

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Ochrana životního prostředí
Ekologie a ochrana prostředí



Bc. Karolína Leifertová

Nové perfluorované látky v životním prostředí
Novel perfluorinated compounds in the environment

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:
Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, PhD., DSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Lucii Linhartové, PhD. za trpělivost při učení práce s buňkami. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Aleně Filipové, PhD. za analýzu fosfolipidů. Ráda bych také poděkovala všem, kteří poslouchali ať už dobrovolně, či nedobrovolně mé výklady o nebezpečnosti perfluorovaných látek a těm, kteří na základě těchto výkladů již nadále nepoužívají teflonové pánve. Na závěr patří největší dík mému školiteli, prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, PhD. DSc., za vyhodnocení vzorků, odborné konzultace a trpělivost. Tato práce vynikla za podpory Technologické agentury ČR (projekt č. SS02030008, program: Prostředí pro život).

Abstrakt

Perfluorované sloučeniny jsou rozsáhlá skupina uměle vyrobených chemikálií. I když jsou spojovány s hepatotoxicitou, neurotoxicitou, nefrotoxicitou a karcinogenitou, mechanismus toxicity zůstává stále nejasný. Teprve nedávno byly dvě z těchto sloučenin (kyselina perfloroktanová a perfluorsulfonová kyselina) plošně zakázány. To vedlo k výrobě tzv. „nových perfluorovaných sloučenin“. Tato práce se zaměřuje na hodnocení toxicity 4 perfluorovaných sloučenin, včetně nových perfluorovaných sloučenin (kyseliny perfluoroktanové PFOA, perfluorsulfonové kyseliny PFOS, hexafluorpropylenoxid-dimerní kyseliny GenX a hexafluorpropylenoxid trimerní kyseliny HFPO-TA). Pro testování byly využity gonadální a jaterní buněčné linie pstruha duhového. Byly provedeny příslušné testy toxicity, jako jsou testy životaschopnosti (karboxyfluorescein diacetát, alamar blue a příjem neutrální červeně), aktivace cytochromu P450 1A (ethoxyresorufin-o-deethyláza, EROD) a měření tvorby reaktivních forem kyslíku (2',7'-dichlorfluorescein diacetát). HFPO-TA dramaticky snížila životaschopnost a vedla ke statisticky významnému zvýšení intracelulárních reaktivních forem kyslíku. GenX jako jediná způsobila zvýšení aktivity EROD, ale nebyl pozorován žádný efekt na viabilitu či tvorbu reaktivních forem kyslíku. Měření fosfolipidových mastných kyselin ukázalo, že všechny testované látky mohou měnit obsah fosfolipidových mastných kyselin alespoň jedné z buněčných linií a mohou tak potenciálně narušovat její funkci.

Klíčová slova: PFC, nové perfluorované látky, HFPO-TA, GenX, viabilita, EROD, ROS, PLFA

Abstract

Perfluorinated compounds are a broad class of manmade chemicals. Even though they have been linked to hepatotoxicity, neurotoxicity, nephrotoxicity and carcinogenicity, the mechanism of toxicity still remains unclear. Only recently, two compounds (perfluorooctanesulfonic acid and perfluorooctanoic acid) have been phased out. This has led to a production of so-called “novel perfluorinated compounds”. This work focuses on the evaluation of toxicity for 4 perfluorinated compounds, including the novel perfluorinated compounds (perfluorooctanesulfonic acid PFOS, perfluorooctanoic acid PFOA, hexafluoropropylene oxide dimer acid GenX, and hexafluoropropylene oxide trimer acid HFPO-TA). Gonadal and liver cell lines of rainbow trout were used for testing. Relevant toxicity tests were performed, such as viability tests (carboxyfluorescein diacetate, alamar blue and neutral red uptake), cytochrome P450 1A activation (ethoxyresorufin-o-deethylase, EROD) and measurements of reactive oxygen species generation (2',7'-dichlorofluorescein diacetate). HFPO-TA dramatically reduced viability and resulted in a statistically significant increase in intracellular reactive oxygen species. GenX caused an increase in EROD activity, but no effect on viability or reactive oxygen species formation was observed. The measurement of phospholipid fatty acids showed that all tested substances can change the phospholipid fatty acid content of at least one of the cell lines and thus can potentially disrupt its function.

Keywords: PFC, novel perfluorinated compounds, HFPO-TA, GenX, viability, EROD, ROS, PLFA

Obsah

Seznam zkratek	8
1 Úvod	11
2 Teoretická část	13
2.1 Perfluorované látky	13
2.2 Výroba	15
2.2.1 Elektrochemická fluorace	15
2.2.2 Telomerizace	16
2.3 Využití	17
2.4 Perfluorované látky v životním prostředí	18
2.4.1 Stockholmská úmluva	18
2.4.2 Limity v pitné vodě	19
2.4.3 Naměřené hodnoty v životním prostředí	20
2.4.4 Osud perfluorovaných látek v životním prostředí	20
2.5 Toxicita	23
2.5.1 Orgánová toxicita	23
2.5.1.1 Hepatotoxicita	23
2.5.1.2 Reprodukční toxicita	24
2.5.2 Buněčná toxicita	25
2.5.2.1 Viabilita buněk	25
2.5.2.2 Apoptóza	25
2.5.2.3 Nekróza	26
2.5.2.4 Reaktivní formy kyslíku	26
2.5.2.4.1 Vliv reaktivních forem kyslíku na membránu	26
2.5.2.5 Interakce s arylovým receptorem	27
2.5.2.6 Syntéza mastných kyselin	28
2.5.2.7 β -oxidace mastných kyselin	29
2.5.2.7.1 Interakce s receptory aktivovanými proliferátory peroxisomů	30
2.5.2.8 Fosfolipidová dvouvrstva	31
2.5.2.8.1 Fosfolipidové mastné kyseliny	33
2.5.2.8.2 Syntéza fosfolipidů	33
3 Hypotézy	35
4 Materiály a metodika	36
4.1 Chemikálie	36

4.2	Materiály.....	38
4.3	Přístroje a software	38
4.4	Buněčné linie.....	39
4.4.1	Udržování buněčných kultur.....	39
4.5	Testy toxicity	41
4.5.1	Postup detekce reaktivních forem kyslíku	41
4.5.2	Postup testu ethoxyresorufin-o-deethyláza.....	41
4.5.3	Postup měření buněčné viability	42
4.5.4	Analýza fosfolipidových mastných kyselin	43
4.5.4.1	Expozice.....	43
4.5.4.2	Extrakce	43
4.5.4.3	Kvantitativní stanovení methylesterů fosfolipidových mastných kyselin	44
4.5.5	Statistická analýza.....	45
5	Výsledky a diskuze.....	46
5.1	Viabilita	46
5.2	Reaktivní formy kyslíku.....	52
5.3	EROD aktivita.....	53
5.4	Analýza fosfolipidových mastných kyselin	55
6	Závěr.....	64
7	Použitá literatura	66

Seznam zkratek

6:2 FTSA	6:2 fluorotelomer sulfonová kyselina
AB	alamar blue
ADONA	dodekafluor-3H-4,8-dioxanonanoát
AFFF	filmotvorné hasicí pěny, z angl. Aqueous film forming foams
AhR	arylový receptor
ATP	adenosintrifosfát
CFDA	karboxyfluorescein diacetát
CFDA-AM	5-karboxyfluorescein diacetát, acetoxymethyl ester
CI-PFESA	chlorované polyfluorované ethylsulfonové kyseliny
CYP1A	cytochrom P450 1A
DCF	dichlorfluorescein
DCFH	dichloro-dihydro-fluorescein diacetát
DCFH-DA	2',7'-dichlorfluorescein diacetát
DMSO	dimethylsulfoxid
DPBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok značky Dulbecco, z angl. Dulbecco's phosphate buffered saline
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí, z angl. Environmental Protection Agency
POPs	perzistentní organické polutanty, z angl. Persistent Organic Pollutants
EQS	standardy environmentální kvality, z angl. environmental quality standard
EROD	ethoxyresorufin-o-deethyláza
F-53B	chlorovaný polyfluorovaný ethersulfonát
FABP	protein vázající mastné kyseliny, z angl. fatty acid binding protein
FAD	flavinadeninukleotid
FTOH	fluorotelomerní alkoholy

GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrofotometrem, z angl. gas chromatography – mass spectrometry
GenX (HFPO-DA)	hexafluorpropylenoxid-dimerní kyselina
HDL	vysokodenzitní lipoprotein, z angl. high density lipoprotein
HepG2	lidská buněčná linie rakoviny jater
hESC	lidské embryonální kmenové buňky, z angl. human embryonic stem cells
HFPO-TA	hexafluorpropylenoxid trimerní kyselina
L15	kultivační médium L15
L15ex	expoziční médium
LDL	nízkodenzitní lipoprotein, z angl. low density lipoprotein
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NRU	Příjem neutrální červeně, z angl. neutral red uptake
PFAS	per a polyfluoroalkylované sloučeniny, z angl. per and polyfluoroalkyl substances
PFBA	kyselina perfluorobutanová
PFBS	perfluorbutansulfonová kyselina
PFCA	perfluorované karboxylové kyseliny
PFDA	kyselina perfluordekanová
PFDoA	kyselina perfluordodekanová
PFDS	perfluordekansulfonová kyselina
PFHpA	kyselina perfluorheptanová
PFHxA	kyselina perfluorohexanová
PFHxS	perfluorhexansulfonová kyselina
PFNA	kyselina perfluorononanová
PFOA	kyselina perfluoroktanová
PFOS	perfluoroktansulfonová kyselina
PFPeA	kyselina perfluorpentanová

PFUnDA	kyselina perfluorundekanová
PLFA	fosfolipidové mastné kyseliny, z angl. phospholipid fatty acid
PPAR	peroxizomový proliferačně aktivovaný receptor, z angl. peroxisome proliferator-activated receptor
PTFE	polytetrafluorethylen
RCF	relativní centrifugační síla, z angl. relative centrifugal force
ROS	reaktivní formy kyslíku, z angl. reactive oxygen species
RTG-2	gonadální buněčná linie pstruha duhového
RTL-W1	jaterní buněčná linie pstruha duhového
T-BHP	tert-butyl hydrogen peroxid
TNF α	faktor nádorové nekrózy α , z angl. tumor necrosis factor α

1 Úvod

Perfluorované látky (PFC, z angl. perfluorinated chemicals) se začaly hojně využívat v polovině minulého století. Díky svým velmi unikátním vlastnostem, způsobeným vazbou uhlík-fluor našly uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. První využívanou perfluorovanou látkou byla kyselina perfluoroktanová (PFOA). Používaly ji například firmy DuPont a 3M pro výrobu teflonu. Postupně se začaly rozvíjet u obyvatel v okolí teflonových provozoven různá onemocnění (Steenland et al., 2020). Přesto, že dlouhodobě existovaly pochybnosti o bezpečnosti využívání perfluorovaných látek, omezení jejich výroby a použití nastalo až v tomto století. Až v roce 2005 vznikl panel C8, jehož cílem bylo prokázat negativní vliv PFOA na zdraví (Scher et al., 2018). Bylo zjištěno, že PFOA vykazuje hepatotoxické, neurotoxické, nefrotoxické, imunotoxické a karcinogenní vlastnosti (Podder et al., 2021). Zároveň je vysoce bioakumulativní (Suja et al., 2009). K úplnému zákazu PFOA došlo až v roce 2019. Pomalá reakce státních orgánů USA ohrozila zdraví milionů lidí a zároveň mezitím došlo ke kontaminaci prakticky celého světa. PFOA je nyní možné detekovat v krevním séru téměř všech lidí na celém světě (Ehresman et al., 2007), ve vodách (Xiao et al., 2015), nebo dokonce v ledních medvědech (Rigét et al., 2013). Mimo PFOA byly využívány i jiné látky, jako je například perfluoroktansulfonová kyselina (PFOS). Tyto dvě látky jsou nyní zapsány na Stockholmské úmluvě. Tím se ovšem problematika perfluorovaných látek nevyřešila. Zákazem používání PFOS a PFOA vznikly nové alternativy, které jsou právně nezávadné, ovšem chybí data o jejich toxicitě (Wang et al., 2009). Některé práce ukazují, že alternativní perfluorované látky jsou rovněž toxické, ne-li toxicitější než PFOA a PFOS (Sheng et al., 2018; Sun et al., 2022). Je proto nutné tyto látky stále monitorovat a nadále zkoumat.

Dalším problémem je, že v životním prostředí nedochází k degradaci perfluorovaných látek, vyjímaje transformace některých perfluorovaných látek za vzniku právě PFOS a PFOA (Blum et al., 2015). Přesto, že některé studie naznačují biodegradaci bakteriemi (Huang et al. 2019; Yu et al. 2020), zatím není známo, zdali tyto bakterie degradují perfluorované látky i v reálných podmínkách (Sáez et al., 2008). Zároveň zatím neexistují vhodné dekontaminační metody, z části proto, že jsou tyto látky všudypřítomné a obzvláště okolí míst s frekventovaným využíváním perfluorovaných látek, jako jsou letiště nebo fluorochemický průmysl, mohou být potenciálně zdraví ohrožující (Cornelsen et al., 2021). Problém perfluorovaných látek prohlubuje i fakt, že je není možné efektivně odstranit z vod, což je jejich hlavní transportní médium a jedna z hlavních expozičních cest pro organismy. Bohužel, jediné funkční technologie odstranění jsou nanofiltrace a reverzní osmóza,

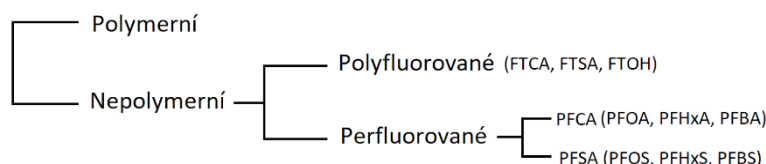
což jsou metody značně finančně i technicky náročné (Franke et al., 2019). Mikrobiálním rozkladem, tedy konvenční metodou čištění odpadních vod, není docíleno odstranění perfluorovaných látek a použitím koagulačních činidel rovněž ne (Rodríguez-Valera et al., 2021). Perfluorované látky se vyskytují i v pitných vodách, protože ani konvenční metody úpravy pitných vod z nich nejsou schopny odstranit tyto látky (Gyllenhammar et al., 2015).

Mechanismus toxicity perfluorovaných látek zatím není zcela objasněn. Existují důkazy o tom, že perfluorované látky mohou interferovat s některými receptory, zahajovat apoptózu a interagovat a narušovat buněčnou membránu (Nouhi et al., 2018; Fitzgerald et al., 2018; Peña-Blanco et al., 2018). Vzhledem k tomu, že je buněčná membrána první exponovanou částí buňky a její správná funkce je nezbytná pro její přežití, je nutné pochopit mechanismus účinku perfluorovaných látek na její vlastnosti a funkci (Yéagle et al., 1989). V této práci bude upřena pozornost na změny složení fosfolipidové dvouvrstvy po expozici perfluorovanými látkami.

2 Teoretická část

2.1 Perfluorované látky

Fluorované látky, se dají rozdělit na polymerní a nepolymerní (Obr. 1). Mezi polymerní látky patří například polytetrafluorethylene (PTFE). Nepolymerní látky obsahují skupiny polyfluorovaných sloučenin, jako jsou například fluorotelomerní alkoholy. V této práci ale bude věnována pozornost pouze perfluorovaným nepolymerním látkám. Tyto uhlovodíky mají všechny vazby C-H nahrazeny za C-F. Nejstudovanější perfluorované látky je možné rozdělit na karboxylové kyseliny (PFCA, z angl. perfluorcarboxylic acid) a perfluooktansulfonové kyseliny (PFSA, z angl. perfluorsulfonic acid) (Miller et al 2015) (Obr. 2). Tyto látky je dále možné dělit dle délky jejich řetězců na krátké a dlouhé. Krátké řetězce obsahují méně jak 5 uhlíků, dlouhé více jak 5 (ITRC, 2017). V současnosti se začíná věnovat pozornost i k takzvaně novým neboli alternativním PFC. Mezi nejčastěji probírané alternativní PFC patří například GenX (nebo také HFPO-DA), HFPO-TA (Obr. 3), ADONA (dodekafluor-3H-4,8-dioxanonanoát) a F-53B (6:2 PFAES, chlorovaný polyfluoralkylethersulfonát) (Ruan et al., 2017; Kotlarz et al., 2020; Zhang et al., 2020).

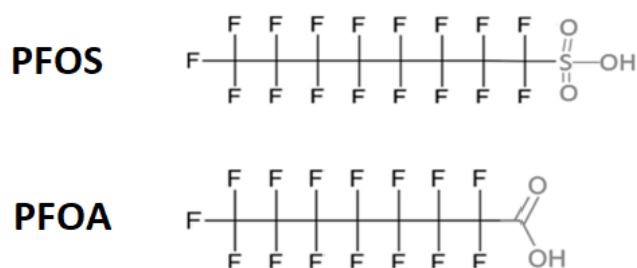


Obrázek 1: Dělení skupin fluorovaných látek, dle ITRC (2017)

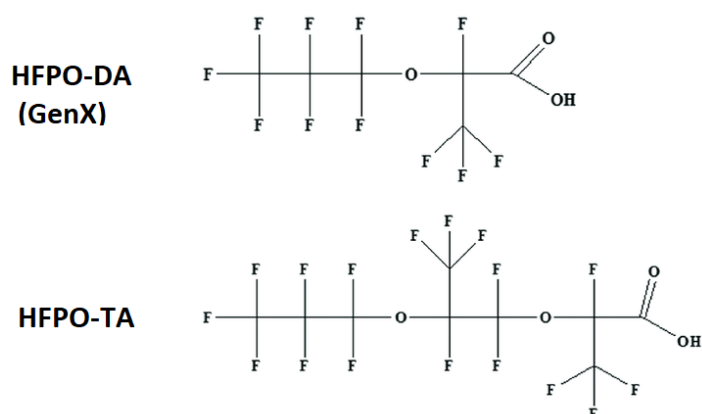
Perfluorované látky jsou převážně pevného skupenství, ovšem kratší řetězce (C4-6) jsou za běžných podmínek kapalné. PFC vykazují zcela jedinečné vlastnosti a díky tomu mají širokou škálu uplatnění. Většinu jejich vlastností lze přisoudit vazbě uhlíku s vysoce elektronegativním fluorem. Tato elektronegativita způsobuje přesun elektronů k fluoru a tím pádem je vazba polarizovaná. Tato vazba je jedna z nejsilnějších v přírodě a zpravidla platí, že její síla roste se stupněm fluorace (Kiplinger et al., 1994). Právě kvůli pevnosti vazby jsou perfluorované látky chemicky i biochemicky stálé a perzistentní v životním prostředí. Vykazují vysokou tepelnou stabilitu (viz tab. 1), zároveň jsou obtížně mísitelné s vodou i organickými rozpouštědly a snižují povrchové napětí vody, chovají se tedy jako surfaktanty.

Tabulka č. 1: Vlastnosti vybraných perfluorovaných látek. NCBI (2020), Feng et al. (2020)

Zkratka	Název	Molekulová hmotnost [g/mol]	Log K_{oc}	Bod varu [°C]
PFOS	Perfluoroktansulfonová kyselina	500,13	6,4	258
PFOA	Kyselina perfluoroktanová	414,07	5,3	192
HFPO-DA (GenX)	Hexafluorpropylenoxid-dimerní kyselina	330,05	4,24	187
HFPO-TA	Hexafluorpropylenoxid trimerní kyselina	496,07	5,5	263



Obrázek 2: Chemická struktura PFOS a PFOA. Upraveno dle Stanifer et al. (2018)



Obrázek 3: Struktura HFPO-DA (GenX) a HFPO-TA. Upraveno dle Xin et al. (2019)

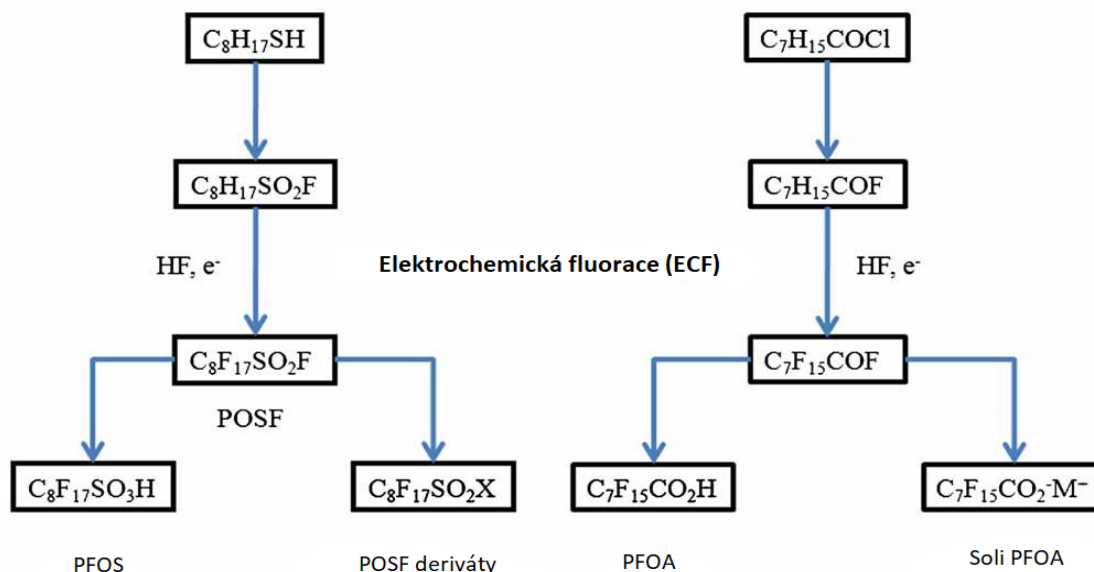
2.2 Výroba

Historicky se PFC vyráběly hlavně dvěma způsoby. Prvním je elektrochemická fluorace (ECF) a druhým je telomerizace. V závislosti na řízení výroby je produkována různá směs lineárních a větvených izomerů (Vyas et al., 2007). Například při výrobě PFOS a PFOA je poměr 70-80 % lineárních a 20-30 % rozvětvených uhlíkových řetězců (Benskin et al., 2010).

2.2.1 Elektrochemická fluorace

Elektrochemická fluorace je proces, který vymyslel a patentoval J. Simons již ve třicátých letech minulého století (Simons et al., 1939). Při tomto procesu se nahrazuje vodík za fluor pomocí elektrického proudu. Například při výrobě PFOS se nejčastěji využívá perfluoroktansulfonylfluorid (POSF). Při tomto procesu se oktansulfonylfluorid jakožto organická složka rozpustí ve fluorovodíku (Obr. 4). K fluoraci dochází na poniklované anodě. Výsledný produkt je nerozpustný ve fluorovodíku a má vysokou hustotu, tudíž je odebrán ze dna (Ignat'ev, 2017). Při ECF vzniká směs různých izomerů, kratších homologů původní organické sloučeniny (Alsmeyer et al., 1994), lineárních či rozvětvených sloučenin, perfluoralkanů, etherů a dalších vedlejších produktů (OECD, 2002).

Reakční schéma výroby PFOS a PFOA pomocí ECF

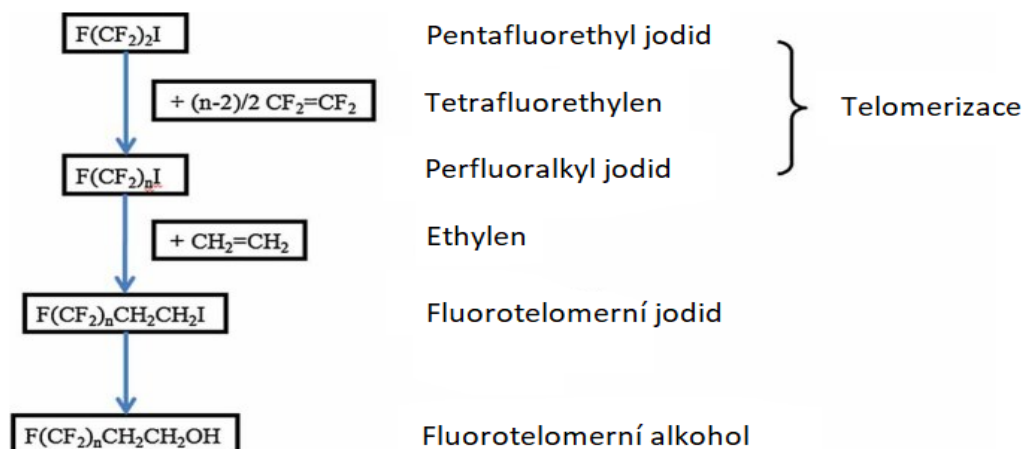


Obrázek 4: Reakční schéma výroby PFOS (vpravo) a PFOA (vlevo) a vznik derivátů a solí. Převzato a upraveno dle Buck et al. (2011).

2.2.2 Telomerizace

Telomerizace byla v roce 1945 definována Hanfordem jako reakce mezi sloučeninou nazývanou telogen a jednou či více molekulami taxogenu (Hanford, 1946; Boutevin et al., 1989). Jedná se o reakci, při které dochází k postupné adici ethylové skupiny k fluoroalkylovému řetězci. Při tomto procesu se využívá perfluorethyljodid, který reaguje s perfluorethylenem za vzniku směsi perfluoralkyljodidů se sudými lineárními perfluorovanými řetězci (Obr. 5). Tato směs se využívá pro výrobu perfluorovaných karboxylových kyselin s lineárním řetězcem nebo fluorotelomerních alkoholů (Lindstorm et al., 2011).

Reakční schéma telomerizace



Obrázek 5: Reakční schéma telomerizace. Převzato a upraveno dle Buck et al. (2011).

2.3 Využití

Díky unikátním vlastnostem se perfluorované uhlovodíky využívají napříč mnoha průmyslovými odvětvími. PFOS se používá ve formě nedisociované sulfonové kyseliny, nebo jako fosfátová sůl (amonná, draselná či lithná sůl) (Concawe, 2016). Využívá se jako impregnace proti vodě a skvrnám při úpravě povrchových materiálů, oblečení nebo koberců. Dle evropské komise bylo ročně využito 150 tun PFOS pouze na úpravu koberců, což je až $\frac{1}{3}$ produkce PFOS (Onyshko et al., 2018). Od počátku století se začala úprava koberců pomocí PFOS omezovat, avšak kvůli dlouhé životnosti koberců může přetrvávat v domácnostech a nadále se pomalu uvolňovat do životního prostředí (Trudel et al., 2008). Zároveň se jako bezpečnější alternativa začala používat PFBS, která je rovněž toxická a bioakumulativní (Poulsen et al., 2005). PFOA se využívala jako polymerizační pomocná látka při výrobě teflonu a fluorotelomerů (Lindstrom, 2011). Teflon je obchodní název pro skupinu chemikálií, jako je například PTFE (Plunkett, 1986). Tento název je známý díky nepřilnavým kuchyňským pomůckám, avšak používá se například i v textilním průmyslu jako impregnace proti vodě anebo v leteckém a elektrotechnickém průmyslu při izolaci kabelů (Sajid et al., 2017; Mishra et al., 2016). Je pravděpodobné, že výrobky, které byly vyráběny pomocí PFOA v sobě mají stopová množství této kyseliny, které se mohou pomalu uvolňovat do okolí (Lv et al., 2009; Sajid et al., 2017). Perfluorované látky jsou také využívány jako příměsi do hasicích pěn, díky své schopnosti vytvoření pěny zamezí přísunu kyslíku k požáru a uhasí jej (Cortina et al., 2008). V nynější době se začínají využívat i nefluorované alternativy, nebo se využívá fluorovaných řetězců o jiné délce (Seow, 2013).

