

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



Hodnocení toxicity směsi léčiv
Evaluation of drugs mixture toxicity

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

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2015

Mgr. Kateřina Podlipská

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

Datum

Podpis

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

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 063.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Cíl práce	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Ciprofloxacin	8
2.1.1. Struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly	8
2.1.2. Fluorochinolony	9
2.1.3. Mechanismus účinku	10
2.1.4. Rezistence	10
2.1.5. Farmakokinetické vlastnosti	11
2.1.5.1. Absorpce	11
2.1.5.2. Distribuce	11
2.1.5.3. Metabolismus	12
2.1.5.4. Vylučování	14
2.1.6. Léčivé přípravky s obsahem ciprofloxacinu	15
2.2. Ibuprofen	16
2.2.1. Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti molekuly	16
2.2.2. NSAID (Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs)	16
2.2.3. Farmakokinetické vlastnosti	19
2.2.3.1. Absorpce	19
2.2.3.2. Distribuce	20
2.2.3.3. Metabolismus	20
2.2.3.4. Vylučování	21
2.2.4. Akutní toxicita	21
2.2.5. Chronická toxicita	21
2.2.6. Léčivé přípravky s obsahem ibuprofenu	22
2.3. Spotřeba léčiv	25
2.3.1. Spotřeba antibakteriálních léčiv a ciprofloxacinu v ČR	28
2.3.2. Spotřeba NSAID a ibuprofenu v ČR	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1. Testované organismy	32
3.2. Chemikálie, pomůcky, přístroje	32
3.2.1. Chemikálie	32
3.2.2. Pomůcky	32
3.2.3. Přístroje	33
3.3. Provedení experimentu	33
3.3.1. Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	33

4.	VÝSLEDKY	37
4.1.	Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	37
5.	DISKUZE	44
6.	ZÁVĚR	52
7.	SEZNAM LITERATURY	54
	Abstrakt.....	66

1. ÚVOD

V rámci Evropy se v humánní medicíně používá asi 3000 různých látek, z nichž nejrozšířenější jsou především analgetika a protizánětlivé léky, antikoncepce, antibiotika, beta-blokátory, hypolipidemika, neuroaktivní látky a mnoho dalších. Velké množství léčiv se používá také ve veterinární medicíně, zejména antibiotika a protizánětlivé látky. (Fent et al., 2006)

Hlavní cesty kontaminace životního prostředí představují městské, průmyslové a nemocniční odpadní vody, společně s odpadními vodami z akvakultur a zootechnických rostlin. Mnoho nedávných studií ukázalo přítomnost měřitelných koncentrací zhruba 80-100 těchto molekul ve vodním prostředí v rozsahu ng/l až µg/l. (Kümmerer, 2004; Fent et al., 2006)

Relativně nové obavy představují hlavně veterinární léčiva, zejména antibakteriální látky. Většina z nich se může dostat do vodního prostředí různými cestami a ve vysokých koncentracích, a to především v důsledku použití v akvakultuře nebo v ošetření hospodářských zvířat, kdy při léčení jsou tyto látky zvířaty exkretovány a tím se metabolizovaná či intaktní léčiva dostávají do agrikulturních půd a prostřednictvím zemědělských rostlin se dostávají do potravy a to bez jakéhokoliv procesu čištění. (Boxall et al., 2004; Halling-Sørensen et al., 1998)

Bez ohledu na to, že některé vyspělé země již vycházejí z právních předpisů, jejichž cílem je, aby se zabránilo nadužívání antibakteriálních látek u potravinových zvířat, globální spotřeba těchto látek se neustále zvyšuje, s odhadovaným ročním tempem 4% a proto se ekotoxikologie na tuto oblast nyní více zaměřuje z důvodu možných rizik. (Hamad, 2010)

Léčiva jsou navrhována tak, aby zasahovala do specifických metabolických a molekulárních drah u lidí a zvířat, ale často mají také významné vedlejší účinky. Pokud se taková látka dostane do životního prostředí, může zde ovlivnit

stejně dráhy u zvířat, která mají stejné nebo podobné cílové orgány, tkáně, buňky nebo biomolekuly. Některé receptory u nižších živočichů se podobají těm u lidí, jiné jsou však rozdílné, nebo úplně chybí, což znamená, že může dojít i k rozdílnému působení na exponovaný organismus. (Fent et al.; 2006)

Tato konkrétní analýza působení, popřípadě toxicity u nižších živočichů je však obtížně proveditelná. Přesto je třeba se na tento problém zaměřit a navrhnout nové experimenty pro specifické cíle léčiv u nižších obratlovců a bezobratlých, a to na základě hypotézy podobnosti druhů. Nicméně, současné hodnocení toxicity se věnuje spíše obecným a zavedeným testovacím systémům a tradičním organismům (řasy, korýši, mušle, ryby, prvoci) podle pokynů a jsou hodnoceny tradiční koncové body jako je úmrtnost. (Fent et al.; 2006)

V průběhu století se znečištění stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáně atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenita, kancerogenita, vlivy na růst, reprodukci, atd. a na tyto problémy je třeba se více zaměřit. (Kočí et al., 2002)

1.1. Cíl práce

Cílem této práce bylo navázat na moji diplomovou práci (Chronická toxicita směsi léčiv) a rozšířit tak spektrum zkoumaných látek a porovnat je s výsledky testů z jiných studií.

V této práci jsem se zaměřila na Vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*, s využitím látek ciprofloxacin a ibuprofen, které byly vybrány z důvodu jejich celosvětově vysoké spotřebě a tudíž i vysoké koncentraci v životním prostředí, a porovnávala jsem jejich toxicitu jak samostatně, tak ve směsi v různých poměrech.

2.1.2. Fluorochinolony

Chinolonová chemoterapeutika tvoří v současnosti malá skupina nefluorovaných chinolonů, která ustupuje podstatně větší skupině novějších fluorovaných chinolonů. Chinolony mohou být řazeny do skupin (generací), obvykle podle spektra účinku a farmakologických vlastností. S výjimkou chinolonů I. generace se všichni ostatní zástupci označují jako fluorochinolony, podle připojení atomu fluoru k základní molekule. Chemicky jsou to tedy 4-fluorochinolony s četnými substitucemi, které různě vylepšují antimikrobiální účinky i farmakologické vlastnosti jednotlivých derivátů. (Lincová et al., 2007)

Ciprofloxacin patří do III. generace fluorochinolonů se širokým antibakteriálním spektrem. Mezi další chinolonová chemoterapeutika této generace registrovaná v ČR patří ofloxacin, levofloxacin a pefloxacin. Všechna tato léčiva působí baktericidně a mají široké antibakteriální spektrum zahrnující grampozitivní i gramnegativní aerobní bakterie, mykoplazmata, chlamydie a *Mycobacterium tuberculosis*. Jejich antibakteriální účinnost je ve srovnání s chinolony I. a II. generace výrazně vyšší.

Chinolony III. generace se po perorálním podání dobře vstřebávají a příjem potravy obvykle nemá vliv na jejich biologickou dostupnost. Mají dlouhý biologický poločas. Velmi dobře pronikají do tkání a sekretů včetně CNS. Z organismu se vylučují buď převážně močí, nebo močí i žlučí. (Remedia, 2009)

Klinické využití chinolonových chemoterapeutik III. generace spočívá v současné době v terapii středně těžkých až těžkých respiračních, život ohrožujících infekcí, vyvolaných grampozitivními i gramnegativními aerobními bakteriemi, případně infekcí smíšené etiologie. Jedná se zejména o septické stavy, infekce CNS, horních a dolních cest dýchacích, gynekologické a nitrobřišní infekce, infekce kůže, měkkých tkání, kostí či kloubů, infekce trávicího ústrojí, žlučových nebo močových cest. Ciprofloxacin lze při intoleranci nebo neúčinnosti antituberkulotik první řady použít k terapii tuberkulózy. Ciprofloxacin a levofloxacin nacházejí navíc uplatnění při terapii *Mycobacterium avium* u HIV-pozitivních pacientů. (Remedia, 2009)

2.1.3. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku celé skupiny spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin. Chinolonová antibiotika jsou inhibitory dvou bakteriálních enzymů: topoizomerázy II (DNA-gyrázy) a topoizomerázy IV, které jsou potřebné pro replikaci, transkripci, opravu a rekombinaci bakteriální DNA. (SPC Ciplox 250)

DNA-gyráza je bakteriální enzym nutný k udržení prostorového uspořádání DNA, je tedy odpovědný za „správné“ zřetězení a rozvolnění superhelikální DNA během replikace. (Lincová et al., 2007; Hynie, 2001)

Topoizomeráza IV je enzym zodpovědný za oddělení DNA po replikaci. (Mladěnka, 2011)

2.1.4. Rezistence

Rezistence vůči fluorochinolonům vzniká třemi základními způsoby: 1. alterací DNA-gyrázy nebo topoizomerázy IV (např. rezistence *Pseudomonas aeruginosa*); 2. snížením permeability zevní membrány mikroorganismů; 3. efluxem. Zcela ojedinělá a prozatím klinicky nevýznamná je rezistence zprostředkovaná inaktivujícími enzymy vázaná na plastidy. (Lincová et al., 2007)

In vitro rezistence na ciprofloxacin se může vyvinout postupným procesem mutací cílového místa u obou topoizomeráz. Výsledný stupeň zkřížené rezistence mezi ciprofloxacinem a jinými fluorochinolony je proměnlivý. Jednotlivé mutace nemusí mít za následek klinickou rezistenci, ale násobné mutace obvykle za následek klinickou rezistenci na většinu aktivních látek nebo na všechny aktivní látky v rámci skupiny mají. (SPC Ciprinol 500)

Nepropustnost a/nebo mechanismus rezistence efluxní pumpy účinné látky může mít proměnlivý efekt na citlivost na fluorochinolony, která závisí na fyzi chemických vlastnostech různých účinných látek v rámci skupiny a afinitě transportních systémů pro danou účinnou látku.

Mechanismy rezistence, které inaktivují další antibiotika, například permeační bariéry (běžné u *Pseudomonas aeruginosa*) a efluxní mechanismus, mohou ovlivnit citlivost na ciprofloxacin. Byla zaznamenána rezistence zprostředkovaná plazmidem kódovaná pomocí genů *qnr*. (SPC Ciplox 250)

2.1.5. Farmakokinetické vlastnosti

2.1.5.1. Absorpce

Po perorálním podání se ciprofloxacin velmi dobře vstřebává, absolutní biologická dostupnost se pohybuje mezi 60-80 % dávky. (Remedia, 2009)

Po perorálním podání jednotlivých dávek tablet ciprofloxacinu dochází k rychlému a rozsáhlému vstřebávání především z tenkého střeva, maximální sérové koncentrace jsou dosaženy za 1-2 hodiny po aplikaci.

Jednotlivé dávky 100-750 mg se projeví na dávce závislou maximální sérovou koncentrací (C_{max}) mezi 0,56 a 3,7 mg/l. Pro hodnoty C_{max} a AUC byla prokázána proporcionalita dávky. Sérová koncentrace se zvyšuje proporcionalně s dávkami až do 1000 mg. (SPC Ciplox 250)

2.1.5.2. Distribuce

Ciprofloxacin velmi dobře proniká do tkání a sekretů včetně CNS. Dosahuje vysokých koncentrací v různých tkáních, jako jsou plíce (epiteliální tekutina, alveolární makrofágy, tkáňová biopsie), dutiny a zánětlivé léze (kantaridinová puchýřová tekutina) a urogenitální trakt (moč, prostata, endometrium), kde celkové koncentrace převyšují dosažené plazmatické koncentrace. Dobře proniká i do mozkomíšního moku a lymfatické tekutiny, v nepatrném množství i do nitrooční tekutiny. (Remedia, 2009; SPC Ciplox 250)

Vazba ciprofloxacinu na bílkoviny je nízká (20-30 %), ciprofloxacin je přítomen v plazmě převážně ve své neionizované formě a má rozsáhlý distribuční objem, v rovnovážném stavu 2-3 l/kg tělesné hmotnosti. (SPC Ciprinol 500)

Fluorované chinolony	Vazba na bílkoviny (%)	Distribuční objem V_d (l/kg)	Frakce vyloučená do moči (%/24h)	Biologický poločas $t_{1/2}$ (h)
norfloxacin	15-20	3,2	26-32	4,8
ofloxacin	25	3	75	7
ciprofloxacin	30	3	65	5
enoxacin	35	175	44	6
pefloxacin	25	0,7	15	12
floxacin	25	133	50	10

lomefloxacin	10	147	66	7,5
sparfloxacin	45	5	40	20
trovafloxacin	70	1,2	6	11,2
levofloxacin	24-52	0,95	95	6,5
moxifloxacin	39-52	2	20	8,2-15,4

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

2.1.5.3. Metabolismus

Z větší části se ciprofloxacin biotransformuje v játrech na tři částečně účinné a další neúčinné metabolity. (Remedium, 2009)

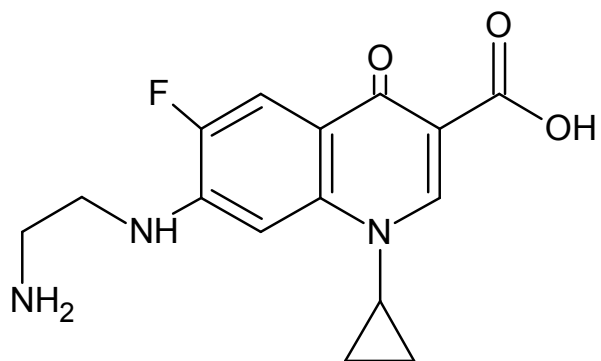
U člověka byly identifikovány tyto čtyři metabolity vyskytující se v nízkých koncentracích: desethyleneciprofloxacin (M_1), sulfociprofloxacin (M_2), oxociprofloxacin (M_3) a formylciprofloxacin (M_4). Metabolity vykazují in vitro antimikrobiální aktivitu, ta je však nižšího stupně než u samotného ciprofloxacinu. (SPC Ciplox 250)

Naproti tomu u některých zvířat byly detekovány pouze dva metabolity, desethyleneciprofloxacin a oxociprofloxacin (v moči opic a telat) a v moči prasat nebyly nalezeny žádné metabolity.

