

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
(diplomová práce)



Chronická toxicita směsi léčiv
Chronic toxicity of drugs mixture

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové, 2013

Kateřina Podlipská

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum

Podpis

Děkuji RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc se zpracováním výsledků, poskytnutí materiálů a všechny cenné rady a připomínky při psaní mé diplomové práce.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV UK 265 002.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Léčivo a životní prostředí.....	6
1.2. Cíl práce	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Ekotoxikologie	9
2.2. Ekotoxikologické testy.....	13
2.3. Chronická toxicita	16
2.4. Testované látky	17
2.4.1. Amoxicilin	17
2.4.1.1. Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti molekuly.....	17
2.4.1.2. Širokospektré aminopeniciliny	17
2.4.1.3. Indikace, dávkování.....	18
2.4.1.4. Mechanismus účinku, farmakokinetika.....	18
2.4.1.5. Kontraindikace, interakce.....	20
2.4.1.6. Nežádoucí účinky	20
2.4.1.7. Léčivé přípravky s obsahem amoxicilinu.....	21
2.4.1.8. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicilinu v ČR	21
2.4.1.9. Amoxicilin v životním prostředí	23
2.4.2. Ibuprofen.....	24
2.4.2.1. Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti molekuly.....	24
2.4.2.2. NSAID (Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs).....	25
2.4.2.3. Indikace, dávkování.....	26
2.4.2.4. Mechanismus účinku, farmakokinetika.....	26
2.4.2.5. Kontraindikace, interakce.....	28
2.4.2.6. Nežádoucí účinky	29
2.4.2.7. Léčivé přípravky s obsahem ibuprofenu	29
2.4.2.8. Spotřeba NSAID a ibuprofenu v ČR	30
2.4.2.9. Ibuprofen v životním prostředí	32
2.5. Testované organismy	33
2.5.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> , Nanney& McCoy	33
2.5.2. <i>Desmodesmus subspicatus</i> , Hegewald& Schmidt	36
2.6. Použité testy	39
2.6.1. Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	39
2.6.2. Řasový test toxicity s <i>Desmodesmus subspicatus</i>	40
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1. Testované organismy	41

3.2. Chemikálie	41
3.3. Provedení experimentu.....	42
3.3.1. Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	42
3.3.2. Řasový test toxicity s <i>Desmodesmus subspicatus</i>	44
4. VÝSLEDKY	47
4.1. Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	47
4.2. Řasový test toxicity s <i>Desmodesmus subspicatus</i>	50
5. DISKUZE	56
6. ZÁVĚR	62
7. SEZNAM LITERATURY	64
Abstrakt.....	71

1. ÚVOD

1.1. Léčivo a životní prostředí

Farmaceuticky účinné látky jsou vyráběny a používány ve velmi velkých objemech a jejich využití a různorodost se každým rokem zvyšuje. (Bound et al., 2004)

Léčiva a léčivé přípravky jsou charakteristické svým silným účinkem a širokou škálou výhod v určitých oblastech použití. Nicméně i přes své blahodárné léčebné účinky ovlivňují některé léky organismy v životním prostředí a ekosystémech. Z hlediska životního prostředí (kontaminace povrchových, podzemních vod a pitné vody) je to velmi nežádoucí, i když obsažené sloučeniny mají nízkou akutní toxicitu pro člověka. (Kümmerer, 2004)

Léčiva byla zjišťována v životním prostředí s narůstající frekvencí od konce 90. let. (Williams, 2005)

Bylo zjištěno, že používáme více než 100 000 chemikálií, které mohou ohrozit životní prostředí vzhledem k jejich více či méně toxickým účinkům na rostliny, zvířata, lidi a celé ekosystémy. (Kümmerer, 2004)

Znečištěná látka se dostává do prostředí z různých zdrojů a na základě svých fyzikálně-chemických vlastností je transportována a účastní se biogeochemických cyklů v jednotlivých složkách životního prostředí – v ovzduší, vodním prostředí, půdě, horninách či sedimentech. (Prokeš, 2005)

Aktivní látky léčivých přípravků, produkty jejich degradace a metabolity byly nalezeny ve všech částech životního prostředí (Kotyza et al., 2009)

Tyto humánní a veterinární léčiva se uvolňují do životního prostředí různými cestami. (Boxall, 2004)

Možné zdroje lidských léčiv v životním prostředí (kromě výjimečných událostí, jako jsou potenciální dopravní nehody nebo vypouštění znečištěných odpadních vod z čistírny odpadních vod během dešťového průtoku), by teoreticky mohlo zahrnovat:

- 1) úniky z farmaceutických výrobních zařízení,
- 2) likvidace farmaceutického výrobku z dodavatelského řetězce (před distribucí k pacientovi),
- 3) likvidace pacientem nebo zařízením zdravotní péče nevyužitých léčiv buď do odpadních vod, nebo do pevného odpadu,
- 4) vylučování účinných látek (API) a metabolitů pacientem do odpadních vod. (Williams, 2005)

Jedním ze způsobů, jak kontrolovat zdroje znečištění, je provést osvětu veřejnosti ve smyslu zodpovědného nakládání s prošlými léky. (Kotyza et al., 2009)

Farmaceutická společnost je povinna prokázat kvalitu, bezpečnost a účinnost každého nového léku před tím, než může být uveden na trh. (Boxall et al., 2004)

O samotných účinných látkách a jejich působení na člověka má tedy společnost díky propracovaným a legislativně potřebným klinickým studiím a toxikologickým testům dostatek informací. (Kotyza et al., 2009)

Potenciální dopady výroby a používání léčivých přípravků na životní prostředí jsou však méně prozkoumány a teprve nedávno se staly předmětem vědeckého zájmu. (Boxall, 2004).

Při hodnocení nebezpečnosti látek tohoto typu na životní prostředí jsou však potřeba spíše informace ekotoxikologického charakteru, a to nejen o samotné aktivní látce, ale také o jejích metabolických a degradačních produktech. Takovýchto dat je ale v současnosti k dispozici málo, neboť jejich získávání je nejenom nákladné, ale také časově značně náročné. (Kotyza et al., 2009)

V současnosti lze v životním prostředí velice dobře určit a kvantifikovat kolem 100 různých léčiv. Nicméně jen v ČR je prozatím registrováno přes 1200 nejrozličnějších léčivých přípravků, což mimo jiné znamená, že jsme prozatím schopni sledovat pouze desetinu celkového lékového znečištění. (Kotyza et al., 2009)

Rostoucí obavy ohledně uvolňování farmaceuticky aktivních látek a výrobků osobní hygieny do prostředí vedly k zavedení směrnic pro hodnocení rizik v

Evropské unii Evropskou lékovou agenturou (EMA) a ve Spojených státech Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). (Bound et al., 2004)

Dnes je posouzení rizika pro životní prostředí povinné pro všechny nové sloučeniny používané ve veterinárních léčivech, ale očekává se, že v blízké budoucnosti to bude povinné i pro všechna humánní léčiva. (Kümmerer, 2004)

Cílem hodnocení ekologických rizik však není zakázat léky, ale pokud existují alternativy s podobnými léčebnými účinky, vybrat a používat ten lék, který je k životnímu prostředí nejšetrnější. (Halling-Sørensen et al., 1998)

1.2. Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit chronickou toxicitu vybrané směsi léčiv. Použity byly látky amoxicilin a ibuprofen, buď samostatně, nebo spolu ve směsi v různých poměrech (1:1, 1:2, 2:1).

Experimentálně jsme zjišťovali jejich ekotoxikologický efekt na různých organismech. Konkrétně byl použit Vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila* a Řasový test toxicity s řasou *Desmodesmus subspicatus*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ekotoxikologie

Termín ekotoxikologie použil jako první okolo roku 1969 člen francouzské akademie věd René Truhaut. Definoval tuto disciplínu jako „studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva“. (Kočí et al., 2009)

Moderní definice představuje ekotoxikologii jako hraniční obor mezi toxikologií a ekologií. V užším slova smyslu se zabývá působením cizorodých látek na volně žijící organismy v jejich prostředí (ekologická toxikologie). (Prokeš, 2005)

Ekotoxikologie je tedy multidisciplinární obor, v podstatě silně zakořeněný v toxikologii, chemii životního prostředí, farmakologii a ekologii. (Devillers, 2009)

Cílem ekotoxikologie je pochopení, charakterizace a eventuálně předpověď účinku v celých populacích, společenstvech, ekosystémech. (Vytlačilová, 2010)

Nedílnou součástí tohoto konceptu je šetření o tom, jak a do jaké míry jsou volně žijící druhy a lidé vystaveni znečišťujícím látkám, ale také studie o způsobu, jakým jsou chemické látky uvolněné do životního prostředí přepravovány mezi různými složkami biosféry a transformovány z abiotických a biotických složek. (Devillers, 2009)

Distribuce farmak do životního prostředí se poněkud liší v porovnání s tradičními polutanty. (Kotyza et al., 2009)

Způsob, jakým se látky dostávají do prostředí, závisí na jejich chemicko – fyzikálních vlastnostech. (Kočí et al., 2009)

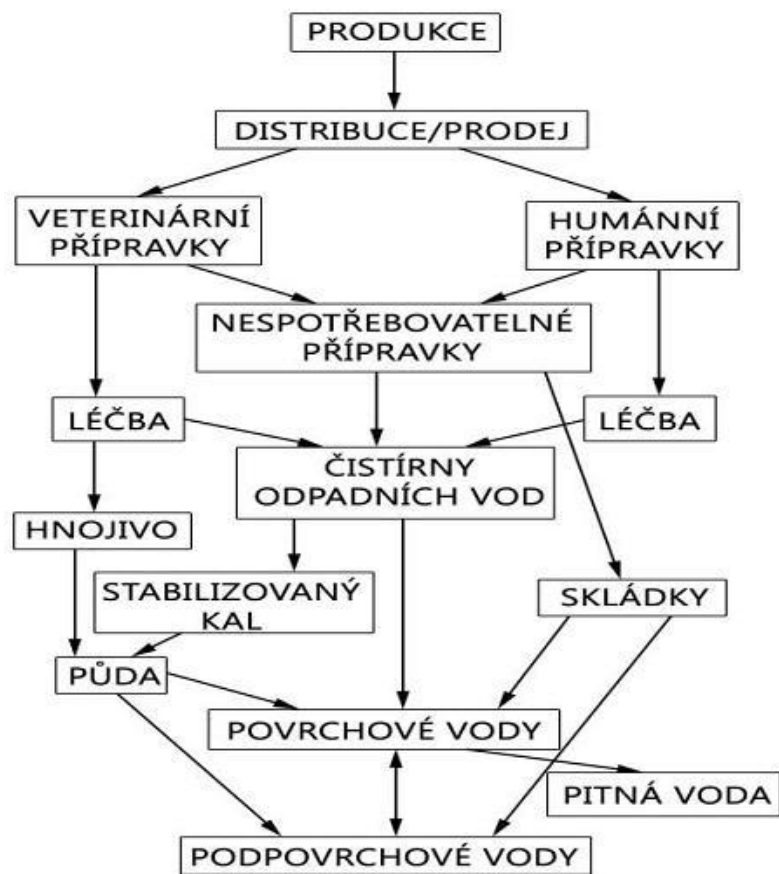
Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti užívající léčiva. Aktivní látky jsou po užití léku z těla vylučovány buď v nezměněné podobě, nebo ve formě jejich metabolitů prostřednictvím výkalů a moči a odcházejí díky splaškům až do čistírny odpadních vod (ČOV). Zde však nemusí být některé z nich dostatečně zachycovány a mohou se transportovat do dalších částí ekosystému. (Kotyza et al., 2009)

Za další významný zdroj jsou považovány léky, které se do koloběhu dostávají buď formou průsaků ze skládek, nebo díky spláchnutí do odpadu. Mezi menší zdroje lze zařadit např. stabilizovaný kal z ČOV, farmaceutická výrobní zařízení a další. (Kotzya et al., 2009)

Veterinární léčiva se mohou dostat do povrchové vody odtékáním z půdy po silných deštích. (Kümmerer, 2004)

Pokud se navíc stabilizované čistírenské kaly používají jako druhotné hnojivo na zemědělských plochách, může dojít k jejich kontaminaci a následnému proniknutí odolných léčiv nebo jejich metabolitů do potravních řetězců. (Kotzya et al., 2009)

Osud léčiva v životním prostředí je schématicky popsán na tomto obrázku.



Obr. č. 1: Tok léčiv a jejich metabolitů v prostředí (©2006, Castensson et al.)

Životní prostředí má omezenou kapacitu vstřebávat antropogenní odpady. Odpadní látky se v životním prostředí buď rozloží, nebo naředí. Vlivem stále narůstajícího množství odpadních látek dochází k vyčerpání schopnosti

životního prostředí nežádoucí účinky látek eliminovat. Důsledkem je pak narušení ekosystému. (Kočí et al., 2009)

Teprve v 60. letech 20. století začaly být vyvíjeny metody schopné popsat toxické účinky lidmi produkováných látek na životní prostředí a v něm žijící organismy.

Dnes jsou tyto ekotoxikologické metody používány při naplňování zákonů majících vztah k životnímu prostředí. (Kočí et al., 2009)

Povinnost hodnotit tuto vlastnost je u nás i v zemích EU dána současnou legislativou. Od roku 1996 vešly v ČR v platnost tři zákony, jejichž prováděcí vyhlášky a navazující předpisy stanovují povinnost hodnotit ekotoxicitu a uvádějí metody jejího stanovení a vyhodnocení, včetně dalších potřebných údajů. Jedná se o Zákon č. 147/1996 Sb. o rostlinolékařské péči, Zákon č. 125/1997 Sb. o odpadech a Zákon č. 157/1998 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích ve znění č. 352/1999 Sb. (Svobodová et al., 2000)

Testy ekotoxicity jsou součástí metodických postupů, tzv. „guidelines“, při posuzování rizik na životní prostředí, nutné pro registraci humánních léčiv. (Williams, 2005)

Skupiny léků, vyžadující zvláštní pozornost jsou hlavně hormony (vzhledem k jejich vysoké účinnosti), léky proti rakovině, antibiotika a antiparazitika (všechny navrženy s cílem zabít buňky nebo organismy) a velkoobjemové léky, jako jsou léky proti bolesti, β -blokátory a antidepresivní léky. (Halling-Sørensen et al., 1998)

Antibiotika v nízkých koncentracích při chronické expozici vyvolávají větší odolnost u patogenních bakterií, perorální hormonální kontraceptiva jsou prokazatelně schopna negativně ovlivňovat reprodukční schopnosti některých organismů. (Kotyza et al., 2009)

Vodní a suchozemské organismy jsou ale vystaveny nejen směsi léčiv, ale i dalších látek, včetně pesticidů, biocidů a všeobecných průmyslových chemikálií (Boxall, 2004)

Zatímco většina hodnocení environmentálních rizik zvažuje chemikálie jednu po druhé, realitou je, že vodní volně žijící živočichové jsou vystaveni směsi

produktů v životním prostředí. Určení expozice, účinku, a nakonec rizika z více stresorů (v tomto případě jeden konkrétní typ - farmaceutické produkty) je mimořádně složitý úkol. Proto je nutné, aby léčiva byla zkoumána v rámci matric, ve kterých se vyskytují. (Williams, 2005)

Směsi dvou či více látek mohou mít na organismus kombinovaný vliv, který může být přídatný (aditivní). Tyto látky mohou také jedna s druhou interferovat (antagonismus), nebo jejich celkový vliv na organismus může být větší, než když působí látka samostatně (synergismus).

(ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC)

O výskytu léčiv ve vodách a životním prostředí České republiky prozatím není k dispozici mnoho údajů. Lze proto jen stěží odhadovat, do jaké míry je naše okolí farmaky zasaženo. Vzhledem k faktu, že v ČR se vyskytují převážně horní toky řek, však můžeme v hrubém přiblížení usuzovat, že na tom bude Česká republika s lékovým znečištěním relativně lépe v porovnání s ostatními státy EU. (Kotýza et al., 2009)

2.2. Ekotoxikologické testy

Ekotoxikologické biotesty jsou experimenty s organismy, pomocí kterých hledáme odpověď na otázku, zda bude testovaná látka působit toxicky na organismy v konkrétních ekosystémech, a zda toxickým působením těchto látek v ekosystémech může dojít k jeho narušení. (Kočí et al., 2009)

Testy toxicity na organismech vodního prostředí mají svou nezastupitelnou úlohu při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků včetně pesticidů, ale i při klasifikaci odpadů určených ke skládkování. Tyto testy mají rovněž velký význam při hledání a usvědčování původců havárií na povrchových a podzemních vodách. (Svobodová et al., 2000)

Jelikož se ekotoxikologie zabývá posuzováním toxických účinků látek a vzorků na ekosystémy, měly by ekotoxikologické studie vždy zahrnovat výsledky testů toxicity na několika organismech z různých trofických pozic sledovaného ekosystému. (Kočí et al., 2009)

Snahou ekotoxikologů je hodnotit potenciální nebezpečí pro vodní ekosystém jako celek. Z toho vyplývá, že výběr testovacích organismů k testům toxicity by měl být prováděn tak, aby byly zastoupeny jednotlivé trofické úrovně studovaného ekosystému (producent - konzument - destruent). Prakticky to znamená 4 úrovně studovaného ekosystému, a to řasy, bezobratlí, ryby a bakterie. (Svobodová et al., 2000)

Požadavky na vlastnosti testovaných organismů jsou: snadná dostupnost, snadné uchovávání a chov v laboratorních podmínkách, dobře známá a charakterizovaná biologie druhu, případně genetika a prostudovaná citlivost druhu k různým třídám toxických látek. (Vytlačilová, 2010)

Při hodnocení akutní toxicity chemických látek, přípravků a odpadů, případně odpadních vod (obecně vzorku) se zjišťují hodnoty **LC₅₀** (letální koncentrace pro 50 % testovacích organismů - v testech na rybách), hodnoty **EC₅₀** (efektivní koncentrace, která vyvolá 50% úhyn, či imobilizaci testovacích organismů - v testech na zástupcích zooplanktonu a efektivní koncentrace,

kteřá snižuje o 50% luminiscenci emitovanou mořskými bakteriemi) a hodnoty **IC₅₀** (inhibiční koncentrace, tj. koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou - v testech na zelených řasách, hořčici bílé a na okřeřku). (Svobodová et al., 2000)

Při hodnocení toxicity testovaného vzorku pro organismus je samozřejmě důležitá nejen koncentrace látky, ale také doba jejího působení. Proto je také doba působení expozice dána metodikou příslušného testu toxicity a uvádí se ve výsledku.

Při zjišťování hodnot **LC₅₀**, **EC₅₀** a **IC₅₀** se vychází z koncentrací, ve kterých došlo k více než nulové a méně než stoprocentní mortalitě, imobilizaci, či inhibici růstu. (Svobodová et al., 2000)

Podle těchto hodnot lze testované látky zařadit do tříd toxicity a odhadnout míru škodlivého působení na organismy. (Vytlačilová, 2010)

Toxické působení látky na testovací organismus lze blíže specifikovat hodnotami **LOEC** a **NOEC**. **LOEC** (lowest observed effect concentration) představuje nejnižší koncentraci testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky. **NOEC** (no-observed effect concentration) představuje nejvyšší koncentraci testovaného vzorku, nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky. (ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC)

Pro možnost porovnání výsledků testů toxicity prováděných v různých laboratořích je třeba, aby tyto laboratoře postupovaly podle shodných metodik. Proto jsou jednotlivé metodiky testu toxicity standardizovány na mezinárodní úrovni. Standardizaci provádí mezinárodní organizace **ISO** (International Organization for Standardization) a **OECD** (Organization for Economic Cooperation of Development). (Svobodová et al., 2000)

Standardní testy toxicity používané po několik let ve vodní toxikologii se v dnešní době stávají pro naše laboratoře velmi nákladnými. Proto některá pracoviště začala tradiční standardní testy postupně nahrazovat alternativními mikrobiotesty, tzv. **toxkit**. (ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC)

Jejich výhodou je miniaturizace (šetření materiálem, vzorkem, časem), dobrá dostupnost organismů, rychlost a jednoduchost. (Vytlačilová, 2010)

Toxikity jsou mikrobiologické testy v sadách, obsahující všechny potřebné materiály včetně zkušebních organismů k provedení jednoduchých, rychlých, citlivých a reprodukovatelných testů za nízkou cenu. Jsou vhodné pro stanovení toxicity všech chemikálií a odpadů uvolněných do vodního i suchozemského prostředí. (ALGALTOXKIT F™)

Rozdělení biotestů je velice pestré. Každý biotest může patřit zároveň do více kategorií. Ekotoxikologické biotesty můžeme členit například podle těchto kritérií:

- dle cílového ekosystému (sladkovodní, mořský, půdní, sedimenty)
- dle doby expozice (akutní, semiakutní (semichronické), chronické)
- dle pokročilosti designu testovacího systému (1. generace – klasické testy s intaktními organismy, 2. generace – mikrobiotesty a 3. generace – biosenzory, biosondy a biomarkery)
- dle trofické úrovně testovacích organismů (testy s producenty, konzumenty a destruenty)
- dle testované matrice (voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka)
- dle počtu testovacích organismů (jednoduché a vícepruhové s přírodními společenstvy nebo laboratorními směsmi druhů)
- dle složitosti testovaného vzorku (čisté chemické látky, směsi látek, přírodní vzorky)
- dle způsobu přípravy vzorku (definované koncentrace chemických látek, testování výluhů či extraktů přírodních vzorků, přímé testy environmentálních matric jako je kontaminovaná půda, sedimenty, odpadní vody)
- dle stupně komplexnosti detekčního systému (enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury, intaktní organismus, populace, společenstvo)
- dle sledované odpovědi (letální či subletální účinky, hodnocení fyziologické aktivity, reprodukční aktivita). (Kočí et al., 2009)

2.3. Chronická toxicita

Biotesty mohou být prováděny v krátkém časovém intervalu, pak se jedná o testy s akutní expozicí, zkráceně označované jako akutní testy, anebo se jedná o dlouhodobé testy, označované jako chronické. (Kočí et al., 2009)

Souhrnně lze říci, že akutní testy toxicity sledují odezvu organismu na expozici toxické látky během jednoho životního stádia organismu, zatímco testy chronické toxicity mají dobu expozice zahrnující více vývojových stádií nebo generací organismu. (Kočí et al., 2009)

Negativní vliv toxické látky je patrný až na dalších vývojových stádiích, generacích a potomcích, na snížení porodnosti, výskytem degenerativních útvarů a možným přenosem dědičných vad a chorob. (Ambrožová, 2003)

Testy prováděné s delší dobou expozice, tzv. chronické testy toxicity, jsou schopné zaznamenat nepříznivý účinek i nižších koncentrací toxických látek.

U chronických účinků toxikantů je obvykle četnost projevů poškození organismu v populaci přímo úměrná intenzitě expozice, zatímco akutnost průběhu na intenzitě expozice závislá není. (Kočí et al., 2009)

Většina ekotoxikologických testů se dá využít jak pro akutní, tak i pro chronické stanovení toxicity, záleží vždy na zvolené délce expozice.

Testy chronické toxicity se provádí zejména na řasách, vodních korýších a rybách. (Ambrožová, 2003)

Např. pro organismus *Daphnia magna* lze využít 48 hodinový test akutní imobilizace *Daphnia sp.* (OECD 202) nebo 21 denní test reprodukce *D. magna* (OECD 211). Pro sledování toxicity na rybách lze využít 96 hodinového testu akutní toxicity ryb (OECD 203), 14 denní test chronické toxicity (OECD 204) nebo test sexuálního vývoje ryb, trvající 60 dní (OECD 234).

Přechodnou kategorií mezi testy akutní a chronické toxicity jsou testy subchronické toxicity, založené na hodnocení fyziologických projevů a růstu s obdržetím výsledků v krátké době (během 5 až 7 dní). (Ambrožová, 2003)

K těmto testům můžeme zařadit vícegenerační test toxicity s *Tetrahymena thermophila*, neboť se v průběhu testu obmění až šest generací, i 72 hodinový test inhibice růstu sladkovodních řas a cyanobakterií (OECD 201).

- základní peniciliny (penicilin G, penicilin V)
- protistafylokokové peniciliny (metacilin, oxacilin, nafcilin)
- širokospektré peniciliny
 - o aminopeniciliny (ampicilin, ampicilin)
 - o karboxypeniciliny (carbenicilin, tikarcilin)
 - o ureidopeniciliny (piperacilin, mezlocilin, azlocilin)

Amoxicilin patří do skupiny penicilinů, konkrétně do skupiny širokospektrých, zvaných aminopeniciliny. Mají rozšířené spektrum (G^- a G^+ bakterie), proti penicilinu G bývá spektrum rozšířeno o některé G^- bakterie a *Enterococcus sp.* Citlivé mohou být i *Moraxella catarrhalis* a *Hemophilus influenzae*. Rezistentní bývají: *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.*, *Proteus sp.* a *Pseudomonas sp.* (Mladěnka, 2011)

2.4.1.3. Indikace, dávkování

Amoxicilin se nejčastěji používá k terapii infekcí respiračního a urogenitálního ústrojí (infekce horních cest dýchacích a močových cest). Dále k terapii některých gynekologických a gastrointestinálních infekcí a infekcí kůže a měkkých tkání a také jako součást terapie eradikace *Helicobacter pylori*. (SPC Ospamox 1000 mg)

Většinou se podává perorálně, 750-1500 mg/den rozdělených každých 8 hodin (pouze při použití vysokých dávek je možné podávání po 12 hodinách), trvání léčby je ještě 48-72 hodin po vymizení příznaků infekce (7-10 dnů). (Lincová et al., 2007)

2.4.1.4. Mechanismus účinku, farmakokinetika

Beta-laktamová antibiotika se váží na své receptory, enzymy PBP (penicilin-binding proteins) a inhibují syntézu bakteriální stěny bloádou transpeptidačních reakcí konstituujících a zpevňujících peptidoglyken (murein, mukopeptid) ve stěně příčnými vazbami. Stěna bakteriálních buněk obsahuje i další enzymy, které řízeně katalyticky obměňují peptidoglyken a které beta-

laktamová antibiotika aktivují, a tím způsobují lýzu a smrt bakteriální buňky. (Lincová et al., 2007)

Inhibitory syntézy buněčné stěny jsou jako antibakteriální léčiva vhodná, protože lidské buňky buněčnou stěnu nemají. Tato farmaka působí na rostoucí a množící se mikroby baktericidně. (Lüllman et al., 2012)

Inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny je podkladem baktericidního účinku antibiotika. V důsledku vazby antibiotika na enzymy bakteriální buňky podílející se na syntéze stěny buňky se bakteriální buňka přestane dělit a hyne. (Lincová et al., 2007)

Mechanismus rezistence

- strukturní rozdíly v PBP (PBP s nižší afinitou k antibiotiku)
- efluxní systém nebo nemožnost antibiotika proniknout k PBP
- enzymatická degradace beta-laktamázy (Mladěnka, 2011)

Kombinace baktericidních penicilinů s látkami, které inhibují beta-laktamázy (ale samy nemají antibakteriální účinky) podstatně zesiluje účinky základní látky a rozšiřuje také její antimikrobiální spektrum i na stafylokoky. Základními inhibitory beta-laktamázy jsou kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. (Hynie, 2001)

Absorpci amoxicilinu neovlivňuje jídlo. Přípravek se téměř úplně absorbuje v tenkém střevě. Maximální koncentrace v krevním séru je dosaženo za 1 - 2 hodiny po užití. Amoxicilin rychle přechází do tělních tkání a tekutin i do hlenů a hnisavých bronchiálních sekretů. Váže se asi z 20% na plazmatické bílkoviny. Jestliže funkce jater není porušena, dosáhne lék ve žluči vysoké koncentrace. Amoxicilin má poločas vylučování mezi 1 - 2 hodinami. Vylučuje se převážně ledvinami. Více než polovina perorálně podané dávky se vylučuje močí a v léčebné aktivní formě. (SPC Ospamox 1000 mg)

Tab. č. 1: Farmakokinetické vlastnosti širokospektrých penicilinů (Lincová et al., 2007)

Širokospektré peniciliny	Vazba na bílkoviny (%)	Distribuční objem V_d (l/kg)	Frakce vyloučená do moči (%/24 h)	Biologický poločas $t_{1/2}$ (h)
ampicilin	18	0,3	85	1
amoxicilin	18	0,4	85	1
tikarcilin	60	0,2	80	1,2
piperacilin	22	0,2	75	1

2.4.1.5. Kontraindikace, interakce

Při známé penicilinové alergii jsou penicilinová antibiotika kontraindikována. (Lüllmann et al., 2012)

Alergie na jeden penicilin znamená vysokou pravděpodobnost alergie i na jiný. (Mladěnka, 2011)

Amoxicilin je dále kontraindikován při infekční mononukleóze, lymfatické leukemii, těžké jaterní insuficienci a opatrnosti je třeba u pacientů s astmatem a alergiemi v anamnéze a u těžší poruchy funkce ledvin. (Medical Tribune Brevíř, 2009)

Při současném podávání může amoxicilin interagovat s digoxinem, antikoagulancii kumarinové třídy a methotrexátem. Podávání amoxicilinu může přechodně snížit plasmatické hladiny estrogenů a progesteronu a může snížit účinnost perorálních kontraceptiv. (SPC Ospamox 1000 mg)

Dále by se neměl kombinovat s allopurinolem, bakteriostatickými antibiotiky, tj. tetracykliny a chloramfenikolem. (SPC Amoxihexal 1000)

2.4.1.6. Nežádoucí účinky

Mohou se objevit alergické reakce, především zarudnutí, kopřivka, svědění, bolesti hlavy a kloubů, léková horečka, výjimečně Stevens-Johnsonův syndrom a Lyellův syndrom, anafylaktická reakce. Rovněž může dojít k poruchám zažívání jako je nauzea, zvracení, průjem. Vzácně dochází až k rozvoji pseudomembranózní kolitidy. Je znám i ojedinělý výskyt psychických a nervových poruch, vzácně edémy, poruchy krve tvorby a poruchy jaterních funkcí. (Medical Tribune Brevíř, 2009)

2.4.1.7. Léčivé přípravky s obsahem amoxicilinu

Aktuálně registrované přípravky v ČR s aktivním výskytem na českém trhu obsahující amoxicilin jsou:

AMOKSIKLAV[®], AMOXICILLIN-RATIOPHARM[®], AUGMENTIN[®], CURAM[®], DUOMOX[®], MEDOCLAV[®], MEGAMOX[®], OSPAMOX[®],

v těchto lékových formách:

- perorální – tablety (POR TBL FLM, POR TBL RET), prášek pro přípravu suspenze (POR PLV SUS), granulát pro přípravu suspenze (POR GRA SUS),
- parenterální – injekce a infuze (INJ PLV SOL, INJ+INF PLV SOL).
(www.sukl.cz, stav k 1. 3. 2013)

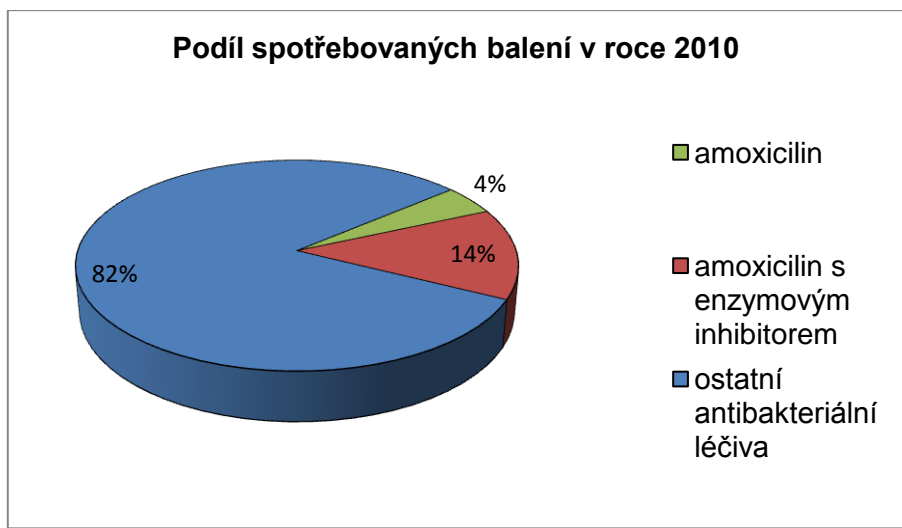
2.4.1.8. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicilinu v ČR

Spotřeba za rok 2010

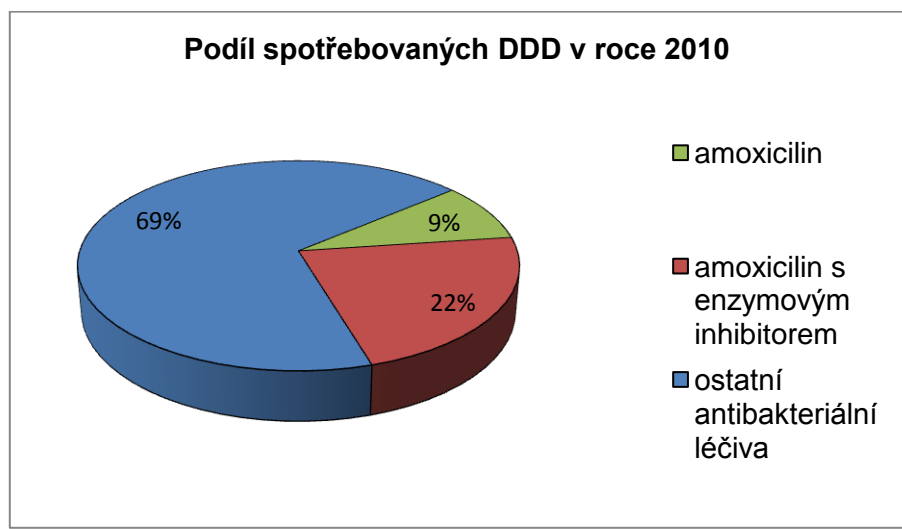
Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii v roce 2010 byla 11 529 666 balení, za průměrnou cenu 2 694 184 703 Kč, což odpovídá 73 000 317 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 19,0354 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na amoxicilin z toho připadá 522 061 balení za průměrnou cenu 69 455 818 Kč, což odpovídá 6 553 071 DDD, tj. 1,7088 DDD/t.o./d.

