected according to the concentrations detected in surface water as discussed above and summarized, for example, by Blahova *et al.* (2008) and Tumova *et al.* (2019). As well, the maximum concentrations detected in wild fish tissues were taken into consideration, while they were determined up to 52.1 µg/kg and 349 µg/kg in common carp's (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) muscle and liver tissue, respectively; or even up to 3700 µg/kg lipid weight in sea trout's (*Salmo trutta*, Linnaeus 1758)

muscle (Fromme *et al.* 2001, Kannan *et al.* 2005, Lange *et al.* 2015, Yao *et al.* 2018). The bioconcentration and bioaccumulation factors in wild fish species were considered for these concentrations to be environmentally relevant and also for testing the dose-dependent effects.

## Methods

### *Ethical statement*

After approval by the institutional ethical committee, the experiment was carried out in accordance with institutional guidelines and national legislation (Act No. 246/1992 Coll., on the Protection of Animals against Cruelty, as amended).

### *Experimental design & fish condition*

The trial was conducted at the Dpt. of Ecology & Diseases of Zooanimals, Game, Fish and Bees at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czechia. A total of 60 male juveniles of rainbow trout from *Skalni Mlyn* hatchery were obtained (total length 32.2±2.2 cm, weight 516.8±102.9 g) and acclimated to the laboratory conditions for two weeks. The aquaria (n=6) were connected to a recirculation system, while the condition of water was monitored every 24 h and was as follows: temperature 14.5-15.6 °C, dissolved oxygen >70 %, pH 7.9-8.3, total ammonia <0.03 mg/l, chlorides 26.71 mg/l, ammonia 0.23 mg/l, nitrites 0.12 mg/l, nitrates 45.44 mg/l. Every aquarium was individually aerated. Fish were held at a 12 h/12 h light to dark photoperiod during both the acclimatization and experimental phase. The probe Oxi 340i and pH 340i digital sampling systems were applied for measurement of O<sub>2</sub> and pH in water (WTWGmbH, Germany). The spectrophotometric methods according to the Animal and Plant Health Agency (APHA 2017) methodology was used for determination of ammonia and nitrites in water samples (method No. 4500-NH<sub>3</sub>, 4500-NO<sub>2</sub>).

During the acclimatization period, fish were fed with commercial pellets EFICO Enviro 920 Advance 4.5 mm (Biomar, Denmark) twice a day with the amount of feed at 1 % of their body weight. The composition of feeding pellets was as follows: 41-44 % crude protein, 28-31 % crude lipid, 13-16 % carbohydrates, 0.7-2.2 % crude fiber, 4-7 % ash, 0.9 % total phosphorus. During the experimental phase, the same amount of feed was given to the fish, but with addition of AHTN. Every 14 days of the experimental phase, the fish were re-weighed and the amount of feed per day was recalculated.

At the beginning of the experimental phase, the fish were randomly divided into three groups – control, AHTN1 and AHTN2 (n=20/per group); each group was divided and placed into two aquaria. The AHTN was tested in two concentrations which were incorporated into fish feed using a specific methodology described in detail by Modra *et al.* (2020). The first tested concentration was environmentally-relevant: 854 µg/kg, thereafter designated as AHTN1. The second concentration, thereafter labelled as AHTN2, was ten times higher: 8699 µg/kg. The feed for the control group was prepared in the same way, but without the use of AHTN. After six weeks of the experimental phase, all fish were sampled.

The monitored biometrical data were as follows: total and standard length (cm), wet weight (g) and weight of liver and gonads (g). For the measurement, a digital balance with an accuracy of up to 0.01 g was used. The wet weight and standard length were used for setting the Fulton's condition factor (CF) according to formula:  $CF = (\text{wet weight [g]} / \text{standard length [cm]}^3) \times 100$  (Froese 2006). The hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI) were calculated as:  $HSI (GSI) = (\text{weight of tissue [g]} / \text{fish wet weight [g]}) \times 100$  (Mazlan and Rohaya 2008).

#### *Determination of AHTN in the feed*

The measurement of AHTN was performed by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). A 5 g representative portion of fish feed granules was homogenized and extracted into cyclohexane (10 ml). The extract was filtered through a 0.7 µm glass filter (Millipore, USA) and used for GC/MS/MS analysis. The separation, identification, and quantification of AHTN were carried out using a Varian 450-GC gas chromatograph with a Varian 220-MS ion trap mass spectrometer equipped with electron ionization and VF-5ms (30 m×0.25 mm) column (Varian, Inc., USA). A 1 µl aliquot of sample extract was injected in a split mode. The injector temperature was 250 °C. The initial oven temperature was set at 50 °C for 1 min, increased at a rate of 35 °C/min to 280 °C, held for 1 min, increased at a rate of 20 °C/min to 300 °C and held for 5 min. The total run time was 14.57 min. The ion trap mass spectrometer was operated in MS/MS mode. The most abundant ion (m/z=243) was selected as a parent ion and ion m/z=187 was selected as a product ion. A standard of AHTN was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Cyclohexane was GC/MS-grade purity (Chromservis, Czech Republic). For our

QA/QC program, the instrument was calibrated daily with multi-level calibration curves. Procedural blank and solvent blank were analysed for every set of 10 samples. The spiked recovery was 103 %. The reported concentrations after corrections are based on the recovery. The coefficient of variation for between-series was 6.1 %. The limit of detection was determined as 3:1 signal versus noise value and was 0.8 µg/kg.

#### *Hematological analysis*

The blood was taken from each fish from the caudal vein using an aspiration syringe and was stabilized with sodium heparin (50 IU per 1 ml of blood). After that, the fish were immediately stunned with a blow in the head, killed by spinal transection and submitted to autopsy. Each fish was weighed and measured, while the weight of the organs was also recorded. The whole blood was used for the red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) count determination with the use of the Burkner hemocytometer to which the heparinized blood diluted with Natt-Herrick solution at a 1:200 ratio was applied. For the hematocrit (PCV) determination, the microhematocrit method with centrifugation of blood in capillary tubes was employed. The photometric cyanohemoglobin method at 540 nm was applied for the determination of hemoglobin concentration (Hb). Additionally, the mean erythrocyte hemoglobin (MCH), mean erythrocyte volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated with using the PCV, Hb and RBC data. All hematological analyses were performed based on the methodology by Svobodova *et al.* (2012).

#### *Biochemical analysis*

One half of each fish blood sample was centrifuged (800×g, 4°C, 10 min). In the obtained plasma, albumin (ALB), ammonia (NH<sub>3</sub>), total protein (TP), glucose (GLU), triglycerides (TG), cholesterol (CHOL), lactate (LACT), calcium (Ca), phosphorus (PHOS), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were evaluated. Biochemical parameters were determined using the commercial kit (BioVendor PCL, Czech Republic) and biochemical analyser Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Czech Republic) following the manufacturer's instructions.

#### *VTG analysis*

The VTG concentration was detected in plasma

samples using a commercial ELISA kit (Biosense Laboratories, Norway) following the manufacturer's instructions. The samples were taken from all fish (n=60, 20 pcs/group), while males in the control group without exposure to AHTN served as a negative control.

#### *Oxidative stress analysis*

For oxidative stress evaluation, the activity of ceruloplasmin (CP) and ferric reducing ability of plasma (FRAP) were determined in plasma samples. The CP was determined spectrophotometrically using a Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific Inc., USA) according to Ceron and Martinez-Subiela (2004) methodology. The results are expressed as an amount of absorbance increase per minute  $\times 10000$ . The FRAP was analysed according to the Benzie and Strain method (1996) with the use of a biochemical analyser Konelab 20i.

The analysis of oxidative stress enzymes was performed in organs, specifically in liver, caudal kidney, gill and gonad tissue. The monitored parameters were glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) and thiobarbituric acid-substances (TBARS). The organs were individually homogenized and the homogenates were then divided into two parts. The first part was used for TBARS determination and the second part was centrifuged (11000 $\times$ g, 4 °C for 20 min) and the obtained supernatant was submitted to GR, GPx and GST analysis. The catalytic activities were determined spectrophotometrically with use of a Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The GR activity was measured by determination of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidation at 340 nm according to the method of Carlberg and Mannervik (1975). The GPx activity determination was based on the NADPH oxidation rate and the reaction with GR at 340 nm (Flohe and Gunzler 1984). Both GR and GPx were expressed as nmol of NADPH consumption per min per mg of protein. The GST activity was detected using the Habig *et al.* (1974) methodology based on conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione at 340 nm and was expressed as nmol of the formed product per min per mg of protein. The Bicinchoninic Acid Protein Essay Kit (Sigma-Aldrich, USA) was employed for establishing of protein concentration with the use of bovine serum ALB as a standard (Smith *et al.* 1985). The levels of TBARS were determined by malondialdehyde measurement at

535 nm (Lushchak *et al.* 2005) and were expressed as TBARS in nmol per gram of tissue. The TBARS concentrations were not determined in gonads due to a lack of tissue.

#### *Histopathological analysis*

The tissue of liver, cranial and caudal kidney, gill (upper limb of arch), spleen, gonads and skin (above the ventral fin) was dissected from each fish and submitted to histological analysis. Samples were fixed in buffered 10 % neutral formalin, thereafter dehydrated and embedded in paraffin wax. Samples were sliced at a thickness of 4  $\mu$ m using the microtome tool. All samples were stained with hematoxylin-eosin dye and examined with light microscope.

#### *Statistical analysis*

The statistical software Unistat for Excel 6.5 (Unistat Ltd., UK) was employed for performing of the statistical analysis. Firstly, all data were tested for normality distribution using the Shapiro-Wilk test. In case of normality achievement, the analysis of variance and Tukey-HSD test were employed; while the Kruskal-Wallis nonparametric test was applied for data with non-normal distribution. The control, AHTN1 and AHTN2 groups were compared and data were considered as statistically significant when  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## **Results**

#### *Mortality, behaviour and health status*

No mortality of fish was observed and the fish behaviour was not changed during any part of the experiment. Fish subjected to the trial were without bacterial, viral or parasitic infection at the beginning and at the end of the experiment. No significant changes were found in biometric indices thus these data are not presented.

#### *Hematological profile*

The only observable changes of hematological profile were found for PCV where a significant increase was detected for both concentrations of AHTN. The PCV increase in both concentrations was significantly different from the control group. However, the AHTN1 and AHTN2 groups did not differ between each other. Consequently, the changes in PCV parameter caused changes in MCV and MCHC levels, specifically the

MCV increased after exposure to AHTN and, in contrast, the MCHC decreased. The MCH levels were also significantly different; a decrease in both AHTN concentrations was observed when compared to the

control group. The other hematological parameters were not changed. An overview of hematological analysis after the induction of changes with AHTN is given in Table 1.

**Table 1.** Hematological and biochemical indices after oral exposure to two different concentrations of tonalide (AHTN): AHTN1 (854 µg/kg) and AHTN2 (8699 µg/kg).

Parameter [unit]	Control	AHTN1	AHTN2
<i>Hematological indices</i>			
RBC [T/l]	1.37 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.06 <sup>a</sup>
Hb [g/l]	83.87 ± 3.08 <sup>a</sup>	80.72 ± 1.73 <sup>a</sup>	78.21 ± 2.25 <sup>a</sup>
PCV [l/l]	0.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a,b</sup>
MCV [fl]	262.07 ± 11.75 <sup>b</sup>	295.90 ± 11.44 <sup>a,b</sup>	307.18 ± 11.44 <sup>a</sup>
MCH [pg]	60.97 ± 2.72 <sup>a</sup>	52.92 ± 1.98 <sup>b</sup>	54.45 ± 1.87 <sup>a,b</sup>
MCHC [g/l]	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a,b</sup>
WBC [G/l]	18.03 ± 1.43 <sup>a</sup>	19.54 ± 2.17 <sup>a</sup>	17.36 ± 1.45 <sup>a</sup>
<i>Biochemical indices</i>			
ALB [g/l]	18.21 ± 0.86 <sup>a</sup>	20.24 ± 0.60 <sup>a</sup>	18.58 ± 0.69 <sup>a</sup>
NH <sub>3</sub> [µmol/l]	240.30 ± 16.24 <sup>a</sup>	245.17 ± 18.09 <sup>a</sup>	262.13 ± 21.52 <sup>a</sup>
TP [g/l]	36.37 ± 1.32 <sup>a</sup>	39.68 ± 0.96 <sup>a</sup>	36.41 ± 1.06 <sup>a</sup>
GLU [mmol/l]	4.28 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.89 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.09 <sup>a</sup>
TG [mmol/l]	2.54 ± 0.31 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.62 ± 0.51 <sup>a</sup>
CHOL [mmol/l]	7.47 ± 0.38 <sup>a</sup>	8.49 ± 0.26 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.37 <sup>a</sup>
LACT [mmol/l]	2.36 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.26 <sup>a</sup>
Ca [mmol/l]	2.56 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.05 <sup>a</sup>
PHOS [mmol/l]	3.93 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.98 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.09 <sup>a</sup>
ALP [µkat/l]	1.06 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.09 <sup>a</sup>
ALT [µkat/l]	0.29 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>
AST [µkat/l]	6.30 ± 0.76 <sup>a</sup>	5.80 ± 0.44 <sup>a</sup>	6.08 ± 0.28 <sup>a</sup>
LDH [µkat/l]	12.04 ± 1.03 <sup>a</sup>	9.88 ± 0.78 <sup>a</sup>	12.46 ± 1.76 <sup>a</sup>

Data are given as mean ± SD; n=20/group. Means in the same row lacking a common letter of superscript (**a**, **b**) differ significantly (p<0.05). RBC – red blood cells count, Hb – hemoglobin concentration, PCV – hematocrit, MCV – mean erythrocyte volume, MCH – mean erythrocyte hemoglobin, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC – white blood cell count.

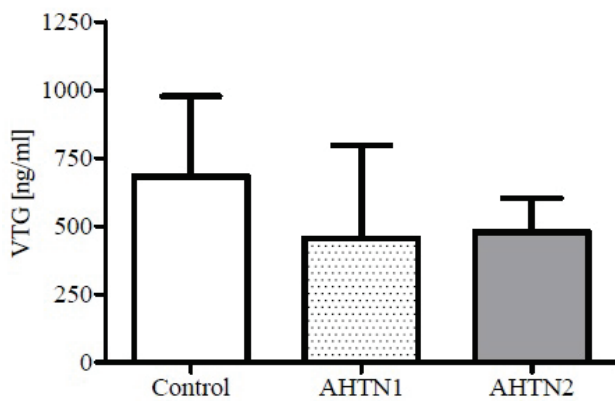
#### Biochemical profile

Surprisingly, there were no significant changes in any observed biochemical parameter and all the indices were at physiological levels. An overview of biochemical analysis results is presented in Table 1.

#### VTG

The VTG concentration was measured in plasma samples of both AHTN exposure groups in comparison with the control group. Surprisingly, even though the

control group consisted of males, which should have served as a negative control, 20 % samples were positive with VTG levels between 303 and 985 ng/ml. With the lower concentration (AHTN1), the VTG concentration ranged between 173 and 945 ng/ml in 25 % samples. However, in the higher concentration (AHTN2), positivity was detected in 15 % cases with a concentration range from 362 to 609 ng/ml. The results are shown in Figure 1.



**Fig. 1.** The concentration of vitellogenin (VTG) in ng/ml in plasma samples after oral exposure to two different concentrations of tonalide (AHTN): AHTN1 (854 µg/kg) and AHTN2 (8699 µg/kg). Data are given as mean ± SD; n=20/group. No significant changes were found among the tested groups (p>0.05).