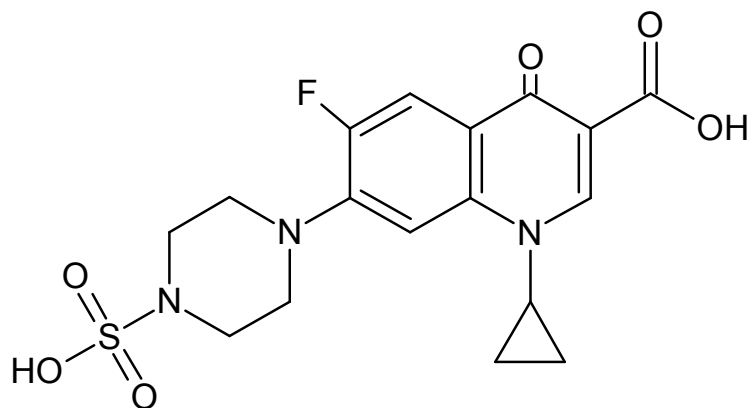
U lidí se po perorálním podání ciprofloxacinu 19 % dávky vylučuje ve formě metabolitů močí a stolicí. Sulfociprofloxacin a oxociprofloxacin představují 10 % a 7 % z celkové dávky. Pouze malé množství se vylučuje jako desethyleneciprofloxacin. Další metabolit, formylciprofloxacin, byl dosud zjištěn pouze jednou skupinou vědců a to ve velmi malých množstvích, méně než 0,1% dávky. (Nouws et al., 1988)

Po intravenózním podání bylo zjištěno v moči a stolici podobné složení metabolitů jako po perorálním podání. Koncentrace sulfociprofloxacinu a dalších metabolitů ve stolici může být vysvětlena především jaterním metabolismem a vylučováním do žluče. Ve žluči bylo nalezeno 83 % sulfociprofloxacinu, 13 % oxociprofloxacinu a 2 % desethyleneciprofloxacinu. (Anadón et al.; 2001)

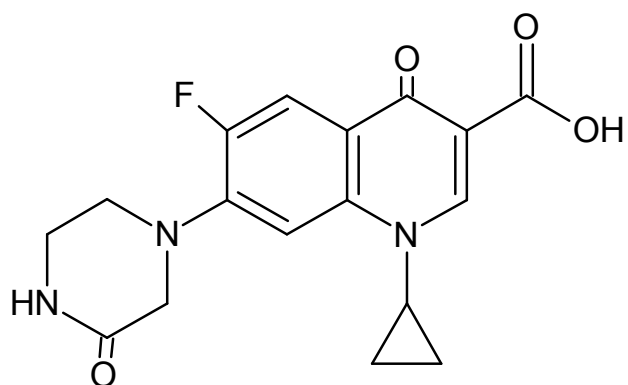
Je známo, že ciprofloxacin je středně silný inhibitor izoenzymů CYP 450 1A2. (SPC Ciprinol 500)



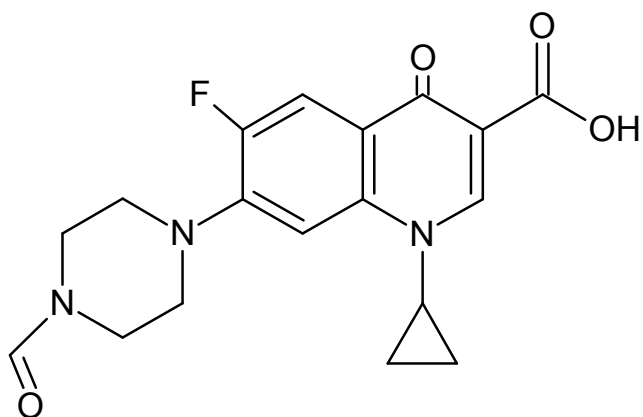
Obr. č. 1: Desethyleneciprofloxacin (M₁)



Obr. č. 2: Sulfociprofloxacin (M₂)



Obr. č. 3: Oxociprofloxacin (M₃)



Obr. č. 4: Formylciprofloxacin (M₄)

2.1.5.4. Vylučování

Ciprofloxacin se vylučuje v nezměněné formě i ve formě metabolitů močí a v menší míře také žlučí. Biologický poločas je 3-6 hodin, u pacientů s těžkou poruchou funkce ledvin se prodlužuje na 5-8 hodin. (Remedia, 2009)

Renální clearance je mezi 180-300 ml/kg/h a celková clearance je mezi 480-600 ml/kg/h. Ciprofloxacin podléhá jak glomerulární filtraci, tak tubulární sekreci. Závažně snížená funkce ledvin vede ke zvýšení poločasu ciprofloxacinu až na 12 hodin. Nerenální clearance ciprofloxacinu je způsobená hlavně aktivní transintestinální sekrecí a metabolizací. Porucha funkce jater nemá vliv na farmakokinetiku ciprofloxacinu. (SPC Ciplox 250)

Vylučování ciprofloxacinu (% z dávky)		
	Perorální podání	
	Moč	Stolice
Ciprofloxacin	44,7	25,0
Metabolity (M₁-M₄)	11,3	7,5

Tab. č. 2: Vylučování ciprofloxacinu z LP v % (SPC Ciprinol 500)

2.1.6. Léčivé přípravky s obsahem ciprofloxacinu

V injekčních a infuzních lékových formách je ciprofloxacin obsažen ve formě laktátu. V perorálních lékových formách ve formě hydrochloridu. Uvedená množství odpovídají množství báze ciprofloxacinu.

V tuto chvíli jsou registrované léčivé přípravky s obsahem ciprofloxacinu pouze humánní, nikoliv veterinární. To ovšem nevylučuje používání těchto léčivých přípravků i ve veterinární praxi. Všechny LP s obsahem ciprofloxacinu jsou v ČR vázané na recept.

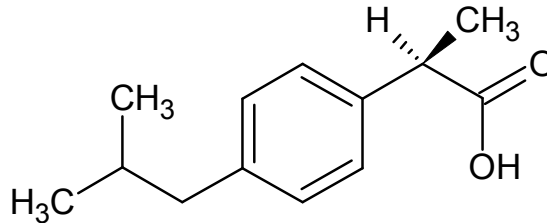
Aktuálně registrované přípravky v ČR s aktivním výskytem na českém trhu obsahující ciprofloxacin jsou uvedené v tabulce:

CIFLOXINAL 250 MG	POR TBL FLM 10X250MG
CIFLOXINAL 500 MG	POR TBL FLM 10X500MG
CILOXAN	OPH+AUR GTT SOL 1X5ML
CIPHIN 500	POR TBL FLM 10X500MG
CIPHIN PRO INFUSIONE 200 MG/100 ML	INF SOL 1X100ML/200MG
CIPLOX	OPH+AUR GTT SOL 5ML
CIPLOX 250	POR TBL FLM 10X250MG
	POR TBL FLM 50X250MG
CIPLOX 500	POR TBL FLM 10X500MG
	POR TBL FLM 50X500MG
CIPRINOL 100 MG/10 ML	INF CNC SOL 5X10ML/100MG
CIPRINOL 200 MG/100 ML	INF SOL 1X100ML/200MG
CIPRINOL 250	POR TBL FLM 10X250MG
CIPRINOL 500	POR TBL FLM 10X500MG
CIPROFLOXACIN KABI 200 MG/100 ML INFUZNÍ ROZTOK	INF SOL 10X200MG/100ML
CIPROFLOXACIN KABI 400 MG/200 ML INFUZNÍ ROZTOK	INF SOL 10X400MG/200ML

Tab. č. 3: Léčivé přípravky s obsahem ciprofloxacinu dostupné v ČR v roce 2014 (www.sukl.cz, stav k 14. 10. 2014)

2.2. Ibuprofen

2.2.1. Struktura, fyzikálně chemické vlastnosti molekuly



Sumární vzorec: C₁₃H₁₈O₂

Relativní molekulová hmotnost (M_r): 206, 28

Chemický název: Kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl) propanová.

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

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

ATC klasifikace: M	Muskuloskeletální systém
M01	Antirevmatika a protizánětlivá léčiva
M01A	Nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva
M01AE	Deriváty kyseliny propionové
M01AE01	Ibuprofen (MV AISLP, 2014)

2.2.2. NSAID (Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs)

Ibuprofen jako derivát kyseliny propionové patří do skupiny NSAID, tedy nesteroidních protizánětlivých látek. NSAID jsou v současné době nejčastěji užívaná farmaka. Používají se k tlumení mírných a středně silných bolestí, ke snížení zánětlivých reakcí a jako antipyretika. Jde o látky spadající do mnoha odlišných chemických skupin (deriváty kyseliny salicylové, kyseliny fenyloctové, indolactové, propionové, fenamové, pyrazolony, oxikami, alkalony, sulfonanilidy). Většinu jejich účinků i těch nežádoucích lze vysvětlit stejným mechanismem jako jejich terapeutické účinky. (Hynie, 2001)

Přestože mechanismus účinku nesteroidních protizánětlivých látek je zřejmě multifaktoriální, za primární se považuje jejich schopnost inhibovat cyklooxygenázu (COX), klíčový enzym limitující rychlost syntézy prostanoidů (prostaglandinů, prostacyklinů a tromboxanů) z arachidonové kyseliny. Prostanoidy se účastní regulace řady fyziologických procesů a za patologických situací se významně podílejí na rozvoji bolesti, horečky a zánětu. (Lincová et al., 2007)

Syntéza prostaglandinů je zajištěna dvěma izoenzymy cyklooxygenázy označovanými jako COX-1 a COX-2.

COX-1 (tzv. konstitutivní izoenzym) hraje roli při syntéze prostaglandinů, které plní fyziologické funkce (gastroduodenální cytoprotekce, srážlivost destiček, vaskulární homeostáza, rovnováha vylučování sodíku a vody ledvinami).

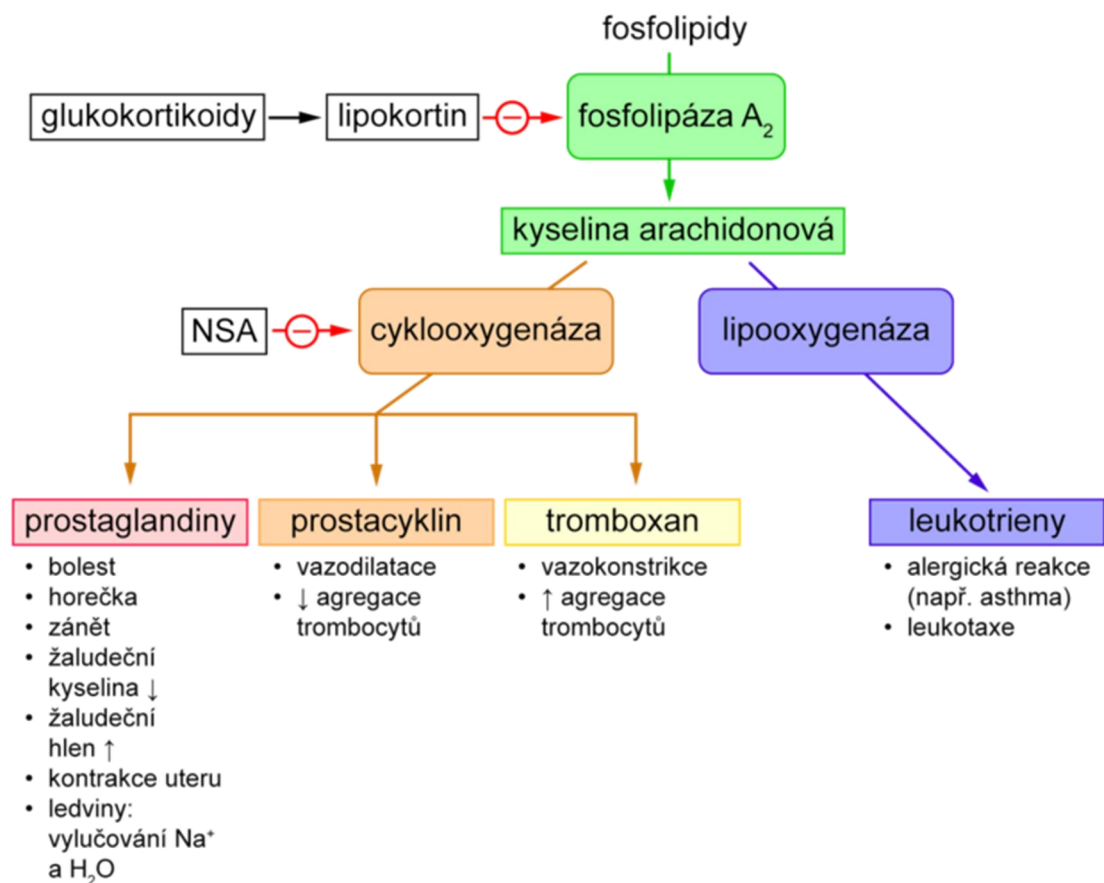
COX-2 (tzv. inducibilní izoenzym) hraje roli při rozvoji lokální zánětlivé reakce.

