

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Diplomová práce

**FOTOTOXICKÝ SCREENING SALICYLANILIDŮ
POMOCÍ TUBIFEX TUBIFEX**

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

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

Hradec Králové 2007

Sylvie Vondráková

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Vondráková Sylvie

Děkuji Mgr. Jitce Vytlačilové za odborné vedení a cenné rady při testování, za pomoc při hledání literatury a sestavování této práce.

Vondráková Sylvie

OBSAH

1. Úvod	6
1.1. Cíl práce	8
2. Teoretická část	9
2.1. Sluneční záření	10
2.1.1. Atmosféra a její složení	10
2.1.2. Solární radiace	10
2.1.3. Ozón	11
2.1.4. Působení UV záření na ekosystém	13
2.1.5. Působení UV záření na člověka	14
2.1.6. Využití UV záření při dezinfekci vody	16
2.2. Fototoxicita	17
2.2.1. Definice a princip mechanismů	17
2.2.2. Reaktivní formy kyslíku	18
2.2.3. Důvod tvorby fototoxicky aktivních látek a jejich metabolizace a detoxifikace	19
2.2.4. Fototoxicita ve vztahu k člověku	20
2.2.4.1. Negativní účinky fotosenzitivních reakcí	20
2.2.4.1.1. Nežádoucí účinky fotosenzitivních reakcí na kůži	21
2.2.4.1.2. Nežádoucí účinky fotosenzitivních reakcí na oční tkáň	23
2.2.4.2. Lékařské využití	24
2.2.4.2.1. Metody fototerapie	26
2.2.4.2.2. Fotochemoterapie s použitím psoralenů	26
2.3. Testovací metody fototoxicity	29
2.3.1. Testování na zvířatech – testy in vivo	30
2.3.2. Alternativní metody	33
2.3.2.1. Testy in vitro	34
2.3.2.1.1. 3T3 NRU in vitro test fototoxicity	34
2.3.2.2. Testy na nižších organismech (biotesty)	35
2.3.2.3. Testy in silico – počítačové metody	36
2.3.2.3.1. QSAR analýza	37
2.3.3. Epikutánní (photopatch) testy	38
2.4. Tubifex tubifex	40
2.4.1. Taxonomické zařazení	40
2.4.2. Anatomická charakteristika některých taxonomických skupin	40
2.4.3. Biologie a ekologie nítěnky obecné	42
2.4.3.1. Pohyb, potrava a dýchání	42
2.4.3.2. Rozmnožování a vývoj	44
2.4.3.3. Bionomie	45
2.4.4. Některé významné poznatky o Tubifex tubifex	45
2.4.4.1. Obecné informace	45
2.4.4.2. Proces dekontaminace u nítěnky	46
2.4.4.3. Interakce nítěnky s UV zářením	47
2.5. Testované toxiny	48
2.5.1. Thiosalicylanilidy	48
2.5.1.1. Chemická struktura	48
2.5.1.2. Biologická aktivita	48
2.5.1.3. Využití	50

3.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
3.1. Metodika testu	53
3.1.1. Design testu	53
3.1.2. Hodnocení	53
3.1.3. Preliminery test	53
3.1.4. Vlastní test	54
3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení, testovací organismus	55
3.2.1. Chemické látky	55
3.2.2. Přístroje a pomůcky	55
3.2.3. Testovaný organismus	56
3.3. Příprava látky a postup testování	57
3.3.1. Příprava testované látky	57
3.3.2. Příprava experimentálního organismu	57
3.3.3. Samotný pokus	57
3.4. Zpracování výsledků	58
4. Výsledky	59
Výsledky měření jsou prezentovány jako:	60
5. Diskuse	75
6. Shrnutí testování	99
Seznam použité literatury	102
Souhrn	109
Summary	110

1. Úvod

Sluneční záření je naprosto nezbytný předpoklad pro zachování života na Zemi a zároveň nejvýznamnějším zdrojem energie. Solární radiaci můžeme podle vlnových délek rozdělit do několika oblastí. Většinu biologických účinků má oblast vlnových délek 280-800nm, přičemž pásmo 280 až 320nm se nazývá zářením středněvlnným ultrafialovým (UVB), 320 až 400nm dlouhovlnným ultrafialovým (UVA) a pásmo 400 až 700nm zářením viditelným (VIS). Tzv. UVC záření o vlnové délce sahající od 100 do 280nm se do biosféry nedostává, je odfiltrováno vrstvou ozónu přítomnou v dolní části stratosféry. Infračervená radiace (IČ) vyšších vlnových délek (2,5-15 μ m) má účinky tepelné.

Všechny organismy jsou však také vystaveny škodlivým účinkům jednotlivých složek slunečního záření. Člověk svou činností vytváří různé látky, které způsobují vznik ozónových děr, tj. ztenčení ochranné vrstvy, následkem čehož se k Zemi dostává více UV paprsků. Foton UV záření nese mnohem více energie než fotony ostatních vlnových délek. Toto vysokoenergetické záření je schopno poškodit mnoho biologických materiálů. Navíc může vyprovokovat série reakcí, při kterých vznikají různé reaktivní formy kyslíku (ROS = Reactive Oxygen Species), jež působí oxidativní stres buňkám i tkáním. Další důležitou vlastností UV záření je jeho všudypřítomnost. Organismy jsou kvůli své závislosti na světle nevyhnutelně vystaveny škodlivému záření. Rovněž může kombinace efektů UV záření s ostatními faktory životního prostředí vést k zesíleným účinkům; příkladem může být aktivace organických polutantů či fotosensitizace.

Fotosensitizace je proces kdy látka zvaná fotosenzibilizátor dokáže absorbovat záření a na kůži vystavené slunečnímu záření zprostředkuje reakci. Mezi fotosenzibilizátory se řadí některá léčiva, sekundární metabolity rostlin, kosmetické přípravky a potravinová aditiva (např. barviva).

V současné době je pro posouzení případné fototoxicity látek velmi podstatný vývoj laboratorních testovacích metod nebo matematických modelů, které umožní předvídat osud nových chemických sloučenin v životním prostředí.

1.1.Cíl práce

Výzkum Katedry farmaceutické botaniky a ekologie je mimo jiné zaměřen na hodnocení fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek, přírodních látek získaných izolací z rostlin či látek získaných chemickou syntézou. Test využívá nítěnkou obecnou (*Tubifex tubifex Müll.*), která ve fylogenetickém systému patří mezi bezobratlé (nižší organismy), nevztahuje se na ni proto legislativa spojená se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

Naším cílem bylo ověřit fotosensibilizující vlastnosti látek nasyntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie, které jsou perspektivní zejména co se týče jejich antimykobakteriálních a antifungálních účinků, a tyto vlastnosti prokázat.

Neméně významným cílem bylo i vlastní propracování metodiky, které vyplyne ze zkušeností získaných po mnohonásobném opakování testování.

2. Teoretická část

2.1. Sluneční záření

2.1.1. Atmosféra a její složení

Povrch Země je obklopen plynným obalem – atmosférou. Atmosféra je tvořena zvláštní směsí plynů – vzduchem. Podle chemického složení lze atmosféru rozdělit na homosféru (do 90 km, molární hmotnost se prakticky nemění) a heterosféru (probíhá disociace plynů a změna molární hmotnosti). V homosféře jsou hlavními plynnými složkami dusík (78%) a kyslík (21%). Zbytek tvoří vodní páry, oxid uhličitý, vzácné plyny a jiné. Vedle plynů obsahuje atmosféra i malé pevné a tekuté složky – atmosférické aerosoly. Ty mohou být jak přirozené (90% - kosmický a vulkanický prach, kouřové, prachové a vodní částice, pyl), tak i antropogenní (do ovzduší se dostávají činností člověka).

V souvislosti s růstem vzdálenosti se atmosféra podle změn teploty a dalších hledisek dělí na troposféru, stratosféru, mezosféru, termosféru a exosféru. Ve výšce od 10 do 50 km s maximem asi ve 23 km se nachází ozónová vrstva (Stonawski, J., 1993).

2.1.2. Solární radiace

Sluneční světlo poskytuje energii naší biosféře, atmosféře, pevnině i oceánům. Fotochemické reakce hrají v životním prostředí významnou roli. Světlo se zapojuje do velké části reakcí v atmosféře, přírodních vodách, půdě i živých organismech. Tyto reakce přispívají k syntéze mnoha organických látek a jejich degradaci a podílejí se na chemické rovnováze naší planety (Boule, P. et al., 1999).

UV záření dopadající na zemský povrch je elektromagnetické vlnění s vlnovou délkou kratší než má viditelné světlo, ale delší než má rentgenové záření, které se dělí na tři pásma: UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) a UVC (100 – 280 nm). Pásma UVB a UVC jsou pro organismus nebezpečná – letální, zejména UVC záření je však téměř úplně pohlcováno v ozónové vrstvě ve stratosféře. Část UVA záření prochází na zemský povrch. Infračervená radiace

vyšších vlnových délek má účinky tepelné. UV záření tvoří asi 5 – 7% slunečního záření. Expozice UV záření vyvolává řadu nežádoucích účinků: záněty až rakovinu kůže, snížení fotosyntetické aktivity rostlin, záněty oční rohovky a spojivky (Prokeš, J. a kol., 1997, cs.wikipedia.org.).

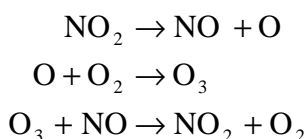
Pokud záření prochází kůží, pak se tak děje v závislosti na jeho vlnové délce v tom smyslu, že hloubka penetrace je jí přímo úměrná. Tedy zatímco středněvlnné UVB záření prochází epidermis maximálně do dermálních papil, UVA radiace se dostává až po rozhraní koria a podkoží. Viditelné záření pak prochází až do podkoží (Malina, L., 1999). Výrazná dávka UV záření může oslabit imunitní systém a zvýšit riziko infekčního onemocnění. Dětská expozice UV záření a počet spálení v dětství přispívají ke vzniku rozvoje melanomu v dalším životě (www.khsbrno.cz).

Některé důležité biologické účinky UV záření: poškození DNA, RNA, proteinů, enzymů a dalších důležitých makromolekul; zástava replikace genetické informace a množení bakterií; znemožnění reparace poškozením nukleových kyselin a tím zábrana opětovného pomnožení mikroorganismů (www.h2o-logic.cz).

2.1.3.Ozón

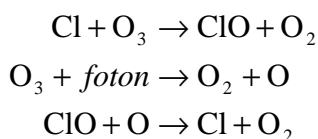
Asi 90% atmosférického ozónu (O₃), což je tříatomová molekula kyslíku, je přítomno v části stratosféry – ozonosféře (20 – 25 km nad zemským povrchem), která z velké části pohlcuje UV záření, jehož některé vlnové délky (180 -280nm) jsou nebezpečné pro zdraví člověka (rakovina kůže, postižení rohovky), ale i pro zelené rostliny (inhibice fotosyntézy, odumírání tkání). Zde ozón a celá ozonosféra vzniká působením elektrických výbojů (blesku) nebo působením UV záření na molekuly kyslíku.

Dalších přibližně 10% ozónu se nachází v nižších vrstvách atmosféry – troposféře a jeho obsah od začátku našeho století postupně vzrůstá, především v důsledku znečištění ovzduší uhlovodíky a NO_x, které v dalších fotochemických reakcích mohou být příčinou jeho vzniku:



Kyslíkové atomy dále simultánně reagují s uhlovodíky přítomnými v atmosféře za vzniku oxidových sloučenin a volných radikálů, které vytváří s oxidem dusnatým další množství NO₂. Výsledkem je kumulace NO₂ a O₃ při tvorbě tzv. fotooxidačního smogu (Vopršalová, M., 1996).

Naopak velkým nebezpečím pro prospěšný stratosferický ozón jsou organické sloučeniny na bázi nižších alkanů (metanu, etanu) s obsahem chloru a fluoru (chlor - fluorkarbyny). Jsou to velmi stálé a netoxické uhlovodíky se sníženým bodem varu. Pro své vlastnosti jsou používány v chladírenství, v rozprašovačích a k čištění součástek při výrobě elektroniky. Jejich chemická stálost způsobuje, že jsou schopny velmi dlouhou dobu (řádově desítky až stovky let) setrvat v atmosféře. Vzdušným proudem se dostávají až do vrchní vrstvy stratosféry, kde se účinkem UV záření rozkládají za uvolnění atomů chloru. Ty pak způsobují rozklad ozónu dle schématu:



Vlivem UV záření dojde k odtržení atomárního chloru, který z molekuly ozónu odtrhává atom kyslíku a reaguje s ním za vzniku oxidu chloru. Dochází k fotochemickému uvolňování chloru z molekuly oxidu chloru, který rozkládá další molekulu ozónu.

Ke skupině freonů jsou počítány též chlorované nebo fluorované uhlovodíky s bromem (tzv. halony), které mají též schopnost rozkládat ozón.

Postupně dochází k výraznému zeslabení ozónové sféry nad Antarktidou zvláště v září a říjnu – vznikají tzv. ozónové díry (Prokeš, J.a kol., 1997).

Nejvýraznější úbytek ozónu vyvolávají oxidy dusíku. Tyto látky ovšem vznikají v daleko větší míře přírodní cestou (mikrobiálním rozkladem) než jako

průmyslové produkty (emise z motorů tryskových letadel, raketových paliv a hnojiv)(Malina, L., 1999).

Dosud však není jasně prokázáno, že ztenčení ozónové vrstvy nevzniká i následkem přirozených mechanismů v atmosféře. Je však prokázáno, že chemickými reakcemi mezi freony a ozónem k úbytku ozónu ve stratosféře dochází, a proto je nezbytné jejich výrobu co nejvíce omezit. V tomto duchu uzavřelo 42 států v roce 1988 tzv. „Montrealskou dohodu“ vykazující vůli výrazně tuto produkci snížit (Prokeš, J.a kol., 1997).

V USA byla založena organizace U.S.EPA (Environmental Protection Agency), která se zabývá ekologií samotnou jako takovou a veškerými ekologickými problémy, např. i narušováním ozónové vrstvy, tvorbou ozónových děr a klimatickými změnami s tím souvisejícími (www.epa.gov). Je nezbytné abychom získali co nejvíce informací o osudu xenobiotických látek v životním prostředí a pokud možno se vyhnuli opakování takových jevů jako je ozonová díra. Lidstvo však bude i nadále pokračovat ve vypouštění xenobiotik do životního prostředí, protože jejich odstranění z průmyslového i komunálního odpadu by bylo neúnosně nákladné. Proto je důležité vědět zda materiály, které jsou bezpečné ve formě ve které jsou vypouštěny, zůstávají bezpečné i poté co projdou chemickými a biochemickými přeměnami v životním prostředí.

Pro lepší kontrolu bezpečnosti chemických látek pro člověka a prostředí jsou v různých zemích vytvářeny zákony týkající se toxických látek. Věda může k tomuto posouzení přispět ve dvou oblastech; jednak v oblasti toxikologie a jednak v oblasti chemické expozice. Velmi podstatným příspěvkem chemie životního prostředí k těmto zákonům by měl být vývoj laboratorních testovacích metod nebo matematických modelů, které umožní předvídat osud nových chemických sloučenin v životním prostředí (Boule, P et al., 1999).

2.1.4.Působení UV záření na ekosystém

Už mnoho let je dokázáno, že člověk svou činností a produkcí ničí ochrannou ozónovou vrstvu. Důsledkem tohoto poškození je pak zvýšená koncentrace UVB

záření, které je nebezpečné pro zdraví člověka (rakovina kůže, poškození rohovky), ale i pro zelené rostliny (inhibice fotosyntézy, odumírání tkání) (Vopršalová, M., 1996).

Velmi nepříznivý vliv má UVB záření také na vodní fytoplankton a zooplankton kde přispívá k inhibici biomasy. Tím se také redukuje množství živočichové a rostliny, které v některých zemích tvoří velmi významnou složku výživy obyvatel (Soni, A.K., 1997).

V praxi se setkáváme s tím, že některé druhy jsou k UVB záření velice citlivé zatímco jiné stejnou dávku tolerují. Tímto problémem se ve své studii zabýval Räsänen a kol. (2003). Vysvětlení spočívá v tom, že organismy mají různé mechanismy ochrany před škodlivými efekty UVB záření. Důležité je zejména přítomnost pigmentu melaninu, který na sebe UVB záření naabsorbuje a tím sníží jeho dávku pro buňku, přítomnost DNA reparačních mechanismů, případně slizový obal, který ochraňuje vajíčka obojživelníků. Všechny tyto mechanismy jsou od sebe neoddelitelné a dobrou ochranu zajišťují ve vzájemné kombinaci.

2.1.5. Působení UV záření na člověka

UV záření vyvolává na kůži dvojí druh účinku: a to účinky časné a pozdní.

Z časných účinků je to radiačně zprostředkovaný zánět, opálení, imunologické změny, hyperplazie kůže a syntéza vitamínu D. Radiačně podmíněný zánět – absorpce UV záření bílkovinami a DNA kůže má za následek vznik molekulárního a buněčného poškození spojeného s poruchou tkáňových funkcí a zánětem. Mezi příznaky zánětu patří erytém, otok, pálení a bolest v průběhu několika hodin, nejvýše dnů. Erytemogenní je převážně UVB záření vlnové délky kolem 300nm, poněkud menší efekt v tomto smyslu má záření pásma 260 – 280nm.

Opálení - fotooxidativně zprostředkované ztmavnutí preformovaného melaninu a jeho přenos z melanocytů do keratinocytů.

Imunologické změny - UVA, UVB, UVC záření vyvolává na kůži i při nízkých dávkách radiace poškození Langerhansových buněk a ovlivnění jejich funkce, mění se charakter procesů prezentace antigenů a zvyšuje míra imunosuprese.

Hyperplazie kůže – ztlustění kůže, a to zejména její rohové vrstvy (www.mzcr.cz). Hyperplastické změny trvají i několik měsíců, jsou následkem urychlení syntézy DNA, RNA a bílkovin s mnohonásobným zvýšením mitotické aktivity keratinocytů. Epidermis i korium se ztlušťují až čtyřnásobně, což přináší významný vzrůst fotoprotektivní schopnosti kůže.

Pozdními účinky jsou stárnutí kůže (vlivem kumulujícího se poškození DNA po opětovné expozici sluncem a umělým UV zářením, dochází ke vzniku vrásek, suchosti a žloutnutí kůže, hyperpigmentaci a ochabnutí kožního turgoru) a fotokarcinogeneze (např. aktinické keratózy, nemelanomové zhoubné kožní nádory jako bazaliom, spinaliom a v menší míře maligní melanom; zodpovědné jsou za to patrně změny DNA spočívající v chybné opravě po poškození UV zářením spolu s poruchou imunitních funkcí (Malina, L., 1999; www.mzcr.cz).

UV záření způsobuje poškození DNA , a to zejména vznik cyklobutan-pyrimidinových dimerů (CPD) a DNA-crossling, zlomy chromozómů. Tato poškození jsou vyvolána buď přímo absorpcí energie UVB nebo nepřímo vznikem reaktivních kyslíkových radikálů UVA zářením. DNA fotoprodukty jsou CPD. Nejsou-li tato poškození opravena mohou interferovat s transkripcí a replikací, může dojít až ke vzniku mutace. Tyto genetické anomálie mohou vést ke spuštění karcinogeneze indukované zářením. Sunscreeny používané jako opalovací prostředky obsahují částice jako TiO_2 , ZnO a jiné, které UV záření absorbují, zabraňují spálení, ale nedokážou odstranit poškození. Některé organismy (např. bakterie) disponují specifickými enzymy (fotolyasy), které dovedou „svázat“ místa poškození. U mnoha organismů, i u člověka, však tyto enzymy chybí. Katalýza enzymu je indukována světlem. Fotolyasa rozštípne cyklobutanový kruh a dojde k uvolnění a obnově pyrimidinových bází. V roce 2005 byla provedena studie ohledně reparační aktivity konstituované fotolyasy (Photosome®) na lidských keratinocytech. Došlo k výraznému snížení vzniku CPD a zlomů chromozómů, takže Photosome®

by mohl být aditivem k sunscreenům, kde by snižoval riziko vzniku karcinomu kůže(Decome, L.et al, 2005; Heelis, P.F. et al, 1993).

2.1.6. Využití UV záření při dezinfekci vody

Jak již bylo uvedeno výše, UV záření velmi účinně zasahuje do procesu množení mikroorganismů a eliminuje tak řadu bakterií, virů a parazitů. Jednou z možností využití UV záření je dezinfekce vody.

Voda přitéká do nerezové nádrže, kde je vystavena UV záření o vlnové délce 153,7nm vysílanému nízkotlakou UV lampou. Ta je umístěna v křemíkovém pouzdře, které slouží k udržování ideální pracovní teploty a současně zabraňuje přímému kontaktu UV lampy s vodou.

UV záření proniká ochrannou bariérou, kterou tvoří cytoplazmatická membrána, do jádra a napadá DNA, kterou fotochemicky poškodí, tím zastaví její další replikaci a napadená buňka odumírá. Takto se mimo jiné inaktivují původci infekčních onemocnění přenášených alimentární cestou jako koliformní bakterie, *Vibrio cholerae*, viry hepatitidy A a ostatní.

Tato metoda dezinfekce nemění chemické ani fyzikální vlastnosti vody, nemá vliv na její chuť ani na obsah minerálů ve vodě (www.h2o-logic.cz).

2.2. Fototoxicita

2.2.1. Definice a princip mechanismů

Pro vlastnost mnoha chemicky i biologicky odlišných látek, které u živých organismů (člověka i zvířete) vyvolávají nežádoucí účinky až po ozáření místa, které bylo těmito látkami exponováno nebo bylo v kontaktu se používá termín fototoxicita (Isaksson, M. et al., 1997). Fototoxicky se projevují chemické látky jako takové (substance), velký vliv mají i některé obsahové látky rostlin a v neposlední řadě mohou fototoxicitu způsobovat léčiva. Tyto látky absorbující záření a vyprovokující reakci na kůži vystavené slunečnímu záření se nazývají fotosenzibilizátory.

Fotosenzibilizační reakce jsou vesměs závislé na kyslíku. Fotosenzibilizátorem může být chemická sloučenina různého složení, která absorbuje elektrony ve formě specifických fotonů, které se přeměňují na chemickou energii uloženou v molekule v excitovaném elektronovém stavu do té doby než vstoupí do chemické reakce schopné buď přeměnit původní sloučeninu v její fotoprodukt, přenést energii na organickou molekulu nebo ji vyzářit jako světlo nebo teplo.

Existují dva hlavní mechanismy fotosenzitizované reakce: u reakce fototoxického typu je fotosenzibilizátor po excitaci zářením transformován ve vysokoenergetický singletový intermediér s krátkou životností. Ten se obratem přeměňuje v delší dobu životnou nížeenergetickou sloučeninu (tripletového stavu), mající větší schopnost vstoupit do fotobiologické reakce. K tomu dochází buď odvržením atomu vodíku a tím ke vzniku radikálu, anebo přenosem elektronu z tripletového stavu fotosenzibilizátoru na jinou sloučeninu opět za vzniku radikálu. Tímto se v sekvenci oxidačních a redukčních reakcí tvoří vesměs vysoce reaktivní peroxidové radikály.

Druhým mechanismem fotosenzitizované reakce je reakce fotoalergického typu kdy dochází k přímému přenosu energie z fotosenzibilizátoru v tripletovém stavu na kyslík jsoucí na základní energetické hladině za vzniku kyslíku singletového schopného oxidovat biologicky významné sloučeniny (Malina, L., 1999). Reakce

fotoalergického typu je využívána ve fotodynamické terapii (PDT) (Glickman, R.D., 2002).

Fotosenzibilizační reakce mohou být i na kyslíku nezávislé, většinou jde o vznik kovalentních vazeb mezi fotosenzibilizátorem a DNA vyvolaný UVA zářením (Malina, L., 1999).

Během několika posledních let byla fototoxicita studována na molekulární úrovni, což umožnilo pochopit mechanismus poškození DNA, její opravu a buněčnou odpověď na stres indukovaný UV zářením. Vývoj nových léčiv (zejména antibiotik a protizánětlivých látek) ukázal nutnost zkoumat fototoxické účinky těchto látek (Meunier, J-R.et al., 2002).

2.2.2.Reaktivní formy kyslíku

K reaktivním formám kyslíku patří singletový kyslík. Pod tímto termínem se rozumí molekula kyslíku v elektronově excitovaném stavu, která má všechny elektrony spárované – singlet (multiplicita spinu se rovná 1).

Vyskytuje se zde tzv. „kyslíková anomálie“ – v základním energeticky nejnižším stavu má molekula kyslíku v nejvyšším antivazebném orbitalu dva nepárové elektrony s paralelními spiny a tedy multiplicitu spinu 3 (triplet). Naprostá většina látek (organické sloučeniny, anorganické aniony, nepřechodné kovy ...) má v základním stavu všechny elektrony spárované. Jsou v singletovém stavu a pro jejich reakce s tripletovou molekulou kyslíku na singletové produkty platí dle pravidla zachování spinu spinový zákaz.

Důsledek: všechny reakce kyslíku v základním stavu se singletovými molekulami mají velmi vysokou aktivační energii a měřitelnou rychlostí probíhají jen tehdy, podaří-li se vytvořit podmínky pro obejití spinového zákazu. Neexistencí spinového zákazu by se veškerá organická hmota zoxidovala v přítomnosti vzdušného kyslíku na oxid uhličitý a vodu.

Singletový kyslík vzniká celou řadou fyzikálních, chemických, fotochemických a biologických reakcí. Z fyzikálních reakcí je to například mikrovlnný výboj v kyslíkové atmosféře; z chemických reakcí je to tepelný rozklad

endoperoxidů, reakce chlornanu s peroxidem vodíku, reakce ozónu s různými látkami; v biologických reakcích je produkován peroxidasami a v přímých fotochemických reakcích dochází k jeho vzniku fotolýzou ozónu ve vyšších vrstvách atmosféry (Lang, K. et al., 2005). Singletový kyslík a další reaktivní formy kyslíku způsobují degeneraci nukleových kyselin proteinů, enzymů, lipidů a dalších biomolekul (Ray, R.S. et al., 2002). Účinky reakcí generujících singletový kyslík jsou souhrně označovány jako fotodynamický efekt a nalézají široké uplatnění ve fotobiologii, při léčbě rakoviny nebo aterosklerózy, při inaktivaci bakterií a virů a v nových insekticidech a herbicidech.

Fenoménem singletového kyslíku, jeho významem, produkcí i způsoby detekce se zabývá studie Langa a kol. (2005).

2.2.3. Důvod tvorby fototoxicky aktivních látek a jejich metabolizace a detoxifikace

Hlavním důvodem proč vlastně rostliny vytváří takto účinné látky je funkce ochranná. Fototoxické sloučeniny, široce rozšířené v rostlinné říši, mají schopnost reagovat s kyslíkem a tvořit reaktivní toxické kyslíkové radikály, které nepříznivě působí na organismy, které se jimi živí (savci, hmyz)(Lee, K., 1993).

Rostlinné fototoxiny jsou tvořeny širokým spektrem látek, které jsou namířeny proti rostlinným škůdcům a patogenům přenášejících choroby, hlístům, býložravcům a dalším. Takovéto rostliny se obvykle nachází na plně osluněných stanovištích, kde jsou defenzivní ochranné mechanismy indukované světlem nejefektivnější (Downum, K.R. et al, 1991).

