

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Ekotoxikologický screening léčiv – Paralen tbl. a Panadol tbl.

Ecotoxicological screening of the medicaments - Paralen tbl. and Panadol tbl.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová
Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

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

V Hradci Králové dne 30. 4. 2010

Děkuji Mgr. Jitce Vytlačilové za odborné vedení a cenné rady při sestavování mé diplomové práce a za pomoc při zpracování výsledků.

Tato diplomová práce byla finančně podpořena granty SVV-2010-261-002 a GAUK č. 105407, za které rovněž děkuji.

Obsah

1	Úvod.....	6
1.1	Cíl práce	6
2	Teoretická část	7
2.1	Léčiva jako polutanty v životním prostředí.....	7
2.2	Toxikologie, ekotoxikologie	10
2.3	Toxicita a její klasifikace, vyjádření výsledků testů toxicity	12
2.4	Ekotoxikologické studie, biotesty a jejich dělení	16
2.5	Ekotoxikologické testy podle trofické úrovně testovaných organismů.....	20
2.5.1	<i>Testy s producenty</i>	20
2.5.2	<i>Testy s konzumenty</i>	23
2.5.3	<i>Testy s destruenty</i>	28
2.6	Testy toxicity v legislativě České republiky.....	31
2.7	Paracetamol.....	34
2.7.1	<i>Struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly</i>	34
2.7.2	<i>Indikace</i>	35
2.7.3	<i>Farmakokinetika, mechanismus účinku</i>	36
2.7.4	<i>Toxikologická data</i>	38
3	Praktická část	39
3.1	Testovaný materiál.....	39
3.2	Modelové organismy	40
3.2.1	<i>Tetrahymena pyriformis</i> Ehr.	40
3.2.2	<i>Thamnocephalus platyurus</i> Packard	44
3.2.3	<i>Sinapis alba</i> L.....	47
3.3	Použité testy	50
3.4	Pomůcky, chemikálie, přístroje.....	51

3.5	Postupy.....	52
3.5.1	<i>Vícegenerační test toxicity s Tetrahymena pyriformis Ehr.</i>	52
3.5.2	<i>Rapidtoxkit™</i>	54
3.5.3	<i>Test inhibice klíčení semen Sinapis alba L.</i>	56
3.6	Výsledky, grafy	58
3.6.1	<i>Vícegenerační test toxicity s Tetrahymena pyriformis Ehr.</i>	58
3.6.2	<i>Rapidtoxkit™</i>	65
3.6.3	<i>Test inhibice klíčení semen Sinapis alba L.</i>	67
4	Diskuze	75
5	Závěr.....	81
6	Seznam literatury.....	83
	Abstrakt (CZ).....	91
	Abstrakt (EN).....	92

1 Úvod

Původní problémy životního prostředí zahrnovaly polutanty typu organické hmoty, kovů, pesticidů. V průběhu století se znečištění stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáň atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenicita, kancerogenita, vlivy na růst, reprodukci, atd. To vede i k mohutnému rozvoji metod stanovujících příčiny a efekty znečištění. V současné době jsou známy desítky milionů organických sloučenin (Kočí a kol., 2002).

Léky a prostředky osobní hygieny se stávají centrem aktuálního environmentálního výzkumu. Vyvíjejí se analytické metody detekující kontaminující látku v environmentálně významné stopové koncentraci. Výzkumníci, kteří sledují toxikologické důsledky látek v životním prostředí zjistili, že i nízké koncentrace polutantu mohou vyvolat nepříznivé účinky na vodní organismy (Onesios a kol., 2009).

V posledních letech se ve vědeckých publikacích objevuje čím dál více zpráv o zbytcích léčiv v povrchových a pitných vodách. Mezi objevenými substancemi v řekách byly například beta blokátory, beta-sympatomimetika, analgetické a protizánětlivé drogy, estrogény, antibiotika i antiepileptika (Cleuvers, 2003).

Testy toxicity jsou užitečným nástrojem ke zjišťování chemického znečištění a jeho potenciálního dopadu na suchozemské a vodní životní prostředí (Tsiridis a kol., 2002).

Ekotoxikologie hraje klíčovou roli v získávání znalostí, které nám v budoucnu umožní vyrovnat konflikt mezi technickým pokrokem na jedné straně, a potřebou čisté vody a vysoce kvalitních produktů při zachování přírodního prostředí a jeho biologické rozmanitosti, na straně druhé (Moiseenko, 2008).

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je zjistit možný vliv paracetamolu ve formě léčivých přípravků (Paralen 500 tbl., Panadol tbl.) na životní prostředí porovnáním s analytickým standardem paracetamolu pomocí různých ekotoxikologických testů. Byly vybrány testy, které jsou použitelné v běžném laboratorním měřítku bez zvláštních nároků na vybavení a pomocné chemikálie, ale přitom hodnověrné, citlivé a snadno reprodukovatelné.

2 Teoretická část

2.1 Léčiva jako polutanty v životním prostředí

Farmaceutický průmysl vyvíjí efektivnější aktivní farmaceutické substance pro zvýšení účinku, bioavailability a resistance k degradaci. U léčiv existuje velký rozsah v době přetrvávání ve vodních prostředích, některá jsou vysoce perzistující. V takových případech jsou farmakologicky cenné vlastnosti jako resistance degradace a bioavailability rizikové pro životní prostředí.

Farmaceutické sloučeniny jsou konstruovány buď jako vysoce aktivní, působící na receptory lidí a zvířat, či jako toxické pro mnoho infekčních organismů, včetně bakterií, hub a parazitů. Nicméně, mnoho nižších zvířat má systémy lidskému receptoru podobné. Mnoho skupin organismů, které negativně ovlivňují lidské a zvířecí zdraví, hrají určující roli ve funkci ekosystémů (Khetan a kol., 2007).

Léčiva lze dělit na základě jejich odolnosti vůči životnímu prostředí do tří skupin, a to na látky lehce odbouratelné (např. kyselina acetylsalicylová), látky stálé a hydrofilní (bezafibrát) a látky stálé a lipofilní (ofloxacin). Nejnebezpečnější z hlediska ochrany prostředí jsou látky zařazené do poslední skupiny, u kterých může dojít k začlenění do potravních řetězců. Obecně platí, že o příslušnosti látky k jedné ze skupin rozhoduje souhrn jejich fyzikálně-chemických vlastností, nejvíce pak rozpustnost, K_{OW} (rozdělovací koeficient oktanol – voda), pK_a a K_H (Henryho konstanta). Základním problémem při odhadu, do které skupiny daná látka patří, je ovšem fakt, že u mnoha látek tyto parametry nejsou známy. Navíc se nelze řídit ani zařazením do skupin ATC (tzv. anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace), protože stejný léčebný účinek mohou mít i dvě chemicky naprosto odlišné sloučeniny (Kotyza a kol., 2009).

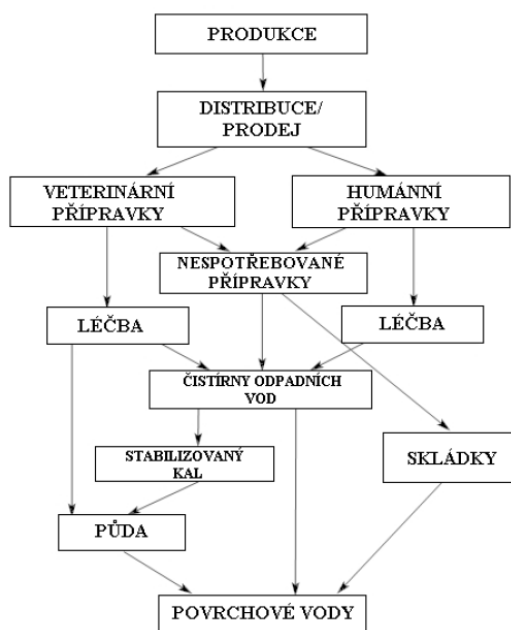
Speciální podskupinou jsou látky, které mohou narušit činnost živého organismu, protože napadají žlázy, které produkují hormony nebo látky, jež napodobují účinky nejrůznějších hormonů. Mezi nejvýznamnější patří např. estrogeny nebo sloučeniny s estrogení aktivitou.

Léčiva v odpadních vodách lze díky nízkým koncentracím (pod 1 mg/l) zařadit mezi tzv. stopové znečištění (Kotyza a kol., 2009).

Zlepšení analytických metod (v první řadě uvedení citlivějších a specifických hmotnostních spektrometrických technik) zvýšilo povědomí o přítomnosti léčiv ve vodním prostředí ve stopových hladinách (ng/l) (Mills a kol., 2007).

Léky se vyskytují v životním prostředí v kombinaci s jinými farmaceutickými sloučeninami, společně s jejich vlastními metabolity a jinými environmentálními polutanty. Aktuální environmentální odhady rizika se zaměřují na jednotlivé substance, běžná hodnocení tak podceňují skutečné environmentální dopady (Khetan a kol., 2007).

Některé sloučeniny mohou být chemicky degradované mikrobiální činností a UV zářením. Tyto faktory ztěžují odhad celkové zátěže, biologické dostupnosti a předpovídání osudu a chování těchto sloučenin ve vodě. Mnoho léčiv se konjuguje například na glukuronidy a sulfáty jako koncové produkty detoxifikace, které jsou uvolněny do životního prostředí. Tyto metabolity mohou být zpět dekonjugovány v životním prostředí např. mikrobiální činností (Mills a kol., 2007).



Obr. 1: Tok léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí (Kotyza a kol., 2009).

Distribuce farmak do životního prostředí (obr. 1) se poněkud liší v porovnání s tradičními polutanty. Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti nebo např. ženy užívající hormonální antikoncepci. Aktivní látky jsou po užití léku z těla vylučovány buď v nezměněné podobě nebo ve formě jejich metabolitů prostřednictvím výkalů a moči a odcházejí díky splaškům až na čistírny odpadních vod. Zde však nejsou některé z nich dostatečně zachycovány a přecházejí tak dále do recipientu, kde následně mohou působit na říční biocenózu a také se transportovat do dalších částí ekosystému. Není tak vyloučena ani kontaminace podzemních vod a pitných zdrojů, čímž se vlastně pomyslný koloběh těchto látek uzavírá.

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

Za další významný zdroj jsou považovány léky s prošlou expirací, které se do koloběhu dostávají buď formou průsaků ze skládek nebo díky spláchnutí do odpadu. Mezi menší zdroje lze zařadit např. stabilizovaný kal z čistírny odpadních vod, farmaceutická výrobní zařízení a další (Kotyza a kol., 2009).

Dokonce i v nekonečně malých koncentracích mají některá léčiva potenciál k tomu, aby zasahovala škodlivě do normálního vývoje vodních organismů. Nízké koncentrace léčiv pravděpodobně nevyvolají akutní toxické efekty. Lokalizované změny v biogeochemických cyklech ale způsobí jemné modifikace v růstu rostlin, chyby v přeměně larev či chyby v líhnutí a anatomické deformace v širokém okruhu organismů (Khetan a kol., 2007).

Aktivní substance byly nalezeny prakticky ve všech složkách prostředí, a to v širokém koncentračním rozmezí (od 1 ng/l až po 1 mg/l) a také téměř na všech místech planety (Kotyza a kol., 2009). Nalezené koncentrace bývají pod úrovněmi, které jsou považovány za akutně toxické lidem, ale chronická expozice nízké úrovni koncentrace je znepokojující. Mezi nejvážnější vyšetřované důsledky chronické expozice patří snižující se počty spermií a resistance na antibiotika. Možnost chronické toxicity směrem k vodní flóře a fauně kvůli dlouhodobému vystavení směsi farmaceuticky aktivních sloučenin je předmětem zkoumání (Bound a kol., 2006).

Za předpokladu, že by všechny přípravky dodané distributory do zdravotnických zařízení v České republice byly použity pacienty, činila by průměrná spotřeba léčivých přípravků jedním občanem České republiky v roce 2007 33,35 balení (Kotyza a kol., 2009).

2.2 Toxikologie, ekotoxikologie

Životním prostředím označujeme vše, co vytváří přirozené podmínky existence organismů včetně člověka a je předpokladem jejich dalšího vývoje. Jeho složkami jsou zejména ovzduší, voda, horniny, půda, organismy, ekosystémy a energie.

Ekosystém tvoří funkční soustava živých a neživých složek životního prostředí, jež jsou navzájem spojeny výměnou látek, tokem energie a předáváním informací, a které se vzájemně ovlivňují a vyvíjejí v určitém prostoru a čase.

Ekologickou stabilitou rozumíme schopnost ekosystému vyrovnávat změny způsobené vnějšími činiteli a zachovávat své přirozené vlastnosti a funkce.

Znečišťování životního prostředí znamená vnášení takových fyzikálních, chemických nebo biologických činitelů do životního prostředí v důsledku lidské činnosti, které jsou svou podstatou nebo množstvím cizorodé pro dané prostředí (Zákon č. 17/1992 Sb.).

Ekologie je nauka o životním prostředí studující vztah mezi biologickými systémy a jejich neživým prostředím. Je zaměřena na tři úrovně biologického uspořádání, a to na jednotlivce, populace a společnost (Moiseenko, 2008).

Toxikologii definujeme jako nauku o jedech, což je každá sloučenina, která vyvolá poruchu biologické rovnováhy, charakteristické pro zdraví. Pro takový děj je rozhodující především dávka látky. Mezi odvětví toxikologie patří toxikologie chemická, farmakologická, biochemická, klinická, průmyslová, potravinářská, veterinární, zemědělská, vojenská toxikologie a ekotoxikologie (Prokeš a kol., 2005).

Ekotoxikologie studuje jako vědecká disciplína vlastnosti toxických látek, jejich chování v přírodním prostředí a mechanismy jejich dopadu na organismy, obyvatelstvo a společnost (Moiseenko, 2008). Prokeš a kol. (2005) představuje ekotoxikologii jako hraniční obor mezi toxikologií a ekologií.

Ekotoxikologii jako směr toxikologie poprvé představil v roce 1969 Thruhaut a určil jako jeho hlavní cíl studování dopadu přírodních či syntetizovaných toxických látek na ekosystém, živočichy, rostliny a mikrobiální společenství. Tímto se liší od klasické toxikologie, která je zaměřena na efekt jedovatých látek na individuální organismy v experimentálních podmínkách. Pochopení procesů na individuální úrovni může vysvětlit podstatu procesů na úrovni celého ekosystému (Moiseenko, 2008).

Předmětem zájmu ekotoxikologie bývá i pohyb polutantů v životním prostředí, předpovídání účinků potenciálně toxických látek na ekosystémy a různé druhy živočichů (Kočí a kol., 2002).

Výzkum v ekotoxikologii se liší od zaměření se na zdravotní rizika pro jedince v humánním testování. Výsledky těchto studií jsou ale důležité, protože mohou souviset s vyplývajícími efekty na úrovni populace a na úrovni vyšší (Khetan a kol., 2007).

V ekotoxikologii má důležité místo biotest, využívající biologický systém, zahrnující expozici organismu testovaným materiálem a stanovující odpověď organismu (Kočí a kol., 2002).

Ekotoxikologie využívá četných přírodních věd pro studování odpovědi organismů na toxický stres, například fyziologii, imunologii, chemii, geochemii, ekologii (Moiseenko, 2008).

Aktuální ekotoxikologické riziko a odhad rizika je založen na analyzování nepříznivého efektu jednotlivých látek standardizovanými laboratorními testy. Reálný účinek a odhad rizika zahrnuje vícenásobné efekty, nejen expozici chemické látky, ale i změnu podmínek prostředí (teploty, světelné intenzity, dodávky vody...). Analyzování, pochopení a předpovídání těchto faktorů je jedna z výzev v ekotoxikologii. Další výzvou je uvážení množství různorodých druhů jednotlivců i společenstev vystavených kombinacím polutantů a nechemickým stresovým faktorům. V ekosystému je genetická diverzita, ovlivňování a komunikace mezi organismy, interakce v potravním řetězci... (Eggen a kol., 2007)

Akvatická ekotoxikologie se zabývá jakostní a kvantitativní analýzou dopadu toxických a nebezpečných látek na vodní organismy, osudem těchto sloučenin ve vodním prostředí, sedimentech dna a vlivem na trofické složení. Studie zahrnují dopad chemických látek nejen na individuální organismy, ale i na celý ekosystém (Moiseenko, 2008). Akvatická ekotoxikologie poskytuje mnoho metodik k testování toxických účinků látek (Kočí a kol., 2002).

Terestriální testy toxicity v tzv. kontaktním uspořádání se začaly vyvíjet s rostoucí potřebou testovat látky ve vodě špatně rozpustné či komodity jako jsou zeminy (Kočí a kol., 2002).

2.3 Toxicita a její klasifikace, vyjádření výsledků testů toxicity

Toxicitou rozumíme nahromadění poruch během krátkého či dlouhého časového období, znamenající neschopnost organismů přizpůsobit se.

Ekotoxicitu definujeme jako nahromadění poruch na úrovni hierarchické struktury. Je klasifikovaná buď podle činitelů (základní prvky a sloučeniny jako například kovy, stabilní organické polutanty), nebo podle úrovně biologické organizace (organismy, populace, či ekosystémy), nebo doby expozice (akutní, subakutní, či chronická), anebo podle důsledků (letální či subletální).

Destruktivní či dezorganizující faktory mohou být netypické nebo se mohou prokázat v netypických koncentracích. Ovlivní biologický systém změnou struktury, změnou energetických toků apod. Systém se snaží udržet v homeostázi. Pokud změny překročí schopnost adaptace, organismus umírá, obyvatelstvo degraduje a společnost se transformuje do nového stavu. U jednotlivce se snadno rozliší standard od patologie, ale ve vyšších úrovních hierarchické struktury ekosystémů je to obtížnější.

Stav biologických systémů vyšších úrovní (populace, společnosti) není pouhý souhrn změn v živých organismech, ale celkový výsledek účinku prostředí (síla a trvání působení nebezpečného činitele) a tolerance biologických systémů.

Chemická látka zpočátku modifikuje strukturu a funkce molekul, ty vedou ke změně buněčné aktivity. Tyto změny ovlivní strukturu a funkce buněčných orgánů, které postupně modifikují fyziologický stav organismu, vedoucí ke změnám v růstu a reprodukci jedinců a obyvatelstva. Struktura populace se mění, a to vede ke změně společnosti. Postupná odpověď v každé úrovni hierarchické struktury není přímá a způsobuje i zpětné vazby.

Akutní efekty se prokážou ihned a obvykle vedou k rychlé smrti ovlivněného organismu, zatímco chronické efekty jsou dlouhotrvající a způsobují pomalý vývoj patologického procesu. Chronické účinky mohou vést buď k přizpůsobení či chronickému onemocnění, úbytku délky života (Moiseenko, 2008).

Vyjádření výsledků testů toxicity

EC₅₀ je střední efektivní koncentrace, koncentrace zkoušené látky ve vodě (mg/l), půdě či sedimentu (mg/kg), která způsobí efekt [odpověď v populaci (Knight a kol., 2003)] u 50% testovacích organismů po určité době vystavení. Expoziční doba musí být specifikovaná (například 72-h EC₅₀) (Moser a kol., 2009).

Vyjádření ekotoxického účinku EC hodnotou je standardní přístup k prezentování údajů o toxicitě (Morrison a kol., 2007).

LC₅₀ je střední letální koncentrace, koncentrace látky ve vodě, půdě či sedimentu, která způsobí úhyn 50% testovacích organismů po určité době vystavení. Expoziční doba musí být specifikovaná (například 48-h LC₅₀) (Moser a kol., 2009).

IC₅₀ je koncentrace, která způsobí 50% inhibici.

Kontrola přežití musí být nejméně 90 % (Tsiridis a kol., 2002).

Hodnoty LC₅₀ (EC₅₀, IC₅₀) se získají statistickými metodami. Hodnoty LC₅₀ (EC₅₀) lze převést na jednotky toxicity TU výpočtem: 100/LC₅₀ (Tsiridis a kol., 2002).

Tabulka I. uvádí klasifikaci rizika toxicity do tříd podle jednotek TU dle Tsiridise a kol., 2002, tabulka II. systém klasifikace rizika pro vodní prostředí dle Persooneho a kol., 2003, tabulka III. třídění chemikálií podle nebezpečnosti pro životní prostředí dle Knighteho a kol., 2003.

Tab. I: Systém klasifikace toxicity (Tsiridis a kol., 2002)

Třída	TU	Riziko toxicity
0	0	netoxický
1	≤ 1	mírně toxický
2	1 - 10	toxický
3	11 - 100	velmi toxický
4	> 100	extrémně toxický

Tab. II: Systém klasifikace rizika odpadu vypuštěného do vodního prostředí (Persoone a kol., 2003)

Třída	TU	Toxicita
I	< 0,4	žádná akutní toxicita
II	0,4 < TU < 1	mírná akutní toxicita
III	1 < TU < 10	akutní toxicita
IV	10 < TU < 100	vysoká akutní toxicita
V	TU > 100	velmi vysoká akutní toxicita

Tab. III: Klasifikace chemikálií podle nebezpečnosti pro životní prostředí (Knight a kol., 2003)

LC ₅₀ [mg/l]	Hodnocení
< 1	vysoce toxický vodním organismům
> 1 < 10	toxický vodním organismům
> 10 < 100	mírně toxický vodním organismům
> 100	relativně netoxický

Hodnocení rizika pro životní prostředí

Cílem **hodnocení vztahu dávky a odpovědi** je odhad koncentrace hodnocené látky v dané složce životního prostředí, pod kterou se neočekává výskyt nepříznivých účinků v dané složce životního prostředí: *PNEC (predicted no-effect concentration)*. Pokud není možné v některých případech hodnotu *PNEC* určit, je nutné odhadnout vztah dávky a odpovědi alespoň kvalitativně.

Hodnotu *PNEC* je možné vypočítat s použitím faktorů nejistoty z experimentálních údajů zjištěných zkouškami na organismech, např. z LD_{50} (střední letální dávky), z LC_{50} , z EC_{50} , z IC_{50} (střední inhibiční koncentrace), z $NOEL(C)$ (dávka (koncentrace) bez pozorovaného nebezpečného účinku), z $LOEL(C)$ (nejnižší dávka (koncentrace) s pozorovaným nepříznivým účinkem), nebo jinými vhodnými metodami. Faktor nejistoty vyjadřuje stupeň nejistoty při extrapolaci údajů na reálné životní prostředí ze zkoušek na omezeném počtu druhů organismů.

Cílem hodnocení expozice je odhad koncentrace, v jaké se pravděpodobně bude hodnocená látka vyskytovat v životním prostředí: *PEC (predicted environmental concentration)*.