#### Oxidative stress profile

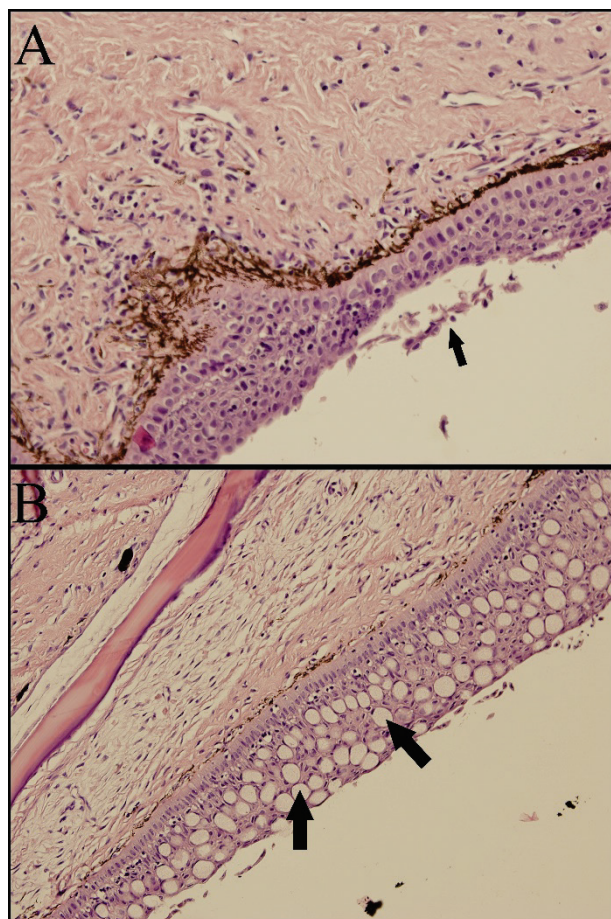
Oxidative stress was measured in both plasma and tissue samples. In the case of plasma, CP and FRAP did not show any significant changes. For tissue samples, significant changes were detected in the caudal kidney tissue where TBARS control levels significantly differed from both AHTN1 and AHTN2. In AHTN1, a decrease was observed as compared with the control, while, in contrast, a significant increase was detected for AHTN2. The results are given in Table 2.

#### Histopathological profile

The histopathological changes in AHTN1 and AHTN2 groups showed congestion and mixed hepatodystrophy in all liver tissues. In the control group,

**Table 2.** Oxidative stress parameters in plasma, liver, caudal kidney, gill and gonads after oral exposure to two different concentrations of tonalide (AHTN): AHTN1 (854 µg/kg) and AHTN2 (8699 µg/kg). Data are given as mean ± SD; n=20/group. Means in the same row lacking a common superscript letter (**a**, **b**) differ significantly (p<0.05). CP – ceruloplasmin, FRAP – reducing ability of plasma, GR – glutathione reductase, GPx – glutathione peroxidase, GST – glutathione-S-transferase, TBARS – thiobarbituric acid-substances.

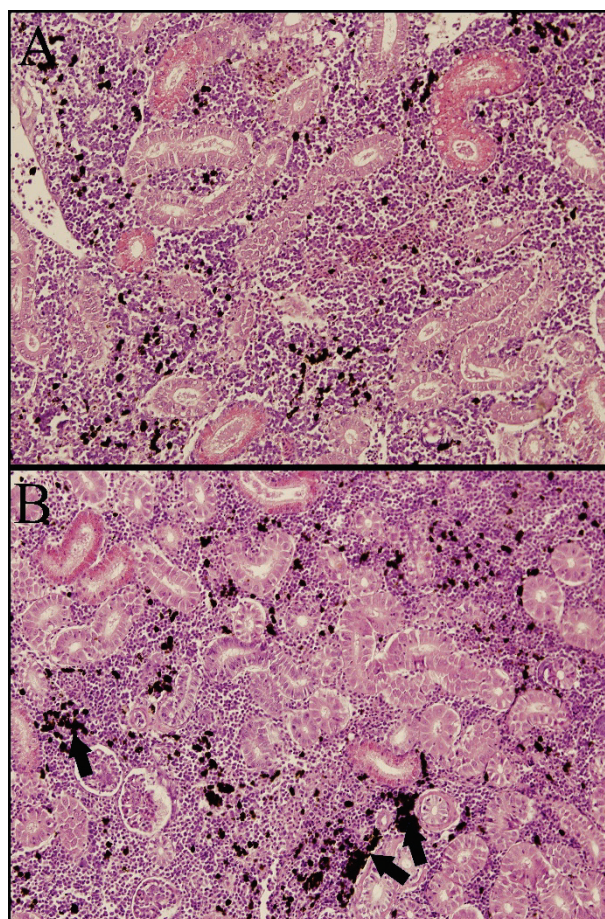
Parameter [unit]	Control	AHTN1	AHTN2
<i>Plasma</i>			
CP [ $\Delta A/\text{min} \times 10000$ ]	113.3 ± 3.3 <sup>a</sup>	120.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	114.1 ± 4.2 <sup>a</sup>
FRAP [ $\mu\text{mol/l}$ ]	748.7 ± 42.6 <sup>a</sup>	759.6 ± 22.0 <sup>a</sup>	805.4 ± 22.7 <sup>a</sup>
<i>Liver</i>			
GR [nmol NADPH/min/mg protein]	13.3 ± 5.9 <sup>a</sup>	10.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	10.9 ± 5.6 <sup>a</sup>
GPx [nmol NADPH/min/mg protein]	35.1 ± 10.1 <sup>a</sup>	37.5 ± 10.5 <sup>a</sup>	34.7 ± 9.0 <sup>a</sup>
GST [nmol/min/mg protein]	683.2 ± 184.6 <sup>a</sup>	785.4 ± 194.8 <sup>a</sup>	681.6 ± 178.6 <sup>a</sup>
TBARS [nmol/g of tissue]	22.8 ± 20.0 <sup>a</sup>	19.0 ± 9.4 <sup>a</sup>	22.9 ± 11.2 <sup>a</sup>
<i>Caudal kidney</i>			
GR [nmol NADPH/min/mg protein]	11.0 ± 3.7 <sup>a</sup>	9.4 ± 2.3 <sup>a</sup>	10.3 ± 3.1 <sup>a</sup>
GPx [nmol NADPH/min/mg protein]	65.6 ± 16.8 <sup>a</sup>	58.4 ± 14.6 <sup>a</sup>	57.2 ± 18.2 <sup>a</sup>
GST [nmol/min/mg protein]	393.4 ± 206.8 <sup>a</sup>	440.2 ± 170.9 <sup>a</sup>	411.0 ± 242.6 <sup>a</sup>
TBARS [nmol/g of tissue]	10.0 ± 10.6 <sup>a,b</sup>	8.4 ± 5.0 <sup>b</sup>	12.9 ± 7.8 <sup>a</sup>
<i>Gill</i>			
GR [nmol NADPH/min/mg protein]	13.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	11.8 ± 3.6 <sup>a</sup>	11.5 ± 2.3 <sup>a</sup>
GPx [nmol NADPH/min/mg protein]	62.0 ± 13.4 <sup>a</sup>	65.7 ± 12.0 <sup>a</sup>	64.6 ± 10.3 <sup>a</sup>
GST [nmol/min/mg protein]	280.6 ± 98.1 <sup>a</sup>	238.4 ± 65.4 <sup>a</sup>	214.7 ± 72.0 <sup>a</sup>
TBARS [nmol/g of tissue]	20.2 ± 7.9 <sup>a</sup>	22.7 ± 11.7 <sup>a</sup>	24.0 ± 15.0 <sup>a</sup>
<i>Gonads</i>			
GR [nmol NADPH/min/mg protein]	11.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	11.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	10.6 ± 4.6 <sup>a</sup>
GPx [nmol NADPH/min/mg protein]	30.9 ± 12.5 <sup>a</sup>	28.7 ± 5.0 <sup>a</sup>	28.0 ± 7.8 <sup>a</sup>
GST [nmol/min/mg protein]	115.3 ± 57.0 <sup>a</sup>	93.9 ± 27.6 <sup>a</sup>	102.4 ± 39.0 <sup>a</sup>



**Fig. 2.** The histopathological findings in skin tissue after oral exposure to two different concentrations of tonalide (AHTN): AHTN1 (854  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and AHTN2 (8699  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The control group (**A**) with artificial superficial erosion (black arrow), otherwise without pathological findings. The AHTN2 group (**B**) with numerous mucinous cells (black arrows). H-E staining, magnification 400 $\times$ .

dystrophy was also observed together with small deposits of pigments; otherwise, the liver tissue in the control was without gross lesions. For the cranial kidney, congestion was observed along with hyaline degeneration of some tubules in AHTN1; in higher concentration, congestion was observed simultaneously with small deposits of pigments – the same finding as in the control group. In contrast, the caudal kidney showed multiple pigment deposits with intact parenchyma in AHTN1 and congestion with hyaline degeneration of some tubules in AHTN2. In the control, pigment deposits with hyaline droplets in some tubules of the caudal kidney were. The gill lamellas were hypertrophic and vacuolization together with surface alterations was observed in AHTN1. In AHTN2, total devastation of lamellas with inflammatory lesions was observed. The control group was intact. Spleen tissue in both AHTN1 and AHTN2 showed congestion with intact parenchyma; the same findings were observed in the

control group. Skin tissue in the control was without gross lesions; the higher the AHTN concentration, the more mucinous cells were observed and, in AHTN2, myodystrophy was also revealed. The gonads were completely intact in the control and both experimental groups. The histopathological changes of skin tissue and caudal kidney compared to control group are presented in Figure 2 and 3, respectively.



**Fig. 3.** The histopathological findings in caudal kidney tissue after oral exposure to two different concentrations of tonalide (AHTN): AHTN1 (854  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and AHTN2 (8699  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The control group (**A**) with normal tubular system and some pigmented deposits. The AHTN2 group (**B**) with droplet hyaline degeneration of some tubules (black arrows). H-E staining, magnification 200 $\times$ .

## Discussion

The presence of PCMs, and AHTN specifically, was observed in many environmental matrices, due to not 100 % effective water purification and high bioaccumulation capacity and stability (Li *et al.* 2020). Thus, AHTN presence was detected in surface water, drinking water, sediment or even in the air and biota, as

reviewed by Tumova *et al.* (2019). The aquatic biota is the main vulnerable group due to the reported adverse effects on the health of its organisms, as discussed above. As the model organism for our study, the rainbow trout was selected to be the typical fish in our country with a high bioaccumulation level and, to our knowledge, no PCMs toxicity testing has ever been performed in this organism.

According to biometrical analysis, hematological and biochemical indices, there were significant changes in PCV which increased in both AHTN1 and AHTN2. Additionally, the MCV also increased depending on AHTN concentration; in contrast, the MCH and MCHC were significantly decreased in both tested AHTN concentrations. These findings indicated that erythrocytes could become swollen by induction with AHTN, as it was previously documented in fish by sudden pH changes (Harter *et al.* 2018); the swelling could lead to irregularities in physiological functions of erythrocytes (Javed *et al.* 2016). The prolonged exposure to higher AHTN concentrations could thus be harmful for maintaining homeostasis.

The main goal of our experiment was to assess the endocrine disruption effects of AHTN, while the production of VTG served as a marker of xenoestrogenic potential. VTG is a precursor of egg yolk and is synthesized in female liver. Even though the juveniles and males also have the gene for VTG synthesis present in their genetic equipment, gene expression does not occur. However, some chemicals with endocrine-disruptive potential can induce VTG synthesis and its production and this potential were also reported for AHTN (Sumpter and Jobling 1995, Jobling *et al.* 1996, Yamauchi *et al.* 2008). In our experiment, 25 % and 15 % of the samples were positive for VTG in the AHTN1 and AHTN2 groups, respectively. Even though 20 % of samples were positive in the control group, the concentration levels were just slightly above the detection limit. The differences in total VTG concentrations in plasma between the control and both tested AHTN groups were without statistical significance and were not higher than 1000 ng/ml. In contrast, the physiological VTG detection limit is 200 to million-fold higher in females than males depending on their sexual maturity (Copeland *et al.* 1986, Wozny *et al.* 2020). The positivity in some of our negative control samples was probably caused by the fish origin as they were taken from natural water sources where chemicals with endocrine-disrupting potential

could be present. In summary, due to the detected VTG levels in male samples, endocrine disruption caused by AHTN was not confirmed for rainbow trout.

The induction of oxidative stress in tissues after AHTN exposure was previously reported in earthworm (Chen *et al.* 2011), zebra mussel (Parolini *et al.* 2015), shrimp larvae (Li *et al.* 2020) and zebrafish (Blahova *et al.* 2018). The multiplication of free radicals could lead to cellular or tissue damage because they are not completely disposed by antioxidant enzymes. In our study, the oxidative stress marker TBARS was significantly increased in caudal kidney tissue in AHTN2. The TBARS is a marker of lipid peroxidation and its analysis includes not only detection of the major formed substance, malondialdehyde (MDA), but also the minor related compounds developing in response to oxidative stress (Wang *et al.* 2014, Chen *et al.* 2012). When the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758) was exposed to another PCM representative, HHCB, the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) was significantly elevated with a correlation to higher tested HHCB concentrations. Additionally, MDA in fish liver also increased. In the same study, the prolonged HHCB exposure led to modulation of antioxidant defense system and the enzyme levels returned to their initial levels after 21 days. Similarly, increased levels of superoxide dismutase, catalase, GST and MDA were observed in shrimp larvae after their exposure to AHTN by Li *et al.* (2020). In our study, the environmentally-relevant AHTN1 concentration was probably tolerable for fish with the origin in free nature and the antioxidant capacity was able to maintain a balance. However, with a 10-times higher concentration, the TBARS content significantly increased, thus confirming the disruption of the cell antioxidant defense system in caudal kidney.

The histopathological findings on the caudal kidney in AHTN2 revealed congestion and hyaline degeneration of some tubules (Fig. 3) which could have developed as a response to AHTN and formed reactive oxygen species causing oxidative stress in cells. Additionally, some pathological findings were discovered in the liver and skin histological images. The hepatic dystrophy in liver tissue is a response to toxic effects of AHTN, as previously reported in the case of other PCMs including AHTN for Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* (Wan *et al.* 2007), medaka *Oryzias latipes* (Yamauchi *et al.* 2008) and goldfish *C. auratus* (Chen *et al.* 2012). In

the case of skin, hyperplasia of mucinous cells was found. These cells are responsible for production of the mucous layer on the fish body surface serving as the innate immune barrier (Dash *et al.* 2018). Multiplication of these cells is a response to disruption of the physiological barrier, which could, if severe, lead to a lower ability to defend the body against pathogens, while fish mucus includes many bactericidal substances for fish protection. Together with the observed hepatic dystrophy, the presence of AHTN in surface water could be potentially harmful to the fish organism and maintaining homeostasis.

Based on the data collected in this study, the presence of AHTN in surface waters can lead to disruptions in physiological parameters and have a potential to cause tissue damage and metabolic disorders as a result of lipid peroxidation in rainbow trout. However, no effect on mortality, behaviour, biochemical profile and endocrine disruption was observed in our experiment.

## References

- APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd. BAIRD RB, EATON AD, RICE EW (eds), American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington D.C., 2017, 1504 p.
- BENZIE IFF, STRAIN JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- BLAHOVA J, DIVISOVA L, PLHALOVA L, ENEVOVA V, HOSTOVSKY M, DOUBKOVA V, MARSALEK P, FICTUM P, SVOBODOVA Z: Multibiomarker responses of juvenile stages of zebrafish (*Danio rerio*) to subchronic exposure to polycyclic musk tonalide. *Arch Environ Con Tox* 74: 568-576, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0484-8>
- CARLBERG I, MANNERVIK B: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250: 5475-5480, 1975.
- CARLSSON G, PATRING J, KREUGER J, NORRGREN L, OSKARSSON A: Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol* 126: 30-41, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.008>
- CARLSSON G, NORRGREN L: Comparison of embryo toxicity using two classes of aquatic vertebrates. *Environ Toxicol Pharmacol* 37: 24-27, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.015>
- CERON JJ, MARTINEZ-SUBIELA S: An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res* 35: 671-679, 2004. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004046>
- CHEN C, ZHOU Q, LIU S, XIU Z: Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere* 83: 1147-1154, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.006>
- CHEN D, ZENG X, SHENG Y, BI X, GUI H, SHENG G, FU J: The concentrations and distribution of polycyclic musks in a typical cosmetic plant. *Chemosphere* 66: 252-258, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.024>

## Conclusions

In conclusion, the result of our experiment showed that the musk compound AHTN has no effect on mortality, behaviour and hematological or biochemical indices, except for PCV, which increased after exposure to both tested concentrations. Formation of reactive oxygen species was not found in plasma samples, based on CP and FRAP results. However, the induction of lipid peroxidation was confirmed in caudal kidney. The xenoestrogenic potential of AHTN was not confirmed.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

## Acknowledgements

Project was funded by the ERDF/ESF "PROFISH" [no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869]. Authors would like to thank Mrs. Ludmila Faldikova for manuscript improvement and English correction.