Velkým tématem dnešní doby jsou perfluorované látky v potravinových obalových materiálech. Evropské státy se nyní snaží omezit přítomnost PFC v obalových materiálech a například v Dánsku v roce 2020 vzešel v platnost zákon, jenž to zcela zakazuje (Executive Order on Food Contact Materials and Penal Code for Violation of Related EU Acts Order No. 681 of May 25, 2020).

2.4 Perfluorované látky v životním prostředí

2.4.1 Stockholmská úmluva

Stockholmská úmluva vznikla v roce 2001 na konferenci ve Stockholmu a následně vešla v platnost v roce 2004. Na této konferenci ji podepsalo více než devadesát zemí včetně České republiky. Stockholmská úmluva má za cíl chránit jak lidské zdraví, tak životní prostředí. Upravuje v souladu s principem předběžné opatrnosti výrobu, používání a transport takzvaných perzistentních organických polutantů (POPs z angl. persistent organic pollutants). POPs jsou chemické látky, které vykazují následující vlastnosti: i) jsou toxické jak pro lidi, tak pro zvířata, ii) jsou odolné vůči degradaci iii) akumulují se v tukové tkáni a jsou přítomny ve vysokých koncentracích i na vyšších úrovních potravního řetězce iv) a jsou náchylné k dálkovému přenosu v životním prostředí (sdělení č. 40/2006). Úmluva zároveň obsahuje metodické pokyny a kritéria pro zařazení nových POPs do jednotlivých příloh úmluvy, metodiku pro sledování těchto látek v matricích životního prostředí, dále stanovuje opatření, která vedou ke snížení emisí a prevenci uvolňování POPs a zajišťuje metodiku pro bezpečnou likvidaci těchto látek (Lallas et al., 2001). Doposud se ukázala Stockholmská úmluva jako velmi efektivní mimo jiné i v potlačování obchodu s látkami, jež jsou na ní zapsány (Nunez-Rocha et al. 2019). První perfluorované látky byly navrženy pro zařazení mezi POPs v roce 2005 Švédskem. Jimi jsou PFOS a 96 dalších prekurzorů, které obsahují část struktury PFOS, a které se mohou rozkládat na PFOS. Návrh bohužel neprošel a PFOS, její soli a perfluoroktansulfonylfluorid (PFOSF) byly zařazený do přílohy B až v roce 2009 (sdělení č. 90/2010 Sb.). V roce 2019 byly do přílohy A zařazený i PFOA a její soli. Příloha A má za cíl úplnou eliminaci výroby a využívání látek, včetně obchodování s nimi. U látek uvedených v příloze B je nařízené omezené využívání. Následně je zde uvedena i příloha C, která obsahuje látky, u nichž je cílem redukovat emise z neúmyslné výroby. Omezení však v přílohách A a B nejsou úplná. PFOA se tak například dá využívat na základě takzvané specifické výjimky v případech, kdy je nemožné, nebo finančně příliš náročné ukončení jejího používání, nebo neexistuje možná alternativa, jako je

například ve fotolitografickém průmyslu (van der Putte et al., 2010), v textilním průmyslu pro úpravu textilií pro ochranu pracovníků (Euratex, 2016) a lékařské prostředky vyrobené z PTFE obsahujícím stopové koncentrace PFOA o maximální koncentraci 1 PPM (ACAT, 2018). Pro výrobu a využívání PFOS je nyní nutné registrovat takzvaný akceptovatelný účel výroby (z angl. acceptable purposes) pro udělení takzvané specifické výjimky na pět let. Je tedy možné PFOS a její prekurzory využívat v souladu s částí II přílohy B. Výjimky byly uděleny například pro využití v leteckých hydraulických kapalinách, fotografickém průmyslu a při pokovování (sdělení č. 90/2010 Sb.).

Stockholmská úmluva se rovněž zabývá možnostmi nahrazení perfluorovaných látek. Zahrnuje fakt o existenci a použitelnosti alternativních (ne)fluorovaných látek do rozhodovacích procesů. Je nutné dodat, že alternativ je na trhu již mnoho, avšak u valné většiny z nich nám chybí dostatečné údaje o toxicitě, akumulaci i perzistenci. Bohužel je proces navržení, schválení a následného přijetí nové látky do kterékoliv z příloh Stockholmské úmluvy časově velmi náročný (Wang et al., 2009), což dává velký prostor výrobcům pro právně nelimitované využívání potenciálně škodlivých látek, jako je například F-53B či GenX, o kterých máme důkazy o všudypřítomnosti v životním prostředí a zároveň byla naměřena data vypovídající o jejich toxicitě (Kucharzyk et al., 2017).

2.4.2 Limity v pitné vodě

Americká agentura pro ochranu životního prostředí EPA (z angl. environmental protection agency) doporučuje limitní koncentraci kombinace PFOS a PFOA v pitné vodě dohromady 70 ng/l (EPA, 2016). Avšak některé státy USA doporučují i přísnější limity jako je například stát Minnesota. Minnesotské ministerstvo zdravotnictví doporučuje následující maximální koncentrace v pitných vodách: PFOS (15 ng/l), PFOA (35 ng/l), PFHxS (47 ng/l), PFBS (2000 ng/l) a PFBA (7000 ng/l) (MDH, 2019). Trochu obecněji upravuje směrnici pro pitnou vodu (Směrnice pro pitnou vodu 2020/2184/ES) limity evropská agentura pro životní prostředí na základě doporučených limitů WHO (světová zdravotnická organizace, z angl. World Health Organisation) s limitem 0,5 µg/l pro všechny PFC, nebo 0,1 µg/l pro 20 vybraných PFC v pitných vodách. Tyto limity by měly vejít v platnost od roku 2023. Byly přijaty i přesto, že jsou rámcovou směrnici o vodách dána EQS (z angl. environmental quality standard) pro PFOS. Jedná se o koncentrační limity, pod nimiž se přítomností kontaminantů nenarušuje životní prostředí (Whitehouse, 2001). Tyto limity jsou 0,00065 µg/l pro povrchové vody a 0,00013 µg/l pro mořské vody (2013/39/EU).

2.4.3 Naměřené hodnoty v životním prostředí

Perfluorované látky byly detekovány ve vodách celého světa, a to včetně vod podzemních (Xiao et al., 2015). Nově se ve vodách a organismech detekují i alternativní sloučeniny jako je GenX, HFPO-TA, ADONA i F53-B. Například Pan et al. (2018) naměřili HFPO-TA v 96 % vzorků a GenX v 83 % vzorků vod z různých částí světa (Tab. 2). Obecně platí, že u fluorochemických továren se vyskytují nejvyšší koncentrace v řekách, což ostatně naměřili i například Pan et al. (2018). V tabulce odpovídají nejnižší koncentrace horním tokům, kde není vliv fluorochemických továren, vyšší koncentrace odpovídají výtoku z fluorochemických továren (Yao et al., 2022; Pan et al., 2018).

Tabulka č. 2: Přehled naměřených koncentrací vybraných perfluorovaných látek

Látka	Místo	Koncentrace	Zdroj
PFOA	Řeka Xiaoqing, Čína	15,4 – 197000 ng/l	Pan et al. (2018)
PFOS	Řeka Xiaoqing, Čína	2,07 – 10,2 ng/l	Pan et al. (2018)
GenX	Řeka Scheur, Nizozemsko	73,1 ng/l	Heydebreck et al. (2015)
	Jezero Tai, Čína	14 ng/l	Pan et al. (2018)
	Řeka Xiaoqing, Čína	1,61 – 2060 ng/l	Pan et al. (2018)
HFPO-TA	Jezero Tai, Čína	5,0 ng/l	Pan et al. (2018)
	Řeka Temže, Velká Británie	0,14 ng/l	Pan et al. (2018)
	Pitná voda, Uppsala, Švédsko	2,83 – 81,2 ng/l	Gyllenhammar et al. (2015)
	Řeka Xiaoqing, Čína	3,99 – 68500 ng/l	Pan et al. (2018)
	Řeka Wangyu, Čína	23 ng/l	Yao et al. (2022)

2.4.4 Osud perfluorovaných látek v životním prostředí

Perfluorované látky se do životního prostředí dostávají dvěma základními způsoby. Prvním je uvolňování z výrobků obsahujících PFC a druhým jsou emise ze samotné výroby. Emitované látky se mění v závislosti na cílovém využití a liší se nejen v lineárních nebo rozvětvených zástupců (Guelfo et al., 2018), ale také ve složení směsi PFC. Například podle Švédské chemické agentury se jen na textil využívá 348 různých PFC, na impregnaci papíru 325 PFC a v elektrotechnickém průmyslu 114 PFC (KEMI S.C.A., 2015). První možností kontaminace životního prostředí jsou plynné emise. Takto

emitované perfluorované látky se sorbují na prach a aerosoly a mohou se tak transportovat i na dlouhé vzdálenosti (Kim et al., 2007; Bossi et al., 2016; Faust et al., 2022). PFC se mohou rovněž inkorporovat do dešťových kapek a následně dochází k vypršení a vymytí (z angl. rainout, washout). Mokrá depozice je schopna kontaminovat území daleko intenzivněji, ale působí spíše lokálně. Je tedy zvýšené riziko kontaminace primárně v okolí fluorochemického průmyslu (Shimizu et al., 2021). Dalším způsobem přenosu perfluorovaných látek do atmosféry je vlnobití. Při vlnobití v oceánech, jakožto hlavních rezervoárech perfluorovaných látek (Cousins et al., 2011), dochází k emisím PFC do atmosféry (Faust et al., 2022). K emisím dochází i při vaření na teflonových pánvích. Schlummer et al. (2015) provedli měření, při kterých zjistili, že po zahřátí pánve potažené PTFE nad 370 °C (teplota, při které dochází k poškození povrchu PTFE) došlo k uvolnění perfluorovaných látek v rozmezí 1-4934 ng/hod. Dominujícími látkami byly PFBA a PFPeA, ale docházelo i k uvolnění PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA a PFDoA.

Atmosféra není jedinou kontaminovanou matricí. Dochází i ke kontaminaci půd a vod, a to primárně v okolí míst s hojným využíváním AFFF, jako jsou například letiště (Milley et al., 2018), nebo odpadní vodou z textilního průmyslu (Hill et al., 2017), chemického průmyslu a kovoprůmyslu (Clara et al. 2008; Dong et al., 2017) a skládkovými vodami (Hamid et al., 2018). Jak již bylo zmíněno výše, do životního prostředí se dostávají také z výrobků, které v sobě obsahují PFC (Lang et al., 2017; Glüge et al., 2020; Mastrantonio et al., 2018; Trier et al., 2018; Glüge et al., 2020).

Hamid et al. (2018) vyzdvihuje jako jednu z nejdůležitějších cest kontaminace skládky, kam se dostávají perfluorované látky uvolněním z odpadů jako jsou například potravinové obaly nebo textil (Hill et al., 2017; Schaidler et al. 2017). Může zde docházet nejen ke kontaminaci podzemních vod (Hepburn et al., 2019), ale i atmosféry (Hamid et al., 2018). Skládky jsou producenty skládkové vody. Tato voda pochází z odpadů samotných a také z dešťové vody, která způsobuje vyluhování kontaminantů. Tato voda se čistí v čistírnách odpadních vod (Stoiber et al., 2020). Zde ale nastává problém, neboť konvenční metody čištění vod PFC neodstraní s dostatečnou účinností (Xiao et al., 2013). Voda z čistíren odpadních vod následně kontaminuje recipient. Část PFC uložená v kalech (které vznikají při čištění odpadních vod) se ukládaly na skládky nebo se používají jako hnojivo. Aplikací čistírenských kalů na pole dochází k emisím PFC do atmosféry (Borthakur et al., 2022) půdy i vody (Sepulvado et al., 2011). Ze skládek mohou opět unikát (Hepburn et al., 2019), nebo se opět dostávají zpět do čistíren odpadních vod ve formě skládkové vody (Stoiber et al., 2020). Je nutné

podotknout, že nynější evropská legislativa má za cíl naprosto eliminovat skládkování (Směrnice 2008/98/ES).

Některé perfluorované látky se rozkládají samovolně v životním prostředí. Problémem je, že většinou dochází k částečnému rozkladu prekurzorů PFC za vzniku stálých, dále již nedegradovatelných látek, jako jsou například perfluorokarboxylové kyseliny (Wang et al., 2014; Blum et al., 2015).

Mnoho polutantů, kterými jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky je biodegradabilních (Shuttleworth et al., 1995) a je tedy nasnadě předpokládat, že tomu je tak i u perfluorovaných látek. Obecně se však má za to, že nejsou biologicky rozložitelné (Sáez et al., 2008; Genuis et al., 2010; Yan et al., 2017; Yang et al., 2020; Aziz et al., 2021; Shittu 2021; Stockenhuber et al., 2021), Nicméně existují zmínky i o mikrobiální transformacích. Například Huang et al. (2019) pozorovali 60% snížení koncentrace PFOS a PFOA během 100 dní pomocí autotrofních bakterie *Acidimicrobium*. Yu et al. (2019) také pozorovali degradaci PFC vlivem bakterií *Dehalococcoides*. Je nutné dodat, že tato pozorování probíhala pouze v laboratorních podmínkách a není zřejmé, zdali by tyto procesy probíhaly i v půdě (Sturman et al., 1995).

Vzhledem k tomu, že je uváděna voda jako hlavní transportní médium pro PFC, a zároveň byly detekovány i v podzemních a pitných vodách, je vhodné se zaměřit i na účinnost jejich odstranění z vod. Účinnost čištění je závislá nejen na zvolené metodě čištění, ale rovněž i na zdroji odpadních vod (Ratola et al., 2012). Jak již bylo zmíněno, různá průmyslová odvětví využívají různorodé směsi PFC, které se rovněž odstraňují s odlišnou efektivitou a rychlostí. Například perfluorované kyseliny jsou netěkavé a velmi rekalitrantní (Ateia et al., 2019), ale naproti tomu například prekurzory jako jsou FTOH (fluorotelomerní alkoholy) jsou mnohdy těkavé, což snižuje jejich koncentrace na výtoky čistíren odpadních vod (Hamid et al., 2018). Perfluorované látky odolávají i běžným procesům čištění odpadních vod jako je aplikace UV záření nebo chlorace (Appleman et al., 2014) a rovněž vykazují daleko vyšší odolnost vůči oxidaci ozonem (Nzeribe et al., 2019). Kvůli velmi pevné vazbě C-F odolávají biodegradaci v čistírnách odpadních vod (Rodríguez-Valera et al., 2021). Nejefektivnějšímu odstranění (až 99 %) PFC je možné docílit použitím membránových technologií jako je reverzní osmóza či nanofiltrace. Membránové technologie jsou ale velmi drahé a náročné na údržbu (Franke et al., 2019).

2.5 Toxicita

Toxicita PFC, a to hlavně PFOS a PFOA je studována již několik desetiletí. Přesto však doposud nebyl odhalen její mechanismus (Wen et al., 2020; Ojo et al., 2021). Nové perfluorované látky mohou představovat obdobné riziko (Fenton et al., 2020). Je proto nutné se věnovat nejen výzkumu PFOS a PFOA, ale také novým perfluorovaným látkám.

2.5.1 Orgánová toxicita

2.5.1.1 Hepatotoxicita

Játra jsou významným orgánem, protože metabolizují toxické látky a hrají klíčovou roli i v metabolismech látek, jako jsou sacharidy, bílkoviny a tuky. Zároveň zde dochází k produkci žluči a produkci hormonů (Cornelius et al., 1980; Trefts et al., 2017). Jsou primárním orgánem, který udržuje homeostázu tuků. Dochází zde k β -oxidaci mastných kyselin, syntéze cholesterolu, mastných kyselin a lipogenezi. V játrech se rovněž syntetizují přenašeče tuků, takzvané lipoproteiny (Fragki et al., 2021). Je známo, že se perfluorované látky akumulují primárně v játrech (Cui et al., 2009; Massarsky et al., 2022). *In vivo* testy na myších prokázaly zvětšení jater a změnu jejich zbarvení (Kudo et al., 2006; Son et al., 2007; Bjork et al., 2008). Rovněž alternativy jako je GenX byly prokázány jako hepatotoxické. U myší exponovaných 0,1 0,5 a 5 mg/kg/den GenX v potravě došlo k jaterní hypertrofii (Chappell et al., 2020). Conley et al. (2019) prokázali dramatické zvýšení hmotnosti jater po expozici krys 62,5 mg/kg tělesné váhy látkou GenX po dobu 14 dní pomocí ústní sondy, což je srovnatelné s PFOS a PFOA. HFPO-TA má pravděpodobně ještě negativnější účinek na játra. Sheng et al. (2018) zaznamenali významné zvýšení hmotnosti myších jater při expozici pomocí ústní sondy koncentracím 1,25 mg/kg/den PFOA a 0,5 mg/kg/den HFPO-TA. 72hodinová expozice buněk hepatocytů tilápie (*Oreochromis niloticus*) již při 10 mg/l způsobila dramaticky sníženou viabilitu (Han et al., 2012). *In vivo* testy provedené s *D. rerio* odhalily ireverzibilní změny ve struktuře jater při expozici 250 μ g/l/den PFOS ve vodě. Docházelo k akumulaci lipidů v játrech, a to hlavně u samců (Du et al., 2009). Byla prokázána korelace mezi koncentrací PFC v séru matky a poškozením jater u novorozenců. Bohužel byly ve studii zahrnuty pouze PFOS, PFHxS, PFNA, PFOA a PFUnDA a nikoli alternativní PFC jako je GenX. Přesto tato studie přináší cenná data o nebezpečnosti těchto chemikálií, a to i při expozici koncentracím, které jsou detekovány v životním prostředí (Stratakis et al., 2020). Oproti tomu populační studie prokázala korelaci i mezi alternativou Cl-PFESA (chlorované

polyfluorované ethylsulfonáty) zvýšenými hladinami albuminu, alaninaminotransferázy, asparátaminotransferázy a γ -glutamyltransferázy (Liu et al., 2022), což jsou indikátory jaterních funkcí (Spinella et al., 2016; Wang et al., 2018). Zároveň bylo zjištěno, že PFOA i HFPO-TA se mohou vázat na protein vázající mastné kyseliny (FABP z angl. fatty acid binding protein) (Sheng et al., 2018), které umožňují transfer mastných kyselin do buňky (Zimmerman et al., 2002) a díky tomu mohou perfluorované látky pronikat do hepatocytů (Leubker et al., 2002). Při vazbě změní jeho strukturu, děje se tomu tak daleko více při kontaktu s HFPO-TA než PFOA. FABP zároveň přenáší molekuly k receptorům, jako je PPAR (receptory aktivované proliferátory peroxizomů, z angl. peroxisome proliferator activated receptor) (Tan et al., 2002), u kterého byla prokázána aktivace vlivem perfluorovaných látek (Ibrahim et al., 2013; Behr et al., 2020; Louisse et al., 2020).

2.5.1.2 Reprodukční toxicita

Gonády jsou pohlavní žlázy. Samčí gonády produkují sperma, samičí gonády produkují vajíčka, a proto je jejich studium vhodné pro určení vlivu na reprodukční toxicitu (Nussey et al., 2001). V minulosti již bylo prokázáno, že mnoho polutantů jako jsou pesticidy a těžké kovy působí na rybí gonády. Přesto doposud nebyla toxicita na gonádálních buňkách věnována taková pozornost, jako je tomu například u buněk jaterních a žaberních, a to i když je známo, že se PFC v gonádách výrazně akumulují (Mansour et al., 2018). Ahrens et al. (2015) studovali okouna obecného (*Perca fluviatilis*) vyloveného ze švédského jezera Halmsjön a zjistili, že 6:2 FTSA, PFOS a PFHxS se primárně akumulovaly v gonádách, ale oproti tomu PFOSA, PFDS (perfluordodekasulfonylová kyselina) a PFCA se akumulovaly primárně v játrech. Rovněž štika (*Esox lucius*) a plotice (*Rutilus rutilus*) vylovené z polských jezer měly vyšší koncentrace PFOS a PFOA v gonádách než v játrech (Surma et al., 2021).

PFC, a to hlavně PFOS a PFOA jsou spojovány s infertilitou (Kim et al., 2020; Tarapore et al., 2021). Ostatně epidemiologické studie ukazují, že v průběhu několika desítek let se snížila kvalita spermatu lidí v různých částech světa (Gabrielsen et al., 2016). PFC byly detekovány ve spermatu lidí a existují domněnky o jejich negativním působení na sperma (Pan et al., 2019). PFOS a PFOA prokazatelně působí na Leydigovy buňky u myši a způsobují buněčnou hyperplazii (Biegel et al., 1995; Li et al., 2021) a snížené hladiny testosteronu (Zhao et al., 2014; Qiu et al., 2021), stejně jako u klinických studií infertilních samců (Petersen et al., 2018; Cui et al., 2020). Některé studie naznačují spojení s rakovinou varlat (Petersen et al., 2020; Purdue 2020; Stevenson et al., 2021). PFC jsou spojovány i s pozdějším příchodem menstruačního cyklu (Wu et al., 2015), nepravidelným

menstruačním cyklem (Fei et al., 2009) a dřívějším příchodem menopauzy (Knox et al., 2011). Rovněž vyplývá z laboratorních studií, že mohou narušovat funkci vaječnicků a snižovat syntézu hormonů prostřednictvím aktivace PPAR receptoru, jehož všechny tři formy (α , β a γ) se exprimují ve vaječnicích (Braissant et al., 1996). Jeho aktivací se zamezí mezibuněčné komunikaci oocytů a granulózových buněk a dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (López-Arellano et al., 2019).

2.5.2 Buněčná toxicita

2.5.2.1 Viabilita buněk

Pokles buněčné viability je způsoben mnoha faktory. Existují dva primární způsoby, jimiž se pokles viability projevuje. Jimi jsou apoptóza a nekróza a budou podrobněji diskutovány v následujících kapitolách (Renehan et al., 2001; Syntichaki et al., 2002).

2.5.2.2 Apoptóza

Apoptóza je pojem, označující smrt buňky, která probíhá endogenními vlivy. Je možné se setkat i s pojmem „programovaná buněčná smrt“. Dochází totiž opravdu k řízenému zneškodnění nepotřebných, nebo potenciálně škodlivých buněk (Renehan et al., 2001). Při apoptóze nedochází k procesům, které by mohly způsobit zánět, jako je například vylití obsahu buňky, ale je pouze neškodně odstraněna. Tento proces je zcela přirozený, ostatně u dospělého člověka dochází k apoptóze až 0,5 % buněk každý den (Karam et al., 2009). Pokud ale dochází ke zvýšené apoptóze, hrozí riziko vzniku rakoviny, autoimunitních onemocnění nebo neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Behl et al., 2000; Renehan et al., 2001).

Existuje mnoho publikací, které potvrzují indukci apoptózy vlivem PFC (Martin et al., 2007; Krøvel et al., 2008; Cui et al., 2015; Bassler et al., 2019; Jabeen et al., 2020). PFOS, PFOA i GenX zvyšují expresi genu *BAX* ale naopak snižují expresi genu *Bcl-2* buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu (Cui et al., 2015; Lv et al., 2019). *BAX* hraje důležitou roli při iniciaci apoptózy, protože se jeho působením zvyšuje permeabilita membrány mitochondrie (Peña-Blanco et al., 2018) a uvolnění cytochromu C (Zhang et al., 2017), čímž dojde k aktivaci kaspáz. Účinkem kaspáz, jejichž hladiny jsou rovněž zvýšené vlivem PFOA (Liu et al., 2007), dochází k apoptóze (Jiang et al., 2004). Naopak působením *Bcl-2* se apoptóza inhibuje (Skommer et al., 2010). PFOA rovněž zvyšuje až 8,7× aktivitu *p53*, který také reguluje apoptózu (Cui et al., 2015; Ge et al., 2016). Ge et al. (2016) navrhuje jako jednu z možných příčin aktivace *p53* ROS, který vzniká v přítomnosti PFC.

2.5.2.3 Nekróza

Nekróza je smrt buňky vlivem exogenních faktorů. Dochází při ní k vakuolizaci a disrupci membrán organel a poté i buňky. Vnitřek buňky se přitom vylévá do extracelulárního prostoru a je poté iniciována buněčná autolýza (Syntichaki et al., 2002). Přesto, že je hlavním způsobem buněčné smrti vlivem expozice PFC apoptóza, při vyšších koncentracích převládá nekróza (Abudayyak et al., 2021). PFC rovněž způsobují nekrózu jaterních buněk po 5týdenní expozicí myši 5 mg/kg/den PFOA (Crebelli et al., 2019). Také byla zjištěna souvislost mezi PFC a TNF α (z angl. tumor necrosis factor α) Singh et al., 2012; Bassler et al., 2019). TNF α aktivuje imunitní odpověď a zároveň indukuje nekrotickou smrt v případě inhibice kaspáz (Morgan et al., 2008).

2.5.2.4 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou nejčastěji volné radikály, tedy molekuly, které mají v elektronovém obalu nespárovaný elektron. Mezi hlavní ROS patří hydroxylový radikál a peroxid vodíku (Bayr et al., 2005). Tyto sloučeniny vznikají v těle samovolně při mitochondriálním oxidativním metabolismu, ale také jako odpověď na přítomnost xenobiotik (Ray et al., 2012). Reagují s mastnými kyselinami, aminokyselinami, proteiny, koenzymy, lipidy atp., narušují jejich strukturu a tím pádem zamezují jejich správné funkci. Také reagují s DNA a mohou ji poškozovat (Stadtman et al., 2006; Farmer et al., 2013). Díky jejich přirozenému vzniku existují v těle mechanismy, které ROS potlačují. Těmi jsou například enzymy glutathion peroxidázy, superoxid dismutázy a katalázy (Oberley et al., 1979). PFC se mohou vázat na superoxid dismutázu hydrofobními interakcemi a zamezovat tak jejímu správnému fungování (Xu et al., 2019). Snižování antioxidační kapacity bylo prokázáno u buněčné linie HepG2 (Wielsøe et al., 2015) a lidských erytrocytů (Pan et al., 2018). Alternativa PFOS F-53B rovněž indukuje vznik ROS v larvách, ale hlavně v embryích *D. rerio* již při koncentracích 0,15 mg/l (Liu et al., 2021). GenX rovněž způsobil ROS a následnou apoptózu buněk u buněčné linie HepG2 již při koncentracích 250 μ M po 12hodinové expozici (Yoo et al., 2021). Dokonce u řasy *Chlorella pyrenoidosa* bylo prokázáno potlačení antioxidačních mechanismů a produkce ROS vlivem PFC (Guo et al., 2020) a jejich alternativ jako je GenX (Liu et al., 2021).

2.5.2.4.1 Vliv reaktivních forem kyslíku na membránu

ROS ovlivňují uspořádání lipidů ve fosfolipidové membráně. Následkem toho může být narušení její správné funkce (Megli et al., 2003). Cordeiro et al. (2014) zjistili, že radikály (hydroxylové a peroxylové) pronikají hluboko do fosfolipidové dvouvrstvy. Je známo, že ROS může

způsobovat peroxidaci lipidů v membráně. Dochází k narušení struktury mastných kyselin. Takto narušené struktury pak také fungují jako radikál, který dále narušuje okolní mastné kyseliny (Mylonas et al., 1999). Peroxidace lipidů vede ke změně fluidity membrány, narušení transportních vlastností a k celkovému poškození membrány, která může vést až k buněčné smrti (Yang et al., 2020). V širším kontextu je peroxidace lipidů spojována s aterosklerózou (Esterbauer et al., 1993), srdečním selháním (Campolo et al., 2007), revmatickou artritidou (Gambhir et al., 1997) a imunologickými poruchami (Alzoghaibi et al., 2005).