Při odhadování hodnoty *PEC* nebo při kvalitativním odhadu expozice je potřebné zohlednit zejména

- a) výsledky řádně změřených expozičních údajů,
- b) množství, ve kterém se látka vyrábí nebo dováží,
- c) formu, ve které se látka vyrábí, dováží, nebo ve které se používá,
- d) způsob použití a možnosti omezení jejího šíření,
- e) údaje o zpracování látky, pokud jsou významné,
- f) fyzikálně-chemické vlastnosti látky, zejména bod tání, bod varu, tenzi par, povrchové napětí, rozpustnost ve vodě, rozdělovací koeficient n-oktanol/voda,
- g) produkty rozkladu nebo přeměn,
- h) očekávané cesty vstupu látky do dílčích složek životního prostředí, očekávanou míru adsorpce/desorpce a schopnost rozkladu,
- i) frekvenci a trvání expozice.

Ve zdůvodněných případech je možné k odhadu *PEC* využít i údaje získané monitorováním jiných látek s analogickým způsobem použití a typem expozice, nebo s analogickými vlastnostmi (Vyhláška č. 223/2004 Sb.).

Charakterizace rizika

Pro každou danou složku životního prostředí se, pokud je to možné, stanoví poměr *PEC/PNEC*. Pokud je tento poměr rovný nebo menší než jedna, není nutné získávat další informace, provádět zkoušení ani dále rozšiřovat dosavadní postupy omezování rizika. Pokud je tento poměr větší než jedna, je nutno posoudit, zda jsou k vyjasnění závažnosti potřebné další informace nebo zkoušky, nebo zda je nutné přijmout opatření k omezení rizika (Vyhláška č. 223/2004 Sb.).

2.4 Ekotoxikologické studie, biotesty a jejich dělení

Tisíce chemických látek jsou kontinuálně uvolňovány do životního prostředí, kde mají potenciál k nepříznivým účinkům na ekosystémy, a to i v nízkých koncentracích. Za účelem zabránění nežádoucím efektům polutantů v životním prostředí vyvinula věda a společnost metody a nástroje pro sledování jejich osudu a distribuce (environmentální chemie) a pro analyzování účinků polutantů na biotu ve standardizovaných testech (ekotoxikologie). Pro posouzení rizik je nutné spojit data získaná environmentální chemií a ekotoxikologií. Cílem je pochopení, předpovídání a předcházení nepříznivým efektům polutantů na ekosystém (Eggen a kol., 2007).

V posledních letech se postupně pozornost zaostřuje na použití testů toxicity jako užitečného nástroje k tomu, aby odhadoval chemické znečištění a jeho potenciální dopad na suchozemské a vodní životní prostředí (Tsiridis a kol., 2002).

Testy toxicity jsou podstatou ekotoxikologické laboratorní práce. Nespecifické testy toxicity zachycují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovaných vzorcích a slouží k rychlé informaci o tom, zda je vzorek toxický, či nikoliv (Kočí a kol., 2002).

Ekotoxikologické biotesty poskytují podklady pro ekotoxikologické studie, hodnocení rizik apod. (Kočí a kol., 2002). Ekotoxikologické studie slouží k zahrnutí teoretických znalostí k praktickým schopnostem zaměřeným na zajištění bezpečnosti prostředí: eliminace zdroje polutantů, předcházení ničení přírody, obnovení a podpora fyzikálně-chemické a biologické struktury narušených ekosystémů (Moiseenko, 2008).

Biotest je proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku.

Biotesty mohou být zahrnuty buď do počátečního screeningu, který stanoví a prioritizuje potenciální zdroje znečištění, nebo mohou následovat za chemickými analýzami, aby determinovaly a prioritizovaly vysoké hladiny nebo biodostupnost kontaminant (Kočí a kol., 2002).

Pokud má zkouška toxicity sloužit k hodnocení látek ovlivňujících ekosystémy, posuzuje se látka v koncentracích, v jakých do prostředí vstupuje či v jakých se může vyskytovat (Kočí a kol., 2002).

Ne všechny polutanty v životním prostředí jsou biodostupné. Biodostupné polutanty navíc nemusí vstupovat do cílového místa toxického účinku. Toxikokinetické procesy (absorpce, metabolismus, vylučování) určují koncentraci znečišťujících látek v cílovém místě, koncentrace se navíc snižuje například sorpcí k usazeninám (Eggen a kol., 2007).

Biotesty mohou signalizovat nebezpečí, aniž fyzikálně-chemické analýzy detekují zvýšené hladiny nebezpečných látek ve vzorku, a naopak i přes indikaci toxicity z fyzikálně-chemických rozborů reagují testované organismy negativně. Organismus totiž vypovídá o testovaném materiálu komplexně, záleží například na biodosažitelnosti toxických složek nebo se mohou projevit interakce mezi přítomnými polutanty, které z chemických rozborů nevyplývají (Kočí a kol., 2002).

Znalost reálné koncentrace polutantu je základem monitoringu životního prostředí. Neposkytuje ale informaci o skutečném vlivu látky na živé organismy či ekosystém. Ekotoxikologické biotesty se snaží překonat propast mezi analytickým stanovením a účinky látek. Jde o překonání rozdílu mezi působením látky na organismy v laboratorním uspořádání testu a působením látky na dané lokalitě, kde hrají roli další faktory a propast mezi znalostí koncentrace látek v prostředí a odhadem jejich účinku na organismy (Kočí a kol., 2002).

Mnoho živých organismů může hromadit toxické látky, tělesné koncentrace jsou pak mnohem vyšší než v jejich životním prostředí. V dnešní době je mnoho monitorovacích programů po celém světě, které využívají například slávky a ústřice jako indikátory kontaminujících látek v mořském prostředí. Tělesné koncentrace mohou být dále užívány pro hodnocení absorpce polutantu živými organismy a bioakumulace. Jedna část potravního řetězce kontaminovaná polutanty může nepříznivě ovlivnit druhy ve vyšších trofických úrovních (Mountassif D. a kol., 2007).

Ekotoxikologické biotesty využívají pro stanovení sledovaného jevu detekční systémy (organismy, tkáně apod.), které jsou relevantní pro sledované ekosystémy či matrice (vodní, půdní ekosystémy, chemické látky, odpady apod.). Umožňují interpretaci, mají dostatečnou výpovědní hodnotu apod. (Kočí a kol., 2002).

Ve srovnání s více než pěti miliony druhů na zemi je pouze velmi málo druhů využíváno jako zkušební organismy v ekologickém odhadu rizik k tomu, aby ohodnotily účinky na ekosystém. Důležitá kritéria pro výběr ekotoxikologických zkušebních druhů jsou citlivost, reprezentace ekosystému, kterého by se dopad týkal, množství a dostupnost druhů, ekologická důležitost, stejně jako praktické aspekty jako snadná manipulace a kultivace druhů v laboratoři (Ratte a kol., 2003).

Testy toxicity cílené ve vztahu k člověku, nikoli k životnímu prostředí, nelze uvádět mezi ekotoxikologické biotesty. Ekotoxicita by měla sledovat účinky testované substance na úrovni producentů, konzumentů a destruentů (Kočí a kol., 2002).

Současným trendem je vyvíjet miniaturizované, plně validované metodiky ekotoxikologických biotestů (umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních, reprodukovatelných podmínek). Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek či různých organismů mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří (Kočí a kol., 2002).

Původní definice ekotoxikologických biotestů uznávala pouze vliv látek na živé organismy, dnes jsou uznávány pro hodnocení rizik také biotesty na úrovni suborganismální (3. generace ekotoxikologických biotestů) (Kočí a kol., 2002).

Hlavní rozdíl mezi ekotoxikologickými biotesty a *in situ* metodami je, že biotesty zahrnují experimentální expozice v laboratorním uspořádání, kde jsou všechny proměnné kontrolovány nebo známy. Studie přírodních populací jsou však ovlivněny mnoha variabilními fyzikálními, chemickými a biologickými faktory, které se navíc ve svých účincích na populace různě kombinují a proto nelze jednoduše oddělit tuto variabilitu od vlivu toxických látek. Nezbytnost redukovat přírodní prostředí na o mnoho jednodušší laboratorní situaci může vést k podhodnocení nebo nadhodnocení efektů toxické látky v přírodě (Kočí a kol., 2002).

Základní přehled nejčastějších dělení ekotoxikologických biotestů dle Kočího a kol. (2002)

Podle doby expozice: akutní, semiakutní, chronické.

Podle pokročilosti designu testovacího systému: 1. generace (klasické - standardní), 2. generace (mikrobiotesty), 3. generace (biosenzory, biosondy, biomárkry).

Podle trofické úrovně testovacích organismů: producenti, konzumenti, destruenti.

Podle testované matrice: voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka.

Podle typu testovaného vzorku: čisté chemické látky, směs látek, přírodní vzorky.

Dle způsobu přípravy vzorku: definované koncentrace chemických látek, testování výluhů přírodních vzorků, semipermeabilní membrány, přímé testy.

Dle stupně komplexnosti detekčního systému: enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury *in vitro*, intaktní živý organismus, populace, micro/mezo kosmos, terénní experimenty.

Dle způsobu vyhodnocování: letální efekty, subletální efekty, hodnocení fyziologické aktivity, reprodukční aktivita, malformace, teratogenita atd.

Speciální testy pro hodnocení rizik v životním prostředí: stanovení například těchto parametrů: trofie, mutagenita/genotoxicita nejen na bakteriích, ale také na rostlinách, volně žijících zvířatech a rybách, teratogenita, například na obojživelnících, embryotoxicita a reprodukční testy na rybách, korýších, obojživelnících, ptácích apod.

V akutních testech jsou pozorovány odpovědi jako úmrtnost či imobilizace. Dlouhodobé testy se zaměřují na účinky na reprodukci, růst či jiné fyziologické procesy (Ratte a kol., 2003).

Doporučuje se ověřovat správnost postupu a kvality testovacího materiálu pomocí testu provedeného na standardu. Testy se standardy se provádějí za stejných podmínek a vyhodnocují stejným způsobem jako základní testy.

Kontrola je testování organismu v prostředí bez přídavku testované látky za stejných podmínek jako probíhá test, pro který je kontrola využívána (Metodický pokyn odboru odpadu ke stanovení ekotoxicity odpadu, 2007).

Ve světě existuje celá řada ekotoxikologických metodik. Jako velice perspektivní se jeví rozšířit do co největšího počtu zemí jednotnou metodiku a jednotné hodnocení toxicity látek. V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozsáhlejší patří metodiky ISO (International Organisation for Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci) a metodiky OECD (Organization for Economic Cooperation of Development) (Ambrožová, 2003).

Nový přístup je založený na použití klidových stádií vybraných vodních organismů, ze kterých se mohou stát v čase potřeby snadno získané organismy k vykonání testu toxicity. Několik vysoce standardizovaných testů toxicity s bezúdržbovou kulturou je komerčně dostupných s vybranými druhy mikrořas, prvoků, vířníků a korýšů (Tsiridis a kol., 2002).

Při testování na rybách musí být před testováním zhodnoceny etické problémy. Testování na obratlovcích by mělo být minimalizováno, pokud není považované za nezbytné. Testování s bezobratlými druhy by mělo být používáno přednostně. Použití kvantitativních vztahů struktura - účinek je doporučované k výběru dávky proto, aby redukovalo počty testovacích zvířat (Knight a kol., 2003).

Kvantitativní vztah struktura - účinek (QSAR - Quantitative structure - activity relationship) je široce používán k předpovídání aktivity nových drog, nebo toxicity environmentálních chemikálií. Cíl QSAR je odhadovat vlastnosti molekul (z fyzikálních například teplotu varu, rozpustnost, z biologických například kancerogenní účinek či LD₅₀) a klasifikovat molekuly podle strukturálních rysů. Pomocí matematických výpočtů (korelace mezi molekulární strukturou a aktivitou/vlastnostmi) se vytváří modely, které dovolují předpovědi biologických účinků či fyzikálních vlastností nové molekuly právě porovnáním deskriptorů neznámé molekuly s deskriptory již známých a analyzovaných sloučenin. Tyto analýzy jsou vhodné pro předpověď toxikologických endpointů pro jejich ekonomickou nenáročnost a krátký zpracovací čas na generování velkého množství dat (Christen a kol., 2010).

2.5 Ekotoxikologické testy podle trofické úrovně testovaných organismů

Každý organismus reaguje na přítomnost toxického materiálu jiným způsobem, proto je nezbytné k získání co nejkomplexnější informace o jeho toxickém působení na živé organismy použít k testování vždy více druhů a vždy zástupce všech trofických úrovní (producenti, konzumenti, destruenti). Do sady analýz je třeba vybírat také testy, které jsou schopny testovat jak kapalné, tak i pevné vzorky (Kočí a kol., 2002).

2.5.1 Testy s producenty

Producenti jsou organismy živící se anorganickými látkami, z nichž syntetizují organické látky. Je-li při syntéze organických látek zdrojem energie světelné záření, proces se označuje jako fotosyntéza. Fotosyntéza je umožněna asimilačním pigmentem, tzv. chlorofylem, obsaženým v chloroplastech či chromatoplastech v buňce. Při fotosyntéze vznikají organické látky a kyslík, který je uvolňován do okolního prostředí. Typickými zástupci producentů jsou mikroskopicky pozorovatelné sinice a řasy a makroskopicky pozorovatelné mechorosty, kapradňorosty a semenné rostliny (nahosemenné a krytosemenné) (Říhová Ambrožová, 2007).

Jako standardní testovací organismy reprezentující primární producenty se používají zelené řasy (Ratte a kol., 2003).

Testy v akvatickém prostředí

Řasové testy toxicity

Exponenciálně rostoucí kultury vybraných zelených řas jsou po několika generacích vystaveny za definovaných podmínek různým koncentracím zkušební látky. Zkušební roztoky se kultivují 72 hodin, během nichž se alespoň každých 24 hodin měří hustota buněk v každém roztoku. Stanoví se snížení růstu ve srovnání s kontrolní kulturou. Je doporučeno použít rychle rostoucí druhy zelených řas vhodné pro kultivaci a zkoušení. Dává se přednost následujícím druhům: *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* (Vyhláška č. 222/2004 Sb.).

Kočí a kol. (2003a) rozlišuje řasové testy trofie a toxicity s mořskými řasami (používají rozsivku *Phaeodactylum tricornutum*) a se sladkovodními řasami. Lze použít tyto sladkovodní řasy: *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella kessleri*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Specifitou řasového testu je to, že během doby expozice (3 - 4 dny) je toxickému vlivu vystaveno 4 - 5 generací populace, takže se častěji hovoří o subchronickém testu, než o testu akutní toxicity (Kočí a kol., 2003a).

Standardní test je prováděn v 250ml Erlenmayerových baňkách a je značně neekonomický, proto byly vypracované miniaturizované metody: řasový mikrobiotest prováděný v jamkových destičkách (Kočí a kol., 2003a). Příkladem je 72hodinový mikrobiotest Algaltokit FTM obsahující řasu *Selenastrum capricornutum* (Manusadzianas a kol., 2000).

Test inhibice růstu okřešku

Tento test je velmi užitečný jako dodatečný informační zdroj o fytotoxicitě. Okřehek patří mezi jednoděložné, krytosemenné rostliny vodních porostů, je to rychle rostoucí vyšší cévnatá rostlina, která je rozšířená celosvětově ve stojatých vodách od tropů k mírné i polární oblasti.

Pro test se používají druhy *Lemna minor*, *L. gibba*, *L. triscula*, méně často *L. perpusilla*, mladé rostliny se dvěma či třemi listy. V definovaném časovém schématu (den 0, 3, 5 a 7) se hodnotí počet listů nebo na konci testu hmotnost sušiny, mimo to i změny ve vývoji rostlin, jako výskyt chlorózy, nekrózy či změny v délce kořene (Ratte a kol., 2003).

Cleuvers (2003) uvádí, že při hodnocení ekotoxikologického potenciálu deseti léčiv byl *Lemna minor* citlivějším organismem než *Dafnia magna* a *Desmodesmus subspicatus*. Kočí a kol. (2003b) hovoří o tomto testu jako o přechodu mezi akvatickým a terestriálním pojetím testování.

Testy v terestrickém (suchozemském) prostředí

Testy s cévnatými rostlinami

Rostliny jsou nejdůležitější suchozemští primární producenti, tvořící základ všech ekosystémů. Přes fotosyntézu transformují biodostupnou energii v biomasu. V ekosystému plní funkce jako poskytování potravy a přirozeného prostředí pro mnoho zvířecích druhů a ochrana půdy proti erozi. Kromě živin rostliny také mobilizují a hromadí polutanty, ty jsou pak dostupné pro suchozemské potravní řetězce. Rostliny jsou (obvykle) imobilní a v úzkém kontaktu s půdou a půdní vodou mohou být proto užívány jako indikátory vlastností příslušné půdy a stanoviště. Mnoho vyšších rostlin může být snadno kultivovaných a množených v laboratoři. Z těchto důvodů přicházejí v úvahu jako zkušební organismy pro hodnocení toxicity chemikálií v půdě.

Existuje několik ekotoxikologických zkušebních metod s vyššími rostlinami. Standardizované testy bývají často s alespoň jedněmi jednoděložnými a jedněmi dvouděložnými druhy. Běžné akutní testy trvají mezi několika dny a třemi týdny (v závislosti na příslušných druzích). Nejdůležitější endpoint měření je biomasa a délka výhonku, stejně jako polokvantitativní parametry jako výskyt chlorózy či nekrózy, zatímco vzcházivost je méně vhodná kvůli jeho nízké citlivosti. Parametry životnosti jako reprodukce jsou užívány zřídka kvůli těžšímu hodnocení.

Obecně je považováno testování růstu dvou druhů vyšších rostlin za postačující pro ochranu těchto organismů v suchozemském prostředí (Moser a kol., 2009).

Rostliny jsou typické pro hodnocení terestrických ekosystémů (orná půda, lesní půdy, komposty, tuhé odpady, pesticidy apod.). Existuje velké množství testů, například testy s bylinami, dřevinami, testy s plevelnými druhy a kulturními plodinami, testy cílené na jednoděložné a dvouděložné, testy využívající semena, cibule, hlízy, vegetativně množený materiál atd.

Podle způsobu experimentálního uspořádání máme testy využívající extrakt na filtračním papíru v Petriho misce anebo přímý kontakt sedimentu, odpadu, zeminy s klíčící rostlinou.

Je mnoho způsobů hodnocení testů s cévnatými rostlinami. Mezi nejčastější patří délka kořene, hypokotyle, popřípadě nadzemní části rostliny a plochy listů, další možností je hmotnost živé nadzemní biomasy a sušiny, hmotnost živé biomasy kořene a sušiny, defekty chlorofylu, nekrózy a jiné abnormality. Vyhodnocovat lze pomocí aktivit dehydrogenáz, fosfatáz, oxidáz, peroxidáz, syntézy glutationu. Dále se může hodnotit doba dosažení fenologických fází, u dřevin přírůstky, odolnost proti chorobám a škůdcům, fotosyntetická aktivita apod. (Kočí a kol., 2003a).

V praxi jsou nejdostupnější dva typy zkoušek fytotoxicity se zaměřením na klíčivost semen rostlin anebo na sledování růstu po vyklíčení. Jako testovací organismy se používají semena jednoděložných (např. *Sinapis alba*, *Lactuca sativa*, *Cucumis sativum*, *Lycopersicon esculentum*) i dvouděložných rostlin (např. *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*) (Kočí a kol., 2003a).

2.5.2 Testy s konzumenty

Konzumenti jsou organismy přijímající hotové organické látky, které ve svém těle zpracovávají endoenzymy a tyto rozložené látky používají ke stavbě svého těla. Patří sem většina zástupců jednobuněčných (Protozoa, tzv. prvoci) a mnohobuněčných organismů (Metazoa). Konzumenty řadíme mezi organismy organotrofní, existují mezi nimi užší ekologické vazby. Výživa vývojově vyššího organismu závisí na výskytu vývojově nižšího organismu, podle toho se rozlišují konzumenti prvního, druhého, třetího a vyššího řádu. Konzumenti prvního řádu se živí rostlinnou stravou, označujeme je jako primární konzumenty. K sekundárním konzumentům řadíme masožravce, k terciárním pak predátory drobných masožravců (Říhová Ambrožová, 2007).

Daphnia magna a jiné dafnie patří k tradičně používaným druhům zastupujícím primární konzumenty. Různé druhy ryb řadíme k sekundárním konzumentům (Ratte a kol., 2003).

Testy s bezobratlými organismy v akvatickém prostředí

Testy s *Daphnia magna*

Sladkovodní perloočka *Daphnia magna* je jedním z nejstarších a široce užívaných zkušebních organismů ve vodní toxikologii. Má několik výhodných charakteristických rysů, malou velikost, snadnou kultivovatelnost v laboratoři a relativní citlivost na chemikálie ve srovnání s jinými sladkovodními bezobratlými. Její relativně krátká délka života a reprodukční cyklus ji přímo určují pro chronické testování. Je dlouho studovaným organismem, proto máme hodně informací o její biologii. Dafnie je nejčastěji testovaný sladkovodní druh jak v akutních, tak v chronických testech.

V akutních testech vystavujeme dafnie mladší než 24 hodin různým koncentracím testované substance ve statickém systému po dobu 48 hodin bez stravy. Hodnotí se imobilizovaní, případně uhynulí jedinci.

Chronický test s dafniemi hodnotí efekt testovaného materiálu na reprodukci dafnie. Dafnie mladší 24 hodin jsou vystavené po dobu 21 dnů testované substanci. Test může být proveden ve statickém uspořádání nebo s výměnou média u látek prchavých nebo stabilních po dobu tří dnů (tzn. koncentrace zkušební substance klesne pod 80 % počáteční měřené koncentrace během tří dnů) (Ratte a kol., 2003).

Mikrobiotesty s konzumenty

Daphtoxkit F magnaTM: 24 - 48hodinový mikrobiotest s *Daphnia magna*,
Thamnotoxkit FTM: 24hodinový mikrobiotest s *Thamnocephalus platyurus*
(Manusadzianas a kol., 2000).

Tsiridis a kol. (2002) uvádí také:

Daphtoxkit FTM pulex: 24 - 48hodinový mikrobiotest s *Daphnia pulex*,
Ceriodaphtoxkit FTM: 24 - 48hodinový mikrobiotest s *Ceriodaphnia dubia*,
Artoxkit MTM: 24 - 48hodinový mikrobiotest s *Artemia franciscana*,
Rotoxkit FTM: 24hodinový mikrobiotest s vířníkem *Brachionus calyciflorus* a
Rotoxkit MTM: 24hodinový mikrobiotest s *Brachionus plicatilis*.