- CHEN F, GAO J, ZHOU QX: Toxicity assessment of simulated urban runoff containing polycyclic musks and cadmium in *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Environ Pollut* 162: 91-97, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.016>
- COPELAND PA, SUMPTER JP, WALKER TK, CROFT M: Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Phys B* 83: 487-493, 1986. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90400-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90400-1)
- DASH S, DAS SK, SAMAL J, THATOI HN: Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iran J Vet Res* 19: 72-81, 2018.
- EUROPEAN COMMISSION: Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. In: *Official Journal of the European Union*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=EN> [2019-08-23], 151 pp, 2009.
- FANG H, GAO Y, WANG H, YIN H, LI G, AN T: Photoinduced oxidative damage to dissolved free amino acids by the photosensitizer polycyclic musk tonalide: Transformation kinetics and mechanisms. *Water Res* 115: 339-346, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.006>
- FLOHE L, GUNZLER WA: Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- FREITAS R, SILVESTRO S, COPPOLA F, MEUCCI V, BATTAGLIA F, INTORRE L, SOARES AMVM, PRETTI C, FAGGIO C: Biochemical and physiological responses induced in *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to salicylic acid. *Aquat Toxicol* 214: 105258, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105258>
- FROESE R: Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol* 22: 241-253, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>
- FROMME H, OTTO T, PILZ K: Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Res* 35: 121-128, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00233-5)
- HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974.
- HARTER TS, MAY AG, FEDERSPIEL WJ, SUPURAN CT, BRAUNER CJ: Time course of red blood cell intracellular pH recovery following short-circuiting in relation to venous transit times in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315: 397-407, 2018. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00062.2018>
- HEBERER T: Occurrence, fate, and assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas - a review. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 30: 227-243, 2002. <https://doi.org/10.1002/aheh.200390005>
- HOMEM V, SILVA JA, RATOLA N, SANTOS L, ALVES A: Long lasting perfume - A review of synthetic musks in WWTPs. *J Environ Manag* 149: 168-192, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.008>
- JAVED M, AHMAD I, AHMAD A, USMANI N, AHMAD M: Studies on the alterations in haematological indices, micronuclei induction and pathological marker enzyme activities in *Channa punctatus* (spotted snakehead) perciformes, channidae exposed to thermal power plant effluent. *SpringerPlus* 5: 761, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2478-9>
- JOBLING S, SHEAHAN D, OSBORNE JA, MATTHIESSEN P, SUMPTER JP: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15: 194-202, 1996. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150218>
- KANNAN K, REINER JL, YUN SH, PERROTTA EE, TAO L, JOHNSONRESTREPO B, RODAN BD: Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere* 61: 693-700, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.041>
- LANGE C, KUCH B, METZGER JW: Occurrence and fate of synthetic musk fragrances in a small German river. *J Hazard Mater* 282: 34-40, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.027>
- LI W, WANG S, LI J, WANG X, CUI L, CHEN J, LIU Z: Antioxidative enzyme activities in the *Rhodeinae sinensis* Gunther and *Macrobrachium nipponense* and multi-endpoint assessment under tonalide exposure. *Ecotox Environ Safe* 199: 110751, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110751>
- LUCKENBACH T, EPEL D: Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environ Health Perspect* 113: 17-24, 2005. <https://doi.org/10.1289/ehp.7301>

- LUSHCHAK VI, BAGNYUKOVA TV, LUSHCHAK OV, STOREY JM, STOREY KB: Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1319-1330, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>
- MAZLAN AG, ROHAYA M: Size, growth and reproductive biology of the giant mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri* (Pallas, 1770), in Malaysian waters. *J Appl Ichthyol* 24: 290-296, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.01033.x>
- MODRA H, PALIKOVA M, HYRSL P, BARTONKOVA J, PAPEZIKOVA I, SVOBODOVA Z, BLAHOVA J, MARES J: Effects of trichothecene mycotoxin T-2 toxin on haematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mycotoxin Res* 36: 319-326, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00396-7>
- NAKATA H, HINOSAKA M, YANAGIMOTO H: Macrocyclic-, polycyclic-, and nitromusks in cosmetics, household commodities and indoor dusts collected from Japan: implications for their human exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 111: 248-255, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.032>
- PABLOS MV, JIMÉNEZ MÁ, SEGUNDO LS, MARTINI F, BELTRÁN E, FERNÁNDEZ C: Effects of dietary exposure of polycyclic musk HHCB on the metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem* 35: 1428-1435, 2015. <https://doi.org/10.1002/etc.3286>
- PAROLINI M, MAGNI S, TRAVERSI I, VILLA S, FINIZIO A, BINELLI A: Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *J Hazard Mater* 285: 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.037>
- PECK A, HORNBUCKLE K: Synthetic musk fragrances in Lake Michigan. *Environ Sci Technol* 38: 367-382, 2004. <https://doi.org/10.1021/es034769y>
- RAMIERZ A, BRAIN R, USENKO S, MOTTALEB M, O'DONNELL JG, STAHL LL, WATHEN JB, SNYDER BD, PITT, JL, PEREZ-HURTADO P, DOBBINS LL, BROOKS BW, CHAMBLISS CK: Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: Results of a national pilot study in the United States. *Environ Toxicol Chem* 28: 2587-2597, 2009. <https://doi.org/10.1897/08-561.1>
- REN Y, WEI K, LIU H, SUI G, WANG J, SUN Y, ZHENG X: Occurrence and removal of selected polycyclic musks in two sewage treatment plants in Xi'an, China. *Front Env Sci Eng* 7: 166-172, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11783-012-0471-2>
- RIMKUS GG: Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicol Lett* 111: 37-56, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00191-5)
- SCHREURS RHMM, LEGLER J, ARTOLA-GARICANO E, SINNIGE TL, LANSER PH, SEINER W, VAN DER BURG B: In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish. *Environ Sci Technol* 38: 997-1002, 2004. <https://doi.org/10.1021/es034648y>
- SEHONOVA P, HODKOVICOVA N, URBANOVA M, ORN S, BLAHOVA J, SVOBODOVA Z, FALDYNA M, CHLOUPEK P, BRIEDIKOVA K, CARLSSON G: Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. *Environ Pollut* 254: 112999, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112999>
- SHI J, LI M, JIAO Z, ZHANG J, FENG Y, SHAO B: Microarray analysis of gene expression in mouse (Strain 129) embryonic stem cells after typical synthetic musk exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 90: 17-21, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0865-7>
- SIMMONS DBD, MARLATT VL, TRUDEAU VL, SHERRY JP, METCALFE CD: Interaction of Galaxolide® with the human and trout estrogen receptor- $\alpha$ . *Sci Total Environ* 408: 6158-6164, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.027>
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- SUMPTER JP, JOBLING S: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178, 1995. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7173>
- SVOBODOVA Z, PRAVDA D, MODRA H: Unified Methods of Haematological Examination of Fish. University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Czech Republic, 2012, 38 p.

- 
- TUMOVA J, SAUER P, GOLOVKO O, UCUN OK, GRABIC R, MACHOVA J, KOCOUR KROUPOVA H: Effect of polycyclic musk compounds on aquatic organisms: A critical literature review supplemented by own data. *Sci Total Environ* 651: 2235-2246, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.028>
- VALLECILLOS L, BORRULL F, POCURULL E: Recent approaches for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples. *Trend Anal Chem* 72: 80-92, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.022>
- WAN Y, WEI Q, HU J, JIN X, ZHANG Z, ZHEN H, LIU J: Levels, tissue distribution, and age-related accumulation of synthetic musk fragrances in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*): comparison to organochlorines. *Environ Sci Technol* 41: 424-430, 2007. <https://doi.org/10.1021/es061771r>
- WANG XN, LIU ZT, WANG WH, YAN ZG, ZHANG C, WANG WL, CHEN LH: Assessment of toxic effects of triclosan on the terrestrial snail (*Achatina fulica*). *Chemosphere* 108: 225-230, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.044>
- WOMBACHER W, HORNBUCKLE K: Synthetic musk fragrances in a conventional drinking water treatment plant with lime softening. *J Environ Eng* 135: 1192, 2009. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000085](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000085)
- WONG F, ROBSON M, MELYMUK L, SHUNTHIRASINGHAM C, ALEXANDROU N, SHOEIB M, LUK E, HELM P, DIAMOND M, HUNG H: Urban sources of synthetic musk compounds to the environment. *Environ Sci Process Impacts* 21: 74-88, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8EM00341F>
- WOZNY M, DOBOSZ S, HLIWA P, GOMUŁKA P, KRÓL J, OBREMSKI K, BLAHOVA J, SVOBODOVA Z, MICHALIK O, OCALEWICZ K, BRZUZAN P: Feed-borne exposure to zearalenone impairs reproduction of rainbow trout. *Aquaculture* 528: 735522, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735522>
- YAMAUCHI R, ISHIBASHI H, HIRANO M, MORI T, KIM JW, ARIZONO K: Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the liver of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 90: 261-268, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.007>
- YAO L, ZHAO JL, LIU YS, ZHANG QQ, JIANG YX, LIU S, LIU WR, YANG YY, YING GG: Personal care products in wild fish in two main Chinese rivers: Bioaccumulation potential and human health risks. *Sci Total Environ* 621: 1093-1102, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.117>
- ZENG X, SHENG G, XIONG Y, FU J: Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangong, China using GC-EI-MS. *Chemosphere* 60: 817-823, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.026>
- ZHANG H, BU Q, WU D, YU G: Polycyclic musks in surface water and sediments from an urban catchment in the megacity Beijing, China. *Environ Pollut* 263: 114548, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114548>
-

## 5.4 Zhodnocení negativního vlivu tonalidu pro danio pruhované

Následující studie je zaměřena na zhodnocení subchronické toxicity pro danio pruhované (*Danio rerio*) po 56-denní expozici tonalidem. Cílem bylo posouzení xenoestrogenního potenciálu tonalidu a jeho schopnosti narušit antioxidační ochranu organismu a vyvolat oxidativní stres u juvenilních jedinců *D. rerio*.

Výsledky dvouměsíčního testu odhalily zvýšenou lipidní peroxidaci, reprezentovanou zvýšenou hodnotou TBARS a snížení aktivity enzymu KAT po expozici environmentálně relevantní koncentrací tonalidu (500 ng/l). Lipidní peroxidace byla zaznamenána také u testované skupiny s nejvyšší koncentrací testované látky (50 000 ng/l tonalidu). Nicméně koncentrace vitellogeninu v celotělním homogenátu juvenilních jedinců dania (*Danio rerio*) neprokázaly estrogenní účinek tonalidu. Tudíž na základě námi zjištěných dat, nejsme schopni označit tonalid jako látku s estrogenním potenciálem. Narušení antioxidační ochrany poukazuje na aktivaci adaptačních mechanismů ochrany organismu před účinky oxidativního stresu způsobeného subchronickou expozicí tonalidu.

Výsledky uvedeného experimentu jsou detailně popsány v publikaci Cahova et al. (2023b).

- **Cahova, J.**, Blahova, J., Plhalova, L., Marsalek, P., Doubkova, V., Hostovsky, M., Divisova, L., Mares, J., Faggio, C., & Svobodova, Z. (2023b). Long-term exposure to polycyclic musk tonalide—A potential threat to juvenile zebrafish (*Danio rerio*)? *Veterinární medicína*, 68(5), 218–224. **IF**<sub>2021</sub>=0, 746, Q4

# Long-term exposure to polycyclic musk tonalide – A potential threat to juvenile zebrafish (*Danio rerio*)?

JANA CAHOVA<sup>1</sup>, JANA BLAHOVA<sup>1\*</sup>, LUCIE PLHALOVA<sup>1</sup>, PETR MARSALEK<sup>1</sup>,  
VERONIKA DOUBKOVA<sup>1</sup>, MARTIN HOSTOVSKY<sup>1</sup>, LENKA DIVISOVA<sup>2</sup>,  
JAN MARES<sup>3</sup>, CATERINA FAGGIO<sup>4</sup>, ZDENKA SVOBODOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Simulation Centre, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agrosciences, Mendel University Brno, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

\*Corresponding author: [blahovaj@vfu.cz](mailto:blahovaj@vfu.cz)

**Citation:** Cahova J, Blahova J, Plhalova L, Marsalek P, Doubkova V, Hostovsky M, Divisova L, Mares J, Faggio C, Svobodova Z (2023): Long-term exposure to polycyclic musk tonalide – A potential threat to juvenile zebrafish (*Danio rerio*)? Vet Med-Czech 68, 218–224.

**Abstract:** Polycyclic musk compounds are commonly used in personal care products to replace expensive natural fragrances. Due to their huge consumption, they have become a part of the aquatic environment. In the present study, a two-month exposure effect of tonalide on juvenile zebrafish (*Danio rerio*) was investigated. We determined the vitellogenin concentration to define the potential endocrine-disrupting effect of tonalide and also analysed selected indices to evaluate the induction of oxidative stress. The environmentally relevant concentration of tonalide (i.e., 500 ng/l) caused a significant decrease in the catalase activity ( $P < 0.05$ ) and a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the lipid peroxidation. An increasing lipid peroxidation was also recorded for the highest concentration group tested (i.e., 50 000 ng/l). On the other hand, no significant changes were recorded in vitellogenin in all the exposed groups. Thus, based on these results, we have not demonstrated the endocrine-disrupting activity of tonalide in zebrafish. The results of the oxidative stress indices showed a significant impairment of the antioxidant defence after the two-month tonalide exposure, which could indicate part of the adaptive response to the tonalide toxicity.

**Keywords:** aquatic contamination; endocrine disruptor; oxidative stress; personal care products; vitellogenin

In the last decades, personal care products, i.e., shampoos, sunscreens, detergents, perfumes etc., have been extensively used by millions of consumers. These products contain a wide range of chemicals that can get into the aquatic environment and

affect non-target organisms (Kolarova et al. 2021). Musk compounds, as a part of common personal care products, are one of the most often found fragrances in the aquatic environment (Hodkovicova et al. 2020).

Financially supported by grant PROFISH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869).

© The authors. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

Polycyclic musk tonalide (AHTN) is a lipophilic compound with low water solubility and high *n*-octanol/water partition coefficient ( $K_{ow} = 5.7$ ). The proportion of musk chemicals in cosmetic products does not exceed 2% (Martinez-Giron et al. 2010), but due to the insufficient purification of musks in wastewater treatment plants and their lipophilic properties, these chemicals could persist in the water ecosystem and possibly bioaccumulate in the environment (Fang et al. 2017). AHTN has been found in the range of 82–49 904 ng/l in the influent wastewater from Tarragona, Spain (Vallecillos et al. 2015). AHTN can accumulate in the sludge particles from the wastewater plant due to its lipophilic properties and slow biodegradability. AHTN was detected in a range of 5.7–5 040 ng/g of dry weight (d.w.) in the sewage sludge from wastewater plants in Spain (Vallecillos et al. 2015) and in sediments at concentrations ranging from 1.4 ng/g to 36.6 ng/g of d.w. in the East China Sea (Hua et al. 2022). AHTN was found in the surface water in Italy in a range of 0.25–6 800 ng/l (Villa et al. 2012). AHTN was detected in many common aquatic species at concentrations reaching tens of ng/g of d.w. (Lyu et al. 2021).

Musk compounds have relatively low toxicity, but due to their ubiquity, it is necessary to examine their toxicity on non-target organisms. Therefore, the number of experiments studying the adverse effect of musk compounds on organisms has increased. One of the current topics in toxicology is the disruption of the antioxidant defence which could lead to an imbalance of the whole organism. Ehigues et al. (2020) detected an increase in oxidative stress biomarkers in clams, *Ruditapes philippinarum*, after 21 days of AHTN exposure even at an environmental concentration. Hodkovicova et al. (2020) proved lipid peroxidation in juvenile rainbow trout after six weeks of AHTN exposure. Furthermore, AHTN induced antioxidant mechanisms and detoxifying enzymes in juvenile stages of zebrafish after 28 days of exposure (Blahova et al. 2018).