2.5.2.5 Interakce s arylovým receptorem

AhR (z angl. arylhydrocarbon receptor), nebo také nazývaný dioxinový receptor je významným receptorem pro detekci a metabolismus xenobiotik. Je aktivovaný mnoha polutanty, a proto je hojně využíván v ekotoxikologických studiích (Rothhammer et al., 2019). Aktivací Ah receptoru dojde k zahájení transkripce Cytochromu P450 1A (CYP1A) (Delescluse et al., 2020; Hu et al., 2007; Burczynski et al., 2000).

Cytochrom P450 je skupina hemoproteinů, která hraje roli v metabolismu mnoha environmentálních polutantů, jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky a polychlorované bifenyly (Williams, 1992). Obsahuje atom železa, který přechází mezi oxidačními stavy Fe^{2+} a Fe^{3+} a tímto přechodem elektronů oxiduje a redukuje látky. Nadále katalyzují reakci $NAD(P)H + O_2 + R \rightarrow NAD(P)^+ + RO + H_2O$ (R je uhlíkový substrát a RO je jeho oxidovaný produkt), kdy je NAD(P)H zprostředkováno Cytochrom P450 reduktázou (Guengerich, 2018). Cytochrom C také působí na kaspázy, které řídí buněčnou smrt (Kluck et al., 1997, Yang et al., 1997). Je známo, že mnohé environmentální polutanty zvyšují hladiny CYP1A, což je spojováno s nárůstem buněčné proliferace (Rodriguez et al., 2013, Liu et al., 2016). Existují také důkazy o tom, že i perfluorované sloučeniny zvyšují hladiny CYP1A (Mortensen et al., 2011, Han et al., 2012).

Liu et al. (2014) zdokumentoval nulovou aktivaci CYP1A změřené na měkkýších *Perna viridis*, kteří byli vystaveni koncentracím 0,1, 1, 10, 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$ PFOS a PFOA po dobu 7 dní. Jako důvod navrhuje nedostatečnou transformaci PFC kvůli vazbě uhlík-fluor. Watanabe et al. (2009) taktéž nezaznamenali odezvy na hepatocytech kuřecích embryí (*Gallus gallus*) při ošetření 0,1, 1, a 10 $\mu\text{g/l}$ PFOS a PFOA. Kombinace těchto dvou látek také neměla odezvu, tudíž je možné, že nedochází ani k synergickým efektům. Na druhou stranu Han et al. (2012) po 72hodinové *in vivo* expozici tilápie (*Oreochromis niloticus*) pozorovali nárůst aktivity CYP1A jaterních buněk při koncentracích 10, 20 a 30 mg/l PFOS a PFOA. Důvodem rozcházejících se výsledků může být rovněž i délka expozice a také

odlišný typ buněk. Beškovski et al. (2014) uvádí, že se aktivita CYP1A liší u myši a lidí. Obdobné to může být jak s buněčnými liniemi orgánů toho samého organismu (CYP1A se nachází v mnoha tkáních, ale primárně v buňkách jater (Nakajima et al., 2014)), tak s různými druhy. Zároveň Petrusis et al. (1999) popsal fenomén o úbytku EROD (ethoxyresorufin-o-deethyláza) aktivity závislém na maximální koncentraci. Vysvětluje to tak, že kvůli vazebné afinitě látky (v tomto případě dioxinu) k CYP1A dochází k inhibici EROD enzym-substrátové reakce. Měření exprese CYP1A na *Salmo salar* ukázalo, že PFOS i PFOA jej regulují v ledvinách i v játrech, a to bez závislosti na Ah receptoru (Mortensen et al., 2011).

Dalším vysvětlením může být naopak inhibice cytochromu P450, kterou jako první zdokumentovali Narimatsu et al. (2011) po expozici PFOS buněčné linie HepG2. Tyto výsledky potvrdili i Amstutz et al. (2022). Jak již bylo zmíněno, cytochrom metabolizuje mnoho látek. Inhibice cytochromu může být fatální například při farmaceutické léčbě. Samotné léčivo pak není metabolizováno cytochromem a může dojít k předávkování (Lynch et al., 2007).

2.5.2.6 Syntéza mastných kyselin

Glykogen a triglyceridy patří mezi hlavní zdroje energie v těle (Olsen et al., 2003, Steenland et al., 2009). Perfluorované látky jsou spojovány se zvýšenými hladinami triglyceridů u lidí. Naopak u hlodavců byly prokázány snížené hladiny triglyceridů v séru (Seacat et al., 2003; Loveless et al., 2006). Triglyceridy jsou tvořeny glycerolem a třemi mastnými kyselinami. Pro syntézu triglyceridů je nutné nejdříve syntetizovat mastné kyseliny.

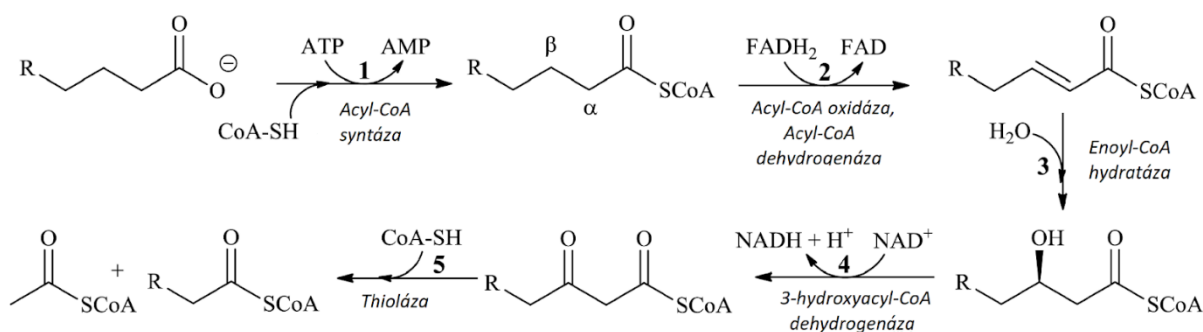
Syntéza mastných kyselin má vliv na stav fosfolipidové dvouvrstvy, neboť právě mastné kyseliny jsou jedním z jejích hlavních komponent (Wei et al., 2016). Mastné kyseliny se tvoří primárně v játrech (Wakil et al., 1961), která jsou jedním z nejpostiženějších orgánů vlivem expozice PFC (Kudo et al., 2006; Son et al., 2007; Bjork et al., 2008; Cui et al., 2009; Massarsky et al., 2022). Syntéza mastných kyselin probíhá pomocí acetyl-CoA. Bylo zjištěno, že vlivem PFOS dochází k silné up-regulaci genů, které kódují ATP citrát lyázu, která přeměňuje citrát na acetyl-CoA (Kobayashi et al., 2021). Acetyl-CoA je následně přeměněn na malonyl-CoA pomocí acetyl-CoA karboxylázy, která je hlavním enzymem definujícím rychlost syntézy. Bylo zjištěno, že exprese tohoto enzymu byla zvýšena 1,3× v játrech krysího plodu při expozici PFOS. Rovněž byla zvýšena syntéza mastných kyselin až 1,6× (Bjork et al., 2008). Wang et al. (2015) prokázali u myši zvýšenou aktivitu malonyl-CoA karboxylázy vlivem 1 mg/kg/den PFNA. Malonyl-CoA karboxyláza je důležitý enzym, díky němuž dochází ke karboxylaci acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA. Tyto poznatky naznačují, že dochází

k vyšší syntéze mastných kyselin vlivem PFC. V souladu s tím Bjork et al. (2011) zdokumentovali zvýšení koncentrace volných mastných kyselin. Zvýšené koncentrace volných mastných kyselin, a to primárně satureovaných, zvyšují hladiny triglyceridů. To potvrzují i studie, které prokazují souvislost perfluorovaných látek a zvýšených hladin triglyceridů u lidí. Naopak u hlodavců byly prokázány snížené hladiny triglyceridů v séru (Seacat et al., 2003; Loveless et al., 2006).

2.5.2.7 β -oxidace mastných kyselin

β -oxidace mastných kyselin je proces, při kterém jsou mastné kyseliny využívány. Mastné kyseliny vstupují do buňky buď volně (do C10), nebo pomocí karnitinových přenašečů mastných kyselin. Následně je na ně pomocí Acyl-CoA syntázy navázán AcylCoA, který může procházet vnější mitochondriální membránou. Aby mohly projít i vnitřní membránou mitochondrie, je na ně navázán karnitin pomocí karnitinacyltransferázy I. Uvnitř mitochondrie dochází opět k převodu koenzym A a uvolněný karnitin se vrací zpět pomocí translokáz. Následně dochází k β -oxidaci. Bylo zjištěno, že PFOA vykazuje významné zvýšení genu *Cpt1a*, který kóduje karnitinacyltransferázu I u myších plodů a tím pádem hrozí riziko narušení transportu mastných kyselin přes membránu (Rosen et al., 2007).

Při β -oxidaci dochází k postupné oxidaci mastné kyseliny až na acetyl-CoA. Takto vzniklý acetyl-CoA dále vstupuje do citrátového cyklu. Při β -oxidaci nejprve dochází k dehydrogenaci sloučeniny v β poloze, za vzniku dvojnás vazby mezi druhým a třetím uhlíkem (Obr. 7). Při tom se redukuje FAD (flavinadeninindukleotidu) na FADH₂. Poté dochází k adici vody na dvojnás vazbu. Následně se dehydrogenují vzniklé hydroxylové skupiny, přičemž se redukuje NAD⁺ na NADH. Poté se působením enzymu thioláza odštěpí acetyl-CoA (Schulz et al., 2002).



Obrázek 6: Průběh β -oxidace mastných kyselin. Převzato a upraveno dle Świzdor et al. (2012)

Při *in ovo* expozici plodu kuřete (*Gallus gallus domesticus*) PFOS dochází ke zvýšené β -oxidaci jaterní kyseliny palmitové při dávkách již 0,1 μ g/g, což je dávka, při které nebyla snížena

viabilita jaterních buněk. V tomto případě autor navrhuje možné spojení s aktivací PPAR α , který může aktivovat peroxisomální i mitochondriální β -oxidaci (Schoonjans et al., 1996). Je rovněž možné, že zvýšení permeability membrány zvyšuje koncentrace mastných kyselin uvnitř buňky, což může být důvodem katabolismu mastných kyselin (Nordén et al., 2012). Geng et al. (2019) sledovali pokles mitochondriální, ale naopak zvýšení peroxisomální β -oxidace kuřecích embryí. Kawashima et al. (1989) rovněž sledovali zvýšení peroxisomální β -oxidace a indukce aktivity acyl-CoA oxidázy, která katalyzuje první krok oxidace mastných kyselin. Také u hepatocytů lososa obecného (*Salmo salar*) pozorovali Krøvel et al. (2008) signifikantně zvýšenou expresi acyl-CoA oxidázy po 24hodinové expozici 25 mg/l PFOS. K obdobným výsledkům došli i Oakes et al. (2005) u jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) a pstruha duhového (*O. mykiss*). Wen et al. (2020) zjistili, že vlivem PFOA dochází k výraznému snížení exprese *ACOX2*, který kóduje acyl-CoA oxidázu 2 u buněčné linie HepG2. GenX zvyšuje hladiny enoyl-CoA hydratázy a 3-hydroxyl-CoA dehydrogenázy, enzymů nezbytných pro β -oxidaci, u kuřecích embryí (Xu et al., 2021). Stejný účinek byl prokázán u buněčné linie FaO (kryší jaterní buňky) při expozici 25 μ M PFOS, PFOA, PFHxS a PFBA po dobu 24 hodin (Bjork et al., 2021). Je možné, že je tento účinek důsledkem působení PFC na PPAR, který tyto geny reguluje (Houten et al., 2012).

2.5.2.7.1 Interakce s receptory aktivovanými proliferátory peroxisomů

PPAR jsou jaderné receptory. Existují 3 formy: PPAR α , β a γ , které se vyskytují u obratlovců včetně ryb (Boukouvála et al., 2004). PPAR ovlivňují expresi genů, jež hrají roli v metabolismu sacharidů a tuků, nádorovém bujení, imunitní odpovědi, adipogenezi proliferaci a apoptóze. K jeho aktivaci dochází působením mastných kyselin, a bylo zjištěno, že obsah cholesterolu v membráně může rovněž hrát roli při aktivaci PPAR (Zeghari et al., 2000). Oxidované formy fosfolipidů, které vznikají při disrupci membrány mohou aktivovat PPAR (Delerive et al., 2000).

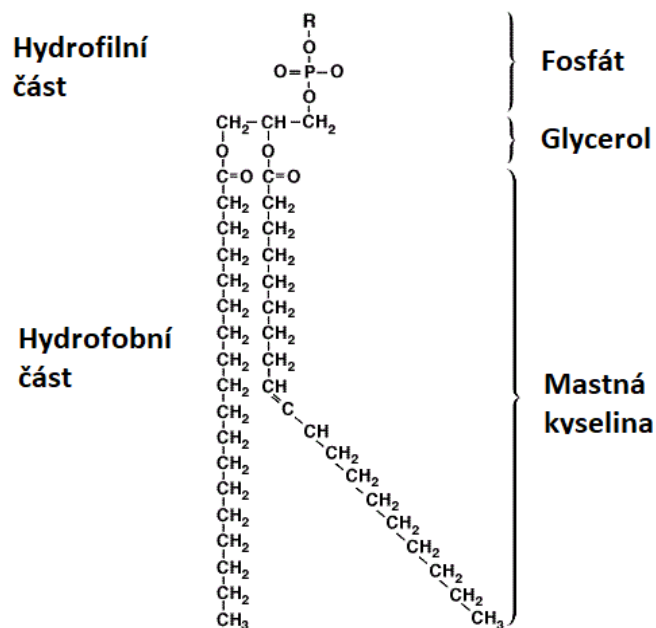
PPAR receptor byl objeven v roce 1980 (Isseman et al., 1990), nedlouho po prvních zmínkách o toxicitě PFC (Ikeda et al., 1985). Následně bylo díky schopnosti PFOA narušovat peroxisomální β -oxidaci mastných kyselin navrženo, že se tak děje díky jejich schopnosti aktivovat PPAR receptor (Sohlenius et al., 1992). PPAR je aktivován různými ligandy, jako jsou mastné kyseliny, eikosanoidy, prostaglandiny či vitamín B (O'Flaherty et al., 2005). Pareza et al. (2006) zjistili, že dochází k ligandové aktivaci PPAR receptorů prostřednictvím PFC. Je to pravděpodobně díky podobnosti PFC mastným kyselinám (Shabalina et al., 2016). PFOS a PFOA výrazně změnily profil transkribovaných genů, které jsou nepostradatelné pro transport a metabolismus lipidů, a to

hlavně mastných kyselin. Právě tyto geny jsou řízeny PPAR (Guruge et al., 2006). K aktivaci PPAR dochází i vlivem GenX u kryš (Conley et al., 2019), u ryb (Rodríguez-Jorquera et al., 2018) a v myších játrech (Chapell et al., 2020). Perfluorované látky vykazují vysokou vazebnou afinitu ke všem třem formám PPAR, přičemž HFPO-TA vykazuje až 7,5x vyšší vazebnou afinitu k PPAR γ než PFOA, oproti tomu GenX vykazuje nižší afinitu než PFOA. Je to patrně tím, že HFPO-TA tvoří více vodíkových můstků, než GenX (Li et al., 2019).

Aktivací receptoru PPAR dochází ke vzniku heterodimeru s RXR (retinoidní receptor X, z angl. retinoid X receptor). Následně se váže na promotorů jejich cílových genů, které jsou zapojeny do metabolismu lipidů (Tan et al., 2005). Důsledkem je například snížení hladiny triglyceridů a LDL (nízkodenzitní lipoprotein), zvýšení HDL (vysokodenzitní lipoprotein) cholesterolu. Zvýšené hladiny LDL cholesterolu korelovaly s koncentrací PFOS a PFOA v séru u obyvatel USA. Naopak tomu je u HDL, který je se zvyšující se koncentrací PFC snižován (Geiger et al., 2014). Dále bylo zjištěno, že PFC mohou interakcí s PPAR zvyšovat buněčné volné mastné kyseliny a volný cholesterol v hepatocytech (Leubker et al., 2002). Plochberger et al. (2017) provedli měření fosfolipidové dvouvrstvy pomocí mikroskopie atomárních sil a fluorescenční mikroskopie a zjistili, že HDL má schopnost se do fosfolipidové dvouvrstvy začleňovat, a tak může potenciálně zvětšovat rigiditu membrány.

2.5.2.8 Fosfolipidová dvouvrstva

Fosfolipidová dvouvrstva ohraničuje prostředí mezi vnitřkem buňky a jejím okolím. V závislosti na charakteru membrány, tedy dle poměru proteinů a lipidů je více či méně propustná (Zhang et al., 2018). Jak již název vypovídá, je tvořena dvěma vrstvami fosfolipidů s charakteristickým uspořádáním. Fosfolipidy mají dvě části (Obr. 8), polární (hydrofilní) skupinu tvořenou fosfátovou skupinou, která je orientována do vnějšího prostředí a nepolární (hydrofobní), kde se shlukují fosfolipidy pomocí hydrofobních interakcí a tvoří tak vnitřek membrány (Wilkins et al., 1971). V membráně jsou rovněž obsaženy proteiny. Ty jsou buď vázané slabými vazebnými interakcemi na povrch membrány (Ziemba et al., 2013), nebo procházejí membránou a plní funkci transportní (Brandl et al., 1986). Další neopominutelnou složkou fosfolipidové dvouvrstvy je cholesterol. Přítomností cholesterolu se snižuje fluidita membrány (Cooper et al., 1978).



Obrázek 8: Struktura fosfolipidů. Převzato a upraveno dle Zahrabi et al. (2016)

Vlastnosti membrány jsou řízeny několika základními faktory. Fosfolipidová dvouvrstva je mobilní prostředí, které je vytvářeno spontánně hydrofobními interakcemi. Fosfolipidy uvnitř rotují, pohybují se laterálně a velmi raritně se i prohodí s fosfolipidem na druhé straně. Co se týče složení, hraje roli délka řetězce a počet dvojných vazeb. Kratší řetězce vykazují nižší přilnavost kvůli zmenšení styčné plochy a tím pádem se zvyšuje fluidita membrány. Přítomností dvojných vazeb opět nedochází k dokonalé přilnavosti (Chaffey et al., 2003).

Díky výše zmíněné struktuře se fosfolipidová vrstva nechová pouze jako prostá bariéra mezi dvěma prostředími, ale rovněž i jako selektivní transportér. Transport je možný díky přítomnosti proteinů, které tvoří kanály (Rietveld et al., 1995; Cockcroft et al., 2018). Shen et al. (2020) zjistili při testech na modelové fosfolipidové dvouvrstvě, že PFHxS, PFOS, PFOA a PFNA jsou schopny spontánně penetrovat dvouvrstvu. Tyto látky přechází energetickou bariéru dvouvrstva-voda pomocí prohození (otočení) polárního a nepolárního konce. Zároveň bylo zjištěno, že se tyto látky chovají podobně jako cholesterol. Cholesterol působí kondenzačním efektem, tedy přesněji dochází ke snížení plochy fosfolipidů vlivem cholesterolu (Franks et al., 1976; Alwarawrah et al., 2010). Rovněž Nouhi et al. (2018) prokázali inkorporaci PFC, a to konkrétně PFBS (perfluorbutansulfonová kyselina), PFHxA (kyselina perfluorhexanová), PFHxS (perfluorhexansulfonová kyselina), PFNA (kyselina perfluorononanová) a PFOS do dvouvrstvy. K vyšší inkorporaci docházelo u perfluorovaných látek s delším uhlíkatým řetězcem, u krátkých řetězců docházelo k inkorporaci a akumulaci do dvouvrstvy také, ale v menší míře. K obdobným výsledkům došli i Fitzgerald et al.

(2018) s modelovou i mikrobiální fosfolipidovou dvouvrstvou. Rovněž zjistili, že dochází k daleko vyšší akumulaci látek se sulfonylovou než karboxylovou skupinou. Dassuncao et al. (2019) zjistili, že koncentrace PFC v různých typech tkání mořských savců koreluje s obsahem fosfolipidů. Akumulace PFC v membránách také zvyšuje permeabilitu (Fitzgerald et al., 2018). To může způsobovat zvýšení transportu látek z a do buňky (Nakamura et al., 1985; Perkins et al., 2017) a je tedy patrné, že je porozumění interakcí perfluorovaných látek s fosfolipidovou dvouvrstvou velmi relevantní (Fitzgerald et al., 2018).

2.5.2.8.1 Fosfolipidové mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou alifatické a většinou lineární karboxylové kyseliny. Jsou známé stovky mastných kyselin (Srivastava, 2002), ale převládá hlavně délka uhlíkového řetězce C4 – C22 a nejvýrazněji C18 (Gunstone et al., 2007). Dle přítomnosti dvojné vazby se dělí na nasycené, které dvojnou vazbu neobsahují a nenasycené, které obsahují jednu či více dvojných vazeb. Dále se pak dělí na cis a trans izomery, které definují orientaci atomů okolo dvojné vazby (Koolman et al., 2012). Konkrétní poměry cis a trans indikují míru stresu u bakterií, protože jsou pravděpodobně schopny přizpůsobovat strukturu buněčné membrány environmentálním podmínkám (Frostegård et al., 2011). Dalším možným vysvětlením je to, že dochází ke změně mikrobiálního společenstva při působení stresorů (Bárcenas-Moreno et al., 2009). Vyšší obsah cis vazeb zvyšuje fluiditu, protože neumožňuje přilnutí mastných kyselin (Kuo et al., 1990).

Fosfolipidové mastné kyseliny (PLFA, z angl. phospholipid fatty acid) jsou přítomny pouze v živých buňkách, protože po buněčné smrti se velmi rychle hydrolyzují na diglyceridy (Blumenstein et al., 2021). Je to rovněž jeden z důvodů, proč se hojně využívá PLFA analýza pro stanovení mikrobiální biomasy (Lewe et al., 2021). Zároveň jsou fosfolipidy indikátorem stavu membrány. Je totiž známo, že některé látky mohou měnit vlastnosti membrán, jako je permeabilita a fluidita, což může vést až k zániku buněk a trvalému poškození organismů (Uttlová et al., 2016; Riegers et al., 20017; Zhu et al., 2020).

2.5.2.8.2 Syntéza fosfolipidů

Syntéza fosfolipidů probíhá v membráně endoplazmatického retikula. V prvním kroku se z glycerolu formuje glycerol-3-fosfát. Následně je pomocí acyl-transferáz sloučen s mastnou

kyselinou a vzniká kyselina fosfatidová. Poté je pomocí fosfatáz odštěpena fosfátová skupina za vzniku diacylglycerolu. Dále je přidán cholin k diacylglycerolu pomocí cholin fosfotransferázy za vzniku fosfatidylcholinu (Cockcroft et al., 2018).

Expozice PFOA zvýšila hladiny acyltransferázy u myší (Kawashima et al., 1989). PFOA zvyšovalo i hladiny glycerol-3-fosfátu u *D. rerio* (Dan et al., 2018). Rovněž byla prokázána zvýšená aktivita glycerol-3-fosfát acyltransferázy myších jater (Kudo et al. 1999), *Escherichia coli* (Lie et al., 2016) a medaky japonské (*Oryzias latipes*) (Lee et al., 2017) vlivem expozice různých PFC. Glycerol-3-fosfát acyltransferáza je nezbytná pro vznik lyzofosfatidové kyseliny, důležitého meziproduktu pro tvorbu membránových lipidů (Chen et al., 2011). Z výše uvedených údajů je patrné, že PFC mohou narušovat syntézu fosfolipidů, a tudíž mít negativní vliv na buněčnou membránu (Liu et al., 2016).

3 Hypotézy

- Nové perfluorované látky vykazují srovnatelnou toxicitu jako PFOS a PFOA
- Perfluorované látky včetně PFOS a PFOA mění hladiny fosfolipidových mastných kyselin pstruha duhového
- Buněčné linie pstruha duhového jsou citlivé vůči perfluorovaným látkám.

4 Materiály a metodika

4.1 Chemikálie

Využité chemikálie při kultivace buněk:

DPBS, Gibco, Velká Británie

FBS, Gibco, USA

Leibovitz L-15 médium, Gibco, USA

Pen-strep, Invitrogen, USA

Trypanová modř, Invitrogen, USA

Trypsin, Gibco, Velká Británie

Využité chemikálie při expozici:

L15ex:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Německo

Galaktóza, Sigma-Aldrich, USA

KCl, Sigma-Aldrich, Španělsko

KH_2HPO_4 , Lach-Ner, Česká republika

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, USA

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Indie

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner

NaCl, Sigma-Aldrich, USA

Sodium pyruvát, Sigma-Aldrich, Japonsko

Sterilní miliQ voda

EROD pufr:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner, Česká republika

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner, Česká republika

Testování toxicity:

AB, Invitrogen, USA

Acetonitril ($\geq 99,9\%$), VWR chemicals, Francie

BSA, Sigma-Aldrich, USA

CFDA-AM, Invitrogen, USA

DCFH-DA, Sigma-Aldrich, Izrael

Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich, Česká republika

EROD pufr

Ethanol ($\geq 99,8\%$), VWR chemicals, Francie

Fluorescamin, Sigma-Aldrich, Francie

Kyselina octová, VWR chemicals, Francie

L15ex (expoziční)

Neutral red, Invitrogen, USA

Resorufin ethyl ether, Sigma-Aldrich

Tert-butyl hydrogen peroxid, Luperox, Francie

Využité standardy:

GenX, HPC, ($\geq 98,0\%$) Německo

PFOA, (99%) Synquest Laboratories, USA

PFOS, ($\geq 98,0\%$), Sigma Aldrich, Německo

HFPO-TA, ($\geq 98,0\%$) Syngest Laboratories, USA

4.2 Materiály

6-jamkové destičky, Thermo Fisher Scientific, Dánsko

96-jamkové destičky, Thermo Fisher Scientific, Dánsko

Eppendorf zkumavky 1,5 ml a 2 ml, Biologix group, Čína

Kultivační lahve 182,5 cm², VWR chemicals, Čína

Sérologické pipety (sterilní), VWR chemicals, Čína

Sterilní falkony, Jet-Bio filtration, Španělsko

4.3 Přístroje a software

Autokláv, BMT Medical Technology, Česká republika

Autosampler Combi Pal, CTC, Švýcarsko

Centrifuga Medifriger-BI, JP Selecta, Itálie

Centrifuga Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Německo

DB5-MS, Agilent, USA

Hmotnostní detektor 240-MS, Varian, USA

I-control Infinite 200 Pro, Tecan, Rakousko

Inkubátor, Pol-Lab, Polsko

Kolona Lichrolut, Merck, Německo

Laminární flow box Bio-II-A/G, Telstar, Španělsko

Microsoft Excel (MS Office 365 Pro Plus)

Mikroskop, Olympus, Japonsko

Plynový chromatograf Varian 450-GC, Varian Inc., USA

Počítací komůrka Coutess, Invitrogen, Korea

R (verze 4.1.2)

4.4 Buněčné linie

Experimenty byly provedeny na liniích RTL-W1 a RTG-2. Jaterní linie pstruha duhového RTL-W1, byla získána z Eawag (Švýcarsko). Linie RTG-2 pochází ze směsi gonádální tkáně pstruha duhového a byla získána z American Type Culture Collection (USA).