Inhibice syntézy prostaglandinů tak na jedné straně potlačuje zánět, na druhé straně však v důsledku omezení tvorby prostaglandinů, vyplývajících z inhibice COX-1, dochází ke vzniku řady nežádoucích účinků. (Remedia, 2009)

Podle poměru inhibice jednotlivých izoenzymů je možno látky ze skupiny NSAID rozdělit do níže uvedených skupin a odhadnout tak nejen intenzitu jejich protizánětlivého účinku, ale i to, v jaké míře se budou vyskytovat nežádoucí účinky:

SKUPINA	LÁTKA
I. COX-1 selektivní	<i>kyselina acetylsalicylová (malé dávky)</i>
II. COX-1 neselektivní	<i>kyselina acetylsalicylová (vysoké dávky)</i>
a) s vyšší afinitou ke COX-1	<i>indometacin, piroxikam</i>
b) s vyšší afinitou ke COX-2	<i>ibuprofen, diklofenak, naproxen</i>
III. COX-2 preferenční	<i>nimesulid, meloxikam</i>
IV. COX-2 selektivní	<i>celecoxib, rofecoxib</i>

Tab. č. 4: Zařazení látek do skupin dle vazby na jednotlivé izoenzymy



Obr. č. 5: Metabolismus a účinky eikosanoidů (©2011, Jeřábek)

Ibuprofen, derivát kyseliny propionové, je nesteroidní antirevmatikum s dobrým analgetickým, protizánětlivým a antipyretickým účinkem. V nižších dávkách působí analgeticky, ve vyšších protizánětlivě. Zánět je zmírňován snížením uvolňování mediátorů zánětu z granulocytů, bazofilů a žírných buněk. Ibuprofen dále snižuje citlivost cév vůči bradykininu a histaminu, ovlivňuje produkci lymfokinů v T lymfocytech a potlačuje vazodilataci. Tlumí též agregaci krevních destiček. (SPC Apo-Ibuprofen 400mg)

Ibuprofen se používá jako symptomatická léčba bolesti a zánětu při:

- akutní artritidě včetně záchvatů dny
- chronické artritidě, obzvláště revmatoidní artritidě
- ankylozující spondylitidě (Bechtěrevova choroba) a jiných seronegativních spondylartritidách
- degenerativních onemocnění kloubů včetně kloubů páteře (osteoartróza, spondylartróza)

- revmatismu měkkých tkání
- poranění měkkých tkání (např. kontuze, distorze)

Ibuprofen je dále indikován k:

- tlumení mírné až středně silné bolesti jako je bolest hlavy včetně migrény, bolest zad, zubů, pooperační bolest, bolestivá menstruace, bolesti svalů a kloubů provázející chřipková onemocnění
- symptomatické léčbě horečky (SPC Ibuprofen AL 400)

2.2.3. Farmakokinetické vlastnosti

Ibuprofen je racemickou směsí [-] R-a [+] S-izomerů. In vivo a in vitro studie ukazují, že [+] S-izomer je odpovědný za klinickou účinnost. To ovšem neznamená, že [-] R-forma je farmakologicky neaktivní. U dospělých je pomalu a neúplně (~ 60 %) převáděna na aktivní [+] S-izomer. Stupeň interkonverze u dětí není znám, ale předpokládá se, že bude podobný jako u dospělých. [-] R-izomer slouží jako cirkulující zásobník pro udržení hladiny aktivního léčiva. (http://www.druglib.com/druginfo/motrin/description_pharmacology/)

2.2.3.1. Absorpce

Po perorálním podání se rychle a dobře vstřebává, částečně již v žaludku a dále úplně v duodenu. (SPC Ibuprofen AL 400)

Vrcholu plazmatické koncentrace při podání nalačno dosahuje již za 45 minut, při podání s jídlem cca za 1-3 hodiny. Po rektální aplikaci se ibuprofen vstřebává pomaleji. (SPC Apo-Ibuprofen 400 mg)

Maximální koncentrace v séru dosahuje ibuprofen po 1,7 hodinách (medián) po podání na lačno. Pokud je podán spolu s jídlem, jsou maximální sérové koncentrace o 34 % nižší a je jich dosaženo přibližně o 2 hodiny později, než když je užit nalačno. Potrava však výrazně neovlivňuje jeho celkovou biologickou dostupnost. (SPC Brufen 400)

2.2.3.2. Distribuce

Ibuprofen se váže ve značné míře (z 99 %) na plazmatické proteiny, ale vazba je reverzibilní. (SPC Apo-ibuprofen 400 mg)

Tato vazba může být příčinou mnoha klinicky významných lékových interakcí. Průnik do tkání a tělesných tekutin je dobrý, ibuprofen prochází i hematoencefalickou bariérou i placentární bariérou a je vylučován do mateřského mléka v množství menším než 1 µg/ml. (Lincová et al., 2007)

Proto je ibuprofen kontraindikován ve třetím trimestru těhotenství a v průběhu prvního a druhého trimestru by neměl být podán, pokud to není nezbytně nutné.

Ibuprofen má malý distribuční objem v rozmezí 0,12 až 0,2 l/kg u dospělých. (SPC Brufen 400)

2.2.3.3. Metabolismus

Ibuprofen je rychle metabolizován v játrech prostřednictvím cytochromu P450, zejména jeho formy CYP2C9. (SPC Brufen 400)

R-enantiomer podléhá in vivo rozsáhlé enantiomerní konverzi (53-65 %) na aktivnější S-enantiomer. (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>)

Po perorálním podání léku se o něco méně než 90 % perorální dávky ibuprofenu vyloučí do moči jako oxidativní metabolity a jejich glukuronidové konjugáty. Velmi malá část ibuprofenu se do moči vylučuje v nezměněném stavu. (SPC Brufen 400)

Mezi dva hlavní metabolity vzniklé oxidací, které jsou dále inaktivní, patří: (+)-2-[4'-(2-hydroxy-2-methylpropyl)fenyl]propionová kyselina (25 %) a (+)-2-[4'-(2-karboxypropyl)fenyl] propionová kyselina (37 %).

Z moči byla izolována velmi malá množství 1-hydroxyibuprofenu a 3-hydroxyibuprofenu. (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>)

Procenta volného a konjugovaného ibuprofenu nalezeného v moči byla přibližně 1 % a 14 %. Zbytek léku byl nalezen ve stolici, v podobě obou metabolitů a nevstřebané drogy.

(http://www.druglib.com/druginfo/motrin/description_pharmacology/)

2.2.3.4. Vylučování

K vylučování ledvinami dochází rychle a beze zbytku. Eliminační poločas ibuprofenu je přibližně 2 hodiny. Vylučování ibuprofenu je prakticky ukončeno do 24 hodin po podání poslední dávky. Při sníženém vylučování může dojít ke kumulaci léku v organismu. (SPC Brufen 400)

2.2.4. Akutní toxicita

LD₅₀ byla stanovena u myši perorálně 800 mg/kg tělesné hmotnosti a 320 mg/kg intraperitoneálně. LD₅₀ u potkana je perorálně 1 600 mg/kg tělesné hmotnosti a 1 300 mg/kg subkutánně. U všech uhynulých zvířat (tedy hlodavců) byla manifestně vyjádřena deprese CNS a ulcerogenní změny gastrointestinálního traktu.

Ibuprofen byl dále podáván psům v dávce 125 mg/kg tělesné hmotnosti a výše, toxické účinky se projeví erozemi žaludku a albuminurií. V dávce 20 a 50 mg/kg nebyly prokázány žádné toxické změny. Výsledky ukazují, že ibuprofen v letálních dávkách způsobil postižení CNS u hlodavců, zatímco ulcerogenní účinek byl pozorován u obou skupin zvířat (i u nehlodavců). (SPC Ibalgin 400)

2.2.5. Chronická toxicita

Chronická toxicita byla zjišťována na potkanech, kterým byl podáván ibuprofen v dávce 180 mg/kg a 60 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 26 a 13 týdnů. Na konci terapie byla jak u samců, tak i u samic zjištěna anémie. Rovněž se zvětšila váha některých orgánů k celkové tělesné hmotnosti potkanů (játra, ledviny, gonády a druhotné pohlavní orgány).

Histologicky nebyly zjištěny signifikantní změny, pouze v několika případech byly nalezeny intestinální ulcerace. Zvětšení jater a ledvin pravděpodobně souvisí s metabolismem a exkrecí ibuprofenu.

Po podání ibuprofenu psům v dávce 16 mg/kg tělesné hmotnosti za den po dobu 30 dnů nebyly nalezeny klinické příznaky toxicity, při pitvě však byly

zjištěny eroze a ulcerace žaludku a záněty střev. Podobné léze byly nalezeny v dávce 8 mg/kg/den, ale ne v dávce 4 mg/kg/den.

V experimentálních studiích nebyl prokázán karcinogenní, mutagenní ani teratogenní efekt ibuprofenu. (SPC Ibalgin 400)

Ibuprofen způsobuje inhibici ovulace u králíků a poruchy zahnízdění vajíčka u různých druhů (králík, potkan, myš). U potkanů byl po podání toxické dávky matce pozorován zvýšený počet malformací u potomků (ventrikulární defekt septa). (SPC Ibuprofen AL 400)

2.2.6. Léčivé přípravky s obsahem ibuprofenu

Ibuprofen se vyskytuje v přípravcích jak pro vnitřní, tak pro zevní použití. Topické přípravky jsou k dostání bez lékařského předpisu, stejně tak jako perorální přípravky v silách 200 mg a 400 mg. Přípravky v síle 600 mg a 800 mg jsou vázány jen na lékařský předpis.

Aktuálně registrované přípravky v ČR s aktivním výskytem na českém trhu obsahující ibuprofen, buď samostatně, nebo v kombinaci, jsou uvedené v následující tabulce:

A) PERORÁLNÍ PŘÍPRAVKY	
a) na lékařský předpis	
BRUFEN 600 MG	POR GRA EFF 20X600MG
DOLGIT 800	POR TBL FLM 20X800MG
IBALGIN 600	POR TBL FLM 30X600MG
IBUMAX 600 MG	POR TBL FLM 100X600MG
IBUMAX 600 MG	POR TBL FLM 30X600MG
b) s mezením	
MODAFEN	POR TBL FLM 24
NUROFEN STOPGRIP	POR TBL FLM 24
NUROFEN STOPGRIP	POR TBL FLM 12
c) volně prodejně	
APO-IBUPROFEN 400 MG	POR TBL FLM 30X400MG
	POR TBL FLM 100X400MG
APO-IBUPROFEN RAPID 400 MG SOFT CAPSULES	POR CPS MOL 10X400MG
	POR CPS MOL 20X400MG
BRUFEN 400	POR TBL FLM 100X400MG
	POR TBL FLM 30X400MG
BRUFEN 400 MG ŠUMIVÉ GRANULE	POR GRA EFF 30X400MG
	POR GRA EFF 20X400MG

BRUFEN SIRUP	POR SIR 1X100ML/2GM
IBALGIN 200	POR TBL FLM 24X200MG
IBALGIN 400	POR TBL FLM 48X400MG
	POR TBL FLM 24X400MG
	POR TBL FLM 36X400MG
	POR TBL FLM 100X400MG
IBALGIN BABY	POR SUS 1X100ML/2GM
IBALGIN GRIP 200 MG/5 MG	POR TBL FLM 24
	POR TBL FLM 12
IBALGIN RAPID	POR TBL FLM 12X400MG I
IBUBERL PRO DĚTI 100MG/5ML PERORÁLNÍ SUSPENZE	POR SUS 1X100ML/2GM
IBUMAX 200 MG	POR TBL FLM 30X200MG
IBUMAX 400 MG	POR TBL FLM 100X400MG
	POR TBL FLM 30X400MG
IBUMYL RAPID 400 MG	POR TBL FLM 24X400MG
	POR TBL FLM 12X400MG I
IBUPROFEN 400 MG GALMED	POR TBL FLM 30X400MG
IBUPROFEN AL 400	POR TBL FLM 30X400MG
	POR TBL FLM 50X400MG
	POR TBL FLM 100X400MG
	POR TBL FLM 10X400MG
IBUPROFEN DR. MAX 200 MG POTAHOVANÉ TABLETY	POR TBL FLM 30X200MG I
IBUPROFEN DR. MAX 400 MG POTAHOVANÉ TABLETY	POR TBL FLM 100X400MG I
	POR TBL FLM 36X400MG I
NUROFEN 200 MG	POR TBL OBD 10X200MG
	POR TBL OBD 24X200MG
	POR TBL OBD 12X200MG
NUROFEN 400 MG	POR TBL OBD 12X400MG
	POR TBL OBD 24X400MG
NUROFEN INSTANT 400 MG ROZPUSTNÝ PRÁŠEK	POR PLV SOL 5X400MG
NUROFEN NEO 200 MG OBALENÉ TABLETY	POR TBL OBD 12X200MG
NUROFEN NEO FEMINA 400 MG OBALENÉ TABLETY	POR TBL OBD 12X400MG
NUROFEN PRO DĚTI	POR SUS 1X100ML TRUB
NUROFEN PRO DĚTI 4% JAHODA	POR SUS 1X100ML
NUROFEN PRO DĚTI 4% POMERANČ	POR SUS 1X100ML
NUROFEN PRO DĚTI ACTIVE	POR TBL DIS 12X100MG
NUROFEN PRO DĚTI JAHODA	POR SUS 2000MG/100ML TRUB
	POR SUS 4000MG/200ML TRUB
NUROFEN RAPID 200 MG CAPSULES	POR CPS MOL 10X200MG
NUROFEN RAPID 400 MG CAPSULES	POR CPS MOL 10X400MG

B) REKTÁLNÍ PŘÍPRAVKY	
NUROFEN PRO DĚTI ČÍPKY 125 MG	RCT SUP 10X125 MG
NUROFEN PRO DĚTI ČÍPKY 60 MG	RCT SUP 10X60MG
C) ZEVNÍ PŘÍPRAVKY	
DOLGIT GEL	DRM GEL 1X50GM
	DRM GEL 1X150GM
DOLGIT KRÉM	DRM CRM 1X150GM
	DRM CRM 1X50GM
	DRM CRM 1X100GM
IBALGIN DUO EFFECT	DRM CRM 1X100GM
	DRM CRM 1X50GM
IBALGIN GEL	DRM GEL 1X50GM
	DRM GEL 1X100GM
IBALGIN KRÉM	DRM CRM 1X50GM
	DRM CRM 1X100GM

Tab. č. 5: Léčivé přípravky s obsahem ciprofloxacinu dostupné v ČR v roce 2014
(www.sukl.cz, stav k 14. 10. 2014)

2.3. Spotřeba léčiv

Studium spotřeby léčiv můžeme definovat jako disciplínu, která hodnotí používání léčiv a jeho medicínské, sociální a ekonomické dopady. Sledování spotřeby léčiv umožňuje odhadnout velikost exponované populace danému léku. Cílem studia spotřeby léčiv je optimalizace používání léčiv na podkladě vyhodnocování jeho kvality. (Tlustá et al., 2010)