Na amoxicilin s enzymovým inhibitorem připadá 1 604 724 balení za průměrnou cenu 536 636 675 Kč, což odpovídá 16 387 495 DDD, tj. 4,2732 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2013.1)



Obr. č. 2: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem amoxicilinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2010



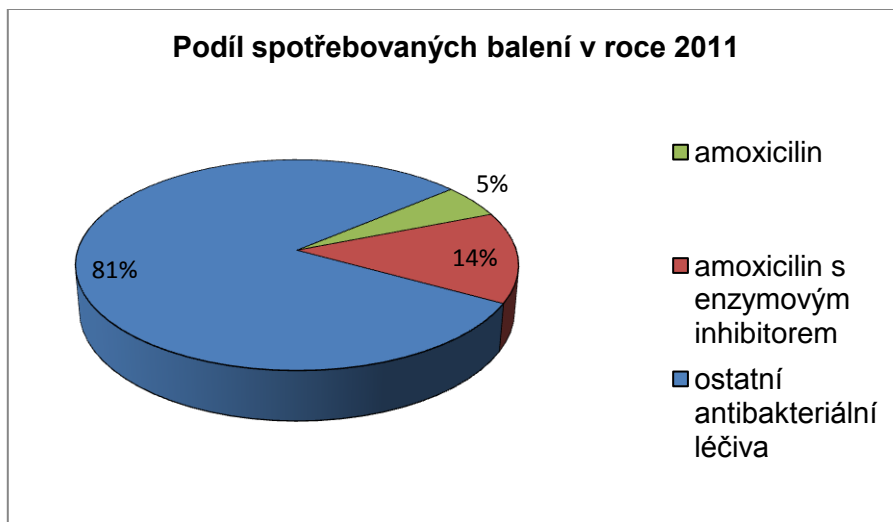
Obr. č. 3: Podíl spotřebovaných DDD amoxicilinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2010

Spotřeba za rok 2011

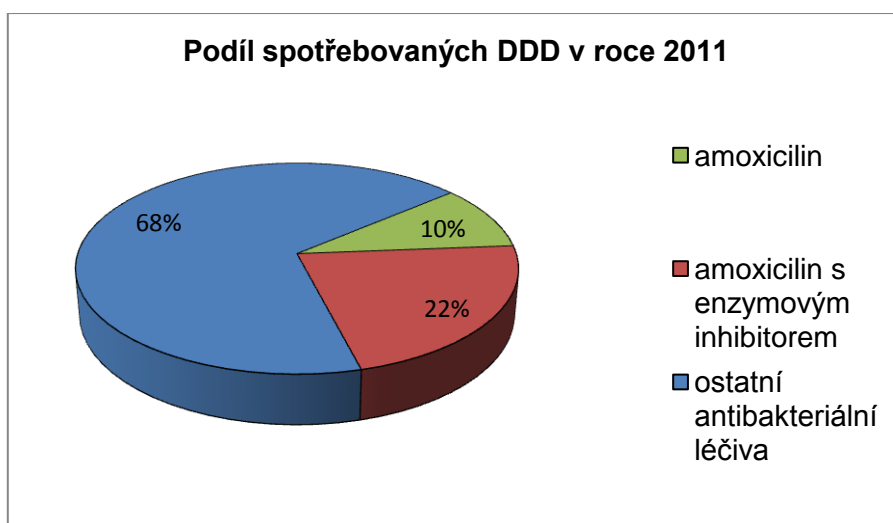
Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii v roce 2011 byla 11 488 721 balení za průměrnou cenu 2 530 535 245 Kč, což odpovídá 76 122 079 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 19,8005 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na amoxicilin z toho připadá 592 153 balení za průměrnou cenu 58 365 995 Kč, což odpovídá 7 514 263 DDD, tj. 1,9546 DDD/t.o./d.

Na amoxicilin s enzymovým inhibítozem připadá 1 603 169 balení za průměrnou cenu 545 001 387 Kč, což odpovídá 16 872 707 DDD, tj. 4,3888 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2013.1)



Obr. č. 4: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem amoxicilinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2011



Obr. č. 5: Podíl spotřebovaných DDD amoxicilinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2011

2.4.1.9. Amoxicilin v životním prostředí

Amoxicilin je vylučován v nezměněné aktivní formě z 60–80 %. Zbytek tvoří dva jeho hlavní metabolity amoxicilinová kyselina (AMA) a amoxicilin

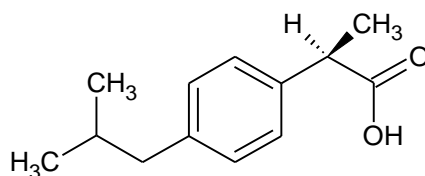
diketopiperazin-2',5'-dion. Tyto metabolity již nemají antibakteriální aktivitu. (SPC Amoxihexal 1000; Fernandez-Torrez et al., 2010)

Peniciliny se vyskytují ve výtoku ČOV v koncentracích do 200 ng/l, v povrchových vodách pak v koncentracích do 48 ng/l. (Färber, 2002; Christian et al., 2003)

Koncentrace nalezené pro beta-laktamová antibiotika v životním prostředí jsou nižší ve srovnání s tím, kolik by se očekávalo při jejich tak rozsáhlém užívání (asi 1 µg/l nebo méně místo očekávaných 20-30 µg/l). (Kümmerer, 2009)

2.4.2. Ibuprofen

2.4.2.1. Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti molekuly



Sumární vzorec: C₁₃H₁₈O₂

Relativní molekulová hmotnost (M_r): 206, 28

Chemický název: kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propanová

Vzhled: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly.

Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v methanolu a dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů. (Český lékopis, 2009)

ATC klasifikace: M	Muskuloskeletální systém
M01	Antirevmatika a protizánětlivá léčiva
M01A	Nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva
M01AE	Deriváty kyseliny propionové
M01AE01	Ibuprofen (MV AISLP, 2012)

2.4.2.2. NSAID (Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs)

Ibuprofen jako derivát kyseliny propionové patří mezi NSAID. Tímto pojmem se označují léčiva charakterizovaná po chemické stránce (s výjimkou inhibitorů COX 2) napojením kyselinové skupiny na aromatické jádro. Z hlediska působení je charakterizuje inhibice cyklooxygenázy (COX). Tímto mechanismem tlumí zánětlivé pochody, mírní bolest a snižují horečku. (Lüllmann et al., 2012)

Základní vlastností všech nesteroidních protizánětlivých látek je protizánětlivé působení. Výrazně zasahují do akutní fáze zánětu, ale nedokážou zastavit progresi chronických zánětlivých procesů. Intenzita protizánětlivého působení může být u jednotlivých látek rozdílná. Silně protizánětlivé účinky má např.: indometacin nebo piroxikam, slabší ibuprofen nebo kyselina acetylsalicylová. (Lincová et al., 2007)

Protože COX se vyskytuje ve dvou isoformách jako COX-1 a COX-2, afinita všech NSAID dává možnost zařadit jednotlivé látky této skupiny podle afinity k těmto isoenzymům a tedy podle frekvence nežádoucích účinků. Podle tohoto třídění existují 4 skupiny.

První skupina je COX-1 selektivní (např. aspirin v nízkých dávkách).

Druhou skupinu tvoří látky COX-1 neselektivní, kam patří naopak vysoké dávky aspirinu, které z nežádoucích účinků vyvolávají perforaci, ulceraci a krvácení v GIT (gastrointestinálním traktu). Tato skupina se dále dělí na dvě podskupiny: COX-1 neselektivní s vyšší afinitou ke COX-1, např. indometacin a piroxikam, které při dlouhodobějším použití ve vyšších antiflogistických dávkách, podobně jako skupina předchozí, vyvolávají perforaci, ulceraci a krvácení. Druhou podskupinu tvoří COX-1 neselektivní ale s vyšší afinitou ke COX-2, kam řadíme ibuprofen, diclofenak a naproxen, které při krátkodobém použití i vysokých dávek tyto nežádoucí účinky nevyvolávají.

Třetí skupinu tvoří látky COX-2 preferenční, jako např. nimesulid nebo meloxicam, které i při dlouhodobém podávání antiflogistických dávek nežádoucí účinky typu perforace, ulcerace a krvácení nevyvolávají.

Čtvrtou skupinu tvoří látky COX-2 specifické, kam patří tzv. coxiby, u nichž ani v maximálních dávkách a při dlouhodobém podávání nebezpečí těchto nežádoucích účinků nehrozí. Bohužel se vyskytly další nežádoucí účinky ze

strany kardiovaskulárních problémů, a proto byly tyto látky prozatím z terapeutického arzenálu vyjmuty. (Fendrich, 2011)

Jde o symptomatická léčiva potlačující bolest především periferním mechanismem a částečně i ovlivněním vnímání bolesti v CNS. Jsou účinné hlavně tam, kde zánětlivé procesy vedly k senzitivizaci receptorů pro bolest na mechanické a chemické podněty. Nepůsobí na viscerální bolesti. Intenzita analgetického účinku je nižší než u centrálně působících opioidních analgetik, na druhé straně však při chronické aplikaci nehrozí ani drogová závislost, jakou vyvolává zneužití opiátu. (Lincová et al., 2007)

2.4.2.3. Indikace, dávkování

Ibuprofen je indikován k symptomatické léčbě zánětlivých a degenerativních chorob kloubních jako je např. revmatoidní artritida nebo osteoartróza. Používá se při distorzi kloubů a zhmoždění pohybového aparátu. Jako analgetikum-antipyretikum při horečnatých stavech a zánětlivých onemocněních horních cest dýchacích, dále při bolestech zad, bolestech hlavy, bolestech zubů a bolestivé menstruaci. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

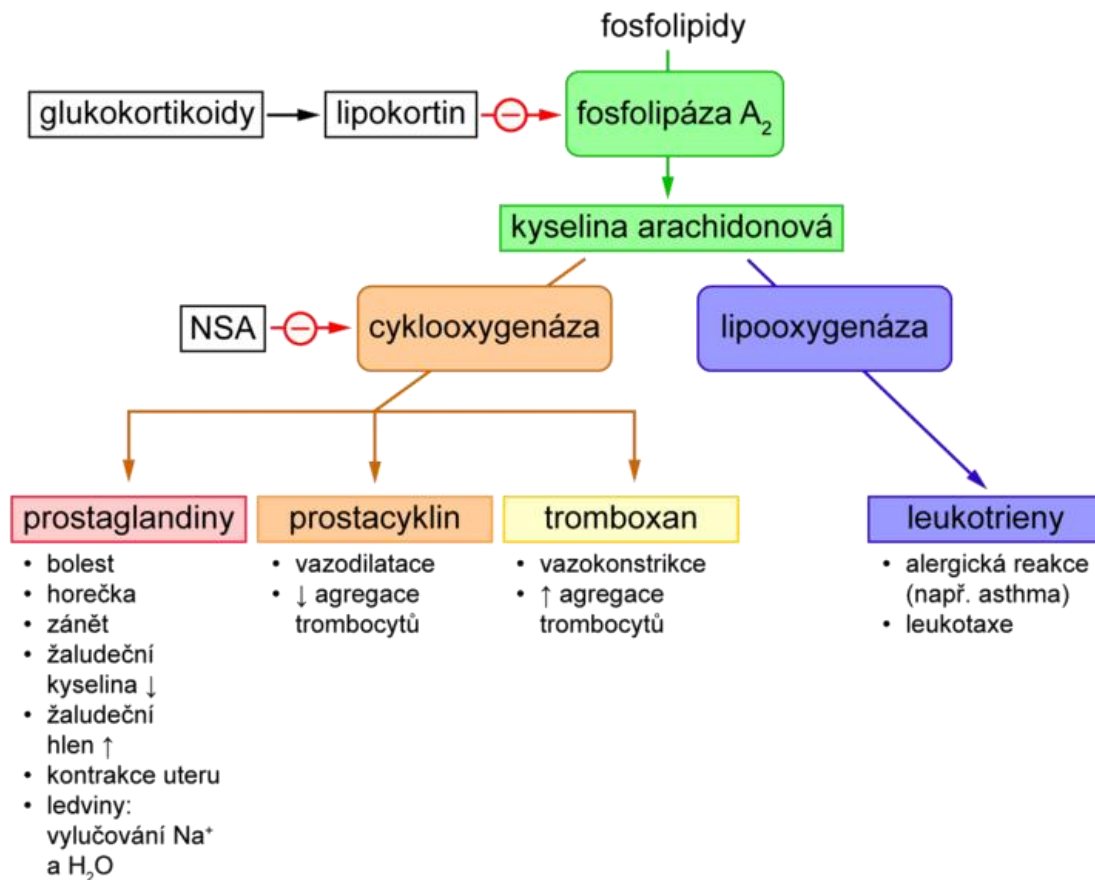
Jako analgetikum a antipyretikum se podává obvykle 400 mg ibuprofenu 1 až 3krát denně s odstupem mezi jednotlivými dávkami nejméně 4 hodiny. (SPC Ibalgin 200 mg)

Dospělí a mladiství od 12 let užívají 1,2 - 2,4 g denně, podle závažnosti onemocnění a reakce pacienta na léčbu. Dávka 2,4 g denně nemá být překročena. (Medical Tribune Breviř, 2009)

2.4.2.4. Mechanismus účinku, farmakokinetika

Mechanismus účinku NSAID se vysvětluje inhibicí syntézy prostanoidů. Hlavním místem účinku těchto látek je enzym cyklooxygenáza (COX), která katalyzuje konverzi arachidonové kyseliny na prostanoidy, které v zanícené tkáni evokují některé manifestace zánětu jako např. vasodilataci, hyperémii, zvýšenou permeabilitu, otok a bolest, zvýšenou migraci leukocytů, přičemž zintenzivňují účinky mediátorů zánětu. Na druhé straně, inhibice syntézy

prostaglandinů je příčinou toxicity, která je společná všem kyselým NSAID. (Fendrich, 2011)



Obr. č. 6: Metabolismus a účinky eikosanoidů (©2011, Jeřábek)