Testy s bezobratlými organismy v terestrickém prostředí

Testy s chvostoskoky

Chvostoskoci patří k ekologicky relevantním testovacím organismům, protože se běžně vyskytují v půdách, jsou lehce vzorkovatelní a lze je chovat v laboratoři (Kočí a kol., 2003b). Používají se dlouhou dobu v odhadu rizik pesticidů v akutních testech i testech reprodukce (Ratte a kol., 2003). Jde o bezkřídý půdní hmyz. Díky relativně rychlému životnímu cyklu s vysokou reprodukcí je test časově dobře proveditelný. Využívá se 10 - 12denních jedinců *Folsomia candida*, kteří se uvedou na hodnocený substrát. Akutní toxicita (vyjádřena jako mortalita) se hodnotí po 14 dnech a reprodukční toxicita po 4 týdnech. Vyšší citlivost se pozoruje u endpointu reprodukce. Další využívané druhy jsou *Isotoma viridis*, *Onychiurus armatus*, *O. quadricellatus*, *Orchesella cincta*, *Tullbergia granulata* (Kočí a kol., 2003b).

Test toxicity půd a půdních materiálů na chvostoskoku *Folsomia candida* je uveden ve vyhlášce č. 257/2009 Sb. jako jeden z ekotoxikologických testů pro testování sedimentů.

Testy s hlemýždi

Využívá se druh *Helix aspersa*, který je exponován kontaktem, příjmem potravy a dýcháním. Dobře se chová v kontrolovaných podmínkách. Po dobu 4 týdnů se týdně sleduje mortalita a růst (hmotnost a růst schránky) (Kočí a kol., 2003b).

Testy s včelou medonosnou

Apis mellifera se využívá v testech akutní kontaktní toxicity a akutní orální toxicity. Cílem je stanovení vlastní toxicity pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Pro test se využívají dospělé dělnice.

Akutní orální toxicita (respektive kontaktní) je nepříznivý účinek, ke kterému dochází nejpozději do 96 hodin od orálního (respektive lokálního) podání jedné dávky zkoušené látky (Vyhláška č. 222/2004 Sb.).

Vzhledem k významu včel se toxicita agrochemických přípravků hodnotí právě ve vztahu ke včelám, avšak takto získané údaje slouží i obecněji k posuzování toxicity pro ostatní užitečný hmyz (Kočí a kol., 2003b).

Testy s obratlovci v akvatickém prostředí

Rybí biotesty

Akutní a chronické rybí testy jsou užívané pro hodnocení efektu chemikálií či průmyslových odpadních vod na přežití či subletální parametry (Ratte a kol., 2003).

Jelikož ryby patří mezi obratlovce, vztahují se na experimentální práci s nimi požadavky etické komise na ochranu zvířat proti týrání (Kulovaná a kol., 2009).

Akutní toxicita pro ryby

Účelem zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Metody mohou být statické (zkušební roztok neprotéká), semistatické (roztok je vyměňován po delších časových úsecích) nebo průtokové (neustálá obměna zkušební roztoku), výběr se provádí podle vlastností testované látky. Ryby se exponují 96 hodin, nejméně 7 na každou koncentraci. Hodnotí se mortalita a zjevné abnormality (Vyhláška č. 222/2004 Sb.).

Mezi druhy ryb doporučené vyhláškou č. 222/2004 Sb. pro zkoušení toxicity patří *Brachyodanio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus carpio*, *Oryzias latipes*, *Poecilia reticulata*, *Lepomis macrochirus*, *Onchorhynchus mykiss* a *Leuciscus idus*.

Ratte a kol. (2003) uvádí další metody využívající ryby jako testovací organismy, a to chronický test toxicity, krátkodobou zkoušku toxicity na rybích embryích a potěru, testy na časných stádiích vývoje ryb apod.

Testy s obojživelníky

Kočí a kol. (2003b) uvádí, že obojživelníci mají řadu unikátních biologických i ekologických charakteristik s významem pro ekotoxikologické procesy (tvoří významnou součást ekosystémů, většina zástupců prodělává proces metamorfózy, kdy ve vodním prostředí žijí vajíčka a časná vývojová stádia (embrya a larvy) jsou přeměněna v převážně terestricky žijící dospělé). Tato životní strategie reprezentuje řadu rozličných expozičních cest a míst pro působení polutantů (vodní prostředí vs. terestrické prostředí). Povrch kůže u dospělců obojživelníků má velký význam pro výměnu vody a plynů a představuje tak značné riziko zvýšeného příjmu toxikantů.

V literatuře lze nalézt jen omezený počet metod, z nichž většina využívá embryolarválního uspořádání.

FETAX představuje standardizovanou metodu pro testování letální toxicity a neletálních efektů (morfologické malformace) během embryolarválního vývoje drápatky vodní *Xenopus laevis* (Kočí a kol., 2003b).

Testy s obratlovci v terestrickém prostředí

Testy s ptáky

Riziko pro ptáky představují zejména rodenticidní přípravky ve formě granulované nástrahy. Vývoj testů toxicity na ptácích vedl ke standardizaci a k praktickému používání testů akutní a chronické toxicity.

V testu akutní perorální toxicity u ptáků je délka expozice 120 hodin, v časovém úseku 24, 48, 72, 96 a 120 hodin se kontroluje stav a chování ptáků.

Test reprodukční toxicity zahrnuje účinky látek na reprodukci, fertilitu a teratogenitu. Testovaná látka je podávána v krmivu minimálně 20 týdnů, poté je navozena snáška vajec, sbírají se 10 týdnů, uměle inkubují a kuřata se chovají 14 dní. Hodnotí se mortalita dospělců, produkce vajec, výskyt křapek, tloušťka skořápky, životnost, líhnivost a účinky na kuřata (Kočí a kol., 2003b).

Testy s laboratorními zvířaty

Jako laboratorní zvířata se využívají pro testování například laboratorní potkani, myši, morčata, králci, psi, primáti.

Podle délky trvání se testy dělí na krátkodobé a dlouhodobé. Krátkodobé studie zahrnují testy akutní toxicity, subchronické toxicity, lokální účinky chemických látek na kůži a oku, testy kožní dráždivosti a testy oční dráždivosti.

K testům reprodukční toxicity řadíme účinky látek na reprodukci, fertilitu a teratogenitu.
Dále jsou studie kinetiky, zkouška na neškodnost, zkouška na pyrogenní látky.
Dlouhodobé studie zahrnují studie kancerogenity a chronické toxicity.
Získané výsledky se extrapolují na člověka (Prokeš a kol., 2005).

2.5.3 Testy s destruenty

Destruenti, tzv. rozkladači, se živí hotovými organickými látkami. Typickými zástupci destruentů jsou většinou viry, bakterie a houby *Mycophyta*. Svoji potravu rozkládají pomocí exoenzymů, jejichž vylučováním do okolního prostředí rozkládají organický substrát na nízkomolekulární látky, které difundují přes buněčnou stěnu do buňky. V buňce jsou pomocí endoenzymů dále zpracovány a zainkorporovány do biomasy. Destruenti rozkládající neživou organickou hmotu jsou saprofyté, naproti tomu parazité rozkládají živé organické látky, napadají těla živých organismů a způsobují jim nemoci a smrt (Říhová Ambrožová, 2007).

Testy s mikroorganismy

Mikroorganismy jsou užitečnými bioindikátory v testování ekotoxicity, se zřetelem k jejich malé velikosti, krátké době potřebné k rozdělení buňky a rozsáhlé druhové rozmanitosti. Potenciální omezení je rozsah extrapolace k vyšším organismům (Wadhia a kol., 2007).

Existují testy využívající jednotlivé druhy izolovaných mikroorganismů na uměle vytvořených substrátech (Microtox, Toxichromopad, ATP Test...) (Kočí a kol., 2003b).

V bakteriálních zkouškách se měří škodlivý efekt jedovatých látek stanovením populačního růstu. Často užívané druhy jsou *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas putida*.

Další testy zhodnocují inhibiční účinek na aktivitu β - galaktozidázy *Escherichia coli*. Test používá lyofilizované bakterie a chromogenní substrát.

Bakteriální mikrobiotesty vyvinuté pro detekci mutagenních účinků zahrnují Ames test a VITOTOX test se *Salmonella typhimurium* (Wadhia a kol., 2007).

Půdní ekotoxikologie se zabývá celými společenstvy mikroorganismů, protože nejdůležitější jsou funkční aspekty mikroorganismů v půdách (aktivity C a N mineralizace, enzymatické aktivity, biomasa, funkční diverzita...) (Kočí a kol., 2003b).

Test zhášení bioluminiscence mořských bakterií *Vibrio fischeri*

Bioluminiscence je metabolickým produktem. Enzym luciferasa katalyzuje oxidaci redukovaného riboflavin-fosfátu, která je doprovázená emisí světla. Snížení přírodní bioluminiscence vibria značí toxický účinek. Bakterie se inkubují s toxickou látkou či odpadní vodou 30 minut. Tato zkouška trvá velmi krátce na rozdíl od jiných akutních biologických zkoušek s trváním od 24 do 96 hodin (Ratte a kol., 2003).

Zkouška inhibice dýchání aktivovaného kalu

Hodnotí vliv zkoušené látky na mikroorganismy měřením intenzity jejich dýchání za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky. Jako mikrobiální inokulum pro zkoušku se používá aktivovaný kal z čistírny odpadních vod čistící převážně domovní odpadní vody.

Respirační rychlostí rozumíme spotřebu kyslíku mikroorganismy odpadních vod v aerobním kalu, obecně vyjádřenou jako mg O₂ na 1 mg kalu za hodinu.

Test trvá 30 minut a (nebo) 3 hodiny, během kterých probíhá provzdušňování (Vyhláška č. 222/2004 Sb.).

Testy s prvoky

Protoxkit FTM je 24hodinový mikrobiotest s *Tetrahymena thermophila*, ve kterém se hodnotí inhibice růstu po vystavení toxikantu. Jde o vícegenerační test toxicity (Standardní operační manuál ProtoxkitTM).

Testy s žížalami

Žížala patří k nejvíce užívaným zkušebním organismům pro zemskou oblast. Tento suchozemský druh reprezentuje půdní faunu a využívá se v akutních testech stejně jako v testech reprodukce (Ratte a kol., 2003).

Žížaly mají mnoho charakteristik, které z nich dělají jeden z nejvhodnějších organismů pro využití jako klíčových bioindikátorů pro testování toxicity chemikálií v půdě, a to velkou biomasu, chování, značnou velikost, ale i dobře známou anatomii a fyziologii (Kočí a kol., 2003b).

Využívané druhy: *Eisenia fetida/andrei*, *Aporredoctea caliginosa*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Aporrectodea longa*, *Eisenia veneta*, *Dendrobaena veneta* atd.

Nejpoužívanější testy jsou především testy akutní, kdy je zjišťována mortalita žížal po působení určitých koncentrací testované látky. V poslední době se stále více začíná rozšiřovat sledování dalších endpointů jako jsou reprodukce, úbytek biomasy, bioakumulace, behaviorální změny, studie malformací, fyziologické změny, snížení imunity, aktivity enzymů, neurotoxicita atd. (Kočí a kol., 2003b).

Akutní toxicita testované látky na žížale může být stanovena dvěma způsoby. Buď je mortalita stanovena poté, co byly žížaly vystavené po dobu několika hodin filtru se zkušební substancí nebo je úmrtnost sledována po 7 či 14 dnech chovu v umělé půdě s testovanou látkou (Ratte a kol., 2003).

Testy s roupicemi

Existují dvě linie testů, a to test reprodukce roupic využívající *Enchytraeus albidus*, případně *E. crypticus* a test využívající *Cognettia sphagnetorum* s endpointy jako akutní toxicita, subletální efekty, růst a reprodukce (Kočí a kol., 2003b).

Test toxicity půd a půdních materiálů na roupici *Enchytraeus crypticus* uvádí vyhláška č. 257/2009 Sb. jako jeden z ekotoxikologických testů pro testování sedimentů.

Testy s hlísticemi

Jejich výhodou je rychlost díky krátkému životnímu cyklu hlístic (24 hodin). Pro test se využívá *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*. *Caenorhabditis elegans* patří k málu půdních organismů, pro něž existují dobře zaběhlé postupy pro sledování chování v reakci na stresové faktory. Citlivost těchto subletálních endpointů je 25 - 100krát vyšší než mortalita (Kočí a kol., 2003b).

2.6 Testy toxicity v legislativě České republiky

Jako nebezpečné označujeme látky nebo přípravky, které mají za podmínek stanovených zákonem č. 356/2003 Sb. jednu nebo více nebezpečných vlastností. Při vstupu do životního prostředí představují nebo mohou představovat okamžité nebo pozdější nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí.

Základní metody pro zkoušení nebezpečných vlastností látek a přípravků

- a) akutní toxicita pro ryby,
- b) akutní toxicita pro dafnie,
- c) inhibice růstu řas,
- d) "snadná" biologická rozložitelnost,
- e) rozložitelnost - biologická spotřeba kyslíku,
- f) rozložitelnost - chemická spotřeba kyslíku,
- g) abiotický rozklad - hydrolýza jako funkce pH,
- h) toxicita pro žížaly - zkouška na umělé půdě,
- i) biologická rozložitelnost - Zahn-Wellensova zkouška,
- j) biologická rozložitelnost - simulační zkouška s aktivovaným kalem,
- k) biologická rozložitelnost - zkouška inhibice dýchání aktivovaného kalu,
- l) biologická rozložitelnost - modifikovaná zkouška SCAS,
- m) bioakumulace - průtoková zkouška na rybách,
- n) růst nedospělých ryb,
- o) toxicita na rybích embryích a potěru - krátkodobá zkouška,
- p) akutní orální toxicita pro včelu medonosnou,
- r) akutní kontaktní toxicita pro včelu medonosnou,
- s) adsorpce/desorpce v rovnovážném stavu,
- t) odhad adsorpčního koeficientu (KOU) pro půdy a čistírenské kaly vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC),
- u) toxicita pro reprodukci u *Daphnia magna*,
- v) aktivita půdních mikroorganismů při transformaci dusíku,
- w) aktivita půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku,
- x) aerobní a anaerobní transformace v půdě,
- y) aerobní a anaerobní transformace v systémech voda – sediment (Vyhláška č. 222/2004 Sb.).

Vyhláška č. 376/2001 Sb. stanoví kritéria, metody a postup hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Odpad se hodnotí jako nebezpečný, jestliže je překročeno alespoň jedno z kritérií pro nebezpečné vlastnosti odpadů uvedených ve vyhlášce. Jako vlastnost H14 je označena ekotoxicita.

Ekotoxicita – tuto vlastnost mají odpady, které představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Jako nebezpečný se hodnotí odpad, jehož vodný výluh vykazuje hodnoty LC (EC, IC)₅₀ ≤ 10 ml/l ve zkouškách akutní toxicity alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus.

Testovací organismy a doba expozice hodnocenému odpadu

- a) *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hodin),
- b) *Daphnia magna* (doba působení 48 hodin),
- c) *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* (doba působení 72 hodin),
- d) semeno *Sinapis alba* (doba působení 72 hodin).

Metody uvedené ve vyhlášce používané pro hodnocení ekotoxicity

ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity,

ČSN EN 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692; 1989),

ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – část 2: Obnovovací metoda,

Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů.

Vyhláška č. 232/2004 Sb. klasifikuje látky a přípravky nebezpečné pro životní prostředí, aby upozornila uživatele na nebezpečí, která tyto látky a přípravky představují pro ekosystémy. I když se uvedená kritéria vztahují na vodní ekosystémy, je známo, že určité látky a přípravky mohou simultánně nebo alternativně ovlivňovat jiné ekosystémy, jejichž složky mohou sahat od půdní mikroflóry a mikrofauny po primáty.

Látky a přípravky jsou ve vyhlášce děleny do dvou skupin na základě akutních nebo dlouhodobých účinků ve vodních (nebo jiných) systémech a je jim přiřazen výstražný symbol pro „N“ a R-věty na základě kritérií uvedených ve vyhlášce.

Klasifikace látek se obvykle provádí na základě experimentálních údajů o akutní toxicitě ve vodě, rozkladu a $\log P_{ow}$ (logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda) (nebo BCF (biokoncentrační faktor), je-li k dispozici).

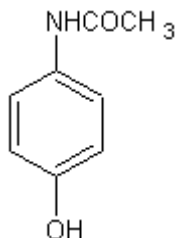
Přípravky klasifikujeme obvykle na základě konvenční výpočtové metody založené na jednotlivých koncentračních limitech. Pro akutní toxicitu ve vodním prostředí je někdy vhodné provést testy s přípravkem na řasách, dafniích a rybách a modifikovat tak jejich klasifikaci.

Příklady R-vět (standardní věty označující specifickou rizikovost):

- R 50 Vysoce toxický pro vodní organismy,
- R 51 Toxický pro vodní organismy,
- R 52 Škodlivý pro vodní organismy,
- R 53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí,
- R 54 Toxický pro rostliny,
- R 55 Toxický pro živočichy,
- R 56 Toxický pro půdní organismy,
- R 57 Toxický pro včely,
- R 58 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky v životním prostředí,
- R 59 Nebezpečný pro ozónovou vrstvu.

2.7 Paracetamol

2.7.1 Struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly



Paracetamol je *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid (ČL 2009).

Synonyma: *N*-acetyl-4-aminophenol; 4-acetamidophenol; 4'-hydroxyacetanilide
(Bezpečnostní list Sigma-Aldrich)

Mr 151,16

CAS 103-90-2

C₈H₉NO₂ (ČL 2009)

Vzhled: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

Rozpustnost (vztaženo na teplotu 15 °C až 25 °C): Mírně rozpustný ve vodě (1 g se rozpustí v přibližně 30 - 100 ml rozpouštědla), snadno rozpustný v ethanolu 96% (1 g se rozpustí v přibližně 1 - 10 ml rozpouštědla), velmi těžce rozpustný v dichlormethanu (1 g se rozpustí v přibližně 1000 - 10000 ml rozpouštědla) (ČL 2009).

Paracetamol patří mezi analgetika - antipyretika anilinové řady. Nejstarším používaným derivátem anilinu byl acetanilid, který se ukázal poměrně značně toxický. Acetanilid je v organismu oxidován na 4-acetamidofenol (paracetamol), čímž dochází k jeho značné detoxikaci. Vzniklý paracetamol je poté konjugován s kyselinou sírovou nebo glukuronovou a vyloučen ledvinami. Pokus o další detoxifikaci paracetamolu byla etherifikace *p*-hydroxylové skupiny. Nejdůležitějším slabým analgetikem anilinové řady s etherifikovanou *p*-hydroxyskupinou je fenacetin, který se prakticky stoprocentně metabolizuje na paracetamol již za 1 hodinu po resorpci. Deacetylace fenacetinu na *p*-fenidin probíhá jen asi z 0,1 %. Tento metabolit však vyvolává nebezpečí vzniku methemoglobinémie, což ohrožuje zvláště kojence a malé děti. Po dlouhodobém podávání fenacetinu může docházet ke vzniku intersticiální nefritidy a existuje i určité nebezpečí lékové závislosti. Proto je dnes nejvýznamnějším analgetikem této řady paracetamol. Oproti fenacetinu je rozpustnější ve vodě a je méně toxický (Hartl a kol., 1994).

2.7.2 Indikace

Farmakoterapeutická skupina: analgetika, antipyretika, anilidy.

ATC kód: N02BE01 (SPC Paralen 500 tbl.)

Terapeutické indikace jsou horečka, zejména při akutních bakteriálních a virových infekcích, bolesti zubů, hlavy, neuralgie, bolesti svalů nebo kloubů nezánettlivé etiologie, bolesti vertebrogenního původu, bolestivá menstruace (SPC Paralen 500 tbl.).

Paracetamol je analgetikum používané u lehké až mírné bolesti, a to bolesti časově limitované. Do terapie byl nasazen roku 1893, širšího použití jako analgetika dosáhl, když v roce 1949 Brodie a Axelrod prokázali, že jde o hlavní metabolit fenacetinu (Gleiter, 1997).

Paracetamol je lékem první volby ke snížení horečky a bolestí u dětí do 12 let, ale i u dospělých, hlavně v situacích, kdy je na závalu antiagregační účinek a některé další nežádoucí účinky kyseliny acetylsalicylové (Lincová a kol., 2007).

Doporučená terapeutická dávka pro dospělé: p.o., p.rect. 0,5 - 1,0 g; denní dávka 2,0 - 4,0 g; maximální denní dávka 4,0 g.

Doporučená terapeutická dávka pro děti: p.o., p.rect. 1,5 g/m²; 0 - 1 rok 0,03 - 0,06 g; 1 - 6 let 0,12 - 0,25 g; 6 - 15 let 0,25 - 0,5 g; 4krát denně v dílčích dávkách; 1 - 3 měsíce 3krát denně.

Doporučená dávka u zvířat: p.o. kůň 15 – 25 g; skot 15 – 30 g; ovce, koza 2 - 5 g; prase 1 – 2 g; pes 0,25 - 0,4 mg/kg (také 10 mg/kg) každých 12 hodin (ČL 2009).

2.7.3 Farmakokinetika, mechanismus účinku

Paracetamol je výborně tolerované účinné neopioidní analgetikum a antipyretikum bez významného protizánětlivého působení. Analgeticko - antipyretické účinky paracetamolu jsou srovnatelné s kyselinou acetylsalicylovou, proti níž má mnohem lepší gastrointestinální snášenlivost, neovlivňuje krevní srážlivost, hladinu kyseliny močové či hladiny krevního cukru.

Po perorálním podání se paracetamol dobře absorbuje z trávicího ústrojí. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 30 - 60 minut. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká (Lincová a kol., 2007).

Distribuční objem u dospělých je 0,83 – 1,36 l/kg tělesné hmotnosti. Paracetamol se rozděluje relativně stejnoměrně do veškeré tělní tekutiny (Gleiter, 1997). Paracetamol prochází placentární bariérou, do slin a je vylučován do mateřského mléka (SPC Paralen 500 tbl.).

Analgetické účinky paracetamolu trvají kolem čtyř hodin, je to způsobeno jeho krátkým biologickým poločasem (asi 2 hodiny) (Rovenský a kol., 2009).

Antipyretické účinky se vysvětlují inhibicí cyklooxygenasy v hypothalamu. Centrální mechanismus se podílí rovněž na analgetickém účinku (selektivní inhibice COX-3, nepřímé působení na serotoninové receptory 5-HT₃ v míše). Na periférii urychluje paracetamol přeměnu prostaglandinu PGG₂ na PGH₂, a tím snižuje prozánětlivé působení nestabilního endoperoxidu PGG₂ (Lincová a kol., 2007).

Cyklooxygenasa (PGH₂-synthasa) je klíčový enzym limitující rychlost syntézy prostanoidů. Prostanoidy se účastní regulace řady fyziologických procesů a za patologických situací se vzájemně podílí na rozvoji bolesti, horečky a zánětu.