Pro potřeby zpracování údajů o spotřebě léčiv a umožnění jejich srovnání jak na národní, tak i mezinárodní úrovni je nezbytné použití jednotného klasifikačního systému. Nejvýznamnějším nástrojem, používaným k třídění léčiv pro účely studia jejich spotřeby, je Anatomicko – terapeuticko - chemická (ATC) klasifikace, kterou doporučila pro přijetí v Evropě Regionální úřadovna SZO (Světové zdravotnické organizace) v roce 1981. (Urbánek, 2002)

V ATC klasifikačním systému jsou účinné látky rozděleny do skupin v pěti různých úrovních. První úroveň tvoří čtrnáct hlavních skupin, rozdělených podle orgánu nebo systému, na který působí, a jejich terapeutických, farmakologických a chemických vlastností. Druhá úroveň je tvořena farmakologickými/terapeutickými podskupinami, třetí a čtvrtá úroveň jsou chemické/farmakologické/terapeutické podskupiny a pátá úroveň je konkrétní chemická látka. (www.whooc.no)

A	Trávicí trakt (1. úroveň, hlavní anatomická skupina)
A10	Látky k terapii diabetu (2. úroveň, terapeutická podskupina)
A10B	Látky snižující hladinu glukózy v krvi, kromě inzulínu (3. úroveň, farmakologická podskupina)
A10BA	Biguanidy (4. úroveň, chemická skupina)
A10BA02	Metformin (5. úroveň, chemická látka)

Tab. č. 6: Ukázka zařazení látky (metforminu) dle ATC systému (www.whooc.no)

Nejdůležitější kvantitativní jednotkou používanou pro potřeby studia spotřeby léčiv je definovaná denní dávka (DDD). Je to technická statistická jednotka, stanovovaná pro jednotlivé účinné látky komisí SZO v rámci systému ATC/DDD. (www.whooc.no)

DDD představuje předpokládanou průměrnou udržovací dávku léčiva na jeden den, podávanou k léčbě v hlavní indikaci pro dospělého člověka. (www.sukl.cz)

Je třeba zdůraznit, že DDD je jednotka měření a nemusí nutně odrážet doporučené nebo stanovené denní dávky pro jednotlivé pacienty a skupiny pacientů. Ty se často od DDD liší a jsou založeny na individuálním stavu konkrétního pacienta. Údaje o spotřebě drog uvedené v DDD poskytnou pouze hrubý odhad spotřeby a nikoliv přesný obraz o skutečném použití. (www.whooc.no)

DDD/1000obyv./den se využívá pro sledování časových řad a pro mezinárodní a jiná srovnávání a vyjadřuje, kolik těchto jednotek připadá na tisíc obyvatel za jeden den ve sledovaném období. (www.sukl.cz)

Výhoda používání DDD tkví především v možnosti srovnávání spotřeby nejen přípravků téže účinné látky, ale i různých látek a dokonce terapeutických skupin, a to i v mezinárodních studiích. Systém ATC/DDD se s podporou Světové zdravotnické organizace v posledních letech rozšiřuje i mimo Evropu a má perspektivu stát se univerzálním nástrojem třídění léčiv a kvantifikace potřeby pro účely zdravotnictví. (www.whooc.no)

V České republice shromažďuje údaje o spotřebě léčiv SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv). Pro sledování trendů v dodávkách léčivých přípravků jsou používána porovnání distribuovaných objemů v počtech balení, finančních ukazatelích a definovaných denních dávkách po čtvrtletích v uplynulých pěti letech. (www.sukl.cz)

Ve finančním vyjádření je spotřeba léčiv v ČR v mezinárodním kontextu spíše průměrná, při vyjádření ve hmotných jednotkách (balení, DDD/1000 obyvatel/den) pak patří ČR k zemím s nadprůměrnou spotřebou a v pomyslných žebříčcích se mezi evropskými zeměmi již řadu let umisťuje mezi prvními pěti. (Suchopár, 2015)

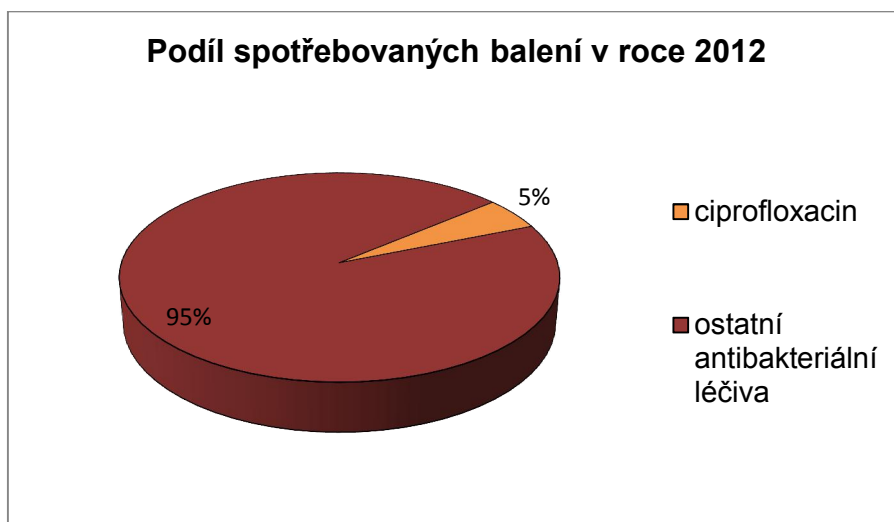
Množství nepoužívanějších léčiv se v některých zemích pohybuje v řádu stovek tun za rok. Skutečné množství podávaných léčiv je pouze odhadované, protože je téměř nemožné zjistit přesnou spotřebu OTC léčiv a léčiv prodávaných přes internet. Předpokládá se tak, že reálná spotřeba některých léčiv je významně vyšší. Vyčíslení roční spotřeby léčiv je obtížné a často založené na odhadech. (Fent et al., 2006)

V případě, že bychom chtěli odhadovat dopad konkrétních léčivých přípravků na životní prostředí, se nemůžeme příliš spoléhat pouze na údaje spojené s objemem jejich distribuce, neboť tyto informace nevyovídají nic o obsahu a účinnosti jednotlivých léčivých látek, degradabilitě a biologické aktivitě, která může po transformaci výchozí látky i několikanásobně vzrůst. (Kotyza et al., 2009)

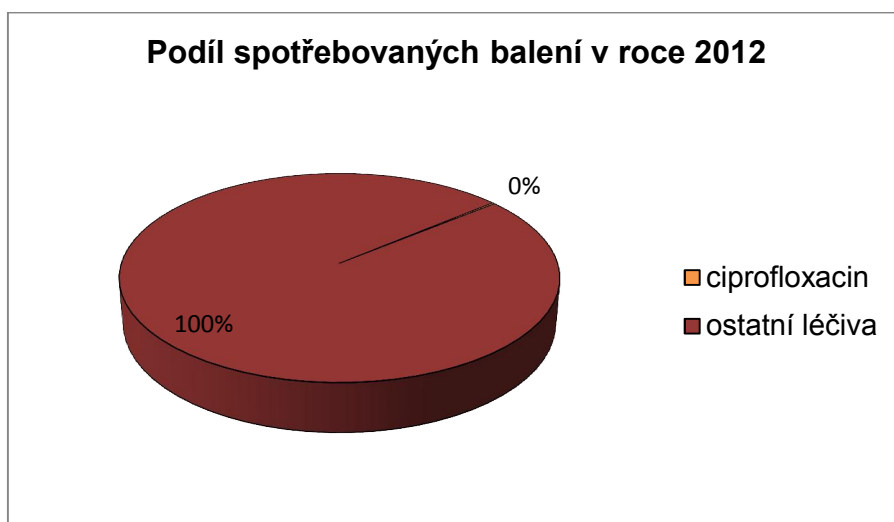
2.3.1. Spotřeba antibakteriálních léčiv a ciprofloxacinu v ČR

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii byla v roce 2012 v České republice 11 064 299 balení, za průměrnou cenu 2 599 951 784 Kč, což odpovídá 73 693 007 spotřebovaných DDD, tj. 19,1400 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

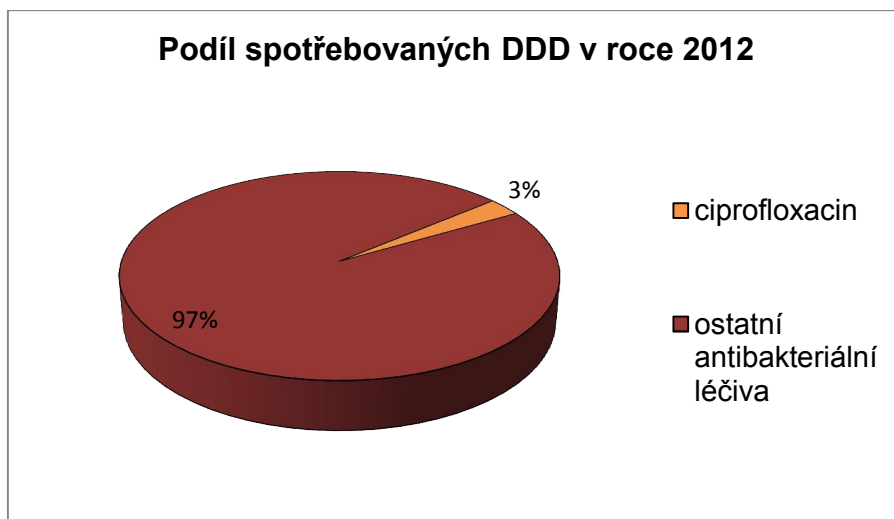
Na ciprofloxacin z toho připadá 554 770 balení za průměrnou cenu 80 148 366 Kč, což odpovídá 2 050 039 DDD, tj. 0,5325 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2014)



Obr. č. 6: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ciprofloxacinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2012.



Obr. č. 7: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ciprofloxacinu k celkovému počtu všech spotřebovaných balení ostatních LP v roce 2012.



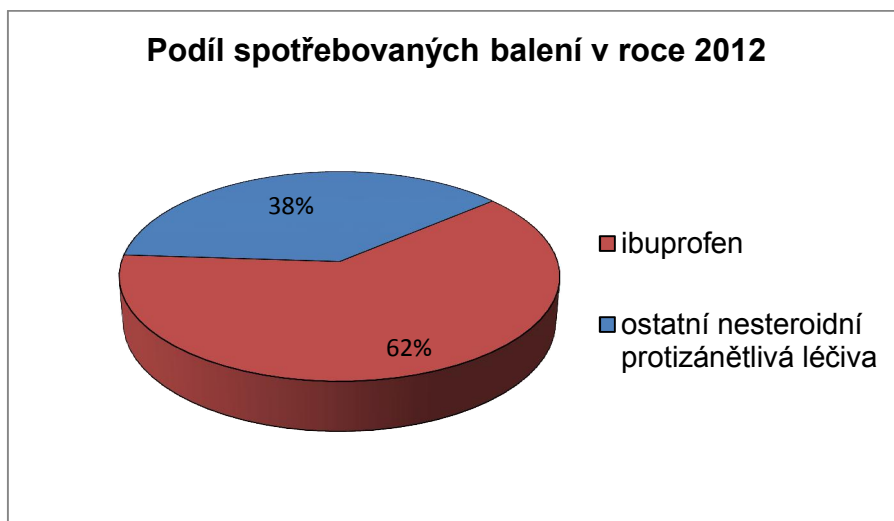
Obr. č. 8: Podíl spotřebovaných DDD LP s obsahem ciprofloxacinu k ostatním antibakteriálním léčivům v roce 2012.

2.3.2. Spotřeba NSAID a ibuprofenu v ČR

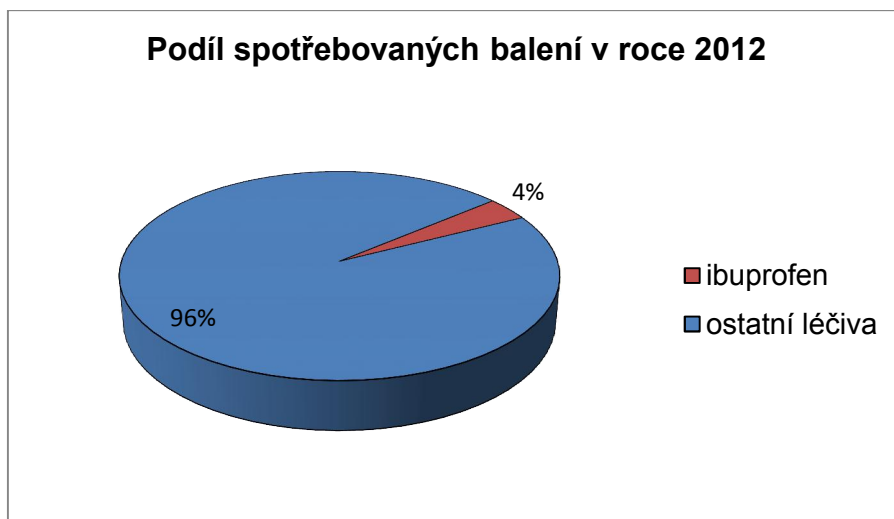
Spotřeba nesteroidních protizánětlivých a protirevmatických léčiv byla v roce 2012 v České republice 16 396 354 balení za průměrnou cenu 1 848 962 727 Kč, což odpovídá 224 577 840 DDD, tj. 58,3287 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na ibuprofen z toho připadá 9 172 681 balení za průměrnou cenu 697 395 410 Kč, což odpovídá 124 660 854 DDD, tj. 32,3777 DDD/t.o./d.