Endocrine disruption is another relevant topic of the toxicity of musks. Vitellogenin (VTG) is one of the most widely-used biomarkers for the detection of estrogenic chemicals. VTG is a precursor of egg yolk protein in females. The presence of the exogenous estrogenic compound induces VTG synthesis in male or juvenile fish. AHTN significantly induced the expression levels of hepatic VTG in male medaka, *Oryzias latipes* (Yamauchi et al.

2008), and in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) where the gene expression of *vgt1* in the yolk-sac was significantly downregulated (Ehigues et al. 2021).

Based on the ubiquitous presence of AHTN in the aquatic environment and the possible negative effect on the non-target organisms mentioned in previous studies, we decided to evaluate the effect of AHTN in fish with an emphasis on the disruption of antioxidant defences representing an impairment of the organism's balance, supplemented by an assessment of the xenoestrogenic potential of AHTN. The analysis of the oxidative stress indices consists of the determination of the antioxidant enzyme activities, such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione *S*-transferase (GST), and lipid peroxidation using a concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The estrogenic potential of AHTN was evaluated by analysis of the VTG in the whole-body homogenate of the male. These analyses were supplemented by a histopathological examination to observe any potential histological changes in the selected organs (i.e., muscles, gills, liver, kidneys, gonads, and intestine). To the best of our knowledge, only limited studies have investigated the effects of subchronic AHTN exposure in fish and we assume that the time of exposure is crucial for evaluating the AHTN toxicity. Therefore, we monitored the AHTN toxic effect after two-month of exposure in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) to simulate natural conditions.

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental design

The subchronic toxicity test was conducted according to the Organisation for Europe Economic Cooperation (OECD 2000) Guideline No. 215 Fish, Juvenile Growth Test (OECD 215). A total of 600 zebrafish (*Danio rerio*) at the age of 30 days were obtained from the experimental laboratory of Mendel University (Czech Republic). The fish were randomly distributed into twelve 20 l glass aquaria (i.e., 50 fish in each aquarium) and acclimatised for seven days before the toxicity test started. The whole experiment lasted for 8 weeks (56 days). The toxicity test was conducted in the approved facility of the Department of Animal Protection and Welfare and

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

Veterinary Public Health (University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic).

The experimental fish were exposed to four different concentrations (50, 500, 5 000, and 50 000 ng/l) of AHTN (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; chemical purity 98%) in water. The lowest concentrations represent the environmental concentrations in the surface waters. Multiples of the tested concentrations were examined to demonstrate dose-dependent effects. A stock solution of AHTN was prepared by dissolving 10 mg of the chemical in 10 ml of acetone and then added to a 2-l volumetric flask with tap water (final concentration of 5 mg/l). This stock solution was prepared every day and an ultrasonic bath was also used to accelerate the dissolution. The stock solution was then dosed into the individual aquaria to achieve the required concentration. Due to the use of the solvent acetone for the stock solution, the concentration of this solvent in all the experimental groups was subsequently adjusted to be uniformly 0.005%. In addition, two control groups were included in the toxicity test. The first control group was with tap water only, while the second control group contained 0.005% of acetone as a solvent in addition to the tap water. The controls and all the tested concentrations were performed in duplicate. The experiment was conducted in a flow-through system, and the test solutions were replaced twice a day. The analysis of the AHTN concentration in the water samples was carried out using gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). The methodology is described in detail by Blahova et al. (2018). The photoperiod interval of the experiment was 12 h light/12 h dark. The fish were fed with dried *Artemia salina* without shells at 8% body weight per day. The faecal material and uneaten food were removed from each aquarium daily by thorough bottom cleaning using suction. During the toxicity tests, the temperature, pH and oxygen saturation were measured daily using an HQ4300 Portable multi-meter (Hach, Loveland, USA), and the chemical parameters of the tap water were checked at 24-hour intervals in each aquarium, including recording the number of dead fish. The temperatures ranged from 23.9 °C to 24.7 °C; the oxygen content was not lower than 70%; and the pH ranged from 7.78 to 8.23. The basic chemical parameters of the water were as follows: acid neutralisation capacity (ANC<sub>4.5</sub>) – 4.2 mmol/l, chemical oxygen demand (COD) – 2.8 mg/l, nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – 23.5 mg/l,

chlorides – 18.1 mg/l,  $\Sigma$  Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> – 3.1 mmol/l, total ammonia and nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) were below the limit of determination (< 0.04 mg/l and < 0.02 mg/l, respectively).

At the end of the test, all the fish were euthanised using tricaine methanesulfonate (MS-222 at a concentration of 250 mg/l, for 10 min), and the total length and body weight of each fish were recorded. The euthanised fish were immediately processed for the histopathological examination and analyses of the selected oxidative stress indices and VTG concentration.

The experiment was approved by the Ethics Committee of the University of Veterinary Sciences Brno (Czech Republic) and by the Ministry of Education, Youth and Sports (Czech Republic). All the procedures complied with the national legislation – Act No. 246/1992 Coll., on the Protection of Animals Against Cruelty, as amended, and Decree No. 419/2012 Coll., on the Protection, Breeding and Use of Experimental Animals, as amended. Ethical approval No. MSMT-7412/2015-18 was authorised.

### Histopathological examination

The whole fish were fixed in buffered 10% neutral formalin. Subsequently, all the samples were dehydrated, embedded in paraffin wax, and sectioned on a microtome at a thickness of 4 µm. All the samples were stained with haematoxylin and eosin. The histology of the muscles, gills, liver, kidneys, gonads and intestine was determined using light microscopy ( $n = 6$  in each experimental group).

### Analysis of the oxidative stress indices

The selected oxidative stress indices (CAT, GPx, GR, GST and TBARS) were determined in the whole-body samples which were stored in a deep-freeze box at –80 °C. Eight individual samples were analysed in each experimental group. At first, the whole-body samples were weighed, homogenised in a phosphate buffer containing 50 mmol/l potassium phosphate and 1 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH 7.2, 1 : 10 w/v). The homogenate samples were divided into two portions. The first part of the homogenate was used for the analysis of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) to evaluate the lipid peroxidation

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

using malondialdehyde determination at 535 nm. The results of the lipid peroxidation are presented as nmol of TBARS per gram of tissue of wet weight (Lushchak et al. 2005). The second part of the homogenate was centrifuged ( $10\,500 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) and the supernatant fraction was used for the analyses of the antioxidant and detoxifying enzyme activities.

The CAT activity was measured according to the methodology of Aebi (1984); the GPx activity was determined according to Flohe and Gunzler (1984); the GR activity was measured according to Carlberg and Mannervik (1975) and the GST activity was detected using Habig et al. (1974). The enzyme activities were related to the protein content (Smith et al. 1985). The determination of all the parameters was conducted spectrophotometrically using a Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

### Vitellogenin analysis

The quantitative analysis of the VTG content was analysed in the whole body samples using a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit for zebrafish *Danio rerio* (catalogue No.: V01008402-480; Biosense Laboratories, Bergen, Norway). Ten individual male samples were analysed in each experimental group. At first, the whole body sample was weighed, homogenised in a 50 mmol/l TRIS buffer (pH = 7.4, 1:4 w/v) with a 1% protease inhibitor and centrifuged ( $15\,000 \times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes). Supernatant fraction was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  before the final analysis. All the samples were kept on ice and were analysed in duplicate. Three different dilutions were used for the samples – 1:250; 1:2 500 and 1:25 000. An eleven-point calibration curve was prepared using the zebrafish VTG standard at concentrations from 0.12 ng/ml to 125 ng/ml. The calibration curve was performed for each microplate desk. The analysis followed the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the statistical software Unistat v6.5 for Excel (London, UK). First, all the results were tested using the

Shapiro-Wilk test and the Levene test for normality and homogeneity of variances across the groups, respectively. The experimental groups were always compared to the control group with acetone as a solvent, because no difference in all the indices was found between the control group with the tap water only and the control group with the solvent. The normally distributed data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-HSD post-hoc test to determine the differences among the control and experimental groups. When the data did not meet the assumption of normality, a non-parametric multi-sample median test was applied. The difference was considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Mortality, behaviour and morphological indices

The mortality and behaviour of the fish were recorded every day. The mortality rate did not exceed 10% and the fish exhibited normal behaviour during the whole experiment. The morphological indices did not differ between the control and treated groups (data are not shown)

### Oxidative stress indices

The results of the antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation are shown in Table 1. A significant decrease in the CAT activity was observed in the tested group exposed to 500 ng/l of AHTN. Significant increases in the TBARS concentrations were recorded in the groups treated with 500 ng/l and 50 000 ng/l of AHTN compared to the control. No statistically significant changes were detected in the GPx, GR and GST enzyme activities.

### Vitellogenin analysis

The results of the VTG concentration are shown in Table 2. Vitellogenin was not detected in all the samples. In the cases where VTG was not detected, half the detection limit (i.e., 150 ng/ml) was used for the statistical analysis. No significant changes were recorded among the groups.

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

Table 1. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the whole body homogenate of the zebrafish after subchronic exposure to tonalide

Indices	Control	Tested groups			
		50 ng/l	500 ng/l	5 000 ng/l	50 000 ng/l
CAT	151.9 ± 7.8 <sup>a</sup>	125.2 ± 4.7 <sup>a</sup>	<b>112.2 ± 6.0<sup>b</sup></b>	125.9 ± 9.0 <sup>a</sup>	128.6 ± 6.5 <sup>a</sup>
GPx	31.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	26.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	24.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	32.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	25.8 ± 0.9 <sup>a</sup>
GR	12.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
GST	176.2 ± 4.5 <sup>a</sup>	177.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	188.1 ± 3.8 <sup>a</sup>	186.0 ± 9.4 <sup>a</sup>	157.7 ± 3.0 <sup>a</sup>
TBARS	94.3 ± 15.7 <sup>b</sup>	107.2 ± 15.6 <sup>b</sup>	<b>261.9 ± 30.9<sup>a</sup></b>	136.5 ± 14.5 <sup>b</sup>	<b>261.4 ± 24.2<sup>a</sup></b>

The data are presented as the mean ± standard error of the mean. Significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ) are indicated by different alphabetic superscripts and the bold font

CAT = catalase in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein; GPx = glutathione peroxidase in  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein; GR = glutathione reductase in  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein; GST = glutathione *S*-transferase in  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  protein; TBARS = lipid peroxidation in  $\text{nmol}/\text{g}$  of tissue

Table 2. Vitellogenin in the whole body homogenate of the male zebrafish after the tonalide exposure

Group	Number of analysed samples	% of positive samples	Range of detected concentrations (ng/ml)
Control	10	0	–
50 ng/l	10	0	–
500 ng/l	10	10	2 788 <sup>#</sup>
5 000 ng/l	10	20	1 437–6 512
50 000 ng/l	10	30	497–8 966

<sup>#</sup>Only one positive sample was found

No significant changes were recorded among the groups ( $P > 0.05$ )

### Histopathological examination

The histopathological examination exposed only rare pathological changes (vacuolisation of hepatocytes and epithelial cells of renal tubules; chronic hepatitis). Considering these rare morphological changes, observed in both control groups and all the experimental groups, we assume they are not associated with the subchronic exposure to AHTN (data are not shown).

### DISCUSSION

AHTN, as a commonly used polycyclic musk, can be detected throughout the aquatic environment. Recent papers have mainly focused on the short-term exposure to AHTN, but it is very important to consider the subchronic effects on non-target

aquatic organisms to simulate natural conditions. Our experiment revealed, after 56 days, various changes in the antioxidant protection of the zebrafish. The lowest concentration had no significant effect in the assessed indices, however, the higher concentration, which can be considered as environmentally relevant (i.e., detected in the sewage sludge and surface water in a more contaminated area) induced the antioxidant defence of the organisms and caused significant lipid peroxidation due to the massive free radical production. Considering the study by Blahova et al. (2018), where the catalase activity significantly increased at 5 000 and 50 000 ng/l of AHTN, we recorded the completely opposite trend, i.e., a decrease in the catalase activity after exposure to the 500 ng/l AHTN concentration. Catalase is one of the most important enzymes that secures the antioxidant resistance and stands in the first line of defence against oxidative stress. If we especially focused on fish, Chen et al. (2012) observed an increase in the catalase activity in goldfish (*Carassius auratus*) after 14 days' galaxolide (musk) exposure. We assume that the inhibition of catalase in our experiment may be caused by the excessive production of reactive oxygen species. As our experiment lasted for two months, the significant reactive oxygen species production may have reduced the catalase activity for the 500 ng/l AHTN concentration. This fact would be supported by the results of TBARS concentration. The TBARS, as the by-product of lipid peroxidation, significantly increased in the same experimental group (i.e., 500 ng/l). The highest tested AHTN concentration did not cause any

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

statistically significant changes for the catalase activity, we suppose that the presumable reason would be the re-producing/activating catalase. The TBARS significantly increased for the highest tested AHTN concentration, while the catalase activity did not change for this tested group. We assume that the whole compensation system is more complex and requires further investigation. However, the increasing content of TBARS could reflect the overproduction of oxidative radicals and could point to lipid peroxidation. This peroxidation could lead to damage to the cell lipid structures and even impair the DNA. Nevertheless, only rare changes on the organ structures were observed after the histopathological examination, thus impairment by the free radicals was not confirmed. Lipid peroxidation was also recorded in clams after 21 days' AHTN exposure (Ehiguese et al. 2020). Considering fish, Blahova et al. (2018) revealed increased lipid peroxidation as well as the GST activity in juvenile zebrafish after 28 days exposure to AHTN at 50 000 ng/l and the GR activity was reduced at 50 ng/l. In contrast, the results of our experiment did not reveal any changes in the GST or GR activity. In view of all these facts, we suppose that the exposure time is decisive in assessing the antioxidant defence of the organism, as the decrease in CAT activity could demonstrate the consumption of the antioxidant capacity of the zebrafish. Although no significant histopathological changes were observed, prolonged exposure to this important micropollutant and the proven ongoing oxidative stress could lead to subsequent organ changes and damage to the whole organism.

Determination of the AHTN endocrine disrupting effect was one of the goals of our experiment. Ehiguese et al. (2021) posed that tonalide had an endocrine disrupting effect and revealed the down-regulation of the *vtg1* gene in the yolk-sac larvae of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) after AHTN exposure. However, based on our results of the VTG analysis, we cannot confirm the endocrine disruption effect of AHTN in the juvenile zebrafish, even after two months of exposure. We assume that the life stage of the tested organism could be a decisive factor.

The results of our study contribute to the evaluation of the potential adverse effects of AHTN in fish. In our study, the subchronic exposure to AHTN caused a significant increase in the lipid peroxidation and a decrease in the catalase activity

which could signify the impairment of the antioxidant defence even at the environmental relevant concentration (i.e., 500 ng/l of AHTN). Based on the VTG concentration result, we did not prove the endocrine disrupting effect of AHTN in the juvenile zebrafish. We assume that the time of exposure as well as the stage of the exposed individual are crucial for the assessment of the AHTN effects on the fish.

For the next experiment, we think that it would be interesting to evaluate the long-term exposure including the embryonic and larval stages to simulate the real conditions in the aquatic environment. It might be useful to include other markers, such as gene expression indices, in the assessment to confirm the adverse AHTN effect.

### Acknowledgment

The authors thank Veronika Zavrelva for manuscript improvement and for language editing and Petr Fictum for histological analysis.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Blahova J, Divisova L, Plhalova L, Enevova V, Hostovsky M, Doubkova V, Marsalek P, Fictum P, Svobodova Z. Multi-biomarker responses of juvenile stages of zebrafish (*Danio rerio*) to subchronic exposure to polycyclic musk tonalide. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2018 May;74(4): 568-76.
- Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1975 Jul 25;250(14):5475-80.
- Ehiguese FO, Alam MR, Pintado-Herrera MG, Araujo CVM, Martin-Diaz ML. Potential of environmental concentrations of the musks galaxolide and tonalide to induce oxidative stress and genotoxicity in the marine environment. *Mar Environ Res.* 2020 Sep;160:105019.
- Ehiguese FO, Rodgers ML, Araujo CVM, Griffitt RJ, Martin-Diaz ML. Galaxolide and tonalide modulate neuroendocrine activity in marine species from two taxonomic groups. *Environ Res.* 2021 May;196:110960.