Cyklooxygenasa má dvojí aktivitu: zodpovídá za přeměnu kyseliny arachidonové na endoperoxid PGG₂ a peroxidasovou aktivitou katalyzuje přeměnu mediátoru nocicepce a zánětu PGG₂ na PGH₂. Tkáňově specifické enzymy vedou k přeměně PGH₂ na prostaglandiny (PGE₂, PGD₂, PGF₂), prostacyklin (PGI₂) a tromboxany (TXA₂ a TXB₂).

V organismu existuje několik izoform cyklooxygenasy.

Konstituční izoforma cyklooxygenasy COX-1 je tvořená ve většině buněk a je odpovědná za vznik prostanoidů zajišťujících fyziologické a homeostatické funkce organismu.

Indukovatelná forma cyklooxygenasy COX-2 je syntetizována působením prozánětlivých faktorů: cytokinů IL-1, IL-2 a TNF- α , onkogenů, bakteriálních lipopolysacharidů aj. v místě zánětu. Je zodpovědná za tvorbu prostanooidů, které mají lokální zánětlivý účinek, podílí se na vzniku horečky a bolesti. COX-2 je konstitučně přítomná v omezeném počtu tkání a může plnit některé fyziologické funkce v CNS, ledvinách a trávicím ústrojí, účastní se reprodukčních funkcí, při remodelaci kostí i hojení žaludečních vředů. K indukci COX-1 však může dojít i za patologických situací.

Izoenzym cyklooxygenasy COX-3 byl identifikován v srdci a centrálním nervovém systému i jiných tkáních. Enzym je selektivně inhibován neopiodními analgetiky, to představuje centrální mechanismus analgetického a antipyretického účinku těchto látek (Lincová a kol., 2007). COX-3 byla objevena v roce 2002 (Khetan a kol., 2007).

Paracetamol se intenzivně biotransformuje, vedle konjugačních reakcí dochází k oxidativním pochodům, přičemž vznikají toxické metabolity (SPC Paralen 500 tbl.), a to vysoce reaktivní metabolit *N*-acetylbenzochinonimin (Lincová a kol., 2007).

Při podání terapeutických dávek dochází k rychlé biotransformaci těchto hepatotoxických intermediálních metabolitů za spolupůsobení glutathionu a za vzniku merkapturových kyselin, které se vylučují močí převážně ve formě konjugátů. Méně než 5 % paracetamolu se vyloučí v nezměněné formě (SPC Paralen 500 tbl.).

Po běžných terapeutických dávkách (500 mg 3 - 4krát denně) je výskyt nežádoucích účinků malý, někdy se objeví alergické kožní reakce (Lincová a kol., 2007).

Kombinace paracetamolu s kodeinem má lepší analgetický účinek, ale vedlejší účinky jsou oproti samotnému paracetamolu několikanásobné (Gleiter, 1997).

Paracetamol nepůsobí na produkci fyziologických prostaglandinů v žaludku, vnitřních orgánech či krevní destičkách a proto nemá žádný z typických nepříznivých účinků pozorovaných při používání nesteroidních protizánětlivých léčiv jako je zvětšené riziko gastrointestinálního krvácení či akutního snížení funkce ledvin (Rovenský a kol., 2009).

2.7.4 Toxikologická data

Při akutním předávkování paracetamolem (10 - 15 g u dospělého) dochází k vyčerpání zásob glutathionu v játrech a vzniklý reaktivní metabolit *N*-acetylbenzochinonimin poškozuje jaterní a ledvinové buňky a vyvolává selhání jater, které může končit letálně. Léčba spočívá v i.v. podání specifického antidota *N*-acetylcysteinu (donátor –SH skupin) nejpozději do 10 hodin po intoxikaci, i když může být ještě prospěšné i pozdější podání (do 15 hodin) (Lincová a kol., 2007).

Pacienti s chronickým nadměrným požíváním alkoholu jsou zřetelně náchylní pro hepatotoxické účinky paracetamolu na základě jejich menší jaterní rezervy glutathionu (Gleiter, 1997).

Pokud je paracetamol přijatý ve velkém množství, způsobuje jaterní onemocnění. Denní dávka vyšší než 1,2 g by neměla být podávána více než 10 dnů. Orální toxické dávky u dospělých jsou 5 – 10 g, u dětí 150 mg/kg. Ústní smrtelná dávka je 25 g nebo více. Krevní terapeutické koncentrace jsou 2,5 – 25 µg/ml; toxické koncentrace jsou 150 – 300 µg/ml; fatální koncentrace více než 160 µg/ml (průměrně 250 µg/ml) (Suzuki a kol., 2005).

Po dlouhodobém podávání kompozitních přípravků s paracetamolem (kombinace např. s kofeinem) se objevily těžké poruchy ledvin (Lüllmann a kol., 2002).

V Bezpečnostním listu Sigma-Aldrich je uvedena toxicita pro ryby a toxicita pro dafnie a jiné vodní bezobratlé:

Pimephales promelas (střevle) LC₅₀ (96 h): 814 mg/l,

Daphnia magna (perloočka velká) EC₅₀ (48 h): 9,2 mg/l.

LD₅₀ u krysy po p.o. podání je 1944 mg/kg (Bezpečnostní list Sigma-Aldrich).

LD₅₀ u myši po p.o. podání je 338 mg/kg, po i.p. podání 500 mg/kg (SPC Panadol tbl.).

3 Praktická část

3.1 Testovaný materiál

Diplomová práce je zaměřena na testování toxicity léčivých přípravků s obsahem paracetamolu (Panadol tbl., Paralen 500 tbl.) a analytického standardu paracetamolu.

Standard paracetamolu Acetaminophen od firmy Sigma-Aldrich je bílý prášek (Bezpečnostní list Sigma-Aldrich).

Tablety **Panadol** jsou bílé potahované s půlicí rýhou na jedné straně, na druhé straně je vyraženo PANADOL.

Držitelem rozhodnutí o registraci je GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GlaxoSmithKline Export Ltd., Brentford, TW8 9GS, Velká Británie.

Léčivá látka je paracetamol 500 mg.

Pomocnými látkami v tabletě jsou kukuřičný škrob, kalium-sorbát, mastek, kyselina stearová 95%, povidon 25, předželatinovaný škrob, hypromelosa a triacetin (SPC Panadol tbl.).

Tablety **Paralen 500** jsou bílé, až téměř bílé tablety s půlicí rýhou o průměru 13 mm a hmotnosti 0,600 g.

Držitelem rozhodnutí o registraci je Zentiva, k.s., Praha, Česká republika.

Léčivá látka je paracetamol 500 mg.

Pomocnými látkami v tabletě jsou předbobtnalý kukuřičný škrob, povidon 30, sodná sůl kroskarmelosy, kyselina stearová (SPC Paralen 500 tbl.).

Ze statistických údajů vyplývá, že v roce 2007 bylo v ČR zákazníkům prodáno přes 73 t paracetamolu (Kotyza a kol., 2009).

Paracetamol je rychle rozložitelný v životním prostředí (poločas rozpadu < 1 den) (Ashton a kol., 2004).

Mnoho studií ukazuje, že jsou léčiva a jejich metabolity široce distribuované v povrchových vodách (Wiegel a kol., 2004). Paracetamolem a jinými léčivy v povrchových vodách se zabývají například práce těchto autorů: Stackelberg a kol. (2007), Roberts a kol. (2006), Fent a kol. (2006), Bound a kol. (2006), Wiegel a kol. (2004), Kasprzyk-Hordern a kol. (2008).

3.2 Modelové organismy

3.2.1 *Tetrahymena pyriformis* Ehr.

Taxonomické zařazení:

říše Protozoa (prvoci),
kmen Ciliophora (nálevníci),
třída Oligohymenophorea (chudoblanní),
řád Hymenostomatida
(Sedlák, 2000).

Nálevníci jsou charakterizováni velkým počtem cilií (řasinek), stavbou kortexu, jaderným dualismem a konjugací – sexuálním procesem životního cyklu.

Kortex (kortikoplazma, kortikální vrstva) udržuje relativně stálý tvar těla jednotlivých druhů. Skládá se ze dvou hlavních složek: pelikuly a ciliárních (kinetidových) kořenů. Pelikulu tvoří plazmalema a u některých druhů extracelulárně i perilema. Plazmalema (buněčná membrána) vytváří u řasinek pravidelně uspořádané parasomální váčky – místa pinocytózy. Pod buněčnou membránou je systém membránových alveolů, jejichž uspořádání je druhově specifické. Pod nimi je bílkovinná vrstva – epiplazma a podélné pásy mikrotubulů. Zvětšují stabilitu kortexu a jsou důležité pro jeho morfogenezi. Kinetidy jsou představovány kinetosomy (bazální tělíška) s kořenovými strukturami (kinetodesmální fibrila a dvě pásy mikrotubulů - příčné a postciliární) a tvoří infraciliaturu. Každý kinetosom nemusí nést řasinku. Velikost, utváření a orientace somatických kinetid má význam v systematice. Kinetosomy jsou spojeny bazálními mikrotubulárními pásy, postciliárními mikrotubuly a kinetodesmálními fibrilami. Řasinky sloužící k pohybu jsou tak uspořádány v podélné řady. V orální oblasti jsou přerušeny periorálními kinetami. Cilie mohou tvořit trsy (ciry, pro kráčivý pohyb) nebo plochy (membranely, pro víření částec potravy).

V kortexu jsou další organely: extrusomy, kontraktilní fibrily, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, různé vezikuly. Na ventrální straně mnoha nálevníků je mezera v celistvém uspořádání kortexu – sutura, vyhrazená pro příjem a výdej látek. V této oblasti je hluboce vchlípená ústní nálevka. Na jejím dnu je potrava fagocytována a tvoří se potravní vakuoly. Pro exocytózu jsou vytvořeny cytoprokt (cytopyge, pro vylučování zbytků potravy) a póry (pro vypouštění tekutého obsahu kontraktilních vakuol).

Dalším znakem nálevníků je přítomnost heterokaryotických jader. Vedle jednoho či více somatických jader (makronukleus, polyploidní, velké) mají jedno i více jader generativních (mikronukleus, diploidní, malé). Makronukley jsou místem syntézy RNA, zajišťují normální metabolismus buňky. Mikronukley jsou místem genetických rekombinací. Sexuálním pochodem je u nálevníků konjugace – spojení dvou buněk téhož druhu (Hausmann a kol., 2003). Během konjugace se rozpadá makronukleus a mikronukleus se vícenásobně rozdělí (Sedlák, 2000). Fúze může trvat několik hodin, dojde k výměně haploidních jader vzniklých z mikronukleu a partneři se oddělí (Hausmann a kol., 2003). Po oddělení se oba jedinci mitoticky dělí. Nálevníci se také mohou množit pučením nebo rozpadem buňky (Sedlák, 2000).

Systematické rozdělení se často měnilo, nyní je uplatněno třídění podle znaků somatické i orální infraciliatury.

Oligohymenophorea mají málo orálních polykinet, umístěné na levé straně ústního aparátu. Somatické cilie jsou v podélných řadách, příčné mikrotubuly probíhají od kinetosomů radiálně, kinetodesmální fibrily míří vpřed, postciliární pásy k zadnímu konci. Životní cyklus se vyznačuje polymorfií (trofonti, tomonti, tomiti, teroniti).

Mezi znaky řádu Hymenostomatida patří jednodílné parorální kinety a monokinetidální somatická ciliatura. Do životního cyklu patří polymorfická stadia (Hausmann a kol., 2003).

Tetrahymena pyriformis Ehr. je sladkovodní nálevník, obecně 50 - 60 μm dlouhý a 30 μm široký a má hruškovitý tvar (odtud je odvozené jeho jméno) (obr. 2, obr. 3). Cytostom leží na dně dutiny ústní, pod ním je potravinová vakuola, která opouští po naplnění ústní oblast a vytváří se nová. Efektivita a rychlost utváření této vakuoly závisí na buněčném cyklu, fyziologickém stavu buňky a faktorech prostředí (pH, teplota...). Mnohé anorganické a organické látky zasahují do formace potravinové vakuoly, je to tedy dobrý indikátor toxických podmínek prostředí (Sauvant a kol., 1999).

Pro růst potřebuje *T. pyriformis* řadu nepostradatelných živin, které pronikají do buňky buď jednoduchou či usnadněnou difúzí přes plazmatickou membránu, aktivním transportem, nebo pohlcováním částic hmoty. Určití nálevníci, včetně *T. pyriformis*, jsou schopni vyměšovat enzymy do své živné půdy (hydrolasu β -galaktosidázu a proteázy), které jim umožní využít komplexní živiny (Bonnet a kol., 1999).

Práce Bonneta a kol. (1999) představuje nálevníka *Tetrahymena pyriformis* jako organismus schopný redukovat a modifikovat syrovátku extracelulárními enzymy tak, aby se redukoval její znečišťující účinek po vypuštění jako odpadu do životního prostředí.

Tetrahymena pyriformis obsahuje mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho komplexy, ribozóm, peroxizóm, lysozomy. Jejich struktury odrážejí fyziologický stav buňky. Během hladovění, ve stacionární fázi, či jako odpovědi na určité podmínky, se v buňce vyskytují strukturální změny (Sauvant a kol., 1999).

Mountassif a kol. (2007) ve své studii ukazují na využití biomarkrů při testování cytotoxického účinku solí kovů (kadmia, železa, chromu) na nálevníku *Tetrahymena pyriformis*: stresových ukazatelů, metabolických enzymů a ukazatele pohyblivosti (acetylcholinesteráza).

V přirozeném prostředí se *T. pyriformis* živí bakteriemi, může být ale kultivována v umělých, chemicky definovaných médiích. Média se skládají obvykle z peptonu, kvasničného extraktu a anorganických solí (PPYS médium). Fyziologický stav *T. pyriformis* a toxický efekt xenobiotik souvisí se složením živné půdy, proto je důležitým faktorem poměrné složení látek v médiu (Sauvant a kol., 1999).

V optimálních podmínkách se růst *Tetrahymena pyriformis* vyznačuje logaritmickou růstovou fází (log fází), pre-stacionární růstovou fází a stacionární fází. V log fázi, která může trvat od několika hodin k dvěma dnům v závislosti na inokulu, se buněčná hustota zvětší logaritmicky. Doba potřebná k rozdělení buňky je 3 - 7 hodin.

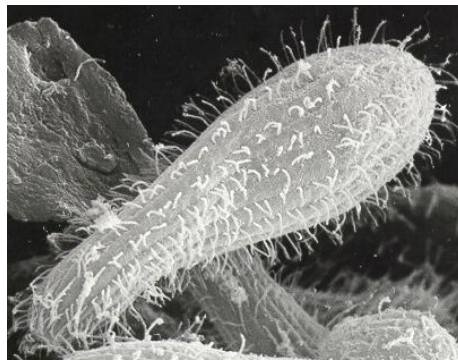
Po vystavení xenobiotiku je často sledovaná buněčná hustota a tempo růstu. Hodnotí se buď pomocí automatického elektronického počítadla, nebo mikroskopicky hemocytometrem či spektrofotometricky měřením optické hustoty. Xenobiotika zvyšují dobu potřebnou pro rozdělení buňky. Pro srovnání toxického potenciálu substancí se získává hodnota IC_{50} , což je koncentrace, která redukuje buněčnou hustotu na 50 % z optické hustoty kontroly (Sauvant a kol., 1999).

V standardních podmínkách se vyznačuje *Tetrahymena pyriformis* ohromnou hybností a aktivitou. V přítomnosti xenobiotik organismus přizpůsobuje jeho chování k stresujícím toxickým faktorům (pohyb, rychlost plavání). Vliv látek na hybnost prvoka, jeho rychlost a membránu stabilizující efekt lze hodnotit pomocí videoanalýzy (Sauvant a kol., 1999).

Obrvený prvok, *Tetrahymena*, napadá paví očka a způsobuje onemocnění vyznačující se bělavými poraněními na tělesném povrchu, erodovanými ploutvemi a letargickým plaváním, je také známá jako paví očko - zabijácký cizopasník. V přírodních lokalitách se *Tetrahymena* živí organickou hmotou a bakteriemi. To je předpoklad k tomu, aby infikovala rybu, která je stresovaná nepříznivými podmínkami prostředí (Zilberg a kol., 2006).



Obr. 2: *Tetrahymena pyriformis* Ehr. (fázová kontrastní mikroskopie) (<http://eol.org/>)



Obr. 3: *Tetrahymena pyriformis* Ehr. (elektronová skenovací mikroskopie)
(<http://biology.bard.edu>)

Pro testování byla použita kultura *Tetrahymena pyriformis* z Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.2.2 *Thamnocephalus platyurus* Packard

Taxonomické zařazení:

říše Animalia,
kmen Arthropoda (členovci),
podkmen Crustacea (korýši),
třída Branchiopoda, Phyllopoda (lupenonožci),
řád Anostraca (žábřonožky)
(Sedlák, 2000).

Crustacea (korýši) je velká skupina primárně vodních (většinou mořských, ale také sladkovodních), i suchozemských druhů.

Hlava vzniká srústem pěti segmentů a nese pět párů přívěsků: první pár tykadel (antenuly), druhý pár tykadel (antény), třetí pár přívěsků jsou mandibuly (kusadla) a dva páry maxil (čelisti). Ústní ústrojí doplňuje horní pysk (labrum) a dolní pysk (labium). Končetiny 3. - 5. hlavového segmentu se nazývají gnathopody. Tělo je tvořeno sérií segmentů, terminální článek (telson) nese na své bázi anus. U většiny korýšů se články tvarově specializují, redukují, vytváří se hrudní a zadečkové články. Hrud' může kryt karapax (záhyb za hlavou).

Končetiny jsou dvojitěvětvené. Skládají se z bazálního protopoditu složeného z koxopoditu a bazopoditu. Bazopodit je spojen s vnitřní větví (endopoditem) a vnější větví (exopoditem). Jsou různé variace, u některých druhů může jedna hlavní větev chybět. V průběhu evoluce se na člancích vytvořily různé výběžky (epipodit, endit...). Hrudní končetiny jsou pereopody, zadečkové pleopody. Evoluční tendencí je redukce tělních přívěsků a adaptace na specializovanou funkci. Kutikula většiny korýšů je kalcifikovaná.

Obrovská diverzita korýšů se projevuje také rozmanitostí jejich potravy. Ta může být rostlinná i živočišná, jsou schopni filtrovat a zachycovat plankton i detrit. Mnozí korýši jsou parazité.

Ústní otvor je posunut ventrálně, trávicí trubice téměř rovná a střevo netvoří kličky. Srdce má tvar dlouhé trubice nebo kulovitého váčku, je uloženo v perikardu. Ze srdce vybíhají dvě artérie. Srdce i artérie mohou u některých skupin chybět. Žilní oběh začíná terminálně štěrbinovými prostůrkami v tkáních – lakunami. Krevní tekutina je většinou bezbarvá, výjimečně obsahuje hemoglobin (Branchiopoda) nebo hemocyanin rozpuštěný v plazmě. Krevní buňky jsou amoebocyty. Pro korýše jsou typickými dýchacími orgány žábry spojené s končetinami, u forem s nevyvinutými žábry dochází k dýchání povrchem těla.

U dospělých korýšů mají exkreční orgány vývod buď na bázi antén (antanální žlázy) nebo na bázi druhého páru maxil (maxilární žlázy). Korýši mají nefrocyty – buňky zachycující a akumulující odpadní látky.

U korýšů je tendence ke koncentrování a splývání ganglií. Dosahuje různé úrovně. Ke smyslovým orgánům patří oči, statocysty, proprioreceptory, taktilní receptory a chemoreceptory. Oči jsou přítomny ve dvou typech. Mediální oko u naupliové larvy (naupliové očko), u adultních zpravidla zaniká. Laterální složené oči mají dospělci, mohou být na pohyblivých stopkách.

Většina řádů jsou gonochoristé. Základní larva mnoha korýšů se nazývá nauplius (larva odlišná od dospělé), mají tři páry končetin k pohybu a jedno nepárové očko. Při vývinu dorůstají další tělní články včetně přívěsků za současného svlékání staré pokožky – vzniká pokročilejší stádium – metanauplius. V této fázi vývoje jsou velké rozdíly mezi skupinami korýšů (Hajer, 1991).

Branchiopoda jsou malí korýši. Mají zploštělé, lupenité končetiny, exopodit a endopodit tvoří ploché laloky a ostny na okrajích. Koxopodit nese zploštělý epipodit, sloužící jako žábry. Tělní končetiny jsou adaptovány pro filtrování potravy a pohyb. Anální segment nese pár širokých výběžků (cercopody) (Hajer, 1991).

Anostraca je řád charakterizovaný protáhlým tělem s 20 a více segmenty, prvních 11 až 19 má přívěsky. Nemají karapax, hlava je volná, složené oči mají stopkovitý tvar. Český název je žábřonožky. Žijí v dočasných stojatých vodách a živí se filtrováním detritu a mikroorganismů (Hajer, 1991).

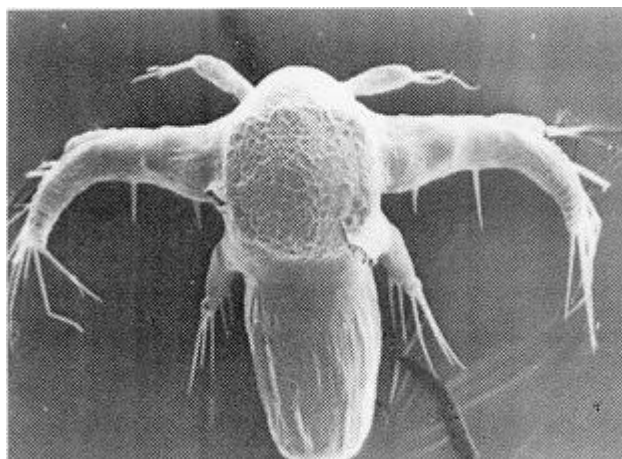
Hrudní nožky slouží k plavání, dýchání i filtraci potravy. Plavou v typické poloze otočené hřbetem dolů, výjimečně při víření a filtraci sedimentu se přetácejí. Antény samečků jsou zvětšené, hákovité, druhově specifické a slouží k přichycení na samici při kopulaci (tzv. objímavé končetiny).

Jejich vajíčka jsou životaschopná i po víceletém období sucha, u mnoha druhů snášejí i vymrznutí. U některých druhů je to podmínkou dalšího vývoje (Sedlák, 2000).

Thamnocephalus platyurus Packard (obr. 4) je žábřonožka, která nežije u nás ani v Evropě, ale vyskytuje se v drobných vodách středních a jihozápadních států USA a Mexika. Tyto vody jsou značně bahnitě a vykazují alkalickou reakci. *Thamnocephalus* má význačné morfologické vlastnosti. Dospělec dosahuje délky až 5 cm, nauplia jsou mikroskopické velikosti. Dospělí samečkové mají značně větší a bizardně zprohýbaná tykadla (antény), doplněné čelním výběžky, což jsou všechno pomocné kopulační orgány.