4.4.1 Udržování buněčných kultur

Buňky byly udržovány v inkubátoru při teplotě 19 °C v kultivačních lahvích (183 cm²) se standardním víčkem v Liebovitz's L15 médiu s přídavkem FBS (z angl. fetal bovine serum) a antibiotik. Pro buněčnou linii RTG-2 obsahovalo médium 10 % FBS a 1 % antibiotika Pen-strep (penicilin 10 000 jednotek/ml a streptomycin 10 000 µg/ml), pro zamezení kontaminace. Pro buněčnou linii RTL-W1 obsahovalo médium pouze 5 % FBS bez přídavku antibiotik (dále jen kultivační média). Médium bylo vyměňováno jedenkrát týdně. Dle rychlosti růstu probíhala pasáž, obvykle 1x týdně. Při pasáži byly buňky jednou opláchnuty DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), pro odstranění FBS, které inhibuje aktivitu trypsinu. Posléze byl přidán proteolytický enzym trypsin pro uvolnění adherovaných buněk. Trypsin byl ponechán v kontaktu s buňkami po dobu maximálně 2 minut, aby se zamezilo poškození buněčné membrány. Působení trypsinu bylo zastaveno opětovným přidáním média obsahujícího FBS. Následně byla buněčná suspenze centrifugována (400 rcf, relativní centrifugační síla) po dobu 5 minut. Vzniklá suspenze byla rozdělena do nových lahví (3,5 mil. buněk/lahev).

Příprava média L15ex:

L15ex, nebo také expoziční médium bylo připraveno dle Schirmer et al. (1997). K 680 ml MiliQ vody bylo přidáno 100 ml roztoků A, B a C, 10 ml 5,5% roztoku pyruvátu sodného v MiliQ vodě a 10 ml 9% roztoku galaktózy v MiliQ vodě. Roztoky A, B a C byly před přípravou média sterilizovány v autoklávu (122 °C, 20 min), roztoky D a E byly sterilizovány filtrací přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,22 µm.

Pro přípravu roztoku A bylo do 1000 ml MiliQ vody přidáno:

80 g NaCl

4 g KCl

2 g MgCl₂ · 6 H₂O

2 g MgSO₄ · 7 H₂O

Pro přípravu roztoku B bylo do 1000 ml MiliQ vody přidáno:

1,85 g CaCl₂ · 2 H₂O

Pro přípravu roztoku C bylo do 1000 ml MiliQ vody přidáno:

0,6 g KH₂PO₄

4,79 Na₂HPO₄ · 12 H₂O

Počítání buněk

Suspenze buněk v kultivačním médiu byla zředěna roztokem trypanové modři (0,4%) v poměru 1:1. Buňky byly následně počítány v automatické počítací komůrce. Měření bylo provedeno dvakrát a následně byly hodnoty viabilních buněk zprůměrovány.

Nasazení buněk a expozice

Buňky v Liebovitz's L15 kultivačním médiu byly nasazeny do 96 jamkové destičky v hustotě 50 000 buněk/jamku a ponechány 24 hodin v inkubátoru (19 °C) pro dokonalou adhezi. Kultivační médium bylo odsáto a buňky byly 1x opláchnuty L15ex médiem pro odstranění zbylého FBS, které by mohlo interagovat s testovaným analytem. FBS obsahuje proteiny, na které se PFAS váží (Forsthuber et al., 2020) a výsledky by tak mohly být podhodnoceny. Následně byly buňky po dobu 24 hodin exponovány roztokům perfluorovaných látek o koncentracích 5, 10, 25, 50, 75 a 100 mg/l v expozičním médiu. Při přípravě zásobních roztoků byly perfluorované látky rozpuštěny buď v DMSO (dimethylsulfoxid) nebo v ethanolu. Koncentrace rozpouštědla v jamce nikdy nepřesáhla 0,1 %. Jako negativní kontrola bylo použito samostatné L15ex médium (tzv. cell control) a L15ex

médium s příměsí odpovídajícího rozpouštědla o koncentraci 0,1 % (tzv. solvent control). Výsledné hodnoty byly vztaženy k negativní kontrole obsahující rozpouštědlo. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku. Měření probíhalo ve 3 paralelách.

4.5 Testy toxicity

4.5.1 Postup detekce reaktivních forem kyslíku

DCFH-DA (2',7'-dichlorfluorescein diacetát) proniká do buňky, kde je působením esteráz přeměněn na DCFH (dichloro-dihydro-fluorescein diacetát). V přítomnosti ROS je okamžitě oxidován na vysoce fluorescenční DCF (dichlorfluorescein). Fluorescenci DCF je možné detekovat při excitačních vlnových délkách 485 nm a emisních vlnových délkách 535 nm. Hodnota odpovídá koncentraci ROS v buňce (Kang et al., 2004).

Před expozicí bylo odsáto kultivační medium a buňky 1x opláchnuty L15ex médiem. Následně byl do každé jamky přidán roztok 20 μ M DCFH-DA a destička byla ponechána 30 minut ve tmě v inkubátoru (19 °C). Poté byly buňky opět opláchnuty L15ex médiem a následně byly exponovány perfluorovaným látkám a pozitivní kontrole *t*-BHP (tert-butyl hydrogen peroxid) o koncentracích 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06 a 0,03 mM. Nárůst intenzity fluorescence (ex 485/em 535 nm) byl měřen ihned poté a následně po intervalech 10 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 3 hod, 4 hod a 24 hod.

4.5.2 Postup testu ethoxyresorufin-o-deethyláza

Test EROD detekuje aktivitu cytochromu P450 1A. Využívá principu přeměny 7-ethoxyresorufinu na resorufin pomocí cytochromu P450 1A. Resorufin je poté možné detekovat fluorescenčně při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 590 nm (Payne et al., 1975).

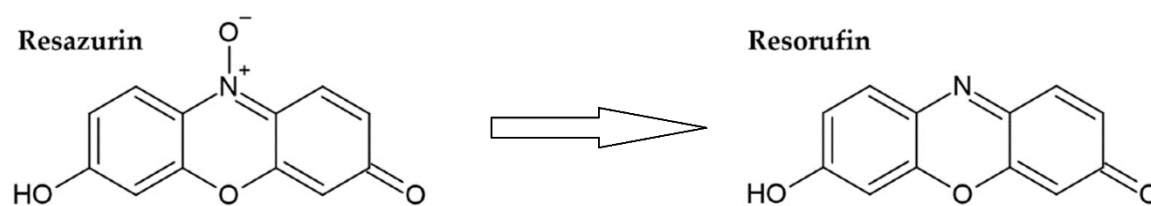
Test byl proveden dle Kennedy et al. (1994). EROD pufr byl připraven postupným přidáváním 0,2M roztoku NaH₂PO₄ k 0,2M roztoku Na₂HPO₄ dokud nebylo dosaženo pH 8. Následně byl naředěn MiliQ vodou pro dosažení koncentrace 50 mM.

Buňky exponované po dobu 24 hodin perfluorovaným látkám a pozitivní kontrole benzo[a]pyrenu o koncentracích 2; 1; 0,5 a 0,1 μ M byly 2x opláchnuty EROD pufrém a do každé

jamky bylo přidáno 100 μ l 2 μ M barvicí roztoku ethoxyresorufinu. Bezprostředně po přidání byla změřena fluorescenční intenzita (ex/em; 530/590 nm). Měření probíhalo celkem 10x po 1 minutě za neustálého třepání. Následně byl stanoven obsah bílkovin přidáním 50 μ l 0,03 mg/ml fluorescaminu v acetonitrilu. Měření předcházelo 10 minut třepání ve tmě (ve spektrofotometru) ex/em; 365/470 nm. Výsledné hodnoty obratu ethoxyresorufinu byly vyjádřeny v pikomolech resorufinu na mg proteinu za minutu (pmol/mg proteinu/min) dle resorufinové a proteinové standardní křivky. Proteinová křivka byla sestavena pomocí BSA (hovězí sérový albumin) v EROD pufu.

4.5.3 Postup měření buněčné viability

Principem měření Alamar blue (AB) je schopnost živých buněk redukovat málo fluorescenční resazurin na velmi fluorescenční resorufin (Obr. 9). Fluorescenční odezva odpovídá počtu živých buněk (Schreer et al., 2005).



Obrázek 9. Mechanismus testu Alamar Blue. Upraveno dle Ligasová et al. (2021)

Barvivo CFDA-AM (5-karboxyfluorescein diacetát, acetoxymethyl ester) je v živých buňkách přeměněno pomocí esteráz na polární CFDA (karboxyfluorescein diacetát), které je fluorescentní. Takto přeměněné barvivo není schopno procházet membránou živých buněk, naopak mrtvé buňky jej vypustí. Tento test tudíž měří enzymatickou aktivitu a zároveň integritu buněčné membrány (Schreer et al., 2005).

Testy CFDA-AM a AB byly provedeny dle Dayeh et al. (2013). Buňky exponované 24 hod byly 2x opláchnuty roztokem L15ex pro dokonalé odstranění perfluorovaných látek. Poté byla každá jamka ošetřena 100 μ l roztoku CFDA-AM/AB (CFDA-AM o koncentraci 0,1 μ l/ml a Alamar blue o koncentraci 6,25 μ l/ml v L15ex). Následně byly ponechány 30 minut v inkubátoru bez přístupu světla. Byla změřena intenzita fluorescence (ex 532/ em 590 nm pro Alamar blue a ex 485/ em 535 nm pro CFDA).

Principem testu NRU (příjem neutrální červeně, z angl. neutral red uptake) je schopnost živých buněk vázat barvivo neutral red. Toto barvivo proniká difúzí až do matrix lyzozomů. Integrita lyzozomální membrány může narušena přítomností toxických látek. Poškozené buňky tak nejsou schopny zadržovat barvivo. Následným oplachem je odstraněno nezadržené barvivo a poté dochází k extrakci NRU. Uvolněné barvivo odpovídá počtu viabilních buněk a je detekováno při excitační vlnové délce 532 nm a emisní vlnové délce 680 nm (Hammond et al. 1980).

Buňky exponované 24 hod 2x opláchnuty roztokem L15ex. K opláchnutým buňkám bylo následně přidáno 100 μ l roztoku NRU v L15ex o koncentraci 10 μ l/ml. Poté byly buňky uloženy na 60 minut do inkubátoru. Po uplynutí této doby byly buňky 2x opláchnuty L15ex a následně bylo NRU extrahováno pomocí extrakčního roztoku (1% ledová kyselina octová, 50% ethanol, 49 % miliQ voda). Obsah všech buněk byl důkladně zhomogenizován pipetováním a následně byla stanovena intenzita fluorescence (ex 532/ em 680 nm).

4.5.4 Analýza fosfolipidových mastných kyselin

4.5.4.1 Expozice

PLFA analýza vyžaduje velké množství buněk. Proto nebylo možné provádět test v 96 jamkových destičkách. Test byl proveden v 6 jamkových destičkách s obsahem 1 milionu buněk v jamce. 1 destička obsahovala 1 paralelu a bylo měřeno celkem 5 paralel. Buňky byly ponechány 24 hodin v inkubátoru pro dokonalou adhezi. Následně byly opláchnuty expozičním médiem a exponovány PFC v expozičním médiu o koncentracích 0,5; 5 a 50 mg/l (PFOS, PFOA a GenX) a 0,25; 2,5 a 25 mg/l HFPO-TA a kontrole, která obsahovala 0,01 % rozpouštědla. Různé expoziční koncentrace byly zvoleny na základě výsledků testů viability. Pro měření byly použity pouze koncentrace, které nesnižovaly viabilitu pod 80 %. Expozice probíhala 24 hodin. Poté byl odebrán expoziční roztok s PFC, spolu s buňkami. Buňky byly odebrány pomocí trypsinu, stejně jako při pasáži. Následně byly vzorky centrifugovány (460 g) po dobu 8 minut. Poté byl odebrán supernatant a buňky byly lyofilizovány.

4.5.4.2 Extrakce

Lyofilizované buňky byly převedeny do skleněných vypálených zkumavek a zváženy pomocí analytických vah. Poté byla k vzorku přidána směs chloroform:methanol:fosfátový pufr (pH = 7,4) o poměru 1:2:0,8. Následně byl staticky extrahován v pokojové teplotě a ve tmě po dobu 1 hodiny.

Vzorek byl centrifugován (3500 rpm; 5 min) a poté byl odebrán supernatant do vypálené skleněné zkumavky a ponechán opět v pokojové teplotě a ve tmě. Následně bylo k sedimentované části přidáno 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu a vzorek byl promíchán a poté byl ponechán v lednici (4 °C) po dobu 1 hodiny. Následně byl vzorek opět centrifugován (3500 rpm, 5 min) a byla odebrána spodní chloroformová část. K horní vodné fázi bylo přidáno 1,88 ml chloroformu a 1,88 ml pufru a směs byla opět centrifugována. Poté byla chloroformová část smíchána s předešlým supernatantem. Vzorek byl následně odpařen do sucha pomocí proudu dusíku, poté k němu bylo přidáno 1,88 ml chloroformu spolu s 1,88 ml pufru. Poté byl aplikován na kolonu LiChrolut Si 60, která byla předem promytá chloroformem. Kolonka byla následně promytá chloroformem (2 ml) pro odstranění frakce neutrálních lipidů a poté acetonem (6 ml) pro odstranění frakce glykolipidů. Následné promytí methanolem (2 ml) uvolnilo frakci fosfolipidů, která byla odebrána. Vzorek byl opět odpařen do sucha pomocí proudu dusíku a poté k němu bylo přidáno 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu. Ke směsi byl poté přidán 1 ml 0,2 M KOH v bezvodném methanolu. Vzorek byl následně inkubován ve vodní lázni po dobu 15 minut (37 °C). Poté byl přidán hexan (1,6 ml), chloroform (0,4 ml), 1 M kyselina octová (0,3 ml) a destilovaná voda (2 ml). Vzorek byl centrifugován (2500 rpm, 5 min) a supernatant byl odebrán, vzorek byl promyt 2× 0,4 ml chloroformu a 1,6 ml hexanu a směs byla opět centrifugována (2500 rpm, 5 min.). Supernatant byl odebrán a přidán k předešlému supernatantu. Tato extrakce byla poté ještě jednou zopakována. Vzorek byl opět odpařen do sucha pomocí proudu dusíku a poté bylo přidáno 0,95 ml hexanu a vzorek byl převeden do krimpovací vialky. Následně bylo ke vzorku přidáno 50 µl vnitřního standardu (200 mg/l C13 v hexanu)

4.5.4.3 Kvantitativní stanovení methylesterů fosfolipidových mastných kyselin

Pro analýzu vzorků byl využit plynový chromatograf Varian 450-GC s hmotnostním detektorem Varian 240-MS (GC-MS, z angl. gas chromatography – mass spektrometry). Vzorky byly dávkovány o objemu 1 µl pomocí autosampleru. Pro separaci byla využita kolona DB5-MS o průměru 0,25 mm a délce 30 m a stacionární fázi 0,25 µm. Nosným plynem bylo helium (1 ml/min). První minutu byl teplotní program nastaven na teplotu 60 °C při zavřeném děliči. Následně byl dělič otevřen a teplota začala lineárně stoupat do 120 °C (25 °C/min) a poté do 240 °C (2,5 °C/min). 6 minut po startu proběhla detekce. Byl měřen celkový iontový proud v rozsahu 50-500 m/z. Porovnáním hmotnostních spekter byly stanoveny methylestery fosfolipidových mastných kyselin. Byly sestrojeny kalibrační křivky v koncentračním rozsahu 0,05-10 µg/ml, dle kterých byly následně stanoveny koncentrace analytů.

Pro zpracování výsledků byly vybrány pouze mastné kyseliny, které byly detekovány ve všech měření, a jejichž rozdíl od kontrolního měření byl statisticky významný alespoň u jedné z testovaných látek.

4.5.5 Statistická analýza

Pro určení normální distribuce dat byl použit Shapiro-Wilkův test normality. Pro určení, zda byl rozdíl mezi kontrolou a exponovanými buňkami signifikantní byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA), s následným Tukeyho Post hoc testem. Testy byly provedené v programu R (verze 4.1.2). Grafy byly následně vytvořeny v programu Microsoft Excel (MS Office 365 Pro Plus).

5 Výsledky a diskuze

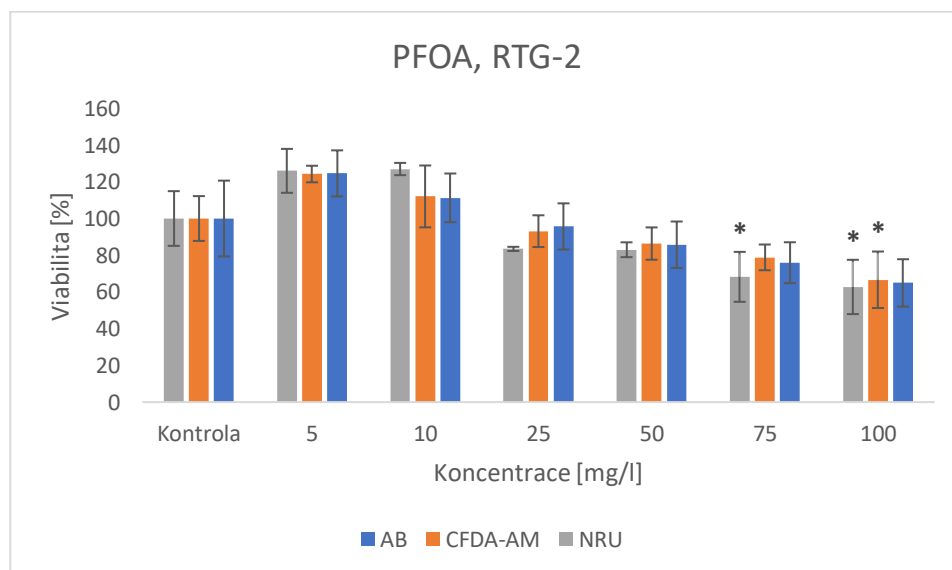
5.1 Viabilita

Viabilita buněčné linie RTG-2

PFOS

Při testování koncentrací 5-100 mg/l nedošlo ke statisticky významnému poklesu viability. Data v této práci nejsou zobrazena. Přesto, že bylo publikováno, že se PFOS akumuluje v gonádách různých ryb (Ankley et al. 2007, Du et al., 2009) a zároveň pravděpodobně inhibuje jejich růst u *D. rerio* při 70denní expozici ve vodě 50-250 µg/l (Du et al., 2009).

PFOA



Graf č. 1: Viabilita buněčné linie RTG-2 po 24 hod. expozici PFOA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

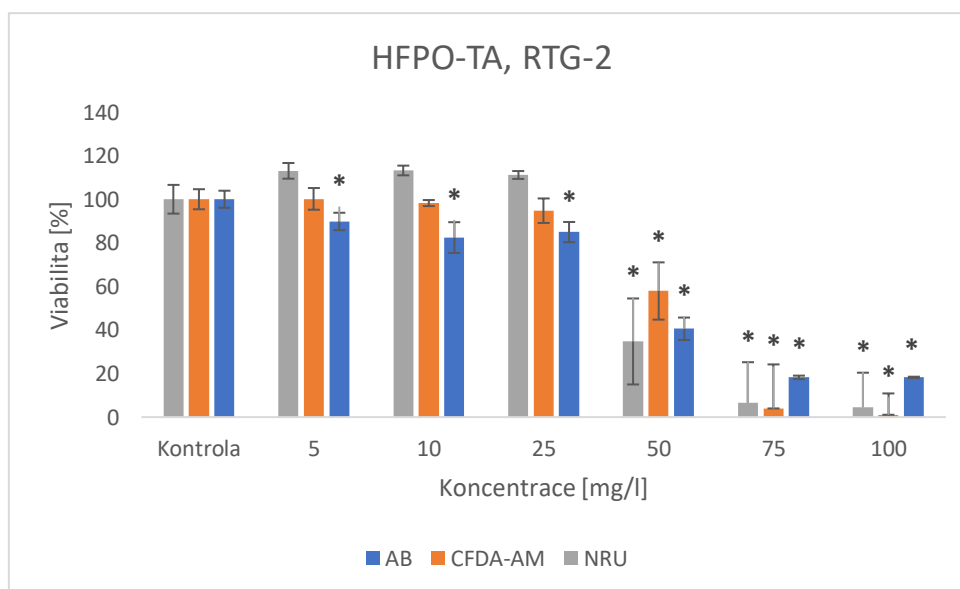
Při testování koncentrací 5-100 mg/l PFOA došlo ke statisticky významnému snížení viability při expozici koncentracím 75 a 100 mg/l (Graf č. 1). Ze snížených hladin CFDA-AM ve srovnání s kontrolou je patrné, že byla snížena membránová integrita při koncentracích 100 mg/l PFOA.

Zároveň je patrné, že při koncentracích 75 a 100 mg/l došlo ke snížení metabolické aktivity buněk (AB). Nepatrně zvýšené hodnoty viability v nižších koncentracích (5 a 10 mg/l) mohou být způsobeny takzvanou hormezí. Hormeze označuje pojem, kdy nižší koncentrace způsobují příznivé odezvy vlivem stresu (Mattson et al., 2008). Buňky mohly vlivem nižších koncentrací proliferovat a tudíž zvyšovat množství viabilních buněk.

GenX

Při testování koncentrací 5-100 mg/l GenX nedošlo ke snížení viability. Data v této práci nejsou zobrazena. Nebyla nalezena žádná data o expozici rybích gonadálních buněk, bylo ovšem publikováno, že *in vivo* expozice způsobila sníženou hmotnost varlat u myši (Conley et al., 2019). Zároveň se v této práci ukázalo, že vlivem *in utero* expozice GenX se snižují hladiny testosteronu u myši, který je produkován gonadálními buňkami. Snížené hladiny testosteronu pak mohou vést k různým malformacím potomků. Je možné, že příčinou je aktivace PPAR vlivem PFC. Existují totiž důkazy o tom, že aktivace PPAR způsobuje anti-androgenní efekt (Gazouli et al., 2002; Nepelska et al., 2015; Conley et al., 2019).

HFPO-TA



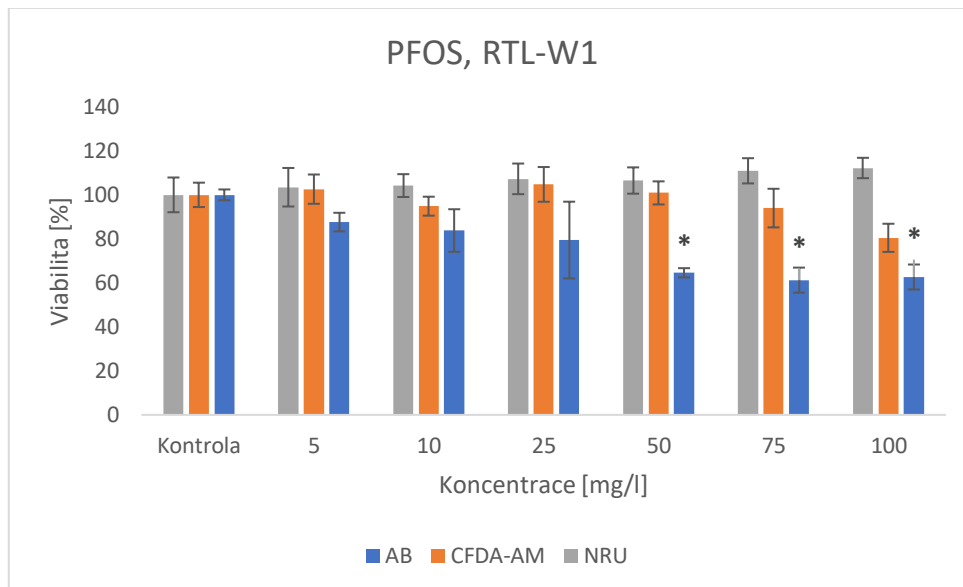
Graf č. 2: Viabilita buněčné linie RTG-2 po 24 hod. expozici HFPO-TA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Expozice koncentracím 5-100 mg/l HFPO-TA po dobu 24 hodin (Graf č. 2) vedla ke statisticky významnému poklesu membránové integrity ve všech testovaných koncentracích. Hodnoty viability ovšem neklesly pod 80 % při expozici koncentracím nižším než 25 mg/l. Literatura neobsahuje mnoho záznamů o měření viability gonadálních buněčných linií. Existují ale záznamy, že i HFPO-TA se akumuluje v reprodukčních orgánech některých organismů. Například ve vaječnicích skokana černoskvrného (*Pelophylax nigromaculatus*) odloveného v Číně byly detekovány obdobné koncentrace HFPO-TA jako PFOS či PFOA (Cui et al., 2018).

Xin et al. (2019) zdokumentovali daleko výraznější afinitu HFPO-TA a HFPO-TeA k estrogením receptorům α i β buněčné linie MVLN než v případě PFOA. Estrogení receptor α se nachází mimo jiné v děloze a ve vaječnicích. Rovněž estrogení receptor β se nachází ve vaječnicích, ale také například v prostatě a v močovém měchýři (Paterni et al., 2014). Estrogení receptory HFPO-TA i HFPO-TeA vykazovali antagonistickou aktivitu, naopak PFOA vykazovalo agonistickou aktivitu. Tyto látky tak mohou účinkovat na pohlavní orgány různých organismů, například narušením estrogení aktivity.

Viabilita jaterní buněčná linie RTL-W1

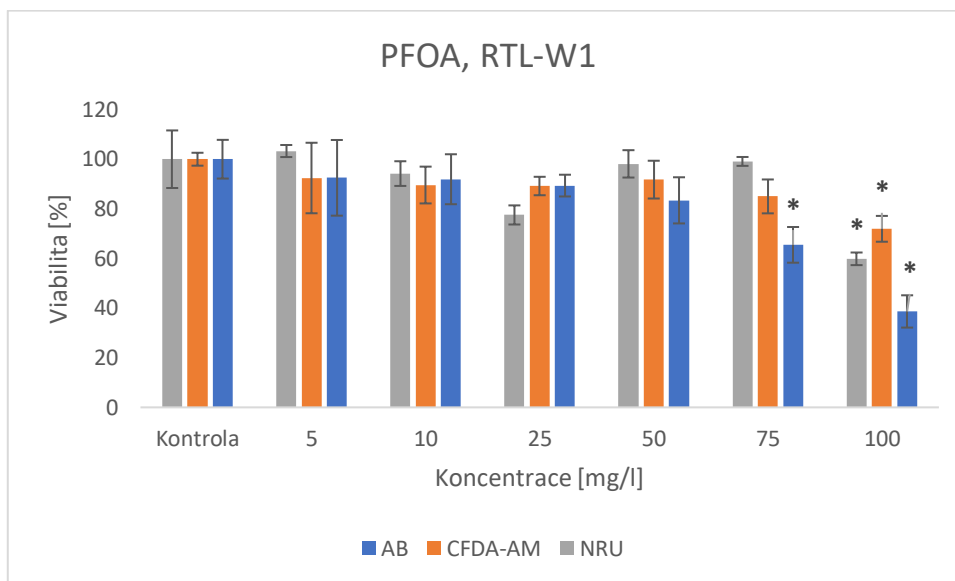
PFOS



Graf č. 3: Viabilita buněčné linie RTL-W1 po 24 hod. expozici PFOS. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Vlivem 24hodinové expozice koncentracím v rozmezí 50-100 mg/l PFOS došlo ke statisticky významnému snížení metabolické aktivity (Graf č. 3). Naopak je očividné, že nedochází k narušení lyzozomů, ani ke statisticky významnému narušení membránové integrity. Jaterní buňky jsou dle očekávání náchylnější k toxickému účinku PFOS než gonadální. Martin et al. (2003) zdokumentovali zvýšenou akumulaci PFOS v játrech pstruha duhového. Krøvel et al. (2008) nezaznamenali snížení viability primární jaterní buněčné linie lososa obecného při expozici koncentracím 1-25 mg/l po dobu 48 hodin. Hepatocyty pstruha duhového obdobně jako hepatocyty lososa obecného nevykazují signifikantní pokles viability při expozici 25 mg/l PFOA.