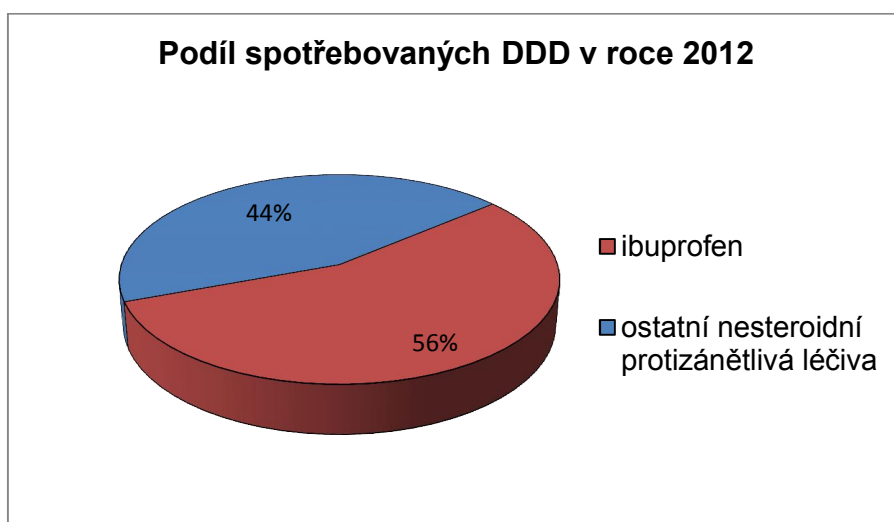
Na ibuprofen v kombinaci s jinými léčivy připadá 419 470 balení za průměrnou cenu 56 920 447 Kč. (MV AISLP; 2014)



Obr. č. 9: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2012.



Obr. č. 10: Podíl spotřebovaných balení LP s obsahem ibuprofenu k celkovému počtu všech spotřebovaných balení ostatních LP v roce 2012.



Obr. č. 11: Podíl spotřebovaných DDD LP s obsahem ibuprofenu k ostatním NSAID v roce 2012.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Testované organismy

nálevník *Tetrahymena thermophila*

3.2. Chemikálie, pomůcky, přístroje

3.2.1. Chemikálie

- ciprofloxacin (výrobce: Fluka Chemie GmbH, S&A, Buchs, Švýcarsko)
- ibuprofen (výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- dichroman draselný (výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- proteose-peptone (výrobce: Fluka Chemie GmbH, S&A, Buchs, Švýcarsko)
- deionizovaná voda

3.2.2. Pomůcky

- automatické mikropipety a špičky
- kádinky
- laboratorní lžičky
- mikrotitrační destičky
- odměrné baňky
- ochranné rukavice
- skleněné tyčinky
- stojan na zkumavky
- váženky
- zkumavky

3.2.3. Přístroje

- analytické digitální váhy KERN ABJ
- box s laminárním prouděním BIOAIR INSTRUMENTS Aura 2000 M.A.C.
- digestoř KÖTTERMAN
- inkubátor WTB BINDER
- počítač
- reader ANTHOS 2010
- světelný mikroskop LEICA
- třepačka VORTEX-GENIE 2
- ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN
- zařízení pro čištění vody P.NIX POWER BIO

3.3. Provedení experimentu

3.3.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Příprava vzorku

Vzorek navážíme na analytických vahách a přidáme deionizovanou vodu, abychom dostali roztok o požadované koncentraci. Ředěním jedna a půl si ve zkumavkách vytvoříme ředící řadu o deseti či dvaceti po sobě jdoucích koncentracích. Jako vzorek zkoušíme ciprofloxacin a ibuprofen, buď samostatně, nebo v poměrech 1:1, 1:2, 2:1. Stejným ředěním připravíme i deset koncentrací dichromanu draselného, který slouží jako standardní testovaná látka pro ověření správnosti průběhu experimentu.

Roztok č.	Koncentrace vzorku	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$
1	50,00	288
2	33,33	192
3	22,22	128
4	14,81	85,33
5	9,88	56,89
6	6,58	37,93
7	4,39	25,28
8	2,93	16,86
9	1,95	11,24
10	1,30	7,49
11	0,87	-
12	0,58	-
13	0,39	-
14	0,26	-
15	0,17	-
16	0,11	-
17	0,08	-
18	0,05	-
19	0,03	-
20	0,02	-

Tab. č. 7: Přehled jednotlivých reálných koncentrací testovaných látek v mg/l

Příprava mikrotitrační destičky

V laminárním boxu pipetujeme vzorek, testovaný organismus a pepton dle schématu, který je uveden níže. Mikrotitrační destička se plní pouze v řadách B, C, D, E, F, G a ve sloupcích 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Okrajové jamky zůstanou prázdné z důvodu větší přehlednosti testu a snadnějšího odečtu. Do všech jamek v řadě B pipetujeme pouze pepton (150 μ l). Do jamek v řadě C pipetujeme pepton a vzorek, vždy v poměru 2:1 (100 μ l:50 μ l), a to podle klesající koncentrace (v jamce C2 je nejvyšší koncentrace, v jamce C11 nejnižší). Do jamek řady D pipetujeme pepton a Tetrahymenu v poměru 2:1 (100 μ l:50 μ l). V řadách E, F, G pipetujeme pepton, vzorek podle klesající koncentrace a nakonec Tetrahymenu v poměru 1:1:1, tj. 50 μ l:50 μ l:50 μ l.

Pro jednu ředící řadu vzorku (o dvaceti koncentracích) je nutné připravit vždy dvě mikrotitrační destičky.

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

Tab. č. 8: Schéma plnění mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
C	○	▨	▨	▨	▨	▨	▨	▨	▨	▨	▨	○
D	○	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	○
E	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
F	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
G	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Obr. č. 12: Schéma plnění mikrotitrační destičky

Měření optické hustoty

Ihned po připravení mikrotitrační destičky změříme na readeru optickou hustotu při vlnové délce 492nm a 445nm. Pak dáme destičku inkubovat do inkubátoru při konstantní teplotě 25°C. Další měření provádíme po 24 a 48 hodinách.

Vyhodnocení

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

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

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

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

Z těchto výsledků poté vypočteme hodnotu EC_{50} pomocí statistického softwaru GraphPad Prism 6.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

- hodnocení chronické toxicity
- podmínky testu: tma, 25°C
- délka testu: 24 (48) hodin
- testovaný organismus *Tetrahymena thermophila*

	Koncentrace vzorku	Koncentrace K ₂ Cr ₂ O ₇
C ₁	50,00	288
C ₂	33,33	192
C ₃	22,22	128
C ₄	14,81	85,33
C ₅	9,88	56,89
C ₆	6,58	37,93
C ₇	4,39	25,28
C ₈	2,93	16,86
C ₉	1,95	11,24
C ₁₀	1,30	7,49
C ₁₁	0,87	-
C ₁₂	0,58	-
C ₁₃	0,39	-
C ₁₄	0,26	-
C ₁₅	0,17	-
C ₁₆	0,11	-
C ₁₇	0,08	-
C ₁₈	0,05	-
C ₁₉	0,03	-
C ₂₀	0,02	-

Tab. č. 9: Přehled jednotlivých reálných koncentrací testovaných látek v mg/l

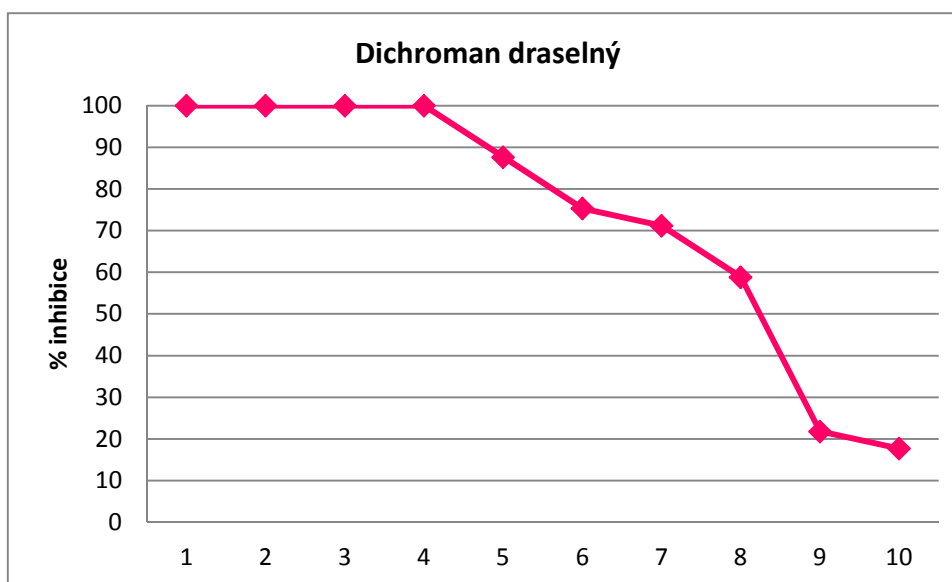
Dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$)

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	87,65	75,31	71,19	58,85	21,81	17,70

Tab. č. 10: $K_2Cr_2O_7$ - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

Pomocí programu GraphPad Prism 6 jsme z těchto hodnot stanovili střední efektivní koncentraci $K_2Cr_2O_7$:

24h EC₅₀ = 18,40 mg/l (16,06 – 21,07 mg/l)



Obr. č. 13: Graf závislosti inhibice (%) na jednotlivých koncentracích dichromanu draselného při 492 nm

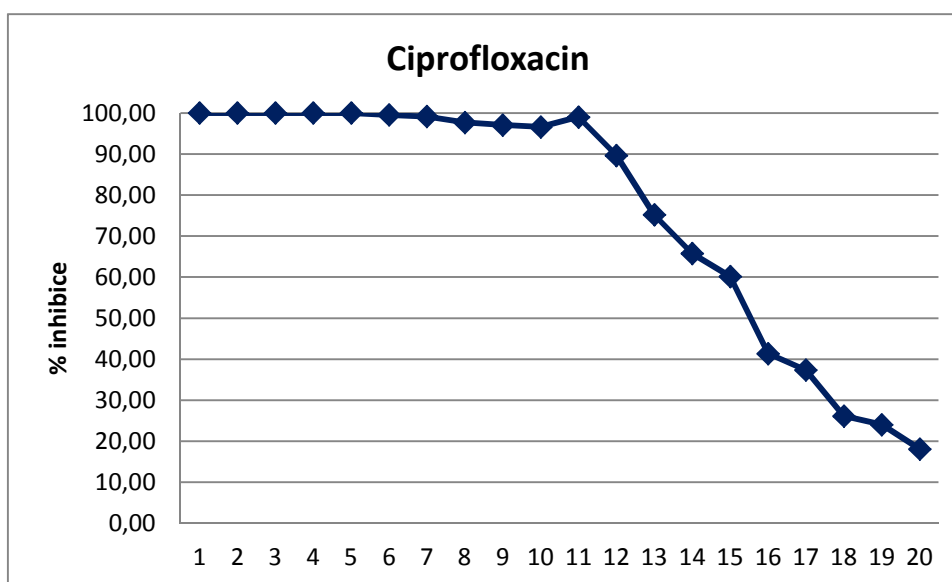
Ciprofloxacin

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,53	99,14	97,71	97,09	96,63
C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
99,06	89,66	75,18	65,77	60,16	41,36	37,33	26,13	24,02	18,12

Tab. č. 11: Ciprofloxacin - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

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

24h EC₅₀ = 0,12 mg/l (0,11 - 0,14 mg/l)



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

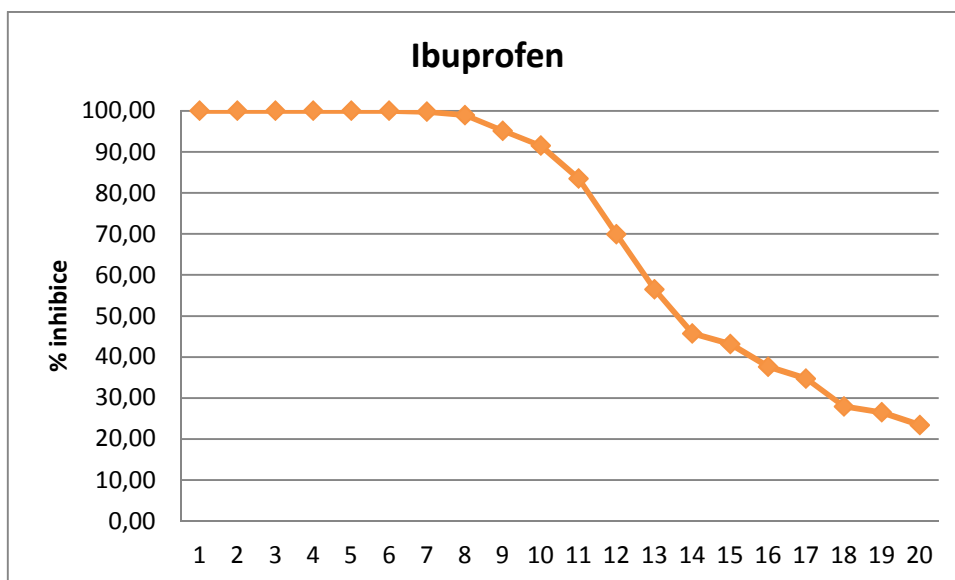
Ibuprofen

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,77	98,95	95,12	91,52
C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
83,51	69,90	56,50	45,74	43,16	37,61	34,74	27,96	26,51	23,42

Tab. č. 12: Ibuprofen - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

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

24h EC₅₀ = 0,18 mg/l (0,15 - 0,22 mg/l)



Obr. č. 15: Graf závislosti inhibice (%) na jednotlivých koncentracích ibuprofenu při 492 nm

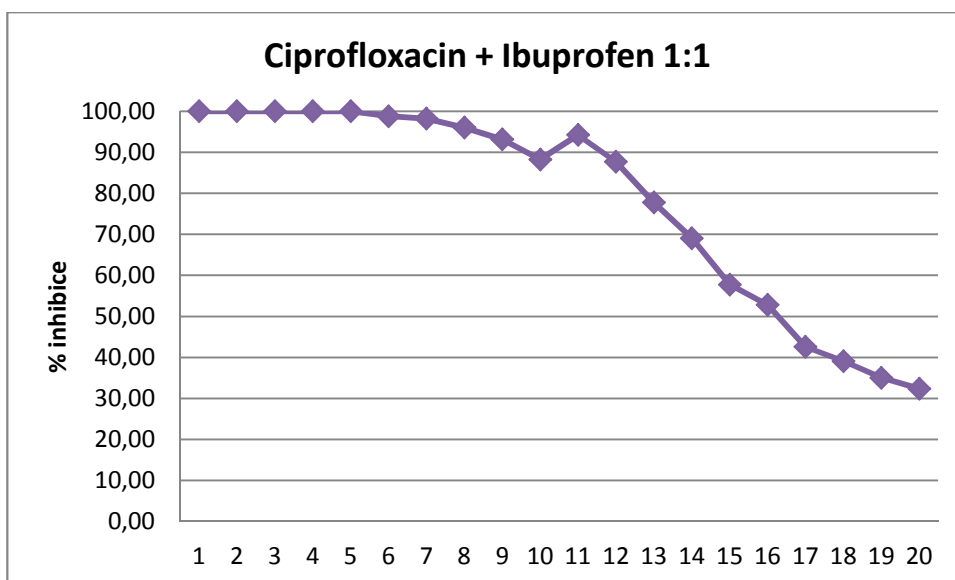
Ciprofloxacin + Ibuprofen 1:1

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	98,80	98,22	96,02	93,13	88,25
C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
94,25	87,67	77,78	69,05	57,74	52,79	42,59	39,11	35,05	32,38