Moderní toxikologické testy využívají trvalá (zimní) vajíčka, označovaná jako cysty. Z cyst se poté nechají vylíhnout larvy II. a III. instaru, které se používají k testům (Sládeček a kol., 1997).

V příčném řezu se stěna cysty skládá z řady vrstev: vnější silná povrchová vrstva (kortex) a vnitřní alveolární vrstva. Alveolární vrstva je charakterizovaná alveolární spleť se sériemi vertikálních čepů se širokými žebry, zužující se navenek, kde se spojují s periferní membránou. Plynová komora je podporovaná alveolárními vlákny. Póry v kůře a alveolární vrstva mají důležitou funkci jako vstup vzduchu do alveolární vrstvy pro dýchací účely stejně jako pro izolaci vajíček. Vaječná skořápka je bariérou proti fyzikálně-chemickému stresu jako vysušení, proměnlivost pH a ultrafialové záření (Radhika a kol., 1993).



Obr. 4: *Thamnocephalus platyurus* Packard (<http://www.r-biopharm.com>)

Pro testování byla použita souprava Rapidtoxkit™ obsahující cysty *Thamnocephalus platyurus*.

3.2.3 *Sinapis alba* L.

Taxonomické zařazení:

Eukarya,
Spermatophyta,
Angiospermophyta,
Magnoliophyta,
Magnoliopsida,
Capparales,
Brassicaceae (Jahodář, 2006).

Řád Capparales zahrnuje stromy, keře, avšak nejčastěji byliny, které obsahují myrosinové buňky a buňky bohaté na proteiny, dále sirné glukosinoláty, protoalkaloidy, kyanogenní glykosidy, brassicasteroidy, mastné kyseliny, sinapovou a ferulovou kyselinu, kardioaktivní glykosidy, barvivo rubrobrassicin. Farmaceuticky významné jsou čeledi Brassicaceae a Capparaceae (Jahodář, 2006).

Čeď Brassicaceae (brukvovité, syn. křížaté) je tvořena jednoletými až vytrvalými bylinami s trichomy, nebo bylinami lysými. Listy mají střídavé nebo pouze přízemní, jednoduché celistvé nebo členěné až složené, bez palistů. Květenstvím bývá hrozen, za plodu se prodlužující. Květy jsou oboupohlavné, bisymetrické, zpravidla dvouobalné se 4 kališními a 4 korunními lístky. Tyčinek je 6, 2 z nich pak kratší. Gyneceum je parakarpní ze 2 plodolistů s druhotnou přehrádkou. Svrchní semeník obsahuje větší počet dvouobalných vajíček. Plod je suchý, nejčastěji pukavý 2 chlopněmi s blanitou přehrádkou (šešule, šešulka) nebo též poltivý nebo nepukavý.

Semena mají hladké, síťované nebo důlkované osemení, při navlhčení někdy slizovatí, nemají endosperm (Hejný a kol., 1992).

Čeď je charakterizována celou řadou obsahových sloučenin. Nejvýznamnějšími z nich jsou hořčičné glykosidy, glykosinoláty. Tyto thioglykosidy jsou založeny na isothiokyanátech vázaných na glukosu. Při porušení pletiv a myrosinových idioblastů dochází ke styku enzymu myrosinasy s thioglykosidy a uvolňuje se glukosa a hořčičné silice, které štiplavě voní a ostře až dráždivě chutnají. Mají význačné fytoncidní účinky. Mezi široce rozšířené patří sinalbin, sinigrin, glukokochlearin atd. Účinkem isomerasy mohou vznikat i toxické látky (rhodanidy). Čeď zahrnuje asi 380 rodů a 3200 druhů, rozšířených téměř po celém světě, hlavně v mírném pásmu severní polokoule, v tropech převážně v horách (Hejný a kol., 1992).

Rod *Leucosinapis* SPACH (syn. *Sinapis* L.) zahrnuje jednoleté, štětinatě chlupaté byliny, které vytvářejí jednoduché, přímé, jemně rýhované lodyhy. Lyrovitě zpeřené řapíkaté listy jsou 5 – 20 cm dlouhé, se 2 - 4 páry postranních úkrojků. Hustý hrozen se později prodlužuje. Lysé kališní lístky mají žlutozelené zbarvení, korunní lístky pak světle žlutou barvu. Šešule obsahuje semena uspořádaná v pouzdrech do jedné řady. Jejich jemně důlkované osemení za vlhka slizovatí. Semena mají silně palčivou chuť.

Druh *Leucosinapis alba* (L.) SPACH – bělohořčice setá, syn. *Sinapis alba* L. (obr. 5) je bylina hustě chlupatá, 30 – 120 cm vysoká. Listy tvoří lyrovitě peřenodílné až peřenosečné, postranní úkrojky široce eliptické, tupé, koncový podstatně větší. Kališní lístky mají délku 4 - 6 mm. Korunní lístky (7 – 11 mm) jsou zbarveny světle žlutě. Šešule je 20 – 45 mm dlouhá a 3 – 5 mm široká, bíle štětinatě chlupatá. Obsahuje 2 - 8 žlutých, zřídka popelavých semen (2 – 3 mm dlouhá a 1,0 - 1,5 mm široká) (obr. 6).

Semena obsahují 25 – 35 % oleje používaného jako pokrmový i technický. Mletá semena slouží k přípravě stolní hořčice, celá se používají jako koření. Z pokrutin se získává hořčičná silice.

Často se *Sinapis alba* vysévá jako strnisková plodina pro zelenou píci i zelené hnojení. Působí příznivě na strukturu půdy. V omezené míře má význam ve farmaceutickém průmyslu (sinalbin).

Původně byla plevelem v obilninách Inu, již několik století se pěstuje na polích jako olejnina, v nadmořských výškách do 450 m, na hlinitých půdách v teplých polohách s nižšími srážkami. Má značné nároky na síru, imise s oxidem siřičitým ji nepoškozuje (Hejtný a kol., 1992).

Podle Zukalové a kol. (2006) leží perspektiva zemědělství v ČR v její originalitě, kterou je pěstování plodin s monopolním postavením na evropském trhu. Jednou z těchto exkluzivních plodin jsou hořčice, a to hořčice bílá (*Sinapis alba*) a hořčice sarepská (*Brassica juncea*).

Hořčice bílá je pro velmi rychlý růst, snadné množení osiva, mohutný kořenový systém a ozdravující účinky na půdu jednou z nejvýznamnějších meziplodin a surovinou pro konzervářský průmysl. Nejzávažnějším kvalitativním problémem u semenné hořčice bílé je její šedosemennost. Vzhledem k tomu byla odrůdová skladba rozšířena o výhradně semenné typy vyznačující se větší rezistencí vůči tomuto znaku. Tyto nové odrůdy nahradily univerzální typy využitelné jako semeno pro konzervárny i meziplodiny (Zukalová a kol., 2006).



Obr. 5: *Sinapis alba* L. (<http://de.wikipedia.org>)



Obr. 6: semena *Sinapis alba* L. (<http://www.progast.cz>)

Pro testování byla použita semena hořčice bílé, a to odrůda Veronika, OSEVA UNI a. s., Choceň.

3.3 Použité testy

Vícegenerační test toxicity s *Tetrahymena pyriformis* Ehr.

Inhibice růstu *Tetrahymena pyriformis* je hodnocena po 24 hodinách expozice toxikantu. Tento test je založen na opakovaném měření optické hustoty suspenze prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Jde o vícegenerační test toxicity, protože v průběhu 24 hodin vznikne 5 - 6 generací prvoka. Principem testu je přeměna substrátu v buněčnou biomasu, provádí se na mikrotitrační destičce a vyhodnocuje se pomocí readeru.

Za účelem kontroly správnosti provedení testu a dobrého fyziologického stavu testovaných organismů je dobré provést referenční test toxicity s dichromanem draselným. Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.5 postupy.

Rapidtoxkit™

Jde o rychlý screeningový test s larválním stádiem korýše *Thamnocephalus platyurus*. Vyhodnocuje se subletální toxický stres po vystavení toxikantu. Stresovaný (intoxikovaný) organismus nepřijímá barevné mikrosféry. Přítomnost či nepřítomnost barevných mikrosfér v zažívacím ústrojí larválního stádia korýše se pozoruje pod stereomikroskopem při malém zvětšení. Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.5 postupy.

Test inhibice klíčení semen *Sinapis alba* L.

V tomto testu se hodnotí vliv toxikantu na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé *Sinapis alba* L. Standardně probíhá 72 hodin na filtračním papíře nasyceném roztokem testované látky, vyhodnocuje se srovnáním se semeny klíčícími bez přítomnosti testované látky (tzv. kontrola). Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.5 postupy.

3.4 Pomůcky, chemikálie, přístroje

Pomůcky:

váženky, lžičky, odměrné baňky, kádinky,
zkumavky, stojan na zkumavky,
mikropipety,
96jamkové mikrotitrační destičky,
líhnoucí nádoba, 8jamkové destičky,
Petriho misky, filtrační papír, pinzeta, pravítko.

Chemikálie:

dimethylsulfoxid (DMSO), dichroman draselný, PPY médium, deionizovaná voda,
standardní voda (součást kitu Rapidtoxkit™),
fixační roztok (součást kitu Rapidtoxkit™),
suspenze mikrosfér (součást kitu Rapidtoxkit™),
standardní médium pro testy na akvarijních rybách, perloočkách a semenech
(v souladu s ČSN EN ISO 7346-2 (75 7761), ČSN EN ISO 6341 (757751)).

Přístroje:

analytické digitální váhy KERN ABJ,
třepačka VORTEX-GENIE 2,
míchačka IKA®MS 3 digital,
ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN,
box s laminárním prouděním BIOAIR INSTRUMENTS Aura 2000 M.A.C.,
inkubátor AQUA®LYTIC,
inkubátor WTB BINDER,
reader ANTHOS 2010,
stereomikroskop LEICA,
počítač.

3.5 Postupy

3.5.1 Vícegenerační test toxicity s *Tetrahymena pyriformis* Ehr.

Testovací organismus:

suspenze prvoka *Tetrahymena pyriformis* v exponenciální fázi růstu.

Postup:

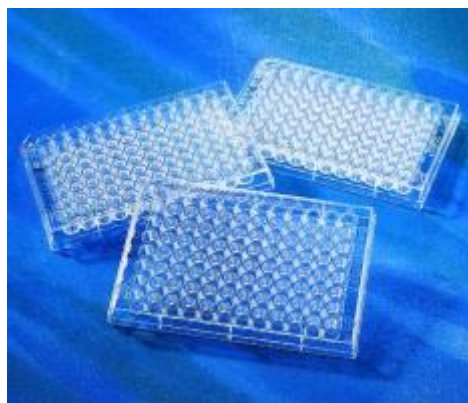
Na analytických vahách se naváží jednotlivé testované látky (paracetamol, Paralen 500 tbl., Panadol tbl.). Ve zkumavkách se připraví dvojkovým ředěním koncentrační řady testovaných látek (5 koncentrací). Nejvyšší testovaná reálná koncentrace je 2341,67 mg/l.

Pro ředění Paralenu 500 tbl. a Panadolu tbl. se použije deionizovaná voda, pro ředění standardu 1% roztok DMSO.

Připraví se PPY médium skládající se z 1,5 % peptonu, 0,5 % kvasnicového extraktu a deionizované vody.

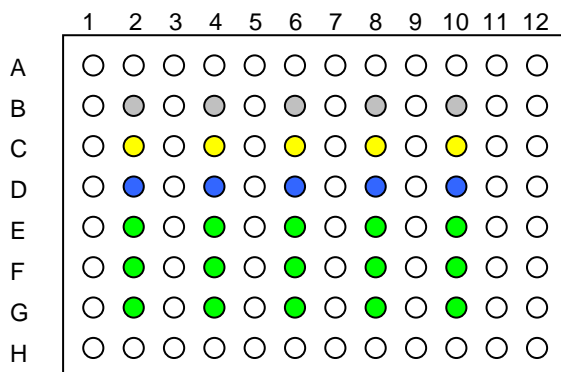
V boxu s laminárním prouděním se plní mikrotitrační destička (obr. 7). Schéma plnění je na obr. 8. Plní se pouze sloupce 2, 4, 6, 8 a 10, řady A a H se vynechají. Důvodem jsou lepší podmínky pro růst *Tetrahymena pyriformis* při tomto uspořádání plných a prázdných jamek.

Ihned po naočkování kultury proběhne měření optické hustoty pomocí readru při vlnové délce 562 nm. Další měření se uskuteční po 1 hodině a po 24 hodinách od inokulace. Inkubace probíhá při 25 °C ve tmě v inkubátoru.



Obr. 7: 96jamkové mikrotitrační destičky (<http://www.baria.cz>)

- vzduch
- 150 μl PPY
- 100 μl PPY + 50 μl roztoku testované látky
- 100 μl PPY + 50 μl suspenze *Tetrahymena pyriformis*
- 50 μl PPY + 50 μl roztoku testované látky + 50 μl suspenze *Tetrahymena pyriformis* (3 paralelní stanovení pod sebou)



Obr. 8: Schéma plnění mikrotitrační destičky pro vícegenerační test toxicity s *Tetrahymena pyriformis*

Vyhodnocení:

Po zpracování naměřených dat se sestrojí pro jednotlivé koncentrace látek graf závislosti růstu prvoka (optická hustota) na čase.

Nakonec se provede pro každou koncentraci a látku výpočet procentuální inhibice růstu prvoka po 24hodinovém působení testované látky podle vzorce:

$$\% \text{ inhibice}_{(C1-C5)} = \left(1 - \frac{\Delta OD_{(C1-C5)}}{\Delta OD_{C0}} \right) \times 100$$

kde:

ΔOD_{C1} je rozdíl hodnot optické hustoty v čase 0 hod a 24 hod pro koncentraci látky C1,

ΔOD_{C0} je rozdíl hodnot optické hustoty v čase 0 hod a 24 hod pro kontrolu.

3.5.2 *Rapidtoxkit*TM

Testovací organismus:

larvální stádium korýše *Thamnocephalus platyurus*

Postup:

Souprava pro provedení testu (tzv. kit) je zobrazena na obr. 9.

Po hodinovém smáčení cyst standardní vodou se cysty nechají líhnout v nádobě se standardní vodou v inkubátoru při 25 °C a souvislém osvětlení (3000 - 4000 lux) 30 - 45 hodin.

Připraví se koncentrační řada testovaných látek ve standardní vodě (6 koncentrací, dvojkové ředění). Nejvyšší testovaná reálná koncentrace je 2341,67 mg/l. Objem roztoku ve zkumavce je 4,5 ml.

Mikropipetou se přidá 0,5 ml suspenze vylíhnutých larev do každé zkumavky a vloží se do inkubátoru (1 hodina, 25 °C). Jedna zkumavka obsahuje pouze standardní vodu a vylíhnuté larvy (tzv. kontrola).

Do každé z testovacích zkumavek se přidá 0,2 ml suspenze červených mikrosfér a 15 minut se inkubuje při 25 °C.

Po 15 minutách se přidají do každé zkumavky 3 kapky fixačního roztoku, po 5 minutách by se měly uhynulé larvy usadit ve spodní části zkumavky.



Obr. 9: RapidtoxkitTM (<http://www.jysco.com>)

Vyhodnocení:

Do jamkové destičky se odebere 0,3 ml roztoku s mrtvými larvami z každé zkumavky, pod mikroskopem se spočítají všechny larvy a poté larvy s neobarveným zažívacím traktem (mortalita způsobená toxinem). Na obr. 10 je larva s barevnými mikrosférami v trávicím traktu.

Vypočítá se míra inhibice příjmu barviva (IPU) podle vzorce:

$$\text{IPU} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad [\%]$$

kde:

A... živé larvy v kontrole (%)

B... živé larvy ve vzorku (%)

Již 30% inhibice vychytávání mikrosfér signalizuje přítomnost toxikantu v testovaném roztoku. Zjišťuje se subletální toxický stres.



Obr. 10: *Thamnocephalus platyurus* s mikrosférami v trávicím traktu
(Standardní operační manuál Rapidtoxkit™)

3.5.3 Test inhibice klíčení semen *Sinapis alba* L.

Testovací organismus:

semena *Sinapis alba* L. s klíčivostí minimálně 90 %, okrově žlutá, střední velikosti (1,5 - 2,5 mm).

Postup:

Připraví se standardní voda smísením zásobních roztoků. Na 1 litr standardní vody se dávkuje 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml zásobních roztoků č. 2, 3, 4.

Litr zásobního roztoku č. 1 obsahuje 117,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v deionizované vodě, litr zásobního roztoku č. 2 obsahuje 49,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v deionizované vodě, litr zásobního roztoku č. 3 obsahuje 25,9 g NaHCO_3 v deionizované vodě, litr zásobního roztoku č. 4 obsahuje 2,3 g KCl v deionizované vodě.

Připraví se koncentrační řada testovaných látek ve standardní vodě (7 koncentrací, dvojkové ředění). Nejvyšší testovaná reálná koncentrace je 2341,67 mg/l. Do Petriho misek se vloží filtrační papír a nasytí se 10 ml testovaného roztoku. Na nasycený filtrační papír se rozloží 10 semen. V tzv. kontrole jsou semena na filtračním papíře nasyceném pouze standardní vodou.

Petriho misky se vloží do inkubátoru. Inkubuje se 72 hodin ve tmě při 20 °C.

Průběh testu je znázorněn na obr. 12.

Vyhodnocení:

Po 72 hodinách inkubace se změří délka kořene a pro každé ředění se vypočítá aritmetický průměr z paralelních měření.

Inhibice růstu (I) se vypočítá podle vzorce:

$$I = \frac{D_k - D_t}{D_k} \times 100 \quad [\%]$$

kde:

I ... inhibice růstu kořene (%),

D_k ... průměrná délka kořene v kontrole (mm),

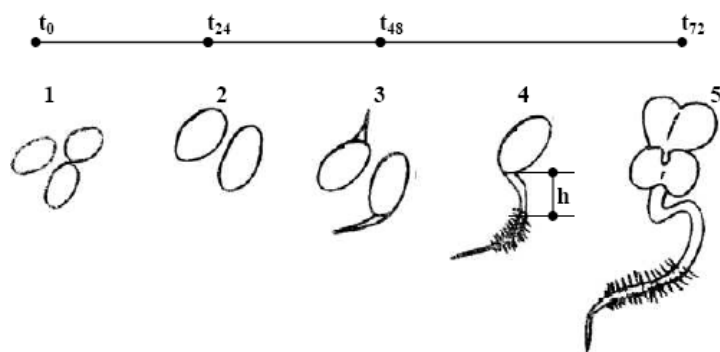
D_t ... průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm).

Stanovení hodnoty IC_{50} se provede nelineární regresní analýzou pomocí výpočetní techniky, programu GraphPad Prism 5 Project.

Správnost postupu a kvality semen se ověří pomocí testu provedeného na standardu $K_2Cr_2O_7$ za stejných podmínek a vyhodnoceného stejným způsobem jako základní testy.

Výsledky testu se považují za platné, jestliže jsou splněny následující požadavky:

- a) klíčivost semen v kontrole je nejméně 90 %,
- b) stanovená hodnota $72 IC_{50}$ standardu dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$) pro testovaná semena je v rozmezí 10 – 50 mg/l (Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů, 2007).



Obr. 12: Průběh testu na semenech hořčice bílé:

- (1) semena v čase t_0 , tj. v den nasazení,
- (2) semena nabobtnalá roztokem v čase t_{24} , tj. v první den pokusu,
- (3) a (4) semena v čase t_{48} , tj. ve druhý den pokusu,
- h ... hypocotyl, tj. zduřelá spodní část stonku oddělující stonk od kořene,
- (5) semena v čase t_{72} , tj. ve třetí den pokusu (Ambrožová, 2003).

3.6 Výsledky, grafy

3.6.1 Vícegenerační test toxicity s *Tetrahymena pyriformis* Ehr.

Test byl proveden ve třech opakováních (A, B, C), vždy ve třech paralelních stanoveních. Uvedené výsledky jsou jejich průměrem.

Grafy znázorňují vždy průměrné hodnoty ze stanovení A, B a C.

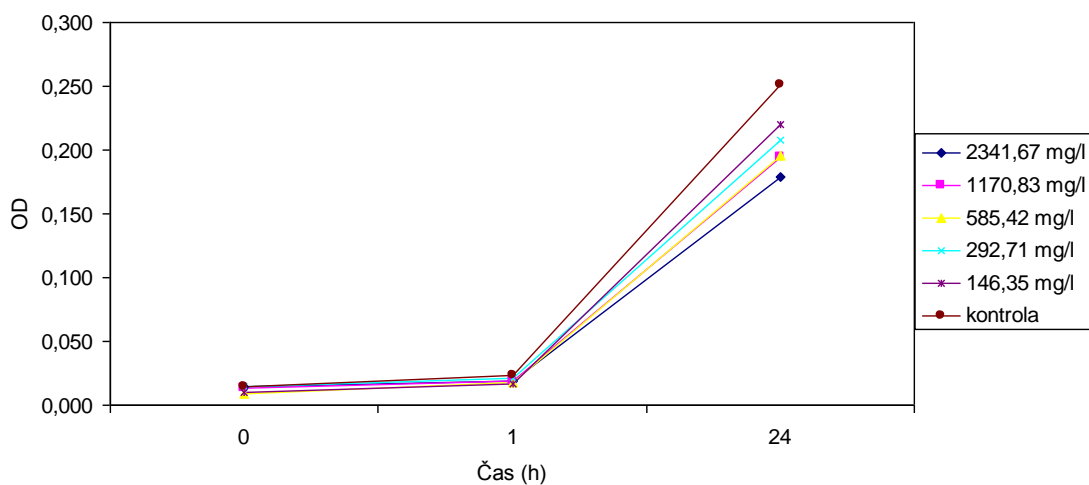
Podmínky testu: 25 °C, tma, 24 hodin.