PFOA



Graf č. 4: Viabilita buněčné linie RTL-W1 po 24 hod. expozici PFOA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

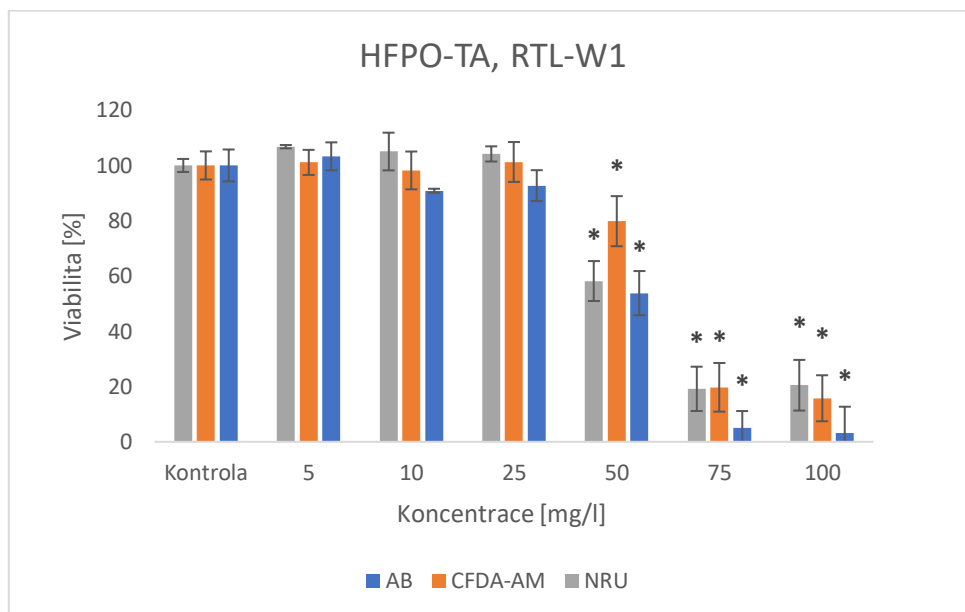
Při testování koncentrací 5-100 mg/l PFOS došlo ke statisticky významnému snížení viability ve dvou nejvyšších koncentracích (75 a 100 mg/l) (Graf č. 4). Největší vliv má expozice PFOA na metabolickou aktivitu. V nejvyšší koncentraci rovněž narušuje membránovou integritu.

Jaterní linie pstruha duhového vykazuje pravděpodobně nižší citlivost vůči PFC než jaterní linie tilápie. Viabilita jaterní linie tilápie byla po 24hodinové expozici snížena viabilita pod 80 % při koncentracích 15 mg/l (Liu et al., 2007). Buněčná jaterní linie *D. rerio* vykazovala až 55% úbytek viability po expozici 96 hodin PFOA (Mahapatra et al., 2017). Oproti tomu lidské HepG2 buňky vykazovaly redukcí viability pod 80 % již při koncentracích 15 mg/l (Wen et al., 2020), tudíž se jeví jako daleko citlivější, než linie RTL-W1.

GenX

Byly testovány koncentrace v rozmezí 5-100 mg/l GenX. Viabilita nepoklesla u žádné z testovaných koncentrací. Data v této práci nejsou zobrazena. Stejným testem (NRU) nebylo prokázáno snížení viability HepG2. Ke snížení pod 80 % došlo až při koncentracích vyšších než 270 mg/kg. V porovnání s PFOA vykazoval GenX menší toxicitu (Wen et al., 2020), což je shodné s výsledky v této diplomové práci.

HFPO-TA

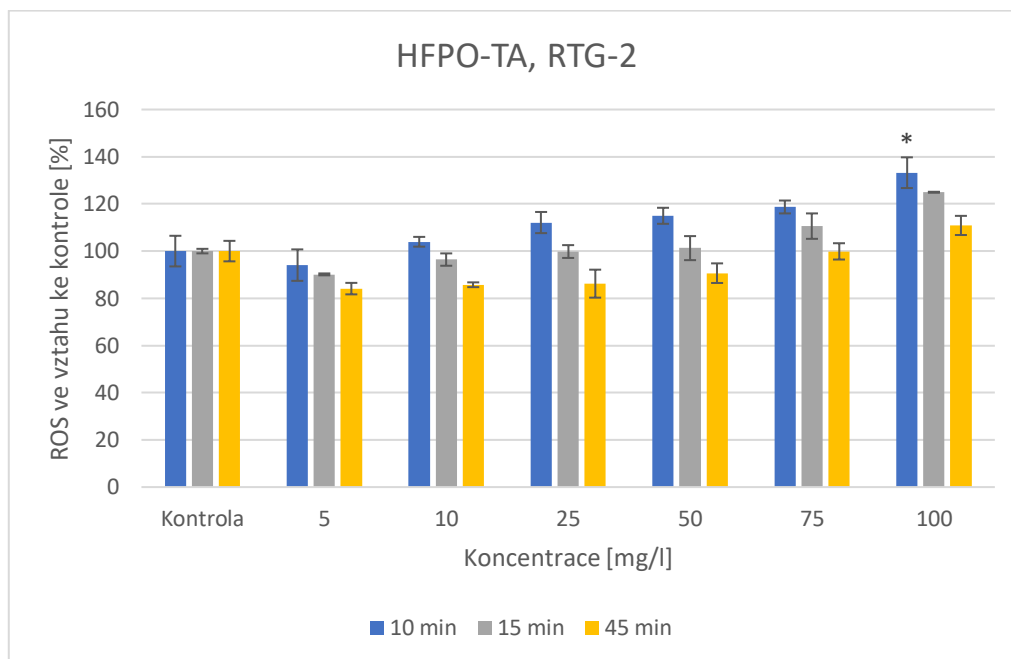


Graf č. 5: Viabilita buněčné linie RTL-W1 po 24 hod. expozici HFPO-TA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

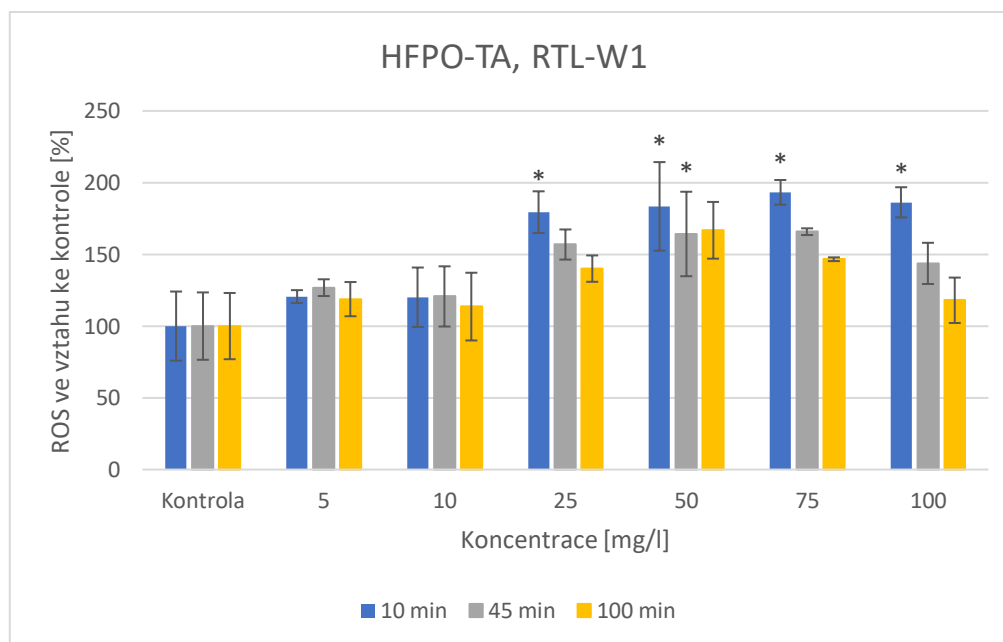
Při testování koncentrací 5-100 mg/l HFPO-TA došlo ke statisticky významnému snížení viability při expozici koncentracím 50-100 mg/l (Graf č. 5). V porovnání s PFOA a PFOS vykazuje HFPO-TA dramaticky vyšší toxicitu u jaterních i gonadálních buněk pstruha duhového. Bylo detekováno narušení integrity buněčné membrány (CFDA-AM) i metabolické aktivity (AB). Zároveň je patrné, že došlo k poškození lyzozomů (NRU).

Výsledky jsou shodné s literaturou. HFPO-TA prokazatelně snížilo viabilitu lidských hepatocytů o 20 % při 24hodinové expozici 59,5 mg/l, což koresponduje s těmito výsledky i přesto, že se jedná o jinou buněčnou linii (Sheng et al., 2018). Liang et al. (2022) prokázali snížení viability lidských H9 buněk (embryonální kmenové buňky) za stejný časový úsek při expozici koncentraci 148 mg/l. Výsledky této diplomové práce, shodně s literaturou vykazuje HFPO-TA vyšší toxicitu než PFOS i PFOA. Například 28denní expozice myších jaterních sféroidů koncentracím 50 mg/l HFPO-TA snížila viabilitu, ale PFOA nikoliv (Sun et al., 2022).

5.2 Reaktivní formy kyslíku



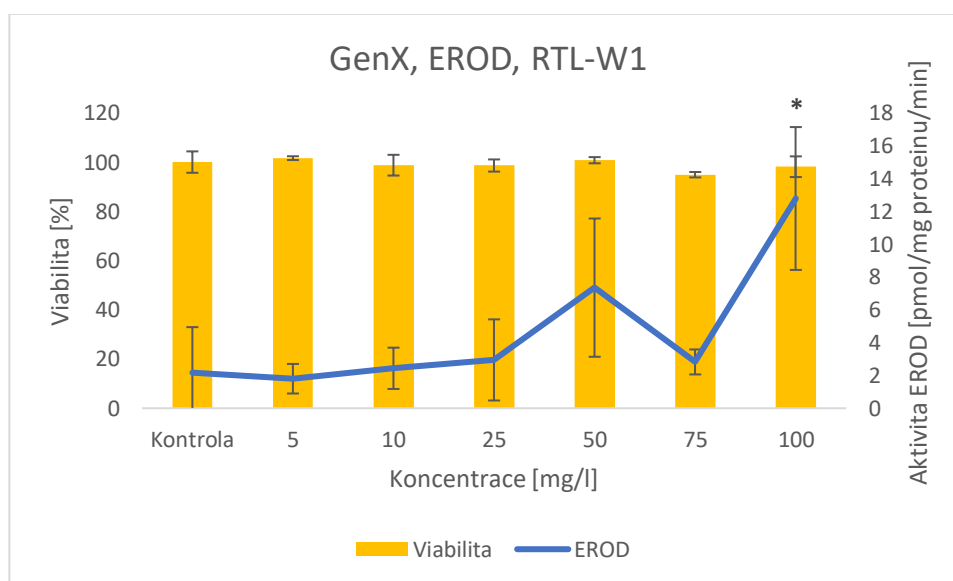
Graf č. 6: Hodnoty ROS buněčné linie RTG-2 po expozici HFPO-TA v časových intervalech 10, 45 a 100 min. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)



Graf č. 7: Hodnoty ROS buněčné linie RTL-W1 po expozici HFPO-TA v časových intervalech 10, 45 a 100 min. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Jedinou testovanou látkou, která způsobila statisticky významné zvýšení intercelulárních ROS je HFPO-TA. Obě linie vykazovaly vznik ROS v závislosti na koncentraci. Jaterní buněčná linie ovšem vykazovala vyšší tvorbu ROS než gonadální linie při expozici HFPO-TA. Nejvyšší hodnoty ROS byly u obou linií změřeny ihned po začátku experimentu (Graf č. 6 a 7). Posléze klesaly s časem, což může být odůvodněno poklesem viability (viz graf č. 2 a 5). Nejvyšší odezvy byly zaznamenány při koncentracích (100 mg/l), a u obou buněčných linií dosahovaly vyšších hodnot než expozice 0,12; 0,06 a 0,03 mM pozitivní kontroly T-BHP. Liang et al. (2022) rovněž naměřili zvýšené hodnoty ROS lidské embryonální kmenové buněčné linie hESC (z angl. human embryonic stem cells) při expozici koncentracím 198 mg/l po dobu 24hodin. Docházelo ovšem ke vzrůstu koncentrace ROS s časem.

5.3 EROD aktivita



Graf č. 8: Vyjádření aktivity EROD buněčné linie RTL-W1 po expozici GenX. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

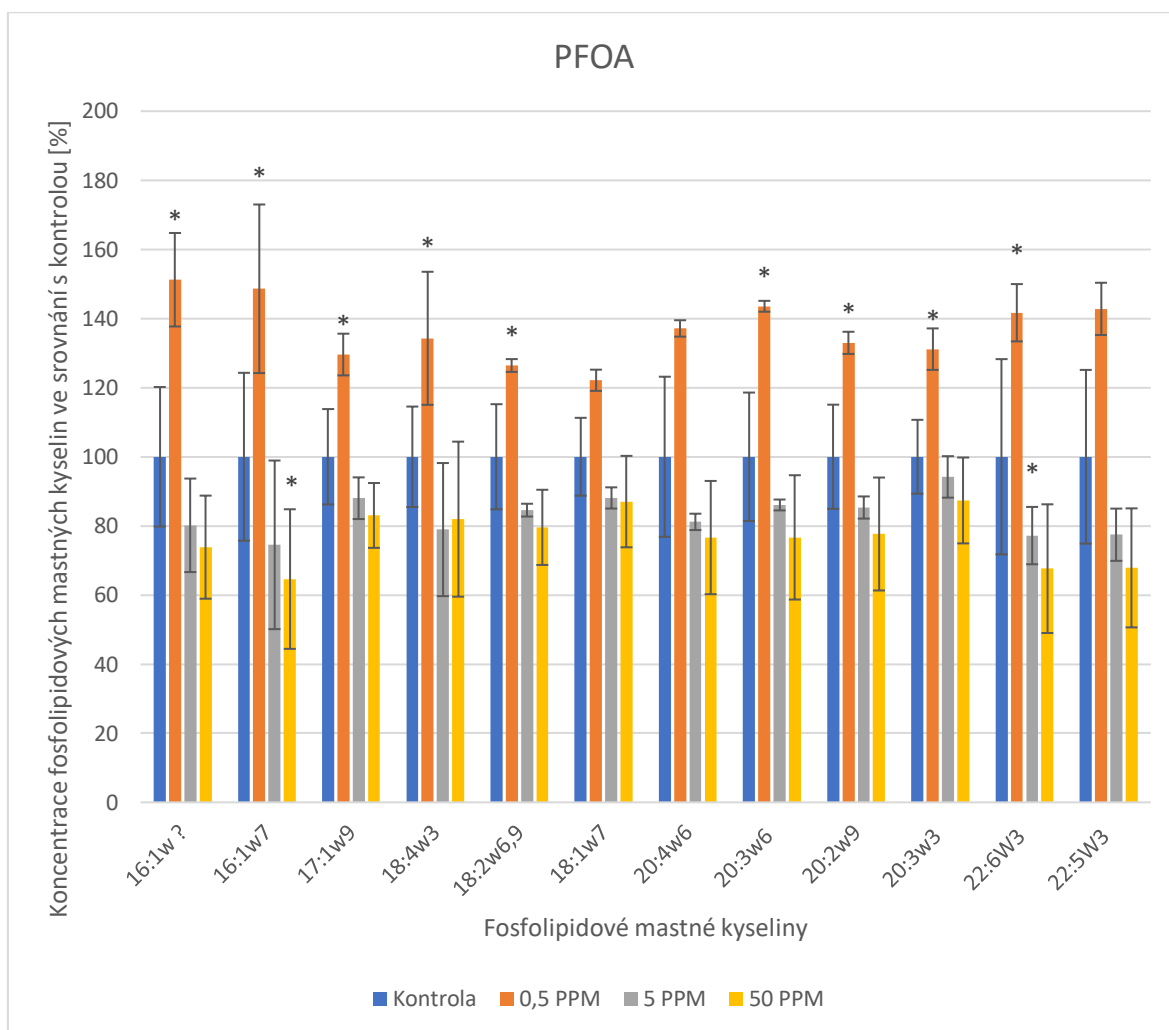
Jak již bylo zmíněno, hodnoty viability při 24hodinové expozici všem testovaným koncentracím GenX nebyly sníženy. Nicméně je nutné zahrnout do měření EROD aktivity i viabilitu, neboť její snížené hodnoty mohou způsobovat nízké koncentrace proteinů, což následně zkresluje výsledné hodnoty EROD aktivity. Ke statisticky zvýšené aktivitě CYP1A došlo při expozici nejvyšší testované koncentraci (Graf č. 8). Data firmy DuPont ukazují, že GenX vyvolal při 28denní *in vivo* expozici myši 3 a 30 mg/kg tělesné váhy/den GenX pomocí orální sondy zvýšenou aktivitu cytochromu P450 o 26 % a 53 % (DuPont, 2008).

Ostatní testované látky (PFOS, PFOA, HFPO-TA) nevykazovaly zvýšení aktivity cytochromu. V teoretické části této práce bylo poukázáno na rozcházející se výsledky aktivity cytochromu po expozici PFC v odborné literatuře. Autoři navrhují, že je cytochrom naopak inhibován (Narimatsu et al., 2011; Amstutz et al., 2022). To ovšem z těchto výsledků není patrné, neboť aktivita EROD detekuje pouze indukci cytochromu.

5.4 Analýza fosfolipidových mastných kyselin

Analýza fosfolipidových mastných kyselin buněčné linie RTG-2

PFOA

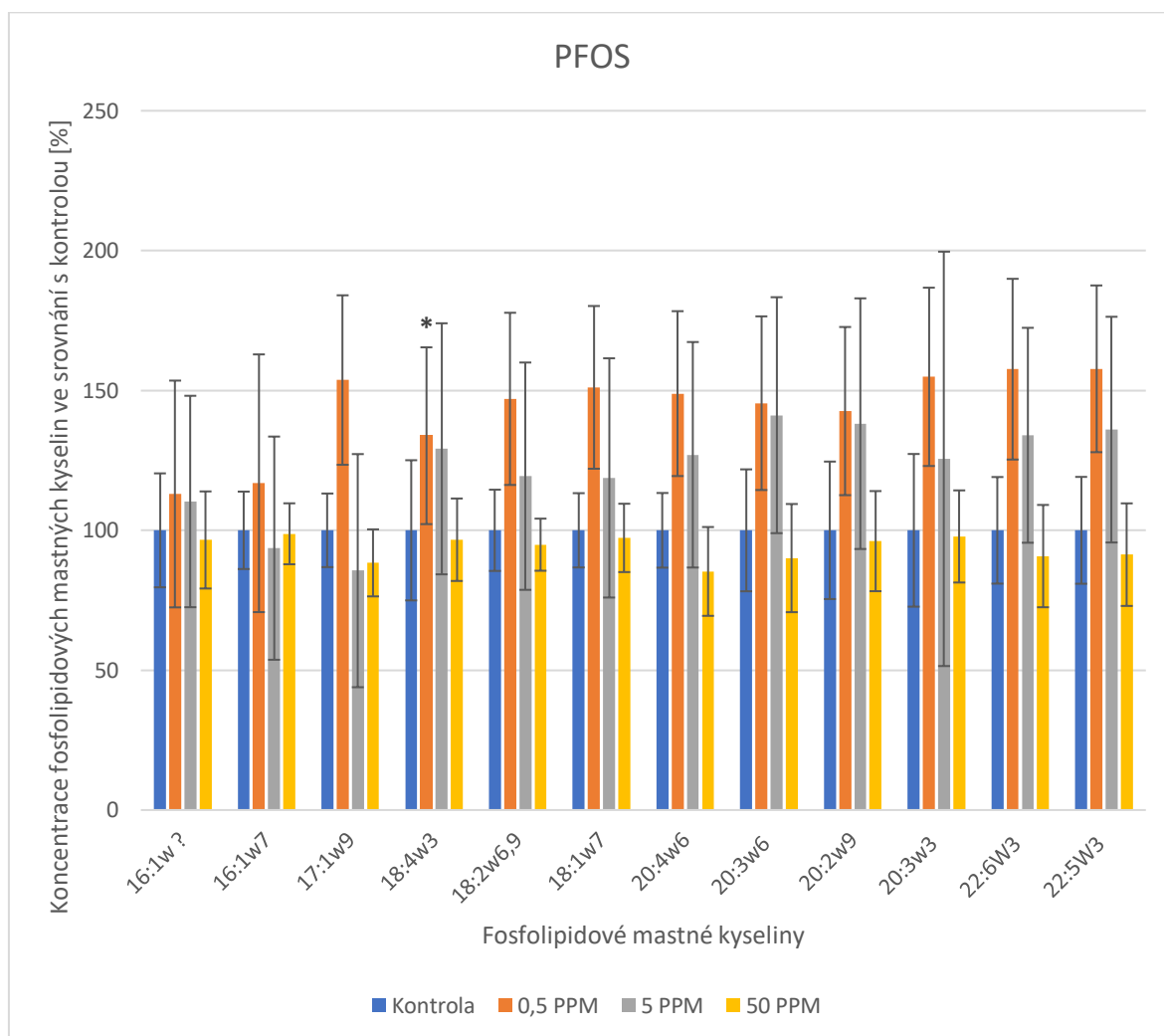


Graf č. 9: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTLG-2 0,5; 5 a 50 mg/l PFOA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Při expozici 0,5-50 mg/l PFOA došlo ke zvýšení koncentrace fosfolipidů při expozici nejnižším koncentracím (0,5 mg/l) a následné snížení koncentrace fosfolipidů v závislosti na zvyšující se koncentraci PFOA. Nejpravděpodobnějším odůvodněním zvýšení koncentrace fosfolipidů je buněčná proliferace. Buňky při dělení zvyšují obsah fosfolipidů, neboť se vytváří nová buněčná membrána. Tato hypotéza je podpořena výsledky v grafu č. 1, ze kterého je patrné, že buňky po expozici 5 a 10 mg/l PFOA mírně zvýšily počet viabilních buněk. PFOA již byla spojována

s buněčnou proliferací. Toto tvrzení je v souladu s literaturou. Například 72hodinová expozice linie MCF 10 (buňky lidského prsu) 20 mg/l PFOA způsobila 50% nárůst viabilních buněk (Pierozan et al., 2018). Snížené koncentrace fosfolipidových mastných kyselin při expozici ukazují, že došlo pravděpodobně k narušení membrány.

PFOS

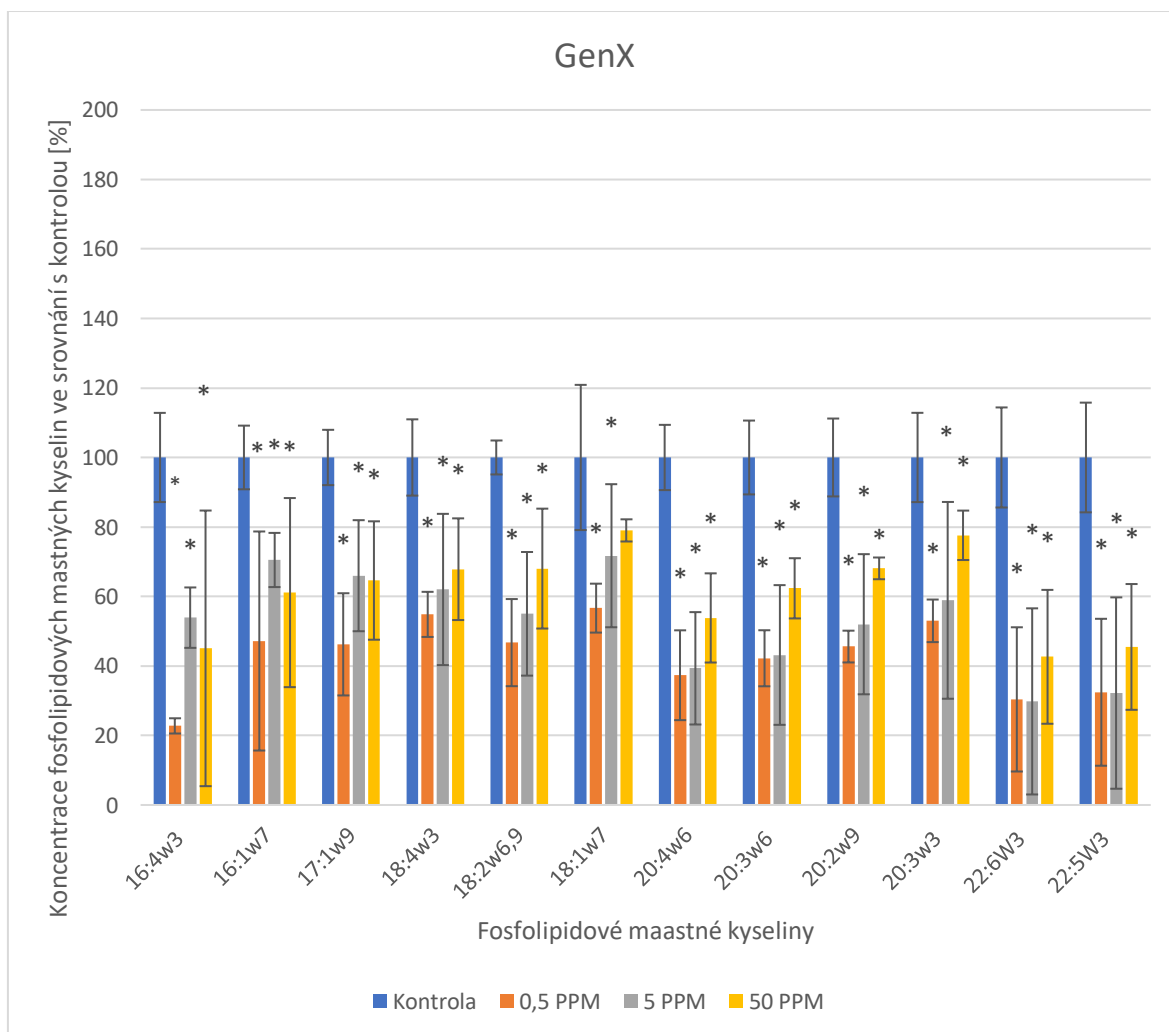


Graf č. 10: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTLG-2 0,5; 5 a 50 mg/l PFOS. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Při testování koncentrací 0,5-50 mg/l PFOS došlo ke zvýšení obsahu fosfolipidových mastných kyselin při expozici 0,5 a 5 mg/l (Graf č. 10). Většina hodnot se pohybovala na hranici statistické významnosti. Stejně jako u PFOA by mohlo být zvýšení této koncentrace způsobeno proliferací. Měření viability neprokázalo statisticky významné zvýšení viability při expozici

koncentracím 5 mg/l. Doba, za kterou se tato buněčná linie dělí je přibližně 2 dny (Plumb et al., 1971). Je možné, že buňky pouze začaly syntetizovat fosfolipidy na vytvoření nové membrány, ale nezvýšily svoji početnost, která by mohla být zaznamenána předchozími testy. Dalším možným vysvětlením je, že docházelo k proliferaci některých organel, které by cytometrická měření nezaznamenala. Organely, jako jsou peroxisomy jsou rovněž ohraničeny fosfolipidovou dvouvrstvou (Carmichael et al., 2022). PFOS je spojována právě s peroxisomální proliferací (Berthiaume et al., 2002; DeWitt et al., 2009). Peroxisomální proliferace může být indukována aktivací PPAR receptorů. Jak již bylo zmíněno, PFOS prokazatelně aktivuje tento receptor u myši i lidí (DeWitt et al., 2009).

