

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE
(diplomová práce)

Ekotoxikologický screening vybraného léčiva III
Ecotoxicological screening of the select drug III

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

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

Hradec Králové 2010

Tereza Šilhavá

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Tereza Šilhavá

Úvodem bych velmi ráda poděkovala Mgr. Jitce Vytlačilové za její odborné vedení, přístup a podporu, bez nichž by tato práce nevznikla. Děkuji.

Tato diplomová práce vznikla za grantové podpory číslo: GAUK 105407 a SVV – 2010 – 261 - 002.

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1. Úvod.....	5
1.2. Cíl práce	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Ekotoxikologie	7
2.2. Ekotoxikologické testy.....	9
2.2.1. Rozdělení testů ekotoxicity	10
2.2.2. Testy akutní toxicity.....	12
2.2.3. Testy chronické toxicity	12
2.2.4. Testy na koryšících	12
2.2.5. Testy na řasách.....	13
2.2.6. Testy na rostlinách	14
2.2.7. Test akutní toxicity na rybách	16
2.3. Diazepam.....	16
2.3.1. Skupina benzodiazepinů.....	16
2.3.2. Diazepam.....	18
2.3.3. Testovaná látka.....	19
2.3.4. Spotřeba léčiv obsahujících diazepam v České republice.....	20
2.3.5. Výdeje z nemocniční lékárny z oddělení výdeje pro veřejnost za rok 2009	22
2.3.6. Testy s diazepamem na volně žijící organismy.....	23
2.4. Testované organismy	24
2.4.1. <i>Sinapis alba</i> , L.	24
2.4.2. <i>Tetrahymena pyriformis</i> , Ehr.	28
2.4.3. <i>Thamnocephalus platyurus</i> , Packard	33
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1. Testované organismy	37
3.1.1. Semena <i>Sinapis alba</i> , L.	37
3.1.2. <i>Tetrahymena pyriformis</i> , Ehr.	37
3.1.3. <i>Thamnocephalus platyurus</i> , Packard	37
3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení	37
3.2.1. Použité chemikálie	37
3.2.2. Pomůcky.....	38
3.2.3. Přístroje	38
3.3. Vlastní provedení experimentů	39
3.3.1. Test toxicity na semenech <i>Sinapis alba</i> , L.	39
3.3.2. Růstový inhibiční test (vícegenerační).....	40
3.3.3. Rapidtoxkit.....	41
4. VÝSLEDKY	43
4.1. Výsledky testů na semenech <i>Sinapis alba</i> , L.	43
4.2. Výsledky růstového inhibičního testu.....	45
4.3. Výsledky testů Rapidtoxkit.....	46
5. DISKUZE.....	48
6. ZÁVĚR	52
6.1. Použitá literatura	54
6.2. Základní pojmy používané v ekotoxikologii	58
Abstrakt	60

1. Úvod

1.1. Úvod

Během druhé světové války a v poválečné době zažilo lidstvo vývoj obrovského množství léčivých látek na nemoci, pro které v předchozí době neexistovalo žádné léčivo nebo byla nemoc nedostatečně terapeuticky zvládnuta (např. rozvoj antibakteriálních látek, antidepresiv,...). Léčivé látky byly pečlivě studovány a zároveň se zpřísnily podmínky, za kterých byly látky testovány (např. po thalimidové aféře), aby se pokud možno snížily na minimum možné nežádoucí účinky (Hartl, J. a kol.; 1998).

Avšak i když byly úspěchy nalezení nových léčivých látek patřičně ceněny, tak se málokdo zajímal o vlivu těchto látek na životní prostředí. V dnešní době je studování tohoto vlivu věnována stále větší pozornost, i když dat, kterých by bylo třeba, stále není mnoho.

Lidé by si měli uvědomit, že léčivo je vlastně jed, který v určitých koncentracích pomáhá, ale zároveň může být toxické pro jiné organismy. Proto by mělo být samozřejmostí zanechávat v lékárnách nespotřebovaná množství léčivých přípravků (léčivé přípravky prošlé, poškozené, atd.) namísto například jejich splachování do záchodové mísy a tím pádem pokračováním osudu léčivého přípravku do stok, podzemních vod, řek, moří, pitné vody atd. Vždyť už nyní jsou prokázány například v Labi tyto látky: diklofenak, ibuprofen, karbamazepin, různá antibiotika, látky na regulaci lipidů, látky další a jejich metabolity (Wiegel, S. a kol; 2004). Je to ovšem jen „špička ledovce“, je třeba prozkoumat velká množství látek, nacházet nové, s lepší vypovídací hodnotou, citlivější, rychlejší metody a zároveň upozornit na tento problém veřejnost i odborníky, kteří jsou schopní v této problematice něco udělat.

Nebude lehké se s tímto obtížným úkolem vypořádat, ale je na nás abychom ať už ve vlastním zájmu nebo i v zájmu ostatních organismů uspěli a nelitovali investovaného času a financí.

Doufám tedy, že časem bude k dispozici stále více informací o osudu těchto látek v životním prostředí, že se situace zlepší a nebude již hledání informací o efektech léčivých látek připomínat „hledání jehly v kupce sena.“

1.2. Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit možný vliv diazepamu na životní prostředí. V této práci jsme porovnávali přímý vliv léčivého přípravku Diazepam tbl. - 5 mg a standardu účinné látky diazepamu.

Chtěli jsme experimentálně ověřit jeho ekotoxikologický efekt na zástupcích jednotlivých trofických úrovní v podobě laboratorních testů toxicity. Jako zástupci byli vybráni: *Tetrahymena pyriformis* – vícegenerační test toxicity, *Thamnocephalus platyurus* - RAPIDTOXKIT a *Sinapis alba* – inhibice klíčení semen.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je interdisciplinární vědní obor kombinující poznatky věd studujících ekosystémy (ekologie) a vědy studující interakce chemických látek s organismy (toxikologie) (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

Pojem ekotoxikologie zavedl v roce 1969 Truhaut jako přirozené rozšíření toxikologie a byla vědou zabývající se od účinků jedů na jednotlivé organismy až po ekologické účinky polutantů (Fargašová, A.; 2008).

Ekologická toxikologie (ekotoxikologie) se zabývá účinky škodlivin na flóru, faunu, ekosystémy a pohybem látek v biosféře (zejména potravních řetězcích). Mezi specializace v této oblasti patří např. hydroekotoxikologie a fytotoxikologie (Komínková, D.; 2008).

Hlavním cílem ekotoxikologie je poznání interakcí mezi živými organismy a chemickými/toxickými látkami v prostředí na všech úrovních a využití těchto poznatků pro racionální ochranu živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů před chemickým znečištěním (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

Již ve 13. století byl sledován negativní vliv lidské činnosti na životní prostředí. Tehdy anglický král Edward I. vydal nařízení, podle kterého bylo zakázáno spalovat uhlí v období zasedání parlamentu. V r. 1885 náčelník Seattle z kmene Duwamishů varoval před devastací přírody a prezidentu USA Franklinu Piercovi napsal: “Až budou všichni buvoli vybiti, divocí koně zkroceni, až budou skryté kouty lesa ztěžklé pachem mnoha lidí a pohled na plodné pahorky zohavené mluvicími dráty, kde potom bude orel? Bude to konec života, začátek přežívání“ (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

První základy moderní toxikologie lze nalézt v díle M. J. B. Orfila z roku 1815, které je první knihou vůbec věnovanou škodlivému účinku chemických látek na organismy. Toto dílo diskutuje o řadě aspektů toxikologie, které se ukazují i dnes jako platné. Dalším pokrokem ve vývoji toxikologie a dalším krokem ke vzniku ekotoxikologie byl výzkum zahájený ve 20. letech 20. století, který vznikl na základě

obav z možných vedlejších účinků potravinových aditiv, léků a pesticidů. V této době začalo docházet ke slučování znalostí z klinické toxikologie, farmacie, medicíny s poznatky z biologie a ekologie. Do 40. - 50.let 20. století se toxikologie jen vyjímečně zabývala zjišťováním vlivu antropogenních látek na jiné organismy než člověka. V průběhu 2. světové války začala být testována možnost využití vodních organismů pro indikaci znečištění (Komínková, D.; 2008). Velký vliv na rozvoj ekotoxikologie měla kniha *The Silent Spring* (Tiché jaro) publikovaná v roce 1962 její autorkou Rachel Carson. Kniha upozorňuje na vliv používání pesticidů, především DDT, na ptačí populace, klade důraz na zastavení širokého a bezohledného používání pesticidů a dalších agrochemikálií a obhajuje využití ekologických postupů. Přes určité nedostatky předložených návrhů je kniha ceněna, protože upozornila na tento problém a vedla v USA k založení Úřadu pro ochranu životního prostředí (US Environmental Protection Agency – EPA) (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

Asi největším problémem je posuzování směsí škodlivých látek. Jejich riziko se nedá posoudit na základě znalostí toxicity jednotlivých složek směsi. Proto jsou vyvíjeny metody, které by měly umožnit sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních reprodukovatelných podmínek (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

Jak již bylo sděleno na začátku, ekotoxikologie je věda, která hodnotí vzájemné interakce mezi toxickou látkou a živým systémem. Proto je třeba chemickou látku charakterizovat, tzn. znát její složení, strukturu, zdroj, distribuci v prostředí, atd. Dále je nutné si uvědomit, že ne všechny látky jsou dostupné ve vodním prostředí (např. limitující může být jejich rozpustnost) a že některé látky se mohou v organismech koncentrovat (Fargašová, A.; 2008).

Bohužel i v dnešní době je málo informací o ekotoxikologických efektech léčivých látek na vodní a terestrické organismy. Pro některé látky sice známe výsledky prováděných akutních testů na vodních organismech, ale data o chronických efektech látek známe jen okrajově. Důležité jsou proto zaměřené ekotoxikologické studie, které by dovolily lepší a komplexnější hodnocení léčivých látek v budoucnosti. Současné testy jsou prezentovány jen malým vzorkem organismů, který často není ani dost citlivý a který není schopen objasnit vedlejší účinky léčivých látek. Důsledkem je nutnost používání více specifitějších testů (je nutné uvědomit si hypotézy pro budoucí šetření – např. léčivé látky mají podobné

chronické efekty jak na savce, tak i na nesavce (dokonce i na rostliny) díky podobným receptorům a biomolekulám. Díky tomu se mohou objevit podobné chronické efekty jako u člověka a savců také u nižších obratlovců a bezobratlých, atd.) (Fent, K. a kol.; 2006).

2.2. Ekotoxikologické testy

První testy toxicity se začaly používat ve 40. letech 20. století, prvními testovacími organismy byly ryby. Po druhé světové válce se začal prosazovat trend standardizace testů toxicity, ale stále se používal pro testy pouze jeden druh organismů a jednalo se o stacionární testy, které se prováděly v jednom až pěti galonových kontejnerech. V 50. letech se objevila nutnost testovat organismy na různých stupních potravního řetězce. Od počátku 60. let dochází k velkému rozvoji testů toxicity, vedle testování skupin organismů se začaly používat různé expoziční systémy a multifaktorové experimenty. V této době se začal klást značný důraz také na kontrolu kvality vody a na testování odpadních vod a jejich dopad na recipient. 70. léta byla v duchu prvního využití výsledků testů toxicity a identifikovaných hodnot akutní toxicity pro definici právních norem a hodnocení rizika spojeného s toxickými látkami vstupujícími do životního prostředí. V následujících dvou desetiletích se vývoj v ekotoxikologii zaměřil na standardizaci testů toxicity a na mezilaboratorní porovnání, na propojení znalostí získaných v laboratoři se zkušenostmi z terénu a na zlepšení monitorovacích technik. V druhé polovině 90. let se začíná velkou měrou prosazovat využívání výsledků testů získaných ze studií prováděných na lidech nebo získaných při havarijních událostech. V posledních letech je v ekotoxikologii největší důraz kladen nejen na testy toxicity, ale zejména na komplexní přístup k životnímu prostředí, tzn. sledování nejen fyzikálně-chemické, ale i biologické složky prostředí a začlenění toho komplexního pohledu do legislativy. Současný vývoj se dá také shrnout jako změna pohledu od studia vztahu dávka – odpověď ke studiu vztahu stresor – odpověď, který zahrnuje i dynamiku ekosystému (Komínková, D.; 2008).

Zvýšené znečištění životního prostředí si dnes vyžaduje vývoj spolehlivých jednoduchých testů na stanovení účinků chemických látek, které by se mohly

hromadit nejen v abiotickém prostředí – v půdě, ovzduší, řekách a mořích (hlavně v jejich sedimentech), ale i v biotě a mohly by být potenciálně nebezpečnými až pro člověka.

Testování toxických látek v životním prostředí je ale značně problematické. V současnosti žije na naší planetě více než 10^8 druhů, což nedává možnost otestovat každou novou chemickou látku ani na alespoň jednom představiteli každého biologického rodu. Jedinou možností v této oblasti je vyvinutí testů, které sledují účinky potenciálně toxických látek na živočichy nebo rostliny nacházející se na jednotlivých trofických úrovních. Z hlediska environmentální toxicity jsou testy na různých trofických úrovních potravního řetězce velmi důležité pro návrh komplexního testovacího systému. Ideální testovací systém hodnocení environmentální toxicity se skládá z destruenta (bakterie, houby), primárního producenta (řasy, sinice), primárního konzumenta (např. vodní článkovci), sekundárního konzumenta (ryby), případně terciárního konzumenta (pták) – tak jako je například uspořádaný typický vodní ekosystém (Fargašová, A.; 2009).

2.2.1. Rozdělení testů ekotoxicity

- dle doby expozice – akutní, semiakutní (semichronické), chronické
- dle pokročilosti designu testovacího systému:
 - 1.generace – klasické (standardní) testy,
 - 2.generace – mikrotesty,
 - 3.generace – biosenzory, biosondy, biomarkery.
- dle trofické úrovně testovacích organismů – producenti (rostliny, bakterie), konzumenti (býložravci, masožravci, všežravci), destruenti (bakterie, houby, bičíkovci).
- dle testované matrice – voda, vzduch, sediment, půda, odpad, chemická látka apod.
- dle spektra testovacích organismů – jednodruhové, vícedruhové
- dle typu testovaného vzorku – čisté chemické látky, směsi látek, přírodní vzorky.
- dle způsobu přípravy vzorků – definované koncentrace chemických látek, extrakce přírodních vzorků, např. půdy, organickými rozpouštědly, roztoky anorganických solí, při různém pH, různé

teplotě, vodné výluhy, využití semipermeabilních membrán, přímých kontaktních testů (např. Direct Test, Solid Phase Test, apod.)

- dle stupně komplexnosti detekčního systému – testování má probíhat od jednodušších ke složitějším systémům, tj. od enzymatických zkoušek, biosond, buněčných a tkáňových kultur in vitro až po populace, mikro/mezo kosmos a terénní experimenty.
- dle způsobu vyhodnocování – např. hodnocení letálních efektů (mortalita, imobilizace), subletálních efektů (chování organismů – např. rychlost a směr pohybu), hodnocení fyziologické aktivity (fotosyntetická asimilace, enzymatická aktivita, změny na membránách, přírůstky – délky kořene rostliny, počtu buněk v populaci, hmotnosti organismu), reprodukční aktivity, malformací, teratogenity apod. (Pavlíková, D.a kol.; 2007).
- dle charakteru uspořádání: statické, semistatické, průtočné
- dle stupně komplexnosti detekčního systému: enzymy, biosondy, buňkové a tkáňové kultury in vitro, intaktní živý organismus, populace, mikro/mezokosmos, terénní experimenty (Fargašová, A.; 2009).

Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování se liší u různých autorů, firem, laboratoří. Neexistuje žádné obecné pravidlo, podle kterého se jednotlivé testy do posuzovacích sad začleňují, i když by měly splňovat alespoň některá kritéria (minimálně tři trofické úrovně testovacích organismů – producent, konzument, destruent; měla by se brát v úvahu i časová náročnost provedení testů a časovou dosažitelnost výsledků; tam, kde příprava vodného výluhu postrádá smysl, je třeba užít pouze kontaktní testy; pro pevné materiály musí být použit alespoň jeden test s vodným výluhem testovaného materiálu vedle kontaktních testů, pokud to má smysl; atd.) (Pavlíková, D.a kol.; 2007).

Není chybou, když se pro testy vybere kterýkoliv představitel trofické úrovně. Avšak výsledky musí být reprodukovatelné a přesné (musí vyhovovat požadavkům GLP – Good Laboratory Practice nebo požadavkům akreditace podle ISO/IEC 17025). Z hlediska požadavků na standardizaci se vytvořilo velké množství testů, které mají přesně definované mezinárodně odsouhlasené protokoly a zahrnují přesně

definované reprezentativní druhy organismů. Na standardizovaných testech se zúčastnily tyto organizace: International Organization for Standardization (ISO), European Committee for Standardization (CEN), U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) a Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (Fargašová, A.; 2009).

2.2.2. Testy akutní toxicity

Tyto testy jsou krátkodobými testy, které hodnotí účinky toxických látek na organismy v krátkém intervalu jejich života. Většinou se hodnotí účinky látek na přežívání organismů po 24 až 96 hodinovému působení. Na hodnocení akutní toxicity je dnes uveřejněných mnoho standardních metod a postupů pro více druhů, které zveřejnili ISO, CEN, ASTM (The American Society for Testing and Materials), Environment Canada, U.S.EPA OECD a další. Organismy, které jsou v těchto testech používány, jsou např. *Pimephales promelas* (škleble potočná), *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový), *Ictalurus punctatus* (sumec velký), *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Lemna*, *Skeletonema costatum* (mořské řasy), *Crassostrea virginica* (ústřice), atd. Mezi endpointy stanovující se v těchto testech patří LC₅₀, EC₅₀ nebo NOEC koncentrace a pozorování chování (Fargašová, A.; 2009).

2.2.3. Testy chronické toxicity

Tyto testy se používají na měření účinků toxických látek, které působí na organismy po dobu, která představuje alespoň desetinu jejich životního cyklu. Zde se nejčastěji hodnotí účinky látek na růst, reprodukci a chování vyvolané biochemickými poruchami. Nejčastějším hodnoceným účinkem je přežívání. Mezi druhy používané při těchto testech jsou např.: *Salvelinus fontinalis* (sivoň potočný), *Brachydanio rerio* (danio pruhované), *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* (larvy pakomárů), *Mysidopsis bahia* (krevety) a další. Nejčastější měřené endpointy jsou: schopnost vysedávání a líhnutí vajec, růst a přežívání (Fargašová, A.; 2009).

2.2.4. Testy na korýších – *Daphnia magna*

Daphnia magna je primárním konzumentem a je systematicky zařazovaná do kmene Arthropoda (článkovci), podkmene Crustaceae (korýši), třídy Phyllopoda (lupenonožci) a nadřádu Cladocera (perloočky) (Fargašová, A.; 2009).

Daphnia magna (hrotnatka velká) patří mezi jedny z nejdůležitějších a nejběžnějších vodních organismů testovaných v akvatické ekotoxikologii na celém světě. Hrotnatky jsou používány jak v akutním (24 hodinovém, 48 hodinovém), tak i v chronickém testu toxicity (21 dní).

Pro standardní ekotoxikologické testy je používán hlavně druh *Daphnia magna*, někdy také *Daphnia pulex*, případně *Daphnia pulicaria* a *Ceriodaphnia dubia* (Pavlíková, D.a kol.; 2007).

OECD guideline for testing of chemicals; 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.

Princip testu: Na začátku testu se pracuje s perloočkami *Daphnia*, které nejsou starší 24 hodin. Ty jsou vystaveny různým koncentracím testované substance po dobu trvání testu (48 hodin). V průběhu testu se zaznamenává imobilizace koryšů za 24 a 48 hodin, která se porovnává s kontrolami. Výsledkem testu je hodnota EC₅₀ za 48 hod (je možná i hodnota EC₅₀ za 24 hod.). Test se provádí za teploty 18-22°C, střídání světla (16 hodin) a tmy (8 hodin) a dalších podmínek uvedených v guideline (OECD; 202).

OECD guideline for testing of chemicals; 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.

Princip testu: V tomto testu se hodnotí vliv testované substance na reprodukční schopnost perloočky *Daphnia magna*. Samičky perloočky mladší 24 hodin jsou vystavené vlivu různých koncentrací testované látky po dobu 21 dní. Ke konci testu se počítají živí potomci žijících hrotnatek. Test je prováděn za teploty 18-22°C, 16 hodin světla a dalších podmínek. Hrotnatky jsou během testu krmeny řasami (OECD; 211). Výsledkem testu je stanovení nejvyšší koncentrace, která ještě nemá toxický účinek (NOEC) a nejnižší koncentrace, při které se pozorují statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolou (LOEC) (Fargašová, A.; 2009).

2.2.5. Testy na řasách

Řasy jakožto primární producenti zaujímají jedinečné postavení ve vodním ekosystému. Podle Walshe a Merilla je řasové hodnocení všeobecně lepším indikátorem potenciálního znečištění než živočichové, jelikož odpovídají jak na toxické látky, tak i na stimulanty růstu (Amparado, R., F. a kol.; 1996).

Řasové testy můžeme rozdělit na:

- testy s mořskými řasami – *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornerutum* (např. v normách Algal Marine Bioassay, ISO 10253)
- testy se sladkovodními řasami – *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*), *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*, *Desmodesmus subspicatus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*
- testy se sladkovodními sinicemi – *Microcystis aeruginosa*, *Navicula pelliculosa*, *Anabaena flos-aquae* (Fargašová, A.; 2009).

Používají se metody statického testování, metody průtočné nebo poloprůtočné. Jako testovací organismus se používají jednodruhové řasy nebo směs, kde jsou zastoupeny sinice, rozsivky a zelené řasy (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

Pro sladkovodní řasy je vypracován od organizace OECD Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Cílem tohoto testu je určit efekt testované substance na růst sladkovodních druhů zelených řas. Tento test může hodnotit efekt přes několik generací.

Princip testu: Exponenciální rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou vystaveny vlivu různým koncentracím testované substance po dobu několika generací za definovaných podmínek. Inhibice růstu je porovnávána ke kontrolám. Baňky testovaných kultur se promíchávají a jsou umístěny do kultivačního aparátu, přičemž je nutné řasy udržovat v suspenzi a usnadnit přenos CO₂. Teplotní rozmezí pro tento test je 21 – 24 ± 2°C. Koncentrace řasové biomasy v každé baňce je určována v čase 24, 48, 72 hodin od začátku testu. Endpoint tohoto testu je inhibice růstu, z níž se vypočítá hodnota EC₅₀ (OECD; 201).

2.2.6. Testy na rostlinách

Z etnických a ekonomických důvodů se testy se zvířaty provádějí minimálně při hodnocení toxicity xenobiotik. Kultury zvířecích/lidských buněk a tkání vyžadují komplexní média a je těžké udržet jejich stabilitu během dlouhých experimentů. Je zde i nebezpečí interakcí testované látky s komponentami média. Z těchto důvodů je někdy možné se testem na živočiších vyvarovat, jestliže jsou použity vhodné rostliny, semena, orgány, tkáň a buňky (Kristen, U.; 1997).

OECD guideline for testing of chemicals; 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.

Princip testu: Test dle OECD hodnotí vliv testované substance na vývin sazenice a na její růst. Semena rostlin jsou v kontaktu s testovanou látkou a jsou hodnoceny efekty následující obvykle 14 až 21 dnů po 50% vývinu semen v kontrolních skupinách. Mezi endpointy získané v tomto testu patří: vizuální hodnocení vývinu semene, váha suchého kořene (možný je i čerstvý kořen), v některých případech délka kořene, stejně jako hodnocení viditelných nepříznivých efektů na různé části rostliny. Tyto výsledky jsou porovnány s výsledky v kontrolních skupinách.

Test může být proveden za účelem zjištění křivky dávka-odpověď nebo v jedné koncentraci jako limitní test v závislosti na cíli studie (OECD; 208).

Testované druhy rostlin: Jsou používána semena jednoděložných i dvouděložných rostlin, obvykle alespoň 1 zástupce z každé této skupiny. Mezi nejfrekventovanější používané rostliny patří: hořčice (*Sinapis alba*, *Brassica alba*, *Brassica rapa*), salát setý (*Lactuca sativa L.*), rajské jablko (*Lycopersicon esculentum*), okurka setá (*Cucumis sativum*), kukuřice (*Zea mays L.*), ječmen (*Hodeum vulgare L.*), pšenice (*Triticum aestivum L.*) a další.

Je ovšem nutné podotknout, že klíčení semen není příliš citlivé k působení řady chemikálií, protože řada látek neproniká snadno do semene a i semena různých druhů rostlin jsou různě citlivá vůči testované látce. V důsledku toho nelze testovat látku jen na jednom druhu rostliny, ale je třeba provést testy s více rostlinnými druhy (Pavlíková, D. a kol.; 2007).

2.2.6.1. Test na *Sinapis alba*

Princip testu: Test se provádí s neředěným vodným výluhem (testovacím roztokem připraveným z vodného výluhu odpadu obohaceným solemi). Z filtračního papíru se vystřihnou kruhy dle dna použitých Petriho misek. Ty se vloží na dna Petriho misek a nasytí se 10 ml vodného výluhu nebo ředící vody (kontrola). Na navlhčené filtrační papíry se pinzetou rovnoměrně rozmístí po 30 semenech. Pak se misky umístí do termostatu s teplotou 20°C bez přístupu světla (Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů, Ministerstvo životního prostředí České republiky; 2007). Test probíhá 72 hodin. Poté se přesně změří délka kořene každé rostliny v jednotlivých koncentracích. Pro každé ředění se vypočte aritmetický průměr délky kořenů L v mm a vypočítá se inhibice I_{μ} (popř. i stimulace) růstu kořene v toxické látce v porovnání s nasazenou kontrolou (Ambrožová, J.; 2003).

$$I\mu = [(L_c - L_v) \times 100] / L_c$$

$I\mu$...inhibice růstu kořene v %

L_c ...aritmetický průměr délky kořene v kontrole v mm

L_v ...aritmetický průměr délky kořene v testovaném roztoku v mm
(Ambrožová, J.; 2003).

2.2.7. Test akutní toxicity na rybách

Tento test se provádí buď na *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio*.

Test s *P. reticulata*: tato živorodka musí být k testu akutní toxicity pohlavně diferencovaná, ve věku 3 - 4 měsíců, délka těla 15 - 25 mm. Samice nesmí mít zřetelnou „zárodečnou“ skvrnu. Používají se i samci (celkově je poměr pohlaví 1:1).

Princip testu: Test probíhá 48 hodin a po tuto dobu jsou ryby vystaveny účinku různých koncentrací testované látky, ryby jsou samozřejmě i v kontrolách. Standardní podmínky jsou teplota $23 \pm 2^\circ\text{C}$, osvětlení 12 – 16 hodin denně. V průběhu testu se pravidelně kontroluje stav i chování ryb a loví se mrtví jedinci. Jejich počet se zaznamenává v době 24 a 48 hodin. Výsledky jsou hodnoty LC_{50} za 24 a 48 hodin (Svobodová, Z. a kol.; 2000).

2.3. Diazepam

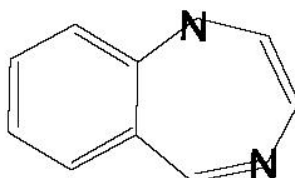
2.3.1. Skupina benzodiazepinů

Benzodiazepiny jsou skupina, jejichž objevení se datuje kolem roku 1960 (Hartl, J. a kol.; 1993). Mají sedativní, anxiolytické, myorelaxační, hypnotické, antikonvulzivní a amnestické účinky (Lincová, D. a kol.; 2007). První látkou zavedenou do praxe byl chlórdiazepoxid a dále pak další látky, které se mezi sebou navzájem liší různě vystupňovanými již dříve popsánymi vlastnostmi (Hartl, J. a kol.; 1993).

Mechanismus účinku této skupiny spočívá v ovlivnění GABA_A receptorového komplexu, přesněji dochází ke zvýšení afinity kyseliny γ - aminomáselné k receptoru a tím ke zvýšení influxu chloridových iontů dovnitř buňky (Lincová, D. a kol.; 2007).

Nejčastější skupinou benzodiazepinů jsou deriváty 1,4 - benzodiazepinu (Hartl, J.a kol.; 1993).

Obr. č. 1: Vzorec 1,4 – benzodiazepamu.



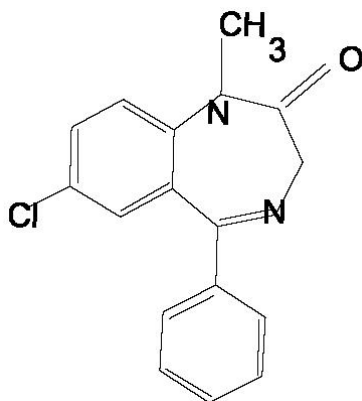
Mezi účinky a strukturou benzodiazepinů byly nalezeny tyto zákonitosti:

1. Pro zachování aktivity je nutná přítomnost základního benzodiazepinového skeletu, který je v poloze 5 substituován fenylem. Jeho náhrada jiným arylem, s výjimkou 2-pyridylu, se neosvědčila. Účinek se zvýší substitucí fenylu nejlépe chlorem nebo fluorem v o-poloze.
2. Účinek po kvalitativní stránce ovlivňuje substituce v poloze 7. Vhodnými substituenty jsou elektronegativní halogeny, zejména chlor a brom, skupina trimethylová a nitroskupina. U látek s anxiolytickým účinkem se v uvedené poloze nejčastěji nachází chlor, případně brom. Náhrada nitroskupinou vede k vyhranění hypnotického charakteru látek (nitrazepam, flunitrazepam, příp. klonazepam). Přesun elektronegativních substituentů do jiných poloh ovlivňuje účinek negativně.
3. Pro zachování účinku je nezbytná přítomnost dvojně vazby v poloze 4. Její hydrogenace ovlivňuje účinek negativně. Naproti tomu odstranění dvojně vazby v poloze 1 je pro účinek výhodné.
4. Širší možnosti pro obměny struktury poskytují polohy 1, 2, 3 a 4, kde vhodná substituce ovlivňuje účinek po kvantitativní stránce. Jako vhodná modifikace struktury se ukázalo i připojení pětičlenného heterocyklického kruhu, např. triazolového, v polohách 1, 2 (alprazolam).
5. Charakter účinku zůstává zachován i u derivátů izomerního 1, 5 - benzodiazepinu (klobazam) a 2,3 - benzodiazepinu (tofisopam) (Hartl, J. a kol.; 1993).

