

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**



**Porovnání LD50 na potkanech po různé  
aplikaci – analýza QAAR**

**Bakalářská práce studijního oboru  
Klinická a toxikologická analýza**

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele - garanta Doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc. a školitele Doc. RNDr. M. Tichého, DrSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Státní zdravotní ústav je možné pouze po písemném souhlasu.

V Praze dne *24. 9. 2006* .....

*Kopová Jana*  
.....  
podpis

Děkuji svému školiteli - garantovi Doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc. a svému školiteli Doc. RNDr. M. Tichému, DrSc. za zadání tématu, podporu, trpělivost a rady při vypracování bakalářské práce.

Děkuji svým rodičům a všem svým přátelům za podporu během celého studia.

## OBSAH

Seznam zkratk a symbolů .....	5
1 ÚVOD .....	6
1.1 Cíl práce .....	6
1.2 Analýza QSAR .....	7
1.2.1 Extrapolace toxických indexů mezi druhy .....	7
1.3 Letální dávka LD <sub>50</sub> .....	8
1.4 Letální koncentrace LC <sub>50</sub> .....	9
1.5 Analýza QAAR .....	9
2 MATERIÁL A METODY .....	9
2.1 Popis objektu .....	9
2.2 Metody stanovení orální LD <sub>50</sub> .....	10
2.2.1 Akutní toxicita orální – metoda fixní dávky .....	10
2.2.2 Akutní toxicita orální – metoda stanovení třídy akutní toxicity ....	11
2.3 Metody stanovení intraperitoneální LD <sub>50</sub> .....	12
2.4 Metody stanovení inhalační LC <sub>50</sub> .....	12
2.4.1 Akutní toxicita inhalační .....	12
2.5 Chemikálie .....	13
2.6 Výpočty .....	14
2.7 Výběr a zpracování dat .....	14
3 VÝSLEDKY A DISKUSE .....	15
4 ZÁVĚR .....	22
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	23
6 PŘÍLOHY .....	24

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

*A* – biologická účinnost látky

*c* – koncentrace (mg/kg, mg/l, mmol/kg, mmol/l, ppm)

**HAZARDTEXT** – Hazard Management = datová báze vedoucí seznam nebezpečných látek

**HSDB** – Hazardous Substance Data Bank = datová banka nebezpečných látek

**LC<sub>50</sub>** – smrtelná koncentrace, která způsobí úhyn 50 % jedinců z testovaného souboru

**LD<sub>50</sub>** – smrtelná dávka, která způsobí úhyn 50 % jedinců z testovaného souboru

**log *c*** – logaritmus hodnoty molární koncentrace

**log *P*** – logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi n-oktanol a vodu

***M*** – molekulová hmotnost (g/mol)

***n*** – počet testovaných chemických sloučenin

***p*** – hladina statistické významnosti

***P(o/v)*** – rozdělovací koeficient mezi n-oktanol a vodu

**QAAR** – Quantitative Activity Activity Relationships = kvantitativní vztahy mezi různými účinnostmi

**QSAR** – Quantitative Structure Activity Relationships = kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností

***r*** – korelační koeficient

**RTECS** – Registry of Toxic Effects of Chemical Substance = seznam toxických efektů chemických látek

***SD*** – standardní odchylka

***X<sub>i</sub>*** – fyzikálně chemická vlastnost látky

# 1 ÚVOD

K rozvoji chemického průmyslu a využívání chemických látek a jejich směsí se nedílně váže potřeba společnosti chránit sebe i životní prostředí před nežádoucími účinky těchto látek a směsí. V důsledku toho je kladen důraz na bezpečnost těchto látek a jejich používání a vývoj metod, které by toto zaručovaly.

Cílem experimentů a testů na pokusných zvířatech je chránit společnost i životní prostředí před toxickými a nežádoucími účinky chemických látek a jejich směsí. Na druhé straně je jedním z požadavků dnešní společnosti, k němuž se nedílně váže koncepce 3R (reduce, refine, replace), omezení pokusů na laboratorních zvířatech. Výsledkem je dnes snaha používat místo savců nižší organismy, buňky a tkáňové kultury a využívat chemické struktury a počítače jako alternativní metody.

Alternativní metody jsou tedy metody, které pomáhají snížit, vylepšit či nahradit používání pokusů na zvířatech k testování toxicity v případě, že podávají informace stejné úrovně jako jsou informace získané z testů na zvířatech [1].

Je tedy důležité nalézt takové metody testování toxicity chemických látek a jejich směsí, které budou vyhovovat všem požadavkům (spolehlivost, nákladnost, časová dostupnost, šetření laboratorních zvířat) jako již známé alternativní metody *in vitro* a *in silico*. Testy *in vitro* rozumíme testy na tkáních, tkáňových řezech a buňkách. Metody *in silico* jsou odhady výpočtem pomocí modelů vytvořených na počítači. Mezi tyto modely patří především QSAR (Quantitative Structure – Activity Relationships), tedy kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností [2]. Dále pak model QAAR (Quantitative Activity – Activity Relationships), tedy kvantitativní vztahy mezi různými účinnostmi (extrapolace toxických indexů mezi druhy) [3].

## 1.1 Cíl práce

1. Vytvoření databáze indexů akutní toxicity  $LD_{50}$  pro potkana při orální, inhalační a intraperitoneální aplikaci.
2. Testování korelace mezi hodnotami  $LD_{50}$  měřených po různé aplikaci a při různé expozici a hydrofobním parametrem látek – logaritmem rozdělovacího koeficientu mezi n-oktanol a vodu;  $\log P$ .
3. Testování korelace mezi hodnotami  $LD_{50}$  pro potkana při orální, inhalační a intraperitoneální aplikaci měřených při různé expozici.

## 1.2 Analýza QSAR

Metody QSAR se zabývají kvantitativními vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností. Analýza QSAR spočívá v tom, že pro vybranou sérii chemických látek lze matematickou formulí kvantitativně vyjádřit závislost mezi změnou chemické struktury dané látky a změnou měřené biologické účinnosti, která po změně struktury následuje. Pro popis chemické struktury se nejčastěji používá rozdělovací koeficient dané látky mezi *n*-oktanol a vodu. To znamená, že převážná většina rovnic QSAR obsahuje jako nezávisle proměnnou stejnou veličinu [3].

### 1.2.1 Extrapolace toxických indexů mezi druhy

Extrapolace toxických indexů mezi druhy stanovených na různých testovacích systémech trápí pracovníky nejrůznějších oborů. Výsledky řady testů na biologických systémech a pokusných zvířatech jsou extrapolovány na údaje pro člověka za předpokladu, že člověk reaguje podobně jako model.