GenX



Graf č. 11: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTG-2 0,5; 5 a 50 mg/l GenX. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

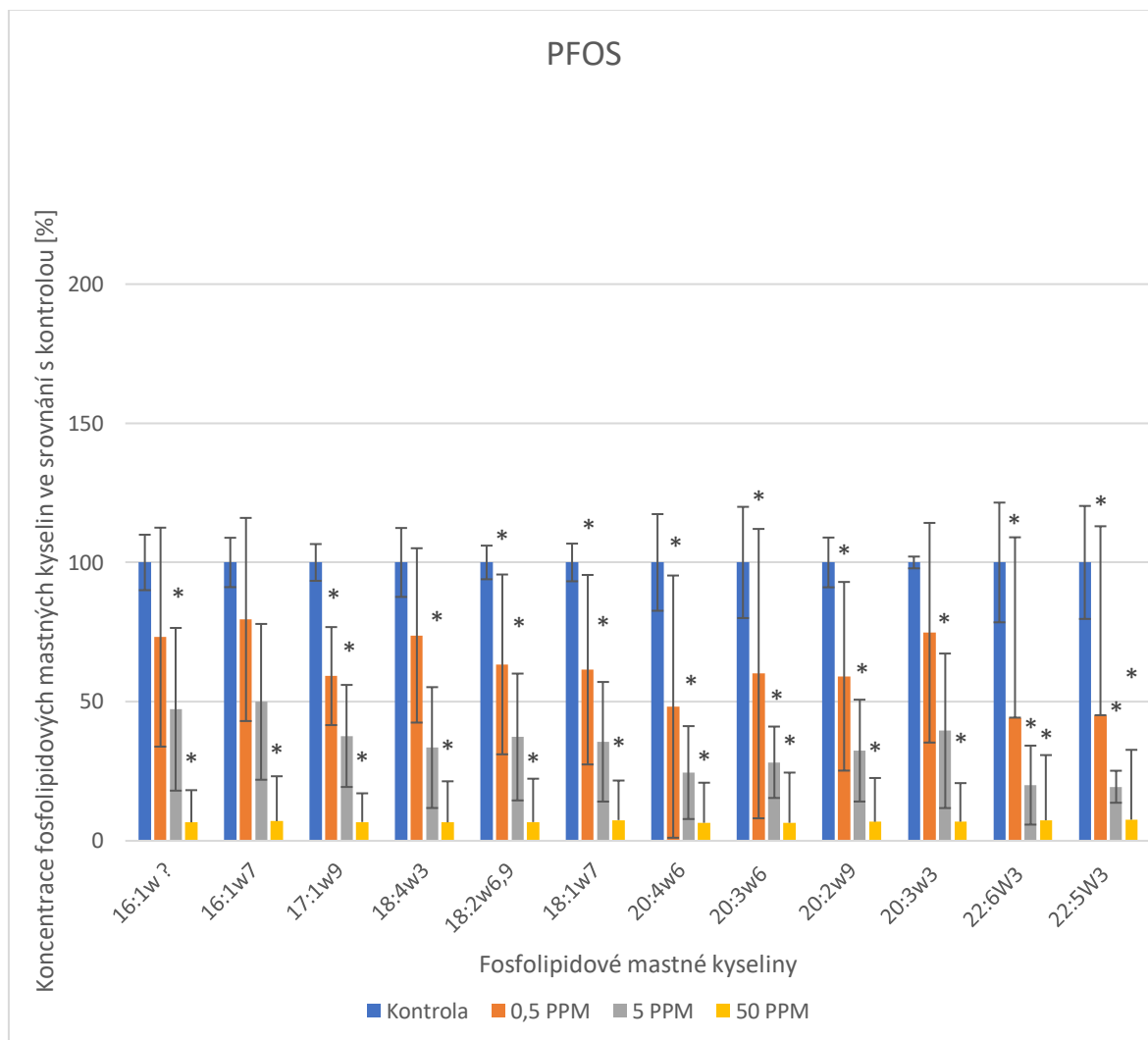
Při testování koncentrací 0,5-50 mg/l GenX došlo k pravděpodobnému narušení membrány, neboť byl ve všech třech testovaných koncentracích snížen obsah fosfolipidových mastných kyselin (Graf č. 11). Testy membránové integrity ale neprokázaly její snížení, a tak je pravděpodobné, že vlivem expozice GenX dochází pouze ke strukturálním změnám, ale nedochází k úplnému poškození membrány. Buňka může vlivem expozice látky změnit tvar, což se může projevit na obsahu fosfolipidů v buněčné membráně (Liu et al., 2016). Perfluorované látky jako je PFOS a PFOA mění membránový potenciál (Tsuda et al., 2016) a zvyšují membránovou fluiditu (Paneth et al., 2020; Liu et al., 2016), odborná literatura ovšem neobsahuje informace o vlivu GenX na membránu. Na základě těchto dat lze říct, že GenX narušuje obsah fosfolipidových mastných kyselin gonadálních buněk pstruha duhového více, než PFOS či PFOA.

HFPO-TA

Při testování 0,25-25 mg/l HFPO-TA nedošlo ke statisticky významným změnám oproti kontrolnímu měření. HFPO-TA nenarušuje membránu gonadální buněčné linie obdobným způsobem jako PFOS, PFOA i GenX. Zároveň je patrné, že je gonadální linie méně citlivá vůči expozici HFPO-TA nežli jaterní.

Analýza fosfolipidových mastných kyselin buněčné linie RTL-W1

PFOS

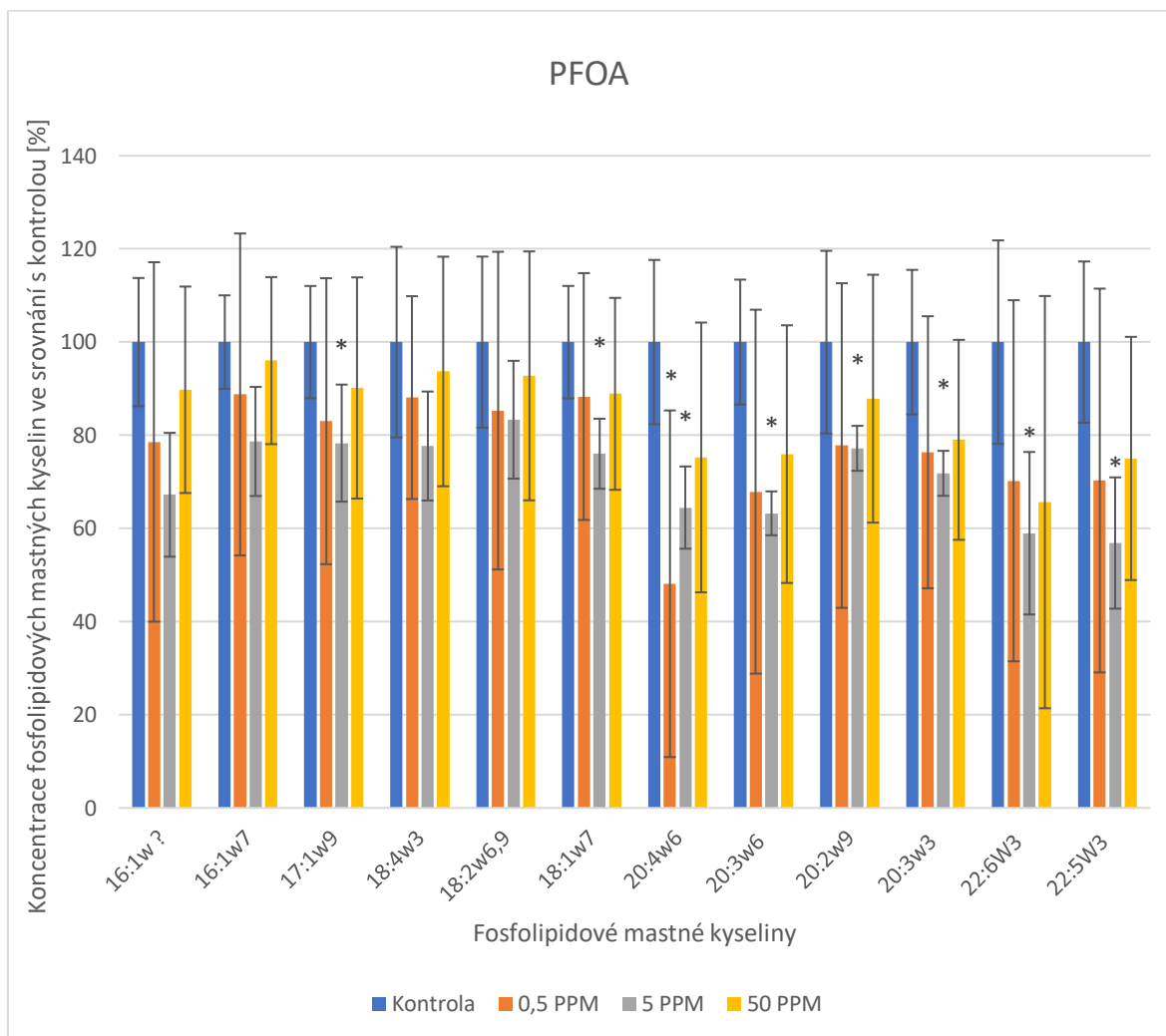


Graf č. 12: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTLW-1 0,5; 5 a 50 mg/l PFOS. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Při testování koncentrací 0,5-50 mg/l PFOS došlo ke statisticky významnému poklesu fosfolipidových mastných kyselin ve všech testovaných koncentracích (Graf č. 12). Je velmi pravděpodobné, že vlivem PFOS dochází k narušení membrány. Je ovšem nutné podotknout, že test integrity membrány (Graf č. 3) neprokázal její narušení při expozici koncentraci 50 mg/l. Tento test ovšem prokazuje pouze schopnost buňky zadržet barvivo, je tak možné, že dochází ke strukturnímu narušení buněčné membrány, ale nikoli úplné perforaci. Liu et al. (2016) zjistili, že při ošetření *E. coli* 500 mg/l PFOS po dobu 3 hodin byla narušena integrita membrány. Dále bylo patrné ze snímků

z transmisního elektronového mikroskopu, že při vyšších koncentracích došlo k úplnému poškození membrány a následnému vylití buněčného obsahu do extracelulárního prostředí. Autoři se domnívají, že se PFOS a PFOA váže na lipidy uvnitř membrány a tím narušují její integritu.

PFOA



Graf č. 13: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTLW-1 0,5; 5 a 50 mg/l PFOA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

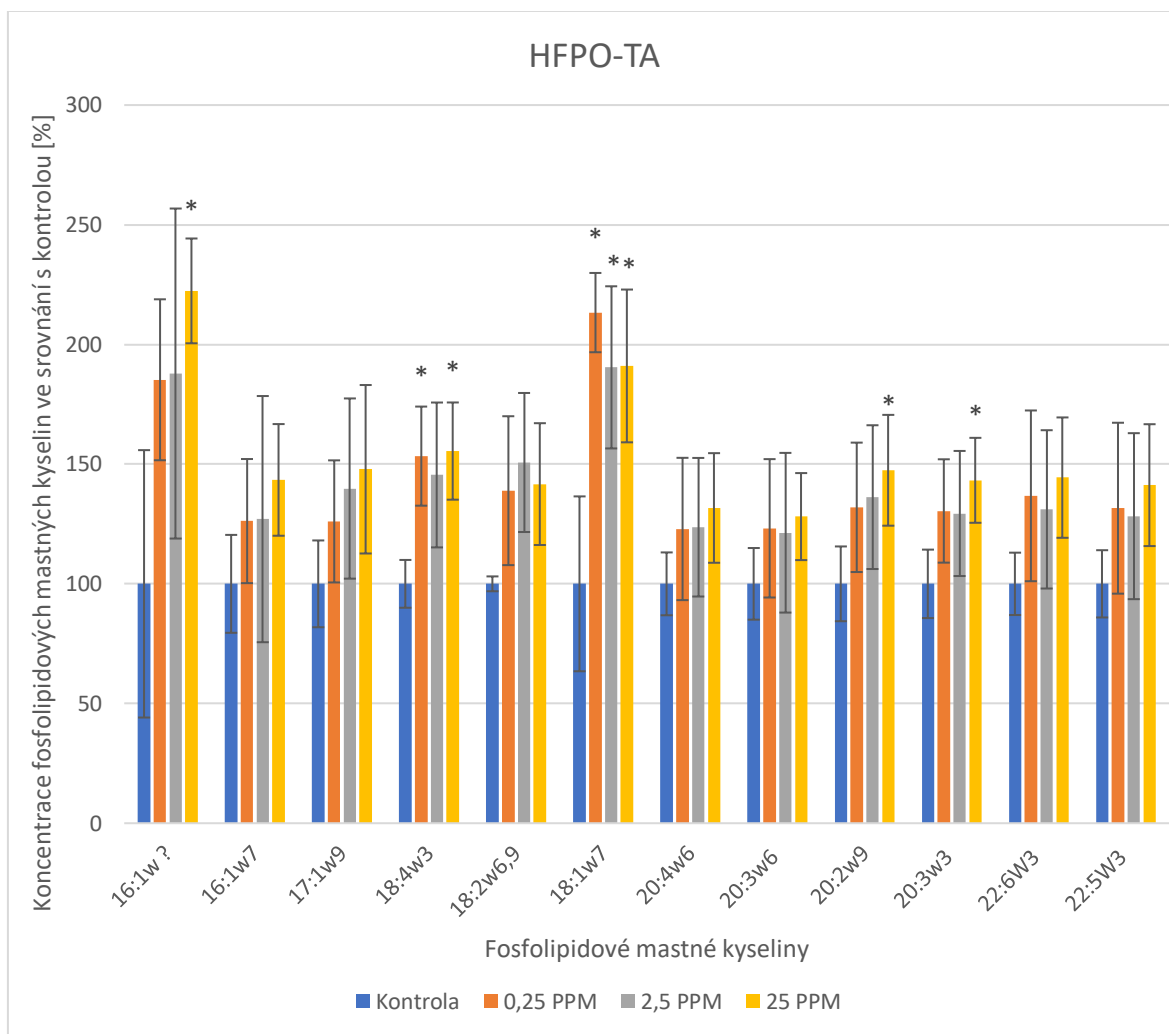
Byly analyzovány fosfolipidové mastné kyseliny jaterní buněčné linie pstruha duhového po 24hodinové expozici koncentracím 0,5-50 mg/l PFOA. Tato expozice snížila hodnoty koncentrací fosfolipidových mastných kyselin ve všech testovaných koncentracích (Graf č. 13). PFOA taktéž narušuje membránu jaterní buněčné linie pstruha duhového, ale podstatně méně než PFOS. Liu et

al (2016) zjistili, že integrita membrány *E. coli* byla narušena při expozici 15 mg/l PFOA po dobu 3 hodin. 3hodinová expozice 40 mg/l PFOA také narušuje membránu buněčné linie HepG2 (Shan et al., 2013). Je možné, že jaterní buňky pstruha duhového jsou méně citlivé vůči expozici PFOA než PFOS.

GenX

Žádná z testovaných koncentrací (0,5-50 mg/l) nezpůsobila signifikantní změnu v koncentracích fosfolipidových mastných kyselin. Z těchto dat vyplývá, že jaterní buněčná linie pstruha duhového vykazuje vyšší senzitivitu než gonadální. To je pozoruhodné, protože jaterní buněčná linie je považována za citlivější vůči expozici toxickým látkám díky jejich vysoké metabolické aktivitě (Woolbright et al., 2014).

HFPO-TA



Graf č. 14: Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin po 24hodinové expozici buněčné linie RTLW-1 0,25; 2,5 a 25 mg/l HFPO-TA. * značí statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$)

Vlivem expozice 0,25-25 mg/l HFPO-TA došlo ke zvýšení koncentrace fosfolipidových mastných kyselin (Graf č. 14). Vysvětlením by mohla být opět proliferace některých organel jako jsou peroxisomy. Li et al. (2019) zdokumentovali aktivaci PPAR buněčné linie HEK 293 (lidské embryonální ledvinné buňky) vlivem expozice HFPO-TA. Tato aktivace může vést ke zvýšení proliferace peroxisomů, stejně jako u HEK 293 buněk (Bishop-Bailey et al., 2000).

Tabulka č. 3: Přehled negativních vlivů analytů na buněčnou linii RTL-W1. 0 označuje žádný naměřený efekt.

RTL-W1				
Látka	Viabilita	ROS	EROD	PLFA
PFOS	↓	0	0	↓
PFOA	↓	0	0	↓
GenX	0	0	↑	0
HFPO-TA	↓	↑	0	↑

Tabulka č. 4: Přehled negativních vlivů analytů na buněčnou linii RTG-2. 0 označuje žádný naměřený efekt.

RTG-2				
Látka	Viabilita	ROS	EROD	PLFA
PFOS	0	0	0	↑
PFOA	↓	0	0	↑
GenX	0	0	0	↓
HFPO-TA	↓	↑	0	0

Tabulky č. 3 a 4 obsahují shrnutí statisticky významně odlišných efektů od kontroly na jaterní a gonadální buněčné linie. Kritérium pro zahrnutí negativního vlivu byl projev statisticky významných změn od kontrolního měření alespoň v jedné z testovaných koncentracích. Ze shrnutí je patrné, že z hlediska viability je jaterní buněčná linie citlivější než gonadální. Zároveň byla náchylnější ke vzniku ROS (Graf č. 7) aktivaci a cytochromu P450. Pouze v případě expozice GenX došlo k narušení membrány pouze u gonadální buněčné linie a u jaterní nikoli.

Je evidentní, že expozice GenX přímo nesnižuje viabilitu, ovšem dochází k procesům jako je aktivace cytochromu P450, nebo interakci s fosfolipidovou dvouvrstvou. Na rozdíl od GenX, HFPO-TA snižuje viabilitu, způsobuje ROS, vyvolává změny v koncentraci fosfolipidových mastných kyselin, ale aktivace cytochromu P450 nebyla pozorována.

6 Závěr

V této práci byla testována toxicita vybraných perfluorovaných látek, mezi nimiž byly i takzvané nové, nebo alternativní perfluorované látky. Tyto nové perfluorované látky již byly detekovány v různých matricích životního prostředí ve vysokých koncentracích. Zatím ale neexistuje mnoho dat, která by zhodnotila jejich toxicitu, a proto existují pochybnosti o jejich bezpečnosti. Tato práce jako první vyhodnocuje toxicitu perfluorovaných látek u jaterní a gonadální linie pstruha duhového. Z hlediska hodnocení ekotoxicity je buněčná linie pstruha duhového relevantní, neboť právě ryby jsou vystavovány perfluorovaným látkám ve značné míře. Z výsledných dat vyplývá, že je jaterní buněčná linie pstruha duhového citlivější vůči expozici vybraným perfluorovaným látkám, a je tak vhodnější pro ekotoxikologické testy.

Co se testovaných látek týká, PFOS snižovala metabolickou aktivitu jaterní buněčné linie při 24hodinové expozici koncentracím 50-100 mg/l, naopak snížení viability gonadální buněčné linie nebylo v rozmezí testovaných koncentrací zaznamenáno. PFOS v subletálních koncentracích snižovala koncentrace fosfolipidových mastných kyselin, což indikuje interakci PFOS s membránou.

PFOA snižovala viabilitu obou buněčných linií při 24hodinové expozici 75-100 mg/l. 24hodinová expozice gonadální buněčné linie 0,5 mg/l PFOA zvyšovala obsah fosfolipidových mastných kyselin, což indikuje možnou buněčnou proliferaci, nebo zvýšení počtu některých organel. Naopak u expozice jaterních buněk docházelo ke statisticky významnému snížení obsahu fosfolipidových mastných kyselin vlivem PFOA.

Alternativní perfluorovaná látka GenX nesnižovala viabilitu v rozmezí testovaných koncentrací, avšak způsobila nárůst EROD aktivity jaterní buněčné linie při expozici 100 mg/l po dobu 24 hodin. GenX zároveň snižovala koncentraci fosfolipidových mastných kyselin u gonadální buněčné linie.

Druhá z testovaných alternativních perfluorovaných látek, HFPO-TA, vykazovala nejvyšší snížení viability ze všech testovaných analytů u obou buněčných linií. Rovněž způsobovala signifikantní nárůst ROS obou buněčných linií. Zároveň zvyšovala koncentrace fosfolipidových mastných kyselin jaterní buněčné linie, což může být rovněž vysvětleno zvýšením počtu organel.

Výsledky této práce naznačují, že HFPO-TA působí více toxicky, než PFOS a PFOA. Oproti tomu GenX vykazuje nižší toxicitu u těchto buněčných linií. Je nutné podotknout, že u jiných linií se může toxicita lišit. Bylo zjištěno, že všechny testované látky v subletálních koncentracích mění koncentrace fosfolipidových mastných kyselin alespoň u jedné z buněčných linií. Pro přesné

zhodnocení rizik je však nutné látky nadále zkoumat a monitorovat jejich koncentrace v životním prostředí.

7 Použitá literatura

AA Mansour, H., AH El-kady, M., H Abu Almaaty, A., & M Ramadan, A. (2018). Effect of environmental pollution on gonads histology of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* from Lake Manzala, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 22(5 (Special Issue)), 563-572.

Abudayyak, M., Öztaş, E., & Özhan, G. (2021). Determination of Perflourooctanoic Acid Toxicity in a Human Hepatocarcinoma Cell Line. *Journal of Health Pollution*, 11(31), 210909.

ACAT. (2018). ACAT Report: Exposure to perfluoroalkyl substances and associations with serum thyroid hormones in a remote population of Alaska Natives | IPEN. Ipen.org. Retrieved 21 June 2022, from <https://ipen.org/documents/acat-report-exposure-perfluoroalkyl-substances-and-associations-serum-thyroid-hormones>.

Ahrens, L., Norström, K., Viktor, T., Cousins, A. P., & Josefsson, S. (2015). Stockholm Arlanda Airport as a source of per-and polyfluoroalkyl substances to water, sediment and fish. *Chemosphere*, 129, 33-38.

Alsmeyer, Y. W., Childs, W. V., Flynn, R. M., Moore, G. G. I., & Smeltzer, J. C. (1994). Electrochemical fluorination and its applications. In *Organofluorine Chemistry* (pp. 121-143). Springer, Boston, MA.

Alwarawrah, M., Dai, J., & Huang, J. (2010). A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers. *The journal of physical chemistry B*, 114(22), 7516-7523.

Alzoghbi, M. A., & BaHammam, A. S. (2005). Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: a pilot study. *Sleep and Breathing*, 9(3), 119-126.

Amstutz, V. H., Cengo, A., Sijm, D. T. H. M., & Vrolijk, M. F. (2022). The impact of legacy and novel perfluoroalkyl substances on human cytochrome P450: An in vitro study on the inhibitory potential and underlying mechanisms. *Toxicology*, 468, 153116.

Ankley, G. T., Kuehl, D. W., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Linnum, A., Leino, R. L., & Villeneuve, D. A. (2005). Reproductive and developmental toxicity and bioconcentration of perfluorooctanesulfonate in a partial life-cycle test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(9), 2316-2324.

Appleman, T. D., Higgins, C. P., Quiñones, O., Vanderford, B. J., Kolstad, C., Zeigler-Holady, J. C., & Dickenson, E. R. (2014). Treatment of poly-and perfluoroalkyl substances in US full-scale water treatment systems. *Water research*, *51*, 246-255.

Ateia, M., Maroli, A., Tharayil, N., & Karanfil, T. (2019). The overlooked short-and ultrashort-chain poly-and perfluorinated substances: A review. *Chemosphere*, *220*, 866-882.

Aziz, K. H. H., Miessner, H., Mahyar, A., Mueller, S., Moeller, D., Mustafa, F., & Omer, K. M. (2021). Degradation of perfluorosurfactant in aqueous solution using non-thermal plasma generated by nano-second pulse corona discharge reactor. *Arabian Journal of Chemistry*, *14*(10), 103366.

Bárcenas-Moreno, G., & Bååth, E. (2009). Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures to simulate a range of fire intensities. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(12), 2517-2526.

Bassler, J., Ducatman, A., Elliott, M., Wen, S., Wahlang, B., Barnett, J., & Cave, M. C. (2019). Environmental perfluoroalkyl acid exposures are associated with liver disease characterized by apoptosis and altered serum adipocytokines. *Environmental pollution*, *247*, 1055-1063.

Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, *33*(12), S498-S501.

Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, *107*(11), 1325-1344.

Behr, A. C., Plinsch, C., Braeuning, A., & Buhrke, T. (2020). Activation of human nuclear receptors by perfluoroalkylated substances (PFAS). *Toxicology in Vitro*, *62*, 104700.

Benskin, J. P., Silva, A. O. D., & Martin, J. W. (2010). Isomer profiling of perfluorinated substances as a tool for source tracking: a review of early findings and future applications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 208*, 111-160.

Berthiaume, J., & Wallace, K. B. (2002). Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicology letters*, *129*(1-2), 23-32.

Biegel, L. B., Liu, R. C., Hurtt, M. E., & Cook, J. C. (1995). Effects of ammonium perfluorooctanoate on Leydig-cell function: in vitro, in vivo, and ex vivo studies. *Toxicology and applied pharmacology*, *134*(1), 18-25.

- Bishop-Bailey, D. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *British journal of pharmacology*, 129(5), 823-834.
- Bjork, J. A., Butenhoff, J. L., & Wallace, K. B. (2011). Multiplicity of nuclear receptor activation by PFOA and PFOS in primary human and rodent hepatocytes. *Toxicology*, 288(1-3), 8-17.
- Bjork, J. A., Dawson, D. A., Krogstad, J. O., & Wallace, K. B. (2021). Transcriptional effects of binary combinations of PFAS in FaO cells. *Toxicology*, 464, 152997.
- Bjork, J. A., Lau, C., Chang, S. C., Butenhoff, J. L., & Wallace, K. B. (2008). Perfluorooctane sulfonate-induced changes in fetal rat liver gene expression. *Toxicology*, 251(1-3), 8-20.
- Blum, A., Balan, S. A., Scheringer, M., Trier, X., Goldenman, G., Cousins, I. T., ... & Weber, R. (2015). The Madrid statement on poly-and perfluoroalkyl substances (PFASs). *Environmental health perspectives*, 123(5), A107-A111.
- Blumenstein, K., Terhonen, E., Sun, H., & Asiegbu, F. O. (2021). Methods for studying the forest tree microbiome. In *Forest Microbiology* (pp. 35-58). Academic Press.
- Borthakur, A., Leonard, J., Koutnik, V., Ravi, S., & Mohanty, S. (2022). Inhalation risks of wind-blown dust from biosolid-applied agricultural lands: Are they enriched with microplastics and PFAS?. *Current Opinion In Environmental Science & Health*, 25, 100309.
- Bossi, R., Vorkamp, K., & Skov, H. (2016). Concentrations of organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers and perfluorinated compounds in the atmosphere of North Greenland. *Environmental pollution*, 217, 4-10.
- Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Favre-Krey, L., Diez, A., Bautista, J. M., Leaver, M. J., ... & Krey, G. (2004). Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39(11), 1085-1092.
- Boutevin, B., & Pietrasanta, Y. (1989). Telomerization. *Comprehensive Polymer Science And Supplements*, 185-194. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-096701-1.00076-8>
- Braissant, Oliver, Foufelle, F., Scotto, Christian, Dauça, Michel., & Wahli, Walter. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.