Tab. č. 13: Ciprofloxacin + Ibuprofen 1:1 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

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

24h EC₅₀ = 0,08 mg/l (0,07 - 0,10 mg/l)



Obr. č. 16: Graf závislosti inhibice (%) na jednotlivých koncentracích ciprofloxacinu a ibuprofenu (1:1) při 492 nm

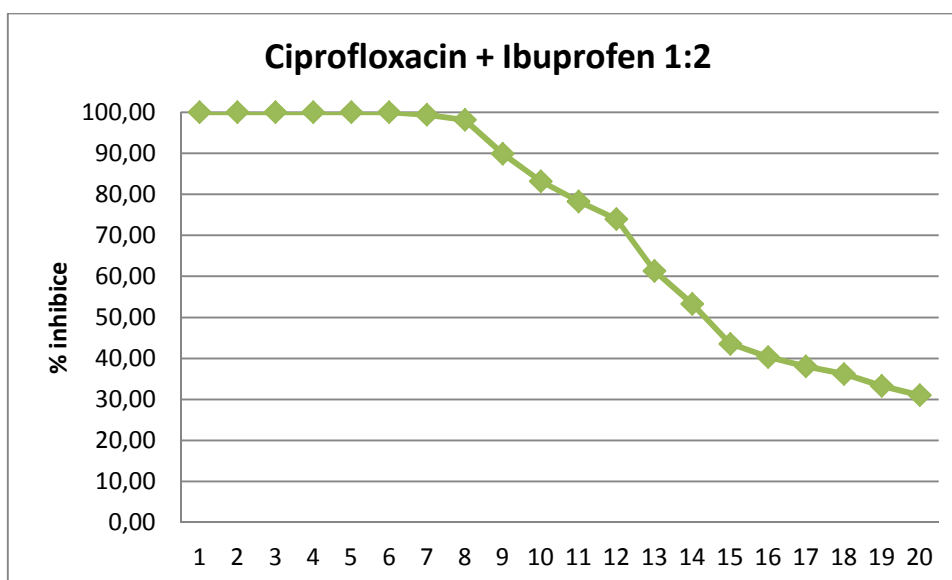
Ciprofloxacin + Ibuprofen 1:2

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,40	98,13	89,86	83,22
C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
78,30	73,95	61,34	53,28	43,55	40,30	38,04	36,20	33,28	31,04

Tab. č. 14: Ciprofloxacin + Ibuprofen 1:2 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

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

$$24\text{h EC}_{50} = 0,14 \text{ mg/l (0,11 - 0,18 mg/l)}$$



Obr. č. 17: Graf závislosti inhibice (%) na jednotlivých koncentracích ciprofloxacinu a ibuprofenu (1:2) při 492 nm

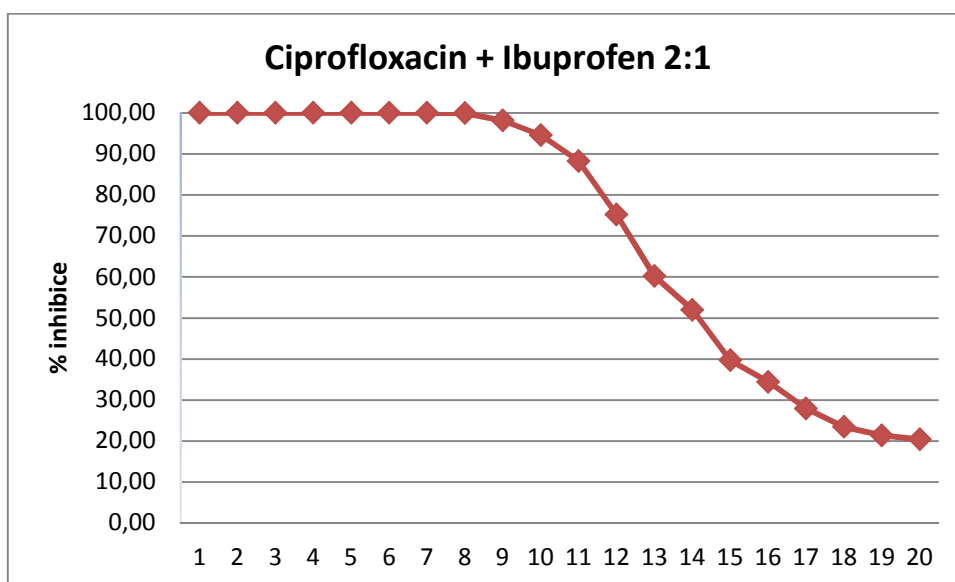
Ciprofloxacin + Ibuprofen 2:1

C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,93	98,16	94,59
C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
88,26	75,20	60,21	51,96	39,69	34,43	27,95	23,44	21,40	20,40

Tab. č. 15: Ciprofloxacin + Ibuprofen 2:1 - Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při vlnové délce 492 nm

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

$$24\text{h EC}_{50} = 0,19 \text{ mg/l (0,17 - 0,22 mg/l)}$$



Obr. č. 18: Graf závislosti inhibice (%) na jednotlivých koncentracích ciprofloxacinu a ibuprofenu (2:1) při 492 nm

5. DISKUZE

Látky testované v této práci, ibuprofen a ciprofloxacin, byly vybrány z důvodu jejich vysokého užívání jak v humánní, tak i veterinární medicíně po celém světě.

Jako testovaný organismus byl zvolen prvok *Tetrahymena thermophila*, jež má několik výhodných vlastností pro testování. Nejen že se nachází v mikrobiální fauně ČOV, ale je také výrazně citlivější vůči různým xenobiotikům oproti ostatním testovaným organismům. Kromě toho je jeho výhodou krátký generační čas (~150 min), který umožňuje při 24h expozici testování na velkém počtu generací (~10).

Pro životní prostředí se stále více stávají středem pozornosti především potenciální rizika antibiotik (ATB) vzhledem k jejich širokému používání i mimo medicínu (především v akvakulturách, chovech drůbeže i při zpracování potravin) a následně i jejich nesprávné likvidaci. ATB mohou být detekována v povrchových vodách, podzemních vodách i mořských vodách v koncentracích v rozmezí ng/l do µg/l (Lalumera et al., 2004; Yang a Carlson, 2004; Richardson et al., 2005; Santos et al., 2010) a v některých případech i v koncentracích mg/l. (Kümmerer, 2001; Lin a Tsai, 2009)

Bylo prokázáno, že ATB nelze zcela odstranit v čistírnách odpadních vod - účinnost odstraňování se pohybuje kolem 60 % (Sacher et al., 2001; Ternes et al., 2004; Petrovič et al., 2005; Karthikeyan a Meyer, 2006) a proto se předpokládá jejich nepříznivý dopad na necílové organismy v důsledku své přirozené biologické aktivity a kontinuálního uvolňování do vodního prostředí. (Nie et al., 2013)

Roční spotřeba ciprofloxacinu připadá až na 33 000 kg, což vede k značnému rozšíření této sloučeniny v povrchových vodách. (Bergmann et al., 2011; Schwabe, 2010)

Vzhledem k jeho profylaktickému použití v akvakultuře se dále předpokládá vzestup spotřeby, zejména v rozvojových zemích, jako je např. Čína nebo Chile. (Cabello, 2006; Cabello et al., 2013)

Existují však podstatné regionální a místní rozdíly v koncentraci ciprofloxacinu v povrchových vodách po celém světě.

Například v Indii byla naměřena hodnota v monitorovací oblasti téměř 20 000 nmol/l, což je neskutečně obrovská hodnota, pokud výsledky porovnáme se světem, kde se průměrná koncentrace pohybuje okolo 500 nmol/l. (Hughes et al., 2013) Koncentrace ciprofloxacinu naměřená v evropských povrchových vodách se pohybovala v rozpětí mezi 0,04 nmol/l a 0,407 nmol/l. (Zuccato et al., 2010; Dinh et al., 2011) Koncentrace nalezené na jiných kontinentech jsou vyšší, v průměru mezi 0,091 nmol/l a 1,09 nmol/l v Severní Americe. (Focazio et al., 2008; Kolpin et al., 2002; Kolpin et al., 2004; Batt et al., 2006) V Brazílii byla naměřena hodnota 0,0018 nmol/l. (Locatelli et al., 2011) V čínských pobřežních vodách byl nalezen ciprofloxacin v koncentraci až 0,20 nmol/l (Zhang et al., 2012), v čínských sedimentech v koncentracích kolem 0,002-0,007 nmol/l. (He et al., 2012) Vyšší koncentrace ciprofloxacinu, a to až 3 nmol/l, byly naměřeny u prasečích farem v blízkosti thajské pobřeží. (Takasu et al., 2011)

I když je známo, že cílovým organismem antibiotik jsou bakterie, mohou antibiotika způsobovat nežádoucí účinky i na eukaryotních organismech - řasách, zejména na jejich organelách, jako jsou chloroplast a mitochondrie, protože ty s bakteriemi sdílejí určité strukturální podobnosti a dokonce i evoluční původ. (Vannini et al., 2011)

Ciprofloxacin se hlavním cílem ekotoxikologických studií stává až v posledních několika letech, kde je zkoumán především v řasových testech a na mořských organismech, kde je nejčastěji porovnáván s ostatními antibiotiky či v kombinaci s těžkými kovy.

Ciprofloxacin má zvláštní význam pro ekotoxikologii i z toho důvodu, že byly hlášeny jeho genotoxické a mutagenní účinky. (Hartmann et al., 1999; Hu et al., 2007; Kümmerer et al., 2000; Yim et al., 2011)

V této práci byl prováděn Vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*. Zkoušené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 50,00–0,02 mg/l pro jednotlivé vzorky a byly zjištěny tyto hodnoty střední efektivní koncentrace:

24hEC₅₀ = 0,12 mg/l (0,11-0,14 mg/l) pro ciprofloxacin, 24hEC₅₀ = 0,18 mg/l (0,15-0,22 mg/l) pro ibuprofen, 24hEC₅₀ = 0,08 mg/l (0,07-0,10 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 1:1, 24hEC₅₀ = 0,14 mg/l (0,11-0,18 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 1:2, 24hEC₅₀ = 0,19 mg/l (0,17-0,22 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 2:1.

Vícegeneračním testem na jiném organismu (*Daphnia magna*) se zabývala například skupina kolem Bona 2015 a stanovila EC₅₀ pro tři antibakteriální látky (enrofloxacin, ciprofloxacin, trimethoprim), která byla v rozmezí 6,5-37 mg/l.

Gürbay a kol. (2005) zkoumal obecně toxický vliv ciprofloxacinu a stanovil hodnotu IC₅₀ na 100 mg/l. Bakteriální testy s *Vibrio fischeri* odhalily hodnotu EC₅₀ vyšší než 5,9 mg/l. (Hernando et al., 2007)

Eukaryotické mikrořasy se zdají být obecně méně citlivé než prokaryota. Například 72hEC₅₀ pro řasu *Pseudokirchneriella subcapitata* byla zjištěna 2,97 mg/l pro ciprofloxacin a 7,8 mg/l pro sulfadiazin. (Holten Lützhøft et al., 1999)

Liu et al. ve své studii z roku 2011 stanovil 96hIC₅₀ na *P. subcapitata* pro erytromycin 0,20 mg/l, pro ciprofloxacin 3,07 mg/l a pro sulfamethoxazol 4,40 mg/l (data nebyla publikovaná) a zjistil, že fotosyntéza řasy *P. subcapitata* byla nejvíce citlivá na expozici erythromycinem.

Toxicita ciprofloxacinu a sulfamethoxazolu pro *P. subcapitata* byla mnohem nižší v důsledku různých detoxikačních mechanismů. (Niea et al., 2013)

Hodnoty EC₅₀ pro zelené řasy *Selenastrum capricornutum* a *Pseudokirchneriella subcapitata* byly stanoveny v rozmezí 9000 nmol/l a 56000 nmol/l. (Halling-Sørensen et al., 2000; Martins et al., 2012; Robinson et al., 2005)

Nejcitlivější k životnímu prostředí se ukazují být prokaryotické organismy. Jejich hodnoty EC₅₀ pro ciprofloxacin ze standardních jednotlivých druhů testů se pohybují mezi 15 a 51 nmol/l pro sinici *Microcystis aeruginosa* (Halling-Sørensen et al., 2000; Robinson et al., 2005) a 241 nmol/l pro gramnegativní bakterie *Pseudomonas putida*. (Kümmerer et al., 2000)

Zhang ve své studii z roku 2012 píše, že ciprofloxacin je ve srovnání s oxytetracyklinem méně toxický, jak pro bakterie, tak i pro řasy. Kovy (Zn, Cd, Cu) jsou celkově toxickejší než antibiotika a řasy byly na testované chemikálie citlivější než bakterie.

Matera a kol. (2014) zjistil ve své studii s ciprofloxacinem, tamoxifenem a cyklofosfamidem, že směsi mají synergický efekt a že tyto účinky jsou výraznější po 72h expozici ve srovnání s nižší dobou expozice.