Cyklooxygenázy jsou enzymy lokalizované na endoplazmatickém retikulu, kde vytvářejí z kyseliny arachidonové lokální mediátory – prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany. Nesteroidní antiflogistika působí jako reverzibilní inhibitory COX (s výjimkou kyseliny acetylsalicylové). Tyto enzymy obsahují v molekule dlouhý pór (kanál), do kterého se kyselina arachidonová zasune a kde se přemění na účinnou látku. Antiflogistika do tohoto póru vniknou, „najdou“ tam vazebné místo, a tím zabrání uložení kyseliny arachidonové, enzym tak reverzibilně inhibují. (Lüllmann et al., 2012)

Forma COX-1 je tzv. konstitutivní enzym, který v organismu za fyziologických podmínek vytváří eikosanoidy, které ochraňují žaludeční sliznici, zajišťuje průtok ledvinami a agregaci trombocytů. Forma COX-2 je inducibilní enzym, který se uplatňuje za patologických podmínek, jakým je zánět. Protože

neselektivně působící NSAID inhibují obě izoformy COX, vedou tyto látky nejen k potlačení projevů zánětu, ale vedou i ke vzniku nežádoucích účinků, které jsou dány především inhibicí COX-1. Některé nové NSAID, které vykazují určitou selektivitu ke COX-2, mají menší nežádoucí účinky. (Hynie, 2001)

Po perorálním podání se rychle a dobře vstřebává, vrcholu plazmatické koncentrace při podání nalačno dosahuje již za 45 minut, při podání s jídlem cca za 1 - 3 hod. Po rektální aplikaci se ibuprofen vstřebává pomaleji, maximální koncentrace v séru je dosaženo za 2 hodiny po aplikaci. Ibuprofen se váže na plazmatické proteiny, ale vazba je reverzibilní. Poměrně rychle je metabolizován v játrech a vylučován močí, hlavně ve formě metabolitů a jejich konjugátů, menší část je vylučována žlučí do stolice. Biologický poločas má asi 2 hodiny. Při sníženém vylučování může dojít ke kumulaci léku v organismu. Exkrece ibuprofenu je ukončena za 24 hodiny po podání poslední dávky. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

Vazba na bílkoviny krevní plazmy je vysoká, v mnoha případech dosahuje až 99 % a může být příčinou mnoha klinicky významných lékových interakcí. Průnik do tkání a tělesných tekutin je dobrý. Téměř všechny nesteroidní protizánětlivé látky dobře prostupují hematoencefalickou bariéru a většinou i placentární bariéru, hrozí tedy nežádoucí účinky na plod. (Lincová et al., 2007)

2.4.2.5. Kontraindikace, interakce

Ibuprofen je kontraindikován při přecitlivělosti na složky přípravku, na kyselinu acetylsalicylovou a jiná nesteroidní antiflogistika. (Medical Tribune Brevíř, 2009)

Dále je kontraindikován při gastrointestinálním krvácení v anamnéze nebo perforaci ve vztahu k předchozí léčbě nesteroidními antirevmatiky, při aktivním nebo anamnesticky rekurentním peptickém vředu/hemoragii, při poruchách hemokoagulace a hemopoézy, závažném srdečním selhání a v třetím trimestru těhotenství. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

Přípravek obsahující léčivou látku ibuprofen by neměl být podáván společně s jinými nesteroidními antirevmatiky včetně selektivních inhibitorů cyklooxygenázy. (SPC Ibalgin 200 mg)

Dále byly zjištěny interakce s těmito skupinami léčiv: antikoagulancia (např. warfarin), antiagregační látky a kyselina acetylsalicylová, kortikoidy a SSRI. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

2.4.2.6. Nežádoucí účinky

Nejčastěji pozorované nežádoucí účinky jsou gastrointestinální. Mohou se objevit peptické vředy, perforace nebo gastrointestinální krvácení, někdy fatální, zejména u starších osob. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

Vlivem na CNS se mohou objevit závratě, bolesti hlavy, neostré vidění, zcela vzácně insomnie, deprese, emoční labilita. Ojedinele poruchy krve tvorby, z kardiovaskulárních poruch edémy, retence tekutin, palpitace; alergické kožní reakce; výjimečně poruchy ledvinných funkcí včetně intersticiální nefritidy nebo nefrotického syndromu. Vzácně poruchy vizu, poruchy percepce barev a toxická amblyopie. (Medical Tribune Brevíř, 2009)

2.4.2.7. Léčivé přípravky s obsahem ibuprofenu

Ibuprofen je dostupný bez lékařského předpisu v těchto silách: 200mg a 400mg. V síle 600mg je vázán na lékařský předpis.

Aktuálně registrované přípravky v ČR s aktivním výskytem na českém trhu obsahující ibuprofen jsou:

APO-IBUPROFEN[®], BRUFEN[®], DOLGIT[®], IBALGIN[®], IBUBERL[®], IBUMAX[®], IBUPROFEN GALMED[®], IBUPROFEN AL[®], IBURION[®], MODAFEN[®], NUROFEN[®], PEDEA[®].

Léčivá látka ibuprofen je dostupná v těchto lékových formách:

- perorální – tablety (POR TBL FLM, POR TBL OBD, POR TBL DIS, POR TBL EFF), tobolky (POR CPS MOL), šumivý prášek (POR GRA EFF), prášek pro přípravu suspenze (POR GRA SUS), sirup (POR SIR),
- rektální – čípky (RCT SUP),
- dermální – gely (DRM GEL), krémy (DRM CRM),
- parenterální – injekce (INJ SOL). (www.sukl.cz, stav k 1. 3. 2013)

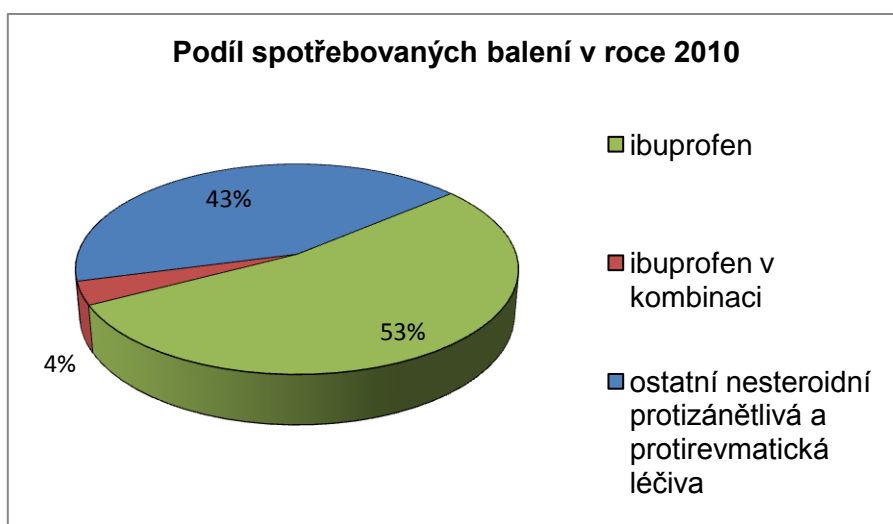
2.4.2.8. Spotřeba NSAID a ibuprofenu v ČR

Spotřeba za rok 2010

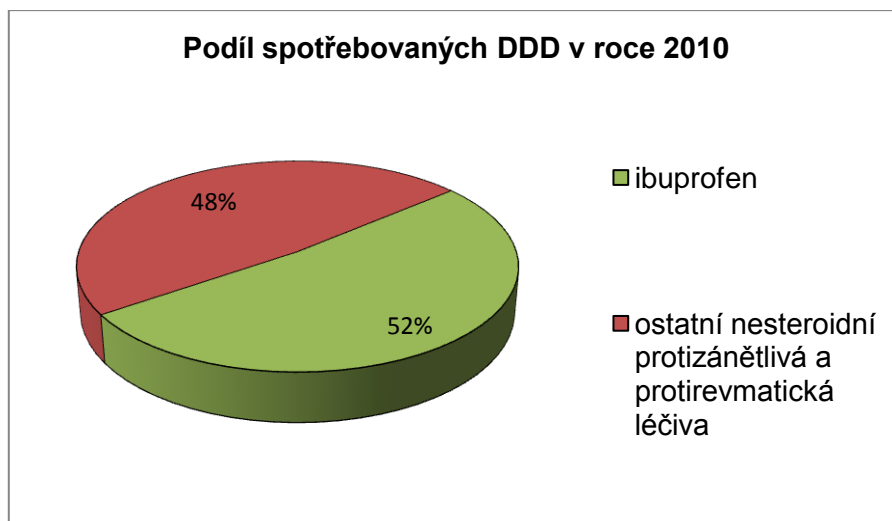
Spotřeba nesteroidních protizánětlivých a protirevmatických léčiv v roce 2011 byla 17 780 274 balení za průměrnou cenu 1 775 826 811 Kč, což odpovídá 218 822 412 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 57,0595 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na ibuprofen z toho připadá 9 503 954 balení za průměrnou cenu 623 326 203 Kč, což odpovídá 112 908 018 DDD, tj. 29,4416 DDD/t.o./d.

Na ibuprofen v kombinaci s jinými léčivy připadá 638 441 balení za průměrnou cenu 74 053 546 Kč. (MV AISLP; 2013.1)



Obr. č. 7: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2010



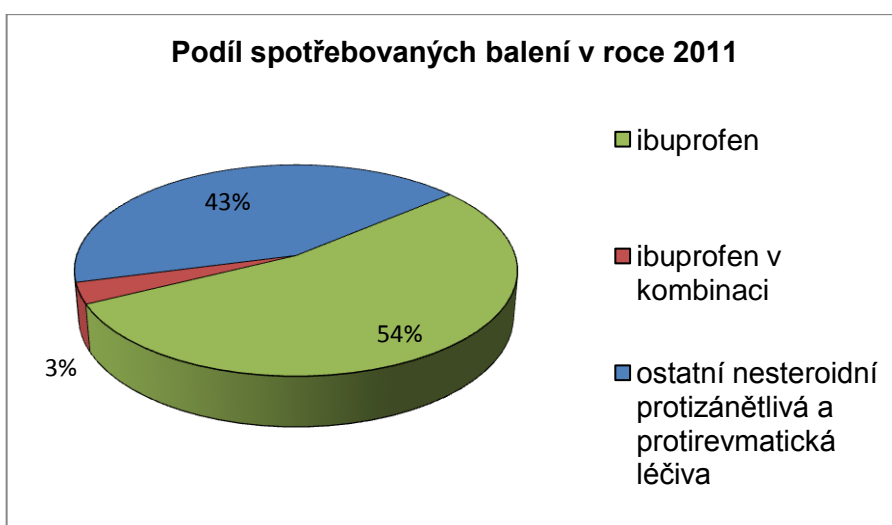
Obr. č. 8: Podíl spotřebovaných DDD ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2010

Spotřeba za rok 2011

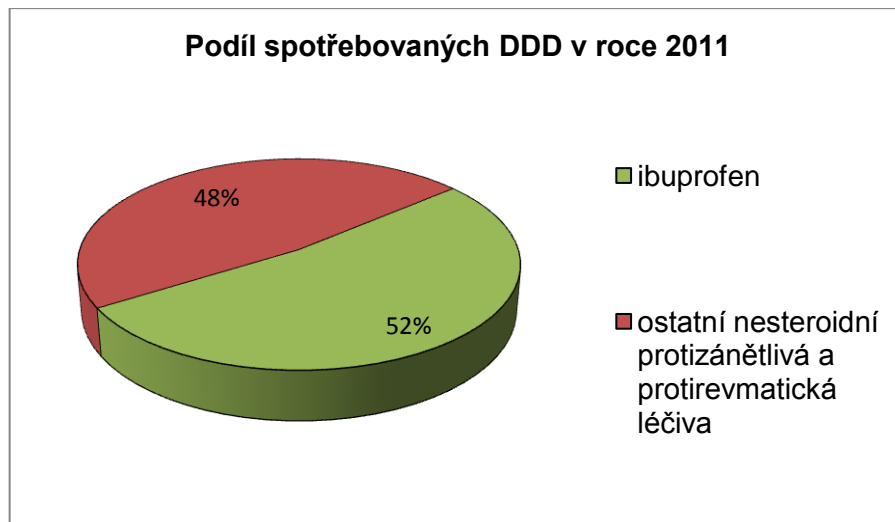
Spotřeba nesteroidních protizánětlivých a protirevmatických léčiv v roce 2011 byla 17 099 861 balení za průměrnou cenu 1 787 211 771 Kč, což odpovídá 220 727 532 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 57,4144 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na ibuprofen z toho připadá 9 207 503 balení za průměrnou cenu 626 624 061 Kč, což odpovídá 115 502 176 DDD, tj. 30,0438 DDD/t.o./d.

Na ibuprofen v kombinaci s jinými léčivy připadá 555 502 balení za průměrnou cenu 65 216 262 Kč. (MV AISLP; 2013.1)



Obr. č. 9: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2011



Obr. č. 10: Podíl spotřebovaných DDD ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2011

2.4.2.9. Ibuprofen v životním prostředí

Ibuprofen je v lidském organismu z velké části metabolizován. V nezměněné formě je z těla vyloučeno méně než 10 % podané dávky. Zbytek tvoří jeho metabolity 2-hydroxyibuprofen (9%), konjugovaný 2-hydroxyibuprofen (17%), karboxyibuprofen (16%), konjugovaný karboxyibuprofen (19%). (Moffat et al., 2004)

V Evropě se koncentrace ibuprofenu v odtoku ČOV pohybuje v rozmezí 134 - 7100 ng/l, v povrchových vodách pak v rozmezí 14 – 44 ng/l. (Pal et al., 2010) Koncentrace ibuprofenu v českých řekách je poměrně malá (Vltava a Jizera >2 ng/l, Ohře 6 ng/l), výjimkou je řeka Bílina 146 ng/l. (Wiegel et al., 2004)

2.5. Testované organismy

2.5.1. *Tetrahymena thermophila*, Nanney& McCoy



Obr. č. 11: *Tetrahymena thermophila*

(©2013, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/222>)

Taxonomické zařazení (Sedlák, 2009):

Nadříše	<i>Eukaryota</i>
Říše	<i>Protozoa</i> (prvoci)
Kmen	<i>Ciliophora</i> (nálevníci)
Třída	<i>Oligohymenophorea</i> (chudoblanní)
Řád	<i>Hymenostomatida</i>
Čeleď	<i>Tetrahymenidae</i> (vejcovkovití)
Rod	<i>Tetrahymena</i>
Druh	<i>Tetrahymena thermophila</i>

Tetrahymena thermophila je nejznámější a nejlépe prozkoumaný člen obrveného rodu *Tetrahymena*. (Collins, 2012)

Tetrahymena thermophila je vhodný modelový organismus pro molekulární výzkum na všech úrovních.

Obrvený jednobuněčný prvok tetrahymena je sladkovodní organismus, který obývá potoky, jezera, rybníky a lze jej nalézt téměř všude, v rozsahu klimatických podmínek. (<http://faculty.jsd.claremont.edu/ewiley/about.php>)

Tetrahymena thermophila je model eukaryotické buňky, ale není to model živočišné buňky. To jasně vyplývá z molekulární fylogeneze její RNA a

proteinových molekul, které jsou užitečné při zařazování tetrahymeny na správné místo mezi organismy.