Standard paracetamolu

Tab. IV: Nárůst optické hustoty (OD) v závislosti na čase a koncentraci standardu paracetamolu

stanovení	čas	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	kontrola
A	0 h	0,013	0,009	0,007	0,014	0,013	0,013
	1 h	0,020	0,018	0,015	0,020	0,016	0,021
	24 h	0,183	0,189	0,193	0,205	0,222	0,248
B	0 h	0,015	0,018	0,012	0,014	0,007	0,016
	1 h	0,022	0,023	0,024	0,020	0,019	0,025
	24 h	0,171	0,195	0,198	0,209	0,217	0,254
C	0 h	0,015	0,014	0,008	0,015	0,011	0,014
	1 h	0,016	0,017	0,016	0,024	0,014	0,025
	24 h	0,183	0,199	0,195	0,208	0,220	0,250
průměr	0 h	0,014	0,014	0,009	0,014	0,010	0,014
	1 h	0,019	0,019	0,018	0,021	0,016	0,024
	24 h	0,179	0,194	0,195	0,207	0,220	0,251

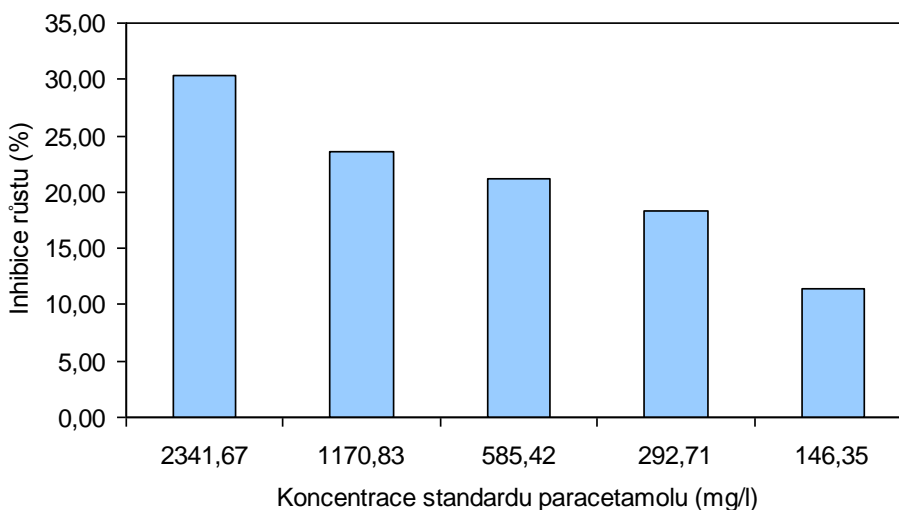
Graf 1: Závislost růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* (OD) na době působení jednotlivých koncentrací standardu paracetamolu



Tab. V: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* [%] působením různých koncentrací standardu paracetamolu

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l
A	27,66	23,40	20,85	18,72	11,06
B	34,45	25,63	21,85	18,07	11,76
C	28,81	21,61	20,76	18,22	11,44
průměr	30,31	23,55	21,15	18,34	11,42

Graf 2: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* vlivem působení různých koncentrací standardu paracetamolu

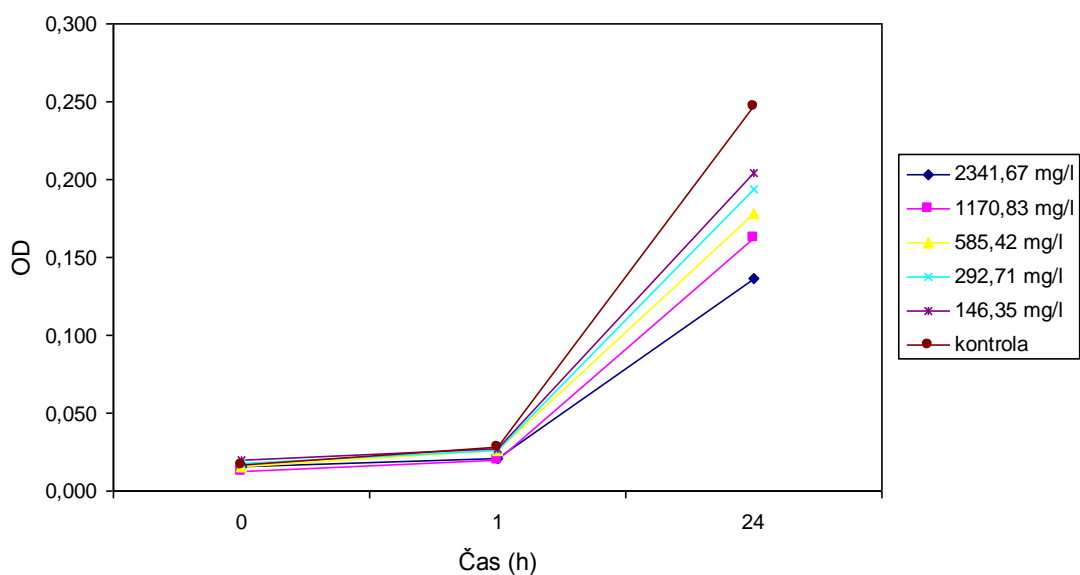


Paralen 500 tbl.

Tab. VI: Nárůst optické hustoty (OD) v závislosti na čase a koncentraci Paralen 500 tbl.

stanovení	čas	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	kontrola
A	0 h	0,014	0,009	0,014	0,016	0,021	0,014
	1 h	0,016	0,016	0,024	0,025	0,027	0,025
	24 h	0,146	0,163	0,179	0,192	0,204	0,246
B	0 h	0,014	0,014	0,018	0,013	0,021	0,018
	1 h	0,022	0,017	0,029	0,025	0,027	0,030
	24 h	0,139	0,170	0,182	0,195	0,210	0,249
C	0 h	0,018	0,013	0,015	0,023	0,017	0,017
	1 h	0,024	0,025	0,024	0,029	0,027	0,029
	24 h	0,124	0,154	0,173	0,193	0,200	0,247
průměr	0 h	0,015	0,012	0,016	0,017	0,020	0,016
	1 h	0,021	0,019	0,026	0,026	0,027	0,028
	24 h	0,136	0,162	0,178	0,193	0,205	0,247

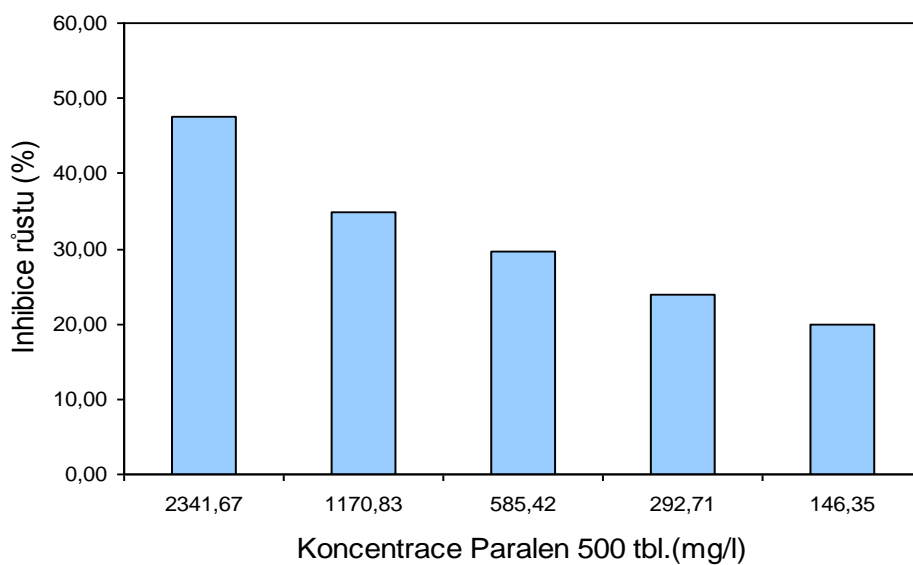
Graf 3: Závislost růstu prvka *Tetrahymena pyriformis* (OD) na době působení jednotlivých koncentrací Paralen 500 tbl.



Tab. VII: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* [%] působením různých koncentrací Paralen 500 tbl.

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l
A	43,10	33,62	28,88	24,14	21,12
B	45,89	32,47	29,00	21,21	18,18
C	53,91	38,70	31,30	26,09	20,43
průměr	47,63	34,93	29,73	23,81	19,91

Graf 4: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* vlivem působení různých koncentrací Paralen 500 tbl.

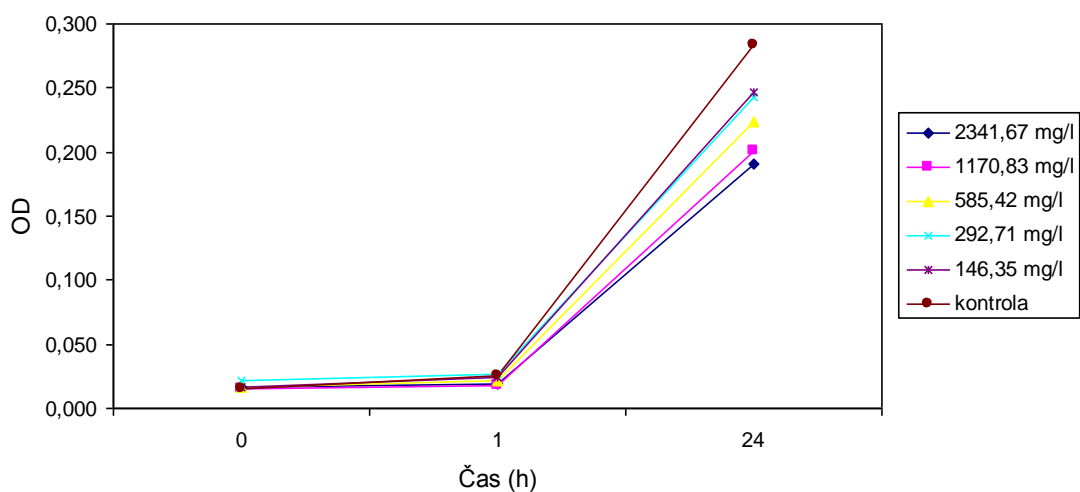


Panadol tbl.

Tab. VIII: Nárůst optické hustoty (OD) v závislosti na čase a koncentraci Panadol tbl.

stanovení	čas	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	kontrola
A	0 h	0,014	0,017	0,016	0,024	0,019	0,014
	1 h	0,013	0,019	0,022	0,028	0,025	0,023
	24 h	0,193	0,206	0,224	0,245	0,250	0,280
B	0 h	0,011	0,021	0,014	0,020	0,014	0,015
	1 h	0,019	0,025	0,017	0,026	0,021	0,024
	24 h	0,178	0,203	0,219	0,239	0,239	0,286
C	0 h	0,023	0,006	0,021	0,021	0,017	0,017
	1 h	0,026	0,010	0,024	0,025	0,028	0,029
	24 h	0,201	0,194	0,229	0,244	0,252	0,285
průměr	0 h	0,016	0,015	0,017	0,022	0,017	0,015
	1 h	0,019	0,018	0,021	0,026	0,025	0,025
	24 h	0,191	0,201	0,224	0,243	0,247	0,284

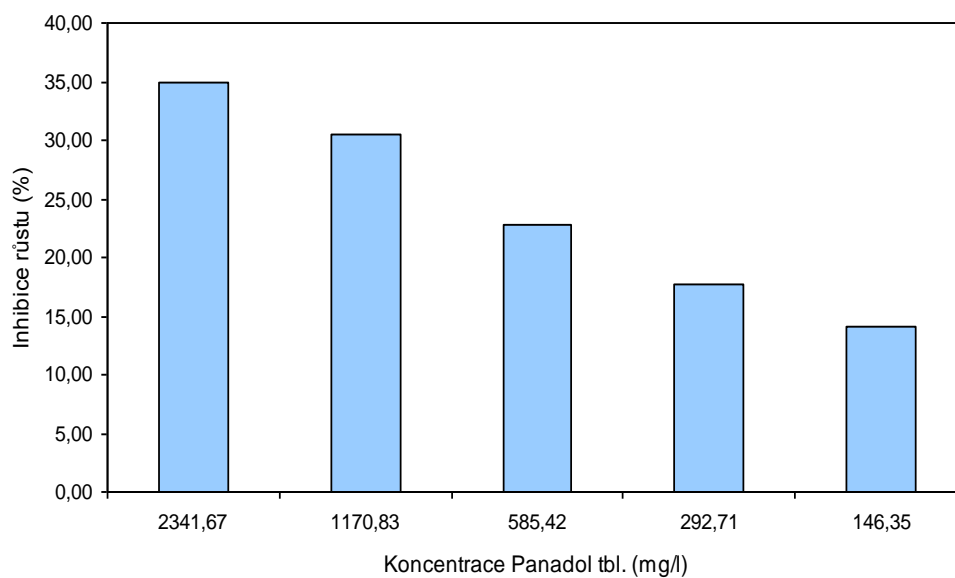
Graf 5: Závislost růstu prvka *Tetrahymena pyriformis* (OD) na době působení jednotlivých koncentrací Panadol tbl.



Tab. IX: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* [%] působením různých koncentrací Panadol tbl.

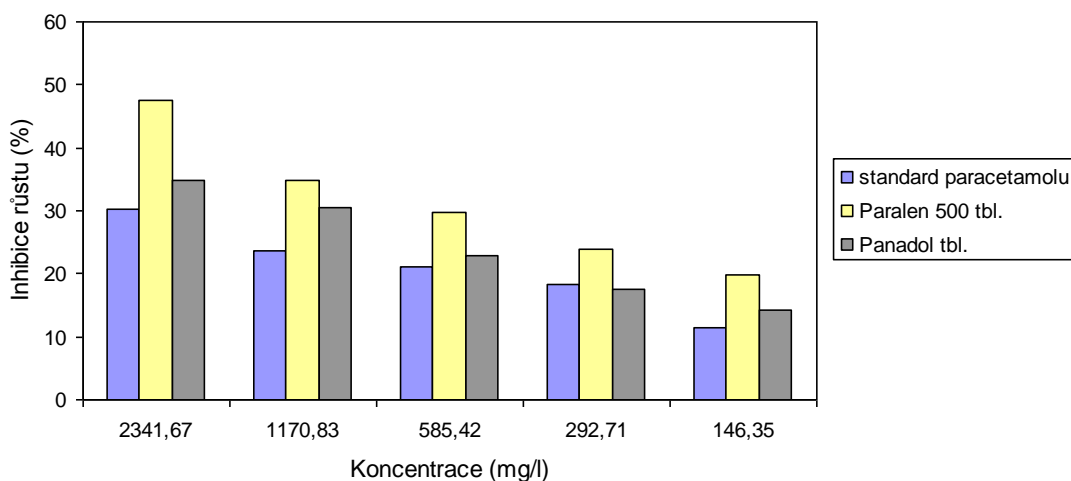
stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l
A	32,71	28,95	21,80	16,92	13,16
B	38,38	32,84	24,35	19,19	16,97
C	33,58	29,85	22,39	16,79	12,31
průměr	34,89	30,55	22,85	17,63	14,15

Graf 6: Inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* vlivem působení různých koncentrací Panadol tbl.



Srovnání inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis* působením standardu a působením léčivých přípravků

Graf 7: Srovnání inhibice růstu *Tetrahymena pyriformis* působením standardu paracetamolu a léčivých přípravků s obsahem paracetamolu



Standard paracetamolu, léčivé přípravky Paralen 500 tbl. i Panadol tbl. měly negativní vliv na růst nálevníka.

Z grafu 7 je zřejmé, že největší vliv měl Paralen tbl., nejmenší vliv měla expozice standardu paracetamolu.

Nejvyšší koncentrace léčivého přípravku Paralen 500 tbl. (2341,67 mg/l) způsobila 47,63% inhibici růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis*.

Standardní toxin

Byl proveden referenční test toxicity se standardním toxinem dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$. Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 Project byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} pro $K_2Cr_2O_7$:

$$IC_{50} (24 \text{ h}) = 20,82 \text{ mg/l} (17,27 - 25,11 \text{ mg/l}).$$

3.6.2 *Rapidtoxit*TM

Test byl proveden ve třech opakováních. Uvedené výsledky jsou jejich průměrem.

Podmínky testu: 25 °C, souvislé osvětlení (3000 - 4000 lux), 1 hodina.

Standard paracetamolu

Tab. X: Inhibice příjmu barviva korýšem *Thamnocephalus platyurus* působením různých koncentrací standardu paracetamolu

koncentrace (mg/l)	celkový počet organismů	živé organismy	% živých organismů	inhibice příjmu barviva (%)
2341,67	12	10	83,33	16,67
1170,83	8	8	100	0
585,42	7	7	100	0
292,71	14	14	100	0
146,35	15	15	100	0
73,18	10	10	100	0
0	7	7	100	0

Paralen 500 tbl.

Tab. XI: Inhibice příjmu barviva korýšem *Thamnocephalus platyurus* působením různých koncentrací Paralen 500 tbl.

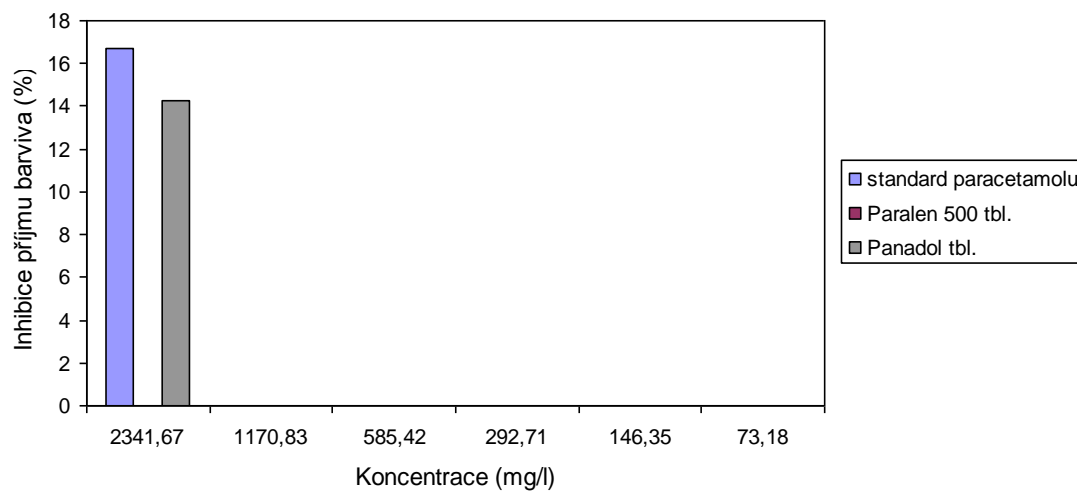
koncentrace (mg/l)	celkový počet organismů	živé organismy	% živých organismů	inhibice příjmu barviva (%)
2341,67	14	14	100	0
1170,83	8	8	100	0
585,42	9	9	100	0
292,71	9	9	100	0
146,35	11	11	100	0
73,18	8	8	100	0
0	7	7	100	0

Panadol tbl.

Tab. XII: Inhibice příjmu barviva korýšem *Thamnocephalus platyurus* působením různých koncentrací Panadol tbl.

koncentrace (mg/l)	celkový počet organismů	živé organismy	% živých organismů	inhibice příjmu barviva (%)
2341,67	7	6	85,71	14,29
1170,83	9	9	100	0
585,42	15	15	100	0
292,71	12	12	100	0
146,35	21	21	100	0
73,18	8	8	100	0
0	7	7	100	0

Graf 8: Srovnání inhibice příjmu barviva korýšem *Thamnocephalus platyurus* působením standardu paracetamolu a léčivých přípravků s obsahem paracetamolu



Pouze nejvyšší koncentrace standardu paracetamolu a přípravku Panadol tbl. měly vliv na korýše *Thamnocephalus platyurus*. Inhibice příjmu barviva byla v případě standardu paracetamolu 16,67 % a v případě přípravku Panadol tbl. 14,29 %. Paralen 500 tbl. korýše neovlivnil.

3.6.3 Test inhibice klíčení semen *Sinapis alba* L.

Test byl proveden ve třech opakováních (A, B, C), každé opakování vždy ve třech paralelních stanoveních. Uvedené výsledky jsou jejich průměrem. Grafy znázorňují vždy průměrné hodnoty ze stanovení A, B a C.

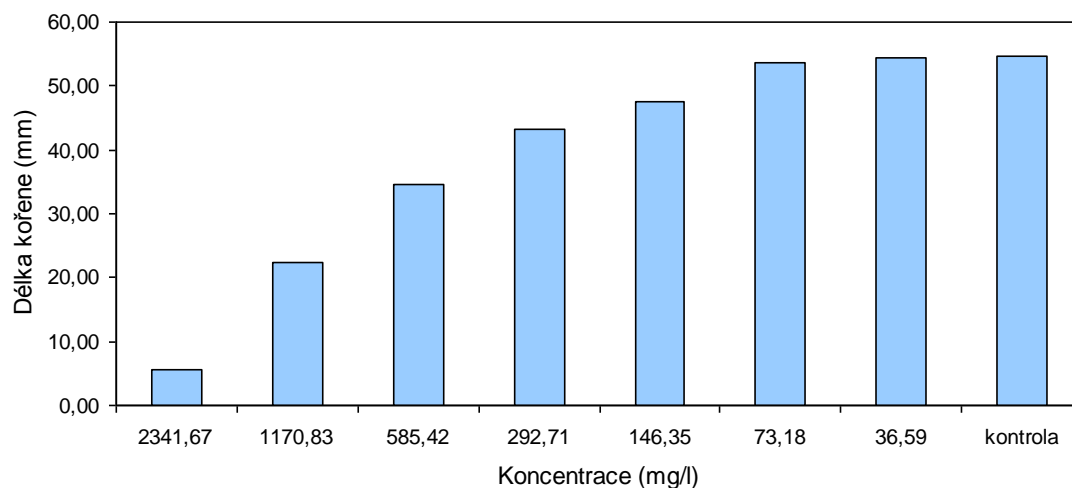
Podmínky testu: 20 °C, tma, 72 hodin.