Předpokládáme-li dvě různé biologické účinnosti  $A_1$  a  $A_2$ , metodami analýzy QSAR získáme pro každou z účinností matematickou formulí, která kvantitativně vyjadřuje vztah struktura – účinnost ve vybrané sérii látek rovnicemi (1) a (2), kde  $X_i$  znázorňuje fyzikálně - chemickou vlastnost (v tomto případě rozdělovací koeficient látek mezi *n*-oktanol a vodu  $P(o/v)$ ), a  $f$  je matematická funkce (přímky, paraboly a jiné).

$$A_1 = f(X_i) \quad (1)$$

$$A_2 = f(X_i) \quad (2)$$

Z matematické analýzy lze pro dvě rozdílné závisle proměnné  $y$  ( $A_1, A_2$ ) se stejnou nezávisle proměnnou  $x$  ( $X_i$ ) odvodit funkci:

$$A_1 = f(A_2) \quad (3)$$

V analýze QSAR jsou hodnoty biologických testů vyjádřeny jako logaritmy, rovnice (4), (5) a (6).

$$\log A_1 = f(\log X_i) \quad (4)$$

$$\log A_2 = f(\log X_i) \quad (5)$$

$$\log A_2 = f(\log A_1) \quad (6)$$

To tedy znamená, že ve všech případech, kdy účinnost, kterou stanovujeme i účinnost, na kterou extrapolujeme, kvantitativně souvisí s toutéž fyzikálně-chemickou charakteristikou. Lze tedy oprávněně předpokládat možnost extrapolace [3].

### 1.3 Letální dávka LD<sub>50</sub>

Index akutní toxicity LD<sub>50</sub> je smrtelná (smrtelná, letální) dávka, při které zahyne 50 % jedinců z testovaného souboru. „Hodnota LD<sub>50</sub> se udává jako hmotnost testované látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete – mg.kg<sup>-1</sup>“ [4] (pro potřeby této práce byly hodnoty přepočteny na jednotky mmol/kg). Hodnota tohoto indexu charakterizuje akutní účinek a je též využívána i ke klasifikaci látek na zdraví škodlivé, toxické a vysoce toxické [5]. Akutní testy jsou využívány k hodnocení účinků projevujících se v krátké době po jednorázovém podání. Stanovují se pomocí závislosti účinku na dávce a toxický index se z ní vypočítá dle vypracovaných postupů. Získaný údaj musí být statisticky vyhodnocen. Důležitý je také čas trvání testu, protože účinek má svou dynamiku. I po ukončení testu jsou zvířata pozorována, aby bylo zjištěno, zda látka nemá prodlouženou dynamiku účinku či zda účinek není opožděný. Akutní toxicita bývá výrazně závislá na typu expozice, proto spolu s hodnotou stanoveného indexu musí být typ expozice uveden, jinak hodnota nemá smysl.



## 1.4 Letální koncentrace LC<sub>50</sub>

Index akutní toxicity je smrtná (smrtná, letální) koncentrace, při které zahyne 50 % jedinců z testovaného souboru. „Hodnota LC<sub>50</sub> se udává jako hmotnost testované látky ve standardním objemu vzduchu mg.l<sup>-1</sup>“ [4] (pro potřeby této práce byly hodnoty přepočteny na jednotky mmol/l). Tento index akutní toxicity je využíván tam, kde je známa hodnota koncentrace látky v prostředí, ve které se organismus pohybuje.

## 1.5 Analýza QAAR

Jak již bylo úvodem řečeno, metody QAAR se zabývají kvantitativními vztahy mezi různými účinnostmi. Cílem analýzy QAAR je extrapolace údajů mezi druhy.

Jde o tvorbu modelu, který místo molekulového deskriptoru využívá jako deskriptor hodnotu stejného indexu, získaného testováním na jiném objektu. Takto lze též prokazovat, že výsledky nové alternativní metody dávají přibližně stejnou informaci jako metody schválené zákonem pro klasifikaci nebezpečnosti chemických látek.

Je to tedy jedna z možných cest validace, ověřování nové metody nebo způsob, jak získávat hodnoty toxických indexů pro zákonnou metodu z indexů metody jednodušší [6].

# 2 MATERIÁL A METODY

## 2.1 Popis objektu

### Potkan laboratorní (*Rattus norvegicus var. alba*)

Laboratorní potkan byl vyšlechtěn z divoce žijícího potkana a černé křisy (*Rattus rattus*). Je to rovněž všežravec (*omnivor*) a k jeho přednostem patří, že se velmi dobře aklimatizuje ve změněných životních podmínkách.

V dospělosti dosahuje hmotnosti 250 – 400 g (v závislosti na pohlaví a druhu), počet mláďat ve vrhu je 12 – 13, délka březosti 19 – 22 dní. Nejpoužívanější jsou kmeny: *Wistar albino* (původ Wistar Institute ve Filadelfii, USA) a *Sprague – Dawley* (farma Sprague – Dawley v Medisonu ve Wisconsinu, USA) [7].

## 2.2 Metody stanovení orální LD<sub>50</sub>

### 2.2.1 Akutní toxicita orální – metoda fixní dávky

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech látky po jednorázovém orálním užití. Podstatou zkušební metody je postupné podání fixní dávky 5, 50, 300 nebo 2000 mg/kg hmotnosti zvířete skupině pokusných zvířat stejného pohlaví. Výchozí úroveň dávky zvolíme na základě orientační studie. Stanovení akutní toxicity orální metodou fixní dávky se tedy provádí ve dvou etapách, orientační a hlavní studii.

Úkolem orientační studie je zvolit vhodnou výchozí dávku pro hlavní studii. Výchozí dávka orientační studie je zvolena dle fixních úrovní dávek 5, 50, 300 a 2000 mg/kg hmotnosti zvířete jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu. Toto očekávání by se mělo zakládat na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a strukturně příbuzných látek. Pro orientační studii se obvykle nepoužije více než pět zvířat.

V hlavní studii se obvykle pro každou vyšetřovanou úroveň dávky používá celkem pět pokusných zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito zvířaty bude jedno pokusné zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky a další čtyři pokusná zvířata. Po užití dávky, odvozené z orientační studie jako dávka vyvolávající zřejmou toxicitu, ale ne uhynutí, jsou pozorovány účinky. Způsobí-li vybraná úroveň dávky zřejmou toxicitu, avšak žádná uhynutí, není třeba žádné další testování. Není-li na zvolené úrovni dávky pozorována zřejmá toxicita, látka je opět testována na nejbližší úrovni dávky. Naopak, dojde-li k úhynu nebo vyžaduje-li závažná toxická reakce humánní utracení, látka je znovu testována na nejbližší nižší úrovni dávky.

Zkoušená dávka je podána v jedné dávce pomocí žaludeční sondy. Po podání dávky jsou pokusná zvířata pozorována individuálně minimálně jednou během prvních 30-ti minut a poté pravidelně během prvních 24 hodin. Zvláštní pozornost je věnována prvním čtyřem hodinám a poté denně po dobu 14-ti dnů. Pozorování zahrnuje změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pokusná zvířata ve stavu agónie a pokusná zvířata se známkami prudkých bolestí jsou humánně utracena. Hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně

jednou týdně poté. Na konci zkoušky se pokusná zvířata, která přežila zváží a poté humánně utratí.