<https://doi.org/10.17221/40/2023-VETMED>

- Fang H, Li G, Yao S, Liang X, An T. Kinetic and mechanism studies of musk tonalide reacted with hydroxyl radical and the risk assessment of degradation products. *Catal Today*. 2017 Mar;281:642-8.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974 Nov 25;249(22):7130-9.
- Hodkovicova N, Enevoeva V, Cahova J, Blahova J, Siroka Z, Plhalova L, Doubkova V, Marsalek P, Franc A, Fiorino E, Faggio C, Tichy F, Faldyna M, Svobodova Z. Could the musk compound tonalide affect physiological functions and act as an endocrine disruptor in rainbow trout? *Physiol Res*. 2020 Dec 31;69(Suppl\_4):S595-606.
- Hua Y, Wang L, Zheng M, Xu Y, Liu J, Fang L, Pan X, Liu A. Occurrence of synthetic musks in the sediment-seawater system of the Yellow Sea and East China Sea during wet and dry seasons. *Sci Total Environ*. 2022 Aug 10;833:155164.
- Chen F, Gao J, Zhou Q. Toxicity assessment of simulated urban runoff containing polycyclic musks and cadmium in *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Environ Pollut*. 2012 Mar;162:91-7.
- Kolarova J, Velisek J, Svobodova Z. Comparison of in vitro (fish cell line) and in vivo (fish and crustacean) acute toxicity tests in aquatic toxicology. *Vet Med-Czech*. 2021 Aug;66(8):350-5.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Lushchak OV, Storey JM, Storey KB. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Jun; 37(6):1319-30.
- Lyu Y, Ren S, Zhong F, Han X, He Y, Tang Z. Occurrence and trophic transfer of synthetic musks in the freshwater food web of a large subtropical lake. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Apr 15;213:112074.
- OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals: Fish, juvenile growth test. Paris, France: OECD Publishing; 2000. 16 p.
- Martinez-Giron AB, Crego AL, Gonzalez MJ, Marina ML. Enantiomeric separation of chiral polycyclic musks by capillary electrophoresis: Application to the analysis of cosmetic samples. *J Chromatogr A*. 2010 Feb 12;1217(7): 1157-65.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem*. 1987 May 15;163(1):279.
- Vallecillos L, Borrull F, Pocurull E. Recent approaches for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2015 Oct; 72:80-92.
- Villa S, Assi L, Ippolito A, Bonfanti P, Finizio A. First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: Spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy). *Sci Total Environ*. 2012 Feb 1;416:137-41.
- Yamauchi R, Ishibashi H, Hirano M, Mori T, Kim JW, Arizono K. Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*. 2008 Dec 11; 90(4):261-8.

Received: April 3, 2023

Accepted: May 16, 2023

Published online: May 29, 2023

## 6 DISKUZE

Následující kapitola je věnována zhodnocení jednotlivých experimentů, které jsou součástí této disertační práce a věnují se problematice výskytu emergentních polutantů v životním prostředí a vlivu testovaných látek na vodní ekosystém. Cílem diskuze je sumarizovat klíčové výsledky provedených studií a zdůraznit jejich přínos v dané problematice.

### 6.1 Zhodnocení změn hematologických a biochemických parametrů ryb

Změny hematologických parametrů patří mezi důležité markery toxického účinku cizorodých látek. Hematologické parametry byly vybrány k hodnocení negativních účinků jak po expozici EHMC, tak tonalidem u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

UV filtr **EHMC** vyvolal statisticky významnou změnu v počtu leukocytů, konkrétně se jednalo o snížení celkového počtu krvinek bílé řady v nejvyšší testované koncentraci (395,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Snížený počet leukocytů může ovlivnit funkci imunitního systému, který je pro zdraví a welfare ryb velice důležitý. Na rozdíl od našich výsledků, Grabicova et al. (2013) uvádějí, že po expozici jiným druhem organického UV filtru (PBSA) v koncentracích 1, 10 a 1 000  $\mu\text{g}/\text{l}$  nebyla zaznamenána žádná statisticky významná změna hematologických parametrů (počet leukocytů a erytrocytů, hematokrit a koncentrace hemoglobinu) po 21 a 42-denní expozici. Podobné snížení počtu leukocytů, stejně jako v našem experimentu, bylo pozorováno u ryby mořčák evropský (*Dicentrarchus labrax*) po expozici polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH). Tyto látky se řadí mezi aktuální a významné mikropolutanty vodního prostředí, obdobě jako organické UV filtry. Ryby byly exponovány po dobu 21 dnů směsí 41 druhů PAHs. U testovaných ryb byla ve srovnání s kontrolou zaznamenána leukopenie v důsledku lymfopenie, dále také zvýšení úbytku leukocytů a snížení aktivity fagocytózy. Všechny tyto výsledky lze vysvětlit poškozením integrity membránových buněk vylučováním PAH a naznačují poškození specifických a nespecifických imunitních systémů (Danion et al. 2011).

Na rozdíl od účinku UV filtru, **tonalid** u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) neměl vliv na krvinky bílé řady. Nicméně po expozici uvedenou sloučeninou byl zaznamenán negativní efekt na erytrocyty. Konkrétně se jednalo o zvýšenou hodnotu hematokritu, a to jak u environmentálně relevantní koncentrace (854  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), tak u skupiny s desetinásobnou koncentrací (8 699  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Dále byly zaznamenány změny v parametrech erytrocytů, konkrétně

se jednalo o zvýšení hodnot MCV a snížení MCHC a MCH. Změna těchto parametrů může vést k nabobtnání erytrocytů, jak bylo dříve zdokumentováno ve vědecké studii realizované autorem kolektivů Harter et al. (2018). Vzniklý otok může vést k poškození fyziologických funkcí erytrocytů (Javed et al. 2016). Pokud by tedy expozice vyšší koncentrací tonalidu byla dlouhodobého charakteru, mohla by vést k narušení homeostázy celého organismu.

Hodnocení biochemického profilu bylo využito jak u experimentů s EHMC, tak s tonalidem. Po expozici UV filtru **EHMC** byly u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) statisticky významně změněny především parametry sacharidového, lipidového a proteinového metabolismu. Z výčtu signifikantních změn jednotlivých parametrů můžeme usuzovat na narušení celého organismu, ačkoli se tyto změny neprokázaly zvýšenou mortalitou či se neodrazily na změně chování nebo sníženým příjmem krmiva. Oproti tomu výsledky testu s **tonalidem** u stejného živočišného druhu nekorespondovaly s výsledky po expozici EHMC. Tato musk sloučenina nezpůsobila signifikantní změnu u žádného sledovaného parametru biochemického profilu.

## 6.2 Vliv na antioxidační status ryb

Jedním z cílů našich experimentů bylo hodnocení parametrů vztahujících se k narušení antioxidační ochrany a tím navození oxidativního stresu po expozici EHMC a tonalidem. Látka **EHMC** způsobila změny v aktivitách GPx a GST, dále v koncentraci TBARS a FRAP. Změny byly výraznější především u střední a nejvyšší testované dávky, tudíž lze usuzovat na zvyšující incidenci negativních účinků s narůstající koncentrací zkoumaného polutantu. Zvýšená aktivita GPx spolu se zvýšenou koncentrací TBARS poukazuje na probíhající lipidní peroxidaci a na indukci tvorby volných radikálů. Enzym GPx se podílí na redukci peroxidu vodíku a jiných peroxidů nenasycených mastných kyselin vzniklých během procesu lipidní peroxidace za současné přeměny redukováného glutathionu na jeho oxidovanou formu. Výše zmíněné reakce mají za cíl snížit množství nově vzniklých volných radikálů a eliminovat tak negativní důsledky oxidativního stresu. Enzym GST je důležitý pro druhou fázi detoxifikace cizorodých látek v organismu díky navázání redukováného glutathionu na toxickou látku. Díky této vazbě dokáže organismus xenobiotikum lépe zpracovat a následně eliminovat. Jeho snížená aktivita v krvi může teoreticky zvyšovat dostupnost intracelulárního redukováného glutathionu a na základě této strategie mohou být buňky méně náchylné k rozvinutí negativních účinků oxidativního stresu. Snížená aktivita GST může tudíž značit určitou adaptaci organismu na působení

oxidativního stresu. K podobným závěrům došli také Chaves Lopes et al. (2020), kdy jejich studie sledovala účinek BP-3 u škeblí (*Amarilladesma mactroides*). V průběhu experimentu zaznamenali zvýšení i snížení aktivity GST v závislosti na změně pH v souvislosti s acidifikací oceánů zapříčiněnou sekvestrací atmosférického oxidu uhličitého v mořské vodě. Změna acidity vedla k rozdílným aktivitám detoxifikačních enzymů u škeblí. Tyto změny prokázaly působení oxidativního stresu, který může ovlivnit tvorbu exoskeletu škeblí, což může mít fatální následky pro existenci těchto vodních živočichů. S prokázanou alterací genu pro enzym GST se setkáváme i ve studii Martínez-Guitarte (2018) po účincích 4-MBC a BP-3. Jedním z dalších výsledků naší studie bylo také snížení koncentrace FRAP. Snížená schopnost plazmy redukovat železité ionty byla prokázána ve všech testovaných koncentracích, což značí narušení antioxidační ochrany. Z výsledků našeho experimentu můžeme tedy vyvodit indukci oxidativního stresu a narušení antioxidační ochrany po expozici EHMC u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

Po expozici **tonalidem** byly u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) detekovány změny v markeru oxidativního stresu, konkrétně u hodnoty TBARS. V environmentálně relevantní koncentraci (854 µg/kg) byla pozorována signifikantně snížená hodnota TBARS oproti kontrole, kdežto u koncentrace desetkrát vyšší (8 699 µg/kg) jsme zaznamenali signifikantní zvýšení hodnoty TBARS. Rozdíl v těchto hodnotách by mohl souviset s reakcí testovaného organismu na zátěž volnými radikály. V environmentální koncentraci byla antioxidační ochrana organismu dostatečná, kdežto v koncentraci desetkrát vyšší se již organismus ubránit volným radikálům nedokázal a tento fakt se mohl projevit zvýšenou hodnotou sledovaného ukazatele. Zatížení organismu volnými radikály bylo také podloženo histopatologickým vyšetřením. U testované skupiny s desetkrát vyšší koncentrací tonalidu oproti environmentálně relevantní koncentraci byly pozorovány kongesce jater a degenerativní změny tubulů ledvin.

Posouzení míry oxidativního stresu jsme testovali i na juvenilních jedincích dania pruhovaného (*Danio rerio*) po dvouměsíční expozici tonalidem. Po dvouměsíční expozici environmentálně relevantní koncentrací (500 ng/l) jsme zaznamenali sníženou aktivitu enzymu KAT společně se zvýšenými hodnotami TBARS. Na rozdíl od této testované skupiny jsme u nejvyšší dávky tonalidu (50 000 ng/l) detekovali pouze zvýšené hodnoty lipidní peroxidace reprezentované zvýšenou hodnotou TBARS. Na základě našich výsledků lze konstatovat, že i u jiného druhu ryb byla pozorována zvýšená zátěž organismu volnými radikály po expozici tímto polutantem.

Důležitým aspektem pro hodnocení toxicity látky je i vstup xenobiotika do organismu. Předpokládáme, že vstup cizorodé látky do organismu je pro toxicitu dané látky velmi důležitý. Další významnou stránkou posouzení toxicity je v neposlední řadě i živočišný druh a stádium vývoje organismu. V našich experimentech byly testované organismy podrobeny účinkům tonalidu po dietární expozici (u pstruha duhového) a po rozpuštění dané látky ve vodě (danio pruhované). Oba druhy ryb byly ve stejné fázi vývoje, neboť se jednalo o juvenilní jedince. Jedním z hodnotících parametrů u obou experimentů bylo nastolení oxidativního stresu. Dietární expozice způsobila nárůst oxidativního stresu, neboť byly zaznamenány zvýšené hodnoty lipidní peroxidace v desetinásobně vyšším množství tonalidu oproti environmentálně relevantní koncentraci. Tonalid rozpuštěný ve vodě měl za následek sníženou aktivitu KAT a také zvýšenou lipidní peroxidaci reprezentovanou zvýšenou hodnotou TBARS již v environmentálně relevantní koncentraci, zvýšené hodnoty TBARS byly zaznamenávány také v testované skupině s nejvyšším množstvím tonalidu. Ačkoli se jednalo o různé koncentrace tonalidu je zajímavé, že tonalid rozpuštěný ve vodě způsobil v environmentálně relevantní koncentraci toxičtější účinek a měl větší vliv na produkci volných radikálů oproti dietární expozici tonalidem.

Za zmínění stojí, že dietární expozice u nejvyšší testované koncentrace (8 699 µg/kg) měla vliv na strukturální poškození tkání ryb, kde histologicko-patologické vyšetření prokázalo hepatodystrofii a kongesci jater. V ledvinách byla pozorována hyalinní degenerace tubulů. Ovšem expozice tonalidem rozpuštěným ve vodě nevedla k histologickým změnám analyzovaných tkání ani v jedné z testovaných koncentrací. I když se v každém experimentu jednalo o různé koncentrace testované látky, která byla podávána buď dietárně nebo rozpuštěná ve vodě, je zajímavé, že po dietární expozici tonalidem bylo prokázáno vážnější poškození tkání.

### 6.3 Narušení endokrinního systému ryb

K hodnocení endokrinní disrupce vybraných emergentních polutantů byli jako testované organismy vybrány pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a danio pruhované (*Danio rerio*). Oba zástupci se běžně využívají jako modelové organismy k hodnocení toxicity cizorodých látek vyskytujících se v životním prostředí dle platných metodik OECD (Grabicova et al. 2013; Li et al. 2018; Zicarelli et al. 2022).

Z výsledků experimentu s pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss*) byla po expozici EHMC hodnocena koncentrace hormonů štítné žlázy. S využitím RT-qPCR byla dále provedena analýza mRNA exprese genů, která souvisí s produkcí a regulací těchto hormonů. K posouzení mechanismu ovlivnění kaskády regulace thyroïdních hormonů byla naše analýza doplněna o *in vitro* test toxicity. Výsledky odhalily u nejvyšší testované koncentrace EHMC (395,6 µg/kg) zvýšenou koncentraci hormonu T4. U testované skupiny se stejnou koncentrací EHMC byla prokázána snížená exprese genu *dio2* a *pax8a*. K podobným závěrům došli i Chu et al. (2021), kteří hodnotili vliv 21-denní expozice EHMC u dospělců dania pruhovaného (*Danio rerio*). Výsledkem studie bylo snížení hormonů T3 v plazmě a down-regulace exprese genů, které souvisejí s metabolismem thyroïdních hormonů. Změny v koncentracích thyroïdních hormonů s následným potenciálním narušením funkce hormonů štítné žlázy byly také zaznamenány po expozici EHMC u medaky japonské (*Oryzias latipes*). Výzkum sledoval negativní účinky EHMC u generace F0 a stejně tak i u potomků, tzn. generace F1. Generace F0 byla exponována koncentracím 0,05–5 mg/l EHMC po dobu pěti měsíců. Poté byla účinku EHMC vystavena i generace F1. Výsledné hodnoty odhalily snížené koncentrace thyroïdních hormonů u generace F1 a sníženou expresi genu *dio2* společně se zvýšenou expresí genu pro thyreotropin uvolňující hormon jak u generace F0, tak u generace F1 (Lee et al., 2019). Na základě výsledků našeho experimentu předpokládáme, že down-regulace exprese genu *dio2* a zvýšená koncentrace plazmatické T4 může mít spojitost, neboť snížení aktivity enzymu dejodázy může mít za příčinu sníženou přeměnu T4 na T3 v periferních tkáních. V kombinaci se sníženou expresí genu *pax8a* pro střední a nejvyšší koncentraci můžeme usuzovat, že expozice EHMC vyvolala změny v rovnováze thyroïdních hormonů s narůstající koncentrací testované látky a na základě toho můžeme EHMC hodnotit jako potenciálního disruptora hormonů štítné žlázy. K objasnění mechanismu účinku EHMC coby thyroïdního disruptora sloužila *in vitro* analýza. Nicméně výsledky testování neprokázaly anti-thyroïdní aktivitu EHMC pomocí receptoru THRβ a ani se EHMC neprojevil jako ligand TTR. Pro pochopení celého mechanismus toxického účinku a s ním spojenou hypotézu EHMC coby thyroïdního disruptora je třeba podložit dalšími experimenty na jiných druzích ryb a také s delší dobou expozice, která by lépe simulovala přirozené podmínky vystavení cizorodým látkám necílovým organismům.