Například rostliny čeledi *Asteraceae* a *Hypericaceae* produkují sekundární metabolity, které indikují fotooxidační děje u živočichů, kteří se jimi živí. Nejčastějším efektem působení těchto látek je peroxidace membránových lipidů prostřednictvím singletového kyslíku. Některé živé organismy toto „řeší“ vyhýbáním se světlu po pozření těchto rostlin nebo schopností tyto škodlivé metabolity detoxifikovat a vyloučit (Aucoin, R. et al, 1995).

Velmi významnou roli v detoxifikaci a metabolizaci těchto látek zde hraje oxidace zprostředkovaná zejména enzymatickým systémem cytochromu P-450.

Základem je cytochrom P-450, jenž je představován velkou rodinou enzymů (hemoproteinů), které obsahují prostetickou skupinu Fe-protoporfyrinu IX. V hemu vázané železo mění v průběhu cyklického procesu oxidace vícekrát své mocenství. Jednotlivé enzymy tohoto systému se liší svou strukturou (sekvencí aminokyselin), specifickou substrátu, indukovatelností, svými inhibitory. Systém využívá NADPH, molekulární kyslík, cytochrom P-450, NADPH - cytochrom P-450 reduktázu (flavoprotein, který postupně během oxidačního cyklu přenáší dva elektrony na cytochrom P-450) a fosfolipidy, zvláště fosfatidylcholin. Reakci, kterou systém katalyzuje, lze popsat takto:



Jeden atom kyslíku je přemístěn na substrát a druhý redukován na vodu. Výsledkem reakce je příprava substrátu ke konjugaci s vysoce polárními látkami, popř. úplná inaktivace substrátu (Eybl, V., 2003).

Dalším přídatným mechanismem v boji proti fototoxicitě jsou potravní antioxidanty (β -karoten, vitamin E, kyselina askorbová), kterých některé organismy mají vysokou hladinu a významně snižují mortalitu po vystavení účinku fototoxinů.

Některé druhy hmyzu také na fototoxické látky v potravě odpovídají zvýšením hladiny glutathionu. V laboratorních podmínkách uměle vyvolaná inhibice syntézy glutathionu, jakožto významného konjugačního prvku pro usnadnění detoxifikace a vylučování škodlivých látek, výrazně zvyšuje fototoxidační efekty na peroxidaci lipidů (Aucoin, R. et al, 1995).

2.2.4. Fototoxicita ve vztahu k člověku

2.2.4.1. Negativní účinky fotosenzitivních reakcí

Důsledkem průběhu fotosenzitivních reakcí může být fotocytotoxický efekt nebo fotogenotoxický efekt. Fotocytotoxický efekt je akutní dopad UV záření, důsledkem je přežití nebo usmrcení buňky. Fotogenotoxický efekt znamená, že buňka přežije, ale s důsledky na její genetickou výbavu. Důsledky cytotoxických

studií závisí na koncentraci použitého fotosenzitizéru, dávce UV záření a použité metodě (Meunier, J-R.et al., 2002).

2.2.4.1.1. Nežádoucí účinky fotosenzitivních reakcí na kůži

Fototoxická reakce se projevuje jako časná nebo pozdní zánětlivá reakce nastávající jako důsledek buněčného poškození vyvolaného fotochemickým procesem. Tento typ reakce je univerzální pro každou osobu, může k ní dojít již při prvním styku s fotosenzibilizátorem a její vznik závisí na překročení prahové dávky radiace a koncentrace vyvolávající sloučeniny v prostředí tkáně. Diskutuje se o přítomnosti imunologické složky tohoto děje.

Klinicky se může fototoxicita projevovat nejen jako zánětlivý erytém, ale v určitých případech vyvolává i edém a přítomny mohou být změny vezikulózní či bulózní. Pro mnohé sloučeniny je typická pigmentační reakce, změny jsou pravidelně lokalizovány na odkrytých částech kožního povrchu.

U fotoalergických reakcí se jedná o typickou buněčně zprostředkovanou alergickou reakci pozdního typu, jejíž mechanismus se nijak neliší od vzniku alergické kontaktní dermatitidy. Od reakce fototoxické se odlišuje zejména v tom, že postihuje pouze vnímavé osoby a její vznik nezávisí na koncentraci fotoalergenů nebo době expozice jeho vlivu. Akční spektrum těchto reakcí obvykle spadá do UVA pásma radiace (Malina, L., 1999). Tato reakce se vždy projevuje až po určité době latence, ve které probíhá senzibilizace skrytě, bez projevů na kůži. Mívá většinou těžší průběh a bývá závažnější (Ditrichová, D. a kol., 1999).

Fotoalergické reakce jsou většinou vyvolány kontaktně působícími látkami, např. dezinficiencii či složkami germicidních mýdel a šampónů (Malina, L., 1999). Rozsáhlou skupinu přípravků s obsahem fotoaktivních látek tvoří kromě řady léků různé kosmetické a dezinfekční prostředky, průmyslové chemikálie, barviva v textiliích, rostliny aj. Psoraleny v rostlinách i synteticky připravované indukují nejen známé fotokontaktní dermatitidy, ale i celkové reakce při perorálním podání (Ditrichová, D. a kol., 1999). Psoraleny se v přírodě vyskytují zejména v čeledích *Rutaceae* a *Umbelliferaeae*. Mohou způsobovat velmi nepříjemné

fytofotodermatitidy po kontaktu se zeleninou (např. mrkev, celer) a následným ozářením nejčastěji u lidí určitých profesí (zahradníci, kuchaři) (Lankerani, L., 2004). První poznané fototoxicky aktivní látky byly halogenované salicylanilidy používané v antimikrobiálních, kosmetických a dezodoračních mýdlech. Jejich testování a proto poznání tohoto účinku bylo zapříčiněno kvůli zhoršení zdravotních potíží u lidí, kteří pravidelně používali tato mýdla. Při systémovém podání vznikají fotoalergické reakce zejména po fenothiazinech, sulfonamidech, nesteroidních antirevmatikách a některých antibioticích (Malina, L., 1999). Zajímavá je studie antibakteriálních fluorochinolonů, ze které vyplývá že ke klinicky významným fototoxickým vedlejším účinkům velmi často vede užívání pefloxacinu, lomefloxacinu a sparfloxacinu (Neumann, N.J. et al, 2005).

Další studie v oblasti antibakteriálních fluorochinolonů byla provedena skupinou Raye *et al* (2006). Práce se týkala čtyř látek: enoxacinu, lomefloxacinu, ofloxacinu a norfloxacinu. U všech byla studována produkce singletového kyslíku, superoxidového radikálu, poškození DNA (fotodegradace 2'-deoxyguanosinu) a peroxidace lipidů v lidské krvi po vystavení UVA, UVB a slunečnímu záření. Produkce singletového kyslíku byla nejvyšší u enoxacinu, produkce superoxidového radikálu u ofloxacinu, poškození DNA u enoxacinu a peroxidace lipidů byla nejvyšší u norfloxacinu po ozáření UVA a UVB zářením a u lomefloxacinu po vystavení slunečnímu záření (Ray, R.S. et al, 2006).

Zajímavý vedlejší účinek-fotoonycholýza (odlupování nehtu od nehtového lůžka) byl zaznamenán po podání fluorochinolonů, psoralenů, tetracyklinů, chloramfenikolu, orální kontracepce aj. Mechanismus tohoto fenoménu není plně objasněn. Podle jedné teorie by příčinou mohlo být málo melaninu v nehtovém lůžku, následkem čehož je tkáň málo chráněna před slunečním zářením. Podle jiného názoru v nehtovém lůžku nejsou mazové žlázy, což je důvodem nepřítomnosti lipidů, které redukuje UV-záření (Lankerani, L., 2004).

K diagnostice fototoxických a fotoalergických reakcí se využívá zejména fotoepikutánních testů.

Terapie fototoxických a fotoalergických reakcí je symptomatická: u fototoxických reakcí spočívá jednak v zabránění kontaktu se známými fototoxiny a jednak ve fotoprotekci při nemožnosti vyhnoutí (Malina, L., 1999). Zajištění účinné fotoprotekce je významné i z toho důvodu, že řada prací zdůrazňuje souvislost mezi fotosenzibilizačními reakcemi a karcinogenezí. Kožní povrch je i za normálních podmínek vystaven působení značných energetických dávek UV záření, sumovaných během celého života. Patologická fotosenzitivita znamená vystupňování této fototraumatizace kůže s řadou nepříznivých důsledků na celulární a subcelulární úrovni, což se klinicky projevuje především urychlením stárnutí kůže, ale i zvýšeným rizikem vývoje bazocelulárních a zejména spinocelulárních karcinomů (Ditrichová, D. a kol., 1999). Při vzniku reakce se podávají kortikosteroidy. U fotoalergických reakcí je důležitá identifikace riskantních sloučenin, jejich eliminace z prostředí a pro terapii klinických změn také steroidní preparáty (Malina, L., 1999).

2.2.4.1.2. Nežádoucí účinky fotosenzitivních reakcí na oční tkáň

Lidské oko je neustále exponováno slunečnímu a umělému záření. Světlo je přenášeno skrze oko a dává signál mozku; tím si uvědomíme, že něco vidíme. U dětí a mladých lidí není poškození oka intenzivním okolním zářením velké, neboť oko je chráněno velmi účinným antioxidačním systémem (např. ochranné pigmenty kynureniny v čočce a melanin v sítnici a rohovce, které absorbují záření a rozptylují jeho energii bez vážného poškození). Ve středním věku je však snížena produkce těchto ochranných pigmentů, tyto protektivní pigmenty jsou chemicky modifikovány (v čočce je 3-hydroxykynureninový pigment enzymaticky převeden na xanthurenovou kyselinu, melanin přechází z antioxidační formy do prooxidační formy) a kumuluje se fluorescenční chromofor lipofuscin, který začíná produkovat reaktivní kyslíkové radikály (Roberts, J.E., 2001).

K poškození však může dojít i u mladého oka zejména v přítomnosti světlem aktivovaných látek (např. léčiv, potravních doplňků, kosmetiky, diagnostických látek), v nejhorším případě může dojít až k oslepnutí (Roberts, J.E. et al., 2002). Světelné poškození může oko zasáhnout třemi hlavními mechanismy zahrnujícími tepelné, mechanické i fotochemické účinky (Glickman, R.D., 2002). Rozsah poškození, které mohou jednotlivé exogenní fotosenzitivní substance způsobit závisí

na několika parametrech – chemické struktury látky, absorpčním spektru, vazbě na oční tkáň a na schopnosti přejít přes bariéru krev – oko (lipofilite nebo hydrofilite).

Sloučeniny s tricyklickým, heterocyklickým nebo porfyrinovým skeletem inkorporované do oční tkáně jsou potenciálně fototoxické. K ověření, zda látka působí fototoxicky se zejména využívá testování *in vitro*, které se provádí při vývoji nového léčiva. Nejprve je prověřena schopnost fotoabsorpce u vyvíjené látky v oblasti záření vlnové délky 300-750nm spektrofotometricky. Pokud látka v této oblasti neabsorbuje záření, je další testování bezpředmětné. Pokud však je látka fotoabsorbérem v daném rozmezí vlnových délek, je indikováno další testování, a to pomocí validovaných screeningových testů prováděných *in vitro* ve tkáňových kulturách. Pokud jsou tyto testy negativní, mohou být zahájeny klinické fototesty u lidí za předpokladu, že všeobecné toxikologické údaje to umožňují. Pokud výsledky *in vitro* testů naznačují, že látka je potenciálně fototoxická, je tato skutečnost indikací k provedení testů na zvířatech. Pokud látka v testech na zvířatech nepotvrdí fotosenzibilizační vlastnosti, je opět možné přistoupit ke klinickým fototestům u lidí. Pokud se však v testech na zvířatech potvrdí fotosenzibilizační vlastnosti, v dalším testování se nepokračuje. Údaje z těchto testů jsou v tomto případě podkladem k odhadu rizika, např. ke stanovení NOEL (koncentrace, při které ještě není pozorován fototoxický účinek)(Ditrichová, D. a kol., 1999; Roberts, J.E. et al.,2002).

2.2.4.2.Lékařské využití

Velmi dynamicky se rozvíjející metodou při léčbě některých druhů nádorů je tzv. fotodynamická terapie (PDT), kde mají mimořádný význam reakce generující singletový kyslík. Při léčbě rakoviny se intravenózní formou aplikuje fotosenzitizér a po uplynutí určité doby nutné k selektivní akumulaci fotosenzitizéru v tumoru je oblast nádoru ozařována viditelným světlem (Lang, K. et al., 2005). Kombinací fotosenzitizující látky, světla a kyslíku dochází k produkci cytotoxických agens, které ničí nádorové buňky. Zvýšené selektivity v zásahu na cílové buňky se dosáhne zlepšenou kumulací fotosenzitizéru v nádorové tkáni a ozářením jen určité oblasti. (Zimčík, P., 2004). Přímo v tumoru se tak generuje singletový kyslík, který způsobí oxidační destrukci nádoru aniž dojde k poškození ostatní zdravé tkáně (Lang, K. et al., 2005).

Rostoucí rezistence proti používaným antimikrobiálním a antifungálním látkám vede k nutnosti hledání alternativních metod terapie. Jednou z možností by mohla být antimikrobiální fotodynamická inaktivace (PDI). Tato metoda využívá viditelného záření k aktivaci fotosenzitizéru (v případě této studie derivátu porfyrinu). Aktivovaný fotosenzitizér může reagovat s molekulami z prostředí přímo za přenosu elektronů nebo vodíku, což vede ke vzniku radikálů nebo nepřímo transferem energie na kyslík za vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. Obě cesty mohou vést k buněčné smrti daného mikroorganismu. V této studii byly použity *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* a *Candida albicans*. Nejlepší výsledky byly dosaženy se *Staphylococcus aureus*, ale přesto je antimikrobiální PDI stále ve stadiu výzkumu (Lambrechts, S.A.G. et al, 2005).

V dermatologii se využívá léčebných účinků fotochemoterapie i samotné fototerapie. Fototerapií se rozumí vystavení nemocného neionizujícímu ultrafialovému záření k dosažení léčebného účinku. Používá se k ní oblastí radiace UVB i UVA s různými šířkami pásem spektra a různých jejich kombinací. Fotochemoterapie je pak metodou využívající UV záření v kombinaci s fotosenzibilizující látkou podanou buď systémově nebo místně (v masti, krému, koupeli).

Onemocnění, u nichž je vhodná fototerapie:

- Psoriáza
- Atopická dermatitida
- Pruritus
- Akné
- Ekzém
- některé fotodermatózy

Onemocnění, u nichž je vhodná fotochemoterapie:

- Psoriáza
- Ekzém
- Alopecia areata
- Vitiligo
- Pruritus
- některé fotodermatózy

Pacienti musejí být průběžně kontrolováni, dávkování záření se musí dít podle předem zjištěných hodnot erytémových prahů, modifikovaných podle reakce. Při použití fotochemoterapeutických metod musejí používat ochranné pomůcky (brýle, oblek, pokrývka hlavy) a nevystavovat se přirozenému slunečnímu záření.

2.2.4.2.1. Metody fototerapie

Pro léčbu ultrafialovým zářením se užívá jak samotného UVB, tak i UVA záření, lze však využít i jejich kombinací. Pokud jde o UVB fototerapii, platí pro ni některé základní předpoklady. Je to v první řadě jednoznačná indikace tohoto druhu léčby, včetně zjištění kontraindikací. Dále je nutné předchozí vyšetření erytémového prahu a dynamiky erytémové reakce každého pacienta. Konečně sem patří řádná dokumentace jednotlivých dávek a sumární dávky obdrženého záření. Během léčení musí být nemocný soustavně kontrolován.

Podle konkrétní diagnózy a stádia onemocnění je UVB terapie prováděna buď aplikací širokého spektra UVB radiace (280 – 320nm), nebo vybranou úzkou oblastí při 311nm (tzv. 311nm – UVB terapie), případně tzv. SUP-UVB terapií, kde se terapeuticky využívá delších, méně erytémogenních vlnových délek UVB spektra, hraničících s jeho UVA oblastí (305 – 325nm). Příznivé výsledky byly referovány i po užití kombinace orálního podávání psoralenu s UVB zářením. K terapeutickým účelům je dále vhodná i kombinace UVA + UVB záření.

2.2.4.2.2. Fotochemoterapie s použitím psoralenu

Fotochemoterapie s psoraleny spočívá v terapeutické kombinaci psoralenových derivátů a dlouhovlnného UVA záření (315 – 400nm), kdy uvedené chemické sloučeniny vyvolávají zvýšenou citlivost vůči uvedenému pásmu solární radiace. Psoraleny se přitom podávají buď celkově perorálně, nebo místně v krému, nebo jsou přidávány ke koupeli.

Principem fotochemoterapie je opětovné vyvolávání kontrolované fototoxické kožní reakce, která vede postupně k hojení patologického tkáňového procesu. Lokální reakcí na záření je intenzivní erytém, závisící na podaném množství léku a dávce záření.

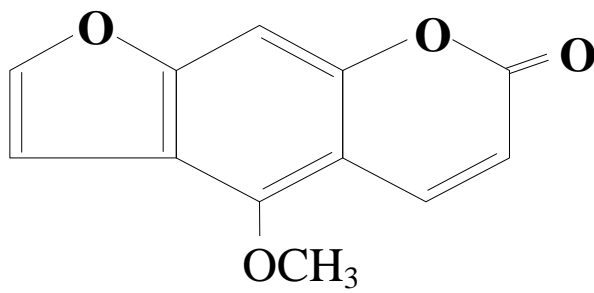
Nejvýznamnější indikací této tzv. PUVA metody je lupénka, vitiligo a některé fotodermatózy.

Psoraleny jsou tricyklické furanokumariny přítomné v řadě rostlin různých druhů. Jejich nejčastěji léčebně používaným derivátem je 8-methoxypsoralen. Jinak se používá též 4,5',8-trimethylpsoralen a dále 5-methoxypsoralen.

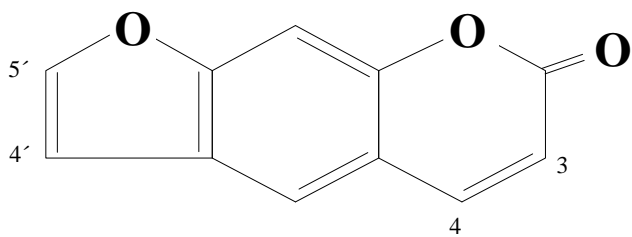
Z fyzikálního hlediska dochází u psoralenů v temnu bez přístupu světla k přemostění s páry bází DNA za vzniku komplexů. Po absorpci UVA radiace se vytváří bifunkční komplexní sloučenina, tzv. „crosslink“. Tato přemostění šroubovic DNA brání její normální syntéze, a tím i dělení buněk. Předpokládá se přitom, že tyto vazebné změny mají význam pro terapeutický efekt u hyperproliferativních onemocnění epidermis, jako je psoriáza. Pro to svědčí i skutečnost že při léčebném použití psoralenů, které zmíněná přemostění mezi šroubovicemi DNA nevytvářejí, u psoriázy ke zlepšování nedochází.

Poslední dobou se užívá i další systémově fotosenzibilizující sloučenina, a to furanochrom khellin, strukturálně příbuzný s psoraleny. Je stejně jako ony aktivován UVA složkou solárního záření. Jeho hlavní indikací je onemocnění vitiligem. Tato metoda bývá též nazývána KUVA. Khellin má výhodu jednak v tom, že postrádá fototoxickou erytemogenní působnost, jednak v možnosti používat při léčbě jako zdroj záření sluneční světlo. Pro možnou hepatotoxicitu je však schválen pro terapii jen v některých zemích.

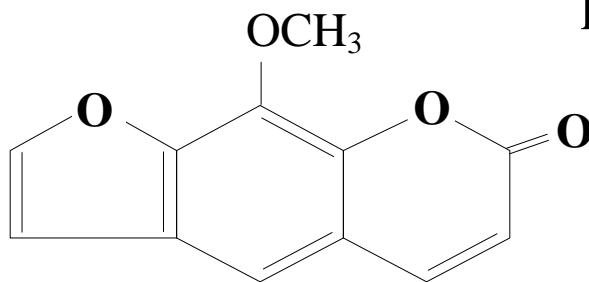
Kromě výše uvedených metod se rozmáhá i tzv. PAUVA terapie, kdy se k senzibilizaci kůže užívá aminokyseliny L- alaninu. Ani tato sloučenina není fototoxická a dávkování UV záření není proto problémem. Existují však sdělení, která pokládají tento terapeutický způsob za málo efektivní ve srovnání s klasickou PUVA – terapií (Malina, L., 1999).



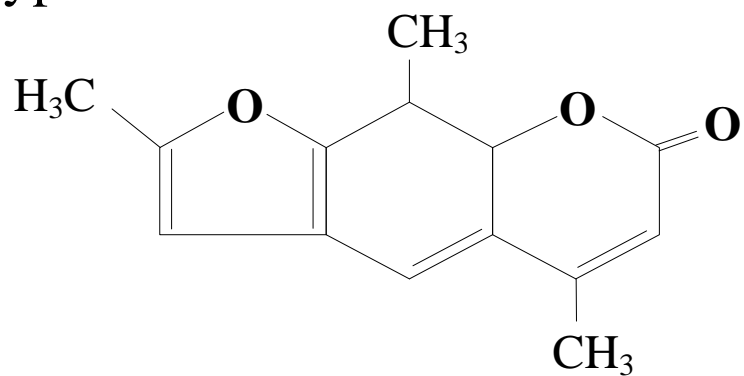
5 - methoxypsoralen



psoralen



8-methoxypsoralen



4, 5', 8 - trimethylpsoralen

Obr. 1: Chemická struktura nejčastěji terapeuticky používaných furanokumarinů
(převzato a upraveno z Malina, L., Fotodermatózy, 1999)

2.3. Testovací metody fototoxicity

Pro studium fototoxicity mohou být používány různé metody, testy *in vitro* i testy *in vivo*. Etický faktor vyžaduje spolehlivé *in vitro* testy pro posouzení a předpovězení kožní fototoxicity. Testování *in vitro* však není příliš jisté, neboť u živých organismů existuje mnoho různých mechanismů fototoxického účinku a různé buněčné cíle. Proto je lepší kombinace více metod. Fototoxicita *in vitro* i *in vivo* způsobuje poškození buněčného jádra (DNA nebo RNA), membrány a cytoplazmatických složek (Kornhauser, A. et al., 1998).

Pro předvídání fototoxického účinku byly vyvinuty testy *in vitro*, které jsou používány ve screeningových studiích a v současné době už je jejich metodika propracovaná natolik, že některé z nich mohou nahradit i testování na zvířatech. Jejich výhodou je menší časová náročnost na provedení, nižší cena a i redukce pokusných zvířat používaných v experimentech (Ellis, L.A., 1998).

V roce 1982 bylo schváleno Mezinárodní sjednocení testů toxicity OECD (Organization for Economical Cooperation and Development), přičemž návrhy doporučení byly vytvořeny proto, aby všechny chemické látky byly testovány shodně, jak v České republice, tak i v ostatních zemích OECD, a aby získané výsledky byly srovnatelné a vzájemně akceptovatelné (Prokeš, J. a kol., 1997).

Před dvěma lety byla schválena koncepce nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami, tzv. **REACH** systém (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*). Vznik této právní normy byl nezbytný zejména poté, co bylo zjištěno, že společnost má dostatek informací o nebezpečných vlastnostech jen u 10% používaných chemických látek. Tato skutečnost vychází z toho, že v EU od roku 1981 platilo rozdělení chemických látek na „nové“ a „existující“, které byly do roku 1981 řádně zaregistrovány a nebyly u nich požadovány zkoušky na neškodnost. **REACH** stírá hranice mezi těmito látkami a nařizuje novou registraci pro nové i stávající látky. Součástí podkladů pro registraci je soubor informací o látce, o jejím bezpečném používání a odstraňování a zpráva o její chemické bezpečnosti při všech očekávaných způsobech jejího použití. Výsledky testování, které bylo provedeno v jednom státě EU jsou akceptovatelné i v ostatních

státech (Bláha, K., 2005). Pro zamezení zkoušek na zvířatech se zkoušky na obratlovcích pro účely tohoto nařízení provádějí až jako poslední možnost. Rovněž je nutné přijmout opatření, kterými se zamezí zdvojování jiných zkoušek (www.mpo.cz).

Opatření současné platné legislativy vedou k nalezení nových vhodných metod pro testování nežádoucích účinků na biologické systémy a i k redukci počtu zvířat používaných pro testování chemických sloučenin.

Definice alternativních testů se různí; podle Evropského centra pro Validaci Alternativních Metod Spojených Výzkumných Center Evropské Komise (ECVAM JRC EC) i podle Centra Johna Hopkinse pro vývoj alternativ k testování na zvířatech (CAAT = Center for Alternatives to Animal Testing) je alternativní metodou jakákoli metoda, která pomůže zredukovat, vylepšit nebo nahradit používání pokusů na zvířatech ve výzkumu, testování nebo výuce tím, že podává informace stejné úrovně jako informace získané se zvířaty (Tichý, M., 2005). Tato definice je založena na koncepci 3R (*Replacement, Reduction and Refinement*), kterou v roce 1959 definovali Russel a Burke.

K alternativním metodám jsou dnes řazeny testy *in vitro* (testy prováděné na tkáních, tkáňových řezech a buňkách), testy *in silico* (pomocí počítačových modelů) a figurují zde také metody výzkumu na nižších (živých) organismech (rostlinách, prvocích, bakteriích a bezobratlých). Velice perspektivní jsou také metody využívající matematické modelování (Tichý, M., 2005; www.caat.jhsph.edu/history/AWE/awards.htm).

2.3.1. Testování na zvířatech – testy in vivo

Co se týče testování na zvířatech, je užitečné připomenout existenci rozdílu mezi pokusným a laboratorním zvířetem. Laboratorní zvíře je speciálně určené pro laboratorní testování, vyšlechtěné se známým genomem a chované pouze v laboratorních podmínkách. Pokusné zvíře naproti tomu může být jakékoliv zvíře používané k pokusům.

Volba pokusného zvířete pro testování je dána jistými konvencemi, předpokládaným charakterem účinků látky, uvažovaným způsobem použití a dobou expozice. Také je vyžadována přesná definice zvířete (původ, pohlaví, stáří, zdravotní stav aj.). Obvyklé zastoupení samců a samic ve studiích je 1:1, není-li požadováno jinak (Kupec, J., 2004).

K testům toxicity se běžně používají nebo používala laboratorní zvířata – myši, potkani, králíci, morčata, kočky, psi a primáti. Dlouholetou snahou je však tyto testy na obratlovcích omezit, na druhou stranu však tyto testy na zvířatech zatím nelze zcela vyloučit (Prokeš, J.a kol., 1997).

Jako příklad nedostatečného testování na zvířatech je popisována tzv.thalidomidová aféra. Tento lék byl roku 1957 uveden na německý trh jako sedativum Contergan a propagován jako zcela neškodný a byl indikován těhotným ženám pro potlačení nevolnosti a zvracení v těhotenství. Výsledky testů na zvířatech prokázaly pouze nízkou akutní toxicitu, vůbec nebyla testována embryotoxicita. Později vyšlo najevo, že thalidomid způsobuje poruchy zakládání končetin, tzv. fokomelii a je to silný teratogen (Zurlo, J. et al., 1994). Později bylo zjištěno, že toto specifické poškození plodu lze vyvolat jen během desetihodinového intervalu v desátém dnu gravidity (Lüllmann, H. et al., 2002).