Všechna pokusná zvířata jsou pitvána. U každého z nich jsou zaznamenány všechny makroskopické patologické nálezy. V protokolu by měly být výše uvedené údaje uvedeny zvlášť pro jednotlivé zvíře. Všechny tyto údaje by pak měly být shrnuty do společné tabulky [8].

### **2.2.2 Akutní toxicita orální – metoda stanovení třídy akutní toxicity**

Metoda stanovení třídy akutní toxicity umožňuje klasifikaci a posouzení nebezpečnosti látky. Metoda využívá předem stanovených dávek a její výsledky umožňují zařazení látky. Je tedy metodou v krocích, přičemž u každého kroku se používají 3 pokusná zvířata. V závislosti na úhynu či stavu agónie pokusných zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené látky rozhodnout průměrně na základě dvou až čtyř kroků. Tato metoda je reprodukovatelná a její výhodou je, že vyžaduje méně pokusných zvířat a dokáže látky zařadit podobně jako jiné metody zkoušení akutní toxicity. Metoda neslouží pro vypočtení přesné hodnoty LD<sub>50</sub>, ale umožňuje určit definované rozpětí expozice, při které se předpokládá úhyn, neboť hlavním koncovým vyhodnocením této zkoušky zůstává uhynutí části pokusných zvířat.

### **PRINCIP METODY**

Látka je testována metodou v krocích, přičemž v každém kroku jsou používána tři pokusná zvířata, obvykle samice, protože jsou obecně nepatrně citlivější. Reakce pokusných zvířat, kterým byla látka podána, poté rozhodne o dalším kroku; není třeba žádné další zkoušení nebo je látka podána dalším třem pokusným zvířatům ve stejné, nejbližší vyšší nebo nižší úrovni dávky. Zkoušená látka je podána v jedné dávce pomocí žaludeční sondy. Výchozí dávka se volí z jedné ze čtyř fixních úrovní 5, 50, 300 a 2000 mg/kg tělesné hmotnosti zvířete a měla by být v takovém množství, které nejpravděpodobněji vyvolá uhynutí některých pokusných zvířat, jimž byla podána.

Po podání dávky jsou pokusná zvířata pozorována individuálně minimálně jednou během prvních 30-ti minut, pravidelně během prvních 24 hodin, zvláštní pozornost je věnována prvním čtyřem hodinám, a poté denně po dobu 14-ti dnů. Výjimkou jsou případy, kdy je nutné pokusná zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit nebo je zjištěn jejich úhyn. Pozorování zahrnuje změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické

aktivity a chování. Pokusná zvířata ve stavu agónie a pokusná zvířata se známkami prudkých bolestí se humánně utratí.

Hmotnosti jednotlivých pokusných zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Na konci zkoušky se pokusná zvířata, která přežila zváží a poté humánně utratí. Všechna pokusná zvířata jsou pitvána. U každého z nich se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. V protokolu by měly být výše uvedené údaje uvedeny zvlášť pro jednotlivé zvíře. Všechny tyto údaje by pak měly být shrnuty do společné tabulky [9].

## **2.3 Metody stanovení intraperitoneální LD<sub>50</sub>**

Metody stanovení LD<sub>50</sub> na potkanech po intraperitoneálním podání nejsou na rozdíl od podání orálního či inhalačního popsány v zákonných vyhláškách. Pozorování, vyhodnocení a protokol budou po jednorázovém intraperitoneálním podání stejné jako po podání orálním (inhalačním), jak je v různých pracích popsáno.

V datových souborech, které jsem měla k dispozici, nebyly uvedeny údaje o podmínkách měření a o časové expozici. Hodnoty jsme proto uvažovali jako průměrné s chybou  $\pm 30\%$ .

## **2.4 Metody stanovení inhalační LC<sub>50</sub>**

### **2.4.1 Akutní toxicita inhalační**

Principem této metody je, že několik skupin pokusných zvířat je exponováno studované látce po určenou dobu v odstupňovaných koncentracích, a to jedné koncentraci v každé skupině. Potom jsou zvířata pozorována a zjišťují se účinky a případy uhynutí. Zvířata, která během pokusu uhynou, i ta, která přežijí do konce pokusu, jsou pitvána.

### **POPIS METODY**

Zvířata jsou bezprostředně před expozicí zvážena. Pro každou dávkovou hladinu je třeba použít nejméně 10 hlodavců (5 samic a 5 samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Počet úrovní dávek, nejméně 3, má být vhodně odstupňován tak, aby byl u testovacích skupin viditelný rozsah toxických účinků a mortality. Získané údaje musí stačit na znázornění vztahu mezi dávkou a mortalitou a, pokud je to možné, musí umožnit stanovení LC<sub>50</sub> s přijatelnou spolehlivostí.

Zvířata jsou vystavena účinku látky nejméně po dobu 4 hodin od ustavení rovnováhy její koncentrace. Teplota během pokusu má být  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Relativní vlhkost má být ideálně mezi 30 % a 70 %.

Je třeba zajistit monitorování podmínek expozice; tj. skutečná koncentrace studované látky se měří v dýchací zóně alespoň třikrát během expozice; průtok, teplota a vlhkost vzduchu se měří kontinuálně. Během expozice i po jejím skončení se pozorování provádějí a zaznamenávají systematicky. První den je třeba provádět pozorování často. Minimálně jednou každý pracovní den je třeba provést pečlivé klinické vyšetření. Pro pokusy se zvířaty je třeba použít inhalační zařízení, které umožňuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně dvanáctkrát za hodinu, aby byl zaručen přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře.

Doba pozorování by měla trvat nejméně 14 dní, může však záviset na toxických reakcích, na rychlosti jejich vzniku a na trvání fáze zotavení, proto ji lze dle potřeby prodloužit. Rozhodující je doba, kdy se objeví a opět odezní projevy otravy.

Pozorování zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatické aktivity a chování. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanovuje po expozici týdně a v okamžiku uhynutí. Zvířata, která během pokusu uhynou i ta, která přežijí do konce pokusu, jsou pitvána se zvláštním zřetelem ke všem změnám horní i dolní části dýchacího traktu [10].

## **2.5 Chemikálie**

Všechny chemikálie a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2 viz Příloha A, B. Látky postihují široký rozsah chemické struktury a zahrnují alkoholy, aldehydy, chlorované aniliny, chlorované fenoly, estery a několik dalších látek mimo tyto strukturní skupiny. Kromě malých neutrálních sloučenin a poměrně inertních sloučenin (alkoholy, estery) soubor obsahuje i sloučeniny reaktivní jako jsou nenasycené alkoholy a aldehydy.

## 2.6 Výpočty

Pro výpočet inhalační LC<sub>50</sub> z primárních údajů uvedených v ppm bylo použito vzorce:

$$c \text{ (mmol/m}^3\text{)} = c \text{ (ppm)} / 24,34 \quad (7)$$

$$\text{kde koncentrace v ppm (ml/m}^3\text{)} = c \text{ (mg/m}^3\text{)} \cdot (24,34 / M) \quad (8)$$

Koeficient 24,34 (objem 1 mol látky v plynném stavu při 25 °C) byl vypočítán pomocí stavové rovnice ideálního plynu.