Vlastnosti ciprofloxacinu může ovlivňovat také částečně jeho vazba do komplexu s dvojmocnými kationty, nacházejí se v mořských vodách, což dále snižuje biologickou dostupnost ve srovnání se sladkými vodami. (Parolini et al., 2011)

Názory na nežádoucí účinky a rizikovost ciprofloxacinu pro životní prostředí se u různých autorů liší. Někteří předpokládají například jen velmi malou pravděpodobnost nepříznivých účinků na vodní organismy. (Golet et al., 2002; Al Aukidy et al., 2012) Naproti tomu, Halling-Sørensen a kol. (2000) odhaduje, že ciprofloxacin by mohl představovat riziko pro životní prostředí v Evropě, na základě obecnějšího hodnocení PEC/PNEC. V poslední době Zhang et al., 2012 ve své publikaci rovněž dospěl k závěru, že ciprofloxacin může představovat značné riziko pro citlivé vodní organismy v asijských povrchových vodách.

Naproti tomu ibuprofen je v ekotoxikologii jedna z nejčastěji zkoumaných látek už po několik desítek let. Koncentrace ibuprofenu (IBU) v povrchových vodách se pohybují v rozmezí ng/l - µg/l. Koncentrace, které byly naměřené v evropských zemích, se pohybují mezi 0,042-1,26 µg/l. (Santos et al., 2010) Ve Velké Británii byly naměřeny průměrné koncentrace ibuprofenu 0,93 µg/l, dosahující maximálních hodnot až 5 µg/l. (Ashton et al., 2004; Thomas et al., 2004) V Norsku byl nalezen ibuprofen a jeho metabolity ve všech vzorcích odpadních vod, ale i v mořské vodě v koncentracích 0,1 až 20 µg/l (součet ibuprofenu a metabolitů). (Weigel et al., 2004)

Relativně byly hlášeny vyšší koncentrace IBU pro přítoky odpadních vod (až do 84 µg/l) a pro odpadní vody z čistíren odpadních vod až do 22 µg/l (Brun et al., 2006; Gomez et al., 2007) a v evropských STP v rozmezí 0,15 až 4,8 µg/l. (Santos et al., 2010)

Hlavním mechanismem, který se podílí na odstranění IBU v čistírnách odpadních vod, je biologický rozklad. Účinnost odstranění je poměrně vysoká (60 ± 98 %), ale záleží na sezónních podmínkách. Kromě ibuprofenu jsou v odpadních vodách často nalezeny i jeho metabolity. (Jones et al., 2007; Suárez et al., 2008)

Většina prováděných studií se zaměřuje na zjišťování akutní toxicity s cílem zjistit úmrtnost, málo studií se zabývá zjišťováním cyto-genetického poškození v rámci dlouhodobého působení. (Parolini et al., 2011)

V některých akutních testech, které byly provedeny na korýši *Daphnia magna*, bylo zjištěno, že 48hEC₅₀ pro nehybnosti se pohybuje mezi 10 a 100 mg/l pro ibuprofen. (Cleuvers, 2003; Cleuvers, 2004; Heckmannem et al., 2005; Han et al., 2006) Studie akutní toxicity pro vodní organismy ukazují, že IBU nevykazuje žádné letální účinky při koncentraci pod 10 mg/l. (Cleuvers, 2003)

Parolini a kol. (2009) testovali několik koncentrací vybraných léčiv na mlži *Dreissena polymorpha* a byli schopni vypočítat hodnoty EC₅₀, které byly 178 µg/l pro diklofenak, 350 µg/l pro paracetamol a 1312 µg/l pro ibuprofen. Z toho vyplývá, že ibuprofen má nejnižší akutní toxicitu mezi testovanými molekulami (dosahující hodnoty EC₅₀ jsou až 7-krát vyšší než pro diklofenak). Tato pozorování potvrzují směrnice EU 93/67/EHS, který klasifikuje látky podle jejich naměřené efektivní koncentrace (CEC, 1996). Při použití této klasifikace je ibuprofen klasifikován jako toxický pro *Dreissena polymorpha* s EC₅₀ mezi 1 a 10 mg/l, zatímco paracetamol a diklofenak jsou klasifikovány jako velmi toxické (EC₅₀ < 0,1-1 mg/l).

Pokud bychom směrnici aplikovali na naše výsledky, mohli bychom označit obě látky, ciprofloxacin a ibuprofen, i jejich směsi v různých poměrech jako

velmi toxické pro *Tetrahymena thermophila*, neboť námi zjištěné hodnoty EC₅₀ byly v rozsahu 0,1-1 mg/l.

Ve většině studií porovnávajících ibuprofen s ostatními NSAID (často je zahrnut i paracetamol) vyplývá, že nejméně toxický je ibuprofen. Naopak jako nejvíce toxický se jeví paracetamol (je to dáno rozdílnou biologickou dostupností a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda). (Parolini et al., 2009)

Dle Lánga a Cleuverse je pořadí toxicity totožné: diklofenak > ibuprofen > naproxen a propranolol > metoprolol. Toto pořadí vychází z molekulárních vlastností a s tím spojené i biologické distribuci, kterou určuje především rozdělovací koeficient oktanol/voda. V experimentu se ukazuje, že se toxicita zvýšila spolu s log Kow : diklofenak (log Kow = 4,4) > ibuprofen (log Kow = 3,5) > naproxen (log Kow = 3,3) a propranolol (log Kow = 3,0) > metoprolol (log Kow = 1,9). Toto pozorování je v souladu s další studií od Cleuverse, 2004, který na dafních a řasách využívá QSAR přístupu a hodnotí, že čím vyšší je log Kow látky, tím vyšší je i její toxicita.

Jak již bylo zmíněno výše, Cleuvers v roce 2003 publikoval studii zaměřenou na stanovení toxicity léčiv, mezi nimi i sodné soli ibuprofenu (v koncentracích 1; 3,2; 10; 32; 100 mg/l). Získal hodnoty EC₅₀ pro jednotlivé organismy: 108 mg/l (*Daphnia magna*), 315 mg/l (*Desmodesmus subspicatus*) a 22 mg/l (*Lemna minor*).

Láng získal hodnotu EC₅₀ pro *Tetrahymena pyriformis* 46,78 mg/l. Tato hodnota je srovnatelná i s ostatními údaji v literatuře, jako např. se studií od Cleuverse (2003). Při screeningu 14 různých léčiv se ukázalo, že *Tetrahymena pyriformis* byla nejvíce citlivá především na β -blokátory a NSAID.

Naproti tomu do dnešní doby bylo provedeno výrazně méně studií, které by se zaměřovaly na chronické účinky ibuprofenu na vodní organismy.

Předchozí studie ukázaly pouze zanedbatelné důsledky při chronické expozici na bezobratlé. Parolini (2011) však ve své studii uvádí, že ibuprofen by mohl být problematický pro mušle a tím i pro celou vodní biotu, protože jeho výsledky odhalily, že krátkodobá chronická expozice (96 h) byla schopna vyvolat mírné buněčné a genetické poškození u exponovaných mlžů.

Parolini (2009) se také zaměřil na srovnání toxických účinků analgetik. Ukázalo se, že paracetamol má největší cytogenotoxický potenciál, následovaný diklofenakem, zatímco ibuprofen nejméně poškozoval jak DNA, tak i lysozomální membránu. Důvodem pro větší toxicitu paracetamolu mohou být ve skutečnosti rozdílné biologické dostupnosti jednotlivých léčiv.

K rozšíření těchto testů mohlo dojít díky rozvoji některých analytických metod, které jsou při nich využívány. Genotoxicita byla hodnocena pomocí SCGE (single cell gel electrophoresis/jednobuněčná gelová elektroforéza) a difúzního DNA testu, zatímco cytotoxicita byla hodnocena pomocí NRRA (neutral red retention assay/retenčního testu s neutrální červení).

Ibuprofen je podezřelý i z ovlivnění pohlavních steroidních hormonů přes steroidogenní dráhy u obratlovců i bezobratlých. Han (2010) ve své studii zkoumal účinek ibuprofenu na rovnováhu pohlavních hormonů in vitro za použití H295R buněk. Také provedl zkoušky na chronickou toxicitu za použití sladkovodní ryby *Oryzias latipes* a dvou sladkovodních perlooček, *Daphnia magna* a *Moina macrocopa*. V závislosti na dávce ibuprofenu se produkce testosteronu snižovala. Pro *D. magna* získal hodnoty 48hEC₅₀ 51,4 mg/l a 21d reprodukce NOEC byla <1,23 mg/l; pro *M. macrocopa* 48hEC₅₀ byla 72,6 mg/l a 7d reprodukce NOEC byla 25 mg/l. Pro *O. latipes* byla 120d NOEC 0,0001 mg/l.

Heckmann a kol. (2007) zkoumali reprodukci a růst populace *D. magna* při dlouhodobé expozici ibuprofenem a zjistili pro reprodukci 14-denní EC₅₀ 13,4 mg/l a NOEC 20 mg/l.

Pascoe a kol. (2003) zjistili, že ibuprofen, kyselina acetylsalicylová a paracetamol neměly žádný vliv na žahavce *Hydra vulgaris* v koncentracích až do 1 mg/l po 7-denní expozici. Nicméně, koncentrace 1 mg/l byla dostatečná pro snížení růstu o 25 % pro *Lemna minor*, se 7-denní EC₅₀ 4 mg/l. (Pomati et al., 2004)

Naopak stejní autoři zjistili, že růst sinice *Synechocystis sp.* byl stimulován v koncentraci 10 µg/l ibuprofenu.

Obě zkoumané látky – ciprofloxacin a ibuprofen byly již ve směsích hodnoceny, ale pouze s látkami ze stejné skupiny (ibuprofen s ostatními NSAID, ciprofloxacin s ostatními antibiotiky).

Láng a Kőhidai (2012) ve své studii zjistili, že kombinace ibuprofenu a diklofenaku působí antagonisticky (což lze možná vysvětlit stejným mechanismem účinku těchto léčiv) a kombinace ibuprofenu s β -blokátory (metoprolol, propranolol) působí při nízkých koncentracích aditivně, při vyšších pak také antagonisticky. Cleuvers (2003) se zabýval hodnocením směsi ibuprofenu, diklofenaku, naproxenu a kyseliny acetylsalicylové. Hodnota EC_{50} pro ibuprofen ve směsi byla 85,6 mg/l pro *D. subspicatus* a 25,3 mg/l pro *Daphnia magna*. Vzájemné působení těchto látek bylo vyhodnoceno jako aditivní.

Jelikož Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila* nebyl prováděn poprvé, získané výsledky se více shodují s výsledky z ostatních studií. Jde především o zkušenosti v provedení samotného testu a také o zkušenosti s chováním jednotlivých látek ve vodě.

Pokud porovnáme všechny výsledky, ibuprofen s ciprofloxacinem se ve své míře toxicity významně neliší. Jako nejtoxičtější se jeví ciprofloxacin s ibuprofenem v poměru 1:1, jehož hodnota EC_{50} je nejnižší ($24hEC_{50} = 0,08$ mg/l). Všechny hodnoty jsou si však velmi blízké a nejde z nich vyvodit, zda látky ve směsi působí synergicky či aditivně.

Vzhledem k získaným hodnotám lze odhadnout, že dané látky nebudou vykazovat akutní toxicitu vůči vodním organismům v porovnání s hodnotami koncentrací nalezených v životním prostředí. Odhadnout vliv těchto látek na organismy při chronickém působení v nízkých koncentracích bude chtít ještě řadu dalších testů, ale nepříznivé účinky při tomto působení se zdají být mnohem pravděpodobnější.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo navázat na moji diplomovou práci (Chronická toxicita směsi léčiv) a rozšířit tak spektrum testovaných látek pomocí Vícegeneračního testu s organismem *Tetrahymena thermophila*. Porovnáním získaných výsledků z této práce s výsledky z ostatních studií jsme se pokusili odhadnout možný dopad těchto látek na životní prostředí.

Pro jednotlivé vzorky a byly zjištěny tyto hodnoty střední efektivní koncentrace: $24hEC_{50} = 0,12$ mg/l (0,11-0,14 mg/l) pro ciprofloxacin, $24hEC_{50} = 0,18$ mg/l (0,15-0,22 mg/l) pro ibuprofen, $24hEC_{50} = 0,08$ mg/l (0,07-0,10 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 1:1, $24hEC_{50} = 0,14$ mg/l (0,11-0,18 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 1:2, $24hEC_{50} = 0,19$ mg/l (0,17-0,22 mg/l) pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu v poměru 2:1.

Výsledky ukazují, že pozorované účinné koncentrace jsou většinou alespoň o tři řády vyšší, než koncentrace nalezené v životním prostředí. Z toho vyplývá, že akutní toxické účinky těchto léčiv ve vodním prostředí se zdají být nepravděpodobné. Nicméně za určitých okolností se mohou objevit významné nepříznivé účinky a to v případech výjimečných znečištění (např. úniky z farmaceutických výrobních zařízení, vypouštění znečištěných odpadních vod z ČOV během dešťového průtoku nebo při nadměrném používání profylaktické léčby v akvakultuře).

Celkově však získané hodnoty z testů neumožňují obecný závěr toxikologického rizika pro dané látky, protože byly zjištěny velké místní a regionální rozdíly v expozičních koncentracích, které vyžadují posouzení specifické vždy pro konkrétní místo.

Pro lepší pochopení možných dopadů nežádoucích účinků na organismy by bylo lepší provádět testy se zaměřením na cílové molekuly, tkáně a orgány, vycházející z předpokládaného mechanismu účinku látek. Ty by pak mohly přinést smysluplnější výsledky a poznatky o účincích na přežití, růst a

rozmnožování než tradiční standardní testy akutní toxicity. Proto je potřeba provést více studií zaměřujících se na možné dlouhodobé ekotoxikologické účinky, a to zejména s ohledem na možné poruchy v hormonální homeostáze vyvolané endokrinními disruptory, na imunologický stav nebo ovlivnění genetické informace při dlouhodobé expozici.

7. SEZNAM LITERATURY

Al Aukidy, M.; Verlicchi, P.; Jelic, A. et al.: Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, **438**, 2012, s. 15–25.

Anadón, A; Martínez-Larrañaga, M. R.; Iturbe, J. et al.: Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, **71(2)**, 2001, s. 101-109.

Ashton, D.; Hilton, M.; Thomas, K. V.: Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, **333**, 2004, s. 167–184.

Batt, A. L.; Snow, D. D.; Aga, D. S.: Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere*, **64**, 2006, s. 1963–1971.