Při studiích, které využívají jako testované objekty obratlovce nastává několik problémů. Zejména jde o splnění podmínek pro chov a testování na laboratorních zvířatech, rozdíly v metabolismu testovaného zvířete a člověka a extrapolace zjištěných výsledků na člověka. Rovněž je třeba vzít do úvahy i časovou náročnost jednotlivých testů a finanční zátěž (Zurlo, J. et al., 1994).

Problémem je i otázka testace jediné chemické látky v experimentu, zatímco za normální situace je člověk v prostředí, ve kterém žije, vždy vystaven vlivu celé řady takovýchto látek soustavně. Toto je třeba si uvědomit, zvláště pak při interpretaci získaných výsledků a jejich extrapolaci na člověka (Prokeš, J.a kol., 1997).

Je pravděpodobné, že v budoucnu dojde ke snížení počtu zvířat používaných pro testy *in vivo*. Tento názor je také publikován v zásadním rozboru OECD

(*Organisation for Economic Co-operation and Development*) „**Health effects test guidelines for *in vivo* testing**“. Bylo zjištěno, jak vylepšit stávající testy. Zásadními body je eliminace nadbytečných testů, použití jednoho pohlaví při testování, simultánní aplikace některých testů stejným zvířatům, širší používání screeningových metod při primárním testování (www.oecd.org).

Roku 2002 bylo pro testování použito asi 10,7 mil. zvířat. 10% z nich se využilo při testování toxicity a stanovení bezpečnosti chemických látek. Zbylých 90% bylo použito pro další vědecké účely (www.jrc.it).

Při testování na laboratorních zvířatech se využívají studie krátkodobé a studie dlouhodobé. Mezi krátkodobé studie lze zařadit testy akutní toxicity, testy subchronické toxicity, testování lokálních účinků chemických látek na kůži a oku a testy kožní dráždivosti. Mezi dlouhodobé studie se řadí studie kancerogenity a chronické toxicity.

Toxikologické testy na laboratorních zvířatech se řídí Zákonem č. 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání, a dále v doporučeních OECD vydaných pod názvem „**OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS**“.

Doporučení OECD situaci ulehčují v tom, že přesně určují jaké druhy laboratorních zvířat pro určitý test použít, obecně jaké množství látky aplikovat a jakým způsobem a udávají co všechno musí obsahovat protokol o testaci. Každá změna pak musí být přesně uvedena a zdůvodněna (Prokeš, J. a kol., 1997).

Nejšířeji akceptovaný test pro zjištění fotokarcinogenního potenciálu je test na bezsrsté myši. Délka tohoto testu je asi jeden rok (obvykle 40 týdnů podávání zkoušené látky a UV ozařování a dalších 12 týdnů pro pozorování kožních nádorů), z tohoto důvodu je také dosti finančně náročný. Proto je tady velký zájem najít zkrácenou levnější metodu pro předpověď fotokarcinogenity (Ellis L. A., 1998).

V prováděných fotobiologických studiích bylo zjištěno, že hlavní principy fotokarcinogeneze jsou u myši i lidí společné. Studie z roku 1998 se zabývala relevancí zvířecího modelu pro studie fotokancerogenity. U obou druhů se vyvíjí nezhoubná forma rakoviny kůže na nekrytých oblastech v závislosti na délce a

intenzitě ozáření, u obou se objevuje poškození DNA a mutace v p53 tumorsupresorové oblasti, u obou se zvyšuje fotokarcinogeneze v přítomnosti uhelného dehtu, imunosupresivních látek a 8-methoxypsoralenu. Toto je výchozí bod pro odhad možných rizik pro člověka v oblasti množství dopadajícího slunečního záření i v oblasti lidských zdrojů (Forbes, D., 1998).

2.3.2. Alternativní metody

Jak již bylo uvedeno výše dle Centra Johna Hopkinse pro vývoj alternativ k testování na zvířatech jsou alternativní testy definovány jako metody, které redukují, zmírňují nebo nahrazují testování na zvířatech (www.caat.jhsph.edu/history/AWE/awards.htm).

Alternativa redukce: Pro pokus je použit minimální počet zvířat za dosažení stejných výsledků jako při použití většího souboru jedinců.

Alternativa zmírnění: Při provedení testů na laboratorních zvířatech je třeba v průběhu testování zmírnit stres, bolest a připravit vhodné životní podmínky. Po ukončení experimentu má být použita nejrychlejší a nejhumánnější metoda utracení.

Alternativa náhrady: Zde jde o úplnou eliminaci využití obratlovců při testování. Obratlovec buď není použit vůbec a je nahrazen bezobratlým organismem, příp.se využijí data, matematické modely nebo obratlovec není podroben testování a slouží jako zdroj tkání, orgánů nebo buněk (Frazier, J.M., 1990).

Alternativní metody testování jsou stále předmětem zkoumání a zájmů odborné veřejnosti. na celém světě(ec.europa.eu/comm). ECVAM během svých workshopů obsáhle projednává přístupy k validaci a problémy s tím spojené. Jedním z prvních cílů ECVAM bylo zvýšení celkové informovanosti o vývoji a validaci neanimálních testů a konečně možnost začlenění alternativních testů do regulační toxikologie. Vůbec první *in vitro* metoda, která byla zavedena v toxikologii regulačních mechanismů, byl před více než dvěma desetiletími test mutagenity *in vitro* (Jírová, D. 2005).

Alternativní metody se dnes využívají zejména při hodnocení kosmetických prostředků, které jsou používány denně, proto musí zaručit bezpečnost užívání pro spotřebitele. Využívají se velmi často při hodnocení oční a kožní tolerance, fototoxicity, fotoprotekce, senzitivace kůže a perkutánní absorpce v oblasti péče o pleť a vlasy.

2.3.2.1. Testy in vitro

2.3.2.1.1. 3T3 NRU in vitro test fototoxicity

Pro vývoj a validaci in vitro fotoiritačních testů zřídila EC (European Commission) a COLIPA (European Cosmetics, Toiletry and Parfumery Association) roku 1991 společný program. Zde byl objeven 3T3 NRU PT test. Tento fotocytotoxický test používá kultury fibroblastových buněk 3T3 uptake (= příjem buňkou) neutrální červeně (NRU = Neutral Red Uptake) jako endpoint (prokazující znak) cytotoxicity (Jones, P.A., 2003).

Prakticky se provede tak, že se fibroblasty nasadí do dvou paralelních mikrotitračních destiček, 24 hodin se nechají inkubovat a pak se médium nahradí osmi koncentracemi testované látky. Nechá se působit 1 hodinu a pak se jedna destička ozáří netoxickou dávkou UVA záření, zatímco druhá destička se ponechá po stejnou dobu ve tmě. Po ozáření se v obou destičkách vymění testovací médium, buňky se kultivují do druhého dne, kdy se obarví neutrální červení a podle toho, zda došlo k inkorporaci barviva do živé buněčné kultury se fluorimetricky stanoví její životnost.

Lze říci, že porovnáváme cytotoxicitu látky v přítomnosti záření a bez něho. Z hodnoty IC_{50} (koncentrace, které způsobí 50-tiprocentní inhibici růstu) je vypočítána míra toxicity bez a s UV ozáření, tzv. PIF (fotoiritační faktor). Definice říká, že testovaný materiál je potenciálně fototoxicky nebezpečný, je-li $PIF \geq 5$ (Jones, P.A., 2003; Jírová, D., 2005).

Podobně jako buněčné kultury lze k testování fototoxicity využít i tkáňové kultury.

Pro testování lze použít tkáňovou kulturu pocházející z normální i abnormální buňky člověka nebo zvířete.

Problémem však bývá uchovávání i následná kultivace tkáňových kultur. Jednotlivé buňky se v kultuře snaží získávat vlastnosti nesespecializovaných buněk místo toho, aby si zachovaly vlastnosti tkáně, ze které pocházejí. Pro testování je proto vhodné používat málo diferencované buňky (fibroblasty) (Zurlo, J. et al., 1994).

Příkladem z oblasti fotobiologie může být použití rekonstruované kůže obsahující živou dermis a epidermis ke zhodnocení biologické modifikace působením UVB, UVA a slunečního záření. Tato metoda nám dnes umožňuje např. hodnocení účinnosti opalovacích krémů a jejich složení (Leclaire, J., 1998).

Komerčně je dostupný test *EPISKINTM*, což je trojrozměrný model lidské kůže skládající se z epidermis s funkční *stratum corneum*. Při testu dochází k topické aplikaci testované látky na povrch kůže a zhodnocení účinku akutního UVA ozáření na životaschopnost buněk (vymizení fibroblastů z pokožky) (www.invittox.com).

2.3.2.2. Testy na nižších organismech (biotesty)

Tyto testy trvají kratší dobu než testy in vivo, ale obtížnější je zde extrapolace výsledků na člověka. Řadí se sem například testy na prvocích, bakteriích, bezobratlých a rybách (Tichý, M., 2005).

Z bakterií je využívána bakterie *Salmonella typhimurium* ve známém Amesově testu, který hodnotí mutagenní potenciál testovaných látek sledováním jejich účinku na pět kmenů *Salmonella typhimurium* avšak tento test se nevyužívá při testování fototoxicity (Nečas, O. et al., 2000).

Z bezobratlých je velmi často využíván druh *Tubifex tubifex*. Zde byly provedeny studie, kdy mechanismus fototoxicity byl posuzován pomocí pozorování produkce reaktivních forem kyslíku, změnou biologických parametrů a určením prahové dávky, po které začíná toxická reakce do tří hodin po expozici (Mishra, R.B., 2002).

Hlavními přednostmi testu je jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost

Jedním z problémů použití bezobratlých pro prvotní screening jsou odlišnosti v biologickém uspořádání vyšších organismů, a s tím související potíže s extrapolací výsledků na obratlovce. Specifická odpověď obratlovců, která je asociována s metabolickými pochody, může limitovat extrapolaci získaných výsledků na obratlovce (Lagadig, L.; 1998).

Využívání bezobratlých organismů při toxikologickém screeningu je výhodné z několika důvodů. Jedná se o organismy s krátkým životním cyklem a vysokou fertilitou, lze je tedy kultivovat za laboratorních podmínek. Krátkodobé testy prováděné na hlodavcích trvají 1-2 týdny, kdežto testy s bezobratlými organismy asi 2-4 dny. Toto a nižší náklady na koupi a chov bezobratlých znamenají celkově menší finanční zátěž toxikologických testů (Lagadig, L.; 1998).

Jako další testované organismy se mohou využívat např. *Daphnia magna* nebo *Artemia salina*. Testování fototoxicity na artemiích prováděl také vědecký tým Kagan, J. *etal.* Nauplia (organismy mladší než 24 hodin) byla vystavena roztokům jednotlivých fotosenzitizérů, jako endpoint byl v jednom případě použit čas potřebný k imobilizaci, ve druhém případě mortalita jedinců vyhodnocená pod mikroskopem jako nepřítomnost pohybu ani jako odpovědi na světelnou a mechanickou stimulaci (1984).

2.3.2.3. Testy in silico – počítačové metody

Metody *in silico* jsou založeny na odhadu výpočtem na počítačích, respektive pomocí modelů vytvořených v počítačích, mezi nimiž jsou již dlouho využívány metody a modely analýzy QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship – kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou látek a velikostí jejich biologického účinku) a SAR (Structure – Activity – Relationship). QSAR modely se spojují s kvantitativním odhadem účinku, SAR modely jsou kvalitativního charakteru a hledají prostorové uspořádání míst účinku (Waisser, K., 2001).

Z metod *in silico* byl vytvořen nový toxikologický obor, tzv. predikční toxikologie (Tichý, M., 2005). Ta slouží ke studiu aplikací a postupů, kterými je možno určit vliv chemikálií a rozsah účinku bez užití pokusných zvířat. K tomu využívá nashromážděné údaje a vytváří počítačové programy, pomocí nichž pak odhaduje toxicitu nových látek (Nesměrák, K., 2005).

Výsledky získané metodami *in silico* jsou po validaci rovnocenné s údaji získanými *in vivo* (Tichý, M., 1983).

Správnost použité *in silico* metody závisí na veškerých faktorech ovlivňujících získané parametry. Mezi tyto faktory patří doba a podmínky expozice, věk testovaného subjektu a jeho zdravotní stav (Kaiser, K.L.E. et al., 1994).

2.3.2.3.1. QSAR analýza

QSAR je matematické (kvantitativní) vyjádření vztahu chemických vlastností k biologickému účinku, naproti tomu SAR je kvalitativní vztah mezi chemickou strukturou a potenciálním biologickým účinkem.

QSAR analýza se využívá v postupech hodnotících riziko, zejména u již stávajících chemických látek (Karcher, W., 1998). Metodami matematické statistiky jsou analyzována data o biologických, chemických nebo fyzikálních vlastnostech série látek. Takto může být vytvořena např. matematická formule, která zobecňuje data získaná experimentálně o látkách vybraných v dané sérii pro všechny látky, které by do série podle stanovených kritérií patřily. Pro výběr látek je vhodné dodržet dva požadavky: 1. látky v sérii by měly vykazovat stejný mechanismus účinku a 2. série by měla obsahovat látky s co největším rozdílem fyzikálně chemických vlastností. Série může být strukturně homogenní-složena ze strukturně podobných látek nebo strukturně heterogenní-složena z látek strukturně rozdílných (Tichý, M., 2005).

Mezi nejmodernější metody QSAR analýzy patří aplikace molekulové grafiky. Tuto metodu lze také velmi výhodně využít při testování nových léčiv. Pomocí počítače lze modelovat interakci sloučeniny s receptorem a zaměřit se na látky u kterých bude tato interakce největší (Waisser, K., 2001).

2.3.3.Epikutánní (photopatch) testy

Tento druh kožních testů slouží k průkazu jednak fototoxického působení a jednak fotoalergické senzibilizační schopnosti různých substancí. Zatímco jimi prokázaná pozitivní fotoalergická reakce je specifickým potvrzením fotosenzibilizace, pozitivní reakce fototoxická musí být pojímána vzhledem k individuální citlivosti jednotlivých osob jen jako průkaz relativní a hodnocena zásadně spolu s klinickým nálezem.

Fotoepikutánní testování bylo zavedeno v souvislosti s nálezem kontaktních fototoxických a fotoalergických reakcí po aplikaci sulfonamidů koncem třicátých a začátkem čtyřicátých let. Posléze se objevily pozitivní reakce fotoepikutánních testů i po některých fenothiazinech. V dalších letech byly zjištěny i fotosenzitivní reakce po dezodorantech přítomných v některých mýdlech a čisticích prostředcích.

Pokud jde o indikaci fotoepikutánních testů, měly by být provedeny v každém případě suspektní kontaktní fotosenzitivity. Dále by takto měly být vyšetřeni i pacienti s perzistujícími formami fotosenzitivity, zejména s chronickou aktinickou dermatitidou. Vyšetření fotoepikutánním testem je vhodné i u těch nemocných, u nichž je zjištěna fotoerupce lokalizovaná ve slunci exponovaných kožních oblastech a neodpovídajících svým charakterem žádné z idiopatických dermatóz. To platí zejména pro nemocné léčené místně či systémově prostředky, jejichž fotosenzibilizační schopnost je známa.

Praktické provedení fotoepikutánního testu spočívá v aplikaci podezíraného antigenu ve vhodné formě a koncentraci, nejčastěji ve vazelínovém základu, na zdravou kůži zad testované osoby pomocí vlhké komůrky chráněné před osvětlením (nejlépe krytím testovaného místa aluminiovou folií).

Suspektní alergen se přikládá na dvě místa vedle sebe, přičemž druhý test slouží jako kontrola. Doba přiložení činí 24 hodin. Po sejmutí jedné z komůrek se testovací místo pod ní ozáří radiačním zdrojem emitujícím široké UVA spektrum (320 – 400nm), dávkou odpovídající 10 J/cm². Komůrka se pak opět uzavře a oba testy se odečtou po dalších 24 hodinách (neozářený test tedy zůstane

neodkryt po 48 hodin). Odečet se provede okamžitě, dále pak po 24, 48 a 72 hodinách po ozáření (Malina,L., 1999).

Pro získání odpovídajících výsledků je nutné snížení dávky u jedinců u kterých se předpokládá nízká minimální erythemální dávka (MED) UVA-zářením, stejně jako její zvýšení u jedinců s tmavou pokožkou (Isaksson, M.et al., 1997).

Předpokladem získání směrodatného výsledku testu je několikátýdenní neopalování se a nepoužívání lokálních kortikoidních přípravků na testované ploše kůže.

Pozitivní morfologický výsledek (erytém, infiltrace, papulovezikuly, eroze a buly) a dynamika změn svědčí o fotoalergickém nebo fototoxickém působení vyšetřované látky.

U řady sloučenin nelze zajistit dobrou průchodnost epidermální bariérou. Fotoepikutánní testy je proto nutné modifikovat. Modifikace testů je mnohdy nutná i při systémovém podávání fotosenzibilizujících sloučenin vzhledem k vzniku jejich odlišně reagujících metabolitů (Malina,L., 1999).

2.4. Tubifex tubifex

2.4.1. Taxonomické zařazení

Říše: *Animalia* (Živočichové)

Kmen: *Annelida* (Kroužkovci)

Třída: *Clitellata* (Opaskovci)

Podtřída: *Oligochaeta* (Máloštetinatci)

Řád: *Plesiopora* (Nitěnkovci)

Nadčeleď: *Tubificoidea*

Čeleď: *Tubificidae*

Podčeleď: *Tubificinae*

Druh: *Tubifex tubifex* Müll. (Nítěnka obecná) (Sedlák, E., 2003)

2.4.2. Anatomická charakteristika některých taxonomických skupin

Annelida (Kroužkovci)

Kroužkovci se vyznačují stejnocenným článkovaním těla (homonomní segmentace). Jednotlivé tělní články (segmenty) jsou od sebe odděleny vnitřními blanitými přepážkami (dissepimenty). První tělní článek se nazývá prostomium, poslední články srůstají a tvoří konečný článek (pygidium). Každý článek kromě prvního a posledního obsahuje pár coelomových váčků, zauzlin, nálevkovitých metanefridií a původně i pohlavních orgánů. U máloštetinatců a pijavek jsou pohlavní orgány jen v některých článcích. Trávicí soustava prostupuje celým tělem, je diferencovaná na jednotlivé typické oddíly. Ústa jsou na druhém tělním článku, anus na pygidiu.

Povrch těla kryje kolagenová kutikula, pokožka obsahuje slizové žlázy a smyslové buňky. Na povrchu těla se také vyskytují nečlánkované útvary zvané parapodia sloužící k pohybu. Pohyb je mimoto zajištěn kožněsvalovým vakem, tj.

hladkou svalovinou srostlou s pokožkou. Svalovina má okružní, podélný i příčný průběh. Coelomové váčky jsou naplněné tekutinou, kterou podpírá kožněsvalový vak a má funkci vnitřní kapalné kostry – hydroskelet.

Nervová soustava žebříčkovitá zauzlinová bývá na břišní straně těla. Je tvořena párem mozkových (nadhltanových) zauzlin spojených obhltnovým prstencem, ze kterých vybíhají dva pruhy. V každém je po páru zauzlin spojených příčnou spojkou. Podélné spojky zauzlin se nazývají konektiny, příčné komisury.

Nálevkovité metanefridie, které tvoří vylučovací soustavu jsou otevřené do coelomového váčku, vývodné kanálky procházejí do následného článku v němž ústí na povrch. Metanefridii se z těla vylučuje přebytečná voda se zplodinami a ve vývodných kličkách jsou v místě opředěném cévami některé látky zpět vstřebávány do krve. V některých tělních člancích slouží metanefridia částečně nebo zcela jako pohlavní vývody – gonodukty.

Kroužkovci dýchají žábami nebo celým povrchem těla. Mají velkou schopnost regenerace.

Cévní soustava je uzavřená, tvořená hřbetní a břišní cévou, které jsou spojené kruhovitými spojkami. Toto základní složení bývá ještě doplněno dalšími cévami, např. cévou subneurální, cévami pokrývajícími trávicí trakt, pulsujícími obloukovitými spojkami zvanými auxilární srdce a jiné. Krevní barvivo hemoglobin není vázáno na krvinky.

Kroužkovci jsou převážně hermafroditi. Časté je také nepohlavní paratomické nebo architomické dělení, běžná je regenerace (Lellák, J. a kol., 1982).

Oligochaeta (máloštětinatci)

Společným znakem máloštětinatců a pijavek je opasek (clitellum), který hraje důležitou roli při rozmnožování. Tělo je kulovitého průřezu, parapodia jsou zakrnělá, zůstávají jen štětiny ve čtyřech párech (www.referaty.info.cz).

Tělo se vyznačuje stejnocennou (homonomní) segmentací. Počet článků je u různých čeledí různý (*Tubificidae* 40 – 200, *Naitidae* 7 – 40). Vnější segmentaci odpovídá segmentace vnitřní. Tělo je kryto kutikulou, články jsou opatřeny

štětinkami, které vyrůstají ve čtyřech svazcích na každém článku. Jejich počet kolísá od dvou (*Lumbriculidae*) do většího počtu ve svazečku (*Tubificidae*). Nikdy nejsou na výběžku prvního tělního článku – na prostomiu. Otvor ústní je na břišní straně těla za prostomiem, anální otvor ústí na posledním tělním článku.

Trávicí soustava může být diferencovaná na ústa, hltan, jícen, žláznatý žaludek, žvýkací žaludek, střevo a řitní otvor.

Plesiopora (Nítěnkovci)

Mají jeden pár testes s vývody v následujícím článku a jeden pár ovárií. Tělo je tenké, malých rozměrů (Sedlák, E., 2003).

Tubifex tubifex Müll.

Nítěnka má jako všichni máloštětinatí válcovité, dvoustranně souměrné tělo (Lucan-Bouché, M.L. et al., 1999). Je 20 až 85mm dlouhé, růžové a skládá se až ze 130 segmentů. Ve hřbetním segmentu je 2 až 5 vějířovitých a týž počet vlasovitých štětín. V břišních svazcích 3 až 5 rozeklaných štětín, za opaskem je štětín méně. Pohlavní štětiny nejsou přítomny. Opasek se nachází na jedenáctém až dvanáctém segmentu (Hrabě, S., 1981).

2.4.3. Biologie a ekologie nítěnky obecné

2.4.3.1. Pohyb, potrava a dýchání

Některé druhy mohou plovat ve vodě mrskavým pohybem celého těla a mohou se také objevit i jako součást planktonu. Rody *Pristina* a *Stylaria* plavou velmi dobře bodovitým pohybem, kdežto druhy rodu *Aelosoma* se pohybují ve vodě pomocí rychle kmitajících brv jen na předním konci těla. Nítěnka se pohybuje kontrakcemi podkožní svaloviny, jako opora slouží štětiny, kterými se zachycuje na podkladu. Živí se detritem a bakteriemi, přičemž nevybírání jednotlivé potravní částice, ale přijímá veškerý materiál uložený na dně, nestravitelné zbytky vyvrhne análním otvorem. Zaživací trubicí projde ze 24 hodin množství bahna převyšující 4 – 6násobně váhu těla jedince.

Všichni máloštětinatci dýchají celým povrchem těla. U některých druhů je vyvinuto i dýchání stěnou střevní přičemž výměnu vody obstarávají svaly a obrvený epitel na konci střeva. Tento způsob může dokonce převažovat u některých čeledí nad dýcháním kožním (*Tubificidae*). U některých červů jsou vyvinuty tenké vláknité žábry. Z čeledi *Tubificidae* má žábra pouze druh *Branchiura sowerbyi*, umístěné po páru na každém článku v zadní části těla.

U řady druhů (především čeleď *Tubificidae*) je vyvinuta schopnost žít v prostředí velmi chudém na kyslík a některé druhy vydrží bez kyslíku velmi dlouho. Dle pokusů Alsterberga (1922) vydrží *Tubifex tubifex* Müll. 25 dnů bez kyslíku. Zjistil, že schopnost anoxybiosy je do značné míry závislá na teplotě (při teplotách 2 - 3°C přežilo 30% pokusných jedinců anoxyi po 48 dnů, zatímco při 18 – 20°C byla již devátý den všechna pokusná zvířata mrtvá). Jako zdroj energie je při anoxybiose ve zvýšené míře využíván glykogen. Za těchto podmínek se může podíl glykolýzy na metabolismu zvětšit 3 – 4krát. Velký podíl na schopnosti tohoto druhu žít i při nízkých koncentracích kyslíku ve vodě má také hemoglobin rozpuštěný v hemolymfě. Jeho množství je nepřímo úměrné množství kyslíku ve vodě: v nádržích se zahnívajících vodou a tudíž s nízkým nasycením kyslíkem jsou populace nítěnek intenzivně červeně zbarvené, zatímco ve vodách s dostatkem kyslíku jsou pouze světle červené.

Alsterberg zjistil u druhu *Tubifex tubifex* stavy chování závislé na množství kyslíku ve vodě. Jestliže se procento nasycení vody kyslíkem pohybovalo kolem 100% (při dané teplotě), pak byly nítěnky zavrtány v bahně a vyčnívalo jen několik posledních článků, které se nepohybovaly. Tento stav označil jako apnoe. Při postupném poklesu procenta nasycení se vysunovala stále větší a větší část těla z bahna ven a prováděla rytmické vlnivé pohyby, jejichž intenzita neustále stoupala (eupnoe a dyspnoe). Při poklesu množství rozpuštěného kyslíku k nulovým hodnotám zalézala pokusná zvířata opět do bahna, nepohybovala se – asphyxie. Vlnivý pohyb a vysunování větší části těla z bahna do vody má dle Alsterberga dva účely – jednak umožňuje výměnu plynů na větší části těla a jednak přichází k tělu voda bohatší kyslíkem.

2.4.3.2. Rozmnožování a vývoj

Máloštětinatci jsou hermafroditi. Při kopulaci se dva jedinci k sobě připojují břišní stranou (někdy je přítom ještě vylučován hlen kožními žlázami – to však je častější u suchozemských forem), a to tak, že před jednoho jedince směřuje vždy ke kaudální části druhého. Při tom jsou jedinci k sobě přiloženi vývody semenných schránek (receptaculum seminis) a otvory chámovodů. Spojení trvá různou dobu, při kterém si partneři předávají spermatophory, tj. shluky spermií stálých tvarů vyznačující se obalovou vrstvou.

U pohlavně zralých jedinců se spermatophory nacházejí ve spermatekách. U rodu *Tubifex* jsou dlouhé 1,2mm. Pohlavní zralost u červů se určuje nejen podle vývoje pohlavních orgánů, ale především podle přítomných spermatophorů ve spermatekách. Vajíčka a spermie získané z druhého jedince se hromadí v posunujícím se hlenovém pouzdře vzniklém uvolněním z opaskových žláz, ze kterého po svlečení vzniká kokon. Žlázy nejprve vytvoří vrchní vrstvu budoucího kokonu a pak spodní, což je většinou průzračná nebo mléčně zakalená hmota, která obsahuje bílkovinu anebo neslouží výživě. Kokon je volně odkládán na dno. Konečný tvar dostává kokon až po uvolnění a tento tvar je charakteristický pro jednotlivé druhy červů. Většina kokonů červů čeledi *Tubificidae* je dvoustranně stopěčkatá, jsou heteropolární s nestejně širokými a dlouhými stopkami. U druhu *Tubifex* uvádí Penners (1933) kokony jednoduché, s průhledným obalem, oválného tvaru asi 1 až 2mm široké a 2 až 3mm dlouhé. Počet vajíček v kokonu je různý (1 – 40), vývoj embryí probíhá přímo, u různých druhů nestejně dlouhou dobu. Vývoj oplozeného vajíčka v kokonu do jeho uvolnění trvá u čeledi *Tubificidae* přibližně 20 dnů.