Standard paracetamolu

Tab. XIII: Průměrné délky kořenů *Sinapis alba* (mm) v závislosti na koncentraci standardu paracetamolu ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l	kontrola
A	6,18	27,02	37,62	48,30	47,29	54,16	54,83	55,05
B	5,80	24,29	40,43	40,68	45,54	53,37	53,64	53,96
C	4,94	15,53	25,44	40,76	49,91	53,30	54,53	54,82
průměr	5,64	22,28	34,49	43,24	47,58	53,61	54,33	54,61

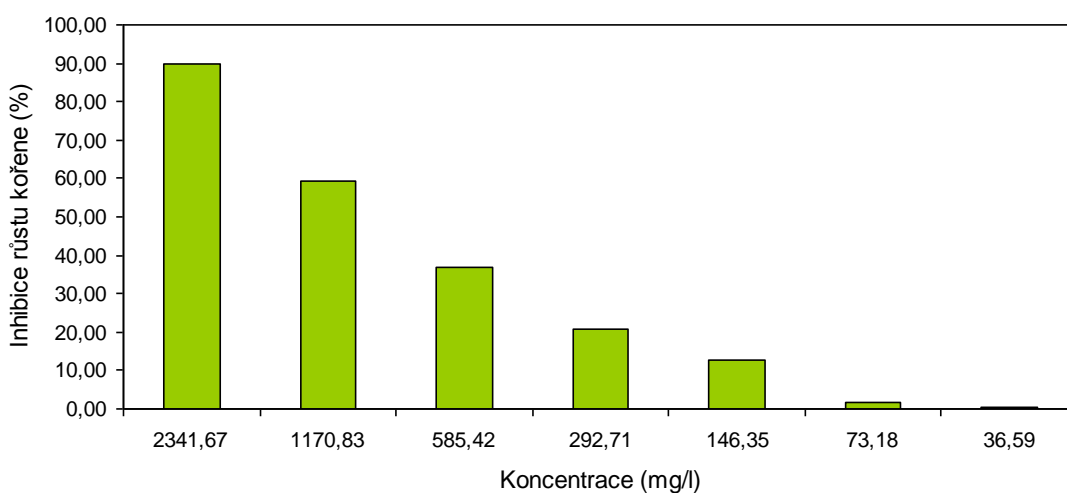
Graf 9: Závislost průměrné délky kořenů *Sinapis alba* na koncentraci standardu paracetamolu ve standardní vodě



Tab. XIV: Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* (%) v závislosti na koncentraci standardu paracetamolu ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l
A	88,77	50,91	31,67	12,27	14,10	1,61	0,40
B	89,26	54,99	25,07	24,61	15,60	1,10	0,60
C	90,98	71,68	53,60	25,65	8,95	2,77	0,53
průměr	89,67	59,19	36,78	20,84	12,88	1,83	0,51

Graf 10: Závislost inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na koncentraci standardu paracetamolu ve standardní vodě



Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 Project byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} standardu paracetamolu:

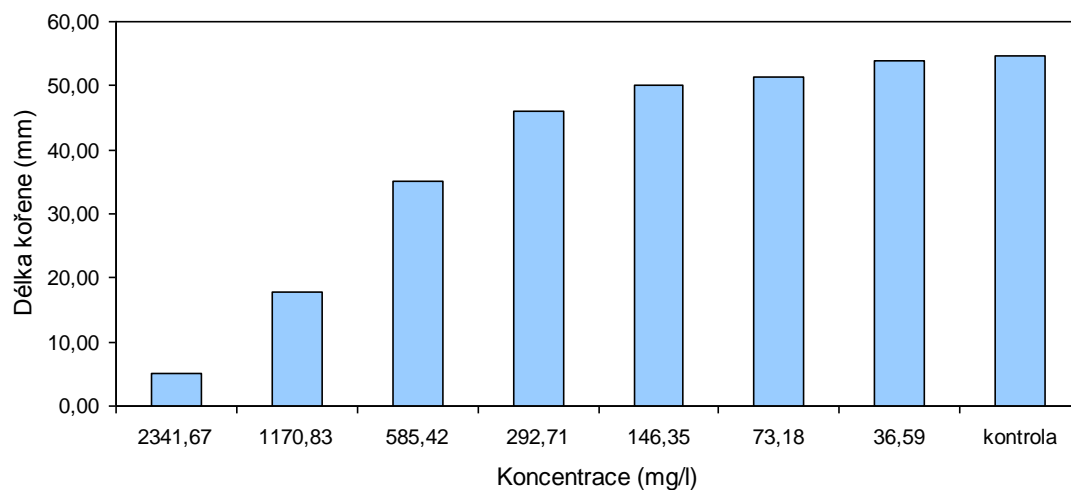
$$IC_{50} (72 \text{ h}) = 1117,59 \text{ mg/l} (878,90 - 1421,14 \text{ mg/l}).$$

Paralen 500 tbl.

Tab. XV: Průměrné délky kořenů *Sinapis alba* (mm) v závislosti na koncentraci Paralen 500 tbl. ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l	kontrola
A	5,81	18,14	36,12	46,67	50,65	52,09	54,39	55,05
B	5,92	16,11	37,60	44,10	49,48	50,61	53,25	53,96
C	3,62	19,28	31,83	47,54	50,31	51,59	54,17	54,82
průměr	5,12	17,84	35,18	46,10	50,15	51,43	53,94	54,61

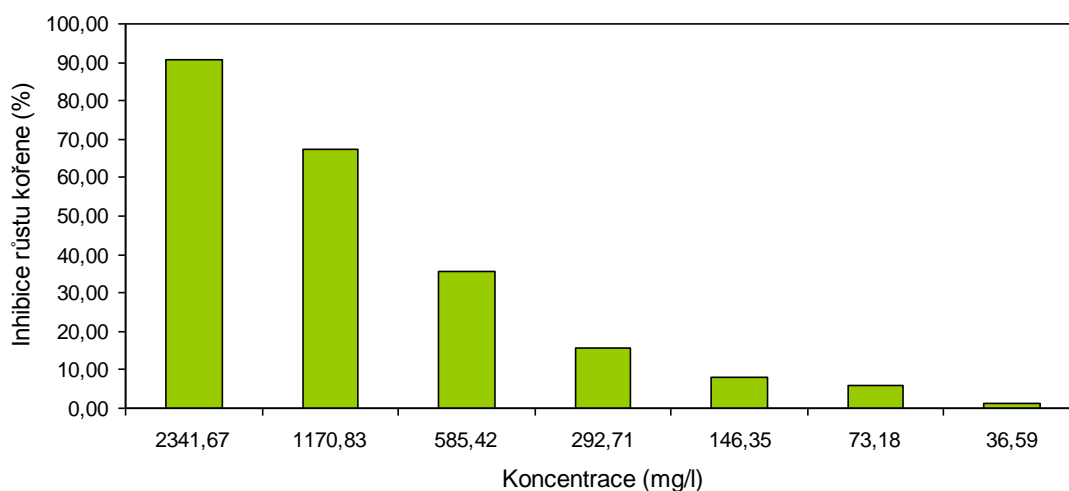
Graf 11: Závislost průměrné délky kořenů *Sinapis alba* na koncentraci Paralen 500 tbl. ve standardní vodě



Tab. XVI: Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* (%) v závislosti na koncentraci Paralen 500 tbl. ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l
A	89,44	67,05	34,38	15,22	7,99	5,38	1,2
B	89,03	70,15	30,32	18,28	8,3	6,2	1,32
C	93,39	64,83	41,94	13,28	8,22	5,9	1,18
průměr	90,62	67,34	35,55	15,59	8,17	5,83	1,23

Graf 12: Závislost inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na koncentraci Paralen 500 tbl. ve standardní vodě



Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 Project byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} pro Paralen 500 tbl.:

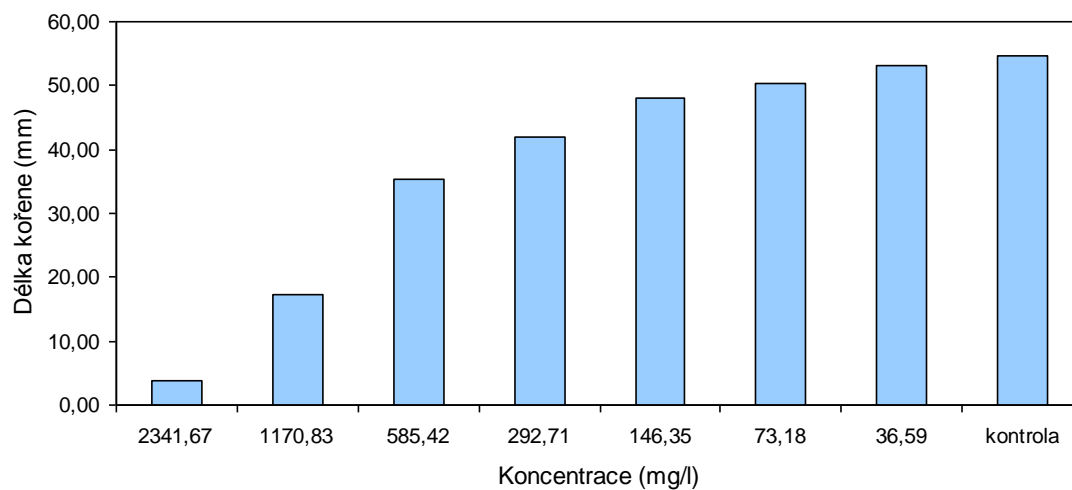
$$IC_{50} (72 \text{ h}) = 1035,21 \text{ mg/l} (867,41 - 1235,35 \text{ mg/l}).$$

Panadol tbl.

Tab. XVII: Průměrné délky kořenů *Sinapis alba* (mm) v závislosti na koncentraci Panadol tbl. ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l	kontrola
A	3,42	16,60	35,84	41,87	48,07	50,36	53,77	55,05
B	3,94	20,05	33,31	41,03	47,07	50,30	52,61	53,96
C	3,73	15,29	36,53	43,21	48,79	50,46	53,39	54,82
průměr	3,70	17,32	35,23	42,03	47,98	50,37	53,26	54,61

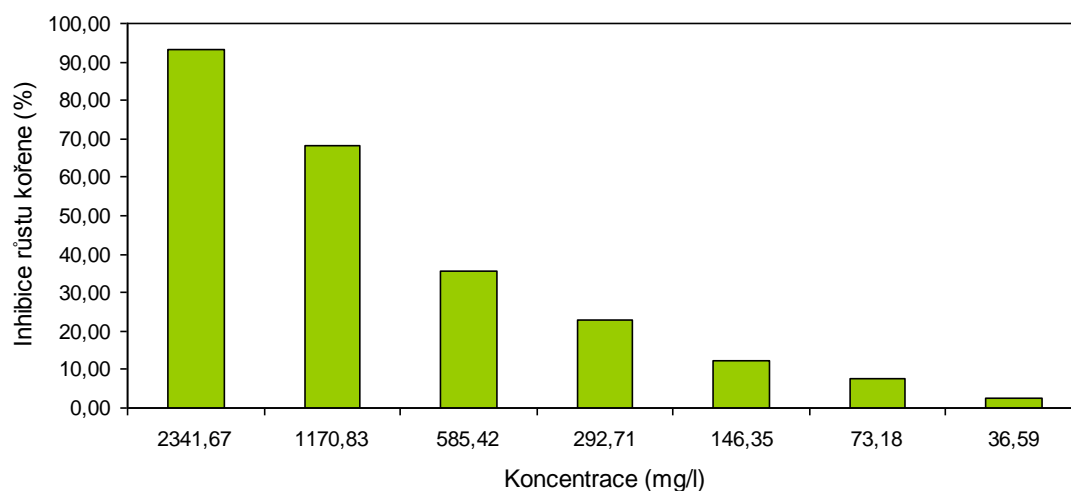
Graf 13: Závislost průměrné délky kořenů *Sinapis alba* na koncentraci Panadol tbl. ve standardní vodě



Tab. XVIII: Inhibice růstu kořene *Sinapis alba* (%) v závislosti na koncentraci Panadol tbl. ve standardní vodě

stanovení	2341,67 mg/l	1170,83 mg/l	585,42 mg/l	292,71 mg/l	146,35 mg/l	73,18 mg/l	36,59 mg/l
A	93,79	69,84	34,89	23,95	12,68	8,52	2,32
B	92,69	62,84	38,27	23,97	12,76	6,79	2,50
C	93,20	72,10	33,37	21,18	11,00	7,96	2,61
průměr	93,23	68,26	35,51	23,03	12,15	7,76	2,48

Graf 14: Závislost inhibice růstu kořene *Sinapis alba* na koncentraci Panadol tbl. ve standardní vodě

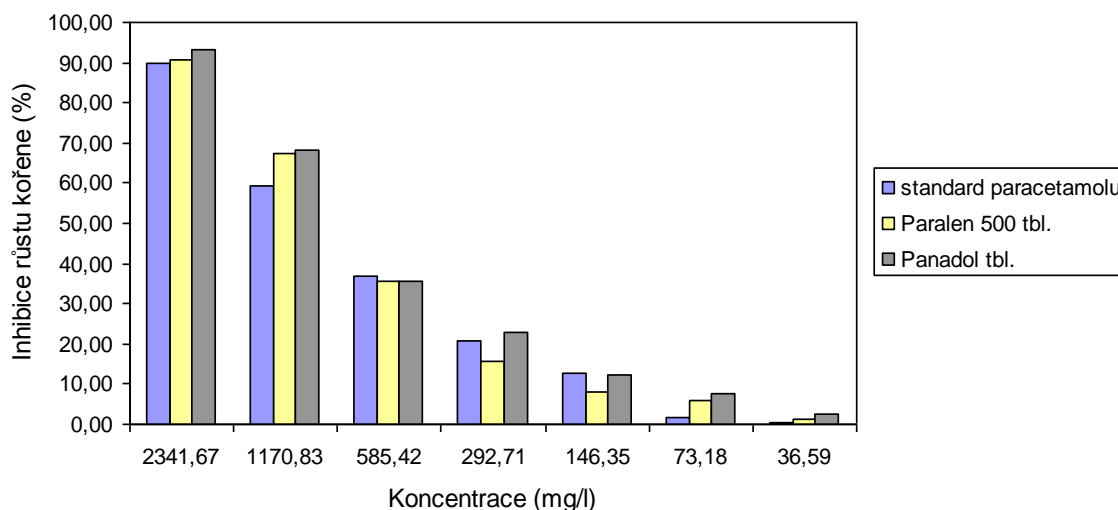


Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 Project byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} pro Panadol tbl.:

$$IC_{50} (72 \text{ h}) = 1004,67 \text{ mg/l} (822,66 - 1227,04 \text{ mg/l}).$$

Srovnání inhibice růstu kořene působením standardu a léčivých přípravků

Graf 15: Srovnání inhibice růstu kořene *Sinapis alba* působením standardu paracetamolu a léčivých přípravků s obsahem paracetamolu



Z grafu 15 je patrné, že největší vliv na klíčení semen *Sinapis alba* měl Panadol tbl. Koncentrace 2341,67 mg/l způsobila 93,23% inhibici růstu kořene. Nejmenší vliv v téže koncentraci vykázal standard paracetamolu. Způsobil 89,67% inhibici růstu kořene.

Zjištěné IC_{50} testovaných látek

Standard paracetamolu IC_{50} (72 h) = 1117,59 mg/l (878,90 – 1421,14 mg/l)

Paralen 500 tbl. IC_{50} (72 h) = 1035,21 mg/l (867,41 – 1235,35 mg/l)

Panadol tbl. IC_{50} (72 h) = 1004,67 mg/l (822,66 – 1227,04 mg/l)

Přepočítání IC_{50} na jednotky toxicity TU

Standard paracetamolu 0,0895 TU

Paralen 500 tbl. 0,0966 TU

Panadol tbl. 0,0995 TU

Standardní toxin

Byl proveden test se standardním toxinem dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$. Nelineární regresní analýzou pomocí programu GraphPad Prism 5 Project byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} dichromanu draselného:

$$IC_{50} (72 \text{ h}) = 13,65 \text{ mg/l} (10,41 - 17,90 \text{ mg/l}).$$

Hodnota IC_{50} se nachází v požadovaném intervalu 10 – 50 mg/l. Byla tím potvrzena správnost postupu a kvalita semen. Můžeme proto výsledky testování považovat za platné.

4 Diskuze

Účinné látky se vyrábějí průmyslově, dochází k jejich rozsáhlému užívání (často i nadužívání) a zákonitě se tak musí projevit jejich výskyt v životním prostředí (Kotyza a kol., 2009).

Mnoho studií ukazuje, že jsou léčiva a jejich metabolity široce distribuované v povrchových vodách (Wiegel a kol., 2004).

Paracetamol je rychle rozložitelný v životním prostředí (poločas rozpadu < 1 den) (Ashton a kol., 2004). Jedná se ale o léčivo široce používané v populaci, proto se jeho výskytem v životním prostředí a toxickými účinky na ekosystém zabývá ve svých studiích mnoho vědců.

Rezidua léčiv ve vodě upravené čistírnou odpadních vod sleduje ve své práci Stackelberg a kol. (2007). Paracetamol se podle jejich závěrů během úpravy vody zahrnující čerání, dezinfekci chlorem a filtrování přes aktivní uhlíkový filtr odstraní z 98 %.

Roberts a kol. (2006) svým měřením koncentrace paracetamolu v odpadní vodě před čištěním a po úpravě v čistírně odpadních vod došel k závěru, že se paracetamol odstraní z odpadní vody zcela.

Fent a kol. (2006) uvádí ve své studii úplné odstranění paracetamolu z odpadních vod mechanickým čeráním a biologickou úpravou, ale zároveň poukazuje na výskyt paracetamolu ve 24 % vzorků odebraných na tocích USA, a to v koncentraci až do výše 10000 ng/l.

Bound a kol. (2006) porovnával předpovězenou environmentální koncentraci (*PEC*) běžných léčiv s naměřenými koncentracemi léčiv v řekách UK. *PEC* paracetamolu 210 ng/l zahrnuje i úvahy o kvantitě předepisování lékařem, metabolismu paracetamolu a stupni jeho odstranění v čistírně odpadních vod. Paracetamol byl nalezen ve všech vzorcích z životního prostředí, maximální koncentrace byla 550 ng/l.

Wiegel a kol. (2004) shrnuje výsledky studií z roku 1998 - 2000 sledujících léčiva včetně paracetamolu na různých místech toku Labe. Nejvyšší naměřená koncentrace paracetamolu byla 66 ng/l v Bílině.

Kasprzyk-Hordern a kol. (2008) sledovala ve svém výzkumu po dobu 10 měsíců výskyt různých látek včetně léčiv ve dvou tocích v Jižním Walesu (v řece Taff a v řece Ely). Mezi faktory ovlivňující úroveň koncentrace látek v povrchových vodách patřila okolní krajina, blízkost výpusti odpadních vod, povětrnostní podmínky a srážky. Nejvyšší naměřená koncentrace paracetamolu na řece Taff byla 2382 ng/l, v řece Ely 1379 ng/l.

Henschel a kol. (1997) zaměřil svoji práci na hodnocení rizika léčiv pro životní prostředí. V testech využívá bakterie, řasy, korýše, nálevníka, embrya ryb a rybí buněčnou linii BF-2. Výsledky testů paracetamolu jsou tyto:

inhibice růstu korýše *Daphnia magna*: EC₅₀ (24 h): 293 mg/l, (48 h): 50 mg/l,

inhibice růstu prvoka *Tetrahymena pyriformis*: EC₅₀ (48 h): 112 mg/l,

inhibice růstu řasy *Scenedesmus subspicatus*: EC₅₀ (72 h): 134 mg/l,

inhibice luminiscence *Vibrio fischeri*: EC₅₀ (30 min): 650 mg/l.

Zajímavý je růst toxicity v testu na dafniích v závislosti na době expozice. To odpovídá teorii, že léčiva mají poměrně nízkou akutní toxicitu, ale mají výraznější chronickou či subchronickou toxicitu.

Santos a kol. (2010) shrnuje výsledky studií jiných autorů, které byly zaměřeny na výskyt farmak v životním prostředí a testy akutní a chronické toxicity. Poskytuje rozsáhlou recenzi existujících dat. U paracetamolu můžeme najít tyto hodnoty:

Vibrio fischeri EC₅₀ (15 min): 567,5 mg/l,

Vibrio fischeri EC₅₀ (30 min): 650 mg/l,

Daphnia magna EC₅₀ (48 h) imobilizace: 30,1 mg/l,

Daphnia magna EC₅₀ (96 h) imobilizace: 26,6 mg/l,

Daphnia magna EC₅₀ imobilizace: 50 mg/l,

Oryzias latipes LC₅₀ (48 h) > 160 mg/l,

Oryzias latipes LC₅₀ (96 h) > 160 mg/l,

Brachyodanio rerio (*Zebra fish*) LC₅₀ (48 h): 378 mg/l,

Scenedesmus subspicatus EC₅₀ (72 h): 134 mg/l,

Tetrahymena pyriformis EC₅₀ (48 h) inhibice růstu: 112 mg/l.

Kim a kol. (2007) ve své studii zkoumal akutní vodní toxicitu léčiv hojně užívaných v Koreji. Jako testovací organismy používal mořskou bakterii (*Vibrio fischeri*), sladkovodní bezobratlý organismus (*Daphnia magna*) a japonskou rybu (*Oryzias latipes*). *Daphnia magna* byla nejvíce citlivá mezi zkušebními organismy. Z testovaných léčiv byl nejvíce akutně toxický diltiazem (střední letální koncentrace 8,2 mg/l). V tabulce XIX jsou výsledky akutní toxicity týkající se paracetamolu.

Kim a kol. (2007) uvádí i vypočítaný poměr *PEC/PNEC* 1,8 pro paracetamol. Jedná se o hodnotu, která doporučuje environmentální zájem o tuto sloučeninu a její další zkoumání v životním prostředí.

Tab. XIX: Akutní střední efektivní koncentrace paracetamolu (ATP) (mg/l) (Kim a kol., 2007)

	<i>V. fischeri</i>		<i>D. magna</i>		<i>O. latipes</i>	
	5 min	15 min	48 h	96 h	48 h	96 h
ATP	549.7 (534.0–565.9)	567.5 (358.6–898.1)	30.1 (23.2–39.0)	26.6 (19.6–33.6)	>160	>160

Stuer-Lauridsen a kol. (2000) uvádí ve své práci tyto údaje akutní toxicity paracetamolu:

D. magna EC₅₀ (24 h): 136 mg/l,

D. magna EC₅₀ (48 h): 9,2 mg/l,

S. proboscideu LC₅₀ (24 h): 29,6 mg/l.

Carlsson a kol. (2006) vytvořili práci, ve které se zabývají hodnocením environmentálního rizika, a také jeho odhadem u 27 léčiv často používaných ve Švédsku. U paracetamolu uvádí poměr *PEC/PNEC* 1,41 a tyto hodnoty akutní toxicity: *Streptocephalus proboscideus*: EC₅₀ (24 h) (Streptoxkit F): 9,2 mg/l, *Daphnia magna*: EC₅₀ (24 h): 55,5 mg/l.

Studie autorů An a kol. (2009) se věnuje efektům paracetamolu na klíčení semen a vývoj sazenic pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) za účelem ohodnocení ekotoxikologického rizika paracetamolu jako příkladu léčiva vstupujícího do zemědělských ekosystémů. Inhibice růstu kořene byla větší se zvyšováním koncentrace léčiva. Zjištěnou koncentraci EC₅₀ 668,8 mg/l nenalezneme volně v životním prostředí, ale změny v růstu pšenice jsou po chronickém vystavení i nízkým koncentracím paracetamolu zřejmé (byla poškozena akumulace chlorofylu a syntéza rozpustných proteinů, změněna aktivita peroxidázy a superoxidodismutázy, byl poškozen antioxidační obranný systém v kořenech).