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) byl zvolen také pro hodnocení endokrinní disrupce **tonalidu**. Tato studie byla zaměřena na posouzení jeho xenoestrogenního účinku. Výsledky studie estrogenní potenciál tonalidu u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

neprokázaly, a to jak u environmentálně relevantní koncentrace (854 µg/kg), tak ani u koncentrace desetkrát vyšší (8 699 µg/kg). Xenoestrogenní účinek tonalidu nebyl prokázán ani u jiného testovaného druhu, kterým bylo danio pruhované (*Danio rerio*). Ačkoli byli juvenilní jedinci *D. rerio* vystaveni působením tonalidu v rozmezích koncentrace 50–50 000 ng/l ještě delší dobu (8 týdnů), na konci experimentu jsme u zkoumaných ryb nezaznamenali zvýšenou koncentraci vitellogeninu. K odlišným závěrům došli Yamauchi et al. (2008), kteří prokázali u samců jednodenních embryí medaky japonské (*Oryzias latipes*) zvýšenou expresi hepatického *vtg* proteinu po expozici 500 µg/l. Ehiguese et al. (2021) zaznamenali down-regulaci exprese genu *vtg1* v žloutkovém vaku halančíkovce diamantového (*Cyprinodon variegatus*) po třídní expozici tonalidem v koncentraci 50 µg/l. Testovaná koncentrace tonalidu se shodovala s nejvyšší testovanou koncentrací v našem experimentu. Nicméně, po expozici stejné koncentrace tonalidu jsme nezaznamenali signifikantní změnu koncentrace vitellogeninu u *D. rerio*. Závěry ostatních vědeckých studií poukazují na schopnost tonalidu narušit fyziologickou funkci hormonálního systému ryb, a tudíž by mohl být tonalid označen za endokrinního disruptora. Nicméně výsledky našich experimentů tento výrok nepotvrzují a na jejich základě nemůžeme potvrdit estrogenní potenciál tonalidu.

#### 6.4 Embryotoxicita UV filtrů pro danio pruhované

V posledních desetiletích se ekotoxikologie zabývala především negativními účinky jednotlivých substancí a existuje mnoho doporučených postupů, jak jejich toxicitu posuzovat (např. metodiky podle OECD). Vodní živočichové jsou však ve svém přirozeném prostředí vystaveni směsi polutantů, nejsou obklopeni pouze samostatnými zástupci. Vědci pod záštitou Nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH) v rámci EU a dle Toxic Substances Control Act v rámci Americké agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) uvádějí, že globálně je vyprodukováno až sto tisíc různých chemikálií s rozdílnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které se v důsledku použití v různých druzích materiálů v zemědělství a v průmyslu mohou integrovat do životního prostředí. Správné nakládání s těmito cizorodými látkami je zdůrazněno jako jeden ze 17 cílů Agentury pro udržitelný rozvoj 2030 (Simonnet-Laprade et al., 2021). Je důležité si uvědomit, že chemické látky ve směsích mohou mezi sebou interagovat a tyto interakce mohou vést k aditivním, synergickým či antagonistickým účinkům. Výsledný toxický účinek směsi cizorodých látek může být ve svém komplexu závažnější než vystavení jednotlivým substancím (Spurgeon et al., 2010; Park et al., 2017; Sehonova et al., 2017). Avšak informace o mechanismu účinku

směsi chemikálií jsou stále nedostatečné. Porozumění těmto interakcím přispívá k objasnění důsledku přítomnosti jednotlivých polutantů ve vodním prostředí, a tím se může snížit toxické riziko účinků těchto látek (Bunke et al., 2014; Park et al., 2017). V současné době se potřeba výzkumu směsí látek a jejich účinků zvyšuje a některé studie již prokázaly vyšší toxické účinky po expozici chemických látek ve směsích, než bylo u látek jednotlivých (Magdaleno et al., 2015; Park et al., 2017). V neposlední řadě nesmíme zapomínat na chování těchto látek v životním prostředí, kdy se mohou tyto látky či směsi těchto látek degradovat a metabolizovat, díky čemuž mohou vznikat nové sloučeniny s hůře předvídatelnou toxicitou (Jentzsch et al., 2019).

V našem experimentu byl sledován embryotoxický účinek UV filtrů použitých jak samostatně, tak ve směsích. Bylo prokázáno, že UV filtry testované samostatně neměly žádný vliv na mortalitu embryí a ani negativně neovlivnily jejich vývoj. Během testování UV filtrů použitých ve směsi, byl zaznamenán zcela evidentní rozdíl v incidenci mortality. Značné změny byly pozorovány především ve směsi OC a 4-MBC. Po účinku směsi těchto dvou UV filtrů jsme detekovali zvýšenou mortalitu po 48, 72 a 96 hpf. Pokud bychom hodnotili ovlivnění mortality po expozici těmito UV filtry, na základě těchto výsledků můžeme uvažovat o synergickém efektu OC a 4-MBC. U směsi UV filtrů tvořené OC a 4-MBC jsme se setkali s dřívějším líhnutím oproti kontrolní skupině. Tento výsledek je poměrně překvapující, neboť samostatně 4-MBC působilo opožděné líhnutí, OC testované samostatně naopak líhnutí dřívější. Ve směsi obou UV filtrů jsme pozorovali akcelerované líhnutí embryí. Z těchto faktů můžeme teoreticky předpokládat, že uvedené UV filtry působí na proces líhnutí antagonisticky, pravděpodobně s dominantním efektem OC. K podobným závěrům antagonistického chování UV filtrů ve směsi přišli také Li et al. (2018). Výstupem jejich studie bylo zhodnocení antagonistických účinků UV filtrů BP-3 a EHMC a OC ve směsi, kdy se jejich účinky v kontextu s embryonálním vývojem vzájemně redukovaly. Na základě hodnocení našich výsledků po expozici všemi pěti UV filtry, kdy došlo k dřívějšimu líhnutí larev již v environmentálně relevantní koncentraci, bychom mohli předpokládat potenciálně dominantní efekt OC na proces líhnutí. Během testování jednotlivých UV filtrů a UV filtrů ve směsích jsme nezaznamenali statisticky významné malformace embryí. Naše výsledky jsou v rozporu se současnými studiemi, kdy byla zaznamenána zvýšená incidence morfologických malformací po expozici benzofenony (Blüthgen et al., 2012; Fong et al., 2016), EHMC (Nataraj et al., 2020) a 4-MBC (Quintaneiro et al., 2019). K podobným závěrům se dopracovali i Li et al. (2018), kteří ve své studii odhalili významné změny ve vývoji rybích embryí dania pruhovaného (*Danio*

*rerio*) po vystavení směsi UV filtrů (BP-3 a EHMC a OC). Navíc byly u potomků prokázány malformace s kumulativními účinky, a to dokonce na úrovni environmentálně relevantních koncentracích. V našem experimentu jsme se se statisticky významnými malformacemi embryí nesetkali.

Je ovšem nutné podotknout, že i zřídka ovlivněný strukturální vývoj embrya (např. edém perikardu, nedokonale vyvinutý ocas embryí) či opožděné líhnutí, zaznamenaný v našem experimentu především u látek 4-MBC a BP-3, nemusí sice nutně zapříčinit smrt embrya, ale tyto změny mohou mít za následek úhyn v pozdější fázi vývoje. Podrobnější mechanismus interakcí mezi jednotlivými UV filtry ve směsích je nutné detailněji prozkoumat, abychom mohli zcela porozumět celému mechanismu toxického účinku těchto látek ve směsích.

## 7. ZÁVĚR

Cílem předkládané disertační práce bylo zhodnotit toxické účinky emergentních polutantů, které jsou hojně detekovány v životním prostředí. Experimenty byly zaměřeny na dva významné zástupce mikropolutantů, které jsou běžně používané v produktech denní potřeby, a to na organické UV filtry a na musk sloučeninu tonalid. Jejich vliv byl hodnocen nejenom na různých druzích ryb, a také v různých vývojových stádiích těchto vodních organismů. Výsledky studií, které jsou součástí předkládané disertační práce, poukazují především na změny v antioxidační ochraně organismu, ovlivnění biochemického profilu a hematologických parametrů a také na narušení fyziologické funkce endokrinního systému ryb.

Na základě výsledků byla po expozici EHMC pozorována zvýšená míra nastolení oxidativního stresu v závislosti s narůstající koncentrací testované látky. Tento trend byl znatelný i po expozici tonalidem, avšak signifikantní narušení antioxidační ochrany bylo zaznamenáno již v environmentální koncentraci. Zajímavé bylo posouzení i druhu expozice tonalidem. Ačkoli se jednalo o jiné koncentrace tonalidu, dietární expozice neměla za následek navození oxidativního stresu v environmentální koncentraci testované látky, na rozdíl od toho tonalid rozpuštěný ve vodě měl v environmentálně relevantní koncentraci signifikantní vliv na zvýšení lipidní peroxidace zřejmě způsobenou účinky volných radikálů. Nutno zdůraznit, že dietární expozice vedla k strukturálním změnám orgánů jater a ledvin. Změny biochemických parametrů byly významné především po expozici EHMC, kdy byly u nejvyšší testované koncentrace zaznamenány změny jak v sacharidovém, lipidovém, tak i proteinovém metabolismu. Avšak tyto změny neměly dopad na zvýšenou mortalitu či změnu chování u testovaných jedinců.

Hematologický profil ryb byl změněn po expozici EHMC, konkrétně u krvinek bílé řady pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). U nejvyšší testované koncentrace byl zaznamenán snížený počet leukocytů, což může mít za následek oslabení imunitního systému a celkové obranyschopnosti ryb. Tonalid způsobil u stejného druhu ryb změny červených krvinek již v environmentálně relevantní koncentraci. U testovaných jedinců byl zaznamenán zvýšený hematokrit, zvýšený MCV a zároveň snížené hodnoty MCHC a MCH. Změny červených krvinek mohou vést k narušení jejich funkce, a tím ovlivnit celou homeostázu organismu ryb.

Po souhrnu výsledků *in vivo* testů toxicity můžeme EHMC označovat za endokrinního disruptora thyroïdních hormonů. Látka EHMC narušila funkci hormonů štítné žlázy u nejvyšší testované koncentrace. Tento jev se projevil zvýšenou plazmatickou koncentrací T4 a sníženou

mRNA expresí genu *dio2* a *pax8a*. *In vivo* studie byla doplněna o výsledky *in vitro* pokusu s důrazem na porozumění mechanismu ovlivnění thyroidních hormonů látkou EHMC. Nicméně *in vitro* analýza neprokázala anti-thyroidní aktivitu EHMC prostřednictvím THR $\beta$ , a zároveň se EHMC neprojevil jako ligand TTR. Nutno zdůraznit, že je třeba dalších analýz k podrobnějšímu porozumění mechanismu účinku EHMC na hormony štítné žlázy. Naproti tomu u tonalidu nebyly prokázány estrogenní účinky ani u jednoho druhu ryb, a tudíž na základě našich výsledků nemůžeme tonalid hodnotit jako látku s xenoestrogením potenciálem.

V neposlední řadě jsme se zaměřili na ovlivnění embryonálního vývoje dania pruhovaného (*Danio rerio*) po účinku jednotlivých UV filtrů a UV filtrů ve směsích. Rozdílné výsledky jsme zaznamenaly především v letalitě. Signifikantně významná mortalita nebyla pozorována po účinku jednotlivých UV filtrů, ovšem směs UV filtrů, konkrétně směs OC a 4-MBC způsobila zvýšenou mortalitu s pravděpodobnou dominancí účinku OC. Ve směsích UV filtrů bylo na rozdíl od jednotlivě testovaných UV filtrů pozorováno dřívější líhnutí, i zde s pravděpodobně převažujícím účinkem OC. Během našeho experimentu jsme nezaznamenali žádné signifikantně významné malformace, ovšem je důležité zdůraznit, že i některé subletální vady (edém perikardu, nedokonale vyvinutý ocas) mohou mít vliv na welfare jedince a jeho schopnosti přežití a reprodukce v pozdějším stádiu vývoje.

Pro další výzkum by mohlo být zajímavé testovat musk sloučeniny s UV filtry ve směsích a sledovat jejich společný účinek jak na embryonální vývoj, tak na organismus juvenilního nebo dospělého jedince s důrazem na narušení fyziologické funkce hormonů ryb.

## 8 ABSTRAKT

Cílem předkládané disertační práce je osvětlit mechanismus toxického účinku organických UV filtrů a musk sloučeniny tonalidu. Jako modelové organismy sloužili pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a danio pruhované (*Danio rerio*). Sledovanými parametry byly především změny v antioxidační ochraně a detoxifikačních enzymech, dále poté změny biochemického a hematologického profilu, doplněných o histopatologické vyšetření. V neposlední řadě byl výzkum zaměřen na průkaz endokrinní disrupce thyroideálních hormonů po expozici EHMC doplněné o analýzu exprese genů souvisejících s produkcí a regulací hormonů štítné žlázy. Dále byla realizována *in vitro* analýza EHMC pro porozumění mechanismu toxického účinku na úrovni ovlivnění hormonů štítné žlázy. Pro zhodnocení tonalidu jako endokrinního disruptora byl experiment také zaměřen na průkaz jeho xenoestrogenního potenciálu pomocí analýzy koncentrace vitellogeninu v plazmě či celotělním homogenitu.

Na základě našich výsledků můžeme hodnotit oba polutanty jako spouštěče oxidativního stresu s následným narušením antioxidační ochrany, po expozici tonalidem dokonce již v environmentálně relevantních koncentracích. Zajímavý trend jsme pozorovali u změn biochemického profilu po dietární expozici tonalidem a po expozici tonalidem rozpuštěného ve vodě. I když se jednalo o různé koncentrace, tonalid rozpuštěný ve vodě způsobil lipidní peroxidaci již v environmentálně relevantní koncentraci oproti dietární expozici. Avšak dietární expozice způsobila signifikantní poškození jater a ledvin. Látka EHMC narušila biochemický profil napříč celým metabolismem ryb, na rozdíl od toho byl pozorován zcela opačný trend po expozici tonalidem. Další významné změny byly zaznamenány v hematologickém profilu ryb. Expozice EHMC snížila množství leukocytů, naopak tonalid ovlivnil hodnotu hematokritu a hemoglobinu v červených krvinkách. Na základě našich výsledků můžeme navíc EHMC posuzovat jako potenciálního endokrinního disruptora thyroideálních hormonů ryb, což může vést k narušení homeostázy celého organismu.

Vzhledem k výsledkům testování embryotoxicity měly UV filtry testované ve směsích toxičtější účinek než UV filtry testované jako jednotlivci z důvodu zvýšené úmrtnosti a dřívějšího líhnutí embryí. Ve výčtu všech zmíněných výsledků může být expozice těmto polutantům hodnocena jako nebezpečná pro vodní organismy.

## 9 ABSTRACT

The aim of the presented dissertation is to clarify the mechanism of the toxic effect of important pollutants, the organic UV filters and the musk compound tonalide. Tested organisms were rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*). The tested parameters were primarily changes in antioxidant protection and detoxification enzymes of fish, then changes in biochemical indices and effect on the hematological profile of fish, supplemented by histopathological examination. Last but not the least, the research was focused on the evidence of endocrine disruption of the thyroid gland after exposure to octinoxate. The analysis was supplemented by the expression of genes related to the production and regulation of thyroid hormones. Furthermore, the *in vitro* analysis of octinoxate was conducted to understand the mechanism of the toxic effect on the influence of thyroid hormones. To evaluate tonalide as an endocrine disruptor, the experiment was also aimed at demonstrating its xenoestrogenic potential by analyzing the concentration of vitellogenin in plasma or whole-body homogenate.