Embrya uvolněná z kokonu jsou různě dlouhá a liší se od dospělých většinou i menším počtem štětín. Protože po rozmnožování červů dochází k úplné resorpci pohlavního aparátu dochází Kennedy (1966) k závěru, že neexistuje spolehlivá metoda jak určit věk červů.

Vývoj červů po uvolnění z kokonů do období pohlavní zralosti je různý a závisí opět na teplotě a množství vhodné výživy. Druh *Tubifex tubifex* se při kolísání

životních podmínek rozmnožoval dvakrát do roka, tzn., že období pohlavní zralosti je přibližně půl roku.

Vedle rozmnožování pohlavního je zachováno také nepohlavní – architomie a paratomie. Při architomii dochází k regeneraci chybějících částí těla až po úplném oddělení dceřinných jedinců. Je známá i u některých druhů čeledi *Tubificidae*. Při paratomii naopak předchází regenerace jednotlivých částí těla jejich oddělení a tím vznikají řetězce jedinců – zooidů.

2.4.3.3. Bionomie

Většina druhů z čeledi *Tubificidae* žije v bahně. Nítěnky obývají většinou vrstvu do 6cm hloubky. Ojedinele jsou nalézáni i v hloubce 40cm. Podle Boruckého (1940) vypadá vertikální rozdělení máloštětinatců na dně jezera takto:

Vrstva bahna (v cm od povrchu)	5 – 10	10 - 15	15 - 25	35 – 40
% z celkového počtu jedinců	81	8	9	2

Někteří červi se za nepříznivých podmínek encystují (byly nalezeny cysty *Tubifex tubifex*). Některé jedinci žijí na různých, často velmi odlišných biotopech. Některé druhy dobře snášejí pokles teplot i na velmi nízké hodnoty – nítěnka až na - 8°C.

Červi jsou potravou dravého hmyzu, živí se jimi larvy vážek, šídel, larvy střechatek, potápníků a obojživelníků, obojživelníci, ale především ryby (Lellák, J.a kol., 1982).

2.4.4. Některé významné poznatky o *Tubifex tubifex*

2.4.4.1. Obecné informace

Nítěnka je kosmopolitně rozšířený máloštětinatce. Tento organismus a další příbuzní kroužkovci jsou významným indikátorem znečištění vod (Beauchamp, K.A., 2001). Hrozí od něj ale i nebezpečí neboť *Tubifex tubifex* je velmi často hostitelem *Myxobolus cerebralis*, který způsobuje onemocnění lososovitých ryb. Nítěnka se nakazí požitím myxospor *M. cerebralis*. Takto

infikovaný organismus do vody uvolňuje triactinomyxony, které způsobují infekci ryb, ze kterých se pak po jejich smrti a rozkladu znovu uvolňují myxospory, které nakazí další nítěnky – vzniká takzvaný bludný kruh (Stevens, R. et al., 2001; Gilbert, M.A., 2001).

Nítěnka žije na rozhraní vody a sedimentu, přední část těla je v sedimentu zahrabaná a zadní část se vlní v okolní vodě. Právě proto je vystavena vlivu látek znečišťujících životní prostředí přítomných v sedimentu i v okolní vodě. Proto jsou tyto máloštětinatci, kteří jsou rovněž důležitým článkem vodního potravního řetězce velmi dobrým materiálem pro hodnocení akutní toxicity různých kovů (Lucan-Bouché, M.L. et al., 1999; Fargašová, A., 1994).

2.4.4.2. Proces dekontaminace u nítěnky

Tubifex tubifex je znám jako velmi odolný druh ke znečištění vody těžkými kovy, zejména mědí a olovem, avšak mechanismy této adaptace nejsou přesně známy. Proto se také používá jako bioindikátor znečištění.

Byla provedena studie, kdy po expozici nítěnky subletální koncentrací mědí a olova došlo k abnormalitě zadní části těla. Morfologie přední části těla těchto nítěnek byla podobná jako u kontrolní skupiny. Nebyla zde žádná morfologická změna břišních ani hřbetních štětín, prostomium bylo neporušené. Avšak asi 75% těchto nítěnek mělo abnormální kaudální část. Polovina nítěnek zadní část úplně postrádala nebo ji obnovovala ze zbytku.

Ztráta ocasní části zahrnovala několik kroků. Nítěnka nejdříve odškrtila a izolovala zadní část od zbytku těla. Izolovaná část pak zdegenerovala, zkroutila se a každý jednotlivý článek se zformoval do kuličky. Ve druhém kroku byl ztracen ocas. Ve třetím kroku se rána uzavřela a zhojila. Ve čtvrtém stupni se regeneroval nový ocas. Toto ukazuje, že *Tubifex tubifex* se tímto způsobem chrání před zvyšující se koncentrací těžkých kovů oddělením zadní části těla, kde jsou tyto kovy naakumulovány (Lucan-Bouché, M.L. et al., 1999).

2.4.4.3. Interakce nítěnky s UV zářením

Soni a Joshi (1996) ve své studii ozařovali *Tubifex tubifex* UVA, UVB, UVC a přímým slunečním světlem aby demonstrovali změny v chování. Ve své zprávě referují o následcích ozáření *Tubifex tubifex* UV světlem.

Kontrolní set organismů byl ponechán v laboratoři v neozářené destilované vodě nebo ve znečištěné vodě z řeky – po 24 hodinách byla mortalita pod 5%. Organismy vystavené UVA záření o intenzitě 2,5J a 10J přežily až do 20 hodin ozařování, ale po 480 hodinách následného stání jich zahynulo 12 – 17%. *Tubifex tubifex* velmi citlivě reagoval na UVC záření. Po ozáření UVC o intenzitě 50mJ byla pozorována okamžitá úmrtnost organismů. Organismy projevovaly velmi rozdílné stupně mortality po expozici UVB zářením. Pěti až desetihodinové ozáření nízkou dávkou UVB záření o intenzitě 100mJ přežilo 100% organismů a při pozorování dalších 48 hodin byl stupeň mortality poměrně nízký. Organismy vystavené dvou až desetihodinovému ozáření UVB o intenzitě 250 – 500mJ sice kompletně přežily ozáření, ale následně umíraly mnohem rychleji než při pokusu s intenzitou 100mJ.

Ze studie vyplynulo, že vystavení nízkoenergetickému dlouhovlnnému UVA záření *Tubifex tubifex* nepoškozuje. Nejvíce toxické se projevvalo vysokoenergetické krátkovlnné UVC záření, což ale v praxi není tak podstatné neboť toto záření je atmosférou odfiltrováno a k zemskému povrchu se nedostane. Nejzávažnější zjištění bylo zaznamenáno při použití UVB záření, kde i malý vzrůst dávky měl za následek výrazné zvýšení mortality buněk (Soni, A.K., 1997).

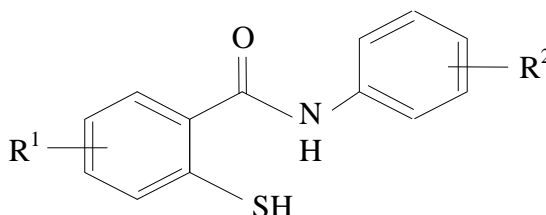
2.5. Testované toxiny

2.5.1. Thiosalicylanilidy

2.5.1.1. Chemická struktura

	R ₁	R ₂
Chemický název: Thiosalicylanilid	H	H
3',4'-dichlorthiosalicylanilid	H	3,4-Cl ₂
4'-methylthiosalicylanilid	H	4-CH ₃
5-chlorthiosalicylanilid	5-Cl	H
3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid	3,5-Cl ₂	4-Cl
3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid	3,5-Cl ₂	4-Br

Základní chemická struktura:

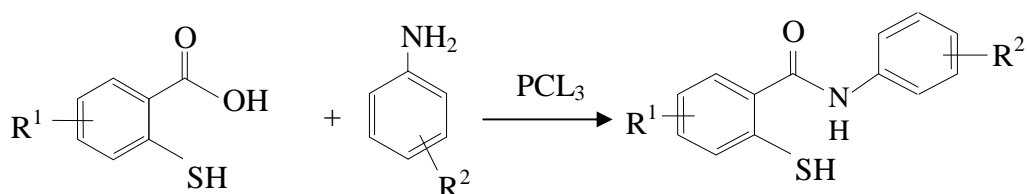


2.5.1.2. Biologická aktivita

Anilidy jsou funkční deriváty karboxylových kyselin, vytvořené od anilinu reakcí s příslušnou kyselinou (např. acetanilid – vznikl reakcí kyseliny octové s anilinem, benzanilid – vzniká reakcí kyseliny benzoové s anilinem, salicylanilid – vzniká reakcí kyseliny salicylové s anilinem). Thiosalicylanilidy jsou pak sirmou obdobou salicylanilidů, tzv. izostery. U anilidů aromatických kyselin se substituenty v acylové části molekuly označují čísla bez indexu, kdežto v anilidové části molekuly se značí čísla s čárkou jako indexem (podobně jako u bifenyly) (Waisser, K., 2001).

Substituované aromatické amidy a thioamidy jsou na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové intenzivně studovány již řadu let.

Substituované thiosalicylanilidy použité pro testování fototoxicity byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK reakcí substituované kyseliny thiosalicylové s příslušným anilinem a chloridem fosforitým v chlorbenzenu (Waisser, K.a kol., 2003). Syntéza byla provedena v mikrovlnném reaktoru. Připravené sloučeniny byly překrystalizovány ze zředěného ethanolu. Totožnost látek byla ověřena stanovením teploty tání a IČ spektry (Kubicová, L., 1992).



Zlepšení syntézy salicylanilidů pomocí mikrovlnného záření bez nutnosti použít rozpouštědlo prováděla pracovní skupina Evy Veverkové a kol. Krátká expozice směsi fenylsalicylátu a anilinu mikrovlnnému záření trvala pouze 3–7 minut a přinesla výtěžek 70 – 95% vysoký (2003).

Salicylanilidy jsou významnou skupinou biologicky aktivních sloučenin. V závislosti na druhu, počtu a poloze substituentů mohou mít různé biologické účinky, např. antibakteriální, antituberkulotické, antimykotické, analgetické a protizánětlivé, antiprotozoární, anthelmintické a herbicidní (Kubicová, L., 1992; Waisser, K.a kol, 2001).

Salicylanilidy patří do skupiny látek, které se ukázaly aktivní vůči G⁺ patogenům včetně methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus* a vankomycin rezistentního *Enterococcus faecium*, kmeny, které představují v současné době velký klinický problém. V roce 1998 byl navržen nový mechanismus jejich působení.

Salicylanilidy působí jako inhibitory dvoukomponentových regulačních systémů (TCS = Two-component regulatory system) bakterií. Tento systém hraje ústřední roli v procesu infekce. Pro účinek je nezbytný elektron akceptorový substituent na salicylové části a hydrofobní skupina na anilidové části. Látky inhibující dvoukomponentový systém mohou vést ke smrti bakteriální buňky (Vinšová, J., 2004).

U autotrofních organismů některé salicylanilidy působí inhibičně na fotosyntézu. Vliv např. 3,5-dichlorsalicylanilidů byl studován na izolovaných chloroplastech špenátu. Tento efekt byl studován spektrofotometricky v přítomnosti akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenol-indofenolu. Studované látky inhibovaly fotosyntetický transport elektronů v chloroplastech špenátu. Po přidání umělého donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu k chloroplastům inhibovaným výše zmíněnými salicylanilidy docházelo ke kompletní obnově redukce 2,6-dichlorfenol-indofenolu. Z toho vyplývá, že jádro fotosystému P680 a část elektronového transportního řetězce (přinejmenším až po plastochinon) zůstala nepoškozena (Kubicová, L.a kol., 2000; Šustr, M.a kol., 2001).

Halogenované salicylanilidy vykazují dva typy účinků souvisejících s ozářením. První je fototoxický účinek, tj. zánětlivá reakce po ozáření. Toto je důsledek chemického poškození tkání vlivem fotochemických procesů (poškození biologicky aktivních molekul reaktivními formami kyslíku), které jsou stimulovány fototoxickou látkou. Kromě toho halogenované salicylanilidy působí rovněž jako fotoalergeny. Zde jde o buňkami zprostředkovanou reakci pozdního typu, přičemž fotoalergen působí jako prohaptén. K fotoalergizujícímu působení dochází uvolněním jednoho nebo více halogenových radikálů po ozáření UV zářením: volný radikál reaguje s proteiny za vzniku nové molekuly, která může působit jako antigen *in vivo* (Harber, L.C. et al, 1967).

2.5.1.3. Využití

Halogenované salicylanilidy byly dříve často používány pro své antimikrobiální účinky jako desinficiencia a antiseptika v medicíně, kosmetice i technických oborech. V souvislosti s jejich zavedením do terapie u nich byla

provedena řada toxikologických studií. Akutní ani chronická toxicita nebyla nijak vysoká a látky nevyvolávaly výrazné orgánové změny, přesto byl popsán toxický efekt a vznik malformací u rybích embryí. Metabolické studie prokázaly, že salicylanilidy působí oxidativní rozpojení oxidativní fosforylace v mitochondriích bezobratlých i obratlovců (Kubicová, L., 1992). Za rozpojení oxidativní fosforylace je pravděpodobně zodpovědná hydroxybenzamidová část molekuly salicylanilidu (Vinšová, J., 2004). Na přelomu 50. a 60. let minulého století se ale zjistilo, že halogenované salicylanilidy vyvolávají fotokontaktní dermatitidy a proto byly až na výjimky postupně staženy z používání (Kubicová, L., 1992).

Velký význam však halogenované salicylanilidy mají ve veterinární medicíně, zejména pro jejich antiparazitární aktivitu jako antitrepatoda (léčiva proti plochým červům – motolicím – trematoda). Trematodózy z parazitologického hlediska představují velmi závažnou skupinu helmintóz především ve skupině hospodářských a volně žijících zvířat. Nejvýznamnějším halogenovaným salicylanilidem je klosantel působící proti dospělým i vývojovým stádiím motolic, proti hlísticím a ektoparazitům, který je používán u skotu, ovcí a spárkaté zvěře. Dalším zástupcem je rafoxanid užívaný pouze u spárkaté zvěře, který působí proti dospělým i vývojovým stádiím motolic a ektoparazitů (Lamka, J., 1998; Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, 1999).

V současné době jsme svědky stoupajícího zájmu vědecké veřejnosti o salicylanilidy a jejich analoga. Na Farmaceutické fakultě UK se intenzivně studuje antimykobakteriální a antifungální aktivita salicylanilidů a jejich analog (Waisser, K. a kol., 2003).

3.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Metodika testu

Experimentální metodika screeningového testování pomocí *Tubifex tubifex* Müll. je součástí navrženého a propracovávaného testu pracovní skupiny „Fototoxicity“ na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Vychází ze zkušeností pracovníků a je navržena pro ověřování fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek.

3.1.1. Design testu

Vlastní test probíhá ve 24jamkových mikrotitračních destičkách, což plně odpovídá nejnovějším trendům v ekotoxikologii a screeningové toxikologii vůbec, tj. miniaturizace uspořádání, úspora experimentálních organismů a zároveň daleko menší spotřeba než je při klasickém uspořádání v Petriho miskách.

Při každém pokusu byl zároveň s fotosenzibilizujícími látkami testován $MnCl_2$ jako standardní toxin, který ověřoval standardnost experimentálních organismů.

3.1.2. Hodnocení

Existuje více hodnotících parametrů. V našem případě byly zvoleny dva endpointy – mortalita a poškození.

Zároveň byly vyhodnocovány i temnostní kontroly, tj. destičky, v nichž se nacházela fotosenzibilizující látka, ale nebyly vystaveny UV záření.

3.1.3. Preliminary test

U každé testované látky byly nejprve provedeny předběžné testy, které slouží k odhadu citlivosti testovaného organismu k danému toxinu. Při předběžných testech se zkoumá širší rozsah koncentrací: podle jejich výsledků se zvolí oblast koncentrací

k vlastnímu testování tak, aby při nejvyšší koncentraci reagovaly všechny organismy a při nejnižší koncentraci nebyl zasažen žádný organismus.

3.1.4. Vlastní test

Na počátku každého testování je proveden test se standardním toxinem - $MnCl_2$. 24jamková destička je vystavena působení toxinu po dobu jedné hodiny celkem v šesti koncentracích a třech paralelních stanoveních. Po uplynutí stanovené doby je vyhodnocena mortalita.

Na základě získání standardních výsledků je přistoupeno k vlastnímu testování. Připravíme koncentrační řadu alespoň 12 ředění, které je dosaženo postupným ředěním výchozího koncentrátu testované látky.

Do každé jamky mikrotitrační destičky umístíme 6 jedinců. Pod stereomikroskopem ověříme jejich nezávadnost a vitalitu. Posléze přidáme testovaný toxin.

Při každém experimentu máme zachovány kontroly jedinců bez fotosenzibilizačních látek a zároveň i temnostní kontrolu, tj. vliv fototoxinů bez UV záření.

Po zvolené době ozařování dochází ihned k vyhodnocení pod stereomikroskopem.

3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení, testovací organismus

3.2.1. Chemické látky

Destilovaná voda

Chlorid manganatý $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p.a. Lachema a.s.

Thiosalicylanilid

3',4'-dichlorthiosalicylanilid

4'-methylthiosalicylanilid

5-chlorthiosalicylanilid

3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid

3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid (všechny výše uvedené thiosalicylanilidy byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK)

3.2.2. Přístroje a pomůcky

Mikrotitrační 24jamkové destičky

Laboratorní náčiní

Kádinky 25, 100, 250 a 400ml

Zkumavky

Stojan

Erlenmayerovy baňky

Petriho misky Ø 5, 10cm

Skleněné tyčinky

Teploměr

Entomologické pinzety

Váženka

Lžičky

Pipety

Automatické pipety a špičky firmy Bran; 100 – 1000 μ l, 0,5 – 5ml

Přístroje

Předvážky Kern 440-47N

Analytické váhy Kern Abj

pHmetr pH/Cond 340

Oxymetr Oxi340i

Termostat VTB Binder

Ultrazvuková lázeň Bandeln

UV lampa DDHN 16 330 (345/245nm)

Stereomikroskop

3.2.3. Testovaný organismus

Nítěnka obecná (*Tubifex tubifex* Müller)

Tubifex tubifex je chován v akváriu s 6cm vrstvou písku a 8cm vody.

Světelný režim den:noc 10:14 hodin.

Akvárium je 24 hodin denně provzdušňováno, koncentrace kyslíku je 8mg/l, teplota 20 \pm 2°C, pH 7,5 \pm 0,1.

3.3. Příprava látky a postup testování

3.3.1. Příprava testované látky

Množství toxinu odpovídající nejvyšší koncentraci bylo naváženo a rozpuštěno v zábrusové zkumavce v 2% roztoku dimethylsulfoxidu. K rozpuštění byla využita ultrazvuková lázeň. Z toho vzorku byly připraveny roztoky o nižší koncentraci tzv. půlovým ředěním.

3.3.2. Příprava experimentálního organismu

Den před pokusem bylo z chovu odděleno dostatečné množství máloštětinatců potřebných pro experiment.

Nitěnky byly 24 hodin před pokusem nekrmeny a udržovány při konstantní teplotě 20°C. Pro pokus byli vybíráni dospělí jedinci v rozmezí 0,0140 – 0,020g.

3.3.3. Samotný pokus

Podrobně popsán v kapitole Metodika testování (3.1.). Po vyhodnocení mortality standardního toxinu (MnCl_2 – chlorid manganatý, jehož indexy akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním. EC_{50} MnCl_2 byla stanovena 68,04mmol/l) přistoupíme k vlastnímu testování. Do dvou 24jamkových mikrotitračních destiček přidáme naředěný fototoxin tak, že máme vytvořenu řadu 12 koncentrací ve třech paralelních stanoveních.

Mikrotitrační destičky umístíme pod UV lampu (366nm; 0,3W.cm²) za standardní teploty 20 ± 0,5°C.

Na konci zvolené doby ozařování pokus vyhodnotíme a výsledky zapíšeme do tabulky v počtech mrtvých či poškozených jedinců.

3.4. Zpracování výsledků

Výsledky byly odečteny bezprostředně po pokusech okulometricky pod mikroskopem; byla hodnocena mortalita a poškození organismů.

Tyto výsledky byly poté přepočteny na procenta mortality a zpracovány statistickým programem Prisma 3.0.; byly vypočteny standardní hodnoty EC_{50} s 95% intervaly spolehlivosti.

Pro lepší znázornění a srovnání toxických a fototoxických vlastností byly hodnoty EC_{50} převedeny do grafové podoby.

4.Výsledky

Výsledky měření jsou prezentovány jako:

1) tabulky primárních výsledků měření

- hodnoty Y1, Y2 a Y3 jsou výsledky paralelních stanovení – poškození či mortalita testovaných organismů je zde uvedeno v procentech (%)
- hodnota X vyjadřuje koncentrace toxinů v mmol/l, přičemž 13. koncentrace představuje slepý vzorek, v němž je roztok toxinů nahrazen destilovanou vodou

2) výsledné hodnoty EC (mmol/l) pro jednotlivé toxiny

- hodnoty EC₅₀ jsou doplněny 95% konfidenčními intervaly (tam, kde výpočet těchto hodnot z primárních výsledků byl možný)

3) grafy hodnot EC₅₀

4.1. Thiosalicylanilid

Thiosalicylanilid byl testován v koncentracích 1,25 – 0,0006mmol/l.

Látka v testovaných koncentracích způsobovala mortalitu, nebylo prokázáno poškození.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab.1. Primární výsledky měření

THIOSALICYLANILID (ozáření UV)							
Koncentrace	A			B			
mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)			
X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	83,33	83,33	83,33	100	100	100
4	0,1563	83,33	83,33	83,33	100	100	100
5	0,0781	16,66	16,66	33,33	83,33	83,33	83,33
6	0,039	0	0	0	66,66	66,66	83,33
7	0,0195	0	0	0	33,33	33,33	33,33
8	0,0098	0	0	0	16,66	0	0
9	0,0049	0	0	0	0	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

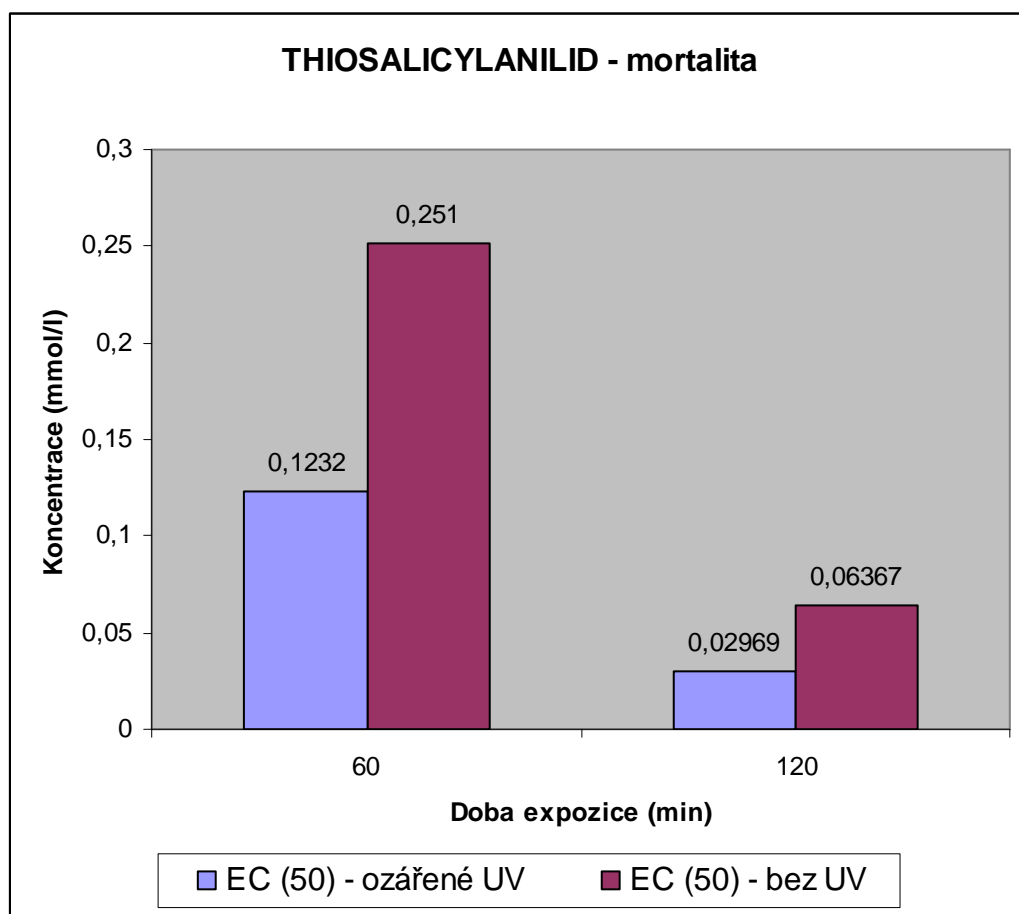
Tab. 2. Primární výsledky měření

THIOSALICYLANILID (bez UV)							
Koncentrace	A			B			
mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)			
X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	50	50	50	100	100	100
4	0,1563	33,33	33,33	33,33	83,33	83,33	83,33
5	0,0781	16,66	0	0	83,33	83,33	66,66
6	0,039	0	0	0	16,66	16,66	16,66
7	0,0195	0	0	0	0	0	0
8	0,0098	0	0	0	0	0	0
9	0,0049	0	0	0	0	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 3. Výsledné hodnoty EC₅₀

THIOSALICYLANILID – mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) – neozářené
60	0,1232	0,251
	(0,08770 - 0,1731)	(0,188 - 0,335)
120	0,02969	0,06367
	(0,02331 - 0,03782)	(0,04598 - 0,08816)

Graf 1. Hodnoty EC₅₀



4.2. 4'-METHYLTHIOSALICYLANILID

4'-methylthiosalicylanilid byl testován v koncentracích 2,5 – 0,0012mmol/l.