Dojem z toho, že je podobný živočichovy, je posílen tím, že má všechny základní struktury živočišných buněk, s výjimkou středních vláken, a postrádá struktury charakteristické pro rostlinné buňky (chloroplasty, vakuolu, buněčnou stěnu), avšak, biochemicky tetrahymena pravděpodobně není blíže zvířatům, než rostlinám. (Asai et al., 2000)

Tetrahymena thermophila je velká, pohyblivá, fagotropní buňka. Její normální rozměry jsou cca 50 μm na délku a maximálně 20 μm na šířku. (Asai et al., 2000)

Tělo tetrahymeny je typicky hruškovitého tvaru, podle kterého je odvozeno její druhové jméno. Zadní konec je zaoblený a přední konec zašpičatělý. Občas lze vidět různé modifikace tvaru jako je vejčitý, okurkovitý, tyčkový, válcový, „bumerang“ a „banán“, zejména ve starých nebo přeplněných kulturách. Šestnáct až dvacet šest řad řasinek pokrývá většinu povrchu buněk a leží převážně rovnoběžně s podélnou osou buňky. (Hill, 1972)

Co je charakteristické pro nálevníky, včetně tetrahymeny, je jaderný dualismus a uspořádání struktur v povrchové oblasti buňky. (Asai et al., 2000)

Klíčem k užitečnosti tetrahymeny jako laboratorního organismu je její mimořádně rychlý růst v rámci jednoduchých a levných kultivačních podmínek. Se zdvojnásobením doby do 2 hodin, tetrahymena je jedním z nejrychleji množících se, volně žijících eukaryotických buněk. (Asai et al., 2000)

Generační doba tetrahymeny se liší v závislosti na použitém kmenu a podmínkách růstu, ale obecně je asi 3 nebo 4 hod. Teplota, při které je normálně dosaženo maximálního růstu, je asi 29 ° C, ale i to se mění s kmenem a složením média. (Hill, 1972)

Tetrahymena thermophila může velmi dobře růst v různých axenických médiích, s generačními časy obvykle v rozmezí 2-3 hod a optimálně 1,4 hod. (Kiy et al., 1992)

Zpravidla zůstávají kultury v rychlé exponenciální fázi růstu až asi na 2×10^5 buněk na mililitr a dosahují případně buněčné hustoty 1×10^6 buněk na mililitr nebo více. (Asai et al., 2000)

Chemicky definované médium pro tetrahymenu bylo poprvé navrženo v roce 1940 podle Kiddera a Deweye a od té doby se neustále zlepšuje. Poslední z těchto vylepšení umožňuje růst s generační dobou a případnou hustotou buněk srovnatelnou s vlastnostmi dosahovanými u nedefinovaných médií. (Asai et al., 2000)

Tetrahymeny poskytují jednoduchý, relativně levný způsob hodnocení inhibice látky. Samozřejmostí je, že inhibice jejího růstu nemusí vždy souviset s toxicitou pro jiné organismy.

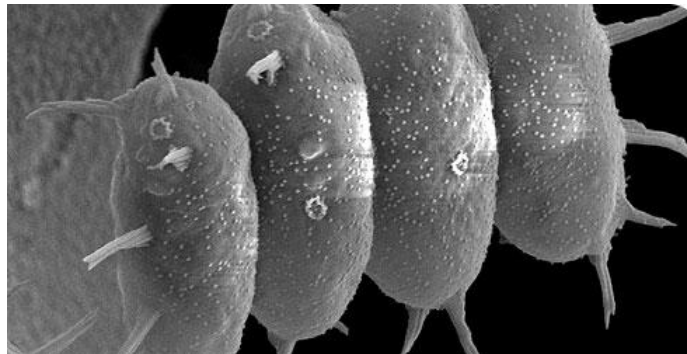
Hlavním důvodem úspěchu tetrahymeny jako experimentálního organismu je to, že je eukaryot, který může být pěstován ve velkém množství v médiích bez bakterií nebo dokonce i v definovaných médiích. Dále dělení jeho buněk lze snadno synchronizovat a jeho vnější membrána může být snadno narušena pro bezbuněčné studie. (Hill, 1972)

K dalšímu širšímu využití tohoto organismu přispělo také to, že byl detailně prozkoumán z pohledu genetiky. (Asai et al., 2000)

Teplotní šoky používané k navození synchronizace mají podstatný vliv na morfologii buněk. Tyto změny zahrnují ztrátu tubulárních struktur z mitochondrií, zmizení drsného endoplazmatického retikula, jaderné abnormality a bobtnání orgánů, které jsou peroxisomy primárních lysosomů. Buňky vystavené zahřívání někdy nedokončí dělení a vytvoří řetězy. Po ukončení tepelných šoků se řetězy rozpadnou a dají vzniknout normálním buňkám. (Hill, 1972)

Ačkoli není jasné, jaké konkrétní funkce přináší odpověď na teplotní šok a jím indukované stresové proteiny, evoluční zachování jejich syntézy v reakci na různé oblasti životního prostředí a vývojové podmínky naznačuje, že tyto proteiny mají zásadní význam pro přežití buněk. (Hallberg et al., 1984)

2.5.2. *Desmodesmus subspicatus*, Hegewald & Schmidt



Obr. č. 12: *Desmodesmus subspicatus*

(© 2013, The Natural History Museum, dostupné z <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/index.html>)

Taxonomické zařazení (<http://www.algaebase.org>, 2002):

Nadříše	<i>Eukaryota</i>
Říše	<i>Plantae</i>
Podříše	<i>Viridaeplantae</i>
Oddělení	<i>Chlorophyta</i>
Pododdělení	<i>Chlorophyceae</i>
Řád	<i>Sphaeropleales</i>
Čeleď	<i>Scenedesmaceae</i>
Rod	<i>Desmodesmus</i>
Druh	<i>Desmodesmus subspicatus</i>

Řasy jsou jednobuněčné nebo více buněčné autotrofní, většinou vodní organismy. (Špaček, 1999)

Zelené řasy jsou fotosyntetické organismy. Jejich barva je díky zelenému pigmentu chlorofylu, který je obklopen membránou a tvoří viditelnou strukturu nazvanou chloroplast. (Shubert, 2013)

Taxonomické členění tohoto druhově bohatého rodu není doposud ustálené a prochází změnami. (Hindák, 1990)

Rod *Desmodesmus* (dříve *Scenedesmus*) je znám a zkoumán téměř 200 let. V roce 1999, za použití molekulární analýzy byly neostnaté a ostnaté formy prokázány jako samostatné rody. Ty, jež tvoří ostny, se nyní nazývají

Desmodesmus sp. (An, Friedl, Hegewald). A neostnaté formy si zachovaly původní název *Scenedesmus* sp. (Shubert, 2013)

Desmodesmus subspicatus je velká (ale stále mikroskopická) sladkovodní zelená řasa, která může být nalezena rostoucí ve vodním sloupci jako volně plovoucí plankton. Je nepohyblivá.

Rod *Desmodesmus* je charakteristický plochými koloniemi, které jsou:

- rovné nebo lehce zakřivené, s buňkami v jedné řadě,
- obvykle 2 -, 4 -, nebo 8 - buněčné, méně často 16 - nebo 32 -, spojené postranně a ležící rovnoběžně vedle sebe,
- buňky jsou vejčité až elipsoidní, se zaoblenými hroty, a nesoucí dlouhé ostny nebo zuby,
- buněčná stěna může být zrnitá, ostnatá nebo ozubená, s výčnělky podobným bradavicím, buňky mají často žebrování,
- chloroplast je parietální s jedním pyrenoidem. (Schubert, 2013)

Řasy z třídy *Chlorophyceae* se mohou rozmnožovat pohlavně i nepohlavně. U volně žijících bičíkovců běžně probíhá schizotomie. Koloniální typy vytváří tzv. dceřiná coenobia. Kapsální, kokální a trichální typy se rozmnožují zoosporami, autosporami nebo aplanosporami. Jednotlivé rody i druhy stejných rodů se rozmnožují různě. Koloniální i trichální a heterotrichální typy se mohou pohlavně rozmnožovat izogamií, anizogamií nebo oogamií.

(<http://www.sinicearasy.cz>, 2013)

Nejvýznamnějším tvarovým typem je kolonie, může se však také vyskytovat jako jednobuněčný morf. Ten je produkován v rámci mateřské stěny buňky kolonie, a při uvolnění má stejnou morfologii stěny a ostnů jako buňky kolonie, pouze jich má více. Přeměna jednobuněčného morfu na kolonii může být "spuštěna" zvýšením koncentrace určitých látek (dusíku a fosforu), tzn. manipulací s koncentrací živin. K této přeměně může dojít v 24 hodinovém období. (Shubert, 2013)

Desmodesmus je kosmopolitní organismus, nachází se po celém světě. Je často zmiňován jako "zelený plevel" a pokud jsou přítomny nadměrné živiny, mohou se vytvořit podmínky pro kvetení, tzv. eutrofizace. (Shubert, 2013)

Většina druhů je součástí vodního planktonu stojatých i tekoucích vod, výjimečně se nachází i ve vlhkých skalách či v půdě. (Hindák, 1990)

Je základem potravinového řetězce a je důležitým zdrojem potravy pro zooplankton a ryby.

Desmodesmus může být užitečným bio-indikátorem výživových podmínek v jezerech a jako modelový organismus pro hodnocení fyziologických, ekologických a evolučních otázek. (Shubert, 2013)

V ekotoxikologických biotestech se nejčastěji používají řasy rodu *Desmodesmus* (dříve *Scenedesmus*), neboť kultivace jednotlivých druhů je až na výjimky relativně snadná a co do počtu popsáných druhů zaujímá tento rod první místo. (Kalina, 1995)

2.6. Použité testy

2.6.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Jde o vícegenerační test toxicity, protože v průběhu 24 hodin vznikne 5-6 generací prvoka. Test je založen na měření přeměny potravinového substrátu do biomasy obrvenek odečtem optické hustoty. (PROTOXKIT F™)

Na počátku testu se dává známé množství obrvenek a jejich potravy. Populace obrvenek inhibovaná přítomností toxické látky přijímá menší rychlostí potravu a tudíž dochází ke zpomalení rychlosti úbytku potravy v testované kultuře. Pokles rychlosti úbytku potravy sledujeme srovnáním jejího množství v testovaných koncentracích toxikantu a kontrolách. Množství potravy se stanovuje spektrofotometricky jako množství zákalu. Jelikož obrvenky přijímají potravu konstantní rychlostí, lze srovnáním rychlosti úbytku potravy v testovaných koncentracích a v kontrole již po 24 hodinové expozici pozorovat fyziologické účinky toxikantů. (Kočič et al., 2009)

Inhibice buněčného růstu pod toxickým stresem se odráží ve zbývajícím zákalu potravinové suspenze (a tudíž vyšší optická hustota) ve srovnání s kontrolou. (PROTOXKIT F™)

Průměrná inhibice růstu po 24h expozice je stanovena a vyjádřena jako 24hEC₅₀. (PROTOXKIT F™)

Pro svou diplomovou práci jsem použila modifikovaný vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*, vycházející z testu PROTOXKIT F™.

Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.3.1.

2.6.2. Řasový test toxicity s *Desmodesmus subspicatus*

Principem tohoto testu je stanovení účinku látek na růst sladkovodních mikrořas (řas a sinic). Exponenciálně rostoucí testované řasy jsou vystaveny zkoušené látce v průběhu obvykle 72 hodin. I přes poměrně krátkou dobou trvání zkoušky, mohou být vyhodnoceny účinky na několik generací. (OECD 201, 2002)

Díky rychlému nárůstu řas je možné kromě akutního působení pozorovat i chronické účinky testovaných látek. (Kočí et al., 2008)

Test spočívá v měření nárůstu řasové biomasy či růstové rychlosti v jednotlivých testovaných koncentracích ve srovnání s kontrolou.

Důležitou součástí řasového biotestu je stanovení koncentrace řas v zásobní kultuře i v jednotlivých testovaných koncentracích během expozice. Nejstarší a principiálně nejjednodušší metodou je určování řasových buněk pomocí mikroskopu a počítací komůrky. Koncentraci řas lze určit i spektrofotometricky. Používá se vlnová délka 670 - 680 nm odpovídající zabarvení chlorofylu, nebo vlnová délka 750 nm odpovídající zákalu. (Kočí et al., 2009)

Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice (snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur) a potom se vyhodnotí $72hIC_{50}$. V některých případech se účinek testované látky projeví jako stimulace (zvýšení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu k růstu kontrolních kultur), v tom případě se výpočet $72hIC_{50}$ neprovádí. Pokud testovaná látka působí stimulačně pouze v nízkých koncentracích a ve vyšších koncentracích působí inhibičně, vyhodnocuje se IC_{50} za použití koncentrací, kde byla prokázána inhibice růstu. (Svobodová et al., 2000)

Řasové testy vycházejí z norem OECD 201 a ČSN EN ISO 8692.

Pro svou práci jsem využila materiál testovací soupravy ALGALTOXKIT s řasou *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*).

Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.3.2.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Testované organismy

nálevník *Tetrahymena thermophila*

řasa *Desmodesmus subspicatus*

3.2. Chemikálie

- amoxicilin (výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- ibuprofen (výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- dichroman draselný (výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- deionizovaná voda
- pepton (výrobce: Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko)
- výživné roztoky A, B, C, D

Tab. č. 2: Složení živného média podle normy ČSN EN ISO 8692

Zásobní roztok	Živina
A	NH ₄ Cl MgCl ₂ .6H ₂ O CaCl ₂ .2H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄
B	FeCl ₃ .6H ₂ O Na ₂ EDTA.2H ₂ O
C	H ₃ B ₃ MnCl ₂ .4H ₂ O ZnCl ₂ CoCl ₂ .6H ₂ O CuCl ₂ .2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
D	NaHCO ₃

3.3. Provedení experimentu

3.3.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Příprava vzorku

Vzorek navážíme na analytických vahách a přidáme deionizovanou vodu, abychom dostali roztok o požadované koncentraci. Vytvoříme si ředící řadu o deseti koncentracích ředěním jedna a půl. Jako vzorek zkusíme amoxicilin a ibuprofen, buď samostatně, nebo v poměrech 1:1, 1:2, 2:1. Stejným ředěním připravíme i deset koncentrací dichromanu draselného, který slouží jako standardní testovaná látka, pro ověření správnosti průběhu experimentu.

Tab. č. 3: Přehled jednotlivých reálných koncentrací testovaných látek v mg/l

Roztok č.	Koncentrace vzorku	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$
1	25,00	288,00
2	16,67	192,00
3	11,11	128,00
4	7,41	85,33
5	4,94	56,89
6	3,29	37,93
7	2,19	25,28
8	1,46	16,86
9	0,98	11,24
10	0,65	7,49

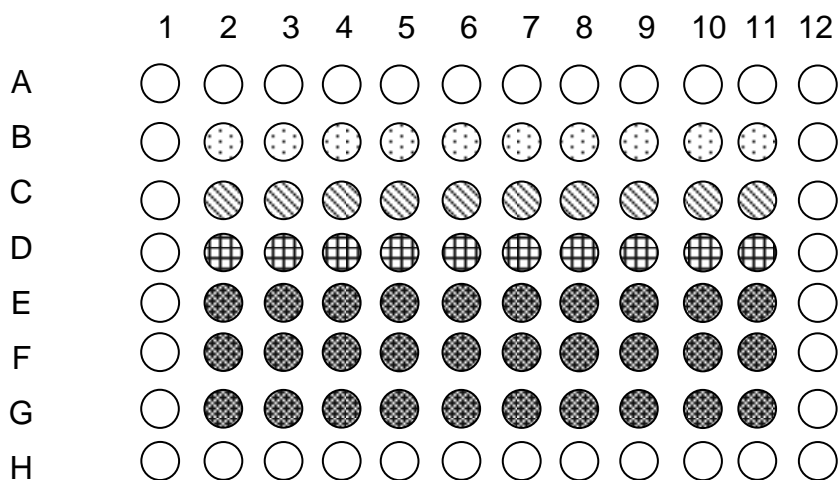
Příprava mikrotitrační destičky

V laminárním boxu pipetujeme vzorek, testovaný organismus a pepton podle níže uvedeného schématu. Mikrotitrační destička se plní pouze v řadách B, C, D, E, F, G a ve sloupcích 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Okrajové jamky zůstanou prázdné. Do všech jamek v řadě B pipetujeme pouze pepton (150 μ l), do jamek v řadě C pipetujeme pepton a vzorek podle koncentrace (v jamce E2 je nejvyšší

koncentrace, v jamce E11 nejnižší v poměru 2:1 (100 μ l: 50 μ l), do jamek řady D pipetujeme pepton a Tetrahymenu v poměru 2:1 (100 μ l: 50 μ l). V řadách E, F, G pipetujeme pepton, vzorek podle koncentrace a nakonec Tetrahymenu v poměru 1:1:1, tj. 50 μ l: 50 μ l: 50 μ l.