Based on our results, we can evaluate both pollutants as triggers of oxidative stress with subsequent impairment of antioxidant protection, even in environmentally relevant concentrations after exposure to tonalide. We observed an interesting trend in changes in the biochemical profile after dietary exposure to tonalide and after exposure to tonalide dissolved in water. Tonalide dissolved in water caused lipid peroxidation already at an environmentally relevant concentration compared to dietary exposure to the same substance. However, on the other hand, dietary exposure caused significant liver and kidney damage. Octinoxate disrupted the biochemical profile across the entire fish metabolism, but we observed a completely opposite trend after exposure to tonalide. Other significant changes were noted in the hematological profile of the fish. Octinoxate exposure decreased leukocyte counts, whereas tonalide affected hematocrit and hemoglobin in red blood cells. Based on our results, we can consider octinoxate as a potential endocrine disruptor of thyroid hormones in fish, which can lead to disruption of the homeostasis of the entire organism.

Considering results of embryotoxicity testing, UV filters tested in mixtures caused more toxic effect than UV filters tested individually due to increased mortality and earlier hatching of embryos. In the list of all our results, exposure to the tested pollutants can be considered as dangerous for aquatic organisms.

## 10 KLÍČOVÁ SLOVA

**Klíčová slova:** oktinoxát, tonalid, oxidativní stres, hematologicko-biochemické parametry, histologicko-patologické parametry, endokrinní disrupce, thyroïdní hormony, vitellogenin, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*

**Key words:** octinoxate, tonalide, oxidative stres, hematological-biochemical indices, histopathological parameters, endocrine disruption, thyroid hormone, vitellogenin, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*

## 11 POUŽITÁ LITERATURA

Abou-Dahech, M., Boddu, S.H., Devi Bachu, R., Babu, R.J., Shahwan, M., Al-Tabakha, M.M., & Tiwari, A. K. (2022). A mini-review on limitations associated with UV filters. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(11), 104212.

Abramsson-Zetterberg, L., & Slanina, P. (2002). Macrocyclic musk compounds—An absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo Micronucleus assay. *Toxicology Letters*, 135(1), 155–163.

Ahmad, H.A., Ahmad, S., Cui, Q., Wang, Z., Wei, H., Chen, X., Ni, S.Q., Ismail, S., Awad, H.M., & Tawfik, A. (2022). The environmental distribution and removal of emerging pollutants, highlighting the importance of using microbes as a potential degrader: A review. *Science of The Total Environment*, 809, 151926.

Ali, J., Ali, M., Khan, I., Khan, A., Rafique, Z., & Waseem, H. (2022). Advances in biodegradation and bioremediation of emerging contaminants in the environment. In *Biological Approaches to Controlling Pollutants* (pp. 121–138). Elsevier.

Amine, H., Gomez, E., Halwani, J., Casellas, C., & Fenet, H. (2012). UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. *Marine Pollution Bulletin*, 64(11), 2435–2442.

Aminot, Y., Munsch, C., Héas-Moisan, K., Pollono, C., & Tixier, C. (2021). Levels and trends of synthetic musks in marine bivalves from French coastal areas. *Chemosphere*, 268, 129312.

Apel, C., Joerss, H., & Ebinghaus, R. (2018). Environmental occurrence and hazard of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of European North and Baltic Seas. *Chemosphere*, 212, 254–261.

Api, A.M., Smith, R.L., Pipino, S., Marczylo, T., & De Matteis, F. (2004). Evaluation of the oral subchronic toxicity of AHTN (7-Acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene) in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5), 791–801.

Artola-Garicano, E., Borkent, I., Hermens, J.L.M., & Vaes, W.H.J. (2003). Removal of two polycyclic musks in sewage treatment plants: freely dissolved and total concentrations. *Environmental Science & Technology*, 37(14), 3111–3116.

Babin, P. J. (1992). Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 262(5), E712–E720.

Balázs, A., Krifaton, C., Orosz, I., Szoboszlai, S., Kovács, R., Csenki, Z., Urbányi, B., & Kriszt, B. (2016). Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 45–53.

Balci, E., Genisoglu, M., Sofuoglu, S.C., & Sofuoglu, A. (2020). Indoor air partitioning of Synthetic Musk Compounds: Gas, particulate matter, house dust, and window film. *Science of The Total Environment*, 729, 138798.

Bell, K.Y., Wells, M.J.M., Traexler, K.A., Pellegrin, M.L., Morse, A., & Bandy, J. (2011). Emerging Pollutants. *Water Environment Research*, 83(10), 1906–1984.

Blahova, J., Divisova, L., Plhalova, L., Enevova, V., Hostovsky, M., Doubkova, V., Marsalek, P., Fictum, P., & Svobodova, Z. (2018). Multibiomarker responses of juvenile stages of zebrafish (*Danio rerio*) to subchronic exposure to polycyclic musk tonalide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(4), 568–576.

Blüthgen, N., Zucchi, S., & Fent, K. (2012). Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2), 184–194.

Brausch, J.M., Rand, G.M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82, 1518–1532.

Bunke, D., Groß, R., Kalberlah, F., Oltmanns, J., Schwarz, M., Reihlen, A., & Reineke, N. (2013). 4M: Mixtures under REACH. Concepts and Options to Act. Mixtures in the Environment—Development of Assessment Strategies for the Regulation of Chemicals under REACH. Environmental Research of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety. Project No (FKZ), 3711(63), 429.

Cahova, J., Blahova, J., Marsalek, P., Doubkova, V., Franc, A., Garajova, M., Tichy, F., Mares, J., & Svobodova, Z. (2021a). The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl

methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of The Total Environment*, 774, 145570.

Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2021b). Do single-component and mixtures selected organic UV filters induce embryotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*)? *Water*, 13(16), 2203.

Cahova, J., Blahova, J., Mares, J., Hodkovicova, N., Sauer, P., Kroupova, H. K., & Svobodova, Z. (2023a). Octinoxate as a potential thyroid hormone disruptor – A combination of in vivo and in vitro data. *Science of The Total Environment*, 856, 159074.

Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Marsalek, P., Doubkova, V., Hostovsky, M., Divisova, L., Mares, J., Faggio, C., & Svobodova, Z. (2023b). Long-term exposure to polycyclic musk tonalide—A potential threat to juvenile zebrafish (*Danio rerio*)? *Veterinárni Medicína*, 68(5), 218–224.

Castro, M., Fernandes, J.O., Pena, A., & Cunha, S.C. (2018). Occurrence, profile and spatial distribution of UV-filters and musk fragrances in mussels from Portuguese coastline. *Marine Environmental Research*, 138, 110–118.

Castro, Ó., Trabalón, L., Schilling, B., Borrull, F., & Pocurull, E. (2019). Solid phase microextraction Arrow for the determination of synthetic musk fragrances in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1591, 55–61.

Cavalheiro, J., Prieto, A., Monperrus, M., Etxebarria, N., & Zuloaga, O. (2013). Determination of polycyclic and nitro musks in environmental water samples by means of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection-gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta*, 773, 68–75.

Chase, D.A., Karnjanapiboonwong, A., Fang, Y., Cobb, G.P., Morse, A.N., & Anderson, T.A. (2012). Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments. *Science of The Total Environment*, 416, 253–260.

Chaves Lopes, F., Rosa de Castro, M., Caldas Barbosa, S., Primel, E.G., & de Martinez Gaspar Martins, C. (2020). Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111401.

Chen, C.; Zhou, Q.; Bao, Y.; Li, Y.; Wang, P. (2010). Ecotoxicological effects of polycyclic musks and cadmium on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Environmental Sciences*, 22, 1966–1973.

Chisvert, A., & Salvador, A. (2007). 3.1—UV Filters in Sunscreens and other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods. In A. Salvador & A. Chisvert (Ed.), *Analysis of Cosmetic Products* (pp. 83–120). Elsevier.

Chu, S., Kwon, B.R., Lee, Y.M., Zoh, K.D., & Choi, K. (2021). Effects of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) on thyroid hormones and genes associated with thyroid, neurotoxic, and nephrotoxic responses in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 263, 128176.

Cizmas, L., Sharma, V.K., Gray, C.M., & McDonald, T.J. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in waters: Occurrence, toxicity, and risk. *Environmental Chemistry Letters*, 13(4), 381–394.

Cuccaro, A., Oliva, M., De Marchi, L., Vieira Sanches, M., Bontà Pittaluga, G., Meucci, V., Battaglia, F., Puppi, D., Freitas, R., & Pretti, C. (2022). Biochemical response of *Ficopomatus enigmaticus* adults after exposure to organic and inorganic UV filters. *Marine Pollution Bulletin*, 178, 113601.

D'Amico, M., Gambaro, A., Barbante, C., Barbaro, E., Caiazzo, L., & Vecchiato, M. (2022). Occurrence of the UV-filter 2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Antarctic snow: First results. *Microchemical Journal*, 183, 108060.

Dang, Z., Arena, M., & Kienzler, A. (2021). Fish toxicity testing for identification of thyroid disrupting chemicals. *Environmental Pollution*, 284, 117374

Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., & Quentel, C. (2011). Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquatic Toxicology*, 105(3–4), 300–311.

Drake, J.J.P., Gaunt, I.F., Butterworth, K.R., Hooson, J., Hardy, J., & Gangolli, S.D. (1975). Short-term toxicity of isoamyl salicylate in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 13(2), 185–193.

Eales, J.G., & Brown, S.B. (2005). Chapter 14 Thyroid hormones. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6, pp. 397–412. Elsevier.

Ehiguese, F.O.; Alam, M.R.; Pintado-Herrera, M.G.; Araújo, C.V.M.; Martin-Diaz, M.L. (2020). Potential of environmental concentrations of the musks galaxolide and tonalide to induce oxidative stress and genotoxicity in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 160, 105019.

Ehiguese, F.O., Rodgers, M.L., Araújo, C.V.M., Griffitt, R.J., Martin-Diaz, M.L. (2021). Galaxolide and tonalide modulate neuroendocrine activity in marine species from two taxonomic groups. *Environmental Research*, 196, 110960.

Fang, H., Li, G., Yao, S., Liang, X., & An, T. (2017). Kinetic and mechanism studies of musk tonalide reacted with hydroxyl radical and the risk assessment of degradation products. *Catalysis Today*, 281, 642–648.

Ferraris, F.K., Garcia, E.B., Chaves, A. da S., Brito, T.M. de, Doro, L.H., Félix da Silva, N.M., Alves, A.S., Pádua, T.A., Henriques, M. das G.M.O., Cardoso Machado, T.S., & Amendoeira, F.C. (2020). Exposure to the UV filter octyl methoxy cinnamate in the postnatal period induces thyroid dysregulation and perturbs the immune system of mice. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 943.

Fisch, K., Waniek, J.J., & Schulz-Bull, D.E. (2017). Occurrence of pharmaceuticals and UV-filters in riverine run-offs and waters of the German Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 124, 388–399.

Fong, H.C.H., Ho, J.C.H., Cheung, A.H.Y., Lai, K.P., & Tse, W.K.F. (2016). Developmental toxicity of the common UV filter, benzophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 164, 413–420.

Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., & Barceló, D. (2015). UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of The Total Environment*, 518–519, 518–525.

Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kocour Kroupova, H., Grabic, R., & Randak, T. (2013). Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, 41–47.

Hajšlová, J., Šetková, L. (2004). Synthetic musks in bioindicators: monitoring data of fish and human milk samples from the Czech Republic. In: Rimkus, G.G. (Ed.), Series Anthropogenic Compounds. *The Handbook of Environmental Chemistry*. vol 3X. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hara, A.; Hiramatsu, N.; Fujita, T. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. (2016). *Fisheries Science.*, 82, 187–202.

Harter, T.S., May, A.G., Federspiel, W.J., Supuran, C.T., & Brauner, C.J. (2018). Time course of red blood cell intracellular pH recovery following short-circuiting in relation to venous transit times in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315(2), R397–R407.

Hawash, H.B., Moneer, A.A., Galhoum, A.A., Elgarahy, A.M., Mohamed, W.A.A., Samy, M., El-Seedi, H.R., Gaballah, M.S., Mubarak, M.F., & Attia, N.F. (2023). Occurrence and spatial distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment, their characteristics, and adopted legislations. *Journal of Water Process Engineering*, 52, 103490.

Heberer, T. (2002). Occurrence, Fate, and Assessment of polycyclic musk residues in the aquatic environment of urban areas—A Review. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 30, 227–243.

Hodkovicova, N., Enevova, V., Cahova, J., Blahova, J., Siroka, Z., Plhalova, L., Doubkova, V., Marsalek, P., Franc, A., Fiorino, E., Faggio, C., Tichy, F., Faldyna, M., & Svobodova, Z. (2020). Could the musk compound tonalide affect physiological functions and act as an endocrine disruptor in rainbow trout? *Physiological Research*, 595–606.

Holbech, H., Nørum, U., Korsgaard, B., & Bjerregaard, P. (2002). The Chemical UV-Filter 3-benzylidene camphor causes an oestrogenic effect in an *in vivo* fish assay: *in vivo* oestrogenicity of 3-benzylidene camphor. *Pharmacology & Toxicology*, 91(4), 204–208.

Huang, W., Xie, Z., Yan, W., Mi, W., & Xu, W. (2016). Occurrence and distribution of synthetic musks and organic UV filters from riverine and coastal sediments in the Pearl River estuary of China. *Marine Pollution Bulletin*, 111(1–2), 153–159.

Ishibashi, H., Watanabe, N., Matsumura, N., Hirano, M., Nagao, Y., Shiratsuchi, H., Kohra, S., Yoshihara, S., & Arizono, K. (2005). Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sciences*, 77(21), 2643–2655.

Jang, G.H., Park, C.B., Kang, B.J., Kim, Y.J., & Lee, K.H. (2016). Sequential assessment via daphnia and zebrafish for systematic toxicity screening of heterogeneous substances. *Environmental Pollution*, 216, 292–303.

Jara, E.L., Muñoz-Durango, N., Llanos, C., Fardella, C., González, P.A., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., & Riedel, C.A. (2017). Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunology Letters*, 184, 76–83.

Javed, M., Ahmad, I., Ahmad, A., Usmani, N., & Ahmad, M. (2016). Studies on the alterations in haematological indices, micronuclei induction and pathological marker enzyme activities in *Channa punctatus* (spotted snakehead) perciformes, channidae exposed to thermal power plant effluent. *Springer Plus*, 5(1), 761.

Jentzsch, F., Reich, M., Kümmerer, K., & Olsson, O. (2019). Photolysis of mixtures of UV filters octocrylene and ethylhexyl methoxycinnamate leads to formation of mixed transformation products and different kinetics. *Science of The Total Environment*, 697, 134048.

Jesus, A., Augusto, I., Duarte, J., Sousa, E., Cidade, H., Cruz, M. T., Lobo, J.M.S., & Almeida, I.F. (2022). Recent Trends on UV filters. *Applied Sciences*, 12(23), 12003.

Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H., & Oehlmann, J. (2012). Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution*, 163, 84–90.

Kang, X., Hu, B., Perdana, M.C., Zhao, Y., & Chen, Z. (2022). Extreme learning machine models for predicting the n-octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) data of organic compounds. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 108552.

Košnář, Z., Mercl, F., Chane, A. D., Pierdonà, L., Míchal, P., & Tlustoš, P. (2021). Occurrence of synthetic polycyclic and nitro musk compounds in sewage sludge from municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 801, 149777.

Koutková, Z., Blahová, J. a Svobodová, Z. (2020). Vitellogenin – biomarker endokrinní disrupce u ryb. *Chemické Listy*, 114(11), 746–752.

Landi, C., Cameli, P., Vantaggiato, L., Bergantini, L., d'Alessandro, M., Perruzza, M., Carleo, A., Shaba, E., Di Giuseppe, F., Angelucci, S., Bargagli, E., & Bini, L. (2021). Ceruloplasmin and oxidative stress in severe eosinophilic asthma patients treated with Mepolizumab and Benralizumab. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1869(2), 140563.