Pro inhalační LC<sub>50</sub> uvedených v mg/m<sup>3</sup> bylo použito vzorce :

$$c \text{ (mmol/m}^3\text{)} = c \text{ (mg/m}^3\text{)} / M \quad (9)$$

Pro intraperitoneální a orální LD<sub>50</sub> v mmol/kg bylo použito vzorce :

$$c \text{ (mmol/kg)} = c \text{ (mg/kg)} / M \quad (10)$$

## 2.7 Výběr a zpracování dat

Údaje o LD<sub>50</sub> pro potkany po orálním a intraperitoneálním podání a inhalační LC<sub>50</sub> byly získány z datové báze Thomson Micromedex. Všechny údaje byly sbírány z datových bazí RTECS, HSDB, HAZARDTEXT z datového souboru Thomson Micromedex [11]. Údaje byly hledány pro chemické sloučeniny, u kterých byl stanoven EC<sub>50</sub> testem na *Oligochaeta Tubifex tubifex* [12].

Inhalační LC<sub>50</sub> byly měřeny po různém čase expozice 0,5, 4, 6, 7, 8 a 10 hodin. Nejvíce údajů bylo nalezeno po 4 hodinové expozici, tato data byla vybrána pro další studium. U orálních a intraperitoneálních LD<sub>50</sub> nebyly v použitých datových souborech údaje o délce expozice uvedeny.

Pro práci byly využity průměrné hodnoty nalezených údajů.

Údaje uvedené v tabulkách 1 a 2 byly zpracovány metodami matematicko - statistické analýzy. Rovnice QAAR byly nalezeny regresní analýzou, ke které byl použit počítačový program Origin ® 6.1 (1991 – 2000), OriginLab Corporation.

Červené přímky v grafech 1 – 6 představují jednotlivé vypočtené rovnice.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Shromážděné údaje o orální  $LD_{50}$ , intraperitoneální  $LD_{50}$  a inhalační  $LC_{50}$  měřené na potkanech jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. V tabulce 1 jsou uvedeny průměry nalezených hodnot. Jednotlivé nalezené hodnoty se v mnoha případech mezi sebou silně lišily. Tabulka 2 shrnuje jejich logaritmické hodnoty.

Korelace mezi sledovanými indexy akutní toxicity a  $\log P$  jsou znázorněny v grafech 1-3. Pod grafem je uvedena příslušná rovnice regrese.

Všechny tři regresní rovnice mají hodnotu směrnice mezi 0,3 a 0,45, což naznačuje, že ve všech případech jistý trend je. Těsnost korelací je ovlivněna rozptylem dat, který je u získaných indexů akutní toxicity silný.

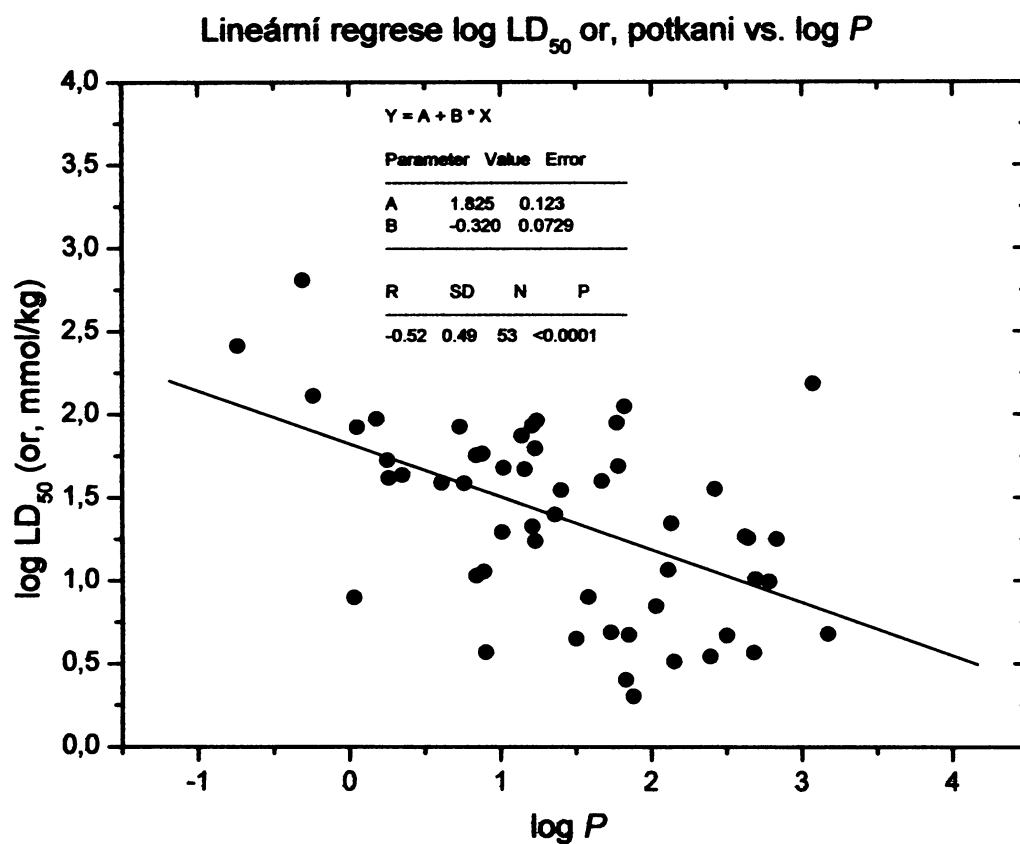
Důvodem značného rozptylu dat je s největší pravděpodobností skutečnost, že jsou shrnuty údaje získané v různě kvalitních laboratořích. V použitých datových souborech také není možno nalézt údaje o délce expozice.

Regrese mezi jednotlivými indexy akutní toxicity jsou poměrně těsné a směrnice regresních rovnic vykazují hodnoty kolem 1. Statisticky nejvýznamnější korelace je mezi intraperitoneální  $\log LD_{50}$  a orální  $\log LD_{50}$  (graf 4), ale i ostatní vzájemné korelace jsou statisticky významné.

Lze tedy uzavřít, že mezi logaritmy indexů akutní toxicity, orální  $\log LD_{50}$ , intraperitoneální  $\log LD_{50}$  a inhalační  $\log LC_{50}$  existují vzájemné korelace, přestože mezi nimi a  $\log P$  zvláště významné korelace nebyly nalezeny.

Důvodem takového výsledku je pravděpodobně nesourodost použitých indexů akutní toxicity (neznámá délka expozice – tyto údaje lze obtížně vysledovat) a velký rozptyl publikovaných údajů mezi sebou (validovaná data lze obtížně vybrat).