Látka v testovaných koncentracích způsobovala mortalitu, nebylo prokázáno poškození.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab. 4. Primární výsledky měření

4'-methylthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	2,5	100	100	100	100	100	100
2	1,25	100	100	100	100	100	100
3	0,625	33,33	50	33,33	100	100	100
4	0,3125	16,66	16,66	16,66	33,33	33,33	33,33
5	0,1563	0	0	0	33,33	16,66	16,66
6	0,0781	0	0	0	16,66	16,66	16,66
7	0,039	0	0	0	16,66	16,66	0
8	0,0195	0	0	0	16,66	0	0
9	0,0098	0	0	0	0	0	0
10	0,0049	0	0	0	0	0	0
11	0,0024	0	0	0	0	0	0
12	0,0012	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

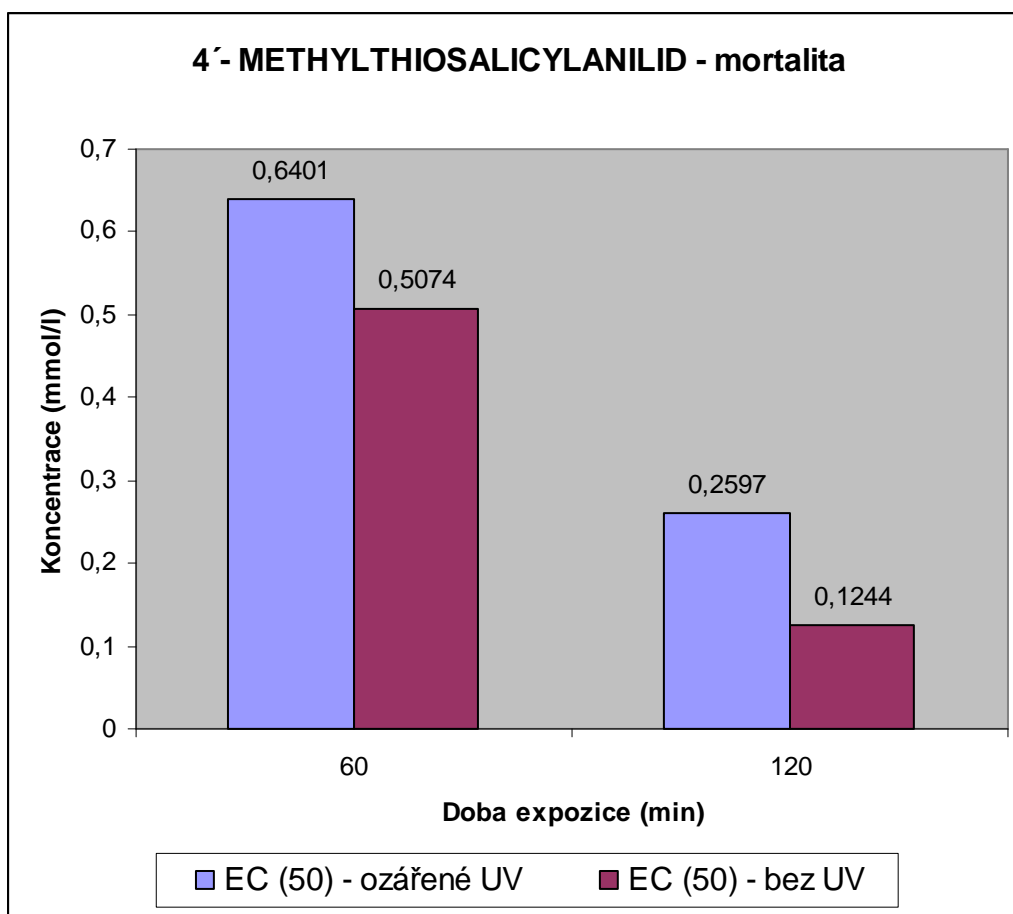
Tab. 5. Primární výsledky měření

4'-methylthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	2,5	100	100	100	100	100	100
2	1,25	100	100	100	100	100	100
3	0,625	50	50	50	100	100	100
4	0,3125	33,33	33,33	16,66	100	100	100
5	0,1563	16,66	0	0	50	50	33,33
6	0,0781	0	0	0	33,33	16,66	16,66
7	0,039	0	0	0	16,66	16,66	16,66
8	0,0195	0	0	0	16,66	16,66	0
9	0,0098	0	0	0	0	0	0
10	0,0049	0	0	0	0	0	0
11	0,0024	0	0	0	0	0	0
12	0,0012	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 6. Výsledné hodnoty EC₅₀

4'-METHYLTHIOSALICYLANILID - mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) - neozařené
60	0,6401	0,5074
	(0,4523 - 0,9059)	(0,3807 - 0,6761)
120	0,2597	0,1244
	(0,1917 - 0,3518)	(0,09296 - 0,1664)

Graf 2. Hodnoty EC₅₀



4.3. 5 – chlorthiosalicylanilid

5 – chlorthiosalicylanilid byl testován v koncentracích 1,25 – 0,0006mmol/l.

Látka v testovaných koncentracích způsobovala mortalitu, nebylo prokázáno poškození.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab. 7. Primární výsledky měření

5-chlorthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	100	100	100	100	100	100
4	0,1563	50	50	50	100	100	100
5	0,0781	16,66	16,66	16,66	66,66	66,66	83,33
6	0,039	16,66	0	16,66	50	50	50
7	0,0195	0	0	0	16,66	16,66	16,66
8	0,0098	0	0	0	16,66	16,66	0
9	0,0049	0	0	0	0	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

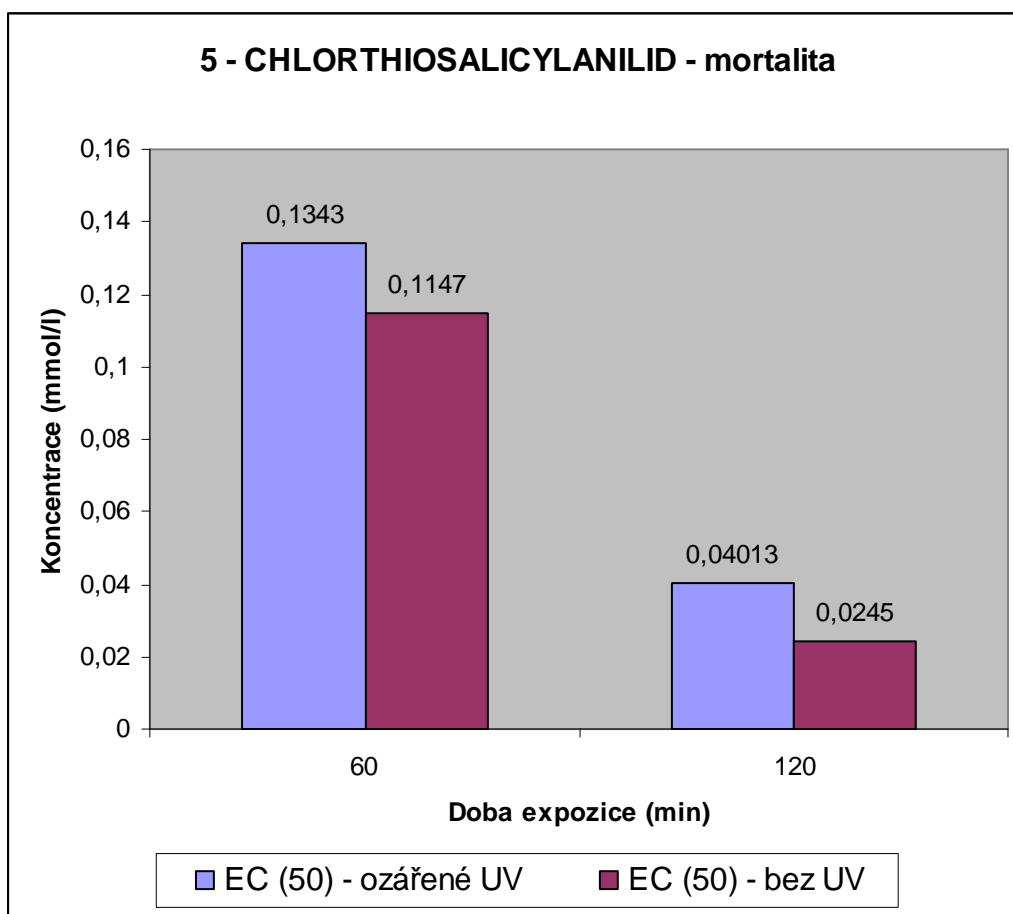
Tab. 8. Primární výsledky měření

5-chlorthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	100	100	100	100	100	100
4	0,1563	50	50	50	100	100	100
5	0,0781	33,33	33,33	33,33	100	100	100
6	0,039	16,66	16,66	16,66	66,66	66,66	66,66
7	0,0195	0	0	0	33,33	33,33	33,33
8	0,0098	0	0	0	16,66	16,66	16,66
9	0,0049	0	0	0	16,66	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 9. Výsledné hodnoty EC₅₀

5 - CHLORTHIOSALICYLANILID - mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) - neozařené
60	0,1343	0,1147
	(0,09841 - 0,1833)	(0,08840 - 0,1489)
120	0,04013	0,0245
	(0,03172 - 0,05076)	(0,01908 - 0,03145)

Graf 3. Hodnoty EC₅₀



4.4. 3', 4'- dichlorthiosalicylanilid

3', 4'- dichlorthiosalicylanilid byl testován v koncentracích 0,625 – 0,0003mmol/l.

Látka v testovaných koncentracích způsobovala mortalitu, nebylo prokázáno poškození.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab. 10. Primární výsledky měření

3',4'- dichlorthiosalicylanilid (ozáření UV)								
Koncentrace		A			B			
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)			
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	0,625	100	100	100	100	100	100	100
2	0,3125	100	100	100	100	100	100	100
3	0,1563	83,33	83,33	83,33	100	100	100	100
4	0,0781	66,66	66,66	66,66	83,33	83,33	83,33	83,33
5	0,039	50	50	33,33	66,66	66,66	66,66	66,66
6	0,0195	33,33	33,33	33,33	50	50	50	50
7	0,0098	16,66	16,66	16,66	33,33	33,33	50	50
8	0,0049	0	0	0	16,66	16,66	16,66	16,66
9	0,0024	0	0	0	0	0	0	0
10	0,0012	0	0	0	0	0	0	0
11	0,0006	0	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0

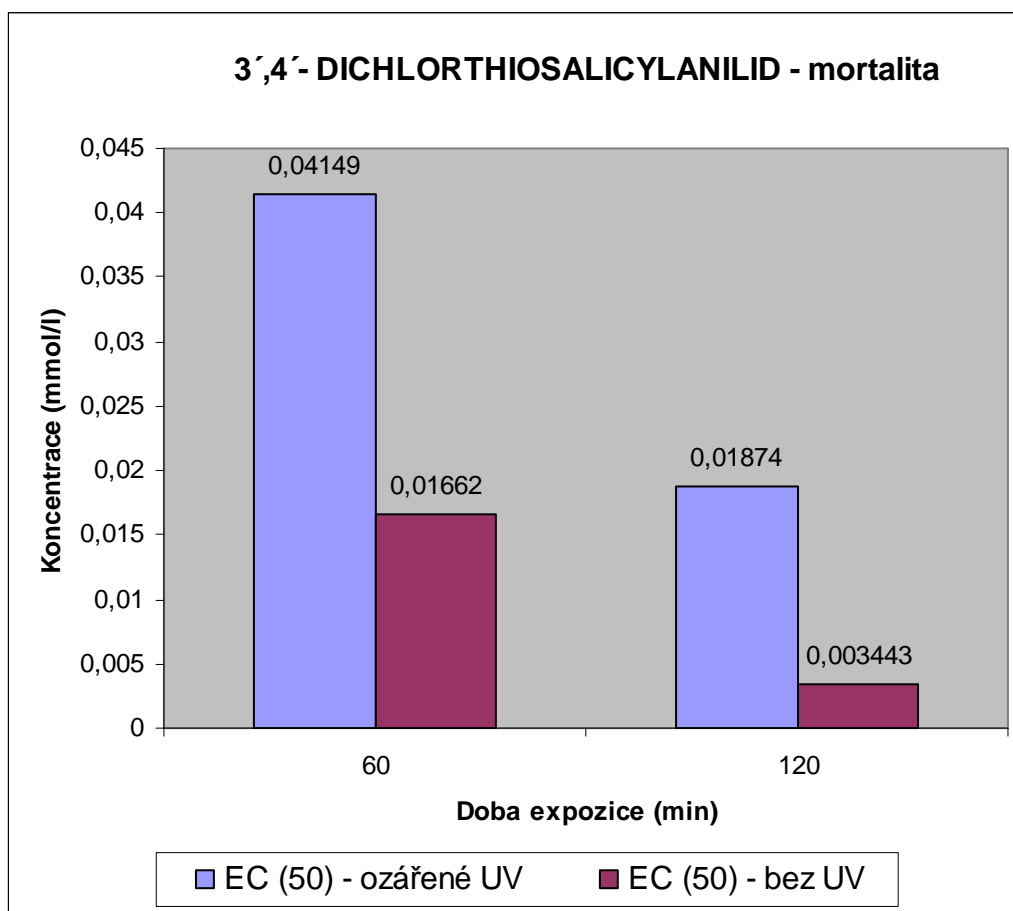
Tab. 11. Primární výsledky měření

3',4'- dichlorthiosalicylanilid (bez UV)								
Koncentrace		A			B			
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)			
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	0,625	100	100	100	100	100	100	100
2	0,3125	100	100	100	100	100	100	100
3	0,1563	100	100	100	100	100	100	100
4	0,0781	83,33	83,33	83,33	100	100	100	100
5	0,039	66,66	66,66	83,33	100	100	100	100
6	0,0195	50	50	66,66	83,33	83,33	83,33	83,33
7	0,0098	33,33	33,33	33,33	83,33	83,33	66,66	66,66
8	0,0049	33,33	33,33	16,66	66,66	66,66	66,66	66,66
9	0,0024	0	0	0	50	50	50	50
10	0,0012	0	0	0	16,66	16,66	0	0
11	0,0006	0	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 12. Výsledné hodnoty EC₅₀

3',4' - DICHLORTHIOSALICYLANILID - mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) - neozářené
60	0,04149	0,01662
	(0,03612 - 0,04766)	(0,01417 - 0,01950)
120	0,1874	0,003443
	(0,0163 - 0,02154)	(0,002823 - 0,004199)

Graf 4. Hodnoty EC₅₀



4.5. **3, 5 – dichlor – 4´- chlorthiosalicylanilid**

3, 5 – dichlor – 4´- chlorthiosalicylanilid byl testován v koncentracích 1,25 – 0,0006mmol/l.

V obou testovaných časech a ve všech koncentracích látka působila poškození i mortalitu.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab. 13. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4´- chlorthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	100	100	100	100	100	100
4	0,1563	100	100	100	100	100	100
5	0,0781	100	100	100	100	100	100
6	0,039	100	100	100	100	100	100
7	0,0195	100	100	100	100	100	100
8	0,0098	83,33	83,33	83,33	100	100	100
9	0,0049	50	50	50	83,33	83,33	83,33
10	0,0024	0	0	0	33,33	33,33	33,33
11	0,0012	0	0	0	16,66	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

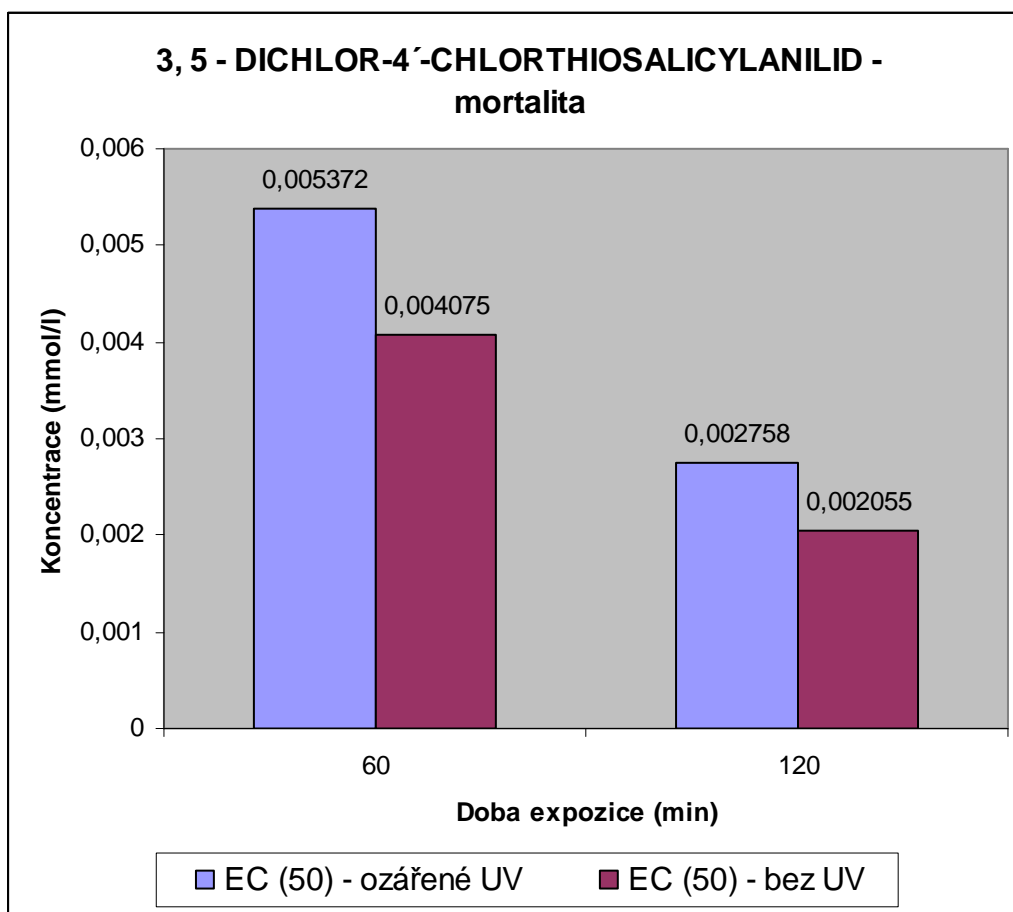
Tab. 14. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4´- chlorthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	1,25	100	100	100	100	100	100
2	0,625	100	100	100	100	100	100
3	0,3125	100	100	100	100	100	100
4	0,1563	100	100	100	100	100	100
5	0,0781	100	100	100	100	100	100
6	0,039	100	100	100	100	100	100
7	0,0195	100	100	100	100	100	100
8	0,0098	83,33	83,33	100	100	100	100
9	0,0049	66,66	66,66	66,66	100	100	100
10	0,0024	16,66	16,66	16,66	50	50	50
11	0,0012	0	0	0	16,66	16,66	16,66
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 15. Výsledné hodnoty EC₅₀

3, 5 - DICHLOR-4'-CHLORTHIOSALICYLANILID - mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) - neozařené
60	0,005372	0,004075
	(0,003859 - 0,007479)	(0,002997 - 0,005540)
120	0,002758	0,002055
	(0,002032 - 0,003745)	(0,001479 - 0,002854)

Graf 5. Hodnoty EC₅₀



3, 5 – dichlor – 4' - chlorthiosalicylanilid – POŠKOZENÍ

Tab. 16. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace	A			B			
mmol/l	Poškození 60 min (%)			Poškození 120 min (%)			
X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	1,25	33,33	50	50	66,66	50	50
2	0,625	33,33	33,33	50	50	50	50
3	0,3125	33,33	33,33	33,33	50	50	50
4	0,1563	33,33	33,33	33,33	50	50	50
5	0,0781	33,33	33,33	33,33	33,33	50	33,33
6	0,039	16,66	16,66	16,66	33,33	33,33	33,33
7	0,0195	0	0	0	33,33	33,33	33,33
8	0,0098	0	0	0	16,66	16,66	16,66
9	0,0049	0	0	0	0	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 17. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace	A			B			
mmol/l	Poškození 60 min (%)			Poškození 120 min (%)			
X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	
1	1,25	66,66	66,66	50	66,66	66,66	50
2	0,625	50	50	50	50	50	50
3	0,3125	50	50	50	50	50	50
4	0,1563	50	50	50	50	50	50
5	0,0781	33,33	33,33	50	33,33	33,33	50
6	0,039	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33
7	0,0195	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33
8	0,0098	0	0	0	16,66	16,66	16,66
9	0,0049	0	0	0	0	0	0
10	0,0024	0	0	0	0	0	0
11	0,0012	0	0	0	0	0	0
12	0,0006	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

4.6. 3, 5 – dichlor – 4´ - bromthiosalicylanilid

3, 5 – dichlor – 4´ - bromthiosalicylanilid byl testován v koncentracích 0,625 – 0,0003mmol/l.

V obou testovaných časech a ve všech koncentracích látka působila poškození i mortalitu.

Doba expozice byla 60 a 120 minut.

Tab. 18. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4´ - bromthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	0,625	100	100	100	100	100	100
2	0,3125	100	100	100	100	100	100
3	0,1563	100	100	100	100	100	100
4	0,0781	100	100	100	100	100	100
5	0,039	100	100	100	100	100	100
6	0,0195	83,33	83,33	83,33	100	100	100
7	0,0098	33,33	33,33	33,33	100	100	83,33
8	0,0049	16,66	16,66	0	50	50	50
9	0,0024	0	0	0	16,66	16,66	16,66
10	0,0012	0	0	0	0	0	0
11	0,0006	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

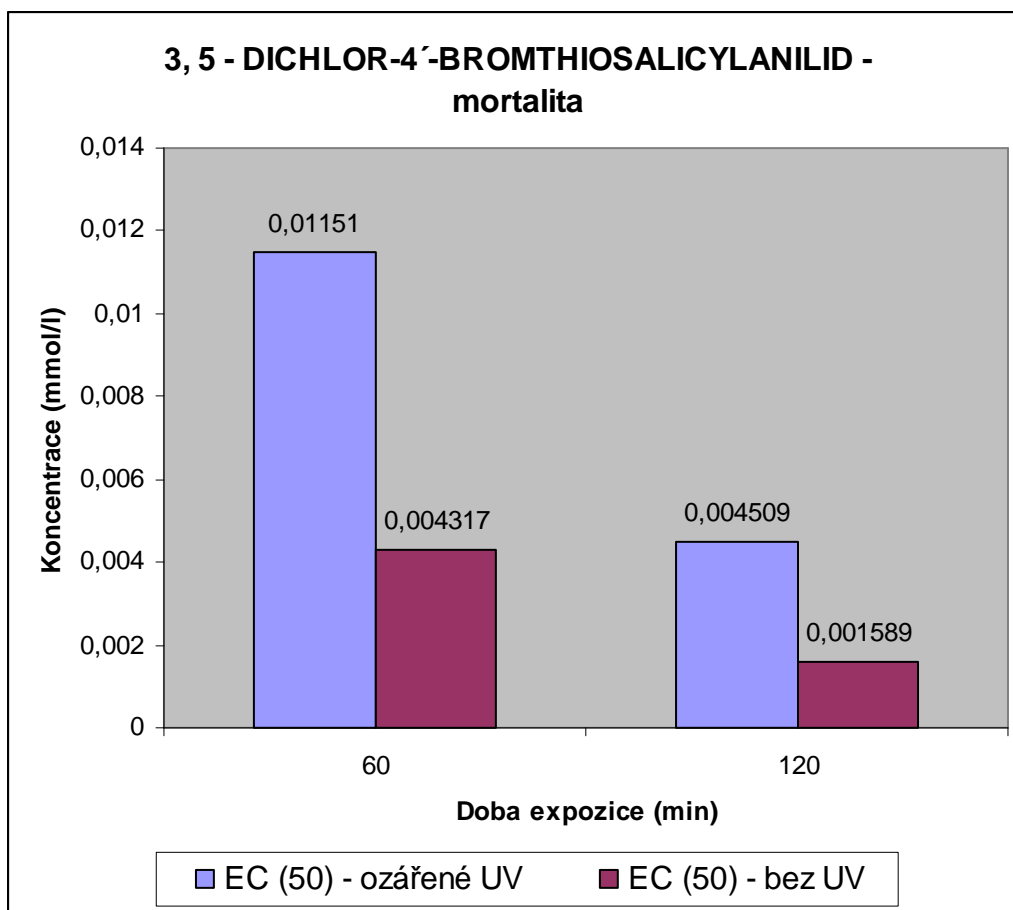
Tab. 19. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4´ - bromthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Mortalita 60 min (%)			Mortalita 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	0,625	100	100	100	100	100	100
2	0,3125	100	100	100	100	100	100
3	0,1563	100	100	100	100	100	100
4	0,0781	100	100	100	100	100	100
5	0,039	100	100	100	100	100	100
6	0,0195	100	100	100	100	100	100
7	0,0098	83,33	83,33	83,33	100	100	100
8	0,0049	50	50	50	100	100	83,33
9	0,0024	33,33	33,33	33,33	83,33	83,33	66,66
10	0,0012	0	0	0	33,33	33,33	33,33
11	0,0006	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 20. Výsledné hodnoty EC₅₀

3, 5 - DICHLOR-4'-BROMTHIOSALICYLANILID - mortalita		
Doba ozařování (min)	EC (mmol/l) - ozařované	EC (mmol/l) - neozařené
60	0,01151	0,004317
	(0,008443 - 0,01569)	(0,003379 - 0,005516)
120	0,004509	0,001589
	(0,003296 - 0,006168)	(0,001158 - 0,002180)

Graf 6. Hodnoty EC₅₀



3, 5 – dichlor – 4' - bromthiosalicylanilid – POŠKOZENÍ

Tab. 21. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4' - bromthiosalicylanilid (ozáření UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Poškození 60 min (%)			Poškození 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	0,625	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66
2	0,3125	16,66	16,66	0	16,66	16,66	16,66
3	0,1563	0	0	0	16,66	16,66	16,66
4	0,0781	0	0	0	0	0	0
5	0,039	0	0	0	0	0	0
6	0,0195	0	0	0	0	0	0
7	0,0098	0	0	0	0	0	0
8	0,0049	0	0	0	0	0	0
9	0,0024	0	0	0	0	0	0
10	0,0012	0	0	0	0	0	0
11	0,0006	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 22. Primární výsledky měření

3,5 - dichlor - 4' - bromthiosalicylanilid (bez UV)							
Koncentrace		A			B		
	mmol/l	Poškození 60 min (%)			Poškození 120 min (%)		
	X	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	0,625	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66
2	0,3125	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66
3	0,1563	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66	16,66
4	0,0781	0	0	0	16,66	16,66	16,66
5	0,039	0	0	0	0	0	0
6	0,0195	0	0	0	0	0	0
7	0,0098	0	0	0	0	0	0
8	0,0049	0	0	0	0	0	0
9	0,0024	0	0	0	0	0	0
10	0,0012	0	0	0	0	0	0
11	0,0006	0	0	0	0	0	0
12	0,0003	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0

5. Diskuse

Pro lepší kontrolu bezpečnosti chemických látek pro člověka a prostředí jsou v různých zemích vytvářeny zákony týkající se toxických látek. Věda může k tomuto posouzení přispět ve dvou oblastech; jednak v oblasti toxikologie a jednak v oblasti chemické expozice. Velmi podstatným příspěvkem chemie životního prostředí k těmto zákonům by měl být vývoj laboratorních testovacích metod nebo matematických modelů, které umožní předvídat osud nových chemických sloučenin v životním prostředí (Boule, P et al., 1999).

V současné době má toxikologie obrovský význam. Zkoumá negativní dopad látek přírodního i syntetického původu na člověka i ostatní organismy. Dnešní toxikologie se řadí mezi multidisciplinární obory. Nedávno se proloupla s fotobiologií a vznikla tak nova disciplína, fototoxikologie (Prokeš, J.a kol., 1997).

Jedním z důsledků vypouštění velkého množství chemických a odpadních produktů moderní společnosti do životního prostředí je ztenčování ozónové vrstvy (Boule, P et al., 1999). Velkým nebezpečím pro prospěšný stratosferický ozón jsou organické sloučeniny na bázi nižších alkanů (metanu, etanu) s obsahem chloru a fluoru (chlor - fluorkarbyny). Jsou to velmi stálé a netoxické uhlovodíky se sníženým bodem varu. Pro své vlastnosti jsou používány v chladírenství, v rozprašovačích a k čištění součástek při výrobě elektroniky. Jejich chemická stálost způsobuje, že jsou schopny velmi dlouhou dobu (řádově desítky až stovky let) setrvat v atmosféře. Vzdušným proudem se dostávají až do vrchní vrstvy stratosféry, kde se účinkem UV záření rozkládají za uvolnění atomů chloru, který z molekuly ozónu odtrhává atom kyslíku a reaguje s ním za vzniku oxidu chloru. Dochází k fotochemickému uvolňování chloru z molekuly oxidu chloru, který rozkládá další molekulu ozónu. Největší nebezpečí představují freony a oxidy dusíku (Prokeš, J.a kol., 1997). Nejvýznamnějším následkem ztenčování ozónové vrstvy je zvýšené pronikání zejména velmi nebezpečného UVB záření k zemskému povrchu (Soni, A.K., 1997). UV záření má samo o sobě schopnost poškozovat mnoho biologických materiálů. V kombinaci s ostatními faktory životního prostředí může dojít i k synergickému účinku, jehož příkladem je fotoaktivace organických polutantů či fotosenzitizace.