Langford, K.H., Reid, M.J., Fjeld, E., Øxnevad, S., & Thomas, K.V. (2015). Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, 80, 1–7.

Lee, I., Lee, J., Jung, D., Kim, S., & Choi, K. (2019). Two-generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. *Chemosphere*, 228, 478–484.

Li, X., Chu, Z., Yang, J., Li, M., Du, M., Zhao, X., Zhu, Z. (Joy), & Li, Y. (2018a). Synthetic Musks: A Class of Commercial Fragrance Additives in Personal Care Products (PCPs) Causing Concern as Emerging Contaminants. In *Advances in Marine Biology*, 81, pp. 213–280). Elsevier.

Li, A. J., Law, J. C.F., Chow, C.H., Huang, Y., Li, K., & Leung, K. S.Y. (2018b). Joint Effects of Multiple UV Filters on Zebrafish Embryo Development. *Environmental Science & Technology*, 52(16), 9460–9467.

Li, N., Ho, W., Wu, R.S.S., Tsang, E.P.K., Ying, G.G., & Deng, W.J. (2019). Ultra violet filters in the urine of preschool children and drinking water. *Environment International*, 133, 105246.

Li, W.; Wang, S.; Li, J.; Wang, X.; Cui, L.; Chen, J.; Liu, Z. (2020). Antioxidative enzyme activities in the *Rhodeinae sinensis* Gunther and *Macrobrachium nipponense* and multi-endpoint assessment under tonalide exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 199, 110751.

Liu, J., Zhang, W., Zhou, Q., Zhou, Q., Zhang, Y., & Zhu, L. (2021). Polycyclic musks in the environment: A review of their concentrations and distribution, ecological effects and behavior, current concerns and future prospects. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(4), 323–377.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X.C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473–474, 619–641.

Magdaleno, A., Saenz, M.E., Juárez, A.B., & Moretton, J. (2015). Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 72–78.

Manová, E., von Goetz, N., Keller, C., Siegrist, M., & Hungerbühler, K. (2013). Use Patterns of Leave-on Personal Care Products among Swiss-German Children, Adolescents, and

Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2778–2798.

Martínez-Guitarte, J.L. (2018). Transcriptional activity of detoxification genes is altered by ultraviolet filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 64–71.

Mitchelmore, C.L., He, K., Gonsior, M., Hain, E., Heyes, A., Clark, C., Younger, R., Schmitt-Kopplin, P., Feerick, A., Conway, A., & Blaney, L. (2019). Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. *Science of The Total Environment*, 670, 398–410.

Molins-Delgado, D., Muñoz, R., Nogueira, S., Alonso, M.B., Torres, J.P., Malm, O., Ziolli, R.L., Hauser-Davis, R.A., Eljarrat, E., Barceló, D., & Díaz-Cruz, M.S. (2018). Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. *Science of The Total Environment*, 618, 451–459.

Moon, H.B., Lee, D.H., Lee, Y.S., & Kannan, K. (2012). Occurrence and accumulation patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons and synthetic musk compounds in adipose tissues of Korean females. *Chemosphere*, 86(5), 485–490.

Nakata, H., Hinosaka, M., & Yanagimoto, H. (2015). Macrocyclic-, polycyclic-, and nitro musks in cosmetics, household commodities and indoor dusts collected from Japan: Implications for their human exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 248–255.

Nakata, H., Shinohara, R.I., Nakazawa, Y., Isobe, T., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Tanabe, S., Zakaria, M.P., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Kim, E.Y., Min, B.Y., We, S.U., Viet, P. H., Tana, T.S., Prudente, M., Frank, D., Lauenstein, G., & Kannan, K. (2012). Asia–Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 64(10), 2211–2218.

Nariadení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Nariadení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1298/2015 ze dne ne 28. července 2015, kterým se mění přílohy II a VI nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 621/2016 ze dne 21. dubna 2016, kterým se mění příloha VI nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Nařízení Komise (EU) č. 1176/2022 ze dne 7. července 2022, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, pokud jde o používání některých filtrů ultrafialového záření v kosmetických přípravcích. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Nataraj, B., Maharajan, K., Hemalatha, D., Rangasamy, B., Arul, N., & Ramesh, M. (2020). Comparative toxicity of UV-filter Octyl methoxycinnamate and its photoproducts on zebrafish development. *Science of The Total Environment*, 718, 134546.

Nataraj, B., Maharajan, K., Malafaia, G., Hemalatha, D., Ahmed, M.A.I., & Ramesh, M. (2022). Gene expression profiling in liver of zebrafish exposed to ethylhexyl methoxycinnamate and its photoproducts. *Science of The Total Environment*, 826, 154046.

Nečasová, A., Bányiová, K., Literák, J., & Čupr, P. (2017). New probabilistic risk assessment of ethylhexyl methoxycinnamate: Comparing the genotoxic effects of *trans* - and *cis* -EHMC: New probabilistic risk assessment of ethylhexyl methoxycinnamate. *Environmental Toxicology*, 32(2), 569–580.

Nguyen, K.T.N., Scapolla, C., Di Carro, M., & Magi, E. (2011). Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 85, 2375–2384.

OECD, The 2007 OECD list of high production volume chemicals by Organization for Economics Co-operation and Development. <https://hpcchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=ea53ff90-c17e-46fe-a912-8d17a873bc40>,

OECD. (2000). Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test. OECD.

OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD.

Park, C.B., Jang, J., Kim, S., & Kim, Y.J. (2017). Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 57–63.

Parolini, M., Magni, S., Traversi, I., Villa, S., Finizio, A., Binelli, A. (2015). Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 1–10.

Peng, F.J., Hu, L.X., Pan, C.G., Ying, G.G., & Van den Brink, P.J. (2019). Insights into the sediment toxicity of personal care products to freshwater oligochaete worms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 296–302.

Picot Groz, M., Martinez Bueno, M.J., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., Maria, V., Bebianno, M.J., & Gomez, E. (2014). Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Science of The Total Environment*, 493, 162–169.

Plhalova, L., Blahova, J., Divisova, L., Enevova, V., Casuscelli di Tocco, F., Faggio, C., Tichy, F., Vecerek, V., Svobodova, Z., (2018). The effects of subchronic exposure to NeemAzal T/S on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemical Ecology*, 34 (3), 199–210.

Power, D.M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M.A., Björnsson, B.T., Einarsdottir, I.E., Canario, A.V.M., & Sweeney, G.E. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 447–459.

Quintaneiro, C., Teixeira, B., Benedé, J.L., Chisvert, A., Soares, A.M.V.M., & Monteiro, M.S. (2019). Toxicity effects of the organic UV-filter 4-Methylbenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 218, 273–281.

Raffa, R.B., Pergolizzi, J.V., Taylor, R., Kitzen, J.M., & for the NEMA Research Group. (2019). Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 44(1), 134–139.

Rahman Khan, F., & Sulaiman Alhewairini, S. (2019). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In L. Streba, D. Ionut Gheonea, & M. Schenker (Ed.), *Current Trends in Cancer Management*. IntechOpen.

Rainieri, S., Barranco A., Primec M., & Langerholc T. (2017). Occurrence and Toxicity of Musks and UV Filters in the Marine Environment. *Food and Chemical Toxicology*, 104, 57–68.

Reiner, J.L., Berset, J.D., & Kannan, K. (2007). Mass Flow of Polycyclic Musks in Two Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(4), 451–457.

Rimkus, G.G., (1999). Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicological Letters*, 111, 37–56.

Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86, 1040–1049.

Sang, W., Zhang, Y., Zhou, X., Ma, L., & Sun, X. (2012). Occurrence and Distribution of Synthetic Musks in Surface Sediments of Liangtan River, West China. *Environmental Engineering Science*, 29(1), 19–25.

Santos, A.J.M., Miranda, M.S., & Esteves da Silva, J.C.G. (2012). The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research*, 46(10), 3167–3176.

Saraiva, M., Cavalheiro, J., Lanceleur, L., & Monperrus, M. (2016). Synthetic musk in seafood products from south Europe using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chemistry*, 200, 330–335.

Scheil, V., Tribskorn, R., & Köhler, H.R. (2008). Cellular and Stress Protein Responses to the UV Filter 3-Benzylidene Camphor in the Amphipod Crustacean *Gammarus fossarum* (Koch 1835). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), 684–689.

Schneider, S.L., & Lim, H.W. (2019). Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 266–271.

Schreurs, R.H.M.M., Legler, J., Artola-Garicano, E., Sinnige, T.L., Lanser, P.H., Seinen, W., & van der Burg, B. (2004). In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 38(4), 997–1002.

Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Prokes, M., Tichy, F., Fiorino, E., Faggio, C., Svobodova, Z. (2017). Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere*, 188, 414–423.

Shi, Y.B. (2013). Unliganded Thyroid Hormone Receptor Regulates Metamorphic Timing via the Recruitment of Histone Deacetylase Complexes. *In Current Topics in Developmental Biology* 105, pp. 275–297. Elsevier.

Simonnet-Laprade, C., Bayen, S., Le Bizec, B., & Dervilly, G. (2021). Data analysis strategies for the characterization of chemical contaminant mixtures. Fish as a case study. *Environment International*, 155, 106610.

Směrnice Komise 2008/105/ES ze dne 16. prosince 2008, o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky, změně a následném zrušení směrnic Rady 82/176/EHS, 83/513/EHS, 84/156/EHS, 84/491/EHS a 86/280/EHS a změně směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Směrnice Komise 2008/123/ES ze dne 18. prosince 2008, kterou se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 76/768/EHS týkající se kosmetických prostředků za účelem přizpůsobení jejich příloh II a VII technickému pokroku. *In: Úřední věstník Evropské unie.*

Spurgeon, D.J.; Jones, O.A.H.; Dorne, J.L.C.M.; Svendsen, C.; Swain, S.; Stürzenbaum, S.R. (2010). Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of The Total Environment*, 408, 3725–3734.

Steinberg, P., Fischer, T., Arand, M., Park, E., Elmadfa, I., Rimkus, G., Brunn, H., & Dienes, H.P. (1999). Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN). *Toxicology Letters*, 111(1–2), 151–160.

Subedi, B., Du, B., Chambliss, C.K., Koschorreck, J., Rüdell, H., Quack, M., Brooks, B. W., & Usenko, S. (2012). Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in German Fish Tissue: A National Study. *Environmental Science & Technology*, 46(16), 9047–9054.

Svobodová, Z., Piačka, V., Adámek, Z. (1995). Pstruh duhový jako indikátor kvality vody před její úpravou. Aktuální otázky vodárenské biologie, *ČSVTS Praha*, 41–44.

Trabalón, L., Cano-Sancho, G., Pocurull, E., Nadal, M., Domingo, J. L., & Borrull, F. (2015). Exposure of the population of Catalonia (Spain) to musk fragrances through seafood consumption: Risk assessment. *Environmental Research*, 143, 116–122.

Tumová, J.; Šauer, P.; Golovko, O.; Koba Ucu, O.; Grabic, R.; Máchová, J.; Kocour Kroupová, H. (2019). Effect of polycyclic musk compounds on aquatic organisms: A critical literature review supplemented by own data. *Science of The Total Environment*, 651, 2235–2246.

USEPA. (2006). High Production Volume (HPV) Chemical List Database. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Villa, S., Assi, L., Ippolito, A., Bonfanti, P., & Finizio, A. (2012). First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: Spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy). *Science of The Total Environment*, 416, 137–141.

Wang, W., Lee, I.S., & Oh, J.E. (2022). Specific-accumulation and trophic transfer of UV filters and stabilizers in marine food web. *Science of The Total Environment*, 825, 154079.

WHO. Sun protection - a primary teaching resource. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 2003.

Wong, F., Robson, M., Melymuk, L., Shunthirasingham, C., Alexandrou, N., Shoeib, M., Luk, E., Helm, P., Diamond, M.L., & Hung, H. (2019). Urban sources of synthetic musk compounds to the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 21(1), 74–88.

Wu, D., Zhou, Y., Lu, G., Hu, K., Yao, J., Shen, X., & Wei, L. (2019). The Occurrence and Risks of Selected Emerging Pollutants in Drinking Water Source Areas in Henan, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(21), 4109.

Yamaguchi, A., Ishibashi, H., Kohra, S., Arizono, K., & Tominaga, N. (2005). Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 72(3), 239–249.

Yamauchi, R., Ishibashi, H., Hirano, M., Mori, T., Kim, J.W., Arizono, K. (2008). Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 90, 261–268.

Zeng, X., Sheng, G., Xiong, Y., & Fu, J. (2005). Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC–EI–MS. *Chemosphere*, 60(6), 817–823.

Zhou, R., Lu, G., Yan, Z., Jiang, R., Shen, J., & Bao, X. (2019). Parental transfer of ethylhexyl methoxy cinnamate and induced biochemical responses in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 206, 24–32.

Zicarelli, G., Multisanti, C. R., Falco, F., & Faggio, C. (2022). Evaluation of toxicity of Personal Care Products (PCPs) in freshwaters: Zebrafish as a model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103923.

## 12 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

**Obrázek 1:** Počet studií publikovaných v jednotlivém státě a regionu na téma „léčiv a produktů osobní péče ve vodním prostředí“ mezi lety 2014 a 2022. *Upraveno pro účely předkládané práce (Hawash et al., 2023).*

**Obrázek 2:** Elektromagnetické spektrum slunečního záření a jeho účinky. *Upraveno pro účely disertační práce dle Abou-Dahech et al. (2022).*

**Obrázek 3:** Změna limitu povolených koncentrací benzofenonu-3 a oktokrylenu v kosmetických přípravcích. *Upraveno pro účely předkládané práce (Příloha Nařízení Komise (EU) č. 1176/2022).*

**Obrázek 4:** Nástin osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza u ryb. *Upraveno pro účely předkládané práce dle Dang et al. (2021).*

**Obrázek 5:** Struktura a základní fyzikálně-chemické vlastnosti tonalidu. *Upraveno dle Rimkus (1999).*

**Tabulka 1:** Seznam UV filtrů povolených v kosmetických přípravcích. *Upraveno a zkráceno dle Nařízení 1223/2009 o kosmetických přípravcích (EU), Nařízení Komise EU 621/2016, Nařízení Komise EU 1298/2015 a dle Santos et al. (2012) pro účely předkládané práce.*

**Tabulka 2:** Koncentrace vybraných UV filtrů v a/biotických maticích.

**Tabulka 3:** Základní charakteristika a fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných UV filtrů. *Zkráceno a upraveno pro účely disertační práce dle Santos et al., 2012.*

**Tabulka 4:** Koncentrace musk sloučeniny tonalidu v a/biotických maticích.

## 13 SEZNAM ZKRATEK

4-MBC – 4-methylbenzyliden kafr

AHTN – tonalid

BP-3 – benzofenon-3

DIO – dejodáza

*dio2* – dejodáza typ 2

EHMC – oktinoxát, ethylhexyl methoxycinamát

EU – Evropská unie

FET – Fish Embryo Acute Toxicity Test

FRAP – redukční potenciál plazmy

GPx – glutathionperoxidáza

GR – glutathionreduktáza

GST – glutathion-S-transferáza

KAT – kataláza

log  $K_{ow}$  – rozdělovacím koeficientem oktanol/voda

MCV – střední objem erytrocytu

MDA – malondialdehyd

MCH – střední obsah hemoglobinu v erytrocytu

MCHC – střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu

OC – oktokrylen

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

PAH – polyaromatické uhlovodíky

*pax8a* – paired box 8 a

PBSA – 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina

PCPs – produkty osobní péče

PPCPs – léčiva a produkty osobní péče

REACH – Nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

RGA – Reporter Gene Bioassay

RT-qPCR – real-time polymerázová řetězová reakce

SOD – superoxiddismutáza

SPF – síla ochranného faktoru proti UV záření

T3 – trijódthyronin

T4 – thyroxin

TBARS – látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou

THr – receptor hormonů štítné žlázy

thra – gen pro receptor THr $\alpha$

thr $\beta$  – gen pro receptor THr $\beta$

TR $\beta$  – beta izoforma thyroidního hormonálního receptoru

TSH – hormon stimulující štítnou žlázu/thyrotropin

TTR – transtyrelin

US EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států

UV – ultrafialové