Tab. č. 4: Schéma plnění mikrotitrační destičky

	pepton	vzorek	Tetrahymena
B = pepton	150 μ l	-	-
C = pepton + vzorek	100 μ l	50 μ l	-
D = pepton + Tetrahymena	100 μ l	-	50 μ l
E = 1	50 μ l	50 μ l	50 μ l
F = 2	50 μ l	50 μ l	50 μ l
G = 3	50 μ l	50 μ l	50 μ l



Obr. č. 13: Schéma plnění mikrotitrační destičky

Měření optické hustoty

Ihned po připravení mikrotitrační destičky změříme na readeru optickou hustotu při vlnové délce 492nm. Pak dáme destičku inkubovat do inkubátoru za konstantní teploty 25°C. Další měření provádíme po 24hodinách.

Vyhodnocení

Z naměřených hodnot vypočítáme procenta inhibice pro každou koncentraci podle vzorce:

$$\left(1 - \frac{\Delta OD(C1-C10)}{\Delta OD(C0)}\right) \times 100$$

$\Delta OD_{(C1-C10)}$rozdíl naměřených optických hustot v čase T_0 a T_{24} pro jednotlivé koncentrace vzorku

$\Delta OD_{(C0)}$rozdíl naměřených optických hustot v čase T_0 a T_{24} pro kontrolu

Z těchto výsledků poté vypočteme hodnotu EC_{50} pomocí speciálního programu.

3.3.2. Řasový test toxicity s *Desmodesmus subspicatus*

Příprava kultivačního média pro řasy

Do odměrné baňky navážíme přibližně 800ml deionizované vody, přidáme 10ml roztoku A, 1ml roztoku B, 1ml roztoku C, 1ml roztoku D a poté doplníme vodou na 1000ml. Baňku zavřeme a důkladně protřepeme, abychom docílili homogenizace, a necháme 30 minut ustálit. Poté změříme pH a podle potřeby upravíme 1M NaOH nebo 1M HCl na požadované rozmezí $8,1 \pm 0,2$.

Příprava řas

Za účelem přizpůsobení testovací řasy podmínkám testu, je inokulum ve zkušebním médiu připraveno 2-3 dny před zahájením testu. Biomasu řas je třeba upravit tak, aby byl umožněn exponenciální růst očkovací kultury, až začne test. Očkovací kultura se inkubuje za stejných podmínek, za jakých bude probíhat vlastní test. Počáteční koncentrace buněk pro řasu *Desmodesmus subspicatus* se doporučuje $2-5 \times 10^3$ buněk/ml. Hustotu zásobní řasové kultury stanovíme počítáním buněk v Bürkerově komůrce. (OECD 201, 2002)

Příprava ředící řady vzorku

Jako testovaný vzorek nám slouží roztoky amoxicilinu a ibuprofenu buď jako čisté roztoky nebo v různých poměrech (1:1, 1:2, 2:1). Požadovanou koncentraci připravíme rozpuštěním látky v řasovém kultivačním médiu. Od každého takového vzorku připravíme sedm koncentrací ředěním jedna a půl. Nejvyšší koncentrace vzorku je v baňce č. 1, nejnižší pak v baňce č. 7.

Přidání řasového inokula

Do označených podlouhlých kyvet přeneseme 24 ml jednotlivých vzorků a ke každému vzorku přidáme 1ml řasového inokula. Vzorky důkladně protřepeme.

Kromě testovaných koncentrací je potřeba připravit i „kontrolu“ obsahující pouze médium a inokulum. (OECD 201, 2002)

Inkubace

Kyvety se inkubují 72 hodin při teplotě $21-24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a konstantním osvětlením 6000 - 10000 lux.

Vyhodnocení

Měříme fluorescenci řasové suspenze v průběhu tří dnů, v pravidelných intervalech po 24 hodinách.

Ve 24 hodinových intervalech provádíme také kontrolu růstu řas, zjištěním hustoty řasové suspenze, kterou získáme počítáním buněk v Bürkerově komůrce. Tyto hodnoty nám slouží k vytvoření kalibrační křivky.

Získané hodnoty odpovídající jednotlivým jamkám mikrotitrační destičky přepočteme na základě kalibrační křivky na koncentraci řas v roztoku.

Podle následujících vzorců vypočteme růstovou rychlost, inhibici růstové rychlosti, plochu pod křivkou a z ní procenta nárůstu biomasy řas:

$$\mu_C = \frac{\ln N_{72} - \ln N_0}{t}$$

$$I_C = \frac{\mu_K - \mu_C}{\mu_K} \times 100$$

μ_Crůstová rychlost pro jednotlivé koncentrace

μ_Krůstová rychlost kontroly

I_Cinhibice růstové rychlosti v procentech pro jednotlivé koncentrace

N_0počet buněk řas v 1ml v čase 0hod.

N_{72}počet buněk řas v 1ml v čase 72hod.

tdoba ukončení testu (hod.)

$$A_C = \frac{(c_1 - c_0) \times t_1}{2} + \frac{(c_1 + c_2 - 2 \times c_0) \times (t_2 - t_1)}{2} + \frac{(c_2 + c_3 - 2c_0) \times (t_3 - t_2)}{2}$$

$$I_C = \frac{A_K - A_C}{A_K} \times 100$$

A_Cplocha pod křivkou pro jednotlivé koncentrace

A_Kplocha pod křivkou pro kontrolu

I_Cinhibice nárůstu biomasy řas v procentech

c_{0-3}počet buněk řas v čase 0hod., 24hod., 48hod., 72hod.

t_{1-3} doba jednotlivých měření (24, 48, 72)

Z těchto výsledků pomocí speciálního počítačového programu získáme hodnotu EC_{50} .

4. VÝSLEDKY

4.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

- podmínky testu: tma, 25°C
- délka testu: 42 hodin
- testovaný organismus *Tetrahymena thermophila*

Tab. č. 5: Přehled jednotlivých reálných koncentrací testovaných látek v mg/l

	Koncentrace vzorku	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$
C ₁	25,00	288,00
C ₂	16,67	192,00
C ₃	11,11	128,00
C ₄	7,41	85,33
C ₅	4,94	56,89
C ₆	3,29	37,93
C ₇	2,19	25,28
C ₈	1,46	16,86
C ₉	0,98	11,24
C ₁₀	0,65	7,49

Dichroman draselný (K_2CrO_4)

Tab. č. 6: K_2CrO_4 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	84,10	76,15	76,15	68,20	60,20	44,3	20,5	12,55

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci K_2CrO_4 :

$$24h EC_{50} = 23,28 \text{ mg/l (20,55 - 26,36 mg/l)}$$

Amoxicilin

Tab. č. 7: Amoxicilin - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	90,83	81,65	72,48	63,30	63,30	54,13	26,61	17,43

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci amoxicilinu:

$$\mathbf{24h EC_{50} = 1,78 \text{ mg/l (1,56 - 2,03 mg/l)}}$$

Ibuprofen

Tab. č. 8: Ibuprofen - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	91,67	83,33	75,00	66,67	58,33	25,00	16,67

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci ibuprofenu:

$$\mathbf{24h EC_{50} = 1,53 \text{ mg/l (1,40 - 1,67 mg/l)}}$$

Amoxicilin + Ibuprofen 1:1

Tab. č. 9: Amoxicilin + Ibuprofen 1:1 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	83,47	75,21	60,89	58,68	42,15	25,62	17,36

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci amoxicilinu + ibuprofenu v poměru 1:1:

$$\mathbf{24h EC_{50} = 1,96 \text{ mg/l (1,79 - 2,16 mg/l)}}$$

Amoxicilin + Ibuprofen 1:2

Tab. č. 10: Amoxicilin + Ibuprofen 1:2 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	68,20	55,57	41,18	36,41	30,19	26,47

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci amoxicilinu + ibuprofenu v poměru 1:2:

$$24\text{h EC}_{50} = 2,18 \text{ mg/l (1,82 - 2,60 mg/l)}$$

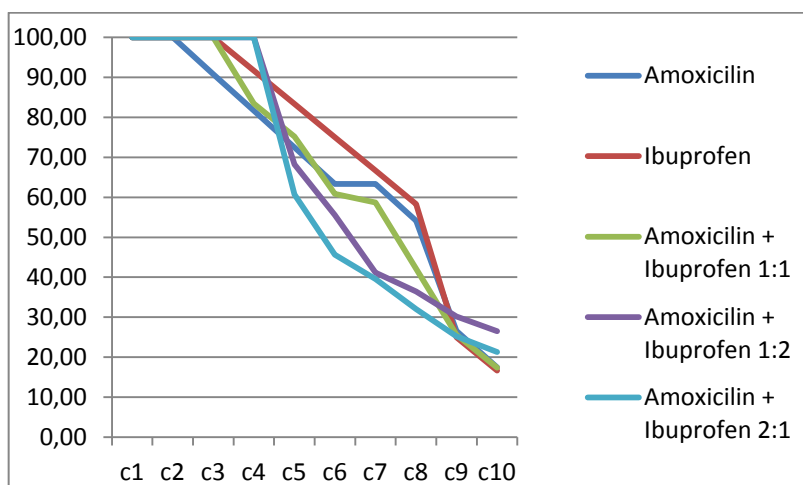
Amoxicilin + Ibuprofen 2:1

Tab. č. 11: Amoxicilin + Ibuprofen 2:1 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích, při vlnové délce 492 nm

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	60,66	45,62	39,55	31,99	25,23	21,32

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci amoxicilinu + ibuprofenu 2:1 v poměru:

$$24\text{h EC}_{50} = 2,57 \text{ mg/l (2,11 - 3,14 mg/l)}$$



Obr. č. 14: Graf závislosti inhibice (%) na koncentraci jednotlivých vzorků při 492 nm

4.2. Řasový test toxicity s *Desmodesmus subspicatus*

- podmínky testu: konstantní osvětlení 6 000 - 10 000 luxů, 21 - 24°C ± 2°C
- délka testu: 72 hodin
- testovaný organismus: *Desmodesmus subspicatus*

Tab. č. 12: Přehled jednotlivých reálných koncentrací testovaných látek

	koncentrace (mg/l)
C ₁	50,00
C ₂	33,33
C ₃	22,22
C ₄	14,81
C ₅	9,88
C ₆	6,58
C ₇	4,39

Amoxicilin

Tab. č. 13: Amoxicilin - % inhibice růstové rychlosti po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	64,70	48,16	47,69	41,86	34,00	33,53	15,55
750 nm	27,56	27,56	25,85	18,96	15,96	10,11	7,52

Tab. č. 14: Amoxicilin - % inhibice nárůstu biomasy po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	58,06	50,00	45,16	41,94	38,71	24,19	8,06
750 nm	56,72	55,22	46,27	44,78	44,78	38,81	34,33

Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace EC₅₀ amoxicilinu:

- z růstové rychlosti při 671 nm: **72h EC₅₀ = 25,96 mg/l (21,39 - 31,51 mg/l)**
- z růstové rychlosti při 750 nm: **72h EC₅₀ = 201,2 mg/l (117,4 - 344,8 mg/l)**

- z nárůstu biomasy při 671 nm: **72h EC₅₀ = 28,54 mg/l (20,86 - 39,04 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 750 nm: **72h EC₅₀ = 23,64 mg/l (20,42 - 27,37 mg/l)**

Ibuprofen

Tab. č. 15: Ibuprofen - % inhibice růstové rychlosti po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	100,00	48,55	44,41	40,95	39,05	33,76	33,53
750 nm	41,51	25,47	22,00	21,92	21,92	18,24	15,96

Tab. č. 16: Ibuprofen - % inhibice nárůstu biomasy po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	56,45	43,55	27,42	20,97	17,74	16,13	9,68
750 nm	71,64	56,72	49,25	38,81	29,85	28,36	17,91

Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace EC₅₀ ibuprofenu:

- z růstové rychlosti při 671 nm: **72h EC₅₀ = 16,77 mg/l (10,74 - 26,18 mg/l)**
- z růstové rychlosti při 750 nm: **72h EC₅₀ = 167,0 mg/l (77,89 - 358,2 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 671 nm: **72h EC₅₀ = 43,81 mg/l (38,29 to 50,13 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 750 nm: **72h EC₅₀ = 22,37 mg/l (20,61 to 24,29 mg/l)**

Amoxicilin + Ibuprofen 1:1

Tab. č. 17: Amoxicilin + Ibuprofen 1:1 - % inhibice růstové rychlosti po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	53,85	19,01	18,94	17,80	14,60	14,20	7,70
750 nm	34,33	29,04	27,56	26,56	17,62	7,52	3,19

Tab. č. 18: Amoxicilin + Ibuprofen 1:1 - % inhibice nárůstu biomasy po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	56,45	54,84	38,71	22,58	14,52	11,29	8,06
750 nm	59,70	44,78	29,85	13,43	8,96	5,97	1,49

Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace EC₅₀ směsi amoxicilin + ibuprofen v poměru 1:1 :

- z růstové rychlosti při 671 nm: **72h EC₅₀ = 66,44 mg/l (40,75 - 108,3 mg/l)**
- z růstové rychlosti při 750 nm: **72h EC₅₀ = 102,2 mg/l (61,17 - 170,7 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 671 nm: **72h EC₅₀ = 34,52 mg/l (31,03 - 38,40 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 750 nm: **72h EC₅₀ = 38,62 mg/l (37,11 - 40,18 mg/l)**

Amoxicilin + Ibuprofen 1:2

Tab. č. 19: Amoxicilin + Ibuprofen 1:2 - % inhibice růstové rychlosti po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	38,65	35,06	29,24	28,45	23,61	22,84	21,10
750 nm	34,33	30,14	24,19	23,53	18,52	14,43	4,35

Tab. č. 20: Amoxicilin + Ibuprofen 1:2 - % inhibice nárůstu biomasy po 72 hod

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	41,94	40,32	35,48	32,26	20,97	19,35	19,35
750 nm	58,21	55,22	53,73	52,24	37,31	35,82	31,34

Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace EC₅₀ směsi amoxicilin + ibuprofen v poměru 2:1 :

- z růstové rychlosti při 671 nm: **72h EC₅₀ = 191,7 mg/l (142,3 - 258,1 mg/l)**
- z růstové rychlosti při 750 nm: **72h EC₅₀ = 123,5 mg/l (80,98 - 188,3 mg/l)**

- z nárůstu biomasy při 671 nm: **72h EC₅₀ = 77,56 mg/l (58,21 - 103,3 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 750 nm: **72h EC₅₀ = 20,23 mg/l (16,96 - 24,13 mg/l)**

Amoxicilin + Ibuprofen 2:1

Tab. č. 21: Amoxicilin + Ibuprofen 2:1 - % inhibice růstové rychlosti po 72 hod

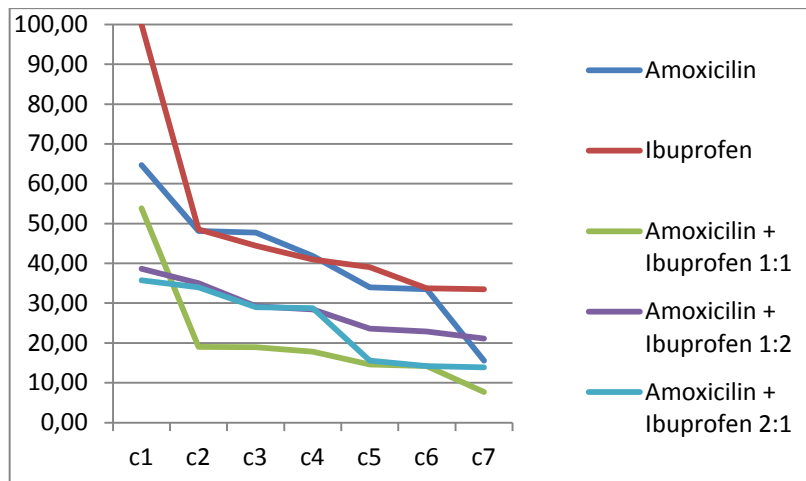
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	35,74	34,00	28,96	28,78	15,55	14,20	13,91
750 nm	31,00	30,14	26,56	25,85	23,53	18,96	7,52