2.3.2. Diazepam

Vzorec: $C_{16}H_{13}ClN_2O$ (Kümmerer, K.; 2008).

Obr. č. 2: Vzorec 7-chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-fenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-on (Hartl, J. a kol.; 1993).



ATC kód: N05BA01 (MEDICAL TRIBUNE BREVÍŘ 2009).

CAS: 439-14-5 (<http://en.wikipedia.org>).

Zařazení: anxiolytikum (MEDICAL TRIBUNE BREVÍŘ 2009).

Molekulární hmotnost: 284,74 g/mol

Rozdělovací koeficient *n*-oktanol /voda: 2,82 (Kümmerer, K.; 2008).

Rozpusťnost: velmi mírně rozpustný ve vodě, rozpustný v alkoholu a volně rozpustný v chloroformu (<http://toxnet.nlm.nih.gov>).

Diazepam byl objeven chemikem doktorem **Leem Henrykem Sternbachem** (1908 – 2005) roku 1963 ve firmě La-Roche a byl uveden na trh pod názvem Valium (<http://en.wikipedia.org>).

Diazepam má sedativní, hypnotické, anxiolytické, myorelaxační, amnestické a antikonvulzivní vlastnosti (Lincová, D. a kol., 2007).

Dnes přes 40 let stará sloučenina byla a stále patří mezi velmi užívaná léčiva – je uvedena v List of essential medicine vydávaný WHO, bohužel jako všechny léky i diazepam má jak léčivé tak i nežádoucí účinky (<http://en.wikipedia.org>).

Inaktivace: Při metabolismu farmaka vzniká postupně řada různých látek podle určitého schématu. Diazepam se převážně demethyluje na dusíku, vzniká 1-demethyldiazepam, který se pak pomalu hydroxyluje v poloze 3 (oxazepam), na

této hydroxy-skupině se konjuguje a tím biologicky inaktivuje. Vedlejší metabolickou cestou se diazepam může hydroxylovat přímo, vzniká temazepam, který se buď může demethylací přeměnit na oxazepam, anebo přímo konjugovat (Lüllmann, H. a kol.; 2004).

Vylučování: Vylučování u lidí je hlavně skrz močový trakt ve formě konjugátů (Kümmerer, K.; 2008). Diazepam je vylučován jako původní látka v malém podílu (Jjemba, P. K.; 2006). Avšak Kümmerer v kapitole o diazepam uvádí, že se tato hodnota u různých autorů velmi liší (někde se diazepam jako původní látka vylučuje až v 50%, jinde třeba jen v 11% jako parentní látka nebo její glukuronid konjugát) (Kümmerer, K.; 2008).

2.3.3. Testovaná látka

Testovaná látka - Diazepam - SLOVAKOFARMA 5 mg

Indikace: úzkost, napětí, panický strach, fobie, obscese, emoční tenze a neklid u neuróz, psychosomatických onemocněních a psychopatiích - vždycky jen tehdy, když je příčina těchto stavů přechodná a předem je zřejmé, že nebude nutné aplikaci poskytovat déle než 4 - 5 týdnů. Při svalové spasticitě jako centrální myorelaxans. Léčba abstinčního syndromu u alkoholiků. Na počátku hospitalizace u osob, které trpí problémy s adaptací a v rámci předoperační přípravy. Při léčbě epilepsie lze podávat dlouhodobě.

Dávkování: Běžně lze vyjít s denní dávkou v rozmezí 4 - 15 mg podle povahy a závažnosti onemocnění. Podle potřeby lze denní dávku zvýšit až na 30 mg, není-li ospalost na překážku. Starým lidem se podávají přiměřeně nižší dávky vzhledem k tomu, že poločas se prodlužuje až o 60% a snadno dojde ke kumulaci.

Kontraindikace: Myastenia gravis, glaukom s uzavřeným úhlem, intoxikace alkoholem, barbituráty a jinými látkami tlumivě působícími, těžší poškození jater a ledvin, první trimestr gravidity a kojení, alergie na přípravek.

Speciální upozornění: Během léčení se nedoporučuje pít alkoholické nápoje. Při delším podávání dochází k enzymové indukci, která po 4 - 5 týdnech vede k projevům tolerance. Při dlouhodobém pravidelném používání se lék nesmí náhle vysadit. Náhlé vysazení může vyvolat neklid až křeče, delirium a epileptické

záchvaty. Při dlouhodobém podávání vysokých dávek je možný vznik lékové závislosti, proto by podávání přípravku nemělo trvat déle než 5 - 6 týdnů.

Interakce: Diazepam zvyšuje účinnost a toxicitu fenytoinu, d-tubokurarinu a gallaminu, snižuje účinnost suxamethonia. Účinnost přípravku zvyšují látky tlumící CNS a alkohol a snižují psychostimulancia a fenobarbital. Současně podávaná antacida a anticholinergika mohou snížit vstřebávání diazepamů po p.o. užití. Nevhodné je současné podávání tricyklických antidepresiv.

Těhotenství a laktace: Jako důsledek užívání přípravku v prvním trimestru těhotenství byl popsán zvýšený výskyt deformit u novorozenců. Během kojení se aplikace nedoporučuje, neboť proniká do mateřského mléka.

Možnost snížení pozornosti u řízení motorových vozidel a u obsluhy strojů: Přípravek snižuje schopnost řízení motorových vozidel a všech činností vyžadujících zvýšenou pozornost, koordinaci pohybů a rychlé rozhodování.

Nežádoucí účinky: Výskyt asi 8%, nejčastěji neuropsychické poruchy jako spavost, ataxie, vertigo, bolesti hlavy, poruchy zraku, deprese, agitovanost, poruchy spánku (MV AISLP – ČR 2010.1).

V současné době jsou na k dispozici na českém trhu tyto přípravky obsahující diazepam:

Apaurin

Diazepam Desitin rectal tube 10 mg

Diazepam Desitin rectal tube 5 mg

Diazepam - SLOVAKOFARMA 2 mg

Diazepam - SLOVAKOFARMA 5 mg

Diazepam - SLOVAKOFARMA 10 mg (MV AISLP - ČR 2010.2).

2.3.4. Spotřeba léčiv obsahujících diazepam v České republice

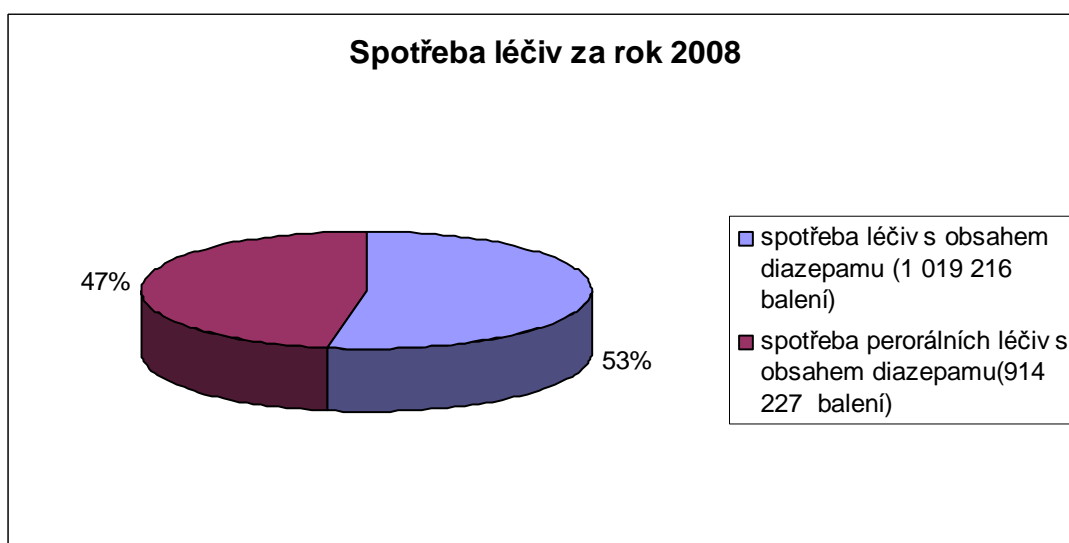
2.3.4.1. Spotřeba za rok 2008

Spotřeba léčiv obsahujících diazepam bylo 1 019 216 balení za průměrnou cenu 22 562 314 Kč, což odpovídá 15 440 339 spotřebovaných DDD (definovaných

denních dávek), tj. 16,2997 spotřebovaných DDD/1000 obyvatel/den (definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den).

Na perorální léčiva obsahující diazepam připadalo 914 227 balení za průměrnou cenu 10 418 952 Kč, což odpovídá 14 514 854 DDD (definovaných denních dávek), tj. 15,32271 spotřebovaných DDD/1000 obyvatel/den (definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den) (<http://www.sukl.cz>).

Graf č.1: Spotřeba léčiv s obsahem diazepamů za rok 2008.

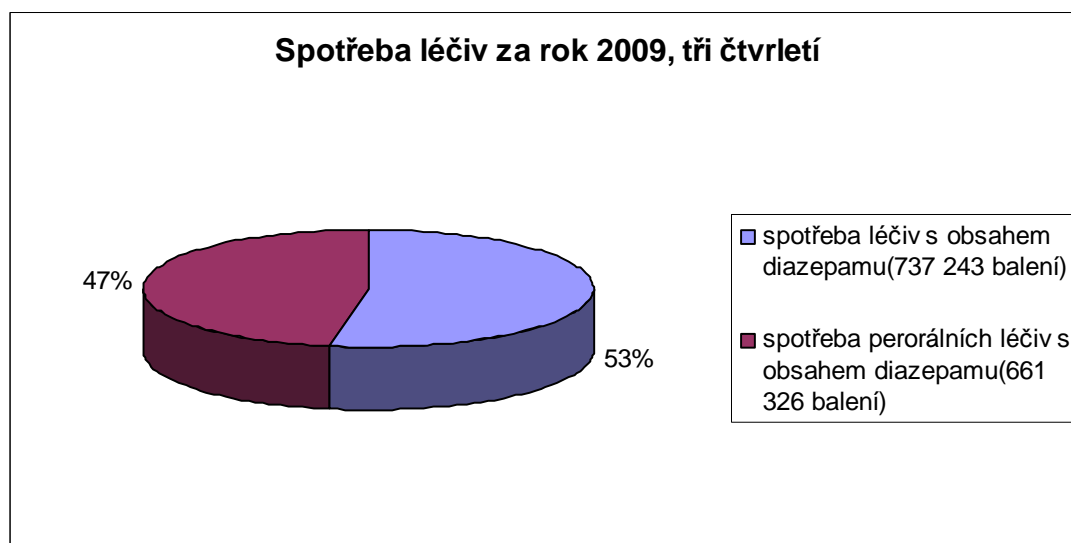


2.3.4.2. Spotřeba za rok 2009, tři čtvrtletí

Spotřeba léčiv obsahujících diazepam bylo 737 243 balení za průměrnou cenu 15 576 067 Kč, což odpovídá 11 202 555 DDD (definovaných denních dávek), tj. 11,72843 spotřebovaných DDD/1000 obyvatel/den (definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den).

Na perorální léčiva obsahující diazepam připadalo 661 326 balení za průměrnou cenu 7 563 844 Kč, což odpovídá 10 540 710 DDD (definovaných denních dávek), tj. 11,0355 spotřebovaných DDD/1000 obyvatel/den (definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den) (<http://www.sukl.cz>).

Graf č.2: Spotřeba léčiv s obsahem diazepamů za tři čtvrtletí roku 2009.

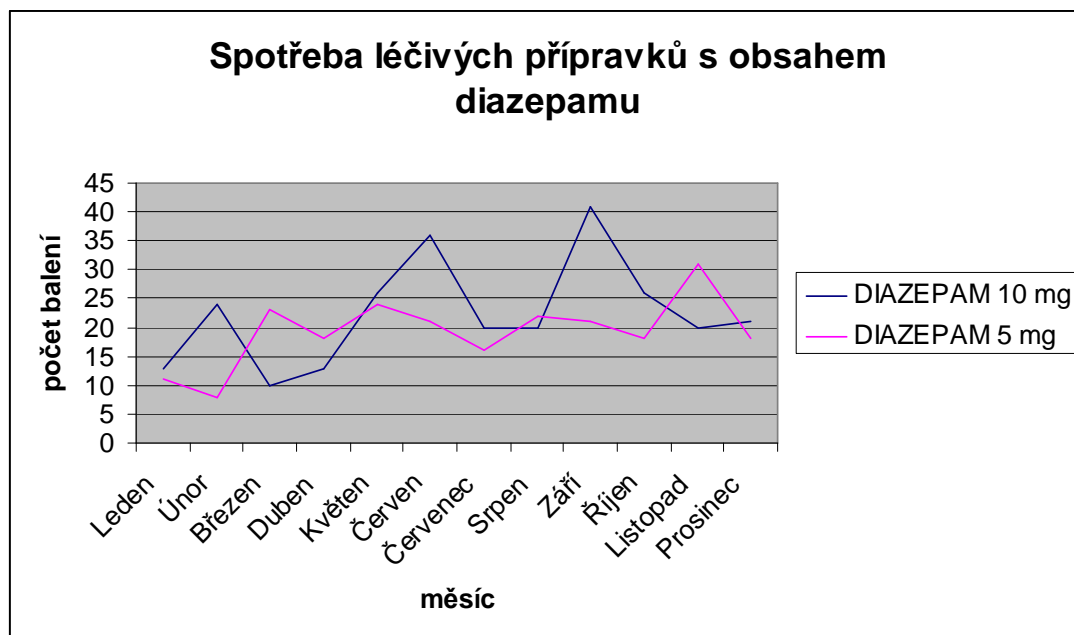


2.3.5. Výdeje z nemocniční lékárny z oddělení výdeje pro veřejnost za rok 2009

Tab. č. 1:

Měsíc	Diazepam – 10 mg	Diazepam – 5 mg
Leden	13	11
Únor	24	8
Březen	10	23
Duben	13	18
Květen	26	24
Červen	36	21
Červenec	20	16
Srpen	20	22
Září	41	21
Říjen	26	18
Listopad	20	31
Prosinec	21	18

Graf č.3: Spotřeba léčivých přípravků s obsahem diazepamů dle výdejů z nemocniční lékárny.



2.3.6. Testy s diazepamem na volně žijící organismy

Carrina Carlsson a kolektiv uvádí, že diazepam není považován za sloučeninu, která by představovala riziko pro své akutní toxické účinky na vodní organismy, protože PEC/PNEC této sloučeniny je méně než 1.

David Pascoe a kolektiv zkoumali vliv 10 běžně předepisovaných léčiv v UK – ibuprofen, paracetamol, aspirin, amoxicilin, bendroflumethiazid, furosemid, atenolol, diazepam, digoxin a amlodipin – za použití žahavce *Hydra vulgaris*. Pracovalo se se standardy účinných látek, aby se zabránilo komplikacím díky dalším složkám obsažených v komerčních přípravcích. U každé látky byly připraveny tyto koncentrace: 10, 100 µg/l, 1 a 10 mg/l, které vznikly zředěním základních roztoků látek *Hydra* médiem s ethanolem. Jako kontrola bylo *Hydra* médium s ethanolem. Tým zkoumal akutní i chronickou toxicitu.