- Brandl, C. J., & Deber, C. M. (1986). Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(4), 917-921.
- Campolo, J., De Maria, R., Caruso, R., Accinni, R., Turazza, F., Parolini, M., ... & Parodi, O. (2007). Blood glutathione as independent marker of lipid peroxidation in heart failure. *International journal of cardiology*, *117*(1), 45-50.
- Carmichael, R. E., & Schrader, M. (2022). Determinants of peroxisome membrane dynamics. *Frontiers in Physiology*, *92*.
- Clara, M., Scharf, S., Weiss, S., Gans, O., & Scheffknecht, C. (2008). Emissions of perfluorinated alkylated substances (PFAS) from point sources—identification of relevant branches. *Water science and technology*, *58*(1), 59-66.
- Cockcroft, S., & Raghu, P. (2018). Phospholipid transport protein function at organelle contact sites. *Current opinion in cell biology*, *53*, 52-60.
- Concawe, 2016. Environmental fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS). Report no. 8/16. June 23.
- Conley, J. M., Lambright, C. S., Evans, N., Strynar, M. J., McCord, J., McIntyre, B. S., ... & Gray Jr, L. E. (2019). Adverse maternal, fetal, and postnatal effects of hexafluoropropylene oxide dimer acid (GenX) from oral gestational exposure in Sprague-Dawley rats. *Environmental health perspectives*, *127*(3), 037008.
- Cooper, R. A. (1978). Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *Journal of supramolecular structure*, *8*(4), 413-430.
- Cordeiro, R. M. (2014). Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1838*(1), 438-444.
- Cornelius, C. E. (1980). Liver function. In *Clinical biochemistry of domestic animals* (pp. 201-257). Academic Press.
- Cornelsen, M., Weber, R., & Panglisch, S. (2021). Minimizing the environmental impact of PFAS by using specialized coagulants for the treatment of PFAS polluted waters and for the decontamination of firefighting equipment. *Emerging Contaminants*, *7*, 63-76.

Cortina, T., & Korzeniowski, S. (2008). Firefighting foams—Reebok redux. *Industrial Fire Journal*, 18-20.

Cousins, I. T., Kong, D., & Vestergren, R. (2011). Reconciling measurement and modelling studies of the sources and fate of perfluorinated carboxylates. *Environmental chemistry*, 8(4), 339-354.

Crebelli, R., Caiola, S., Conti, L., Cordelli, E., De Luca, G., Dellatte, E., ... & Villani, P. (2019). Can sustained exposure to PFAS trigger a genotoxic response? A comprehensive genotoxicity assessment in mice after subacute oral administration of PFOA and PFBA. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 106, 169-177.

Cui, L., Zhou, Q. F., Liao, C. Y., Fu, J. J., & Jiang, G. B. (2009). Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(2), 338-349.

Cui, Q., Pan, Y., Wang, J., Liu, H., Yao, B., & Dai, J. (2020). Exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in serum versus semen and their association with male reproductive hormones. *Environmental Pollution*, 266, 115330.

Cui, Q., Pan, Y., Zhang, H., Sheng, N., Wang, J., Guo, Y., & Dai, J. (2018). Occurrence and tissue distribution of novel perfluoroether carboxylic and sulfonic acids and legacy per/polyfluoroalkyl substances in black-spotted frog (*Pelophylax nigromaculatus*). *Environmental science & technology*, 52(3), 982-990.

Cui, Y., Liu, W., Xie, W., Yu, W., Wang, C., & Chen, H. (2015). Investigation of the effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) on apoptosis and cell cycle in a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell line. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15673-15682.

Dan, Y., Hao, W., & Min, J. (2018). Effects of perfluorooctane sulfonate on the liver metabolism of *Danio rerio*. *Asian Journal of Ecotoxicology*, (6), 97-106.

Danish Order on food contact materials and on provisions for penalties for breaches of related EU legislation¹ (Bekendtgørelse nr. 681 af 25. maj 2020) <https://www.foedevarestyrelsen.dk/english/SiteCollectionDocuments/Kemi%20og%20foedevarekvalitet/FCM%20order%20681%202020.pdf>

Dassuncao, C., Pickard, H., Pfohl, M., Tokranov, A. K., Li, M., Mikkelsen, B., ... & Sunderland, E. M. (2019). Phospholipid levels predict the tissue distribution of poly-and perfluoroalkyl substances in a marine mammal. *Environmental science & technology letters*, 6(3), 119-125.

Dayeh, V. R., Bols, N. C., Tanneberger, K., Schirmer, K., & Lee, L. E. (2013). The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: An update following OECD's fish toxicity testing framework no. 171. *Current protocols in toxicology*, 56(1), 1-5.

Delerive, P., Furman, C., Teissier, E., Fruchart, J. C., Duriez, P., & Staels, B. (2000). Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS letters*, 471(1), 34-38.

Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G., & Rahmani, R. (2000). Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?. *Toxicology*, 153(1-3), 73-82.

DeWitt, J. C., Shnyra, A., Badr, M. Z., Loveless, S. E., Hoban, D., Frame, S. R., ... & Luster, M. I. (2009). Immunotoxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and the role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Critical reviews in toxicology*, 39(1), 76-94.

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. Official Journal of the European Union L226/1-L226/17 [online]. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN>.

Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., ... & Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 35, 93-99.

Dong, X. S., Largay, J. A., Choi, S. D., Wang, X., Cain, C. T., & Romano, N. (2017). Fatal falls and PFAS use in the construction industry: Findings from the NIOSH FACE reports. *Accident Analysis & Prevention*, 102, 136-143.

Du, Y., Shi, X., Liu, C., Yu, K., & Zhou, B. (2009). Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life-cycle test. *Chemosphere*, 74(5), 723-729.

DuPont-24447 (4 Volumes contained in 4 separate PDF files): E.I. du Pont de Nemours and Company (2008). A 28-Day Oral (Gavage) Toxicity Study of H-28397 in Rats with a 28-Day Recovery. OECD TG 407. Study conducted by WIL Research Laboratories, LLC (Study Completion Date: August 22, 2008), Ashland, Ohio.

Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Olsen, G. W., Chang, S. C., & Butenhoff, J. L. (2007). Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals. *Environmental research*, 103(2), 176-184.

Esterbauer, H., Wäg, G., & Puhl, H. (1993). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Medical Bulletin*, 49(3), 566-576.

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 (Text with EEA relevance). (2013/39/EU).

EURATEX. (2016). Euratex.eu. Retrieved 21 June 2022, from <https://euratex.eu/wp-content/uploads/2019/05/Euratex-annual-report-2016-LR.pdf>.

Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. Annual review of plant biology, 64, 429-450.

Faust, J. (2022). PFAS on atmospheric aerosol particles: a review. *Environmental Science: Processes & Impacts*.

Fei, C., McLaughlin, J. K., Lipworth, L., & Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human reproduction*, 24(5), 1200-1205.

Feng, X., Ye, M., Li, Y., Zhou, J., Sun, B., Zhu, Y., & Zhu, L. (2020). Potential sources and sediment-pore water partitioning behaviors of emerging per/polyfluoroalkyl substances in the South Yellow Sea. *Journal of hazardous materials*, 389, 122124.

Fenton, S. E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J. C., Lau, C., Ng, C., ... & Roberts, S. M. (2021). Per- and polyfluoroalkyl substance toxicity and human health review: Current state of knowledge and strategies for informing future research. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(3), 606-630. *stress. Chemosphere*, 281, 130808.

Fitzgerald, N. J., Wargenau, A., Sorenson, C., Pedersen, J., Tufenkji, N., Novak, P. J., & Simcik, M. F. (2018). Partitioning and accumulation of perfluoroalkyl substances in model lipid bilayers and bacteria. *Environmental science & technology*, *52*(18), 10433-10440.

Forsthuber, M., Kaiser, A. M., Granitzer, S., Hassl, I., Hengstschläger, M., Stangl, H., & Gundacker, C. (2020). Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environment international*, *137*, 105324.

Fragki, S., Dirven, H., Fletcher, T., Grasl-Kraupp, B., Bjerve Gützkow, K., Hoogenboom, R., ... & Luijten, M. (2021). Systemic PFOS and PFOA exposure and disturbed lipid homeostasis in humans: what do we know and what not?. *Critical reviews in toxicology*, *51*(2), 141-164.

Franke, V., McCleaf, P., Lindegren, K., & Ahrens, L. (2019). Efficient removal of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: nanofiltration combined with active carbon or anion exchange. *Environmental Science: Water Research & Technology*, *5*(11), 1836-1843.

Franks, N. P. (1976). Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers I. X-ray diffraction. *Journal of molecular biology*, *100*(3), 345-358.

Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (2011). Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*(8), 1621-1625.

Gabrielsen, J. S., & Tanrikut, C. (2016). Chronic exposures and male fertility: the impacts of environment, diet, and drug use on spermatogenesis. *Andrology*, *4*(4), 648-661.

Gambhir, J. K., Lali, P., & Jain, A. K. (1997). Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clinical biochemistry*, *30*(4), 351-355.

Gazouli, M., Yao, Z. X., Boujrad, N., Corton, J. C., Culty, M., & Papadopoulos, V. (2002). Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor α . *Endocrinology*, *143*(7), 2571-2583.

Ge, J., Wang, C., Nie, X., Yang, J., Lu, H., Song, X., ... & Wu, Q. (2016). ROS-mediated apoptosis of HAPI microglia through p53 signaling following PFOS exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *46*, 9-16.

- Geiger, S. D., Xiao, J., Ducatman, A., Frisbee, S., Innes, K., & Shankar, A. (2014). The association between PFOA, PFOS and serum lipid levels in adolescents. *Chemosphere*, *98*, 78-83.
- Geng, D., Musse, A. A., Wigh, V., Carlsson, C., Engwall, M., Orešič, M., ... & Hyötyläinen, T. (2019). Effect of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) on the liver lipid metabolism of the developing chicken embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *170*, 691-698.
- Genius, S. J., Birkholz, D., Ralitsch, M., & Thibault, N. (2010). Human detoxification of perfluorinated compounds. *Public health*, *124*(7), 367-375.
- Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., ... & Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts*, *22*(12), 2345-2373.
- Guelfo, J. L., & Adamson, D. T. (2018). Evaluation of a national data set for insights into sources, composition, and concentrations of per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in US drinking water. *Environmental Pollution*, *236*, 505-513.
- Guengerich, F. P. (2018). Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. *ACS catalysis*, *8*(12), 10964-10976.
- Gunstone, F. D., & Harwood, J. L. (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*. CRC press.
- Guo, Q., He, Z., Liu, X., Liu, B., & Zhang, Y. (2020). High-throughput non-targeted metabolomics study of the effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the metabolic characteristics of *A. thaliana* leaves. *Science of The Total Environment*, *710*, 135542.
- Guruge, K. S., Yeung, L. W., Yamanaka, N., Miyazaki, S., Lam, P. K., Giesy, J. P., ... & Yamashita, N. (2006). Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). *Toxicological Sciences*, *89*(1), 93-107.
- Gyllenhammar, I., Berger, U., Sundström, M., McCleaf, P., Eurén, K., Eriksson, S., ... & Glynn, A. (2015). Influence of contaminated drinking water on perfluoroalkyl acid levels in human serum—A case study from Uppsala, Sweden. *Environmental research*, *140*, 673-683.
- Hamid, H., Li, L. Y., & Grace, J. R. (2018). Review of the fate and transformation of per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in landfills. *Environmental Pollution*, *235*, 74-84.

Hammond, M. E., Goodwin, J., Dvorak, H. F. Quantitative measurements of neutral red uptake and excretion by mammalian cells. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 27, 337-346, 1980.

Han, Z., Liu, Y., Wu, D., Zhu, Z., & Lü, C. (2012). Immunotoxicity and hepatotoxicity of PFOS and PFOA in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Geochemistry*, 31(4), 424-430.

Han, Z., Liu, Y., Wu, D., Zhu, Z., & Lü, C. (2012). Immunotoxicity and hepatotoxicity of PFOS and PFOA in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal Of Geochemistry*, 31(4), 424-430.

Hepburn, E., Madden, C., Szabo, D., Coggan, T. L., Clarke, B., & Currell, M. (2019). Contamination of groundwater with per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) from legacy landfills in an urban re-development precinct. *Environmental Pollution*, 248, 101-113.

Heydebreck, F., Tang, J., Xie, Z., & Ebinghaus, R. (2015). Alternative and legacy perfluoroalkyl substances: differences between European and Chinese river/estuary systems. *Environmental science & technology*, 49(14), 8386-8395.

Hill, P. J., Taylor, M., Goswami, P., & Blackburn, R. S. (2017). Substitution of PFAS chemistry in outdoor apparel and the impact on repellency performance. *Chemosphere*, 181, 500-507.

Houten, S. M., Denis, S., Argmann, C. A., Jia, Y., Ferdinandusse, S., Reddy, J. K., & Wanders, R. J. (2012). Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. *Journal of lipid research*, 53(7), 1296-1303.

Hu, W., Sorrentino, C., Denison, M., Kolaja, K., & Fielden, M. (2007). Induction of Cyp1a1 Is a Nonspecific Biomarker of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation: Results of Large Scale Screening of Pharmaceuticals and Toxicants in Vivo and in Vitro. *Molecular Pharmacology*, 71(6), 1475-1486.

Burczynski, M., & Penning, T. (2000). Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Research*, 60(4).

Huang, S., & Jaffé, P. (2019). Defluorination of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) by *Acidimicrobium* sp. Strain A6. *Environmental Science & Technology*, 53(19), 11410-11419.

Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn.

Chappell, G. A., Thompson, C. M., Wolf, J. C., Cullen, J. M., Klaunig, J. E., & Haws, L. C. (2020). Assessment of the mode of action underlying the effects of GenX in mouse liver and implications for assessing human health risks. *Toxicologic pathology*, 48(3), 494-508.

Chen, X., Snyder, C. L., Truksa, M., Shah, S., & Weselake, R. J. (2011). sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1695-1699.

Ibrahim, W. N. W., Tofighi, R., Onishchenko, N., Rebellato, P., Bose, R., Uhlén, P., & Ceccatelli, S. (2013). Perfluorooctane sulfonate induces neuronal and oligodendrocytic differentiation in neural stem cells and alters the expression of PPAR γ in vitro and in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*, 269(1), 51-60.

Ignat'ev, N. V. (2017). Electrochemical Fluorination: A Powerful Tool for the Preparation of Organofluorine Compounds. In *Modern Synthesis Processes and Reactivity of Fluorinated Compounds* (pp. 71-123). Elsevier.

Ikeda, T., Aiba, ., Fukuda, K. Tanaka, M. (1985). The induction of peroxisome proliferation in rat liver by perfluorinated fatty acids, metabolically inert derivatives of fatty acids. *The Journal of Biochemistry*, 98(2), 475-482.

Interstate Technology and Regulatory Council (ITRC), 2017. Retrieved 20 August 2022, from <https://pfas-1.itrcweb.org/fact-sheets/>.

Issemann, I., & Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645-650.

Jabeen, M., Fayyaz, M., & Irudayaraj, J. (2020). Epigenetic modifications, and alterations in cell cycle and apoptosis pathway in A549 lung carcinoma cell line upon exposure to perfluoroalkyl substances. *Toxics*, 8(4), 112.

Jiang, X., & Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 73.

Kang, H. S., Chung, H. Y., Kim, J. Y., Son, B. W., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2004). Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Cladonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Archives of pharmacal research*, 27(2), 194-198.

Karam and Jose A. (2009) Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Springer, Netherlands.

Kawashima, Y., Uy-Yu, N., & Kozuka, H. (1989). Sex-related difference in the inductions by perfluoro-octanoic acid of peroxisomal β -oxidation, microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase and cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver. *Biochemical Journal*, 261(2), 595-600.

Kemi, S. C. A. (2015). Occurrence and use of highly fluorinated substances and alternatives. *Swedish Chemicals Agency Stockholm, Sweden*.

Kennedy, S. W., Jones, S. P. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Analytical biochemistry*, 222(1), 217-223, 1994

Kim, S. K., Khim, J. S., Lee, K. T., Giesy, J. P., Kannan, K., Lee, D. S., & Koh, C. H. (2007). Emission, contamination and exposure, fate and transport, and national management strategy of persistent organic pollutants in South Korea. *Developments in environmental science*, 7, 31-157.

Kim, Y. R., White, N., Bräunig, J., Vijayasathy, S., Mueller, J. F., Knox, C. L., ... & Toms, L. M. L. (2020). Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) in follicular fluid from women experiencing infertility in Australia. *Environmental Research*, 190, 109963.

Kiplinger, J. L., Richmond, T. G., & Osterberg, C. E. (1994). Activation of carbon-fluorine bonds by metal complexes. *Chemical Reviews*, 94(2), 373-431.

Kluck, R., Bossy-Wetzell, E., Green, D., & Newmeyer, D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, 275(5303), 1132-1136.

Liu, C., Gin, K., & Chang, V. (2013). Multi-biomarker responses in green mussels exposed to PFCs: effects at molecular, cellular, and physiological levels. *Environmental Science And Pollution Research*,

Knox, S. S., Jackson, T., Javins, B., Frisbee, S. J., Shankar, A., & Ducatman, A. M. (2011). Implications of early menopause in women exposed to perfluorocarbons. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(6), 1747-1753.

Kobayashi, S., Sata, F., Goudarzi, H., Araki, A., Miyashita, C., Sasaki, S., ... & Kishi, R. (2021). Associations among perfluorooctanesulfonic/perfluorooctanoic acid levels, nuclear receptor gene polymorphisms, and lipid levels in pregnant women in the Hokkaido study. *Scientific reports*, *11*(1), 1-11.

Koolman, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. vydání. Praha : Grada, 2012. 512 s. [ISBN 978-80-247-2977-0](#).

Kotlarz, N., McCord, J., Collier, D., Lea, C. S., Strynar, M., Lindstrom, A. B., ... & Hoppin, J. A. (2020). Measurement of novel, drinking water-associated PFAS in blood from adults and children in Wilmington, North Carolina. *Environmental health perspectives*, *128*(7), 077005.

Krøvel, A. V., Sjøfteland, L., Torstensen, B., & Olsvik, P. A. (2008). Transcriptional effects of PFOS in isolated hepatocytes from Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *148*(1), 14-22.

Kudo, N., Mizuguchi, H., Yamamoto, A., & Kawashima, Y. (1999). Alterations by perfluorooctanoic acid of glycerolipid metabolism in rat liver. *Chemico-biological interactions*, *118*(1), 69-83.

Kudo, N., Suzuki-Nakajima, E., Mitsumoto, A., & Kawashima, Y. (2006). Responses of the liver to perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in male and female mice: in relation to induction of hepatomegaly, peroxisomal β -oxidation and microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(9), 1952-1957.

Kucharzyk, K. H., Darlington, R., Benotti, M., Deeb, R., & Hawley, E. (2017). Novel treatment technologies for PFAS compounds: A critical review. *Journal of environmental management*, *204*, 757-764.

Kuo, P., Weinfeld, M., Rudd, M. A., Amarante, P., & Loscalzo, J. (1990). Plasma membrane enrichment with cis-unsaturated fatty acids enhances LDL metabolism in U937 monocytes. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, *10*(1), 111-118.

Lallas, P. L. (2001). The Stockholm Convention on persistent organic pollutants. *American Journal of International Law*, 95(3), 692-708.

Lang, J. R., Allred, B. M., Field, J. A., Levis, J. W., & Barlaz, M. A. (2017). National estimate of per-and polyfluoroalkyl substance (PFAS) release to US municipal landfill leachate. *Environmental science & technology*, 51(4), 2197-2205.

Lee, J. W., Lee, J. W., Kim, K., Shin, Y. J., Kim, J., Kim, S., ... & Park, K. (2017). PFOA-induced metabolism disturbance and multi-generational reproductive toxicity in *Oryzias latipes*. *Journal of hazardous materials*, 340, 231-240.

Lewe, N., Hermans, S., Lear, G., Kelly, L. T., Thomson-Laing, G., Weisbrod, B., ... & Deslippe, J. R. (2021). Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis as a tool to estimate absolute abundances from compositional 16S rRNA bacterial metabarcoding data. *Journal of Microbiological Methods*, 188, 106271.

Li, C. H., Ren, X. M., & Guo, L. H. (2019). Adipogenic activity of oligomeric hexafluoropropylene oxide (perfluorooctanoic acid alternative) through peroxisome proliferator-activated receptor γ pathway. *Environmental science & technology*, 53(6), 3287-3295.

Li, X., Wang, D., Yang, C., Zhou, Q., Zhuoga, S. L., Wang, L. Q., ... & Xu, J. C. (2018). Establishment of age-and gender-specific pediatric reference intervals for liver function tests in healthy Han children. *World Journal of Pediatrics*, 14(2), 151-159.

Liang, S., Liang, G., Zhang, Y., Zhang, X., & Zhong, L. (2022). Profiling biotoxicities of hexafluoropropylene oxide trimer acid with human embryonic stem cell-based assays. *Journal of Environmental Sciences*, 116, 34-42.

Ligasová, A., & Koberna, K. (2021). DNA Dyes—Highly Sensitive Reporters of Cell Quantification: Comparison with Other Cell Quantification Methods. *Molecules*, 26(18), 5515.

Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., & Libelo, E. L. (2011). Polyfluorinated compounds: past, present, and future. *Environmental science & technology*, 45(19), 7954-7961.

Liu, B., Jia, K., Yang, Y., Hao, S., Lu, C., & Xu, F. et al. (2017). Diosmetin Induces Cell Apoptosis by Regulating CYP1A1/CYP1A2 Due to p53 Activation in HepG2 Cells. *Protein & Peptide Letters*, 24(5).

Liu, C., Gin, K. Y., & Chang, V. W. (2014). Multi-biomarker responses in green mussels exposed to PFCs: effects at molecular, cellular, and physiological levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2785-2794.

Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P. K., Wu, R. S., & Zhou, B. (2007). Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic toxicology*, 82(2), 135-143.

Liu, G., Zhang, S., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D. (2016). Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to *Escherichia coli*: Membrane disruption, oxidative stress, and DNA damage induced cell inactivation and/or death. *Environmental pollution*, 214, 806-815.

Liu, J. J., Cui, X. X., Tan, Y. W., Dong, P. X., Ou, Y. Q., Li, Q. Q., ... & Zhao, X. M. (2022). Per- and perfluoroalkyl substances alternatives, mixtures and liver function in adults: A community-based population study in China. *Environment International*, 163, 107179.

Liu, S., Lai, H., Wang, Q., Martínez, R., Zhang, M., Liu, Y., ... & Tu, W. (2021). Immunotoxicity of F53B, an alternative to PFOS, on zebrafish (*Danio rerio*) at different early life stages. *Science of The Total Environment*, 790, 148165.

Liu, X., Li, Y., Zheng, X., Zhang, L., Lyu, H., Huang, H., & Fan, Z. (2021). Anti-oxidant mechanisms of *Chlorella pyrenoidosa* under acute GenX exposure. *Science of the Total Environment*, 797, 149005.

López-Arellano, P., López-Arellano, K., Luna, J., Flores, D., Jiménez-Salazar, J., Gavia, G., ... & Bonilla, E. (2019). Perfluorooctanoic acid disrupts gap junction intercellular communication and induces reactive oxygen species formation and apoptosis in mouse ovaries. *Environmental toxicology*, 34(1), 92-98.

Louisse, J., Rijkers, D., Stoop, G., Janssen, A., Staats, M., Hoogenboom, R., ... & Peijnenburg, A. (2020). Perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), and perfluorononanoic acid (PFNA) increase triglyceride levels and decrease cholesterologenic gene expression in human HepaRG liver cells. *Archives of toxicology*, 94(9), 3137-3155.

Loveless, S. E., Finlay, C., Everds, N. E., Frame, S. R., Gillies, P. J., O'Connor, J. C., ... & Kennedy, G. L. (2006). Comparative responses of rats and mice exposed to linear/branched, linear, or branched ammonium perfluorooctanoate (APFO). *Toxicology*, 220(2-3), 203-217.

Luebker, D. J., Hansen, K. J., Bass, N. M., Butenhoff, J. L., & Seacat, A. M. (2002). Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology*, *176*(3), 175-185.

Luebker, D. J., Hansen, K. J., Bass, N. M., Butenhoff, J. L., & Seacat, A. M. (2002). Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology*, *176*(3), 175-185.

Lv, D., Gu, Y., Guo, M., Hou, P., Li, Y., & Wu, R. (2019). Perfluorooctanoic acid exposure induces apoptosis in SMMC-7721 hepatocellular cancer cells. *Environmental Pollution*, *247*, 509-514.

Lv, G., Wang, L., Liu, S., & Li, S. (2009). Determination of perfluorinated compounds in packaging materials and textiles using pressurized liquid extraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Sciences*, *25*(3), 425-429.

Plunkett, R. J. (1986). The history of polytetrafluoroethylene: discovery and development. *high performance polymers: their origin and development*, 261-266.

Lynch, T., & Neff, A. P. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American family physician*, *76*(3), 391-396.

Mahapatra, C. T., Damayanti, N. P., Guffey, S. C., Serafin, J. S., Irudayaraj, J., & Sepúlveda, M. S. (2017). Comparative in vitro toxicity assessment of perfluorinated carboxylic acids. *Journal of Applied Toxicology*, *37*(6), 699-708.

Martin, M. T., Brennan, R. J., Hu, W., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H., ... & Dix, D. J. (2007). Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on mechanisms of toxicity. *Toxicological Sciences*, *97*(2), 595-613.

Massarsky, A., Parker, J. A., Donnell, M. T., Fung, E. S., & Unice, K. M. (2022). Critical evaluation of ToxCast-Reactome predicted toxicity pathway correspondence of the human liver HepG2 activity profile with observed PFOA and PFOS hazards. *Computational Toxicology*, *21*, 100212.

Mastrantonio, M., Bai, E., Uccelli, R., Cordiano, V., Screpanti, A., & Crosignani, P. (2018). Drinking water contamination from perfluoroalkyl substances (PFAS): an ecological mortality study in the Veneto Region, Italy. *The European Journal of Public Health*, *28*(1), 180-185.

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, *7*(1), 1-7.

Megli, F. M., & Sabatini, K. (2003). Respiration state IV-generated ROS destroy the mitochondrial bilayer packing order in vitro. An EPR study. *FEBS letters*, *550*(1-3), 185-189.

Milley, S. A., Koch, I., Fortin, P., Archer, J., Reynolds, D., & Weber, K. P. (2018). Estimating the number of airports potentially contaminated with perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances from aqueous film forming foam: A Canadian example. *Journal of environmental management*, 222, 122-131.

Minnesota Department of Health: "News release: Health department issues new guidance values for two perfluoroalkyl substances (PFAS)." Retrieved 17 January 2022, from <https://www.health.state.mn.us/news/pressrel/2019/water040319.html>. (MDH, 2019)

Mishra, M., & Yagci, Y. (2016). *Handbook of vinyl polymers: radical polymerization, process, and technology*. CRC press.

Sajid, M., & Ilyas, M. (2017). PTFE-coated non-stick cookware and toxicity concerns: a perspective. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(30), 23436-23440.

Morgan, M. J., Kim, Y. S., & Liu, Z. G. (2008). TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research*, 18(3), 343-349.

Mortensen, A., Letcher, R., Cangialosi, M., Chu, S., & Arukwe, A. (2011). Tissue bioaccumulation patterns, xenobiotic biotransformation and steroid hormone levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a diet containing perfluoroactane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Chemosphere*, 83(8),

Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295-309.