Tab. č. 22: Amoxicilin + Ibuprofen 2:1 - % inhibice nárůstu biomasy po 72 hod

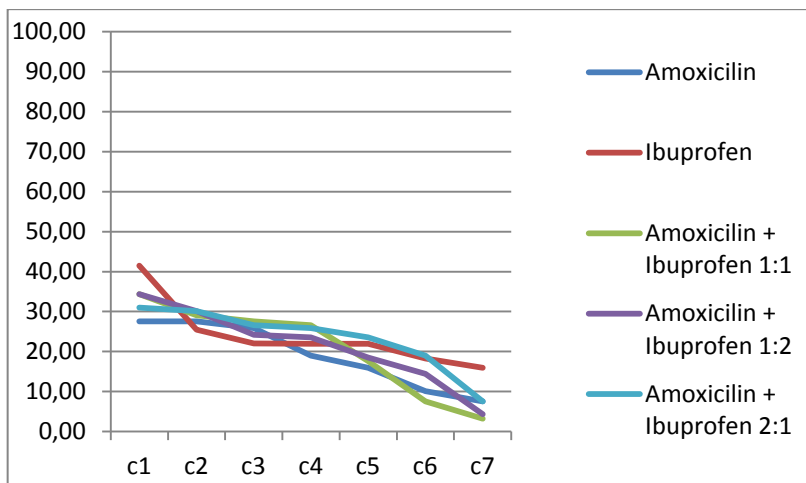
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
671 nm	48,39	16,13	16,13	12,90	9,68	4,84	3,23
750 nm	67,16	53,73	50,75	40,30	37,31	22,39	16,42

Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme stanovili hodnotu střední efektivní koncentrace EC₅₀ směsi amoxicilin + ibuprofen v poměru 2:1 :

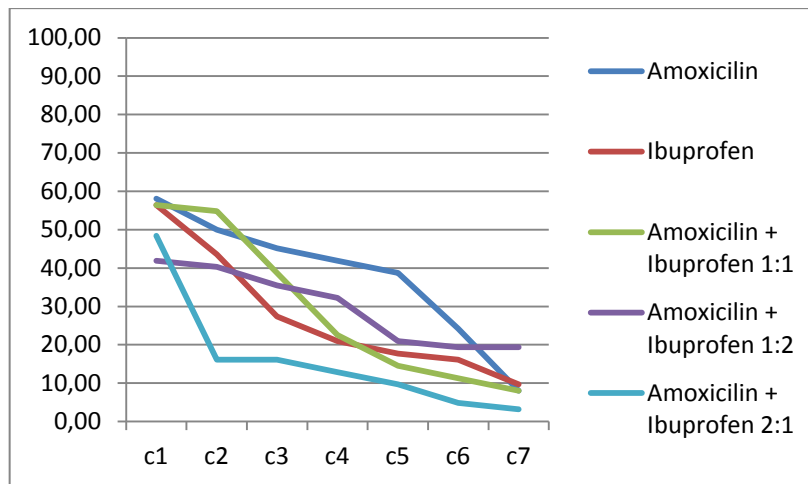
- z růstové rychlosti při 671 nm: **72h EC₅₀ = 116,6 mg/l (75,67 - 179,6 mg/l)**
- z růstové rychlosti při 750 nm: **72h EC₅₀ = 229,3 mg/l (90,50 - 580,9 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 671 nm: **72h EC₅₀ = 61,49 mg/l (47,26 - 80,00 mg/l)**
- z nárůstu biomasy při 750 nm: **72h EC₅₀ = 23,26 mg/l (20,99 - 25,78 mg/l)**



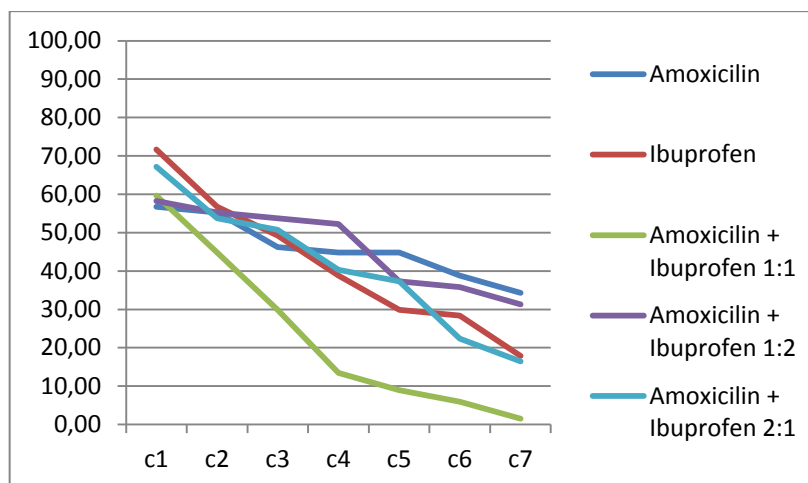
Obr. č. 15: Graf závislosti inhibice (z růstové rychlosti) na koncentraci jednotlivých vzorků při 671 nm



Obr. č. 16: Graf závislosti inhibice (z růstové rychlosti) na koncentraci jednotlivých vzorků při 750 nm



Obr. č. 17: Graf závislosti inhibice (z nárůstu biomasy) na koncentraci jednotlivých vzorků při 671 nm



Obr. č. 18: Graf závislosti inhibice (z nárůstu biomasy) na koncentraci jednotlivých vzorků při 750 nm

5. DISKUZE

Amoxicilin a ibuprofen patří v České republice, ale i po celém světě mezi léčiva s nejvyšší spotřebou. V důsledku toho se očekává jejich zvýšený výskyt v životním prostředí oproti ostatním méně používaným léčivům. Z pohledu ochrany životního prostředí je tedy dobré vědět, v jakém množství se tyto látky v životním prostředí vyskytují a jaký na něj mají účinek.

V Evropě se koncentrace ibuprofenu v odtoku ČOV pohybuje v rozmezí 134 - 7100 ng/l, v povrchových vodách pak v rozmezí 14 – 44 ng/l. (Pal et al., 2010) Peniciliny se vyskytují ve výtoku ČOV v koncentracích do 200 ng/l, v povrchových vodách pak v koncentracích do 48 ng/l. (Färber, 2002; Christian et al., 2003)

Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv těchto léčivých látek a jejich směsi na životní prostředí pomocí vybraných ekotoxikologických testů. Ibuprofen je tématem ekotoxikologických studií poměrně často, zatímco studií zabývajících se hodnocením amoxicilinu mnoho není.

Obě tyto látky byly již ve směsích hodnoceny, ale pouze s látkami ze stejné skupiny (ibuprofen s ostatními NSAID, amoxicilin s ostatními antibiotiky). Láng a Kóhidai (2012) ve své studii zjistili, že kombinace ibuprofenu a diklofenaku působí antagonisticky (což lze možná vysvětlit stejným mechanismem účinku těchto léčiv) a kombinace ibuprofenu s β -blokátory (metoprolol, propranolol) působí při nízkých koncentracích aditivně, při vyšších pak také antagonisticky. Cleuvers (2003) se zabýval hodnocením směsi ibuprofenu, diklofenaku, naproxenu a kyseliny acetylsalicylové. Hodnota EC_{50} pro ibuprofen ve směsi byla 85,6 mg/l pro *D. subspicatus* a 25,3 mg/l z testu pro *Daphnia magna*. Vzájemné působení těchto látek bylo vyhodnoceno jako aditivní.

Prvním zvoleným testem byl vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila* (zástupce destruentů). Zkoušené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 25,00 – 0,65 mg/l pro jednotlivé vzorky a byly zjištěny tyto hodnoty

střední efektivní koncentrace: $24hEC_{50} = 1,78 \text{ mg/l}$ (1,56 - 2,03 mg/l) pro amoxicilin, $24hEC_{50} = 1,53 \text{ mg/l}$ (1,40 - 1,67 mg/l) pro ibuprofen, $24hEC_{50} = 1,96 \text{ mg/l}$ (1,79 - 2,16 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:1, $24hEC_{50} = 2,18 \text{ mg/l}$ (1,82 - 2,60 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:2, $24hEC_{50} = 2,57 \text{ mg/l}$ (2,11 - 3,14 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 2:1.

Druhým zvoleným testem byl řasový test toxicity s organismem *Desmodesmus subspicatus* (zástupce producentů) vycházející z normy OECD 201 a ČSN EN ISO 8692. Zde byla zvolena výchozí koncentrace vyšší, tj. 50 mg/l. Hodnotu střední efektivní koncentrace jsme spočítali pomocí dvou různých metod – z růstové rychlosti a z nárůstu biomasy, při vlnové délce 671 nm odpovídající zabarvení chlorofylu a vlnové délce 750 nm odpovídající zákalu.

Pro amoxicilin byly získány tyto hodnoty:

z růstové rychlosti při 671 nm: $72h EC_{50} = 25,96 \text{ mg/l}$ (21,39 - 31,51 mg/l),
z růstové rychlosti při 750 nm: $72h EC_{50} = 201,2 \text{ mg/l}$ (117,4 - 344,8 mg/l),
z nárůstu biomasy při 671 nm: $72h EC_{50} = 28,54 \text{ mg/l}$ (20,86 - 39,04 mg/l),
z nárůstu biomasy při 750 nm: $72h EC_{50} = 23,64 \text{ mg/l}$ (20,42 - 27,37 mg/l).

Pro ibuprofen byly získány tyto hodnoty:

z růstové rychlosti při 671 nm: $72h EC_{50} = 16,77 \text{ mg/l}$ (10,74 - 26,18 mg/l),
z růstové rychlosti při 750 nm: $72h EC_{50} = 167,0 \text{ mg/l}$ (77,89 - 358,2 mg/l),
z nárůstu biomasy při 671 nm: $72h EC_{50} = 43,81 \text{ mg/l}$ (38,29 to 50,13 mg/l),
z nárůstu biomasy při 750 nm: $72h EC_{50} = 22,37 \text{ mg/l}$ (20,61 to 24,29 mg/l).

Pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:1 byly získány tyto hodnoty:

z růstové rychlosti při 671 nm: $72h EC_{50} = 66,44 \text{ mg/l}$ (40,75 - 108,3 mg/l),
z růstové rychlosti při 750 nm: $72h EC_{50} = 102,2 \text{ mg/l}$ (61,17 - 170,7 mg/l),
z nárůstu biomasy při 671 nm: $72h EC_{50} = 34,52 \text{ mg/l}$ (31,03 - 38,40 mg/l),
z nárůstu biomasy při 750 nm: $72h EC_{50} = 38,62 \text{ mg/l}$ (37,11 - 40,18 mg/l).

Pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:2 byly získány tyto hodnoty:

z růstové rychlosti při 671 nm: $72h EC_{50} = 191,7 \text{ mg/l}$ (142,3 - 258,1 mg/l),
z růstové rychlosti při 750 nm: $72h EC_{50} = 123,5 \text{ mg/l}$ (80,98 - 188,3 mg/l),
z nárůstu biomasy při 671 nm: $72h EC_{50} = 77,56 \text{ mg/l}$ (58,21 - 103,3 mg/l),
z nárůstu biomasy při 750 nm: $72h EC_{50} = 20,23 \text{ mg/l}$ (16,96 - 24,13 mg/l).

Pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 2:1 byly získány tyto hodnoty:
z růstové rychlosti při 671 nm: 72h EC₅₀ = 116,6 mg/l (75,67 - 179,6 mg/l),
z růstové rychlosti při 750 nm: 72h EC₅₀ = 229,3 mg/l (90,50 - 580,9 mg/l),
z nárůstu biomasy při 671 nm: 72h EC₅₀ = 61,49 mg/l (47,26 - 80,00 mg/l),
z nárůstu biomasy při 750 nm: 72h EC₅₀ = 23,26 mg/l (20,99 - 25,78 mg/l).

Oproti výpočtu inhibice z nárůstu biomasy (srovnáváním ploch pod růstovými křivkami) metoda růstových rychlostí lépe vystihuje vliv toxikantu na okamžitý růst řas. (Kočí et al., 2009)

Způsob výpočtu inhibic na základě růstových rychlostí je vhodný pouze pro exponenciální fázi růstové křivky. Hodnoty ze stacionární fáze či fáze poklesu zatěžují výpočet chybou a neměly by být do výpočtu zahrnuty. Metoda se tedy hodí pro krátkodobější expozici, pro zaznamenání trendů. Tento způsob výpočtu je nyní v praxi více používán, což souvisí s používanou krátkodobou expozicí (72 hodin). (Kočí et al., 2009)

Pro dlouhodobou expozici řasové kultury je vhodnější výpočet inhibice růstu biomasy. Do výpočtu může být zahrnuta i fáze poklesu řasové suspenze způsobená začínajícím vyčerpáním živin z média. (Kočí et al., 2009)

V ideálních podmínkách s konstantním exponenciálním růstem při stejných koncentracích by měly tyto metody výpočtu z růstové rychlosti a nárůstu biomasy produkovat stejné výsledky. Obecně by mezi takovými výsledky měly být pouze drobné rozdíly a data mohou být analyzovány pomocí stejných statistických metod. (OECD 201, 2002)

V současnosti platná ISO norma doporučuje používat výpočet z průměrné růstové rychlosti.

Kromě těchto dvou metod výpočtu ovlivňuje konečný výsledek i použitá vlnová délka při spektrofotometrii. Buď se měří fluorescence při vlnové délce 671 nm odpovídající množství chlorofylu, nebo se měří zákal při 750 nm.

Metoda stanovení chlorofylu má výhodu v tom, že není zatížena nepřesností v důsledku přítomnosti bakterií a nerozpuštěných částic, jež se mohou vyskytnout u nesterilních vzorků z životního prostředí. (Kočí et al., 2008)

Metoda stanovení zákalu je naopak někdy upřednostňována na základě předpokladu, že se koncentrace chlorofylu v buňce vlivem fyziologických

pochodů přirozeně mění. Zákal tedy přesněji popisuje množství buněk v suspenzi. Je však nutné brát v úvahu, že jednotlivé buňky se liší velikostí a tím se i mění hodnota zákalu. Zákal lze také konvertovat na sušinu, která lépe vypovídá o celkovém objemu řas v roztoku, protože v sobě nezahrnuje rozdíly ve velikosti buněk. (Kočí et al., 2008)

Cleuvers (2004) zjišťoval toxicitu 4 nesteroidních antiflogistik: diklofenaku, ibuprofenu, naproxenu a acetylsalicylové kyseliny. Akutní toxicitu sledoval na korýši *Daphnia* a na řase *Scenedesmus subspicatus*. Nalezl jen dvě léčiva, která by mohla být potencionálně škodlivá k vodním organismům - diklofenak a acetylsalicylovou kyselinu. Ibuprofen dosáhl hodnot EC_{50} v řasovém testu 342,2 mg/l a v testu na dafniích 101,2 mg/l.

Láng a Kőhidai ve své studii z roku 2012 sledovali toxicitu 14 léčiv ze skupiny NSAID, antipyretik, analgetik, antibiotik, β -blokátorů a rentgenkontrastních látek na *Tetrahymena pyriformis*. Zjistili, že získané hodnoty EC_{50} (46,78 mg/l pro ibuprofen) jsou srovnatelné s údaji ze studie od Cleuverse (2003), který uvádí, že citlivost testu s *Daphnia magna*, *Lemna minor* a *Desmodesmus subspicatus* byla ve stejném rozsahu (hodnoty EC_{50} se pohybovaly mezi 5 mg/l a > 320 mg/l).

Ukázalo se, že *Tetrahymena pyriformis* byla nejcitlivější na β -blokátory a NSAID. Nicméně, výsledky ukazují, že pozorovaná účinná koncentrace je nejméně o tři řády vyšší, než koncentrace v prostředí, což naznačuje, že akutní toxické účinky těchto léčiv jsou ve vodním prostředí nepravděpodobné. (Láng et al., 2012)

Jak již bylo zmíněno výše, Cleuvers v roce 2003 publikoval studii zaměřenou na stanovení toxicity léčiv, mezi nimi i sodné soli ibuprofenu (v koncentracích 1; 3,2; 10; 32; 100 mg/l). Získal hodnoty EC_{50} pro jednotlivé organismy: 108 mg/l (*Daphnia magna*), 315 mg/l (*Desmodesmus subspicatus*) a 22 mg/l (*Lemna minor*).

Většina autorů, která studovala vliv amoxicilinu na životní prostředí, využívala především řasové testy toxicity.