Mnohé testy s diazepamem byly provedeny pro firmu Hoffmann – La Roche Ltd., které ale nebyly publikovány. Jedná se např. o testy na organismech: *Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Chironomus tentans*, *Scenedesmus subspicatus*, *Synechococcus leopoliensis*, atd (Kümmerer, K.; 2008).

2.4. Testované organismy

2.4.1. *Sinapis alba*, L.

Taxonomické zařazení:

Oddělení: Spermatophyta (Semenné rostliny)

Pododdělení: Angiospermophyta (Krytosemenné rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida (Dvouděložné rostliny)

Podtřída: Dilleniidae

Řád: Capparales

Čeleď: Brassicaceae (Brukvovité)

Druh: *Sinapis alba* (Hořčice bílá) (Jahodář, L.; 2006).

Oddělení: Spermatophyta (Semenné rostliny)

Semenné rostliny jsou zdaleka nejpočetnějším seskupením mezi cévnatými rostlinami, zahrnují okolo 270 000 žijících druhů (Jahodář, L.; 2006). Jejich sporofyt výrazně dominuje nad gametofytní generací, která je jen součástí sporofytu a není schopna samostatné existence. Ve srovnání s výtrusnými vyššími rostlinami jsou důležité pro evoluční strategii semenných rostlin dva momenty: 1. nezávislost procesu oplození na vodním prostředí, 2. tvorba semen (Kincl, L. a kol.; 2000).

Další charakteristikou semenných rostlin je tvorba dřeva – sekundárního xylému, který (spolu s mechanismem obnovy vnější kůry – tvorbou peridermu) umožňuje vývoj základního stonku. Cévnaté rostliny rostou do délky aktivitou primárního apikálního meristému na špičce stonku a kořene. Apikální meristémy tvoří nediferencované buňky, které postupně prodělávají mitotické buněčné dělení. Některé buňky produkované apikálním meristémem se uvnitř osy diferencují do zvláštních provazců tkáně, které v konečné formě vytvářejí vodivé pletivo-cévní svazky, ve kterých je patrná diferenciace primárního xylému (směřuje do středu rostlinné osy) a floému (směřuje vně osy). Mezi xylémem a floémem zůstává nediferencovaná vrstva buněk – kambium. Tato vrstva působí jako sekundární meristém – vytváří nové buňky na obě strany. Vznikají tedy nové buňky lýka

a dřeva. Tato vzniklá pletiva se označují jako sekundární floém a xylém (Jahodář, L.; 2006).

V dnešní době je popisováno pět hlavních linií semenných rostlin: Cycodophyta (Cykasy), Ginkgophyta (Jinany), Coniferophyta (Jehličnany) a Gnetophyta (Liánovce), což jsou Gymnospermophyta (Nahosemenné rostliny) a Angiospermophytina (Krytosemenné rostliny) (Jahodář, L.; 2006).

Pododdělení: Angiospermophyta (Krytosemenné rostliny)

Krytosemenné rostliny jsou nejmladší, nejpočetnější a vývojově nejpokročilejší skupinou semenných rostlin, kterých čítá asi 250 000 druhů. Jejich vajíčka jsou uzavřena v pestíku, který vzniká z jednoho nebo z více plodolistů; vajíčka se po oplození a dozrání mění v semena. Dalším rysem je tvorba květů. Pylová zrna, která jsou přenášena nejčastěji hmyzem nebo větrem, klíčí na blizně v pylovou láčku. Ta prorůstá čnělkou do semeníku a nese dvě nepohyblivé spermatické buňky, které se obě účastní oplození vajíčka. Jde tedy o dvojité oplození vajíčka, kdy jedna samčí gameta splývá s buňkou vaječnou a druhá s jádrem zárodečného vaku. Vaječná buňka se po oplození mění v zygotu, která se dále vyvíjí v embryo. Výsledkem splnutí jádra zárodečného vaku a vaječné buňky je vznik endospermu, což je živné pletivo zajišťující výživu embrya (Kincl, L. a kol.; 2000).

Krytosemenné rostliny se dělí na třídy Magnoliopsida (Dvouděložné rostliny) a Liliopsida (Jednoděložné rostliny) (Jahodář, L.; 2006).

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida (Dvouděložné rostliny)

Tato třída zahrnuje dřeviny i byliny se zárodky klíčovými dvěma dělohami, mezi nimiž se nachází vzrostlý vrchol stonku. Rostliny mají kořen hlavní, z něhož vyrůstají kořeny postranní. Na příčném řezu stonkem jsou rozeznatelné cévní svazky mající kruhovitě uspořádání. Protože je přítomné kambium, stonky sekundárně tloustnou. Listy jsou většinou řapíkaté a mají zpravidla dlanitou nebo zpeřenou žilnatinu. Květy jsou čtyř - nebo pětičetné, nejčastěji s květním obalem rozlišeným na kalich a korunu (Kincl, L. a kol.; 2000).

Pro sekundární metabolismus dvouděložných rostlin je charakteristická rozsáhlejší biogeneze alkaloidů různých typů (s převahou benzylochinolinových), silic, tříslovin (gallotaniny, ellagotaniny i katechinové proanthocyanidiny), steroidních saponinů, iridoidních a sekoiridoidních glykosidů, glukosinolátů, polyynů, seskviterpenových laktonů, nerozpustných šřavelanů ve formě krystalů, písku a drúz. Farmaceuticky významné podtřídy jsou: Magnoliidae, Ranunculidae, Hamamelididae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Cornidae, Lamiidae, Asteridae (Jahodář, L.; 2006).

Podtřída: Dilleniidae

Řád: Capparales

Jsou to stromy, keře, nejčastěji byliny obsahující myrosinové buňky a buňky bohaté na proteiny. Dále obsahují sirné glukosinoláty, protoalkaloidy, kyanogenní glykosidy, brassicasteroidy, mastné kyseliny (eruková, olejová, linolová), sinapovou a ferulovou kyselinu, kardioaktivní glykosidy, barvivo anthokyanového původu – rubrobrassicin.

Farmaceuticky významné čeledi jsou Brassicaceae a Capparaceae (Jahodář, L.; 2006).

Čeď: Brassicaceae (Brukvovité)

Brukvovité (křížaté) představují početnou skupinu rostlin (asi 3 500 druhů), rozšířenou hlavně v mimotropních oblastech (Kincl, L. a kol.; 2000). Jsou to jednoleté až vytrvalé rostliny (Jahodář, L.; 2006). Listy mají střídavé a květy v hroznovitých květenstvích. Plodem bývá nejčastěji šešule a šešulka, zřídka struk či nažka.

Charakteristickým znakem této čeledi je přítomnost idioblastů, buněk obsahující enzym myrosinázu – při rozdrcení pletiv štěpí obsah sousedních buněk za uvolnění hořčičných silic ostře pálivé chuti (Kincl, L. a kol.; 2000).

Mezi zástupce patří: *Erysimum cheiranthoides* (trýzel malokvětý), *Armoracia rusticana* (křen selský), *Brassica nigra* (brukev nebo hořčice černá), *Brassica juncea*

(brukev sítinovitá), *Brassica oleracea* (brukev zelná), *Leucosinapsis alba* (bělohořčice setá), *Capsella bursa – pastoris* (kokoška pastuší tobolka) (Jahodář, L.; 2006), kedluben, kapusta, *Sinapis alba* (hořčice bílá), atd. (Kincl, L. a kol.; 2000).

Druh: *Sinapis alba*, L.

Je jednoletou rostlinou o výšce 30 až 60 cm. Lodyhy má přímé, větvené, hranaté. Listy jsou řapíkaté, 4 - 10 cm dlouhé, vejčité podlouhlé, lyrovitě peřenodílné, se 2 - 3 páry zubovitých úkrojků (<http://analytic.profitux.cz>). Květenstvím je dlouhý žlutý hrozen, který se opyluje cizím pylem. Plodem je krátká silná šešule končící mečovitě zahnutým zobanem. Semeno je drobné, kulaté a světle žluté. Obsahuje 25 - 35% oleje a glykosid sinalbin. Celá rostlina i plod jsou kryty tuhými trichómy.

Olej lze využít k potravinářským nebo technickým účelům (výroba mýdla, farmaceutický a kosmetický průmysl).

Rostlina má krátké vegetační období. Někdy se vysévá jako náhradní olejnina za špatně přezimované porosty ozimé řepky. Kromě pěstování na semeno, se používá na zelené krmení (v mladých rostlinách je obsah glukosinolátů nízký), převážně jako strnisková meziplodina a na zelené hnojení. V České republice se bílá hořčice vysévá na méně než 50 000 ha. Největší využití má při výrobě stolní hořčice (Benda, V. a kol.; 2000).

Obr. č.3: *Sinapis alba* (zdroj: www.luirig.altervista.org).



:

Obr. č.4: Semeno *Sinapis alba* (zdroj: www.progast.cz).



2.4.2. *Tetrahymena pyriformis*, Ehr.

Taxonomické zařazení:

Říše: Animalia (Živočichové)

Podříše: Protozoa (Prvoci)

Kmen: Ciliophora (Obrvení)

Třída: Ciliata (Nálevníci)

Řád: Holotricha (Stejnobrví)

Druh: *Tetrahymena pyriformis* (Vojtková, L; 1988)

Říše: Animalia (Živočichové)

Podříše: Protozoa (Prvoci)

Prvoci byli po dlouhou dobu rozsáhle studováni, popisováni a klasifikováni protozoology. Jsou tvořeni eukaryotickou buňkou a vyskytují se ve vodním a terestrickém prostředí. Jejich normální chování v přírodě může být spojeno s přítomností polutantů a kvalitou vzduchu, půdy a vody. Tento poznatek vedl toxikology a ekotoxikology k užívání prvoků jako testovacích organismů v testech pro xenobiotika a testech hodnocení zdravotního rizika (Sauvant, M. P. a kol.; 1999).

K jednobuněčným (Protozoa) patří živočichové, jejichž tělo je tvořeno jedinou buňkou, která vykonává všechny základní funkce živočišného organismu (Vojtková, L; 1988). Prvoci mají většinou mikroskopické rozměry ($\mu\text{m} - 10^{-1} \text{ mm}$) (Papáček, M. a kol.; 2000). Buňky některých prvoků obsahují chloroplasty a na světle v jejich tělech probíhá fotosyntéza. Takovými prvoky jsou například krásnoočka.

Výhradně heterotrofní jednobuněčné organismy víceméně formálně řadíme k živočichům a vyčleňujeme pro ně zvláštní podříši prvoků (Papáček, M. a kol.; 2000). Větší část prvoků má buňku pohyblivou. Nejčastější je pohyb pomocí bičíku. Řada skupin prvoků má více než jeden bičík. Od bičíku lze odvodit i další pohybové orgány, např. u nálevníků obecné brvy (cilie) a z nich odvozené membranely apod. Buňky se pohybují také pomocí panožek (pseudopodií).

Nejjednodušším způsobem příjmu potravy je osmóza, odvozená je pinocytóza. Velké částice včetně drobných organismů jsou přijímány fagocytózou. Vzniklá dutina při fagocytóze - potravní vakuola, kde dochází k trávení potravy enzymy, při trávení putuje cytoplazmou a poskytuje buňce živiny vzniklé trávením. Vakuola tedy slouží jako trávicí soustava včetně produkce exkrementů, ale také jako systém oběhový, který roznáší živiny.

Vylučování exkretů se děje jejich soustředěním z cytoplazmy do jiného typu vakuol, které pak stahem vyvrhují svůj obsah na povrch buňky.

Dýchání probíhá na principu prosté difuze plynů do buňky (Smrž, J. a kol.; 2004).

Prvoci se mohou rozmnožovat nepohlavně, dělením na dvě dceřiné buňky nebo rozpadem na mnoho dceřiných útvarů. Rozmnožují se ovšem i jinými způsoby, které můžeme označit jako pohlavní rozmnožování. Jejich rozmnožování může probíhat buď jako splývání částic, které jsou produkovány buňkami prvoků a které

můžeme považovat za gamety, nebo splývání celých jedinců, popř. jejich jader (Papáček, M. a kol.; 2000).

Prvoci mají pět kmenů: Sarcomastigophora (bezbrví), Sporozoa (výtrusovci), Cnidosporidia (mnohojaderní), Microsporidia (hmyzomorky) a Ciliophora (obrvení) (Vojtková, L.; 1988).

Kmen: Ciliophora (Obrvení)

Za své české pojmenování vděčí nálevníci tomu, že se jejich aktivní stadia objevují v nálevech připravených ze sena nebo trávy a vody. Do nálevu jsou totiž spolu se senem přeneseny i klidová stadia nálevníků (cysty), které se ve vodním prostředí uvedou do aktivního stavu (Papáček, M. a kol.; 2000).

Do tohoto kmene patří více jak 7 000 druhů (Vojtková, L.; 1988). Nálevníci mají mezi prvoky nejodvozenější znaky. Unikátní je jaderný dimorfismus, tedy morfologické a funkční rozlišení jádra na makronukleus a mikronukleus. Makronukleus přitom řídí životní (vegetativní) procesy (pohyb, metabolismus), kdežto mikronukleus se účastní procesu konjugace, při němž dochází k vzájemné výměně genetického materiálu mezi dvěma jedinci. Pohybovými organelami jsou primárně cilie (brvy), homologické s bičíky, které mohou být modifikovány a vzájemně spojovány např. v membranely. Nálevníci žijí většinou volně, ale vyvinuly se i formy parazitické a komenzální (Smrž, J. a kol.; 2004).

Mezi základní znaky nálevníků patří: řasinky, dále pelikula, která je značně silná, tvořená dvojitou membránou. Ta nese pravidelně rozmístěné pohybové organely, řasinky, které se svou stavbou podobají bičíkům.

V silné pelikule jsou zeslabená místa, kterými nálevníci přijímají potravu a vylučují ji, tzv. buněčná řiť a ústa. V pelikule jsou drobné trichocysty (organely obsahující látky s charakterem buněčných jedů).

Mezi nejznámější nálevníky patří druhy rodu *Paramecium* (trepka), *Colpidium* (bobovka), *Glaucoma* (vejcovka), *Vorticella* (vířenka), *Suctorina* (rounatky), *Entodiniomorpha* (bachořci), aj (Papáček, M. a kol.; 2000).

Ciliophora se dělí na dvě třídy, a to na Ciliata (nálevníci) a Suctorina (rounatky) (Vojtková, L.; 1988).

Třída: Ciliata (Nálevníci)

Nálevníci mají různý tvar těla, nejčastěji však oválný nebo kulatý. Velikost těla je různá, kolísá většinou od 0,3 mm do 1 mm, může být ale i větší. Z hlediska fylogenetického vývoje patří nálevníci mezi nejpokročilejší skupinu prvoků, čemuž odpovídá i poměrně složitá stavba jejich těla. Cytoplasma je vždy zřetelně rozdělena na dvě vrstvy, vnější – ektoplasmu (cortex) a vnitřní endoplasmu. Ektoplasma vytváří na povrchu elastickou pelikulu.