Graf 1



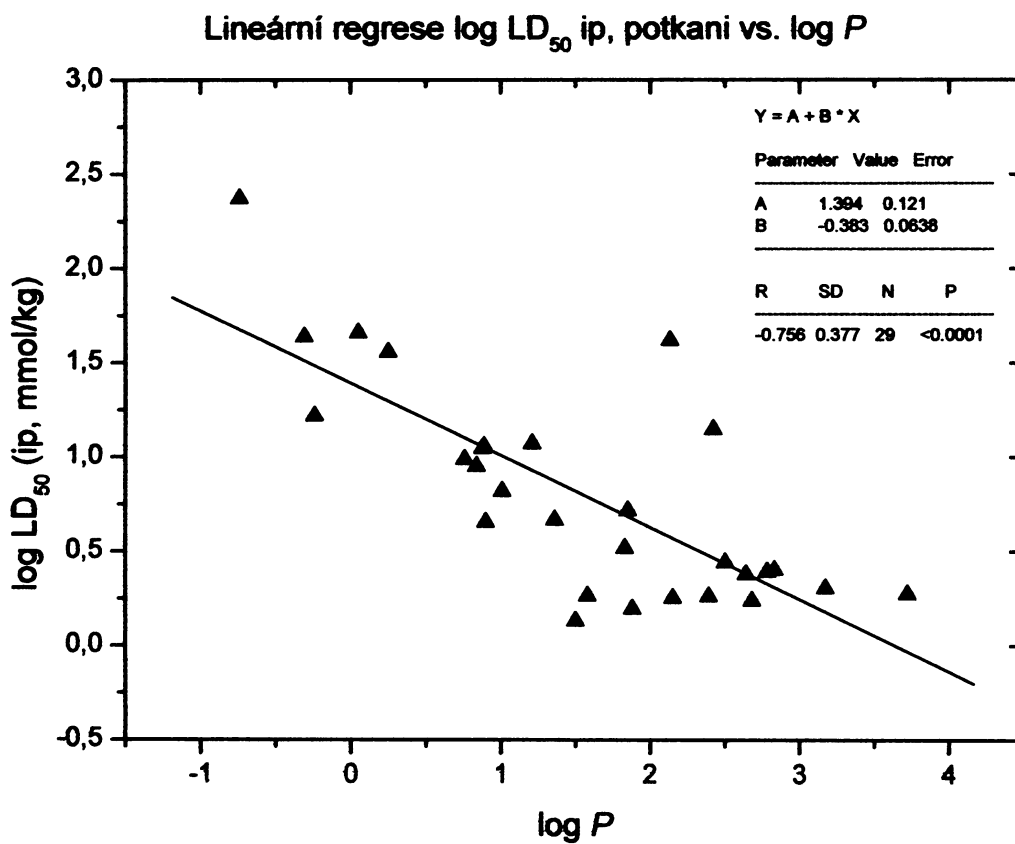
Rovnice regrese:

$$\log LD_{50} (\text{potkan, or}) = -0,320 \log P + 1,825 \quad (11)$$

$n = 53$ ;  $r = -0,52$ ;  $SD = 0,49$ ;  $p < 0,0001$



Graf 2



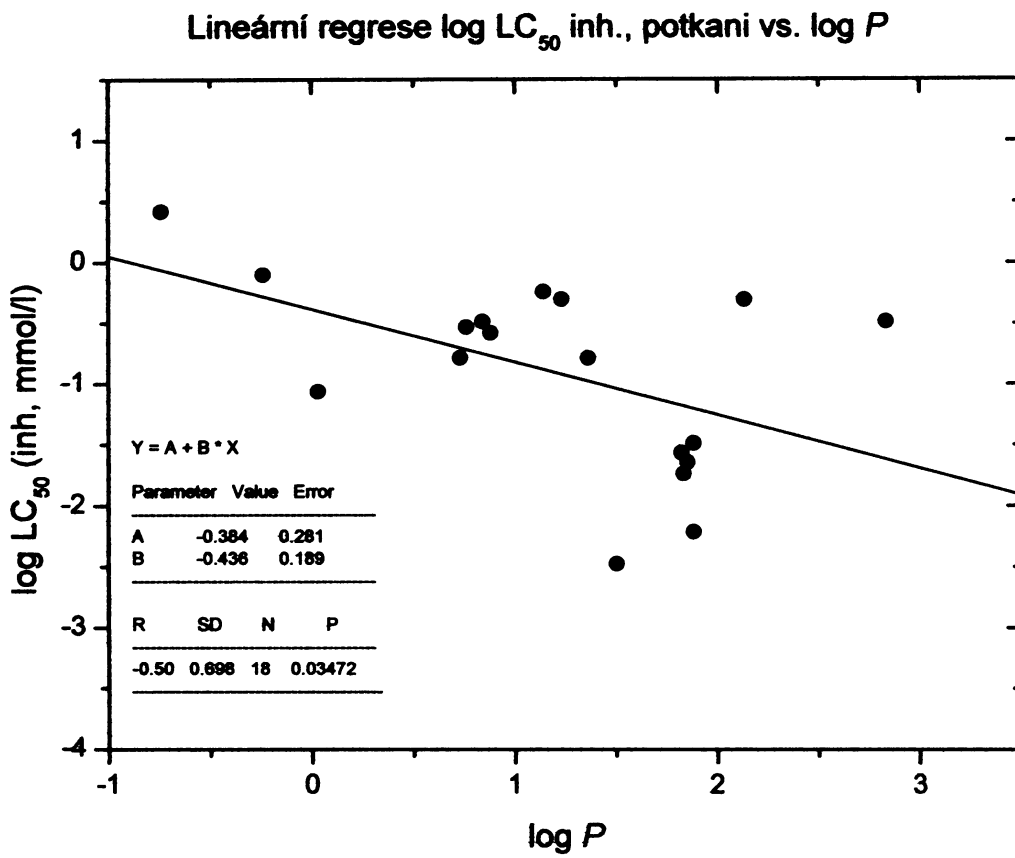
Rovnice regrese:

$$\log LD_{50} (\text{potkan, ip}) = -0,383 \log P + 1,394$$

(12)