Řasová toxicita amoxicilinu byla studována skupinou okolo Holten-Lützhøfta (1999). U sladkovodní sinice *Microcystis aeruginosa* byla zjištěna hodnota toxicity EC₅₀ pro amoxicilin 0,0037 mg/l, pro mořskou řasu *Rhodomonas salina* 3108 mg/l a pro sladkovodní zelenou řasu *Selenastrum capricornutum* byla zjištěna hodnota NOEC větší než 250 mg/l.

Řasové biologické zkoušky ukázaly, že v rozsahu koncentrací od 50 ng/l do 50 mg/l není amoxicilin toxický vůči eukaryotickým organismům, jako jsou řasy z čeledí Chlorophyceae *Pseudokirkneriella subcapitata* a *Closterium ehrenbergii* a Bacillariophyceae *Cyclotella meneghiniana*, ale ukázal značnou toxicitu vůči Cyanophyta *Synechococcus leopolensis*. (Andreozzi et al., 2004)

Skupina kolem Liua (2012) se zabývala působením dvou antibiotik, spiramycinu a amoxicilinu. V této studii byly hodnoty EC₅₀ amoxicilinu na *M. aeruginosa* podstatně nižší (8,03 mg/l) ve srovnání s výsledky na jiných druhích řas v předchozích výzkumech, které byly 3108 mg/l pro *Rhodomonas salina*, >250 mg/l pro *Selenastrum capricornutum* (Holten-Lützhøft et al., 1999) a >1000 mg/l pro *Chlorella vulgaris* (Eguchi et al., 2004).

Ze zkoušky na luminiscenčních bakteriích byla získána hodnota EC₅₀ pro amoxicilin 121,1 mg/l (115,8 - 136,7 mg/l). (Liu et al., 2012)

Pascoe a kol. (2003) studovali účinky léčiv na sladkovodní bezobratlé organismy (*Hydra vulgaris*). Pro ibuprofen i amoxicilin stanovili hodnotu NOEC > 0,01 mg/l.

Skupina kolem Cranea (2006) zjistila, že mikrořasy a sinice (jako *Microcystis aeruginosa*) jsou značně citlivé na antibiotika, více než standardní druhy řasových testů toxicity (jako *Pseudokirkneriella subcapitata*).

Jelikož je amoxicilin těžce rozpustný ve vodě a ibuprofen prakticky nerozpustný ve vodě, přes veškerá snažení o rozpuštění mohlo dojít při měření ke zkreslení výsledků z důvodu nerozpuštěných částic.

Z našich výsledků lze usoudit, že organismus *Tetrahymena thermophila* vykazuje vyšší citlivost k těmto látkám než *Desmodesmus subspicatus* (hodnoty

EC₅₀ pro *T. thermophila* byly v řádu jednotek mg/l, pro *D. subspicatus* v řádu desítek až stovek mg/l).

Z výsledků pro čisté látky a jejich směs lze usoudit, že nedošlo ke vzájemnému ovlivnění a látky tedy nepůsobí synergicky.

6. ZÁVĚR

V této práci jsme si dali za cíl stanovit vliv léčiv amoxicilinu a ibuprofenu a jejich směsi v různých poměrech na životní prostředí, a to pomocí vybraných ekotoxikologických testů na zástupcích dvou trofických úrovní.

Jako zástupce producentů byl zvolen organismus *Desmodesmus subspicatus*, jako zástupce destruentů byl zvolen organismus *Tetrahymena thermophila*.

Vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena thermophila* sloužil ke zjištění subchronické toxicity po 24 hodinové expozici. Testované koncentrace byly v rozsahu 25,00 – 0,65 mg/l. V nejvyšší koncentraci došlo k 100% inhibici. Stanovili jsme střední efektivní koncentraci jednotlivých vzorků při vlnové délce 492 nm: 24hEC₅₀ = 1,78 mg/l (1,56 - 2,03 mg/l) pro amoxicilin, 24hEC₅₀ = 1,53 mg/l (1,40 – 1,67 mg/l) pro ibuprofen, 24hEC₅₀ = 1,96 mg/l (1,79 - 2,16 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:1, 24hEC₅₀ = 2,18 mg/l (1,82 - 2,60 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:2, 24hEC₅₀ = 2,57 mg/l (2,11 – 3,14 mg/l) pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 2:1.

Řasový test toxicity s řasou *Desmodesmus subspicatus* sloužil ke stanovení semichronické toxicity po 72 hodinové expozici. Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 50,00 – 4,39 mg/l. Hodnotu střední efektivní koncentrace jsme spočítali pomocí dvou různých metod – z růstové rychlosti a z nárůstu biomasy, při vlnové délce 671 nm odpovídající zabarvení chlorofylu a vlnové délce 750 nm odpovídající zákalu.

Pro amoxicilin se hodnoty 72hEC₅₀ pohybovaly v rozmezí 23,64 - 201,2 mg/l, pro ibuprofen v rozmezí 16,77 - 167,0 mg/l, pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:1 v rozmezí 34,52 - 102,2 mg/l, pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 1:2 v rozmezí 20,23 - 191,7 mg/l a pro směs amoxicilinu a ibuprofenu v poměru 2:1 v rozmezí 23,26 - 229,3 mg/l.

Podle dosažených výsledků se zdá být citlivějším organismem prvok *Tetrahymena thermophila*. Z výsledků pro jednotlivé látky a jejich směsi v různých poměrech lze usuzovat, že kombinace těchto látek nevyvolává synergické působení na organismy v životním prostředí.

7. SEZNAM LITERATURY

ALGALTOXKIT FTM – Freshwater Toxicity Test with Microalgae, Standard Operational Procedure. MicroBioTests Inc., Mariakerke (Gent), Belgium.

Ambrožová, J.: Aplikovaná a technická hydrobiologie. 2. vyd., VŠCHT, Praha, 2003, s. 194, 211.

Andreozzi, R.; Caprio, V.; Ciniglia, C. et al.: Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, **38**, 2004, s. 6832–6838.

Asai, D. J.; Forney, J. D.: Methods in Cell Biology, Volume 62, Tetrahymena thermophila, Academic Press, USA, 2000, s. 28-35, 190.

Bound, J. P.; Voulvoulis, N.: Pharmaceuticals in the aquatic environment - a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere*, **56**, 2004, s. 1143–1155.

Boxall, A. B. A.: The environmental side effects of medication. *EMBO reports*, **5**, 2004, s. 1110–1116.

Boxall, A. B. A.; Fogg, L. A.; Blackwell, P. A. et al.: Veterinary Medicines in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, **180**, 2004, s. 2.

Castensson, S.; Gunnarsson, B.: Environment and Pharmaceuticals. Apoteket AB, Stockholm, 2006, s. 15.

Cleuvers, M.: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effect. *Toxicology Letters*, **142**, 2003, s. 185–194.

Clevers, M.: Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, **59**, 2004, s. 309-315.

Collins, K.: *Methods in Cell Biology, Volume 109, Tetrahymena Thermophila*, 1.vyd., Elsevier Inc. (Academic Press), USA, 2012, s. 12.

Crane, M.; Watts, Ch.; Boucard, T.: Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, **367**, 2006, s. 23–41.

Český Lékopis 2009 (ČL 2009), Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX). 2. díl, 1. vyd., Grada Publishing a. s., Praha, 2009, s. 1350, 2301.

ČSN EN ISO 8692, Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas, 2012.

Devillers, J.: *Ecotoxicology Modeling, Emerging Topics in Ecotoxicology, Principles, Approaches and Perspectives, Vol. 2*, Springer, New York, 2009, předmluva.

Eguchi, K.; Nagase, H.; Ozawa, M. et al.: Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, **57**, 2004, s. 1733–1738.

Färber, H.: Antibiotika im Krankenhausabwasser (Antibiotics in the hospital sewage). *Hygiene & Medizin*, **27**, 2002, s. 35.

Fendrich, Z.: Přednáška z Farmakologie – Antiflogistika a antirevmatika, akademický rok 2011/2012.

Fernandez-Torres, R.; Olías Consentino, M.; Bello Lopez, M. A. et al.: Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography–diode array–fluorescence (HPLC–DAD–FLD) in human urine samples. *Talanta*, **81**, 2010, s. 871–880.

Hallberg, R. L.; Kraus, K. W.; Findly, R. C.: Starved *Tetrahymena thermophila* Cells That Are Unable to Mount an Effective Heat Shock Response Selectively Degrade Their rRNA. *Molecular and Cellular Biology*, American Society for Microbiology, **4**, 1984, s. 2170-2179.

Halling-Sørensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F. et al.: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. *Chemosphere*, **36**, 1998, s. 357–393.

Hill, D. L.: *The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena*, Academic Press, USA, 1972, s. 1-5, 14-19, 196-199.

Hindák, F.: *Studies on the Chlorococcal algae (Chlorophyceae)*. Vydavateľ'stvo VEDA, Bratislava, 1990.

Holten-Lützhøft, H. C.; Halling-Sørensen, B.; Jørgensen, S. E.: Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish fading. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36**, 1999, s. 1–6.

<http://faculty.jsd.claremont.edu/ewiley/about.php> (staženo 23.3.2013).

http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443
(staženo 18.3.2013).

http://www.biohidrica.cl/pdfs/algaltokit_f-protocol.pdf (staženo 4.1.2013).

<http://www.microbiotests.be/toxkits/algaltokitf.pdf> (staženo 4.1.2013).

<http://www.microbiotests.be/toxkits/protoxkitf.pdf> (staženo 4.1.2013).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/222> (staženo 23.3.2013).

<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/index.html> (staženo 17.3.2013).

<http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyceae> (staženo 17.3.2013).

<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 14.3.2013).

Hynie, S.: Farmakologie v kostce. 2. vyd., Triton, Praha, 2001, s., 200, 396.

Christian, T.; Schneider, R. J.; Färber, H. A. et al.: Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31, 2003, s. 36–44.

Jeřábek, J.: Metabolismus a účinky eikosanoidů. 2011, dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Neopioidn%C3%AD_analgetika (staženo 10.1.2012).

Kalina, T.: Systém a vývoj sinic a řas. Vydavatelství Karolinum, Praha, 1995.

Kiy, T.; Tiedtke, A.: Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena* in a perfused bioreaktor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 1992, s. 141-146.

Kiy, T.; Tiedtke, A.: Mass cultivation of *tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 1992, s. 576-579.

Kočí, V.; Mlejnek, M.: Řasový mikrobiotest, 2008, dostupný z: <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/mikrometodaras.htm> (staženo 2.10.2012).

Kočí V.; Mocová, K.: Ekotoxikologie pro chemiky. 1. vyd., VŠCHT, Praha, 2009, s. 13, 14, 20, 111, 112, 114, 125, 199.

Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z. et al.: Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chemické Listy*, **103**, 2009, s. 540-547.

Kümmerer, K.: Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, **75**, 2009, s. 417–434.

Kümmerer, K.: Pharmaceuticals in the Environment, Sources, Fate, Effects and Risks. 2. vyd., Springer, Berlin, 2004, s. 3, 4, 5.

Láng, J.; Kőhidai, L.: Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere*, **89**, 2012, s. 592–601.

Lincová, D.; Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé, doplněné a přepracované vydání, Galén, Praha, 2007, s. 297, 299, 471.

Liu, Y.; Gao, B.; Yue, Q. et al.: Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **77**, 2012, s. 79–87.

Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: Barevný atlas farmakologie. 4. vyd., Grada Publishing a.s., Praha, 2012, s. 182, 184, 252.

Medical Tribune Brevíř 2009, Pediatrie/Očkovací látky. 1. vyd., Medical Tribune CZ s.r.o., ve spolupráci s Inpharmex spol. s.r.o., Praha, 2009, s. 131, 463, 471, 672, 673.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. dostupné z: <http://www.algaebase.org> (staženo dne 18.3.2013).

Mikroverze AISLP – ČR 2013.1, stav k 1.1.2013.

Mladěnka, P.: Přednáška z Farmakologie - Antimikrobní látky, akademický rok 2011/2012.

Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B.: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3. vyd., Michiganská univerzita: Pharmaceutical Press, 2004, s. 1248.

OECD 201, Guidelines For Testing Of Chemicals, Alga Growth Inhibition Test, 1984.

OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals, Proposal For Updating Guideline 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2002.

Pal, A.; Yew-Hoong Gina, K.; Yu-Chen Linb, A. et al.: Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effect. *Science of The Total Environment*, **408**, 2010, s. 6062–6069.

Pascoe, D.; Karntanut, W.; Müller, C. T.: Do pharmaceuticals effect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, **51**, 2003, s. 521–528.

Prokeš, J. et al.: Základy toxikologie : obecná toxikologie a ekotoxikologie. 1.vyd., Karolinum, Praha, 2005, s. 109, 126, 248.

PROTOXKIT FTM - Freshwater Toxicity Test with a Ciliate Protozoan, Bench Protocol. MicroBioTests Inc., Mariakerke (Gent), Belgium.

Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých. 2. přepracované vyd., MU Přírodovědecká fakulta, Brno, 2005, s. 141, 142.

Shubert, E.: *Desmodosmus subspicatus*, The Natural History Museum, dostupné z: <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/index.html> (staženo 16.3.2013).

SPC Amoxihexal 1000, Mikroverze AISLP 2012.1, stav k 1.1.2012.

SPC Apo-Ibuprofen 400 mg, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0125525&tab=texts> (staženo 25.11.2012).

SPC Ibalgin 200 mg, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0032078&tab=texts> (staženo 25.11.2012).

SPC Ospamox 1000 mg, Mikroverze AISLP 2012.1, stav k 1.1.2012.

Svobodová, Z.; Máchová, J.; Beklová, M. et al.: Ekotoxikologie - praktická cvičení, část I. Ediční středisko VFUB, Brno, 2000, s. 4, 15.

Špaček, J.: Hlenky, houby, řasy. Vydavatelství MU, Brno, 1999.

Vodní ekotoxikologie. Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP v Olomouci, dostupné z: ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC (staženo 1.4.2013).

Vytlačilová, J.: Přednáška z Monitorování životního prostředí, akademický rok 2010/2011.

Wiegel, S.; Aulinger, A.; Brockmeyer, R. et al.: Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, **57**, 2004, s. 107–126.

Williams, R. T.: Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts on Aquatic Ecosystems, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Allen Press/ACG Publishing, USA, 2005, s. 111, 112, 149, 183, 197, 198, 239-252, 269, 303.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor diplomové práce: Podlipská Kateřina

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Chronická toxicita směsi léčiv

Ibuprofen, ze skupiny nesteroidních a protizánětlivých léčiv, a amoxicilin, ze skupiny širokospektrých aminopenicilinových antibiotik, patří mezi jedny z nejčastěji používaných léčiv. V této práci byla sledována chronická toxicita těchto léčiv a jejich směsi. Pro hodnocení byl zvolen vícegenerační test toxicity s prvokem *Tetrahymena thermophila* a řasový test toxicity s řasou *Desmodesmus subspicatus*. Ukázalo se, že citlivějším organismem je *T. thermophila*, pro kterou jsme stanovili hodnotu 24hEC₅₀ v rozmezí 1,53 – 2,57 mg/l, v porovnání s hodnotou 72hEC₅₀ pro *D. subspicatus* v rozmezí 16,77 – 229,3 mg/l. Synergické působení těchto dvou léčiv ve směsi se neprokázalo.

Klíčová slova: ekotoxikologie, amoxicilin, ibuprofen, *Tetrahymena thermophila*, *Desmodesmus subspicatus*

Abstract

Charles University in Prague

Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Podlipská Kateřina

Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of thesis:

Chronic toxicity of drugs mixture

Ibuprofen, from the group of non-steroidal and anti-inflammatory drugs, and amoxicillin, from the group of broad-spectrum aminopenicillin antibiotics, belong to one of the most often used drugs. In this work was monitored chronic toxicity of these drugs and their mixtures. For the evaluation was selected multigenerational toxicity test with the protozoan *Tetrahymena thermophila* and algal toxicity test with the alga *Desmodesmus subspicatus*. It turned out that the more sensitive organism is *T. thermophila* for which we have determined the value 24hEC₅₀ in the range of 1,53 to 2,57 mg/l compared with the value 72hEC₅₀ for *D. subspicatus* in the range of 16,77 to 229,3 mg/l. Synergistic action of these two drugs in mixture has not been demonstrated.

Keywords: ecotoxicology, amoxicillin, ibuprofen, *Tetrahymena thermophila*, *Desmodesmus subspicatus*