Na povrchu mají nálevníci brvy, které začínají v ektoplasmě bazálním tělískem. Počet brv se u nálevníků liší, primitivnějším rysem je, když jsou brvy po celém povrchu těla, kdežto brvy, které se koncentrují na určité části těla nebo se spojují do větších útvarů, svědčí o vývojově pokročilejší skupině. Dále mohou být v ektoplasmě ochranná tělíška – trichocysty. Jsou to krátké, tyčinkovité útvary, které po podráždění živočicha vystřelují dlouhé vlákno, díky němuž se do těla oběti přenášejí jedovaté látky.

Skoro všichni nálevníci mají dobře vyvinuté orgány přijímání potravy – jsou to buněčná ústa, kterými prvok přijímá potravu. Ta je po přijetí v ústech a hltnu součástí potravní vakuoly, která se kolem ní vytvoří. Potravní vakuola putuje endoplasmou tělem prvoka a zbytky jsou pak vyvrženy buněčnou řítí ven.

V endoplasmě mají nálevníci velký makronukleus a menší mikronukleus, jež se liší funkcí. Rozmnožování prvoků je pohlavní i nepohlavní.

Nálevníci žijí volně v mořích nebo ve sladkých vodách. Způsob jejich života je různý. Třída Ciliata má čtyři řády: Holotricha (stejnobrví), Spirotricha (pásmobrví), Entodiniomorpha (bachořci) a Peritricha (kruhobrví) (Vojtková, L.; 1988).

Řád: Holotricha (Stejnobrví)

Stejnobrví nálevníci mají brvy po celém těle nebo alespoň na břišní straně. Většina žije volně na dně vod nebo v planktonu ve volné vodě, někteří jsou cizopasníci. Okolo úst nemají nikdy membranely. Živí se bakteriemi, drobnými řasami, drobným zahnívajícím detritem. Někteří jsou draví.

Nejdůležitější zástupci jsou: *Paramecium caudatum* (trepka velká), *Tetrahymena* (vejcovka), *Colpidium* (bobovka), *Ichthyophthirius multifiliis* (kožovec rybí), *Chilodonella cyprini* (čepelenka rybí) (Vojtková, L.; 1988).

Druh: *Tetrahymena pyriformis*, Ehr.

Mezi prvoky je *Tetrahymena pyriformis* nejvíce používaným řasinkovým modelem v laboratorním výzkumu. Je charakterizována krátkým životním cyklem, který dovoluje jednoduchou kultivaci ve vhodných laboratorních podmínkách. Toxické efekty substancí mohou být také testovány na několika generacích. *Tetrahymena pyriformis* byl první prvok, který byl kultivován axenicky v definovaném médiu. Všechny tyto vlastnosti mohou vysvětlovat četné studie, které byly provedeny s tímto organismem, ve fyziologickém, biochemickém výzkumu a také ve farmakologickém a toxikologickém výzkumu.

Tělo prvoka *Tetrahymena pyriformis* je obecně 50 – 60 µm dlouhé, 30 µm široké a má tvar podobný hrušce. Jsou možné různé modifikace těla ve starých nebo stresovaných kulturách. U prvoka *Tetrahymena pyriformis* jsou obvyklé tyto cytoplazmatické orgány: mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, ribosomy, peroxisomy a lysozomy. Jejich struktura odráží fyziologický stav buňky. Během hladovění, ve stacionární fázi nebo v odpovědi na určitou léčbu se v buňce objevují strukturální změny.

Je jasné, že mnoho strukturálních změn organel jsou citlivými indikátory fyziologického stavu prvoka *Tetrahymena pyriformis* a mohou být použity k vytváření jednoduchého modelu ke studování toxicity mnoho substancí (Sauvant, M.P. a kol.; 1999).

Vejcovka žije kosmopolitně ve sladké vodě, často se objevuje ve vodě obsahující rostlinný nebo živočišný materiál, ve kterém začal bakteriální rozklad. Zejména se vyskytuje ve vodě znečištěné hnojem (Bick, H.; 1972).

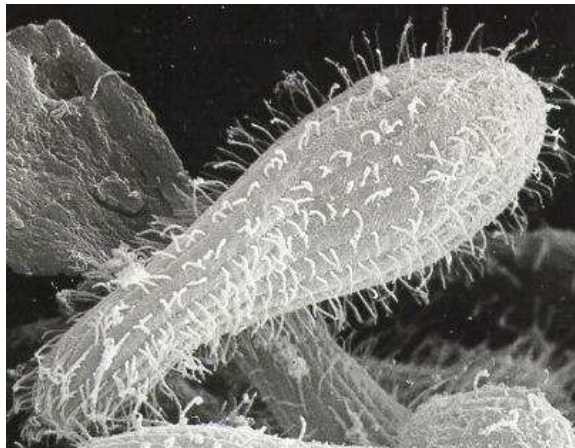
Tento nálevník se živí bakteriemi. Byl vypěstován v čisté kultuře a slouží jako pokusný objekt při biochemických a farmakologických zkouškách (Vojtková, L.; 1988).

Máme několik druhů rodu *Tetrahymena*: *T. americanis*, *T. australis*, *T. borealis*, *T. canadensis*, *T. capricornis*, *T. cosmopolitanis*, *T. hyperangularis*,

T. pigmentosa, *T. pyriformis*, *T. thermophila*, *T. tropicalis*, *T. vorax* (Hausmann, K. a kol.; 2003).

Zatímco *Tetrahymena pyriformis*, která je držena v laboratořích přes 40 let, je amiconukleoidní a neschopná sexuální reprodukce, vyšší teplotu tolerující *Tetrahymena thermophila*, jako většina nálevníků vlastní zárodečný diploidní mikronukleus, což umožňuje genetickou výměnu. Aby se popsaly toxické efekty na těchto jednobuněčných organismech, tak se většina studií odkazuje na zhoršení běžných konečných výsledků (end pointů) buněčné proliferace, dýchání nebo buněčné životaschopnosti. Růstová hodnocení v tomto kontextu jsou provedena za axenických podmínek, na proteinech založených nebo syntetických médiích nebo v médiích s bakteriemi jako jediným zdrojem potravy (Pauli, W. a kol.; 1997).

Obr. č. 5: *Tetrahymena pyriformis* (zdroj: <http://biology.bard.edu>)



2.4.3. *Thamnocephalus platyurus*, Packard

Taxonomické zařazení:

Říše: Animalia (Živočichové)

Kmen: Arthropoda (Členovci)

Třída: Branchiopoda (Lupenonožci)

Řád: Anostraca (Žábronožky)

Čeleď: Thamnocephalidae

Rod: *Thamnocephalus* (Sedlák, E.; 2003)

Říše: Animalia (Živočichové)

Kmen: Arthropoda (Členovci)

Velikost zástupců se pohybuje od méně než 1 mm až po 60 cm. Počet druhů je okolo 1 milionu.

Členovci jsou článkovci s výrazným sdružováním stejnocenných článků a s článkovanými končetinami. Tělo je kryto mnohavrstevnou kutikulou, která obsahuje chitin. Kutikula je několikrát za život svlékána, protože brání růstu.

Končetiny jsou dvouvětevné nebo jednovětevné.

Nervová soustava je tvořena gangliem.

Cévní soustava vždy otevřená.

Výchozí typ dýchacích ústrojí jsou žábry. S vystoupením na souš souvisí vznik plicních vaků a vzdušnic.

Členovci jsou většinou gonochoristé (Buchar, J.; 1991).

Třída: Branchiopoda (Lupenonožci)

Je charakterizována mnohočlánkovým trupem a tzv. thorakofagií, tedy užíváním trupových končetin k příjmu potravy. Jejich dvojitěvětvené plovací nohy se mění v mnohovětevné končetiny s filtračními hřebínky na vnitřní straně a mění se v lupenité struktury (Zrzavý, J.; 2006).

Řád: Anostraca (Žábronožky)

Žábronožky jsou poměrně velké (5,5 – 136 mm), měkké, protáhnuté lupenonožky (tvarem připomínající malou rybu), s rovnoměrně článkovaným tělem, které se skládá z hlavy, hrudi a zadečku. Jsou vždy bez jakékoliv schránky.

Hlava nese tenká jednočláneková tykadla, pár velkých stopkatých složených očí, mohutná tykadla jeví velmi výrazný sexuální dimorfismus a na její spodní straně ústní ústrojí: velké horní rty, nápadná hryzadla, spodní rty a dva páry nenápadných čelistí – čelistí 1.páru a čelisti druhého páru.

Hrud' je 11-článeková. Každý článek nese na břišní straně pár listovitých nohou, které jsou na koncích hustě obrvené a slouží k plavání a cezení potravy.

Zadeček, původně 9 - článkový, je bez nohou. Jeho první dva (tzv. genitální) články nesou na břišní straně u samic nepatrný vejcový vak, u samců pářící penisy.

Poslední článek nese po bocích distální strany pár koncových přívěsků (Brtek, J.; 2005).

Pohybovým orgánem žábřonožek jsou exopodity hrudních nožek.

Žábřonožky se živí částicemi detritu, rostlin a živočichů, které jsou odfiltrovány z vody činností hrudních končetin.

Dýchání probíhá na výběžcích hrudních nožek.

Žábřonožky jsou představitelé gonochoristů (Lellák, J. a kol.; 1982).

Čeleď: *Thamnocephalidae*

Rod: *Thamnocephalus*

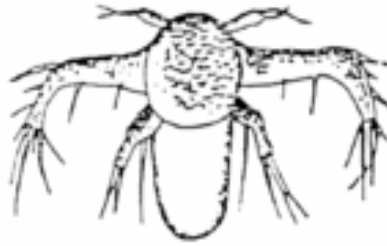
Charakteristiky tohoto rodu, který založil Packard, jsou: zadeček končící rozšířeným lalokem, hlava nesoucí stromovitý přední lalok u samců (u samic chybí) a endity thoracopod jsou širší a více zaoblené než u jiných druhů.

Dnes obsahuje rod *Thamnocephalus* tři druhy (zaznamenáno z USA): *Thamnocephalus platyurus* Packard, 1877 (vyskytují se v centrální a západní části USA a v severním Mexiku), *T. mexicanus* Linder, 1941 (z Arizony a jižního Texasu k severnímu Mexiku) a *T. Venezuelensis* (od Zulia a Falcon, Venezuela).

V současnosti byl objeven nový druh *Thamnocephalus salinarum* pocházející z dočasně zakalených, slaných rybníků v Salinas Grandes v Cordobě, Argentina. Tento nový druh se od ostatních liší nerozvětveným předním přívěskem u samců a párem měkkých tvarem připomínajících srdce vedle penisu vyskytujících se laloků. Liší se tedy sexuálním dimorfním ocasním lalokem připomínajícím ploutvičku. *T. salinarum* by mohl být novým druhem, ale zatím bylo nalezeno jen pět zástupců (Cohen, R. G.; 2002).

Thamnocephalus platyurus je druh korýše, který je součástí zooplanktonu. Jako ostatní korýši přijímá potravu pomocí filtrace vody. Tato filtrace se ovšem snižuje, jestliže je organismus stresován, ať environmentálním faktorem nebo přítomností toxické látky. Právě této vlastnosti se využívá v rychlých testech toxicity (RAPIDTOXKIT).

Obr. č. 6: Druh koryšce *Thamnocephalus platyurus* používaný v miniaturizovaných testech toxicity (zdroj: <http://vydavatelstvi.vscht.cz>).



Obr. č. 7: Jeden z instarů koryšce *Thamnocephalus platyurus* (zdroj: [http://vydavatelstvi.vscht.c](http://vydavatelstvi.vscht.cz)).



3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Testované organismy

3.1.1. Semena *Sinapis alba*, L. - zakoupeno balení s názvem Hořčice bílá, odrůda Veronika.

- původ: OSEVA UNI a. s., Choceň

3.1.2. *Tetrahymena pyriformis*, Ehr. - odebrána zásobní kultura z Katedry parazitologie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze.

3.1.3. *Thamnocephalus platyurus*, Packard – původem z testu Thamnotoxkit.

3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení

3.2.1. Použité chemikálie

Použité léčivé přípravky

Diazepam - SLOVAKOFARMA 5 mg: – držitel rozhodnutí o registraci: Zentiva a.s., Hlohovec

- balení: POR TBL NOB 20X5 MG
- ATC skupina: NO5BA01
- kód SÚKLu: 2477
- léková forma: bílé tablety s půlicí rýhou a číselným označením (2, 5, 10)
- složení: diazepam, lactosum monohydricum, maydis amyllum, solani amyllum, carboxymethylamyllum natrium, želatina, glycerolum, kalcii stearas (MV AISLP - ČR 2010.2).

Standard účinné látky

Diazepam – dodavatel: Dr. Kulich Pharma, s. r. o., HK

Ostatní chemikálie

Dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$

Deionizovaná voda

Zásobní roztok solí – složen ze 4 zásobních roztoků:

a) 117,6 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$10 ml

b) 49,3 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$1 ml

c) 25,9 g $NaHCO_3$1 ml

d) 2,3 g KCl1 ml

těchto 13 ml se doplní do 1000 ml deionizovanou vodou a vznikne standardní médium. Složení zásobního roztoku solí odpovídá požadavkům ČSN EN ISO 7346 - 2 (757761) a ČSN EN ISO 6341 (757751).

3.2.2. Pomůcky

Laboratorní lžičky

Zkumavky

Stojan na zkumavky

Eppendorfovy zkumavky

Plastové destičky

Kádinky

Váženky

Lihové fixy

Mikropipety

Podložní sklíčka

Filtrační papír

Ochranné rukavice

Parafilmy

Černý papír

3.2.3. Přístroje

Analytické váhy

Vortex

Ultrazvuková lázeň

Lednice

Mikroskop

Reader

Laminár

Počítač

Inkubátor

3.3. Vlastní provedení experimentů

3.3.1. Test toxicity na semenech *Sinapis alba*, L.

Připravili jsme si několik koncentrací diazepamů léčiva, standardu diazepamů a dichromanu draselného (standardně testovaná látka) naředěním pomocí standardního média. Těmito koncentracemi jsme navlhčili filtrační papíry vložené do Petriho misek. Do každé misky jsme rovnoměrně umístili pinzetou po 10 pečlivě vybraných semen horčice bílé. Zároveň jsme ještě provedli kontroly, kde se místo chemikálií použilo standardní médium. Všechny Petriho misky jsme kultivovaly po dobu 72 hodin za tmy při teplotě 20°C.