Před dvěma lety byla schválena koncepce nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami, tzv. **REACH** systém (*Registration, Evaluation,*

Authorization and Restriction of Chemicals). Vznik této právní normy byl nezbytný zejména poté, co bylo zjištěno, že společnost má dostatek informací o nebezpečných vlastnostech jen u 10% používaných chemických látek. Tato skutečnost vychází z toho, že v EU od roku 1981 platilo rozdělení chemických látek na „nové“ a „existující“, které byly do roku 1981 řádně zaregistrovány a nebyly u nich požadovány zkoušky na neškodnost. **REACH** stírá hranice mezi těmito látkami a nařizuje novou registraci pro nové i stávající látky. Součástí podkladů pro registraci je soubor informací o látce, o jejím bezpečném používání a odstraňování a zpráva o její chemické bezpečnosti při všech očekávaných způsobech jejího použití. Výsledky testování, které bylo provedeno v jednom státě EU jsou akceptovatelné i v ostatních státech (Bláha, K., 2005).

V rámci výzkumu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie je rozvíjena oblast fototoxikologie. Výzkum je kromě jiného soustředěn i na propracování nového testu, který by měl pomoci při screeningu či hodnocení fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek. Testujícím organismem je nítěnka obecná (*Tubifex tubifex* Müll.), která je v rámci fylogeneze zahrnuta mezi bezobratlé, tzn. nižší organismy, a tudíž se na ni nevztahuje legislativa spojená se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

Naším cílem bylo ověřit fotosenzibilizující vlastnosti šesti látek nasyntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie.

Pro nastínění rozsáhlosti a významnosti problematiky jsou dále uvedeny příklady některých fotosenzibilizujících látek z oblasti léčiv, kosmetického a potravinářského průmyslu.

Látky způsobující fototoxickou reakci: při zevním kontaktu-antiseptika, antimykotika, halogenované salicylanilidy, látky obsažené v kamenouhelném dehtu, bergamotový či citrusový olej. Při vnitřním podání-fenothiaziny, hydrochlorothiazid, amiodaron, chinolony, tetracykliny, profeny.

Látky způsobující fotoalergickou reakci: při zevním kontaktu-halogenované salicylanilidy, některá antimykotika. Při systémovém podání-chlorpromazin, promethazin, sulfonamidy.

Rostliny způsobující fytofotodermatitidy: *Heracleum*, *Angelica silvestris*, *Ruta graveolens*, *Daucus carota*, *Petroselinum sativum*. Zastoupeny jsou hlavně čeledi *Rutaceae* a *Apiaceae* (Malina, L., 1999).

OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ THIOSALICYLANILIDŮ

Substituované aromatické amidy a thioamidy jsou již řadu let intenzívně studovány na Katedře anorganické a organické chemie FAF UK v Hradci Králové.

V řadě prací zabývajících se fototoxicitou a fotokontaktními alergiemi se používá 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid jako standardní syntetický fototoxin a fotoalergen (Waisser, K.a kol., 2003).

Halogenované salicylanilidy vykazují dva typy účinků souvisejících s ozářením. První je fototoxický účinek, tj. zánětlivá reakce po ozáření. Toto je důsledek chemického poškození tkání vlivem fotochemických procesů (poškození biologicky aktivních molekul reaktivními formami kyslíku), které jsou stimulovány fototoxickou látkou. Kromě toho halogenované salicylanilidy působí rovněž jako fotoalergeny. Zde jde o buňkami zprostředkovanou reakci pozdního typu, přičemž fotoalergen působí jako prohapten. K fotoalergizujícímu působení dochází uvolněním jednoho nebo více halogenových radikálů po ozáření UV zářením: volný radikál reaguje s proteiny za vzniku nové molekuly, která může působit jako antigen *in vivo* (Harber, L.C. et al, 1967).

V roce 1998 byl navržen nový mechanismus jejich působení. Salicylanilidy působí jako inhibitory dvoukomponentových regulačních systémů (TCS = Two-component regulatory system) bakterií. Tento systém hraje ústřední roli v procesu infekce. Pro účinek je nezbytný elektron akceptorový substituent na salicylové části a hydrofobní skupina na anilidové části. Látky inhibující dvoukomponentový systém mohou vést ke smrti bakteriální buňky (Vinšová, J., 2004).

U autotrofních organismů některé salicylanilidy působí inhibičně na fotosyntézu. Vliv např. 3,5-dichlorsalicylanilidů byl studován na izolovaných chloroplastech špenátu (Kubicová, L.a kol., 2000; Šustr, M.a kol., 2001).

OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ THIOSALICYLANILIDU

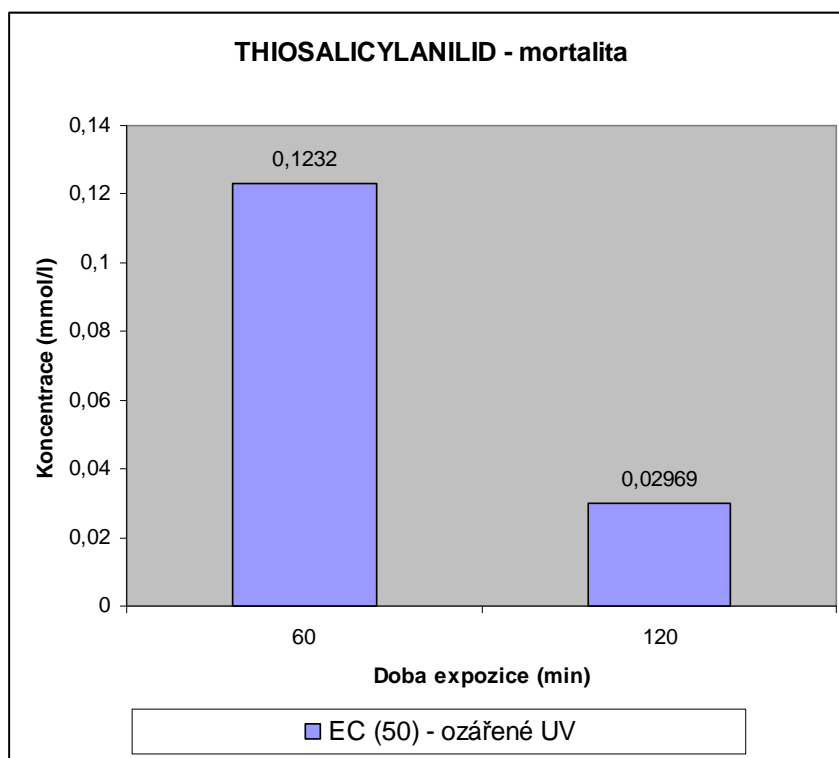
Při testování na nítěnkách se u této látky jako jediné prokázala nižší hodnota EC_{50} po ozáření testovaných jedinců UV zářením než hodnota EC_{50} u neozařovaných jedinců po 60-ti i po 120-timinutové expozici. Hodnota EC_{50} u ozařovaných organismů byla až o polovinu nižší než u neozařovaných.

Projevuje se zde také čtyřnásobný pokles hodnoty EC_{50} u ozařovaných i neozařovaných jedinců po 120-timinutové expozici oproti hodnotě EC_{50} po 60-timinutové expozici ze sledovaných látek.

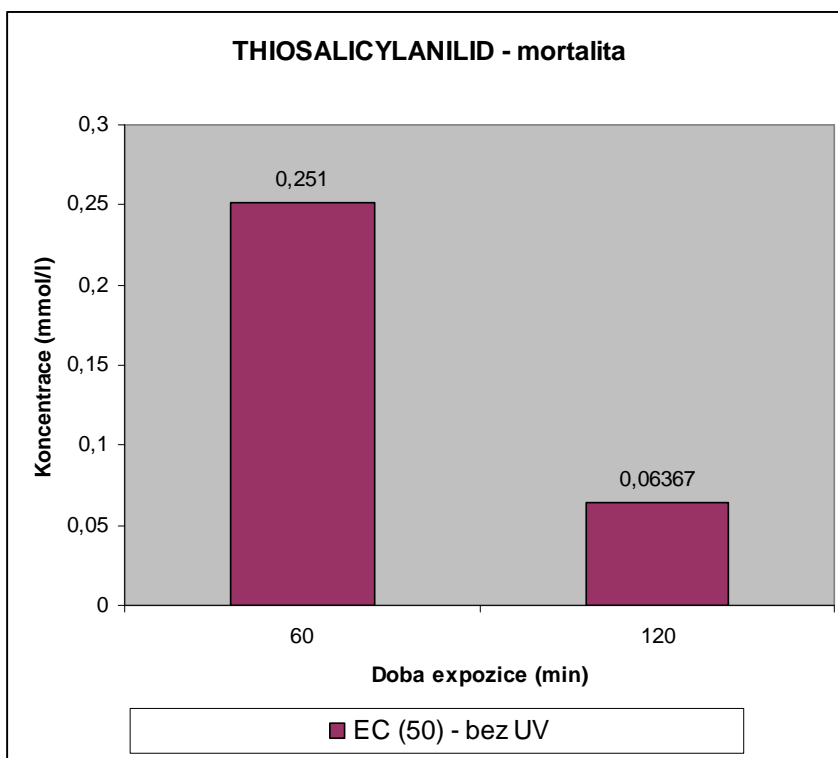
Látka u nítěnek nezpůsobovala žádné povrchové poškození.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

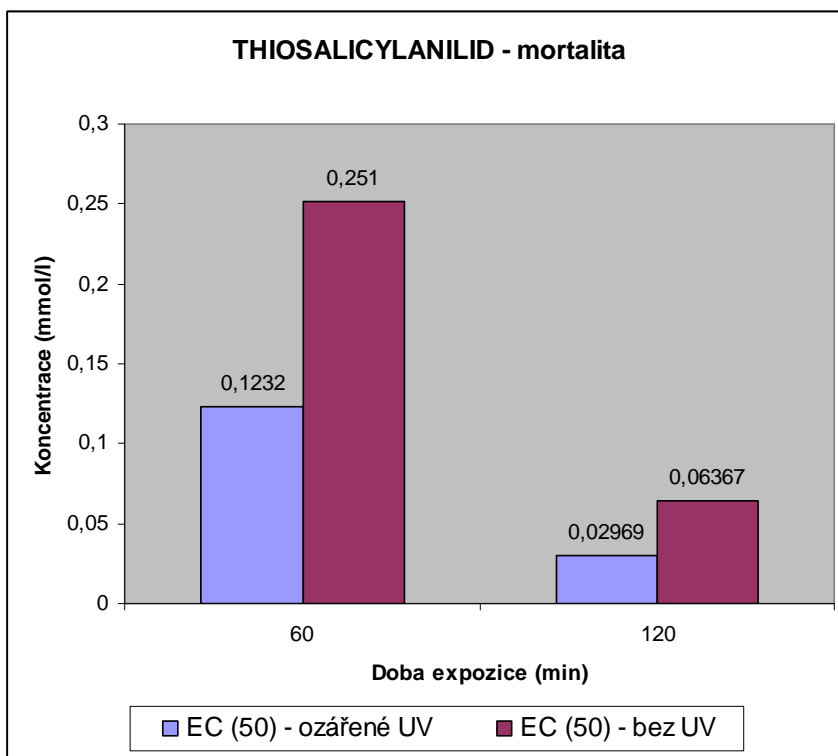
Graf 7. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 8 Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 9. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



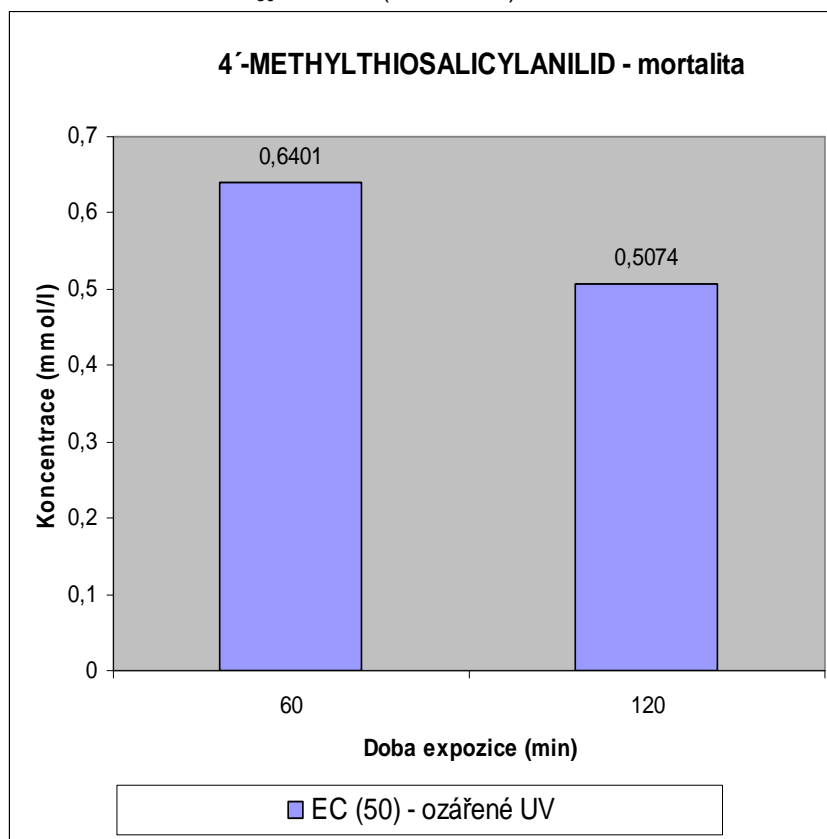
OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ 4' - METHYLTHIOSALICYLANILIDU

Při testování této látky byla EC_{50} u ozařovaných organismů při 60-timinutové expozici o něco vyšší než u neozařovaných, ale po 120-timinutové expozici byla EC_{50} u ozařovaných organismů o více než polovinu vyšší než u neozařovaných organismů. Rovněž lze zde dobře pozorovat pokles hodnoty EC_{50} u ozařovaných jedinců po 120-timinutové expozici o víc než polovinu, u neozařovaných čtyřnásobný pokles oproti hodnotě EC_{50} po 60-timinutové expozici.

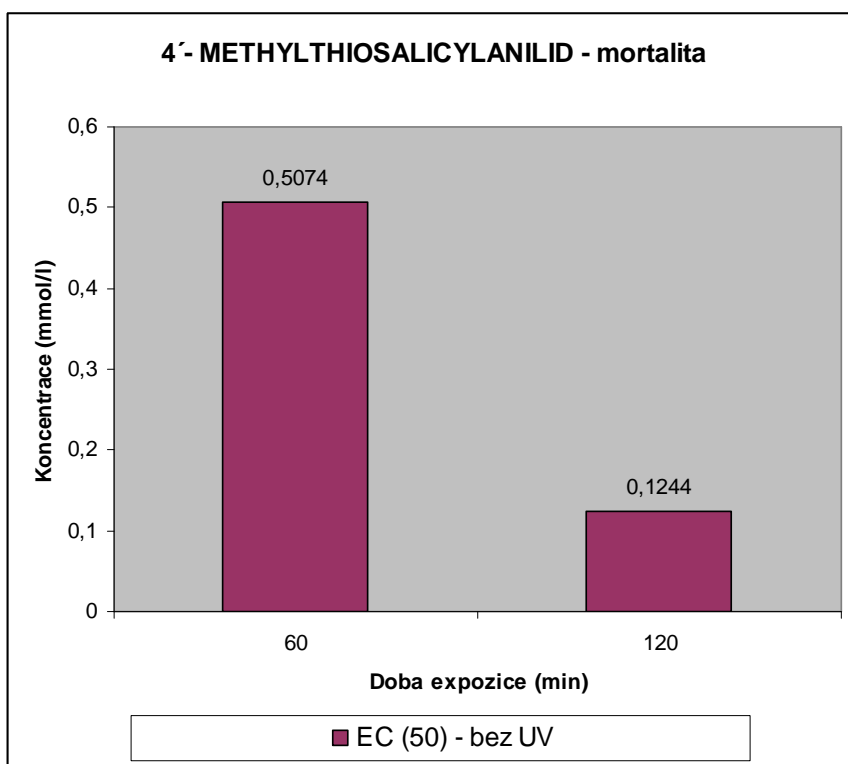
Látka u nítěnek nezpůsobovala žádné povrchové poškození.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

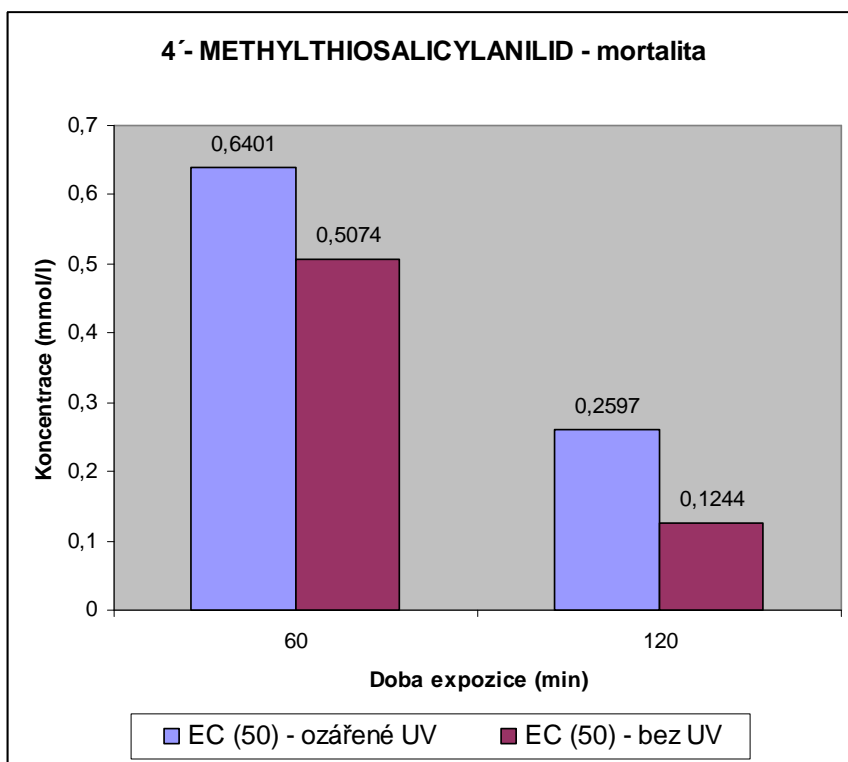
Graf 10. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 11. Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 12. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ

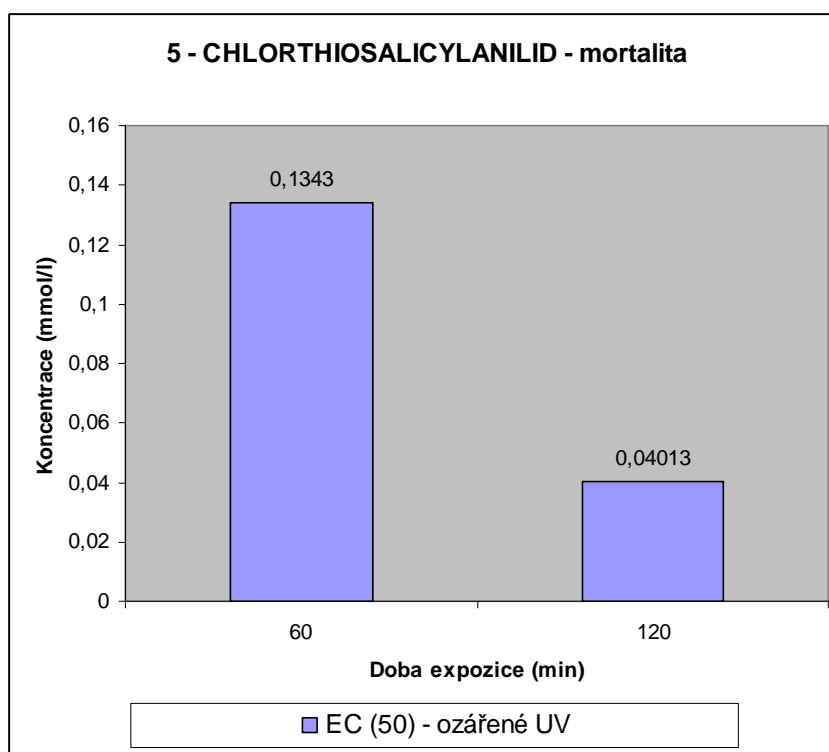
5 – CHLORTHIOSALICYLANILIDU

Při testování této látky byla hodnota EC_{50} u ozařovaných jedinců po 60-timinutové expozici jen nepatrně vyšší než hodnota EC_{50} u neozařovaných jedinců. Po 120-timinutové expozici se hodnota EC_{50} u ozařovaných jedinců zvýšila o polovinu než u neozařovaných. Pokles hodnoty EC_{50} u ozařovaných organismů po 120-timinutové expozici byl trojnásobný, u neozařovaných až pětinašobný oproti 60-timinutové expozici. Tento pokles je velmi dobře vidět v příložených grafech.

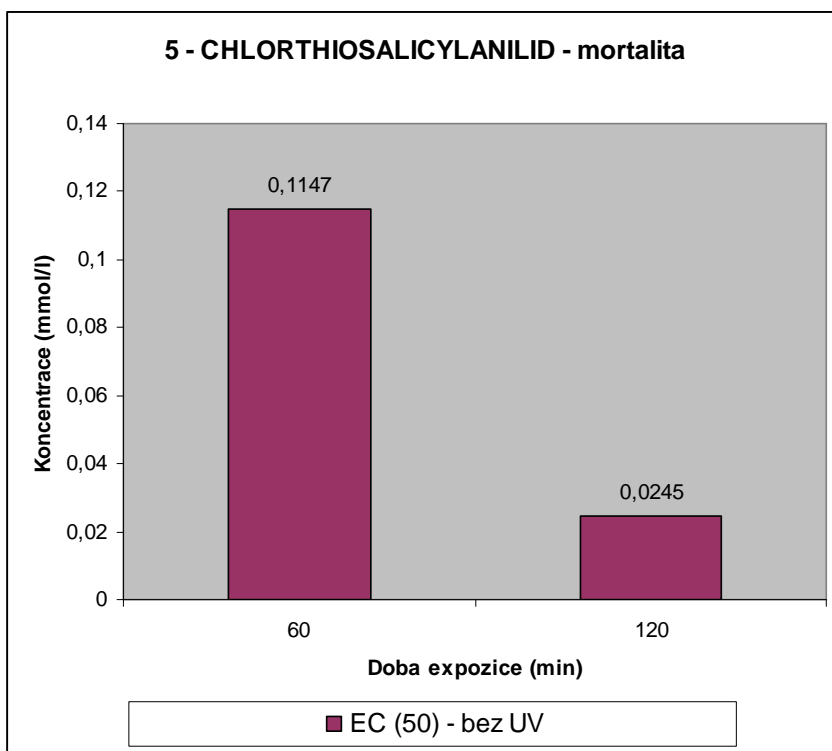
Látka u nítěnek nezpůsobovala žádné povrchové poškození.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

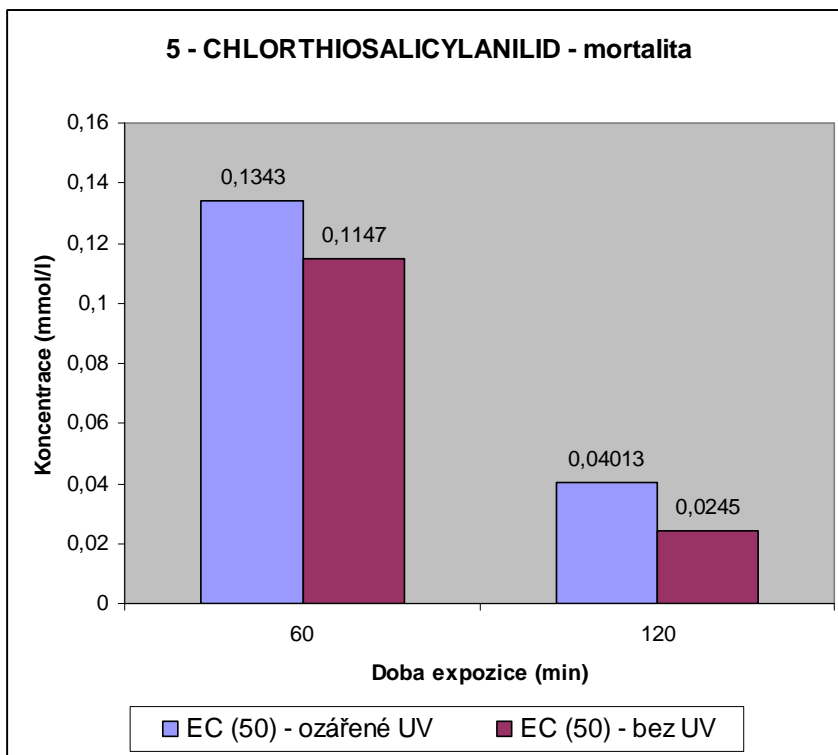
Graf 13. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 14. Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 15. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ

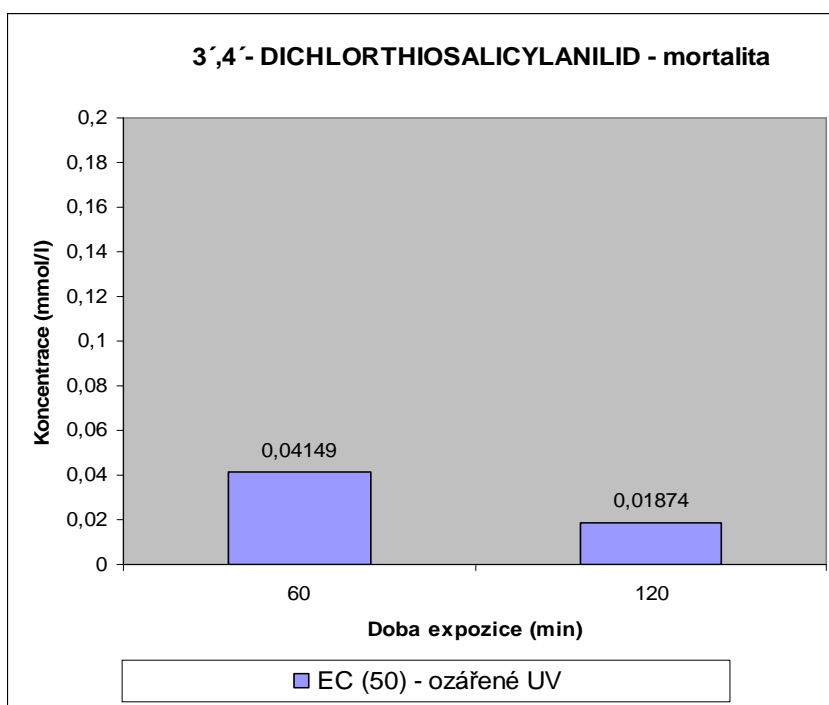
3',4' – DICHLORTHIOSALICYLANILIDU

Při testování této látky byla hodnota EC_{50} u ozařovaných organismů při 60-timinutové expozici o víc než polovinu vyšší než u neozařovaných, zvýšení hodnoty EC_{50} u ozařovaných jedinců oproti neozařovaným po 120-timinutové expozici bylo až pětinasobné.