$n = 29; r = -0,756; SD = 0,377; p < 0,0001$

Graf 3



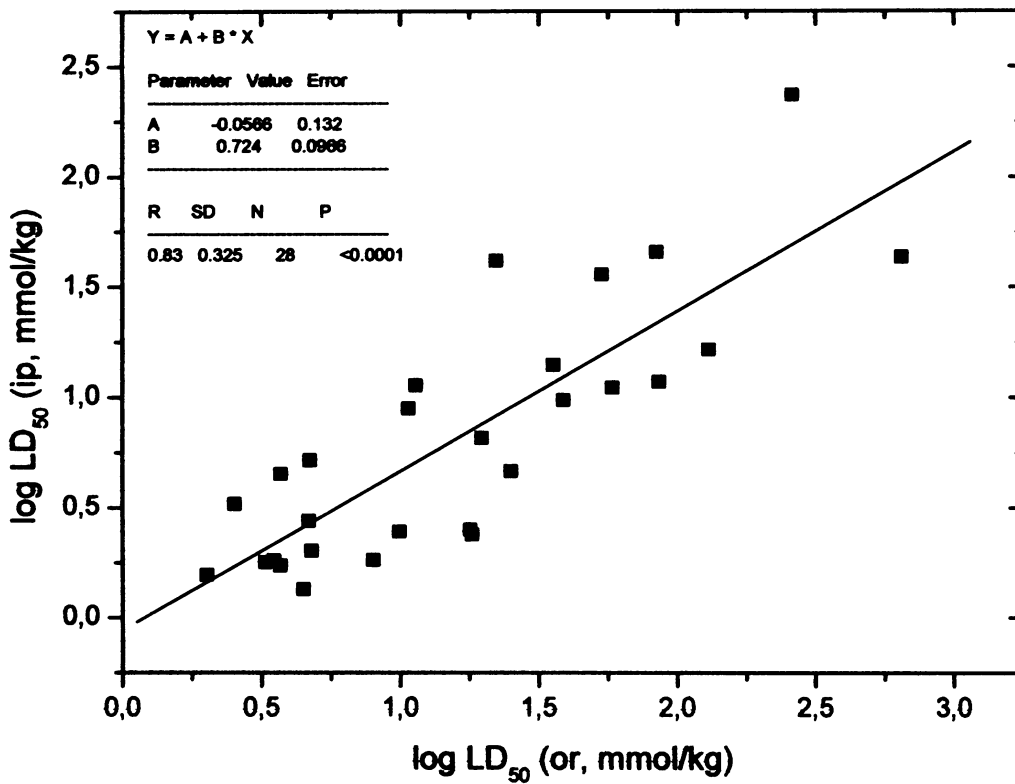
Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = -0,436 \log P - 0,384 \quad (13)$$

$$n = 18; r = -0,50; SD = 0,698; p = 0,03472$$

**Graf 4**

Lineární regrese  $\log LD_{50}$  ip vs.  $\log LD_{50}$  or, potkani

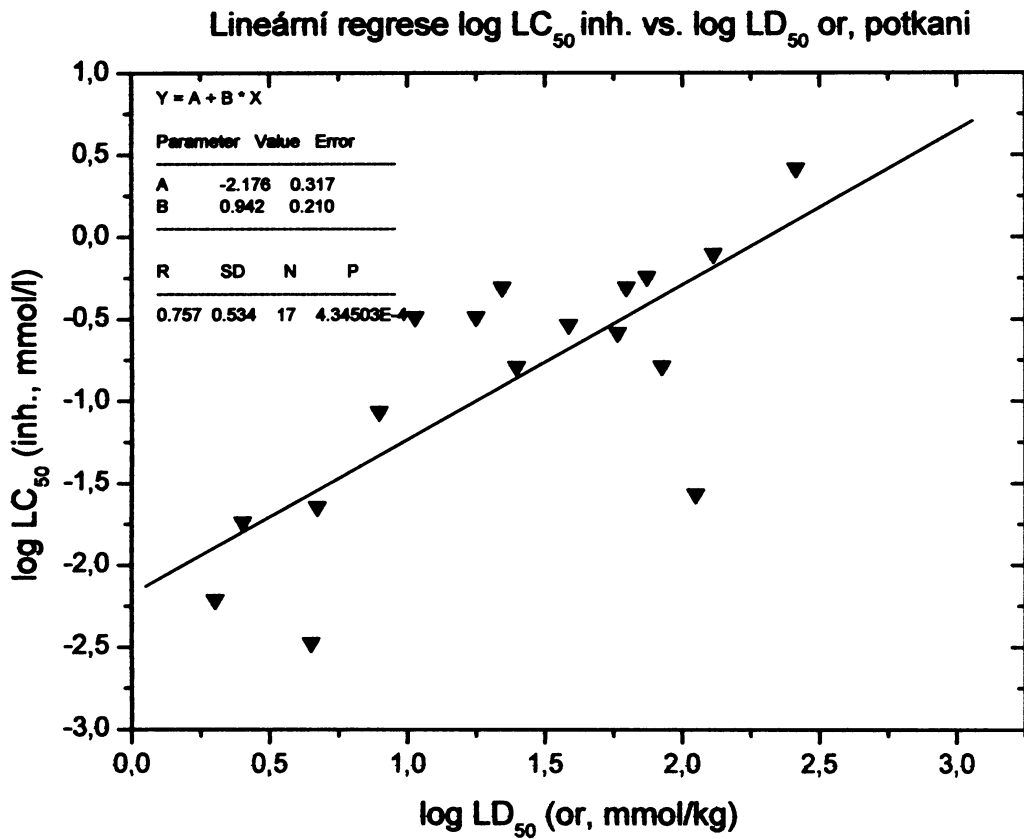


Rovnice regrese:

$$\log LD_{50} (\text{potkan, ip}) = 0,724 \log LD_{50} (\text{potkan, or}) - 0,0566 \quad (14)$$

$n = 28; r = 0,83; SD = 0,325; p < 0,0001$

**Graf 5**

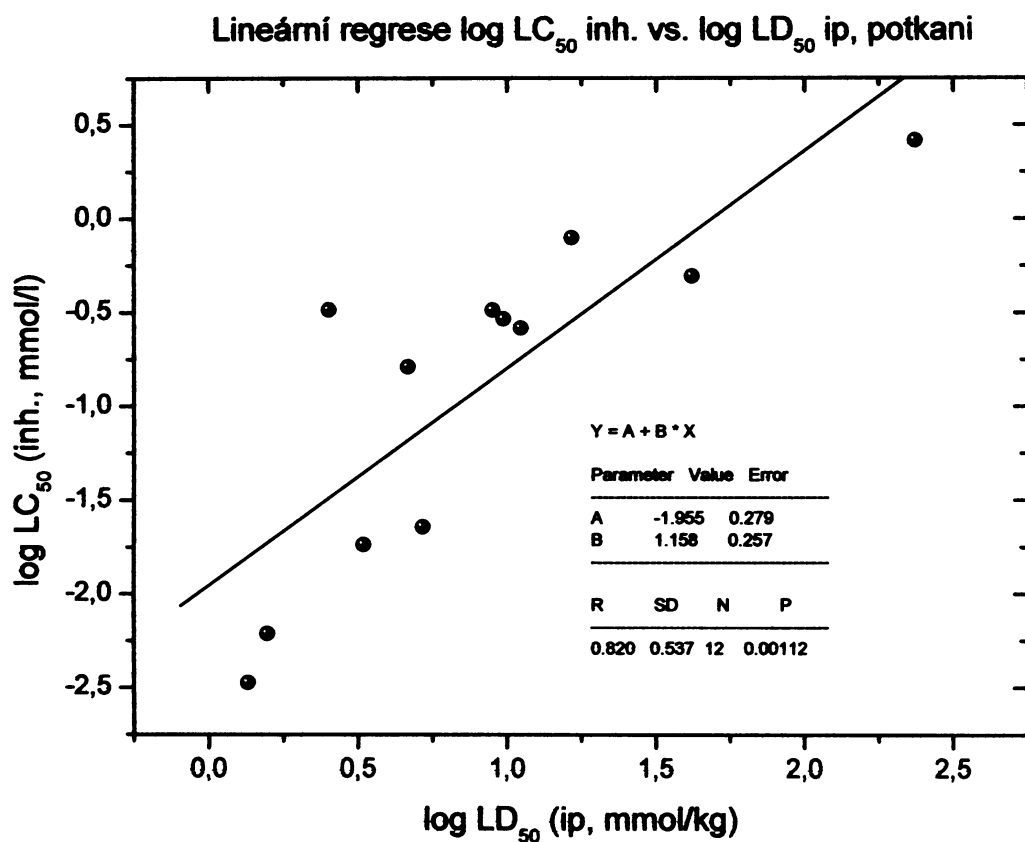


Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = 0,942 \log LD_{50} (\text{potkan, or}) - 2,176 \quad (15)$$

$$n = 17; r = 0,757; SD = 0,534; p = 4,345 \cdot 10^{-4}$$

**Graf 6**



Rovnice regrese:

$$\log LC_{50} (\text{potkan, inh}) = 1,158 \log LD_{50} (\text{potkan, ip}) - 1,955 \quad (16)$$