Nakajima, M., & Yokoi, T. (2014). MicroRNA: Regulation of P450 and Pharmacogenetics. *Handbook Of Pharmacogenomics And Stratified Medicine*, 385-401.

Nakamura, T., Fujii, T., & Ichihara, A. (1985). Enzyme leakage due to change of membrane permeability of primary cultured rat hepatocytes treated with various hepatotoxins and its prevention by glycyrrhizin. *Cell biology and toxicology*, 1(4), 285-295.

Narimatsu, S., Nakanishi, R., Hanioka, N., Saito, K., & Kataoka, H. (2011). Characterization of inhibitory effects of perfluorooctane sulfonate on human hepatic cytochrome P450 isoenzymes: focusing on CYP2A6. *Chemico-biological interactions*, 194(2-3), 120-126.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 74483, Perfluorooctanesulfonic acid. Retrieved June 14, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanesulfonic-acid>.

Nepelska, M., Munn, S., & Landesmann, B. (2015). OECD AOP18-PPAR α activation in utero leading to impaired fertility in males.

Nepis.epa.gov. 2011. *Document Display (PURL) | NSCEP | US EPA*. [online] Available at: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100B8AA.TXT>> [Accessed 23 July 2022].

Nordén, M., Westman, O., Venizelos, N., & Engwall, M. (2012). Perfluorooctane sulfonate increases β -oxidation of palmitic acid in chicken liver. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1859-1863.

Nouhi, S., Ahrens, L., Pereira, H. C., Hughes, A. V., Campana, M., Gutfreund, P., ... & Hellsing, M. S. (2018). Interactions of perfluoroalkyl substances with a phospholipid bilayer studied by neutron reflectometry. *Journal of colloid and interface science*, 511, 474-481.

Nunez-Rocha, T., & Martínez-Zarzoso, I. (2019). Are international environmental policies effective? The case of the Rotterdam and the Stockholm Conventions. *Economic Modelling*, 81, 480-502.

Nussey, S. S., & Whitehead, S. A. (2001). *Endocrinology: an integrated approach*.

Nzeribe, B. N., Crimi, M., Mededovic Thagard, S., & Holsen, T. M. (2019). Physico-chemical processes for the treatment of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(10), 866-915.

Oakes, K. D., Sibley, P. K., Martin, J. W., Maclean, D. D., Solomon, K. R., Mabury, S. A., & Van Der Kraak, G. J. (2005). Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: Acute effects on fatty acyl-CoA oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(5), 1172-1181.

Oberley, L. W., & Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer research*, 39(4), 1141-1149.

OECD (2002). Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, ENV/JM/RD(2002)17/FINAL

O'Flaherty, J. T., Rogers, L. C., Paumi, C. M., Hantgan, R. R., Thomas, L. R., Clay, C. E., ... & Morrow, C. S. (2005). 5-Oxo-ETE analogs and the proliferation of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1736(3), 228-236.

Ojo, A. F., Xia, Q., Peng, C., & Ng, J. C. (2021). Evaluation of the individual and combined toxicity of perfluoroalkyl substances to human liver cells using biomarkers of oxidative

Olsen, G. W., Burris, J. M., Burlew, M. M., & Mandel, J. H. (2003). Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *Journal of occupational and environmental medicine*, 260-270.

Onyshko, J. (2018). Studie der Anthesis Consulting Group: „Toxics in Carpets in the European Union.

P. Whitehouse, Measures for protecting water quality: current approaches and future developments, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50 (2) (2001) 115e126

Pan, X., Qin, P., Liu, R., Yu, W., & Dong, X. (2018). Effects of carbon chain length on the perfluoroalkyl acids-induced oxidative stress of erythrocytes in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(25), 6414-6420.

Pan, Y., Cui, Q., Wang, J., Sheng, N., Jing, J., Yao, B., & Dai, J. (2019). Profiles of emerging and legacy per-/polyfluoroalkyl substances in matched serum and semen samples: new implications for human semen quality. *Environmental health perspectives*, 127(12), 127005.

Pan, Y., Zhang, H., Cui, Q., Sheng, N., Yeung, L. W., Sun, Y., ... & Dai, J. (2018). Worldwide distribution of novel perfluoroether carboxylic and sulfonic acids in surface water. *Environmental science & technology*, 52(14), 7621-7629.

Paneth, H. (2020). Langmuir trough studies of the interactions between per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and a model cell membrane.

Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 90, 13-29.

Payne, J. F., & Penrose, W. R. (1975). Induction of aryl hydrocarbon (benzo (a) pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.:(United States)*, 14(1).

Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416-431.

Perkins, R., & Vaida, V. (2017). Phenylalanine increases membrane permeability. *Journal of the American Chemical Society*, 139(41), 14388-14391.

Petersen, K. U., Larsen, J. R., Deen, L., Flachs, E. M., Hærvig, K. K., Hull, S. D., ... & Tøttenborg, S. S. (2020). Per- and polyfluoroalkyl substances and male reproductive health: a systematic review of the epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 23(6), 276-291.

Petersen, M. S., Halling, J., Jørgensen, N., Nielsen, F., Grandjean, P., Jensen, T. K., & Weihe, P. (2018). Reproductive function in a population of young Faroese men with elevated exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and perfluorinated alkylate substances (PFAS). *International journal of environmental research and public health*, 15(9), 1880.

Petrulis, J., & Bunce, N. (1999). Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds. *Toxicology Letters*, 105(3), 251-260.

Petrulis, J., Chen, G., Benn, S., LaMarre, J. and Bunce, N., 2001. Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environmental Toxicology*, 16(2), pp.177-184.

Pierozan, P., Jerneren, F., & Karlsson, O. (2018). Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure promotes proliferation, migration and invasion potential in human breast epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 92(5), 1729-1739.

Plochberger, B., Röhl, C., Preiner, J., Rankl, C., Brameshuber, M., Madl, J., ... & Schütz, G. J. (2017). HDL particles incorporate into lipid bilayers—a combined AFM and single molecule fluorescence microscopy study. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Plumb, J. A., & Wolf, K. (1971). Fish cell growth rates. *In vitro*, 7(1), 42-45.

Podder, A., Sadmani, A. A., Reinhart, D., Chang, N. B., & Goel, R. (2021). Per and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) as a contaminant of emerging concern in surface water: A transboundary review of their occurrences and toxicity effects. *Journal of hazardous materials*, 419, 126361.

Poulsen, P. B., Jensen, A. A., Wallström, E., & Aps, E. N. P. R. O. (2005). More environmentally friendly alternatives to PFOS-compounds and PFOA. *Environmental Project*, 1013, 2005.

Purdue, M. (2020). *An Investigation of Serum Levels of Per-and Polyfluoroalkyl Substances and Testicular Cancer Risk Within the Department of Defense Serum Repository*. National Cancer Institute Rockville United States.

Qiu, L., Wang, H., Dong, T., Huang, J., Li, T., Ren, H., ... & Wang, S. (2021). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts testosterone biosynthesis via CREB/CRTC2/StAR signaling pathway in Leydig cells. *Toxicology*, *449*, 152663.

Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., & Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *Journal of hazardous materials*, *239*, 1-18.

Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, *24*(5), 981-990.

Rehman, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj*, *322*(7301), 1536-1538.

Rietveld, A. G., Koorengel, M. C., & De Kruijff, B. (1995). Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, *14*(22), 5506-5513.

Rigét, F., Bossi, R., Sonne, C., Vorkamp, K., & Dietz, R. (2013). Trends of perfluorochemicals in Greenland ringed seals and polar bears: indications of shifts to decreasing trends. *Chemosphere*, *93*(8), 1607-1614.

Rodríguez, M., & Potter, D. (2013). CYP1A1 Regulates Breast Cancer Proliferation and Survival. *Molecular Cancer Research*, *11*(7), 780-792.

Rodríguez-Jorquera, I. A., Colli-Dula, R. C., Kroll, K., Jayasinghe, B. S., Parachu Marco, M. V., Silva-Sanchez, C., ... & Denslow, N. D. (2018). Blood transcriptomics analysis of fish exposed to perfluoroalkyls substances: assessment of a non-lethal sampling technique for advancing aquatic toxicology research. *Environmental science & technology*, *53*(3), 1441-1452.

Rodríguez-Varela, M., Durán-Álvarez, J. C., Jiménez-Cisneros, B., Zamora, O., & Prado, B. (2021). Occurrence of perfluorinated carboxylic acids in Mexico City's wastewater: A monitoring study in the sewerage and a mega wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, *774*, 145060.

Rosen, M. B., Thibodeaux, J. R., Wood, C. R., Zehr, R. D., Schmid, J. E., & Lau, C. (2007). Gene expression profiling in the lung and liver of PFOA-exposed mouse fetuses. *Toxicology*, *239*(1-2), 15-33.

Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *19*(3), 184-197.

Ruan, T., & Jiang, G. (2017). Analytical methodology for identification of novel per-and polyfluoroalkyl substances in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *95*, 122-131.

Sáez, M., de Voogt, P., & Parsons, J. R. (2008). Persistence of perfluoroalkylated substances in closed bottle tests with municipal sewage sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, *15*(6), 472-477.

sdělení č. 40/2006 Sb. m. s., Ministerstva zahraničních věcí o sjednání Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech - znění od 18. 12. 2018.

sdělení č. 90/2010 Sb. m. s., Ministerstva zahraničních věcí o přijetí Českou republikou změn příloh A, B a C Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech - znění od 26. 8. 2010.

Seacat, A. M., Thomford, P. J., Hansen, K. J., Clemen, L. A., Eldridge, S. R., Elcombe, C. R., & Butenhoff, J. L. (2003). Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology*, *183*(1-3), 117-131.

Seow, J. (2013). *Fire fighting foams with perfluorochemicals-environmental review*. Hemming Information Services.

Sepulvado, J. G., Blaine, A. C., Hundal, L. S., & Higgins, C. P. (2011). Occurrence and fate of perfluorochemicals in soil following the land application of municipal biosolids. *Environmental science & technology*, *45*(19), 8106-8112.

Shabalina, I. G., Kalinovich, A. V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2016). Metabolically inert perfluorinated fatty acids directly activate uncoupling protein 1 in brown-fat mitochondria. *Archives of toxicology*, *90*(5), 1117-1128.

Shan, G., Ye, M., Zhu, B., & Zhu, L. (2013). Enhanced cytotoxicity of pentachlorophenol by perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid in HepG2 cells. *Chemosphere*, *93*(9), 2101-2107.

- Shen, Z., Ge, J., Ye, H., Tang, S., & Li, Y. (2020). Cholesterol-like condensing effect of perfluoroalkyl substances on a phospholipid bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(26), 5415-5425.
- Sheng, N., Cui, R., Wang, J., Guo, Y., Wang, J., & Dai, J. (2018). Cytotoxicity of novel fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl substances to human liver cell line and their binding capacity to human liver fatty acid binding protein. *Archives of toxicology*, 92(1), 359-369.
- Sheng, N., Pan, Y., Guo, Y., Sun, Y., & Dai, J. (2018). Hepatotoxic effects of hexafluoropropylene oxide trimer acid (HFPO-TA), a novel perfluorooctanoic acid (PFOA) alternative, on mice. *Environmental science & technology*, 52(14), 8005-8015.
- Shimizu, M., Mott, R., Potter, A., Zhou, J., Baumann, K., & Surratt, J. et al. (2021). Atmospheric Deposition and Annual Flux of Legacy Perfluoroalkyl Substances and Replacement Perfluoroalkyl Ether Carboxylic Acids in Wilmington, NC, USA. *Environmental Science & Technology Letters*, 8(5), 366-372.
- Shittu, A. (2021). Toxicity Studies of Per-And Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). Bowling Green State University.
- Shuttleworth, K. L., & Cerniglia, E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 54(1), 291-302.
- Schaider, L. A., Balan, S. A., Blum, A., Andrews, D. Q., Strynar, M. J., Dickinson, M. E., ... & Peaslee, G. F. (2017). Fluorinated compounds in US fast food packaging. *Environmental science & technology letters*, 4(3), 105-111.
- Scher, D. P., Kelly, J. E., Huset, C. A., Barry, K. M., Hoffbeck, R. W., Yingling, V. L., & Messing, R. B. (2018). Occurrence of perfluoroalkyl substances (PFAS) in garden produce at homes with a history of PFAS-contaminated drinking water. *Chemosphere*, 196, 548-555.
- Schirmer, K., Chan, A. G. J., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., & Bols, N. C. (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in vitro*, 11(1-2), 107-119.
- Schlummer, M., Sölch, C., Meisel, T., Still, M., Gruber, L., & Wolz, G. (2015). Emission of perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) from heated surfaces made of polytetrafluoroethylene (PTFE) applied in food contact materials and consumer products. *Chemosphere*, 129, 46-53.

Schoonjans, K., Staels, B., & Auwerx, J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(2), 93-109.

Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P., & Schirmer, K. (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical biochemistry*, 344(1), 76-85.

Schulz, H. (2002). Oxidation of fatty acids in eukaryotes. In *New comprehensive biochemistry* (Vol. 36, pp. 127-150). Elsevier.

Simons, J. H., & Block, L. P. (1939). The Reaction of Fluorine with Carbon. *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 2962-66.

Singh, T. S., Lee, S., Kim, H. H., Choi, J. K., & Kim, S. H. (2012). Perfluorooctanoic acid induces mast cell-mediated allergic inflammation by the release of histamine and inflammatory mediators. *Toxicology letters*, 210(1), 64-70.

Skommer, J., Brittain, T., & Raychaudhuri, S. (2010). Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. *Apoptosis*, 15(10), 1223-1233.

Směrnice Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 98/2008 ze dne 19. listopadu 2008 o odpadech a o zrušení některých směrnic (Text s významem pro EHP)

Směrnice Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 98/2008 ze dne 19. listopadu 2008 o odpadech a o zrušení některých směrnic (Text s významem pro EHP)

Směrnice Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 98/2008 ze dne 19. listopadu 2008 o odpadech a o zrušení některých směrnic (Text s významem pro EHP)

Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřacované znění) (Text s významem pro EHP)

Sohlenius, A. K., Lundgren, B., & DePierre, J. W. (1992). Perfluorooctanoic acid has persistent effects on peroxisome proliferation and related parameters in mouse liver. *Journal of biochemical toxicology*, 7(4), 205-212.

- Spinella, R., Sawhney, R., & Jalan, R. (2016). Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatology international*, *10*(1), 124-132.
- Srivastava, L. (2002). Seed Food Reserves and Their Accumulation. *Plant Growth And Development*, 503-520.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free radical research*, *40*(12), 1250-1258.
- Stanifer, J. W., Stapleton, H. M., Souma, T., Wittmer, A., Zhao, X., & Boulware, L. E. (2018). Perfluorinated chemicals as emerging environmental threats to kidney health: a scoping review. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *13*(10), 1479-1492.
- Steenland, K., Fletcher, T., Stein, C. R., Bartell, S. M., Darrow, L., Lopez-Espinosa, M. J., ... & Savitz, D. A. (2020). Evolution of evidence on PFOA and health following the assessments of the C8 Science Panel. *Environment International*, *145*, 106125.
- Steenland, K., Tinker, S., Frisbee, S., Ducatman, A., & Vaccarino, V. (2009). Association of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate with serum lipids among adults living near a chemical plant. *American journal of epidemiology*, *170*(10), 1268-1278.
- Stevenson, E. D., Kleinman, M. T., Bai, X., Barlaz, M., Abraczinskas, M., Guidry, V., ... & Chow, J. (2021). Critical review on PFOA, kidney cancer, and testicular cancer. *Journal of the Air & Waste Management Association*, *71*(10), 1265-1276.
- Stockenhuber, S., Weber, N., Dixon, L., Lucas, J., Grimison, C., Bennett, M., ... & Kennedy, E. (2019). Thermal degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA). *16th International Conferenc on Environmental Science and Technololgy Rhodes, Greece*.
- Stoiber, T., Evans, S., & Naidenko, O. (2020). Disposal of products and materials containing per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A cyclical problem. *Chemosphere*, *260*, 127659.
- Stratakis, N., V. Conti, D., Jin, R., Margetaki, K., Valvi, D., Siskos, A. P., ... & Chatzi, L. (2020). Prenatal exposure to perfluoroalkyl substances associated with increased susceptibility to liver injury in children. *Hepatology*, *72*(5), 1758-1770.
- Sturman, P. J., Stewart, P. S., Cunningham, A. B., Bouwer, E. J., & Wolfram, J. H. (1995). Engineering scale-up of in situ bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology*, *19*(3), 171-203.

- Suja, F., Pramanik, B. K., & Zain, S. M. (2009). Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: a review paper. *Water Science and Technology*, 60(6), 1533-1544.
- Sun, S., Wang, J., Yao, J., Guo, H., & Dai, J. (2022). Transcriptome analysis of 3D primary mouse liver spheroids shows that long-term exposure to hexafluoropropylene oxide trimer acid disrupts hepatic bile acid metabolism. *Science of The Total Environment*, 812, 151509.
- Surma, M., Hliwa, P., Sznajder-Katarzyńska, K., Wiczkowski, W., Topolska, J., & Zieliński, H. (2021). Perfluoroalkyl Substance Contamination Levels of Pike (*Esox lucius* L.) and Roach (*Rutilus rutilus* L.) from Selected Masurian Lakes in Eastern Europe. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(12), 3317-3327.
- Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N., & Kołek, T. (2012). Biotransformations utilizing β -oxidation cycle reactions in the synthesis of natural compounds and medicines. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16514-16543.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. *EMBO reports*, 3(7), 604-609.
- Tan, N. S., Michalik, L., Desvergne, B., & Wahli, W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 93(2-5), 99-105.
- Tan, N. S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., ... & Noy, N. (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and cellular biology*, 22(14), 5114-5127.
- Tarapore, P., & Ouyang, B. (2021). Perfluoroalkyl chemicals and male reproductive health: do PFOA and PFOS increase risk for male infertility?. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(7), 3794.
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147-R1151.
- Trier, X., Taxvig, C., Rosenmai, A. K., & Pedersen, G. A. (2018). *PFAS in paper and board for food contact: Options for risk management of poly-and perfluorinated substances*. Nordic Council of Ministers.

Trudel, D., Horowitz, L., Wormuth, M., Scheringer, M., Cousins, I. T., & Hungerbühler, K. (2008). Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Analysis: An International Journal*, 28(2), 251-269.

Tsuda, S. (2016). Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). *The Journal of toxicological sciences*, 41(Special), SP27-SP36.

U.S. Environmental Protection Agency: "FACT SHEET PFOA & PFOS Drinking Water HealthAdvisories" EPA 800-F-16-003 (EPA, 2016)

Uttlová, P., Pinkas, D., Bechyňková, O., Fišer, R., Svobodová, J., & Seydlová, G. (2016). Bacillus subtilis alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(12), 2965-2971.

Vladimir Beškoski, Takeshi Nakano, Chisato Matsumura, Katsuya Yamamoto, Atsushi Yamamoto, Mamoru Motegi, Hideo Okamura, Hideyuki Inui, Interaction of PFOS, PFOA and 8:2 FTOH with Human, Rat, and Microbial Cytochrome P450s: Similarities and Differences; International Conference on Asian Environmental Chemistry (ICAEC), Book of Abstracts and Programme, p. 309, Bangkok, Thailand, November 24 - 26, 2014, (ISSN 2189-0137)

Vyas, S. M., Kania-Korwel, I., & Lehmler, H. J. (2007). Differences in the isomer composition of perfluorooctanesulfonyl (PFOS) derivatives. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(3), 249-255.

W, E. Hanford and R. M. Joyce, U. S. Patent 2,440,800 (May 4, 1948); W. E. Hanford, U. S. Patent 2,418,832 (April 15, 1957); U. S. Patent 2,373,561 (April 10, 1945).

Wakil, S. J. (1961). Mechanism of fatty acid synthesis. *Journal of Lipid Research*, 2(1), 1-24.

Wang, J., Wang, X., Sheng, N., Zhou, X., Cui, R., Zhang, H., & Dai, J. (2017). RNA-sequencing analysis reveals the hepatotoxic mechanism of perfluoroalkyl alternatives, HFPO2 and HFPO4, following exposure in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 37(4), 436-444.

Wang, J., Yan, S., Zhang, W., Zhang, H., & Dai, J. (2015). Integrated proteomic and miRNA transcriptional analysis reveals the hepatotoxicity mechanism of PFNA exposure in mice. *Journal of proteome research*, 14(1), 330-341.

Wang, T., Wang, Y., Liao, C., Cai, Y., & Jiang, G. (2009). Perspectives on the inclusion of perfluorooctane sulfonate into the Stockholm convention on persistent organic pollutants.

Wang, Z., Cousins, I. T., Scheringer, M., Buck, R. C., & Hungerbühler, K. (2014). Global emission inventories for C4–C14 perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, part II: The remaining pieces of the puzzle. *Environment international*, *69*, 166-176.

Watanabe, M. X., Jones, S. P., Iwata, H., Kim, E. Y., & Kennedy, S. W. (2009). Effects of co-exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid on expression of cytochrome P450 isoforms in chicken (*Gallus gallus*) embryo hepatocyte cultures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *149*(4), 605-612.

Wei, X., Song, H., Yin, L., Rizzo, M. G., Sidhu, R., Covey, D. F., ... & Semenkovich, C. F. (2016). Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes. *Nature*, *539*(7628), 294-298.

Wen, Y., Mirji, N., & Irudayaraj, J. (2020). Epigenetic toxicity of PFOA and GenX in HepG2 cells and their role in lipid metabolism. *Toxicology in Vitro*, *65*, 104797.

Wielsøe, M., Long, M., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Perfluoroalkylated substances (PFAS) affect oxidative stress biomarkers in vitro. *Chemosphere*, *129*, 239-245.

Wilkins, M. H. F., Blaurock, A. E., & Engelman, D. M. (1971). Bilayer structure in membranes. *Nature New Biology*, *230*(11), 72-76.

Williams, M. T. (1992). Cytochrome P450. Mechanisms of action and clinical implications. *The Journal of the Florida Medical Association*, *79*(6), 405-408.

Woolbright, B., Williams, C., McGill, M., & Jaeschke, H. (2014). Liver Toxicity. *Reference Module In Biomedical Sciences*. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.00205-1

Wu, H., Yoon, M., Verner, M. A., Xue, J., Luo, M., Andersen, M. E., ... & Clewell III, H. J. (2015). Can the observed association between serum perfluoroalkyl substances and delayed menarche be explained on the basis of puberty-related changes in physiology and pharmacokinetics?. *Environment international*, *82*, 61-68.

Xiao, F., Simcik, M. F., Halbach, T. R., & Gulliver, J. S. (2015). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in soils and groundwater of a US metropolitan area: migration and implications for human exposure. *Water research*, 72, 64-74.

Xiao, F., Simcik, M., & Gulliver, J. (2013). Mechanisms for removal of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) from drinking water by conventional and enhanced coagulation. *Water Research*, 47(1), 49-56.

Xin, Y., Ren, X. M., Wan, B., & Guo, L. H. (2019). Comparative in vitro and in vivo evaluation of the estrogenic effect of hexafluoropropylene oxide homologues. *Environmental Science & Technology*, 53(14), 8371-8380.

Xu, M., Wan, J., Niu, Q., & Liu, R. (2019). PFOA and PFOS interact with superoxide dismutase and induce cytotoxicity in mouse primary hepatocytes: A combined cellular and molecular methods. *Environmental research*, 175, 63-70.

Xu, X., Ni, H., Guo, Y., Lin, Y., Ji, J., Jin, C., ... & Jiang, Q. (2021). Hexafluoropropylene oxide dimer acid (HFPO-DA) induced developmental cardiotoxicity and hepatotoxicity in hatchling chickens: Roles of peroxisome proliferator activated receptor alpha. *Environmental Pollution*, 290, 118112.

Yan, Y., & Kwan, P. (2017). PFAS removal options for drinking water treatment: an overview and case study.

Yang, H., Zhou, M., Li, H., Wei, T., Tang, C., Zhou, Y., & Long, X. (2020). Effects of low-level lipid peroxidation on the permeability of nitroaromatic molecules across a membrane: a computational study. *ACS omega*, 5(10), 4798-4806.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C., Ibrado, A., & Cai, J. et al. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, 275(5303), 1129-1132.

Yang, L., He, L., Xue, J., Ma, Y., Xie, Z., Wu, L., ... & Zhang, Z. (2020). Persulfate-based degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in aqueous solution: Review on influences, mechanisms and prospective. *Journal of hazardous materials*, 393, 122405.

Yang, Y. (2020). Recent advances in the electrochemical oxidation water treatment: Spotlight on byproduct control. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 14(5), 1-12.

Yao, J., Sheng, N., Guo, Y., Yeung, L. W., Dai, J., & Pan, Y. (2022). Nontargeted Identification and Temporal Trends of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in a Fluorochemical Industrial Zone and Adjacent Taihu Lake. *Environmental Science & Technology*.

Yèagle, P. L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *The FASEB journal*, 3(7), 1833-1842.

Yoo, H. J., Pyo, M. C., Park, Y., Kim, B. Y., & Lee, K. W. (2021). Hexafluoropropylene oxide dimer acid (GenX) exposure induces apoptosis in HepG2 cells. *Heliyon*, 7(11), e08272.

Yu, Y., Zhang, K., Li, Z., Ren, C., Chen, J., & Lin, Y. et al. (2020). Microbial Cleavage of C–F Bonds in Two C₆ Per- and Polyfluorinated Compounds via Reductive Defluorination. *Environmental Science & Technology*, 54(22), 14393-14402.

Zahrabi, Ebrahim & Mokari Bolhassan, Iman & Veladi, Hadi & Hosseinzadeh, Rashid. (2016). Nano Liposomes in Novel Drug Delivery Systems: a review.

Zeghari, N., Vidal, H., Younsi, M., Ziegler, O., Drouin, P., & Donner, M. (2000). Adipocyte membrane phospholipids and PPAR- γ expression in obese women: relationship to hyperinsulinemia. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 279(4), E736-E743.

Zhang, B., He, Y., Huang, Y., Hong, D., Yao, Y., Wang, L., ... & Sun, H. (2020). Novel and legacy poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in indoor dust from urban, industrial, and e-waste dismantling areas: the emergence of PFAS alternatives in China. *Environmental Pollution*, 263, 114461.

Zhang, M., Zheng, J., Nussinov, R., & Ma, B. (2017). Release of cytochrome C from Bax pores at the mitochondrial membrane. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Zhang, X., Barraza, K. M., & Beauchamp, J. L. (2018). Cholesterol provides nonsacrificial protection of membrane lipids from chemical damage at air–water interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), 3255-3260.

Zhao, B., Li, L., Liu, J., Li, H., Zhang, C., Han, P., ... & Chu, Y. (2014). Exposure to perfluorooctane sulfonate in utero reduces testosterone production in rat fetal Leydig cells. *PLoS One*, 9(1), e78888.

Zhu, H. L., Chen, G., Chen, S. N., Wang, R. Q., Chen, L., Xue, H., & Jian, S. P. (2020). Changes in cell membrane properties and phospholipid fatty acids of bacillus subtilis induced by polyphenolic extract of *Sanguisorba officinalis* L. *Journal of Food Science*, *85*(7), 2164-2170.

Ziemba, B. P., & Falke, J. J. (2013). Lateral diffusion of peripheral membrane proteins on supported lipid bilayers is controlled by the additive frictional drags of (1) bound lipids and (2) protein domains penetrating into the bilayer hydrocarbon core. *Chemistry and physics of lipids*, *172*, 67-77.

Zimmerman, A. W., & Veerkamp, J. H. (2002). New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *59*(7), 1096-1116.