Po uplynutí uvedené doby jsme spočítali počet vyklíčených semen, u kterých jsme změřili délku kořene. U každé koncentrace se vypočítal aritmetický průměr délky kořenů a inhibice růstu kořene v procentech dle vzorce:

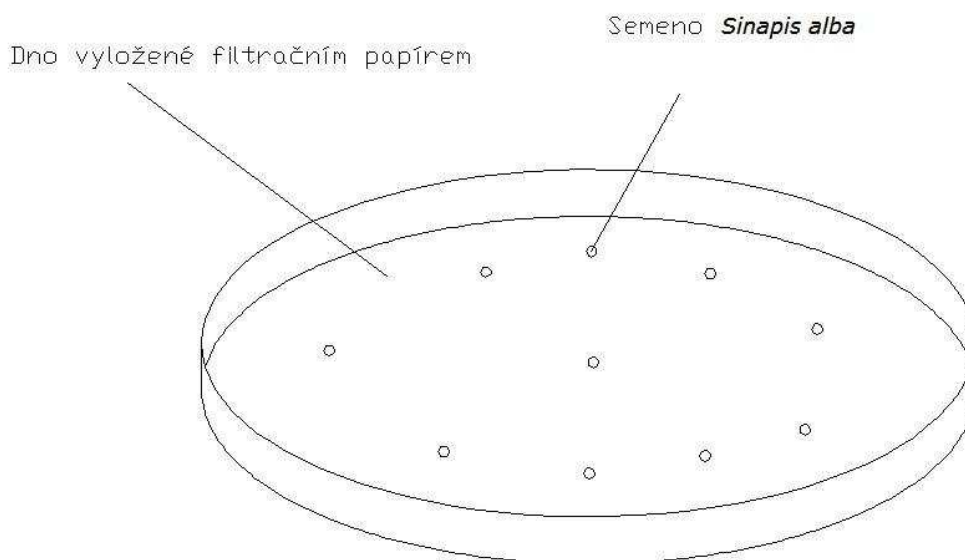
$$I_{\mu} = [(L_c - L_v) \times 100] / L_c$$

I_{μ} ...inhibice růstu kořene v %

L_c ...aritmetický průměr délky kořene v kontrole v mm

L_v ...aritmetický průměr délky kořene v testovaném roztoku v mm

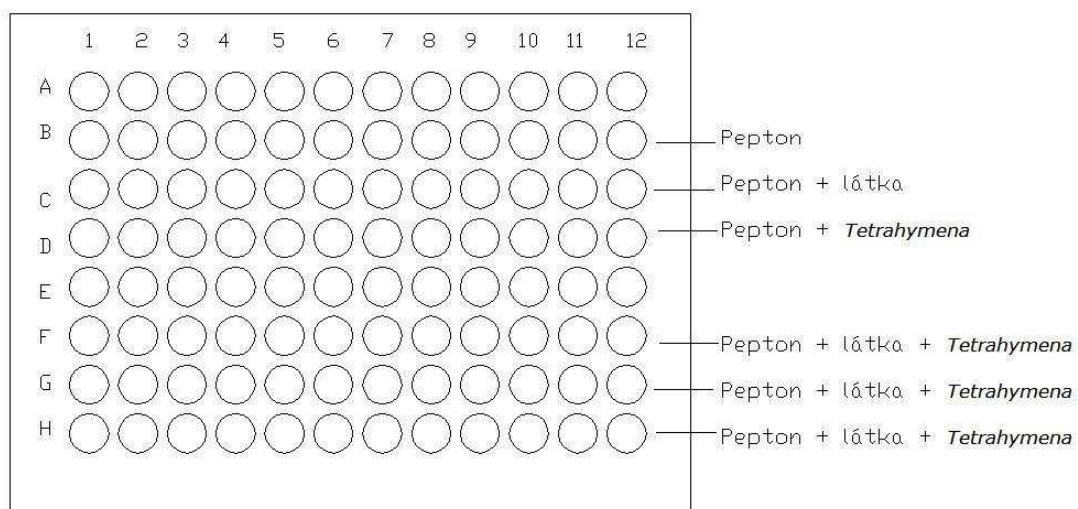
Obr. č. 8: Petriho miska se semeny *Sinapis alba*.



3.3.2. Růstový inhibiční test (vícegenerační)

Připravili jsme si několik koncentrací diazepamu léčiva, standardu diazepamu a dichromanu draselného pomocí deionisované vody. Do mikrotitračních destiček jsme v laminárním boxu dle schématu postupně pipetovali pepton, testovanou látku (nebo standard či standardní toxin) a prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Po dokončení schématu jsme následně změřili optickou hustotu v readeru při určité vlnové délce a vše nechali kultivovat v inkubátoru za tmy. Po uplynutí 24 hodin se znovu změřila optická hustota při stejné vlnové délce. Ze změřených hodnot se vypočetl růst nebo inhibice prvoka *Tetrahymena pyriformis* za 24 hodin a její procentuální inhibice, případně stimulace.

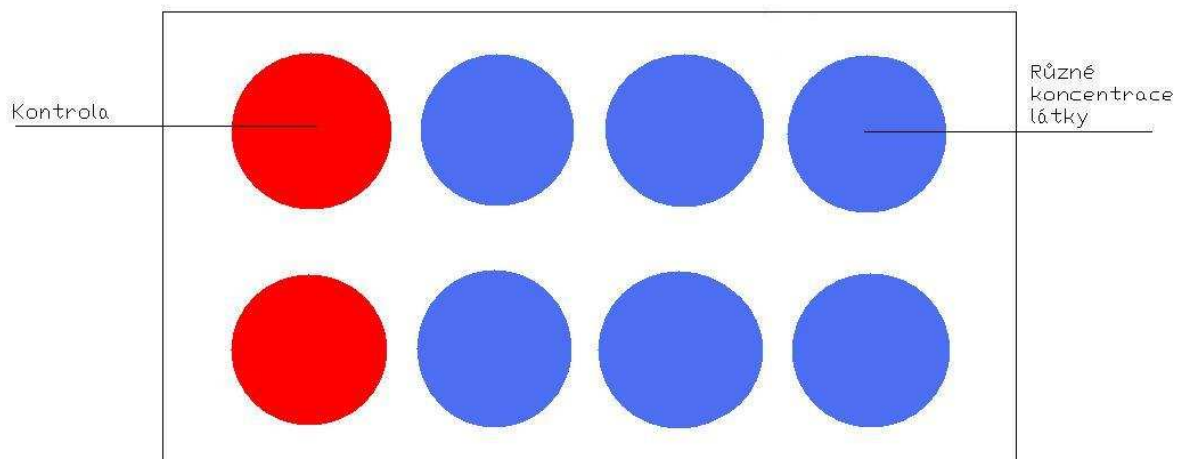
Obr. č. 9: 96 - jamková mikrotitrační destička se schématem.



3.3.3. Rapidtookit

U tohoto testu jsme si nejprve nechali vylíhnout organismus *Thamnocephalus platyurus* z cyst dle postupu uvedeném v manuálu testu. Larvy musely mít vyvinutý trávicí trakt, avšak zároveň nesměly být starší než 45 hodin v době provedení testu. Připravili jsme si koncentrace diazepamů léčiva a diazepamu standardu naředěním pomocí standardního média. Těmito koncentracemi jsme naplnili zkumavky do objemu 4,5 ml a následně jsme přidali mikropipetou 0,5 ml vylíhnutých larev (kontroly obsahovali 4,5 ml standardního média a 0,5 ml larev organismu). Všechny zkumavky jsme uzavřeli zátkou a po 1 hodinu nechali působit testované látky. Po uplynulé době jsme do zkumavek přidali kapku suspenze červených mikrosfér a nechali jsme zkumavky stát dalších 15 minut. Pak jsme do každé zkumavky přidali fixační roztok a po 5 minutách jsme spočítali množství uhynulých larev.

Obr. č. 10: Schéma provedení Rapidtoxkitu



4. VÝSLEDKY

4.1. Výsledky testů na semenech *Sinapis alba*, L.

Experimentální podmínky: 20°C, tma

Délka trvání testu: 72 hodin

Tab. č. 2: Použité koncentrace diazepamů léčiva a standardu diazepamů (mg/l).

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
1500,00	750,00	375,00	187,5	93,75	46,88	23,44

Během 3 opakování tohoto testu byly zjištěny následující průměrné hodnoty:

Tab. č. 3: Průměrná délka kořene (mm).

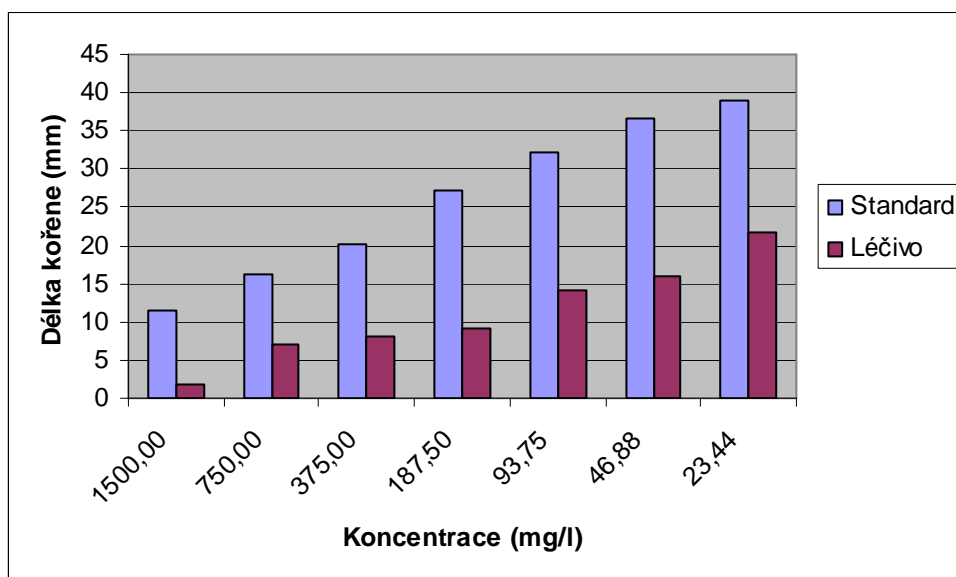
Průměr	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Standard diazepamů	11,60	16,29	20,17	27,33	32,17	36,57	39,00
Tableta diazepamů	1,71	7,00	8,13	9,20	14,14	15,83	21,83

Tab. č. 4: Inhibice růstu kořene v procentech.

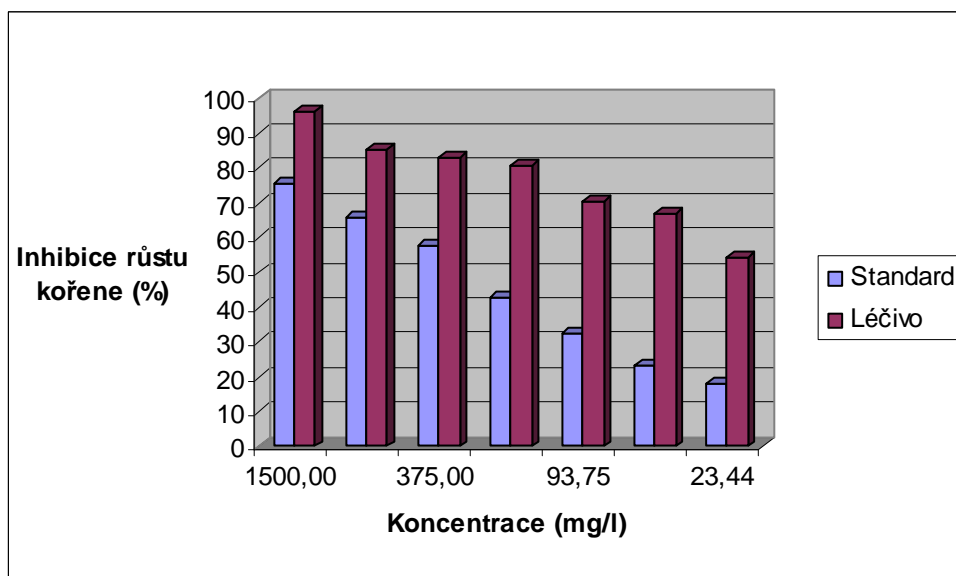
Průměr	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Standard diazepamů	75,66	65,83	57,68	42,64	32,50	23,26	18,16
Tableta diazepamů	96,40	85,31	82,95	80,69	70,32	66,78	54,18

Byly získány tyto statistické hodnoty: hodnota IC_{50} (72 hod) pro dichroman draselný 13,65 mg/l (interval spolehlivosti 10,41 – 17,9 mg/l), hodnota IC_{50} (72 hod) pro standard diazepamů 171,6 mg/l (interval spolehlivosti 144,5 – 203,9 mg/l). Statistickou hodnotu IC_{50} pro tabletu diazepamů nelze spočítat, protože při nejmenší koncentraci tablety byla inhibice růstu kořene více jak 50%.

Graf č. 4: Vliv koncentrací diazepamu u standardu a léčiva na délku kořene hořčice bílé.



Graf č.5: Vliv koncentrace diazepamu u léčiva a standardu na inhibici růstu kořene.



Jak je vidět z těchto dvou grafů, tak léčivo působilo vždy větší inhibici než samostný standard. Z tohoto lze tedy usoudit na možný inhibiční vliv některých pomocných látek v tabletě.

4.2. Výsledky růstového inhibičního testu

Experimentální podmínky: 25°C, tma, vlnová délka: 562 nm

Délka trvání testu: 24 hodin

Tab. č. 5: Použité koncentrace diazepamů léčiva a standardu diazepamů (mg/l).

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
1500,00	750,00	375,00	187,50	93,75	46,88	23,44	11,72	5,87	2,93

Experiment byl 3x ověřován.

Tab. č. 6: Průměrné hodnoty optické hustoty u standardu diazepamů.

Koncentrace	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	kontrola
<i>Tetrahymena</i> p. v čase 0 hod	0,022	0,019	0,022	0,020	0,021	0,019	0,019	0,021	0,021	0,023	0,019
<i>Tetrahymena</i> p. v čase 24 hod	0,132	0,173	0,180	0,186	0,193	0,196	0,201	0,214	0,220	0,230	0,231

Tab. č. 7: Průměrné hodnoty optické hustoty u tablety diazepamů.

Koncentrace	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	kontrola
<i>Tetrahymena</i> p. v čase 0 hod	0,019	0,019	0,018	0,019	0,021	0,020	0,022	0,021	0,020	0,020	0,020
<i>Tetrahymena</i> p. v čase 24 hod	0,088	0,115	0,153	0,178	0,228	0,240	0,251	0,253	0,253	0,257	0,260

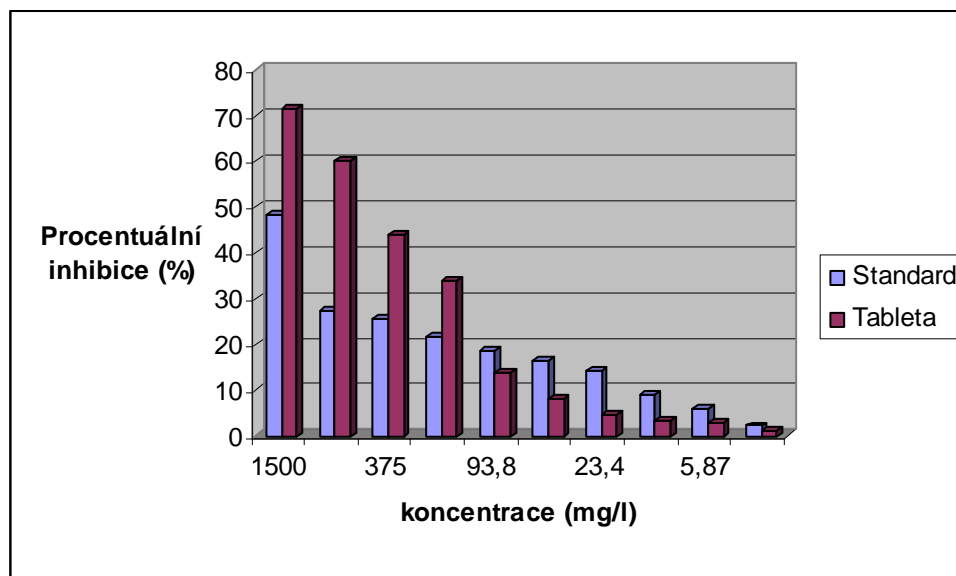
Tab. č. 8: Vypočtená procentuální inhibice.