$n = 12; r = 0,820; SD = 0,537; p = 0,00112$

## **4 ZÁVĚR**

Cíle práce byly splněny. Byly vytvořeny datové báze indexů akutní toxicity LD<sub>50</sub> pro potkana při orální a intraperitoneální aplikaci a LC<sub>50</sub> při inhalační aplikaci. Byly testovány korelace mezi logaritmy indexů akutních toxicit a logaritmem rozdělovacího koeficientu látek mezi n-oktanol a vodu. Byly testovány korelace mezi logaritmy indexů akutních toxicit stanovených na potkanech při různých typech expozic.

Výsledky naznačují, že mezi logaritmy orálních, intraperitoneálních a inhalačních indexů akutních toxicit korelace existují.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TICHÝ, M. Co a k čemu jsou alternativní metody *in vitro* a *in silico*. In *Alternativní metody testování toxicity chemikálií 2: sborník semináře*. Ekomonitor spol.s.r.o, Chrudim - Píšťovy, 2006. s. 26 - 31. ISBN 80-86832-19-8
- [2] TICHÝ, M. *Účinnost xenobiotik a chemická struktura*. Praha: Avicenum, 1983. 1. vydání
- [3] TICHÝ, M., TRČKA, V., ROTH, Z., KRIVUCOVÁ, M. *QSAR Analysis and Data Extrapolation among Mammals in a Series of Aliphatic Alcohols*. Environmental Health Perspectives. **61**, p.321 – 328, 1985. podle Alternativní metody testování toxicity chemikálií 2: sborník semináře, s. 32 – 35, viz. [6]
- [4] Zákon č. 443/2004 Sb., příloha 1, o základních pojmech a metodách pro zkoušení toxicity chemických látek nebo chemických přípravků. Částka 147, s. 8552
- [5] TICHÝ, M. *Toxikologie pro chemiky. Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativní*. Praha: UK, 2003. ISBN 80-246-0566-X
- [6] TICHÝ, M. Extrapolace toxických indexů mezi různými druhy. In *Alternativní metody testování toxicity chemikálií: sborník semináře*. Ekomonitor spol.s.r.o, Chrudim - Píšťovy, 2006. s. 32 - 35. ISBN 80-86832-19-8
- [7] RUSEK, V. *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoři* [online]. Pardubice : Univerzita Pardubice, Ústav ochrany životního prostředí, 9.7.2004 [cit. 1.8.2006]. Dostupné na WWW:< <http://www.upce.cz/priloha/uozp-skripta-tox-rusek>>.
- [8] Zákon č. 449/2005 Sb., *B.1 bis AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ – METODA FIXNÍ DÁVKY*. Částka 157, s. 8181 - 8196 (2005)
- [9] Zákon č. 449/2005 Sb., *B.1 tris AKUTNÍ TOXICITA ORÁLNÍ – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY*. Částka 157, s. 8197 – 8214 (2005)
- [10] Zákon č. 443/2004 Sb., *B.2 AKUTNÍ TOXICITA INHALAČNÍ*. Částka 147, s. 8580 – 8585 (2004)
- [11] Chemická databáze Thomson Micromedex Chemknowledge (R) Systém, Vol. 69 (1974 – 2006).
- [12] HRACHOVÁ, M. *Potkan, validace testu akutní toxicity s Tubifex tubifex a analýza QSAR*. Praha, 2005. 24 str., 1 příloha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Z. Bosáková, M.Tichý.

## **PŘÍLOHY**



**Příloha A**

**Tabulka 1** Hodnoty LD<sub>50</sub> (potkan, orální), LD<sub>50</sub> (potkan, intraperitoneální) a LC<sub>50</sub> (potkan, inhalační)

číslo	látka [12]	CAS číslo	M (g/mol)	orální (mmol/kg)	Intraperitonální (mmol/kg)	Inhalační (mmol/l) 4h
1	methanol	67-56-1	32,05	259,0	235,0	2,62
2	ethanol	64-17-5	46,08	191,0	43,3	
3	isopropylalkohol	67-63-0	60,11	83,7	45,5	
4	1-propanol	71-23-8	60,11	53,1	36,0	
5	terc-butylalkohol	75-65-0	74,14	43,1		
6	isobutylalkohol	78-83-1	74,14	38,6	9,71	0,293
7	1-butanol	71-36-3	74,14	10,7	8,92	0,326
8	3-methyl-1-butanol	123-51-3	88,17	46,9		
9	1-pentanol	71-41-0	88,17	19,6	6,57	
10	3-pentanol	584-02-1	88,17	21,2		
11	2-methyl-2-butanol	75-85-4	88,17	11,3	11,3	
12	1-hexanol	111-27-3	102,20	7,012		
13	cyklohexanol	108-93-0	100,16	17,3		
14	1-heptanol	111-70-6	116,23	18,5		
15	3-heptanol	589-82-2	116,23	10,2		
16	1-oktanol	111-87-5	130,26	154,0		
17	trans-2-hexen-1-ol	928-95-0	100,16	34,9		
18	butyraldehyd	123-72-8	72,12	58,1	11,1	0,262
19	valeraldehyd	110-62-3	86,15	25,0	4,64	0,163
20	hexanal	66-25-1	100,16	48,9		
21	heptanal	111-71-7	114,21	35,9	14,0	
22	isovaleraldehyd	590-86-3	86,15	62,5		0,496
23	2-methyl-butyraldehyd	96-17-3	86,15	74,3		0,573
24	isobutyraldehyd	78-84-2	72,12	38,7		
25	2-ethyl-butyraldehyd	97-96-1	100,16	39,7		
26	trans-2-hexenal	6728-26-3	98,16	7,95	1,83	
27	trans-2-heptenal	18829-55-5	112,19	11,6		