Bergmann, A.; Fohrmann, R.; Weber F. A.: Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. 66/2011Umweltbundesamt, 2011.

Bona, M. D.; Zounková, R.; Merlanti, R. et al.: Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **113**, 2015, s. 152–158.

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

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

Brun, G. L.; Bernier, M.; Losier, R. et al: Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25(8)**, 2006, s. 2163–2176.

Cabello, F. C.: Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, **8(7)**, 2006, s. 1137–1144.

Cabello, F. C.; Godfrey, H. P.; Tomova, A. et al.: Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, **15(7)**, 2013, s. 1917–1942.

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

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

Český Lékopis 2009 (ČL 2009), Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX). 2. díl, 1. vyd., Grada Publishing a. s., Praha, 2009, s. 1719, 2301.

Dinh, Q. T.; Alliot, F.; Moreau-Guigon, E. et al.: Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta*, **85(3)**, 2011, s. 1238–1245.

Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D.: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, **76**, 2006, s. 122-159.

Focazio, M. J.; Kolpin, D. W.; Barnes, K. K. et al.: A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, **402**, 2008, s. 201–216.

Golet, E. M.; Alder, A. C.; Giger, W.: Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, **36**, 2002, s. 3645–3651.

Gómez, M. J.; Martínez-Bueno, M. J.; Lacorte, S. et al.: Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, **66**, 2007, s. 993–1002.

Gürbay, A.; Osman, M.; Favier, A.: Ciprofloxacin-induced cytotoxicity and apoptosis in HeLa cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **15(5)**, 2005, s. 339–342.

Halling-Sørensen, B.: Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, **40**, 2000, s. 731–739.

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

Han, S.; Choi, K.; Kim, J. et al.: Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology*, **98(3)**, 2010, s. 256–264.

Hartmann, A.; Golet, E. M.; Gartsler, S. et al.: Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36(2)**, 1999, s. 115–119.

He, X.; Wang, Z.; Nie, X. et al.: Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Geochemistry and Health*, **34(3)**, 2012, s. 323–335.

Heckmann, L. H.; Callaghan, A.; Hooper, H. L. et al.: Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, **172(3)**, 2007, s. 137-145.

Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R. et al.: Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, **69**, 2006, s. 334–342.

Hernando, M. D.; Vettori, S.; Bueno, M. J. M. et al.: Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, **68(4)**, 2007, s. 724–730.

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050> (staženo 17. 10. 2014).

http://www.druglib.com/druginfo/motrin/description_pharmacology/
(staženo 3. 11. 2014).

<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (staženo 14. 10. 2014).

<http://www.sukl.cz/souisejici-informace-1> (staženo 14. 11. 2014).

<http://zdravi.e15.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/spotreba-leciv-v-cr-v-poslednim-desetileti-451773> (staženo 14. 11. 2015).

Hu, J.; Wang, W.; Zhu, Z. et al.: Quantitative structure – activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environmental Science & Technology*, **41(13)**, 2007, s. 4806–4812.

Hughes, S. R.; Kay, P.; Brown, L. E.: Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environmental Science & Technology*, **47(2)**, 2013, s. 661–67.

Hynie, S.: Farmakologie v kostce. 2. vyd., Triton, Praha, 2001, s. 415, 201, 203.
Jeřábek, J.: Metabolismus a účinky eikosanoidů. 2011, dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Neopioidn%C3%AD_analgetika, staženo 10. 1. 2012.

Johansson, C. H.; Janmar, L.; Backhaus, T.: Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. *Aquatic Toxicology*, **156**, 2014, s. 248–258.

Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N.: The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment. *Environmental Pollution*, **145**, 2007, s. 738–744.

Karthikeyan, K. G.; Meyer, M. T.: Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*, **361**, 2006, s. 196–207.

Kočí V.; Mocová, K.: Ekotoxikologie pro chemiky. 1. vyd., VŠCHT, Praha, 2009, s. 17.

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T. et al.: Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, **36**, 2002, s. 1202–1211.

Kolpin, D. W.; Skopec, M.; Meyer, M. T. et al.: Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, **328**, 2004, s. 119–130.

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

Kümmerer, K.: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, **45(6–7)**, 2001, s. 957-969.

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

Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Mersch-Sundermann, V.: Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, **40**, 2000, s. 701–710.

Lalumera, G. M.; Calamari, D.; Galli, P. et al.: Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, **54(5)**, 2004, s. 661-668.

Láng, J.; Kőhidai, L.: Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere*, **89(5)**, 2012, s. 592–601.

Li, W.; Shia, Y.; Gao, L. et al.: Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, **89(11)**, 2012, s. 1307–1315.

Lin, A. Y. C.; Tsai, Y. T.: Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment*, **407**, 2009, s. 3793–3802.

Lincová, D.; Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé, doplněné a přepracované vydání, Galén, Praha, 2007, s. 540-543, 297-299.

Liu, B. Y.; Nie, X. P.; Liu, W. Q. et al.: Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**, 2011, s. 1027–1035.

Locatelli, M. A. F.; Sodr , F. F.; Jardim, W. F.: Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **60(3)**, 2011, s. 385–393.

Martinez, J. L.: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, **157**, 2009, s. 2893–2902.

Martins, N.; Pereira, R.; Abrantes, N.: Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, **21(4)**, 2012, s. 1167–1176.

Matera, N.; Geret F.; Castillo, L. et al.: In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environment International*, **63**, 2014, s. 191–200.

Mikroverze AISLP –  R 2014.7, stav k 1. 7. 2014.

Mlad nka, P.: P edn ška z Farmakologie - Chinolony, akademick  rok 2011/2012.

Nie, X. P.; Liu, B. Y.; Yu, H. J. et al.: Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Pollution*, **172**, 2013, s. 23–32.

Nouws, J. F. M; Mevius, D. J.; Vree, T. B. et al.: Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. *Veterinary Quarterly*, **10(3)**, 1988, s. 156-163.

- Nowak, K. M.; Girardi, C.; Miltner, A. et al.: Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil. *Science of The Total Environment*, **445–446(15)**, 2013, s. 377–384.
- Parolini, M.; Binelli, A.; Cogni, D. et al.: An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro*, **23(5)**, 2009, s. 935–942.
- Parolini, M.; Binelli, A.; Provini, A.: Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74(6)**, 2011, s. 1586–1594.
- Pascoe, D.; Karntanut, W.; Müller, C. T.: Do pharmaceuticals effect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, **51**, 2003, s. 521–528.
- Petrovič, M.; Hernando, M. D.; Díaz-Cruz, M. S. et al.: Liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples (Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part IV). *Journal of Chromatography A*, **1067(1–2)**, 2005, s. 1–14.
- Pomati, F.; Netting, A. G.; Calamari, D. et al.: Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, **67(4)**, 2004, s. 387-396.
- Quinn, B.; Gagné, F.; Blaise, Ch.: The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment*, **402(1)**, 2008, s. 62–69.
- Richard, J.; Boergers, A.; Eyser, C. et al.: Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **217(4–5)**, 2014, s. 506–514.

Richardson, B. J.; Lam, P. K. S.; Martin, M.: Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Marine Pollution Bulletin*, **50(9)**, 2005, s. 913-920.

Robinson, A.; Belden, J. B.; Lydy, M. J.: Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24(2)**, 2005, s. 423-430.

Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H. J. et al.: Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, **938**, 2001, s. 199-210.

Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E.: Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment International*, **33**, 2007, s. 596-601.

Santos, J. L.; Aparicio, I.; Callejon, M.; Alonso, E.: Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewater from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, **164**, 2009, s. 1509-16.

Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, N.; Fachini, A. et al.: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, **175(1-3)**, 2010, s. 45-95.

Schwabe, U.: Arzneimittelverordnungsreport 2010, Springer, 2010.

SPC Apo-Ibuprofen 400 mg, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0125525&tab=texts> (staženo 13. 10. 2014)

SPC Brufen 400, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0203017&tab=texts> (staženo 13. 10. 2014)

SPC Ciplox 250, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015653&tab=texts> (staženo 12. 10. 2014)

SPC Ciprinol 500, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0096039&tab=texts> (staženo 12. 10. 2014)

SPC Ibuprofen AL 400, dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0032018&tab=texts> (staženo 13. 10. 2014)

Suárez, S.; Carballa, M.; Omil, F. et al.: How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **7**, 2008, s. 125–138.

Suchopár, J.: Ceny a úhrady léčivých přípravků v ČR- pohled na minulost a budoucnost, dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/29/>.

Suchopár, J.; Valentová, Š.; Šimek, R.: Remedial compendium, 4. vydání, Panax, Praha, 2009, s. 391-394, 679, 680, 684, 685.

Takasu, H.; Suzuki, S.; Reungsang, A. P. et al.: Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand. *Microbes and Environments*, **26(2)**, 2011, s. 135–143.

Ternes, T. A.; Joss, A.; Siegrist, H.: Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, **38**, 2004, s. 392–399.

Ternes, T.; Stuber, J.; Herrmann, N. et al.: Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?. *Water Research*, **37(8)**, 2003, s. 1976–1982.

Thomas, K. V.; Hilton, M. J.: The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, **49(5–6)**, 2004, s. 436–444.

Thomas, P. M.; Foster, G. D.: Tracking acidic pharmaceutical, caffeine, and triclosan through the wastewater treatment process. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2005, s. 25–30.

Tlustá, E. et al.: Význam sledování spotřeby léčiv ve farmakoepidemiologii na příkladech longitudinálních studií inhibitorů protonové pumpy, antibiotik a metforminu. *Klinická farmakologie a farmacie*, **24(2)**, 2010, s. 66–70.

Urbánek, K.; Štika, L.: Studium spotřeby léčiv v klinické farmakologii. *Postgraduální medicína*, **3**, 2002, s. 301.

Vannini, C.; Domingo, G.; Marsoni, M. et al.: Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, **101**, 2011, s. 459–465.

Weigel, S.; Berger, U.; Jensen, E. et al.: Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, **56**, 2004, s. 583–92.

WHO Collaborating Centre For Drug Statistics Methodology: Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index including Defined Daily Doses (DDDs) for plain substances. World Health Organization, Oslo, 2000.

WHO Collaborating Centre For Drug Statistics Methodology: Future role for ATC and DDDs. *WHO Drug information*, **11(2)**, 1997, s. 51–52.

WHO Collaborating Centre For Drug Statistics Methodology: Guidelines for ATC classification and DDD assignment. World Health Organization, Oslo, 2000.

Xia, K.; Bhandari, A.; Das, K. et al.: Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 2005, s. 91–104.

Yang, S.; Carlson, K.: Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Research*, **38(14–15)**, 2004, s. 3155-3166.

Yim, G.; McClure, J.; Surette, M. G. et al.: Modulation of Salmonella gene expression by subinhibitory concentrations of quinolones. *The Journal of Antibiotics*, **64(1)**, 2011, s. 73–78.

Zhang, C.; Zhou, X.; Chen, J. et al.: Dynamics and fate of ciprofloxacin in a simulated aquatic system. *Journal of Ecology and Rural Environment*, **25**, 2009, s. 73–78.

Zhang, Y.; Cai, X.; Lang, X. et al.: Insights into aquatic toxicities of the antibiotics oxytetracycline and ciprofloxacin in the presence of metal: Complexation versus mixture. *Environmental Pollution*, **166**, 2012, s. 48–56.

Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R. et al.: Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, **179(1-3)**, 2010, s. 1042–1048.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor rigorózní práce: Mgr. Kateřina Podlipská

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

Název rigorózní práce:

Hodnocení toxicity směsi léčiv

V této práci byly hodnoceny dvě látky, ibuprofen, ze skupiny nesteroidních a protizánětlivých léčiv, a ciprofloxacin, ze skupiny fluorochinolonových antibiotik. Tyto látky patří mezi léčiva s celosvětově nejvyšší spotřebou a jsou velmi často detekovány v životním prostředí. V této práci byla sledována chronická toxicita těchto léčiv a jejich směsí za využití Vícegeneračního testu toxicity s prvokem *Tetrahymena thermophila*. Pro ciprofloxacin byla zjištěna hodnota $24hEC_{50} = 0,12$ mg/l (0,11-0,14 mg/l), pro ibuprofen byla $24hEC_{50} = 0,18$ mg/l (0,15-0,22 mg/l), pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu (v poměru 1:1) byla $24hEC_{50} = 0,08$ mg/l (0,07-0,10 mg/l), pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu (v poměru 1:2) byla $24hEC_{50} = 0,14$ mg/l (0,11-0,18 mg/l) a pro směs ciprofloxacinu a ibuprofenu (v poměru 2:1) $24hEC_{50} = 0,19$ mg/l (0,17-0,22 mg/l). Synergické nebo aditivní působení těchto dvou léčiv ve směsi nebylo pozorováno.

Klíčová slova: ekotoxikologie, ciprofloxacin, chronická toxicita, ibuprofen, *Tetrahymena thermophila*.

Abstract

Charles University in Prague

Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Mgr. Kateřina Podlipská

Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of thesis:

Evaluation of drugs mixture toxicity

In this thesis were evaluated two substances, ibuprofen, from the group of non-steroidal and anti-inflammatory drugs, and ciprofloxacin, from the group of fluoroquinolone antibiotics. These substances belong to drugs with the highest worldwide consumption and are very often detected in the environment. In this thesis was monitored chronic toxicity of these drugs and their mixtures by using Multigenerational toxicity test with the protozoan *Tetrahymena thermophila*. For ciprofloxacin was detected the value of 24hEC₅₀ 0,12 mg/l (0,11 to 0,14 mg/l), for ibuprofen was 24hEC₅₀ 0,18 mg/l (0,15 to 0,22 mg/l), for the mixture of ciprofloxacin and ibuprofen (in ratio 1:1) was 24hEC₅₀ 0,08 mg/l (0,07 to 0,10 mg/l), for the mixture of ibuprofen and ciprofloxacin (in ratio 1:2) was 24hEC₅₀ 14 mg/l (0,11 to 0,18 mg/l) and for the mixture of ibuprofen and ciprofloxacin (in ratio 2:1) was 24hEC₅₀ 0,19 mg/l (0,17 to 0,22 mg/l). Synergistic or additive effect of these two drugs in the mixture was not observed.

Keywords: ecotoxicology, ciprofloxacin, chronic toxicity, ibuprofen, *Tetrahymena thermophila*.