Koncentrace	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Standard diazepamů	48,11	27,36	25,47	21,70	18,87	16,51	14,15	8,96	6,13	2,36
Tableta diazepamů	71,25	60,00	43,75	33,75	13,75	8,33	4,58	3,33	2,92	1,25

Statisticky byly získány následující hodnoty: hodnota IC₅₀ (24 hod) pro dichroman draselný 20,82 mg/l (interval spolehlivosti 17,27 – 25,11 mg/l), hodnota IC₅₀

(24 hod) pro léčivo s obsahem diazepamu 507,9 mg/l (interval spolehlivosti 476,7 – 541,1 mg/l) a hodnota IC_{50} (24 hod) pro standard diazepamu 3397 mg/l (interval spolehlivosti 2267 – 5091 mg/l).

Graf č. 6: Porovnání procentuální inhibice růstu u standardu a tablety diazepamu.



4.3. Výsledky testů Rapidtoxkit

Experimentální podmínky: 25°C, souvislé osvětlení 3000 – 4000 luxů

Délka trvání testu: 60 minut

U testu s korýšem *Thamnocephalus platyurus* byly ze 3 opakování získány následující průměrné hodnoty:

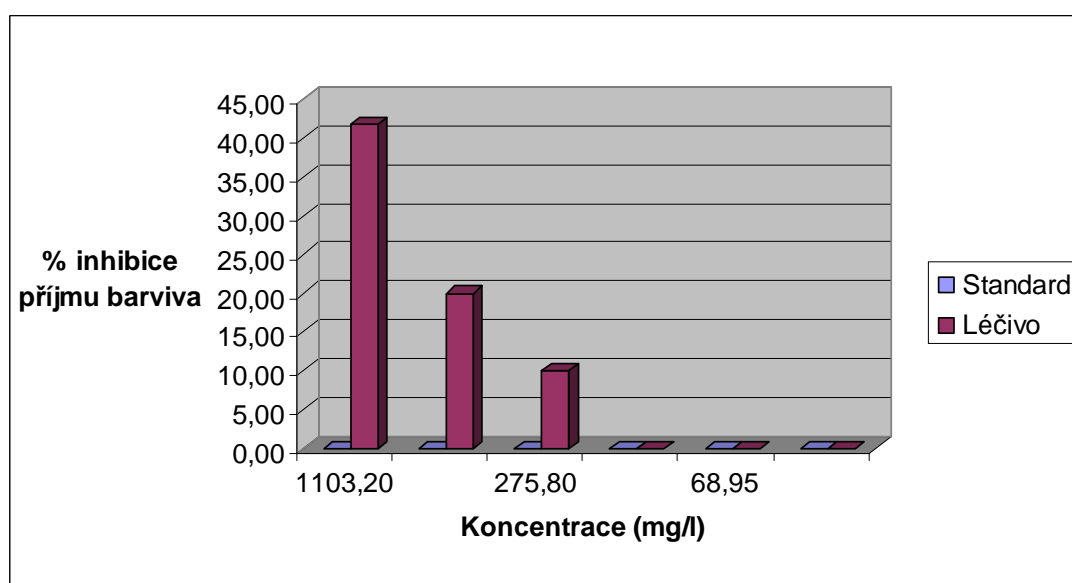
Tab. č. 9: Standard diazepamů.

Koncentrace (mg/l)	Celkový počet			% živých organ.	% inhibice příjmu barviva
		mrtví	živí		
1103,20	16	0	16	100,00	0,00
551,60	17	0	17	100,00	0,00
275,80	16	0	16	100,00	0,00
137,90	9	0	9	100,00	0,00
68,95	9	0	9	100,00	0,00
34,48	15	0	15	100,00	0,00
Kontrola	7	0	7	100,00	0,00

Tab. č. 10: Tableta diazepamu.

Koncentrace (mg/l)	celkový počet			% živých organ.	% inhibice příjmu barviva
		mrtví	živí		
1103,20	12	5	7	58,33	41,67
551,60	10	2	8	80,00	20,00
275,80	10	1	9	90,00	10,00
137,90	13	0	13	100,00	0,00
68,95	7	0	7	100,00	0,00
34,48	16	0	16	100,00	0,00
Kontrola	7	0	7	100,00	0,00

Graf č. 7: Porovnání vlivu koncentrací diazepamu (standard a léčivo) na procentuální inhibici příjmu barviva.



5. DISKUZE

Až donedávna se věnovalo málo pozornosti vlivu léčivých substancí na životní prostředí. Přitom roční expozice některých látek může být velická. Halling-Sørensen a kolektiv uvádí ve svém článku následující zjištěné koncentrace diazepamů v životním prostředí: koncentrace diazepamů v pitné vodě a vodě z řeky okolo 10 ng/l a v odpadních vodách koncentrace menší jak 1 µg/l. V dalším článku od Jonese a jeho týmu se můžeme dočíst, že v Německu byl diazepam detekován v odpadních vodách v koncentraci 40 ng/l. Fent a kolektiv ve své práci uvádí, že v Německu byl diazepam zjištěn v 8 ze 20 čistíren odpadních vod v relativně malé koncentraci do 0,04 µg/l, zatímco v Belgii byla naměřena koncentrace až do 0,66 µg/l.

Na počátku naší práce jsme si zvolili počáteční nejvyšší koncentraci léčiva a standardu 1 500,00 mg/l (tato hodnota je taková, protože jsme na začátku práce počítali s molární koncentrací). Jako první z testů jsme si zvolili test se semeny *Sinapis alba*, následovaný vícegeneračním inhibičním testem s prvokem *Tetrahymena pyriformis*. Bohužel u třetího a zároveň posledního testu jsme zjistili, že koncentraci užitou u hořčice bílé a testu s prvokem není možné převést na test s korýšem *Thamnocephalus platyurus*, jelikož první koncentrace tablety byla velmi bílá a korýš tudíž nebyl vidět. Z tohoto důvodu jsme si zvolili koncentraci nižší, a to 1 103,20 mg/l. Při této koncentraci byla situace lepší, i když ne zrovna ideální.

Zároveň jsme měli i problémy s rozpustností testované látky. Jak u standardu, tak i léčiva nedocházelo k úplnému rozpuštění, a tak jsme pracovali se suspenzí. Možnou filtraci jsme nepoužili z důvodu velké absence testované látky.

Při testování vlivu diazepamů na semena hořčice bílé jsme zjistili, že tableta působí větším inhibičním efektem než standard, což je zřejmě dáno pomocnými látkami obsaženými v tabletě. Nejvyšší inhibice růstu kořene byly zaznamenány při nejvyšší koncentraci, a to pro tabletu 96,4% a pro standard 75,66%.

Ani u testu s prvokem *Tetrahymena pyriformis* nebyla situace jiná. Tableta působila větším efektem (při nejvyšších koncentracích) na inhibici růstu než standard. Při nejvyšší koncentraci byla u tablety vypočítána inhibice 71,25%, u standardu 48,11%.

U posledního prováděného testu – testu s korýšem *T. platyurus* jsme opět zjistili větší inhibiční vliv tablety. V tomto testu ani při nejvyšší koncentraci standardu nedocházelo k úmrtí korýšů, kdežto u tablety byl zaznamenán inhibiční vliv u prvních tří koncentrací.

Skupina okolo Nunese (2005) hodnotila akutní toxicitu diazepam (klofibrátu, kyseliny klofibrové a dodecylsulfátu sodného) na vodních organismech *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* a *Tetraselmis chuii*. Při růstovém řasovém inhibičním testu trvajícím 96 hod. (*T. Chuii*) byl diazepam použit v těchto koncentracích: 7,9; 11,85; 17,78; 26,67 a 40 mg/l, u 48 hodinového testu s korýšem byly koncentrace diazepam: 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 mg/l a v 96 hodinovém testu s *G. Holbrooki* byly koncentrace následující: 5,21; 7,29; 10,2; 14,28 a 20 mg/l. U testů byly získány následující hodnoty diazepam IC_{50} = 16,5 mg/l pro *T. chuii*, LC_{50} = 12,2 mg/l pro *A. parthenogenetica* a hodnota LC_{50} = 12,7 mg/l pro *G. holbrooki*. Diazepam se ze všech čtyř látek ukázal jako nejtoxičtější pro *T. chuii* a *A. parthenogenetica*. U *G. holbrooki* byla jako nejtoxičtější látka shledán klofibrát a na druhém místě diazepam. Tyto výsledky tedy shledávají diazepam jako ne zrovna zanedbatelnou látku ve vodním prostředí.

Cílem dalšího provedeného testu od Nunese a kolektivu (2008) bylo zjistit vliv diazepam (klofibrátu, kyseliny klofibrové a SDS – dodecylsulfát sodný) na parametry oxidačního stresu u *G. holbrooki*. Enzymatické biomarkery oxidačního stresu se měřily v jaterní a žaberní tkáni. Také se hodnotila peroxidace lipidů a oxidační stav glutathionu. Z důvodu inhibičního vlivu diazepam na centrální nervový systém se také hodnotilo chování ryb. Počáteční koncentrace pro diazepam byly následující: 4,26; 5,11; 6,13; 7,36 a 8,83 mg/l. Získané výsledky vykazovaly celkově sníženou odezvu na oxidační stres způsobené diazepamem (a i u SDS). Diazepam navíc způsoboval viditelné změny v chování, zvířata měla tmavou pigmentaci, dále vykazovala lethargii a zvláštní pohyby těla.

Tým okolo Nunese (2006) pracoval na dalším obdobném případě, a to s organismem *Artemia parthenogenetica*. Zde byl opět hodnocen vliv diazepam a dalších látek (klofibrát, kyselina klofibrová a SDS) na parametry oxidativního stresu – GPx (glutathion peroxidáza), Gred (glutathion reduktáza), SOD (superoxiddismutáza), GSTs (glutathion – S - transférázy) a na TBARS (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou) a ChE (cholinesteráza). Počáteční koncentrace byly: 4,07; 4,89; 5,86; 7,04 a 8,44 mg/l pro diazepam. Výsledkem bylo

zjištění, že diazepam způsoboval významné snížení aktivity ChE při dvou nejvyšších koncentracích; významné zvýšení celkových GPx aktivit a významné snížení obsahu TBARS při koncentraci 7,04 mg/l.

Mohamed Hassan Mourad (1992) hodnotil vliv diazepamu na kardiovaskulární a respirační systém úhoře (*Anguilla anguilla*). Pomocí elektrod bylo snímáno jejich EEG a z něho byla vypočtena tepová frekvence, zatímco frekvence dýchání byla vypočtena pomocí počítání mandibulárních pohybů. Každý úhoř v akváriu byl individuálně podroben koncentraci 5 mg/l diazepamu ve 20 litrech dechlorované vody z hohoutku a byly zaznamenávány změny ve vlnové amplitudě, srdeční a dechové frekvenci. Největší efekty byly pozorovány prvních 30 minut – docházelo k menšímu snížení v tepové a dýchací frekvenci, avšak po 60 minutách docházelo ke zvýšení frekvencí téměř na shodné hodnoty, jaké měly kontroly. Ve vlnové amplitudě docházelo během 60 minut ke snížení hodnot QRS a T vln. Avšak po statistickém zpracování byly shledány tyto změny jako nevýznamné.

Lilius (1995) a jeho kolektiv testovali diazepam (a i další chemikálie) na čerstvě izolovaných žaberních epitelálních buňkách pstruha duhového. Izolací získané buňky byly dány do vhodného inkubačního pufru, který obsahoval různé koncentrace testované látky. Po nějaké době byl přidán Calcein – AM (acetoxymethylester Calceinu) rozpuštěný v DMSO (dimethylsulfoxid) a po 30 minutách se měřila intenzita emise pomocí fluorescenčního spektrofotometru. Pro stanovení hodnoty EC₅₀ měla testovaná látka nejméně 5 koncentrací a experiment byl opakován minimálně třikrát. Hodnota EC₅₀ byla vypočítána pomocí regresní analýzy. Zjištěná hodnota EC₅₀ pro diazepam byla okolo 0,37 mM.

David Pascoe a kol. (2003) zkoumali vliv 10 běžně předepisovaných léčiv v UK – mezi nimi byl i diazepam – za použití žahavce *Hydra vulgaris*. Žahavce kultivovali v laboratorních podmínkách (Lenhoff, H. M.; 1983). Pracovalo se se standardy účinných látek, aby se zabránilo komplikacím díky dalším složkám obsažených v komerčních přípravcích. Počáteční koncentrace látek byly 10, 100 µg/l, 1 a 10 mg/l. Tým zkoumal akutní i chronickou toxicitu.

Při akutním testu se hodnotil mikroskopicky morfologický stav polypa. Kdežto v chronickém testu (pracovalo se s žahavci, kteří přežili akutní toxicitu) se hodnotilo, zda jejich schopnost příjmu potravy a pučení nebyla poškozena. U všech žahavců, kteří byly vystavení koncentraci 10 µg/l hodnocených látek, se po

akutním testu a testování, zda jejich schopnost příjmu potravy a pučení nebyla poškozena, hodnotila mikroskopicky po dobu 72 hodin regenerace jejich trávicí dutiny, která se z těchto žahavců vyňala a přenesla do zkumavky obsahující testovaný roztok. Regenerace se také hodnotila na vyňatých trávicích dutinách žahavců, kteří předtím nebyly vystaveni žádné látce. Zde se trávicí dutiny po vyjmutí vystavily vlivu roztoku testované látky o koncentraci 10 µg/l.

V akutním testu všichni žahavci vystavení vlivu diazepamů přežili kromě koncentrace nejvyšší (10 mg/l), která byla připravena s použitím 10% ethanolu, v kontrolách přežili všichni kromě kontrol s 10% ethanolem. Ovšem u ostatních koncentrací byly pozorovány změny – např. lehce kontrahované tělo, paličkovitá chapadla. U chronického testu nebyl u diazepamů zaznamenán významný pokles příjmu potravy, ani nebyl statisticky významný rozdíl v pučení, ale bylo zjištěno, že u trávicí dutiny žahavce (vystavenému vlivu diazepamů po dobu akutního a chronického testu) nedocházelo k její regeneraci a u trávicí dutiny žahavce, který nebyl předtím vystaven vlivu diazepamů, byla patrná také inhibice regenerace.

6. ZÁVĚR

V této práci jsme si za cíl vytyčili zhodnotit vliv diazepamů na životní prostředí a získat jeho ekotoxikologická data. Jako zástupce léčivých přípravků s obsahem diazepamů jsme si zvolili Diazepam – SLOVAKOFARMA 5 mg a jako standard diazepam získaný od firmy Dr. Kulich Pharma s.r.o.

Vybrali jsme tři testy akutní toxicity, které zastupují jednotlivé trofické úrovně – producent, konzument, destruent.