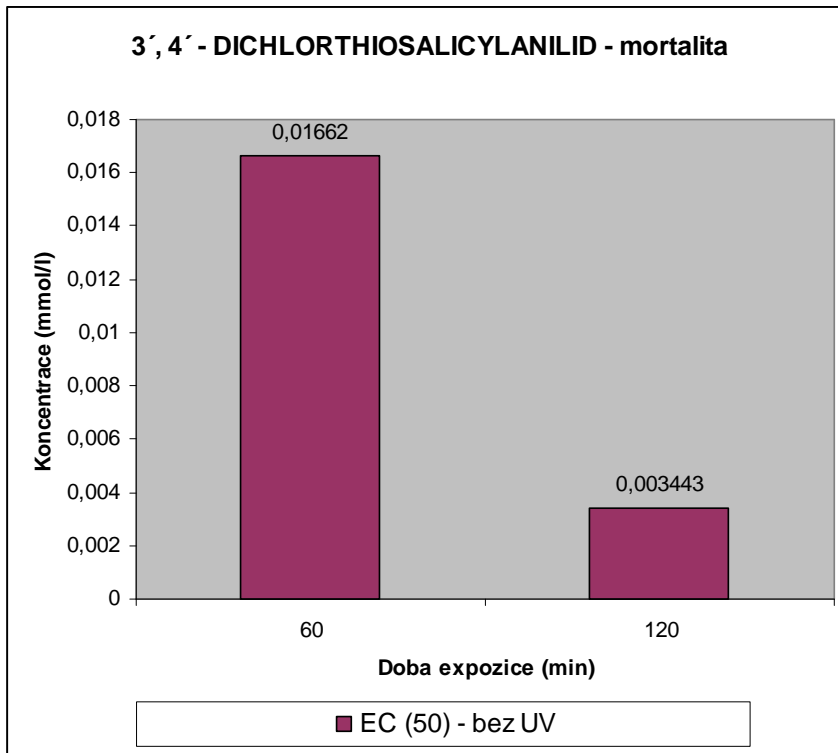
Také je zde dobře znatelný pokles hodnoty EC_{50} u ozařovaných jedinců po 120-timinutové expozici oproti hodnotě EC_{50} po 60-timinutové expozici o víc než polovinu. Tento pokles je u neozařovaných jedinců až trojnásobný. Látka u nítěnek nezpůsobovala žádné povrchové poškození.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

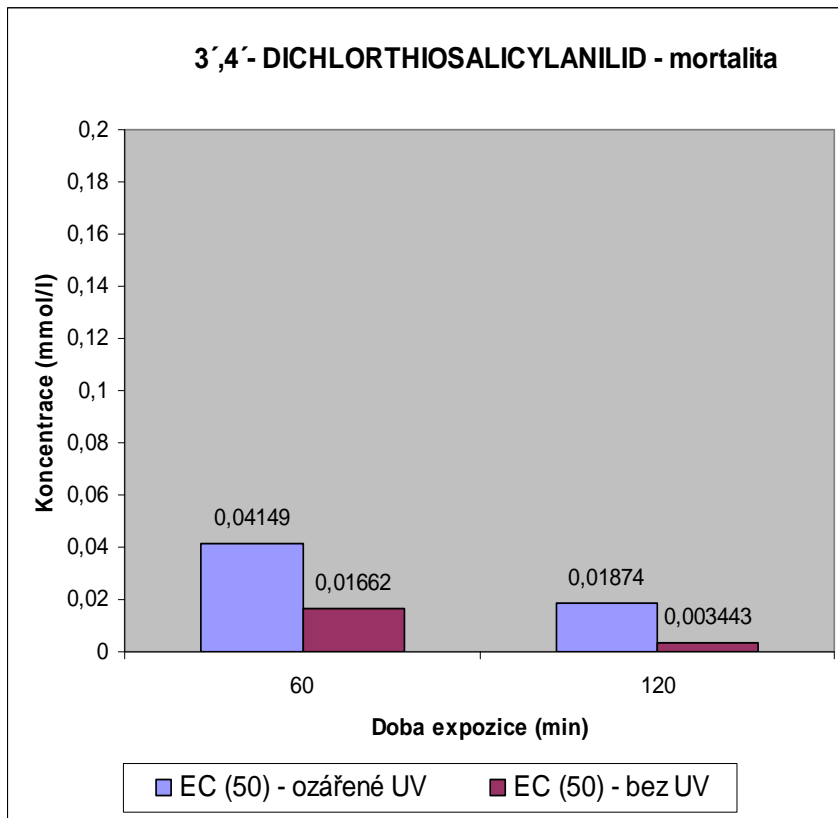
Graf 16. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 17. Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 18. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ

3.5 – DICHLOR 4'-CHLORTHIOSALICYLANILIDU

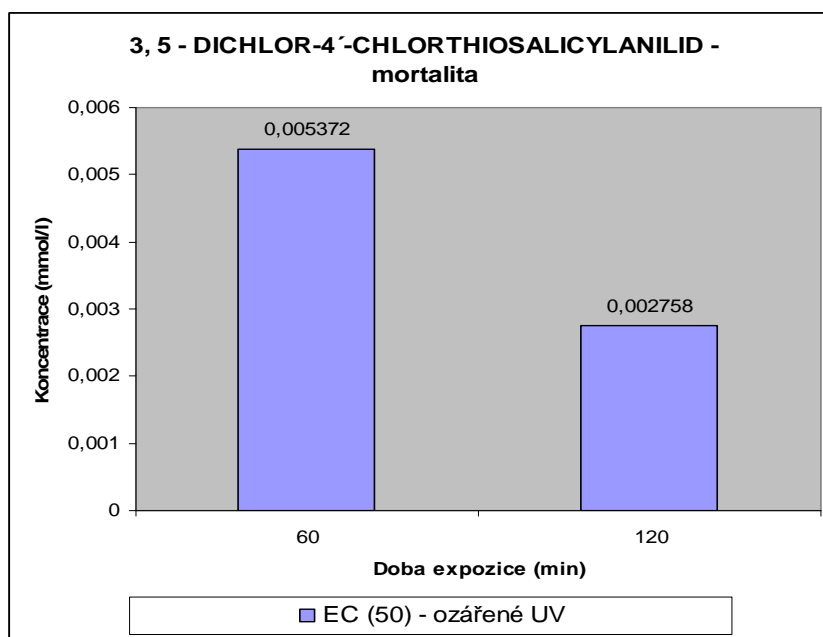
Při testování této látky byla hodnota EC_{50} u ozařovaných jedinců při 60-timinutové expozici jen o málo vyšší než u neozařovaných, po 120-timinutové expozici byla hodnota EC_{50} u ozařovaných a neozařovaných jedinců téměř vyrovnaná.

Rovněž se zde projevuje pokles hodnot EC_{50} u ozařovaných i neozařovaných jedinců po 120-timinutové expozici až o polovinu oproti hodnotám EC_{50} po 60-timinutové expozici.

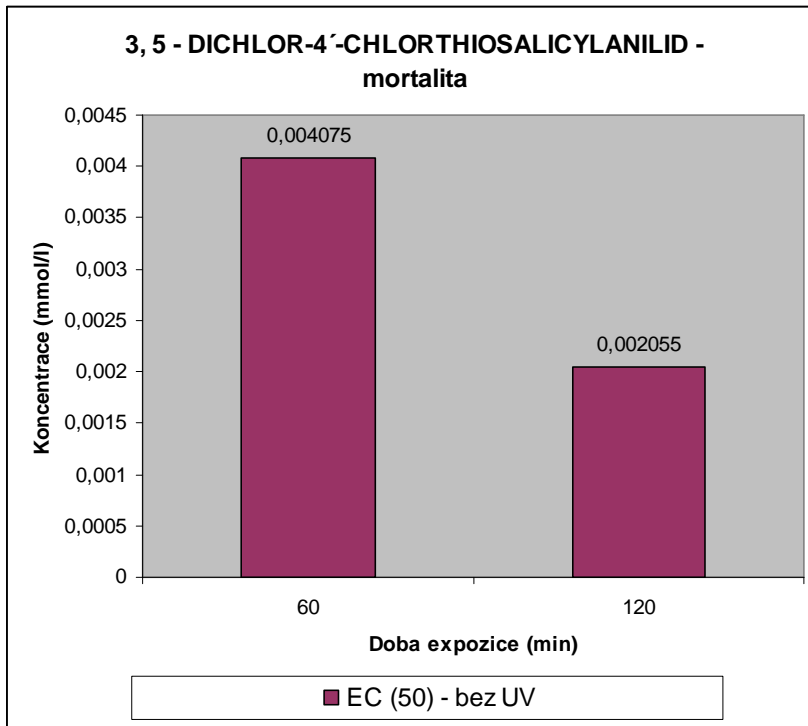
Po 60-timinutové expozici UV zářením toxin způsoboval poškození nítěnek od koncentrace 0,039mmol/l do koncentrace 1,25mmol/l, po 120-timinutové expozici se poškození projevilo od koncentrace 0,0098mmol/l do koncentrace 1,25mmol/l. po 60-timinutové expozici bez UV záření nastalo poškození v koncentraci 0,0195 – 1,25mmol/l, po 120-timinutové expozici v koncentraci 0,0098 – 1,25mmol/l.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

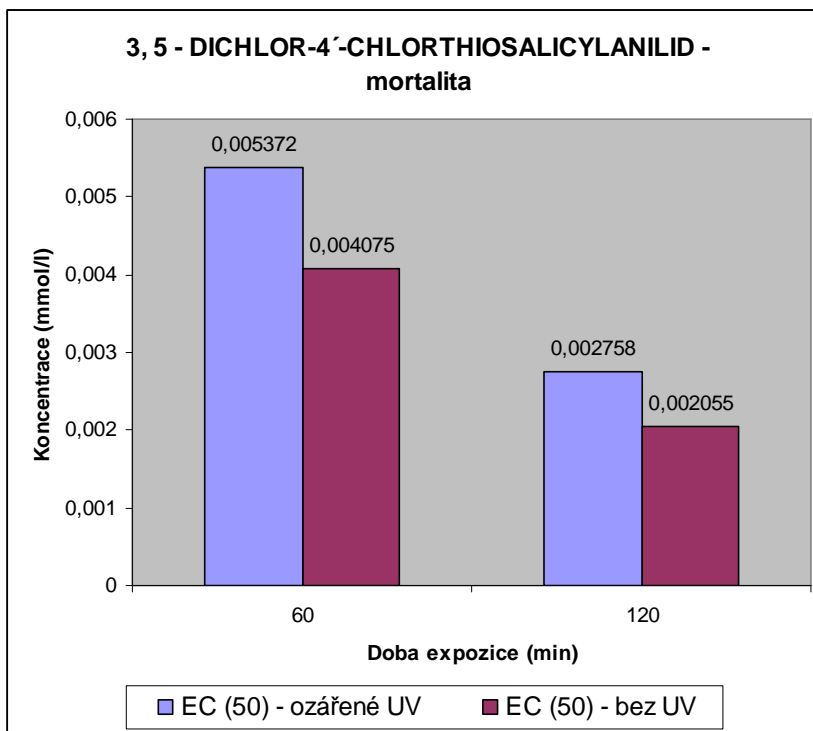
Graf 19. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 20. Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 21. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



OVĚŘENÍ FOTOSENZIBILIZUJÍCÍCH VLASTNOSTÍ

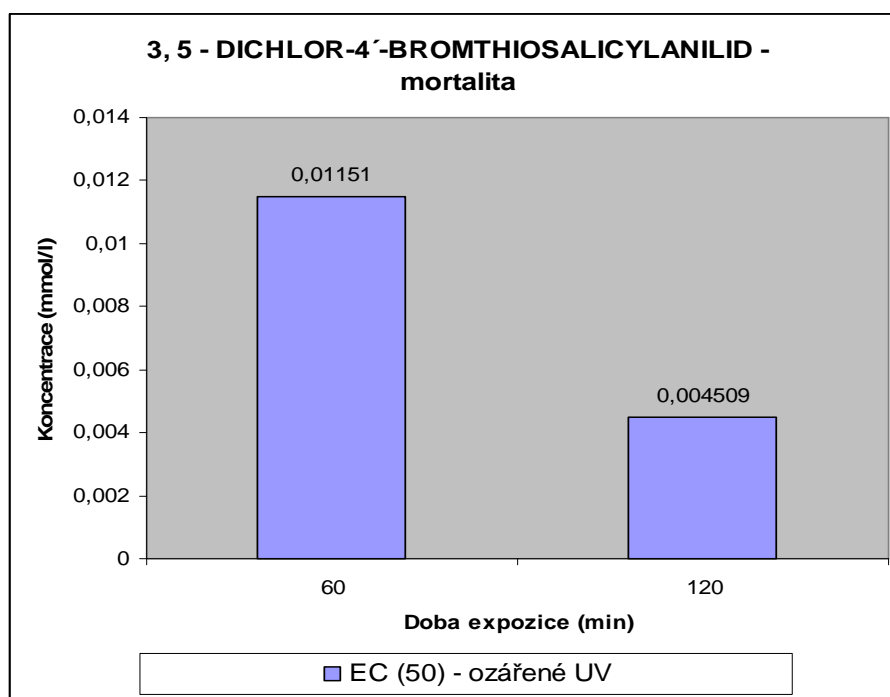
3, 5 – DICHLOR 4' - BROMTHIOSALICYLANILIDU

Při testování této látky byla hodnota EC_{50} při 60-timinutové expozici u ozařovaných organismů až trojnásobně vyšší než u neozařovaných, rozdíl hodnot EC_{50} mezi ozařovanými a neozařovanými jedinci po 120-timinutové expozici byl také trojnásobný. Rovněž je zde patrný pokles hodnoty EC_{50} u ozařovaných i neozařovaných jedinců po 120-timinutové expozici oproti 60-timinutové expozici až o polovinu.

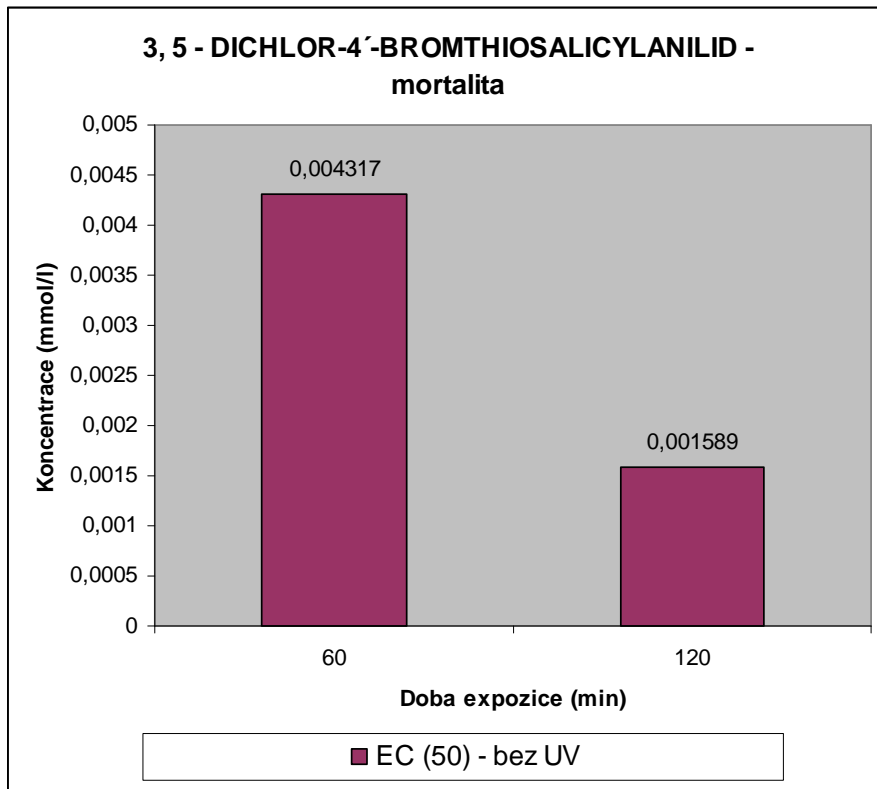
Po 60-timinutové expozici UV zářením toxin způsoboval poškození od koncentrace 0,3125 do koncentrace 0,625mmol/l, po 120-timinutové expozici UV zářením nastalo poškození v koncentracích 0,1563 – 0,625mmol/l, po 60-timinutové expozici bez UV záření nastalo poškození v koncentracích 0,1563 – 0,625mmol/l, po 120-timinutové expozici v koncentracích 0,0781 – 0,625mmol/l.

Pro názornost jsou přiloženy grafy závislosti EC_{50} na době expozice u ozařovaných organismů, u neozařovaných organismů a u ozařovaných i neozařovaných dohromady.

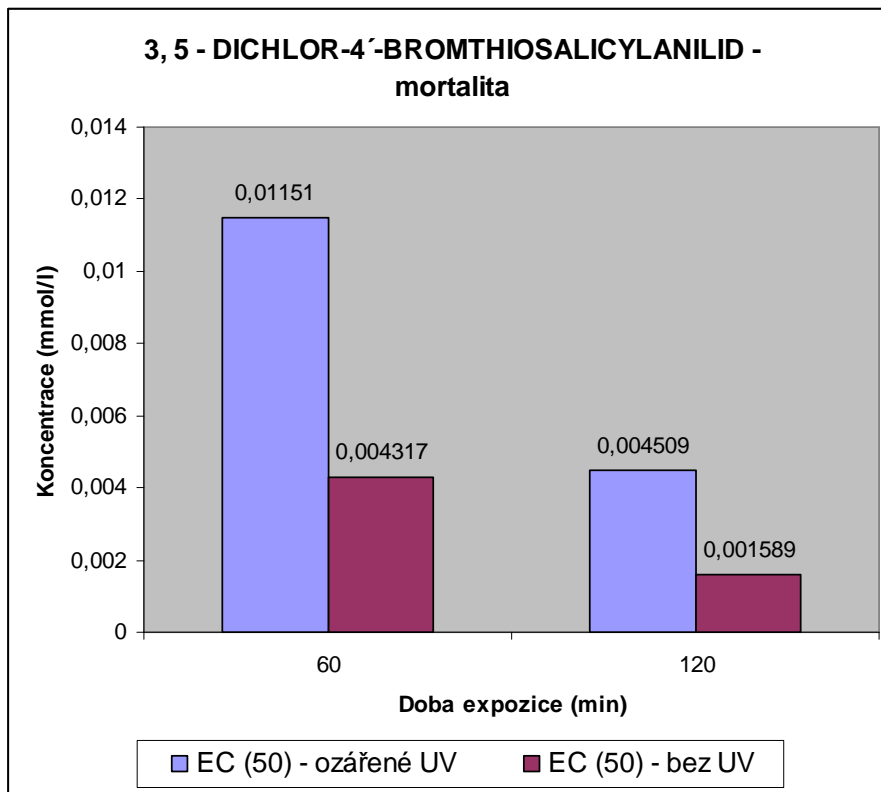
Graf 22. Závislost EC_{50} na čase (UV záření)



Graf 23. Závislost EC₅₀ na čase (bez UV)



Graf 24. Závislost EC₅₀ na čase (UV i bez UV)



SROVNÁNÍ TOXICITY JEDNOTLIVÝCH TOXINŮ

SROVNÁNÍ MORTALITY PO EXPOZICI NÍTĚNEK UV ZÁŘENÍM PO 60-TI A 120-TIMINUTOVÉ EXPOZICI

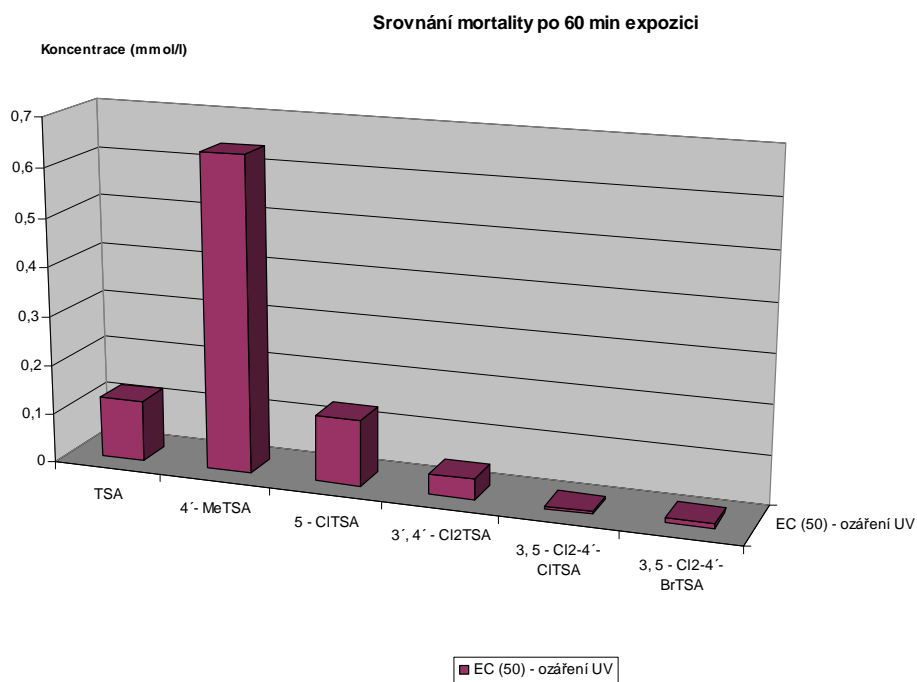
Při vyhodnocování mortality po 60-timinutové expozici nítěnek UV zářením se jako nejvíce toxická látka projevil 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid.

Druhou nejtoxičtější látkou byl 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid, dále 3',4'-dichlorthiosalicylanilid a nesubstituovaný thiosalicylanilid. Nejméně toxický byl 5-chlorthiosalicylanilid a 4'-methylthiosalicylanilid.

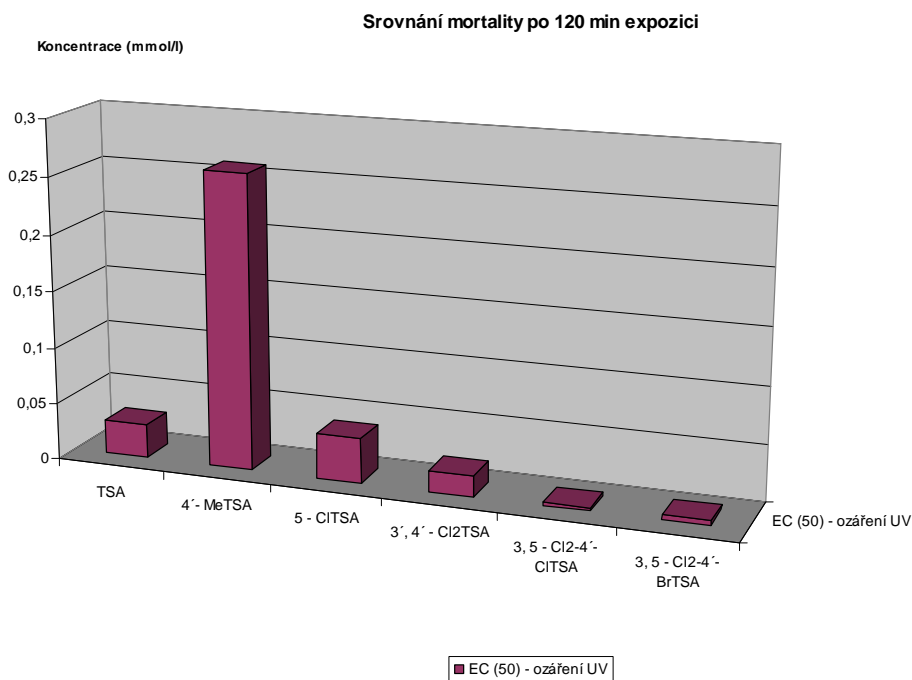
Toto pořadí platí i pro 120-timinutovou expozici.

Pro názornost jsou přiloženy grafy mortality po 60-timinutové expozici UV zářením a po 120-timinutové expozici UV zářením.

Graf 25. Srovnání hodnot EC₅₀ u jednotlivých toxinů po 60-ti minutové expozici (UV záření)



Graf 26. Srovnání hodnot EC₅₀ u jednotlivých toxinů po 120-ti minutové expozici (UV záření)



SROVNÁNÍ MORTALITY PO EXPOZICI NÍTĚNEK BEZ UV ZÁŘENÍ
PO 60-TI A 120-TIMINUTOVÉ EXPOZICI

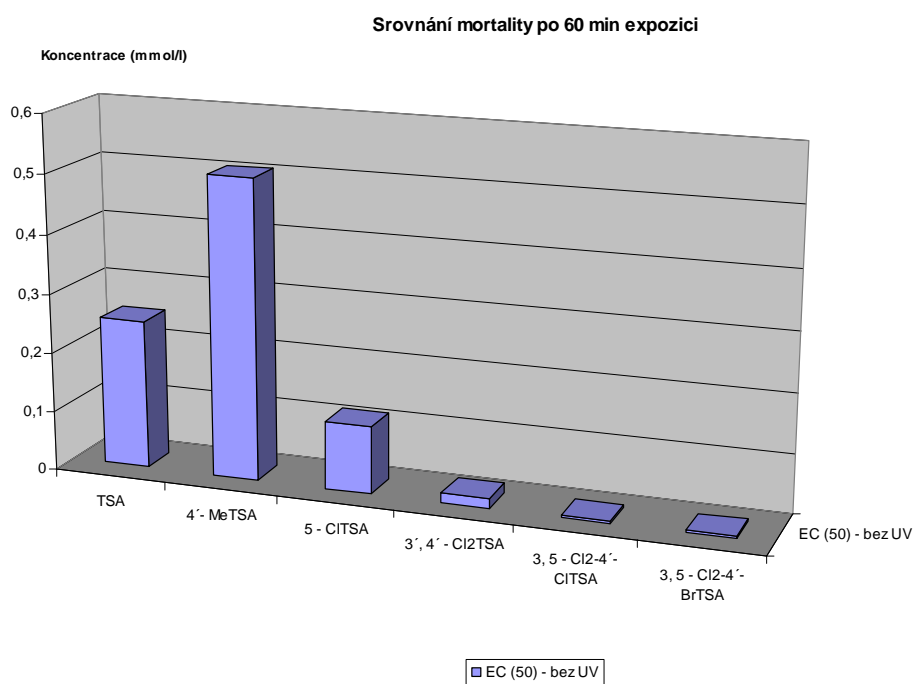
Při vyhodnocování mortality po 60-timinutové expozici nítěnek bez UV záření se jako nejvíce toxická látka projevil 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid.

Druhou nejtoxičtější látkou byl 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid, dále 3',4'-dichlorthiosalicylanilid a 5-chlorthiosalicylanilid. Nejméně toxický byl nesubstituovaný thiosalicylanilid a 4'-methylthiosalicylanilid.