číslo	látka	CAS číslo	M (g/mol)	orální (mmol/kg)	intraperitoneální (mmol/kg)	inhalační (mmol/l) 4h
28	aceton	67-64-1	58,09	129,0	16,4	0,792
29	anilin	62-53-3	93,14	3,70	4,51	
30	2-chloranilin	95-51-2	127,58			0,0326
31	3-chloranilin	108-42-9	127,58	2,01	1,57	0,00614
32	4-chloranilin	106-47-8	127,58	2,52	3,29	0,0183
33	2,4-dichloranilin	554-0-7	162,02	9,88	2,47	
34	3,4-dichloranilin	95-76-1	162,02	3,68	1,73	
35	fenol	108-95-2	94,12	4,46	1,35	0,00336
36	2-chlorfenol	95-57-8	128,56	3,25	1,79	
37	3-chlorfenol	108-43-0	128,56	4,67	2,76	
38	4-chlorfenol	106-48-9	128,56	3,49	1,83	
39	2,4-dichlorfenol	120-83-2	163,00	4,76	2,018	
40	2,6-dichlorfenol	87-85-0	163,00	18,04	2,39	
41	3,4,5-trichlorfenol	609-19-8	197,44		1,88	
42	methyl-formiat	107-31-3	60,06	7,91		0,0866
43	ethyl-formiat	109-94-4	74,09	41,4		
44	methyl-acetat	79-20-9	74,09	94,1		
45	ethyl-acetat	141-78-6	88,12	84,1		0,164
46	propyl-acetat	109-60-4	102,15	91,7		
47	isopropyl-acetat	108-21-4	102,15	47,7		
48	butyl-acetat	123-86-4	116,18	112,0		0,0273
49	methyl-propionat	554-12-1	88,12	56,7		
50	ethyl-propionat	105-37-3	102,15	85,5	11,7	
51	Propyl-propionat	106-36-5	116,18	88,9		
52	benzen	71-43-2	78,12	22,1	41,7	0,494
53	nitrobenzen	98-95-3	123,12	4,71	5,2	0,227
54	2-nitroanisol	91-23-6	153,15	4,90		
55	tetrachlormethan	56-23-5	153,81	17,8	2,52	0,327

## Příloha B

Tabulka 2 Logaritmy hodnot LD<sub>50</sub> (potkan, orální), LD<sub>50</sub> (potkan, intraperitoneální), LC<sub>50</sub> (potkan, inhalační) a P(α/ν)

číslo	látka [12]	CAS číslo	M (g/mol)	log P (α/ν)	orální log c (mmol/kg)	Intraperitoneální log c (mmol/kg)	inhalační 4h log c (mmol/l)
1	methanol	67-56-1	32,05	-0,74	2,42	2,37	0,418
2	ethanol	64-17-5	46,08	-0,31	2,808	1,64	
3	isopropylalkohol	67-63-0	60,11	0,05	1,92	1,66	
4	1-propanol	71-23-8	60,11	0,25	1,73	1,56	
5	terc-butylalkohol	75-65-0	74,14	0,35	1,64		
6	isobutylalkohol	78-83-1	74,14	0,76	1,59	0,987	-0,533
7	1-butanol	71-36-3	74,14	0,84	1,029	0,950	-0,486
8	3-methyl-1-butanol	123-51-3	88,17	1,16	1,67		
9	1-pentanol	71-41-0	88,17	1,01	1,29	0,817	
10	3-pentanol	584-02-1	88,17	1,21	1,33		
11	2-methyl-2-butanol	75-85-4	88,17	0,89	1,055	1,055	
12	1-hexanol	111-27-3	102,2	2,03	0,846		
13	cyklohexanol	108-93-0	100,18	1,23	1,24		
14	1-heptanol	111-70-6	116,23	2,62	1,27		
15	3-heptanol	589-82-2	116,23	2,69	1,008		
16	1-oktanol	111-87-5	130,26	3,07	2,19		
17	trans-2-hexen-1-ol	928-95-0	100,18	1,40	1,54		
18	butyraldehyd	123-72-8	72,12	0,88	1,76	1,045	-0,582
19	valeraldehyd	110-62-3	86,15	1,36	1,40	0,667	-0,789
20	hexanal	66-25-1	100,18	1,78	1,69		
21	heptanal	111-71-7	114,21	2,42	1,55	1,15	
22	isovaleraldehyd	590-86-3	86,15	1,23	1,8		-0,3048
23	2-methyl-butyraldehyd	96-17-3	86,15	1,14	1,87		-0,242
24	isobutyraldehyd	78-84-2	72,12	0,61	1,59		
25	2-ethyl-butyraldehyd	97-96-1	100,18	1,67	1,60		
26	trans-2-hexenal	6728-26-3	98,16	1,58	0,900	0,263	
27	trans-2-heptenal	18829-55-5	112,19	2,11	1,064		

číslo	látka	CAS číslo	M (g/mol)	log P (oV)	orální log c (mmol/kg)	intraperitoneální log c (mmol/kg)	inhalační 4h log c (mmol/l)
28	aceton	67-64-1	58,09	-0,24	2,11	1,22	-0,1013
29	anilin	62-53-3	93,14	0,9	0,569	0,654	
30	2-chloranilin	95-51-2	127,58	1,88			-1,49
31	3-chloranilin	108-42-9	127,58	1,88	0,303	0,195	-2,21
32	4-chloranilin	106-47-8	127,58	1,83	0,402	0,518	-1,74
33	2,4-dichloranilin	554-0-7	162,02	2,78	0,995	0,393	
34	3,4-dichloranilin	95-76-1	162,02	2,68	0,566	0,238	
35	fenol	108-95-2	94,12	1,50	0,649	0,130	-2,47
36	2-chlorfenol	95-57-8	128,56	2,15	0,512	0,253	
37	3-chlorfenol	108-43-0	128,56	2,50	0,669	0,441	
38	4-chlorfenol	106-48-9	128,56	2,39	0,543	0,262	
39	2,4-dichlorfenol	120-83-2	163,00	3,17	0,678	0,305	
40	2,6-dichlorfenol	87-65-0	163,00	2,64	1,26	0,379	
41	3,4,5-trichlorfenol	609-19-8	197,44	3,72		0,275	
42	methyl-formiat	107-31-3	60,06	0,03	0,898		-1,063
43	ethyl-formiat	109-94-4	74,09	0,26	1,62		
44	methyl-acetat	79-20-9	74,09	0,18	1,97		-0,786
45	ethyl-acetat	141-78-6	88,12	0,73	1,93		
46	propyl-acetat	109-60-4	102,15	1,24	1,96		
47	isopropyl-acetat	108-21-4	102,15	1,02	1,68		
48	butyl-acetat	123-86-4	116,18	1,82	2,048		-1,57
49	methyl-propionat	554-12-1	88,12	0,84	1,75		
50	ethyl-propionat	105-37-3	102,15	1,21	1,93	1,07	
51	propyl-propionat	106-36-5	116,18	1,77	1,95		
52	benzen	71-43-2	78,12	2,13	1,35	1,62	-0,3062
53	nitrobenzen	98-95-3	123,12	1,85	0,673	0,716	-1,64
54	2-nitroanisol	91-23-6	153,15	1,73	0,687		
55	tetrachlormethan	56-23-5	153,81	2,83	1,25	0,4012	-0,485