V testu se semeny hořčice bílé (*Sinapis alba*) jsme hodnotili vliv diazepamů na inhibici růstu kořene. Do Petriho misek vyložených filtračním papírem nasyceným suspenzí léčiva nebo standardu jsme vložili pečlivě vybraná semena a nechali je kultivovat 72 hodin ve tmě při teplotě 20°C. Současně se provedly kontroly se semeny kultivovanými pouze ve standardním médiu a referenční test toxicity se standardním toxinem. Zjistili jsme, že vysoká inhibice byla dosažena při všech testovaných koncentracích u tablety, přičemž při nejnižší koncentraci, tj. 23,44 mg/l, byla dosažena inhibice více jak 50 - ti procentní.

Korýše *Thamnocephalus platyurus* jsme testovali pomocí testu Rapidtoxkit. U tohoto testu jsme si připravili koncentrace standardu a léčiva. Do jednotlivých zkumavek se standardem a léčivem jsme přidali vylíhlé larvy, které měly vyvinutý trávicí trakt. Po jedné hodině působení látek jsme přidali červené mikrosféry a po čtvrt hodině fixační roztok. Následně jsme spočítali uhynulé larvy a vypočítali procentuální inhibici příjmu potravy. Provedli jsme také kontroly jen za použití standardního média. U všech koncentrací standardu (tj. 1103,20 mg/l až 34,48 mg/l) nedošlo k usmrcení korýšů. U tablety byla situace jiná, a to u prvních tří koncentrací, kde smrt korýšů nastala – 1103,20 mg/l, 551,60 mg/l a 275,80 mg/l. U první koncentrace tablety diazepamů můžeme říci, že látka je potenciálně nebezpečná pro životní prostředí, jelikož způsobila více jak 30% inhibici příjmu potravy.

Experimenty s prvokem *Tetrahymena pyriformis* jsme prováděli v laminárním boxu pomocí 96 – jamkové mikrotitrační destičky, do které jsme postupně pipetovali pepton, látku (léčivo, standard a standardně testovaná látka) a prvoka. Následně jsme v readeru změřili absorbanci a nechali 24 hodin kultivovat při teplotě 25°C za tmy. Po opětovném změření jsme vypočetli procentuální inhibici.

Z experimentů byly získány následující statistické hodnoty: hodnota IC_{50} (24 hod) pro dichroman draselný 20,82 mg/l (interval spolehlivosti 17,27 – 25,11 mg/l), hodnota IC_{50} (24 hod) pro léčivo s obsahem diazepamů 507,9 mg/l (interval spolehlivosti 476,7 – 541,1 mg/l) a hodnota IC_{50} (24 hod) pro standard diazepamů 3397 mg/l (interval spolehlivosti 2267 – 5091 mg/l).

Jako nejcitlivější organismus pro testování diazepamů jsme sledali *Sinapis alba*, tedy její semena.

6.1. Použitá literatura

- Ambrožová, J.: Aplikovaná a technická hydrobiologie. Skriptum Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2003, s. 226.
- Amparado, R. F.; Persoone, G.: THE USE OF ALGAE IN ECOTOXICOLOGICAL TESTING: A REVIEW. *The Philippine Scientist*, **33**, 1996, s. 116 - 147.
- Benda, V.; Babůrek, I.; Žďárský, J.: BIOLOGIE II. Nauka o potravinářských surovinách. Vysoká škola chemicko - technologická, Praha, 2000, s. 195.
- Bick, H.: CILIATED PROTOZOA. An illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. World Health Organization, Geneva, 1972, s. 198.
- Brtek, J.: Fauna Slovenska, Anostraca – žiabronôžky, Notostraca – štítovky, Spinicaudata – škl'abkovky, Laevicaudata – hrachovky (Crustacea: Branchiopoda). VEDA, Bratislava, 2005, s. 143.
- Buchar, J.: STRUČNÝ PŘEHLED ZOOLOGIE BEZOBRATLÝCH. Skriptum Karolinum, Praha, 1991, s. 114.
- Carlsson, C.; Johansson, A.-K.; Alvan, G. a kol.: Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.*, **364**, 2006, s. 67 - 87.
- Cohen, R., G.: Description of a new subgenus and a new species of *Thamnocephalus* (Crustacea: Branchiopoda, Anostraca) from the Salinas Grandes Basin, Córdoba Province, Argentina. *Hydrobiol.*, **486**, 2002, s. 91 – 100.
- Fargašová, A.: Ekotoxikologické biotesty. PERFEKT, Bratislava, 2009, s. 317.
- Fargašová, A.: Enviromentálna toxikológia a všeobecná ekotoxikológia. ORMAN, Bratislava, 2008, s. 350.
- Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D.: Review, Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.*, **76**, 2006, s. 122 – 159.
- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P.F. a kol.: Occurence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review. *Chemosphere*, **36**, 1998, s. 357 – 393.
- Hartl, J.; Palát, K.: FARMACEUTICKÁ CHEMIE I. Skriptum Karolinum, Praha, 1998, s. 107.
- Hartl, J.; Palát, K.; Doležal, M. a kol.: FARMACEUTICKÁ CHEMIE II. Skriptum Karolinum, Praha, 2000, s. 172.

- Hassan Mourad, M.: *CARDIO AND RESPIRATORY RESPONSES IN EEL, ANGUILLA ANGUILLA L. DURING EXPOSURE TO DIAZEPAM. ACTA ICHTHYOL PISCAT.* **22**, 1992, s. 119 - 123.
- Hausmann, K.; Hülsmann, N.; Macheimer, H. a kol.: *Protozoologie*. Academia, Praha, 2003, s. 347.
- <http://analytic.profitux.cz/disertace/horcice.pdf> , staženo 10.10.2009.
- <http://biology.bard.edu/ferguson/>, staženo 15.12.2009.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Diazepam>, staženo 10.11.2009.
- <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@na+DIAZEPAM>, staženo 30.9.2009.
- http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=M018, staženo 16.12.2009.
- <http://www.sukl.cz/spotreba-leciv-v-ceske-republice-v-roce-2008>, staženo 16.12.2009.
- <http://www.sukl.cz/spotreba-leciv-v-ceske-republice-v-roce-2009>, staženo 16.12.2009.
- Jahodář, L.: *FARMAKOBOTANIKA – semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 2006, s. 258.
- Jjemba, P. K.: Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **63**, 2006, s. 113 - 130.
- Jones, O. A. H.; Noulvoulis, N.; Lester, J. N.: *HUMAN PHARMACEUTICALS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT A REVIEW. Environ. Technol.*, **22**, 2001, 1383 – 1394.
- Kincl, L.; Kincl, M.; Jarklová J.: *BIOLOGIE ROSTLIN*. Fortuna, Praha, 2000, s. 255.
- Komínková, D.: *Ekotoxikologie*. Skriptum České vysoké učení technické, Praha, 2008, s. 156.
- Kristen, U.: Use of Higher Plants as Screens for Toxicity Assessment. *Toxicol. in Vitro*, **11**, 1997, s. 181 - 191.
- Kümmerer, K.: *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008, s. 521.

- Lenhoff, H. M.: Culturing large numbers of *Hydra*. In: Lenhoff, H. M. (Ed.), *Hydra Research Methods*. Plenum Press, New York, s. 53 – 62.
- Lellák, J. a kol.: BIOLOGIE VODNÍCH ŽIVOČICHŮ. Skriptum Univerzita Karlova, Praha, 1982, s. 220.
- Lilius, H.; Sandbacka, M.; Isomaa, B.: The Use of Freshly Isolated Gill Epithelial Cells in Toxicity Testing. *Toxic. in Vitro*, **9**, 1995, s. 299-305.
- Lincová, D.; Farghali, H. a kol.: ZÁKLADNÍ A APLIKOVANÁ FARMAKOLOGIE. Galén, Praha, 2007, s. 672.
- Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE. Grada Publishing, Praha, 2004, s. 725.
- MEDICAL TRIBUNE BREVÍŘ 2009. MEDICAL TRIBUNE CZ ve spolupráce s INPHARMEX, Praha, 2009, s. 1179.
- Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ ČESKÉ REPUBLIKY, Odbor odpadů, Praha, únor 2007.
- Mikroverze AISLP – ČR 2010.1, stav k 1.1.2010.
- Mikroverze AISLP - ČR 2010.2, stav k 1.4.2010.
- Nunes, B.; Carvalho, F.; Guilhermino, L.: Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **61**, 2005, s. 413 - 419.
- Nunes, B.; Carvalho, F.; Guilhermino, L.: Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, **62**, 2006, s. 581 - 594.
- Nunes, B.; Gaio, A. R.; Carvalho, F. a kol.: Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**, 2008, s. 341 - 354.
- OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201 (2006): Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 211 (2008): *Daphnia magna* Reproduction Test.
- OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 202 (2004): *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 208 (2006):
Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.

Papáček, M.; Matěnová, V.; Matěna, J. a kol.: ZOOLOGIE. Scientia, Praha, 2000, s. 286.

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

Pauli, W.; Berger, S.: TOXICOLOGICAL COMPARISONS OF *Tetrahymena* SPECIES, END POINTS AND GROWTH MEDIA: SUPPLEMENTARY INVESTIGATIONS TO THE PILOT RING TEST. *Chemosphere*, **35**, 1997, s. 1043 - 1052.

Pavlíková, D.; Pavlík, M.; Matějů, L. a kol.: Ekotoxikologie. Skriptum Česká zemědělská univerzita, Praha, 2007, s. 152.

RAPIDTOXKIT – Microbiotest for rapid detection of water contamination, STANDARD OPERATIONAL PROCEDURE. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

Sauvant, M. P.; Pepin, D.; Piccinni, E.: *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*: A TOOL FOR TOXICOLOGICAL STUDIES. A REVIEW. *Chemosphere*, **38**, 1999, s. 1631 – 1669.

Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých. Skriptum Masarykova univerzita, Brno, 2003, s. 337.

Smrž, J.; Horáček, I.; Švátora, M.: BIOLOGIE ŽIVOČICHŮ. Fortuna, Praha, 2004, s. 207.

Svobodová, Z.; Máchová, J.; Beklová, M. a kol.: EKOTOXIKOLOGIE – praktická cvičení, část I. Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity, Brno, 2000, s. 64.

Vojtková, L.: Zoologie bezobratlých I. Protozoa. Skriptum Rektorát UJEP Brno, A. Nováka 1-vlastním nákladem, Brno, 1988, s. 110.

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

www.luirig.altervista.org/schede/ae/sinapis_alba.htm, staženo 12.12.2009.

www.progast.cz/druhy-koreni/?alpha=6, staženo 12.12.2009.

Zrzavý, J.: Fylogeneze živočišné říše. SCIENTIA, Praha, 2006, s. 255.

6.2. Základní pojmy používané v ekotoxikologii

Bioindikátor – organismus (mikroorganismus, prvok, houba, rostlina, nižší či vyšší živočich), který slouží k posouzení toxicity látek nebo působení vnějších podmínek

Biotest – proces, při němž je testovací systém (organismus, populace) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané látky

Dávka – je množství látky přijaté do organismu; zpravidla se vyjadřuje v hmotnostních jednotkách škodliviny vztažených na jednotku tělesné hmotnosti organismu (např. v mg/kg)

DDT (dichlordifenyltrichlormethylmethan) je aromatická halogensloučenina. Je jedním z nejstarších a nejznámějších insekticidů.

ED – efektivní dávka = účinná dávka (*EC* – efektivní koncentrace) udává, jaké procento jedinců testovaného souboru reaguje po expozici sledovanou látkou.

ED₅₀ – efektivní dávka, při které reaguje 50% jedinců souboru. *ED₀* – efektivní dávka, při které nereaguje žádný jedinec testovaného souboru

Doba expozice – je doba, po kterou je organismus vystaven působení sledované látky

Endpoints – parametry, které jsou v testech sledovány a slouží k hodnocení ekotoxicity

Expozice – je vystavení organismu účinkům látky nebo proces vstupu škodliviny do organismu

GABAa receptor – receptor pro kyselinu γ – aminomáselnou (GABA)

LOAEL – nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek (lowest observable adverse effect level)

Monitoring – opakované, většinou dlouhodobé a systematické měření vybraných fyzikálních, chemických i jiných ukazatelů pro zjišťování změn charakteristik prostředí v čase a predikce těchto charakteristik nebo jejich dalšího vývoje

NOAEL – dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek (no observable adverse effect level)

NOEC - nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no-observed effect concentration)

PEC (Predicted Environmental Concentration) - předpokládaná koncentrace látky v životním prostředí

PNEC (Predicted No Effect Concentration) – nejvyšší předpokládaná koncentrace bez škodlivých účinků

Účinek – je odpovědí organismu na expozici látkou. Účinek může být: 1. akutní – bezprostřední po jednorázové dávce toxické látky; 2. chronický – po dlouhodobém styku s látkou. Základním údajem o akutní toxicitě je smrtelná =letální dávka (LD) nebo pro plyny a páry letální koncentrace (LC). Dávka, při níž uhynie 50% sledovaných jedinců, je označována jako LD₅₀. Látka je tím toxičtější, čím nižší je její číselná hodnota LD₅₀. Ze dvou látek je toxičtější ta látka, která má LD₅₀ 1 mg/kg oproti látce, která má LD₅₀ 10 mg/kg. Uvádí se druh testovaného zvířete (myš, krysa, pes atd.) a způsob podání látky (zažívacím, dýchacím ústrojím, na kůži apod.)

Abstrakt

Šilhavá Tereza, Ekotoxikologický screening vybraného léčiva III, (diplomová práce)
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra
farmaceutické botaniky a ekologie, celkový počet stran: 61

V dnešní době se stále více setkáváme s přítomností reziduí léčivých látek v životním prostředí, kde mohou dále ovlivňovat organismy nacházející se v přírodě. V našem experimentu jsme hodnotily ekotoxicitu diazepamu v léčivém přípravku Diazepam 5 mg v porovnání se standardem diazepamu. Při hodnocení toxicity jsme používali následující organismy: prvoka *Tetrahymena pyriformis*, nauplium korýše *Thamnocephalus platyurus* a semena *Sinapis alba*. Ukázalo se, že nejvíce citlivým organismem byla *Sinapis alba*. Při nejvyšší koncentraci tablety diazepamu docházelo až k 96,4 % inhibici růstu kořene.

Klíčová slova: ekotoxikologie, diazepam, *Sinapis alba*, *Tetrahymena pyriformis*, *Thamnocephalus platyurus*

Abstract

Šilhavá Tereza, Ecotoxicological screening of the select drug III, (graduation thesis)
Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology; total number of pages: 61

At the present time, we are increasingly discovering the residue of medical drugs in the environment where they can continue to influence organisms found in nature. In our experiment, we were assessing the ecotoxicity of diazepam found in the medical drug Diazepam 5 mg in comparison with standard diazepam. When evaluating the toxicity, we were using the following organisms: unicellular *Tetrahymena pyriformis*, nauplii of *Thamnocephalus platyurus*, and seeds of *Sinapis alba*. It was revealed that the most sensitive organism was *Sinapis alba*. At the highest concentration of diazepam tablet, root growth was inhibited by up to 96.4%.

Key words: ecotoxicology, diazepam, *Sinapis alba*, *Tetrahymena pyriformis*, *Thamnocephalus platyurus*