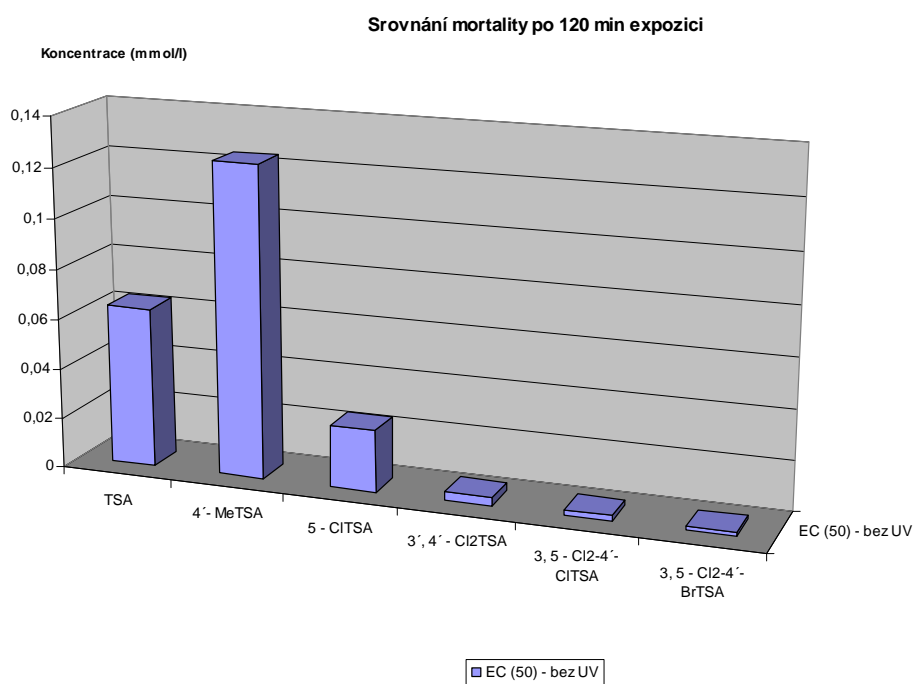
Toto pořadí platí i pro 120-timinutovou expozici.

Pro názornost jsou přiloženy grafy mortality po 60-timinutové expozici bez UV záření a po 120-timinutové expozici bez UV záření.

Graf 27. Srovnání hodnot EC₅₀ u jednotlivých toxinů po 60-ti minutové expozici (bez UV)

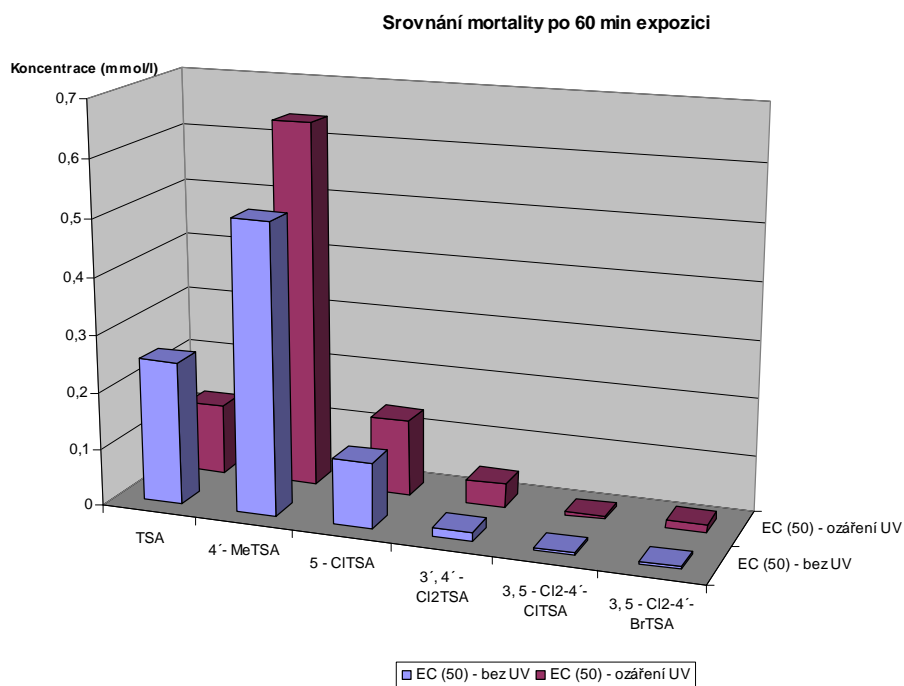


Graf 28. Srovnání hodnot EC₅₀ u jednotlivých toxinů po 120-ti minutové expozici (bez UV)

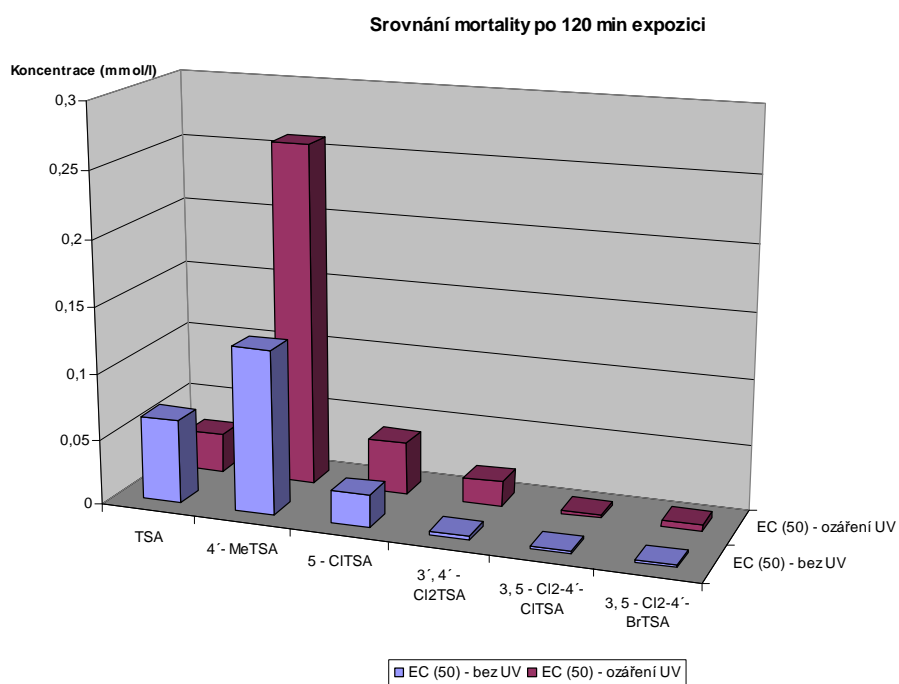


Nakonec jsou přiloženy souhrnné grafy mortality po 60-ti a 120-timinutové expozici s UV zářením i bez UV záření.

Graf 29. Srovnání hodnot EC_{50} u jednotlivých toxinů po 60-ti minutové expozici (UV i bez UV)



Graf 30. Srovnání hodnot EC_{50} u jednotlivých toxinů po 120-ti minutové expozici (UV i bez UV)



Největší rozdíl mezi EC₅₀ při testování s UV zářením a při temnostní kontrole a tedy nejvyšší fototoxický potenciál (tzv. fotoiritační faktor – PIF) se projevil u nesubstituovaného thiosalicylanilidu (v tabulce zvýrazněn červeně). U všech ostatních testovaných toxinů byly hodnoty PIF menší než 1 (tzn., že látka způsobuje stejnou reakci při ozáření UV zářením i při temnostní kontrole nebo je dokonce fotoprotektivní). Tyto hodnoty jsou vyznačeny v tabulce zeleně. Látky s hodnotou PIF v rozmezí 1 – 5 mají středně silný fototoxický potenciál. Je-li hodnota PIF ≥ 5, látka vykazuje silný fototoxický potenciál.

Níže je přiložena tabulka srovnání fotoiritačních faktorů jednotlivých testovaných toxinů.

Tab 23. Porovnání fotoiritačních faktorů jednotlivých toxinů

Poměr EC₅₀ bez UV / EC₅₀ – ozáření UV		
Doba expozice (min)	60	120
Thiosalicylanilid	2,04	2,14
4'- methylthiosalicylanilid	0,79	0,48
5-chlorthiosalicylanilid	0,85	0,61
3', 4' - dichlorthiosalicylanilid	0,40	0,18
3, 5 - dichlor - 4' - bromthiosalicylanilid	0,38	0,35
3, 5 - dichlor - 4' - chlorthiosalicylanilid	0,75	0,75

SROVNÁNÍ POŠKOZENÍ ÚČINKEM **JEDNOTLIVÝCH TOXINŮ**

Poškození způsobovaly pouze dvě látky - 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid a 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid. Poškození nastalo po 60-timinutové i 120-timinutové expozici UV zářením i bez UV.

Při působení UV záření a 60-timinutové expozici způsoboval 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid poškození od koncentrace 0,039mmol/l, po 120-timinutové expozici už v koncentraci 0,0098mmol/l.

Bez působení UV záření a po 60-timinutové expozici způsoboval 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid poškození od koncentrace 0,0195mmol/l, po 120-timinutové expozici od koncentrace 0,0098mmol/l.

Při působení UV záření a 60-timinutové expozici způsoboval 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid poškození od koncentrace 0,3125mmol/l, po 120-timinutové expozici už v koncentraci 0,1563mmol/l.

Bez působení UV záření a po 60-timinutové expozici způsoboval 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid poškození od koncentrace 0,1563mmol/l, po 120-timinutové expozici už v koncentraci 0,0781mmol/l.

6. SHRNU TÍ TESTOVÁNÍ

Na základě provedených testů lze říci, že jediná látka s fototoxickým potenciálem je nesubstituovaný thiosalicylanilid. Jeho PIF po 60-timinutové expozici je 2, 04 a po 120-timinutové expozici je 2, 14. Těmito hodnotami se řadí k látkám se středně silně fototoxickým potenciálem. Všechny ostatní testované látky mají hodnoty PIF nižší než 1, což znamená, že způsobují stejnou reakci při ozáření UV zářením nebo dokonce mohou být fotoprotektivní. Kromě toho všechny testované toxiny kromě thiosalicylanilidu mají vyšší hodnoty EC_{50} u ozařovaných organismů než u neozařovaných (tzn., že efektivní koncentrace, která usmrtí 50% pokusných jedinců musí být vyšší při ozařování UV zářením než při temnostní kontrole), a to při 60-ti i 120-timinutové expozici. U všech látek je také pozorovatelná přímá úměra mezi rostoucí délkou expozice a toxicitou (vlivem UV záření i bez něj). Čím delší je doba expozice, tím více narůstá toxicita při působení UV záření i bez něj.

3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid a 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid byly vyhodnoceny jako látky s absolutně nejvyšší toxicitou po ozáření i bez působení UV záření, ale není u nich patrný příliš velký rozdíl mezi mortalitou pokusných jedinců po ozáření a mortalitou bez působení UV záření. Vysoká mortalita pokusných jedinců po expozici 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilidem a 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilidem patrně souvisí s přítomností halogenů v molekulách těchto látek. 3', 4' - dichlorthiosalicylanilid obsahuje pouze dva atomy chloru, vykazuje i nižší toxicitu než dvě výše uvedené látky. Následuje nesubstituovaný thiosalicylanilid, pak 5-chlorthiosalicylanilid s jedním halogenem a nakonec 4' - methylthiosalicylanilid, který je nejméně toxický.

Při hodnocení mortality testovaných organismů bez přítomnosti UV záření je pořadí toxicity podobné, pouze thiosalicylanilid se umístil na předposledním místě.

Co se týče posouzení poškození, to způsoboval pouze 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid a 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid po 60-timinutové i 120-timinutové expozici UV zářením i bez UV. Větší míru poškození způsoboval 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, což vede k závěru, že chlor je pro daný testovací organismus toxičtější než brom. Po 120-timinutové expozici obě látky

způsobovaly poškození v nižších koncentracích než po 60-timinutové expozici, a to v přítomnosti UV i bez něj.

Z těchto výsledků se dá usoudit, že zvyšující se počet halogenů v molekule thiosalicylanilidů zvyšuje akutní toxicitu, ale snižuje fototoxický potenciál látky. Přítomnost methylové skupiny, která je izosterem halogenu toxicitu thiosalicylanilidů snižuje.

U salicylanilidů i thiosalicylanilidů se předpokládá i fotoalergizující účinek, který ale v prováděném rozsahu testování nemohl být potvrzen.

Zajímavé je postavení nesubstituovaného thiosalicylanilidu, který se v pořadí toxicity po ozáření i bez UV umisťuje uprostřed, ale jako jediný má fototoxický potenciál. Je možné, že fototoxický potenciál thiosalicylanilidů se bude spíše projevovat u nesubstituovaných derivátů.

Z hodnocení lze vyvodit, že kromě thiosalicylanilidu ostatní zkoumané látky nevykazují standardní fototoxický účinek, jaký byl prokázán u 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilidu.

Důvod se bohužel nepodařilo přesně objasnit. Testované látky se projevovaly jako poměrně stabilní, což souvisí i s jejich obtížnou rozpustností. Proto není pravděpodobná hypotéza možnosti rozkladu těchto látek vlivem UV záření a tím snížení fototoxicity. Stabilita toxinů vyvolává další možnou hypotézu – snížení toxicity vlivem UV záření. Bezprostředně po experimentu byl pozorován jemný povlak na povrchu nítěnek, film, který by mohl plnit funkci protektiva. Je tedy možné, že záření po určité době a při určité koncentraci toxinu navodí rychlejší vysrážení látky již samo o sobě obtížně rozpustné.

Pro názornost je přiloženo porovnání pořadí akutní toxicity stejných látek při testování na *Artemia salina*, které ve své diplomové práci souběžně prováděla Zuzana Čapková. Zde byl nejtoxičtější 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid, pak 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid, 3',4'-dichlorthiosalicylanilid, 5-chlorthiosalicylanilid, thiosalicylanilid a poslední 4-methylthiosalicylanilid. Rozdíly mohou mít různé důvody. Pravděpodobná je teorie interindividuální variability při

reakci na testované toxiny a schopnost jejich metabolizace. Přítomnost bromu v molekule může být pro artemie toxicitější než pro nítěnky, které na něj reagují méně citlivě. Rozdíl v reaktivitě mezi 5-chlorthiosalicylanilidem a nesubstituovaným thiosalicylanilidem zase může být zapříčiněn přítomností chloru v určité poloze (v tomto případě v poloze 5)-vliv substituentu. Tady naopak citlivěji reaguje nítěnka.

Seznam použité literatury:

AUCOIN, R. *et al.* How do insect herbivores cope with the extreme oxidative stress of phototoxic host plants? *Arch. Ins. Bioch. and Phys.* 1995, Vol. 29 (2), s. 211 – 226

BEAUCHAMP, K. A.: Molecular phylogeny of Tubificid Oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidea).

Mol. Phylogenet. Evol. 2001, Vol. 19 (2), s. 216 – 224

BLÁHA, K.: REACH – návrh nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami. Převzato z: TICHÝ, M., HANOUSKOVÁ, O. *Alternativní metody testování toxicity chemikálií*, Chrudim, 27. – 28. dubna 2005, s. 5 -8

BOULE, P. *et al.*: Environmental Photo-chemistry. *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1999, Vol. (2), s. 359

[cs.wikipedia.org/wiki/Ultravioletové záření](http://cs.wikipedia.org/wiki/Ultravioletové_zářen%C3%AD)

DECOME, L. *et al.* Evaluation of photolyase (Photosome®) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *J. Photochem. Photobiol.* 2005, Vol. 79, s. 101-108

DITTRICHOVÁ, D. a kol. Nežádoucí reakce kůže na sluneční záření a xenobiotika v životním prostředí. *Hygiena*, 44, 1999, No. 2, s.102-109

DOWNUM, K.R. *et al.* Influence of light on plant allelochemicals: A synergistic defense in higher plants. *Arch. Ins. Bioch. and Phys.*, 1991, Vol. 17(4), s. 201- 211

ec.europa.eu/comm

ecvam.jrc.it

ELLIS, L.A. Regulatory perspective *in vitro* assay as predictors of phototoxicity and photo co-carcinogenicity. *Int. J. Toxicol.*, 1998, Vol. 17, s. 571-575

- EYBL, V. Vybrané kapitoly z obecné farmakologie č. 1, UK, Karolinum Praha, 2003, s.63
- FARGAŠOVÁ, A. Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1994, Vol. 27, s. 210- 213
- FORBES, D., SAMBOCO, C. Assays for photocarcinogenesis: relevance of animal model. *Int. J. Toxicol.*, 1998, Vol. 17, s.577-588
- FRAZIER, J.M. Scientific criteria for validation of *in vitro* toxicity tests. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD Monograph No. 36), 1990
- GILBERT, M. A., GRANATH, O. W. Persistent infection of *Myxobolus cerebralis*, The causative agent of salmonid whirling disease in *Tubifex tubifex*. *J. Parasitol.*, 2001, Vol. 87 (1), s. 101-107
- GLICKMAN, R.D. Phototoxicity to Retina: Mechanisms of Damage. *Inter. J. of Toxicol.*, 2002, Vol. 21, s. 473- 490
- HARBER, L. C., TARGOVNÍK, S. E., BAER, R. L. Contact photosensitivity patterns to halogenated salicylanilides in man and guinea pigs. *Arch. Dermatol.*, 1967, Vol (96), s.646-656
- HEELIS, P. F. *et al.* The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems. *J. Photochem. Photobiol.*, 1993, Vol. 17, s. 219- 228
- HRABĚ, S. Vodní máloštětinatci Československa. *Acta Universitatis Carolinae-Biologica*, Univerzita Karlova, Praha, 1981, Vol. 1979 (1-2), s.167
- ISAKSSON, M. *et al.* Photopatch testing, Photocontact dermatitis. *Clin. Dermatol.*, 1997, Vol. 15, s. 615- 618
- JÍROVÁ, D., KEJLOVÁ, K. Alternativní metody testování toxicity *in vitro* kosmetických přípravků. *Alternativní metody testování chemikálií, Proceedings*, Chrudim 2005, s. 49-58

- JONES, P.A., KING, A. V. High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the *in vitro* 3T3 neutral red uptake assay.
Toxicol. In Vitro, 2003, Vol. 17, s. 703- 708
- KAGAN, J. *et al.* The phototoxicity of non-carcinogenic polycyclic aromatic Hydrocarbons in aquatic organisms. *Chemosphere*, 1985, Vol. 14, s. 1829- 1834
- KAISER, K. L. E., McKINNON, M., FORT, F. Interspecies Toxicity Correlation of Rat, Mouse and Photobacterium Phosphoreum.
Environ. Toxicol. Chem., 1994, Vol. 13, s. 1599- 1606
- KARCHER, W. Recent trends and developments in the EU in the Environmental Control and management of chemicals.
Ecotoxicol. Environmen. Saf., 1998, Vol. 40, s. 97- 102
- KORNHAUSER, A. *et al.* *In vitro* assays for phototoxicity.
Int. J. Toxicol., 1998, Vol. 17, s. 567- 570
- KUBICOVÁ, L., WAISSER, K. Biologická aktivita salicylanilidů. *Česk. Slov. Farm.*, 1992, Vol. 41, s. 208
- KUBICOVÁ, L., KRÁLOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F. *et al.* Effect of substituted salicylanilides on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts.
Folia Pharm. Uni. Carol., 2000, Vol. 25, s. 89
- KUPEC, J. Toxikologie, Univerzita Tomáše Baťi, Zlín, 2004, s. 176
- LAGADIG, L., CAQUET, T. Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives ? *Environ. Health Perspect.*, 1998, Vol. 106, s. 593- 611
- LAMBRECHTS, S. A. G. *et al.* Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin.
J. Photochem. Photobiol., 2005, Vol. 79, s. 51- 57
- LAMKA, J., DUCHÁČEK, L. Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, 1999, s. 164

- LANG, K. *et al.* Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku.
Chem. Listy, 2005, Vol. 99, s. 211- 221
- LANKERANI, L., BARON, E. D. Photosensitivity to Exogenous Agents.
J. Cutaneous Medicine and Surgery, 2004, Vol 8 (6), s. 424- 431
- LECLAIRE, J., SILVA, O. Industry experience with alternative methods.
Toxicol. Lett., 1998, Vol. 103, s. 575- 579
- LEE, K., BERENBAUM, M. R. Food utilization and antioxidant enzyme activities of black swallowtail in response to plant phototoxins.
Arch. Ins. Bioch. and Phys., 1993, Vol. 23 (2), s. 79- 89
- LELLÁK, J. a kol. Biologie vodních živočichů, Univerzita Karlova v Praze, 1982, s. 220
- LUCAN- BOUCHÉ, M.-L *et al.* An original decontamination process developed by aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to cooper and lead.
Aquat. Toxicol., 1999, Vol. 45, s. 9- 17
- LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. Farmakologie a toxikologie, GRADA Publishing., Praha, 2002, s. 696
- MALINA, L. Fotodermatózy, Maxdorf, 1999, s. 208
- MEUNIER, J-R. *et al.* Photogenotoxicity of Mammalian Cells: A Review of the Different Assays for *in vitro* testing.
J.Photochem. Photobiol., 1997, Vol. 75 (5), s. 437- 447
- MISHRA, R. B. *TUBIFEX* : A sensitive model for UV-B induced phototoxicity.
Ecotoxicol. Environ. Saf., 2002, Vol. 52 (3), s. 288- 295
- NEČAS, O. a kol. Obecná biologie pro lékařské fakulty, H+H Vyšehradská, Jinočany, 2000, s. 555
- NESMĚRÁK, K. Toxikologie dříve a nyní, 2005 /www.otevrena-veda.cz/Img Page C1/Chemie/25nesmerak.pdf/

- NEUMANN, N.J. *et al.* Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different *in vitro* and *in vivo* methods.
J. Photochem. Photobiol., 2005, Vol. 79, s. 25- 34
- PROKEŠ, J. a kol. Základy toxikologie I.; Obecná toxikologie a ekotoxikologie, UK, Karolinum Praha 1997, s. 165
- RÄSÄNEN, K. *et al.* Does jelly envelope protect the common frog *Rana temporaria* embryos from UV-B radiation ? *Herpetologica*, 2003, Vol. 59 (3), s. 293- 300
- RAY, R.S. *et al.* Effect of UV-B radiation on some common antibiotics.
Toxicol. In Vitro, 2002, Vol. 16, s. 123- 127
- RAY, R.S. *et al.* Radiation Induced *in Vitro* Phototoxic Potential of Some Fluoroquinolones. *Drug and Chemical Toxicology*, 2006, Vol. 1, s. 25- 38
- ROBERTS, J.E. Ocular Phototoxicity. *J. Photochem. Photobiol.*, 2001, Vol. 64 (2-3), s. 136- 143
- ROBERTS, J.E. Screening for ocular phototoxicity.
Int. J. Tox., 2002, Vol. 21, s. 491- 500
- SEDLÁK, E. Zoologie bezobratlých, Masarykova Univerzita v Brně, 2003, s. 337
- SONI, A. K., JOSHI, P. C. High sensitivity of *Tubifex* for Ultraviolet- B.
Biochem. Biophys. Research Commun., 1997, Vol. 231 (3), s. 818- 819
- STEVENS, R. *et al.* The effect of myxobolus cerebralis myxospore dose on triactinomyxon production and biology of *Tubifex tubifex* from two geographic regions. *J. Parasitol*, 2001, Vol. 87 (2), s. 315- 321
- STONAWSKI, J. Základy ekologie, UK, Karolinum Praha 1993, s. 218
- ŠUSTR, M., KRÁLOVÁ, K., KUBICOVÁ, L. Antimykobakteriální 3, 5-dichlorsalicylanilidy- inhibitory Hillový reakce. *Chem. Listy*, 2001, Vol. 95, s. 742- 778

The John Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT); <http://caat.jhsph.edu/history/AWE/awards.htm>

TICHÝ, M. Co a k čemu jsou alternativní metody *in vitro* a *in silico*.
Alternativní metody testování chemikálií, Chrudim, 2005, s. 43- 47

TICHÝ, M. Účinnost xenobiotik a chemická struktura,
Avicenum, Praha, 1983, s. 166

VEVERKOVÁ, E. a kol. Synthesis of Substituted Salicylanilides under Microwave Irradiation. *Monatshefte für Chemie*, 2003, Vol. 134, s. 1215- 1219

VINŠOVÁ, J., IMRAMOVSKÝ, A. Salicylanilidy- stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Čes. Slov. Farmacie*, 2004, Vol. 53, s. 294- 299

VOPRŠALOVÁ, M., ŽÁČKOVÁ, P. Základy toxikologie pro farmaceuty,
UK, Karolinum Praha, 1996, s. 232

WAISSER, K. Organická chemie I, UK, Karolinum Praha, 2001, s. 341

WAISSER, K., BUREŠ, O., HOLÝ, P. a kol. Relationship between structure and antimykobacterial activity of substituted salicylanilides.
Arch. Pharm. Med. Chem., 2003, Vol. 336, s. 53

WAISSER, K., BUREŠ, O., HOLÝ, P. a kol. Antimykobakteriální a antimykotická aktivita látek podobných salicylanilidům. *Chem. Listy*, 2001, Vol. 95, s. 742- 778

www.epa.gov

www.h2o-logic.cz/uv.htm

www.invittox.com

www.jrc.it

www.khsbrno.cz/souodkaz/hoh_who_solaria.doc

www.mpo.cz/cz/prumyslastavebnictvi/reach

www.mzcr.cz/data/c2147/lib/Slunecni_zareni

www.oecd.org

www.referaty.info.cz

ZIMČÍK, P., MILETÍN, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění- II. Přehled fotosenzitizérů.

Čes. Slov. Farm, 2004, Vol. 53 (6), s. 271- 279

ZURLO, J., RUDACILLE, D., GOLDBERG, A. M. Animals and Alternatives in Testing. *History, Science and Ethics*, Mary Ann Liebert, Inc., N.Y. 1994

SOUHRN

Tato práce se zabývala hodnocením biologické aktivity vybraných fotosenzibilizátorů.

Testujícím organismem je *Tubifex tubifex* Müll., test probíhá ve 24jamkových mikrotitračních destičkách.

Z mnoha fototoxických látek bylo vybráno k posouzení fotodynamické aktivity šest sloučenin nasyntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie.

Z mnoha parametrů byly vybrány dva endpointy-poškození a mortalita.

Poškození vyvolávaly pouze 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid a 3,5-dichlor-4'-bromhiosalicylanilid.

Mortalita (ozáření UV):

1. 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid-nejtoxičtější
2. 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid
3. 3'.4'-dichlorthiosalicylanilid
4. thiosalicylanilid-vykazuje fototoxický potenciál
5. 5-chlorthiosalicylanilid
6. 4-methylthiosalicylanilid-nejméně toxický

Mortalita (bez UV):

1. 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid-nejtoxičtější
2. 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid
3. 3'.4'-dichlorthiosalicylanilid
4. 5-chlorthiosalicylanilid
5. thiosalicylanilid
6. 4-methylthiosalicylanilid -nejméně toxický

SUMMARY

This research dealt with evaluation biological activity some choice photo-sensitizers.

Testing organism is *Tubifex tubifex* Müll, test proceeds in twenty-four foveolated micro-titrating plates.

From many photo-toxic materials was choice to check photo-dynamic activity six compounds synthesized on Department Inorganic and Organic Chemistry.

From many parameters been choice two endpoints-damage and mortality.

Damage induced only 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid a 3,5-dichlor-4'-bromhiosalicylanilid.

Mortality (UV-irradiation):

1. 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid- most toxic
2. 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid
3. 3',4'-dichlorthiosalicylanilid
4. thiosalicylanilid-embodies photo-toxic potential
5. 5-chlorthiosalicylanilid
6. 4-methylthiosalicylanilid-at least toxic

Mortality (without UV-irradiation):

1. 3,5-dichlor-4'-chlorthiosalicylanilid- most toxic
2. 3,5-dichlor-4'-bromthiosalicylanilid
3. 3',4'-dichlorthiosalicylanilid
4. 5-chlorthiosalicylanilid
5. thiosalicylanilid
6. 4-methylthiosalicylanilid-at least toxic