Richards a kol. (2006) provedl test FETAX se 14 léčivy. Blastula *Xenopus laevis* byla vystavena 96 hodin jednotlivým koncentracím léčiv. Sledovaly se malformace, teratogenní toxicita. V koncentracích až do 100 mg/l paracetamol nevykazoval významné rozdíly v úmrtnosti v porovnání s kontrolou. Expozice blastuly koncentraci paracetamolu 100 mg/l měla za následek deformace pulců jako ohyby ocasu a edémy.

Pro testování toxicity látek potenciálně toxických pro vodní ekosystémy doporučuje Kulovaná a kol. (2009) testy toxicity na perloočkách, řasách a luminiscenčních baktériích. Tyto testy jsou vhodné i pro testování kapalných vzorků. Vzorky potenciálně toxické pro půdní ekosystémy či vzorky ve vodě nerozpustné či hydrofobní je vhodné testovat na chvostoskocích, roupicích a kořenu salátu.

V této diplomové práci byli pro testování použiti zástupci producentů, konzumentů i destruentů.

Nejvyšší testovaná koncentrace paracetamolu byla zvolena 15,5 mmol/l (odpovídá 2341,67 mg/l), aby se tableta kvalitně rozpustila. Vyšší koncentrace by nebyla možná, protože by se při rozpouštění tablet vytvořila suspenze, která by nevhodně ovlivnila měření. Její zfiltrování není vhodné, protože by na filtru ulpěla spolu s pomocnými látkami z tablety i účinná látka a její koncentrace by byla ve filtrátu nižší.

Zástupcem destruentů byl ve vícegeneračním testu toxicity nálevník *Tetrahymena pyriformis* Ehr. Standard paracetamolu, léčivé přípravky Paralen 500 tbl. i Panadol tbl. měly negativní vliv na růst nálevníka. Expozice léčivému přípravku Paralen tbl. v nejvyšší testované koncentraci způsobila 47,63% inhibici růstu prvoka a působila tak nejvíce toxicky. Nejméně toxicky působil na prvoka standard paracetamolu.

Sladkovodní prvok *Tetrahymena pyriformis* je organismus volby pro cytotoxické studie. Jeho krátká doba potřebná k rozdělení buňky a možnost rychlého pěstování v kultuře jsou obzvláště výhodné vlastnosti pro studie účinku xenobiotik na několika generacích buněk (Mountassif a kol., 2007).

Mnoho farmaceutických substancí bylo testovaných na *Tetrahymena pyriformis*. Většina studií se zabývá inhibičními efekty a morfologickými změnami v *Tetrahymena pyriformis* (Sauvant a kol., 1999).

Tetrahymena pyriformis může být dle Sauvanta a kol. (1999) považovaná za doplněk či alternativu zvířeti a model savčí buňky v toxikologickém výzkumu. Sauvant a kol. (1999) zdůrazňuje ohromné kapacity *Tetrahymena pyriformis* ve screeningu toxických látek v environmentálních či farmaceutických polích a v pochopení buněčných mechanismů toxicity substancí.

Jako zástupce konzumentů byl pro diplomovou práci vybrán korýš *Thamnocephalus platyurus*. Byl nejméně citlivým modelovým organismem na působení paracetamolu. Inhibice příjmu barviva byla menší než 30 %, což řadí paracetamol k látkám potencionálně netoxickým.

Testy toxicity s larvami *Thamnocephalus platyurus* u nás zavedl B. Maršálek (v řadě publikací od roku 1991). Tyto testy jsou v laboratoři snadno proveditelné a zaslouží si širšího použití (Sládeček a kol., 1997).

Kim a kol. (2009) se ve své studii zabývají testy akutní toxicity 14 léčivých látek (ibuprofen, karbamazepin, indometacin atd.). Pro zkoušení využívají dva vodní organismy, a to *Thamnocephalus platyurus* (LC₅₀, 24 h) a *Oryzias latipes* (LC₅₀, 96 h). *Thamnocephalus platyurus* vybrali pro testování proto, že je podstatně citlivější na různé druhy chemických látek než *Daphnia magna*.

Törökne (2006) srovnávala ve své práci dva testy toxicity, které využívají larvy korýše *Thamnocephalus platyurus*, a to 24hodinový Thamnotoxkit™ a 1hodinový Rapidtoxkit™. Došla k závěru, že v mnoha případech je možné pro testování nahradit Thamnotoxkit™ rychlým Rapidtoxkitem™.

Zástupcem producentů je v této diplomové práci *Sinapis alba* L. Hodnotila se inhibice klíčení semen. Byla nejcitlivější z modelových organismů. Nejvíce inhiboval růst kořene Panadol tbl., nejvyšší koncentrace způsobila 93,23% inhibici. Nejméně toxicky působil v téže koncentraci standard paracetamolu. Způsobil 89,67% inhibici růstu kořene.

Základním sledovaným parametrem pro hodnocení testu je průměrná délka kořene. Hodnota stanovená v testovaných koncentracích látky se porovnává s kontrolou a vypočítává se procento inhibice (zkrácení) či stimulace (prodloužení kořene) (Metodický pokyn odboru odpadu ke stanovení ekotoxicity odpadu, 2007).

U testu toxicity na semenech hořčice bílé se jedná o metodiku, která byla několikrát veřejně pro hodnocení ekotoxicity odpadů kritizována. Metoda je sice provozně jednoduchá a ekonomicky nenáročná, má však pro oblast hodnocení ekotoxicity odpadů několik závažných principiálních nedostatků (problémy s klíčivostí, různá semena od různých dodavatelů apod.). Rovněž dlouholeté zkušenosti s metodou ukazují, že je její citlivost nízká, a že v drtivé většině vzorků odpadů je citlivost ostatních metod vyšší a tudíž vyřazením této metody nedojde ke snížení citlivosti sady testů toxicity jako celku (Kulovaná a kol., 2009).

Sekutowski a kol. (2009) využil pro testování reziduí herbicidů v půdě jako jednu z rostlin *Sinapis alba*. Ukázala se nejvhodnější pro detekci chlorsulfuronu a nicosulfuronu, zatímco nejméně citlivá byla pro herbicid dicamba a 2,4-DP. Zásadní význam pro testování má výběr vhodných rostlin. Dostatečně citlivé rostliny umožňují provádět analýzy vzorků s koncentrací reziduí 1,5 ng/kg půdy.

Léčiva jako polutanty v životním prostředí představují vážný problém, a to nejen pro člověka, ale také pro všechny zasažené ekosystémy. Je proto nutné pokračovat ve výzkumu tohoto celosvětového problému i nadále.

Použití experimentálních dat k ohodnocení a předpovídání efektu toxických substancí v přirozených podmínkách je komplikované. V přirozených podmínkách jsou organismy ovlivněny celým souborem okolních faktorů. Vodní ekosystémy jsou kontaminované četnými polutanty, které mohou mít synergické či antagonistické účinky, proto je téměř nemožné zvažovat veškeré kombinace okolních faktorů, které mají vliv na efekt toxických látek na organismy (Moiseenko, 2008).

Je nedostatek studií, které se zabývají chronickou expozicí více generací organismů farmakům a pátráním po dopadu na celé společenství. Jen získáním potřebných informací bude možné zlepšit existující legislativu tak, aby chránila lidi, zvířata a ekosystémy před hrozbou, kterou představuje přítomnost léčiv v životním prostředí (Santos a kol., 2010).

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možný vliv paracetamolu ve formě léčivých přípravků (Paralen 500 tbl., Panadol tbl.) na životní prostředí porovnáním s analytickým standardem paracetamolu pomocí různých ekotoxikologických testů.

Nejvyšší testovaná koncentrace paracetamolu byla s ohledem na rozpustnost tablet zvolena 15,5 mmol/l (odpovídá 2341,67 mg/l).

Byly vybrány testy s ohledem na modelové organismy tří trofických úrovní.

Zástupcem destruentů byl pro diplomovou práci zvolen prvok *Tetrahymena pyriformis*. 24hodinový vícegenerační test sloužil ke zjištění subchronické toxicity. Testovaly se koncentrace v rozmezí 2341,67 mg/l - 146,35 mg/l. Nejvíce inhiboval růst nálevníka Paralen 500 tbl. V nejvyšší testované koncentraci způsobil 47,63% inhibici. Nejméně toxicky působil na prvoka standard paracetamolu. V nejvyšší testované koncentraci způsobil 30,31% inhibici.

Rychlý screeningový test Rapidtoxkit sloužil ke zjištění subletálního toxického stresu. Využíval zástupce konzumentů *Thamnocephalus platyurus* Packard. Testovaly se koncentrace v rozmezí 2341,67 mg/l – 73,18 mg/l. Pouze nejvyšší koncentrace standardu paracetamolu a přípravku Panadol tbl. měly vliv na korýše *Thamnocephalus platyurus*. Inhibice příjmu barviva byla v případě standardu paracetamolu 16,67 % a v případě přípravku Panadol tbl. 14,29 %. Paralen 500 tbl. korýše neovlivnil. Z testovaných organismů byl *Thamnocephalus platyurus* nejméně citlivý na působení paracetamolu. Inhibice příjmu barviva byla menší než 30 %, což řadí paracetamol k látkám potenciálně netoxickým.

Testem využívajícím zástupce producentů byl test inhibice klíčení semen *Sinapis alba* L. Testovaly se koncentrace v rozmezí 2341,67 mg/l – 36,59 mg/l. Nejvíce inhiboval růst kořene Panadol tbl., nejvyšší koncentrace způsobil 93,23% inhibici. Nejméně toxicky působil v téže koncentraci standard paracetamolu. Způsobil 89,67% inhibici růstu kořene.

Z hodnot získaných z testu na semenech *Sinapis alba* L. byly vypočítány hodnoty IC_{50} pro standard paracetamolu i léčivé přípravky Paralen 500 tbl. a Panadol tbl. a převedeny na jednotky toxicity TU. Nejvíce toxický je Panadol tbl. (0,0995 TU), poté Paralen 500 tbl. (0,0966 TU) a nejméně toxický je standard paracetamolu (0,0895 TU).

Standard paracetamolu, léčivé přípravky Paralen 500 tbl. a Panadol tbl. vykazují toxicitu menší než 0,4 TU a podle Persooneho a kol. (2003) se tak řadí k látkám třídy I, které nevykazují žádnou akutní toxicitu pro vodní prostředí.

System klasifikace toxicity dle Tseridise a kol. (2002) je řadí ke třídě 0, k látkám netoxickým.

6 Seznam literatury

An, J., Zhou, Q., Sun, F. a kol. (2009): Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Hazardous Materials*, 169, s. 751–757.

Ambrožová, J. (2003): Aplikovaná a technická hydrobiologie. 2. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, s. 226.

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

Bezpečnostní list Sigma-Aldrich, Acetaminophen, podle nařízení (ES) č. 1907/2006 Verze 3.0, 28.01.2010.

Bonnet, J.L., Bogaerts, P., Bohatier, J. (1999): Biological treatment of whey by *Tetrahymena pyriformis* and impact study on laboratory-scale wastewater lagoon process, *Chemosphere*, 38, s. 2979-2993.

Bound, J.P., Voulvoulis, N. (2006): Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment, *Water research*, 40, s. 2885–2892.

Carlsson, C., Johansson, A.-K., Alvan, G. a kol. (2006): Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients, *Science of the Total Environment*, 364, s. 67– 87.

Cleuvers, M. (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology Letters* 142, s. 185-194.

Český lékopis 2009, Pharmacopoea bohemica MMIX, Grada Publishing a.s., Praha, 2009, s. 3968.

Dias, N., Nicolau, A., Carvalho, G.S. a kol. (1999): Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants, *Journal of Basic Microbiology*, 39, s. 103-108.

Eggen, R.I.L., Suter, M.J.-F. (2007): Analytical Chemistry and Ecotoxicology—Tasks, Needs and Trends, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70, s. 724–726.

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

Gleiter, C.H. (1997): Paracetamol – das sichere Analgetikum, *Internist*, 38, s. 707–712.

Hajer, J. (1991): Vybrané kapitoly ze zoologie bezobratlých pro učitele – 2. díl, Pedagogická fakulta v Ústí n. L., s. 194.

Hartl, J., Palát, K. a kol. (1994): Farmaceutická chemie II., Univerzita Karlova v Praze - Karolinum, s. 152.

Hausmann, K., Hülsmann, N. (2003): Protozoologie, Academia Praha, s. 347.

Hejný, S., Slavík, B. a kol. (1992): Květena České republiky, Sv. 3, Academia Praha, s. 542.

Henschel, K.-P., Wenzel, A., Diedrich, M. a kol. (1997): Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 25, s. 220-225.

<http://biology.bard.edu/ferguson/>, [31. 3. 2010].

http://de.wikipedia.org/wiki/Senf_%28Gattung%29, [31. 3. 2010].

<http://eol.org/pages/61455>, [31. 3. 2010].

<http://www.baria.cz/uploaded/image/plast/corning-mikrodesticky.jpg>, [1. 4. 2010].

<http://www.oardc.ohio-state.edu/seedid/single.asp?strId=75>, [31. 3. 2010].

<http://www.progast.cz/druhy-koreni/?alpha=6>, [31. 3. 2010].

http://www.r-biopharm.com/product_site.php?language=french&product_id=4278,
[1. 4. 2010].

http://www.jysco.com/product/largeimage.php?it_id=1213691274&img=1213691274_11
[1. 4. 2010].

Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B. a kol. (2010): Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action, *Aquatic Toxicology*, 96, s. 167-181.

Jahodář, L. (2006): Farmakobotanika - semenné rostliny, Nakladatelství Karolinum, Praha, s. 258.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2008): The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK, *Water Research*, 42, s. 3498–3518.

Khetan, S. K., Collins, T. J. (2007): Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry, *Chemical Reviews*, 107, s. 2319-2364.

Kim, J.-W. a kol. (2009): Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*), *Journal of Toxicological Sciences*, 34, s. 227-232.

Kim, Y., Choi, K., Jung, J. a kol. (2007): Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environment International*, 33, s. 370–375.

Knight, D. J., Thomas, M. B. (2003): Practical Guide to Chemical Safety Testing, iSmithers Rapra Technology, s. 474.

Kočí, V., Halousková, O. (ed.) (2002): Ekotoxikologické biotesty 1, Sborník pracovní konference 18.-19. září 2002, Seč, Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s r.o., s. 187.

Kočí, V., Halousková, O. (ed.) (2003a): Ekotoxikologické biotesty 2, Sborník pracovní konference 3.-4. února 2003, Praha, Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s r.o., s. 139.

Kočí, V., Maršálek, B., Halousková, O. (ed.) (2003b): Ekotoxikologické biotesty 3, Sborník pracovní konference 22.-23. října 2003, Brno, Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s r.o., s. 191.

Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z. a kol. (2009): Léčiva – „nový“ environmentální polutant, *Chemické listy*, 103, s. 540-547.

Kulovaná, M., Kočí, V., Vosáhlová, S. (2009): Jak dál v hodnocení ekotoxicity odpadů, Odpadové fórum 2009, APROCHEM, s. 3358-3365.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2002): Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing, spol. s r.o., s. 694.

Lincová, D., Farghali, H. a kol. (2007): Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé, doplněné a přepracované vydání., Galén, Praha, s. 672.

Manusadzianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K. a kol. (2000): Microbiotests for the toxicity assessment of various types of water samples, *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, s. 391-399.

Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (2007), Ministerstvo životního prostředí České republiky, Odbor odpadů, Praha, s. 17.

Mills, G. A., Vrana, B., Allan, I. a kol. (2007): Trends in monitoring pharmaceuticals and personal-care products in the aquatic environment by use of passive sampling devices, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, s. 1153–1157.

Moiseenko, T.I. (2008): Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application, *Water Resources*, 35, s. 530–541.

Morrison, G.M., Rauch, S. (eds.) (2007): Highway and Urban Environment: Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium, Springer, s. 594.

Moser, H., Römbke, J. (2009): Ecotoxicological Characterization of Waste, Springer Science+Business Media, LLC, s. 308.

Mountassif, D. a kol. (2007): Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase, *Ecological Indicators*, 7, s. 882–894.

Návod do praktických cvičení z Monitorování životního prostředí, Testy toxicity se semeny (*Sinapis alba* L.).

Novák, J., Skalický, M. (2008): Botanika: cytologie, histologie, organologie, systematika, Vyd. 1., Praha: Powerprint, s. 327.

Onesios, K.M., Yu, J.T., Bouwer, E.J. (2009): Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review, *Biodegradation*, 20, s. 441-466.

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I. a kol. (2003): A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters, *Environmental Toxicology*, 18, s. 395-402.

Prokeš, J. a kol. (2005): Základy toxikologie, Obecná toxikologie a ekotoxikologie, Galén, Praha, s. 248.

Radhika, M., Christine de Walsche, Munuswamy, N. (1993): Structural and biochemical adaptation in the cryptobiotic cysts of *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca), *Cytobios*, 74, s. 59-64.

Ratte, H.T., Hammers-Wirtz, M., Cleuvers, M. (2003): Ecotoxicity testing, *Bioindicators and biomonitors*, 6, s. 221-226.

Richards, S.M., Cole, S.E. (2006): A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae, *Ecotoxicology*, 15, s. 647–656.

Roberts, P. H., Thomas, K. V. (2006): The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Science of the Total Environment*, 356, s. 143– 153.

Rovenský, J., Payer, J. (eds.) (2009): Dictionary of Rheumatology, Springer-Verlag/Wien, s. 230.

Říhová Ambrožová, J. (2006): Encyklopedie hydrobiologie, Praha: VŠCHT, Elektronická publikace, verze 1.0, 2006.

Santos, L.H.M.L.M, Araújo, A.N., Fachini, A. a kol.: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment (2010), *Journal of Hazardous Materials*, 175, s. 45–95.

Sauvant, M. P., Pepin, D., Piccinni, E. (1999): *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review., *Chemosphere*, 38, s. 1631-1669.

Sedlák, E. (2000): Zoologie bezobratlých, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, s. 336.

Sekutowski, T., Sadowski, J. (2009): Phytotoxkit™ microbiotest used in detecting herbicide residue in soil, *Environment Protection Engineering*, 35, s. 105 – 110.

Sládeček, V., Sládečková, A., Ambrožová, J. (1997): *Thamnocephalus platyurus* jako testovací organismus - Sbor. konf. "Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí", Chelčice, s. 96-99.

SPC Panadol tbl., Mikro-verze AISLP – ČR 2010.1, stav k 1.1.2010.

SPC Paralen 500 tbl., Mikro-verze AISLP – ČR 2010.1, stav k 1.1.2010.

Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T. a kol. (2007): Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds, *Science of the Total Environment*, 377, s. 255–272.

Standardní operační manuál Protoxkit™, MicroBioTests Inc.

Standardní operační manuál Rapidtoxkit™, MicroBioTests Inc.

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L. P. a kol. (2000): Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use, *Chemosphere*, 40, s. 783-793.

Suzuki, O., Watanabe, K. (2005): *Drugs and Poisons in Humans. A Handbook of Practical Analysis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 672.

Törökne, A. (2006): Comparison of the 1 hour and the 24 hour toxicity tests with *Thamnocephalus platyurus* larvae on environmental and spiked samples, *Fresenius Environmental Bulletin*, 15, s. 1076 – 1080.

Tsiridis, V., Persoone, G. (2002): Toxkit microbiotests: New low cost tools for hazard detection/monitoring in environmental toxicology, *Protection and Restoration of the Environment VI*, July 1-5, s. 809-816.

Vyhláška č. 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů. Sbírka zákonů 2001, částka 143 (2001).

Vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí. Sbírka zákonů 2004, částka 73 (2004).

Vyhláška č. 223/2004 Sb., kterou se stanoví bližší podmínky hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí. Sbírka zákonů 2004, částka 73 (2004).

Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků. Sbírka zákonů 2004, částka 76 (2004).

Vyhláška č. 257/2009 Sb., o používání sedimentů na zemědělské půdě. Sbírka zákonů 2009, částka 77 (2009).

Wadhia, K., Clive Thompson, K. (2007): Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive, *Trends in Analytical Chemistry*, 26, s. 300-307.

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

Zákon č. 17/1992 Sb., o životním prostředí. Sbírka zákonů 1992, částka 4 (1992).

Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů. Sbírka 2003, částka 120 (2003).

Zilberg, D., Sinai, T. (2006): Optimization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. survival, *Research in Microbiology*, 157, s. 355-359.

Zukalová, H., Cihlář, P., Vašák, J. (2006): Kvalita olejin – II. hořčice bílá, sareptská. Mák, makovina., Sborník z konference „Prosperující olejniny“, 13.-14.12.2006, ČZU v Praze, s. 105-109.

Abstrakt (CZ)

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor diplomové práce: Petra Janečková
Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová
Název diplomové práce:

Ekotoxikologický screening léčiv – Paralen tbl. a Panadol tbl.

Paracetamol patří k velmi často používaným léčivým látkám ze skupiny analgetik-antipyretik. V této diplomové práci byl hodnocen vliv paracetamolu obsaženého v léčivých přípravcích Paralen 500 tbl. a Panadol tbl. a analytického standardu paracetamolu na životní prostředí. Byly vybrány tři ekotoxikologické testy a zástupci tří trofických úrovní organismů, a to vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena pyriformis* Ehr., rychlý screeningový test Rapidtoxkit™ s korýšem *Thamnocephalus platyurus* Packard a test inhibice klíčení semen *Sinapis alba* L.

Nejvyšší testovaná koncentrace paracetamolu byla 2341,67 mg/l.

V testech se hodnotila inhibice růstu prvoka, inhibice příjmu potravy korýšem a inhibice klíčení semen vyšší rostliny. Nejcitlivějším organismem byl producent *Sinapis alba* L., nejméně citlivým konzument *Thamnocephalus platyurus* Packard.

Z výsledků testu se *Sinapis alba* L. byly vypočítány hodnoty IC₅₀. Paracetamol i léčivé přípravky Paralen 500 tbl. a Panadol tbl. byly zařazeny k látkám, které nevykazují akutní toxicitu k životnímu prostředí.

Klíčová slova: ekotoxicita, paracetamol, *Tetrahymena pyriformis*, *Thamnocephalus platyurus*, *Sinapis alba*.

Abstrakt (EN)

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Petra Janečková
Consultant: Mgr. Jitka Vytlačilová
Title of thesis/dissertation:

Ecotoxicological screening of the medicaments – Paralen tbl. and Panadol tbl.

Paracetamol is an often-used medicinal substance from the group of analgetics-antipyretics. This thesis evaluates the influence of paracetamol contained in pharmaceuticals Paralen 500 tbl. and Panadol tbl., and of the paracetamol analytical standard on the environment. Three ecotoxicological tests and representatives of three trophic-level organisms were selected: a multi-generational test with the protozoan *Tetrahymena pyriformis* Ehr., a rapid screening test Rapidtoxkit™ with the crustacean *Thamnocephalus platyurus* Packard and an inhibition test of the germination of *Sinapis alba* L. seeds.

The highest tested concentration of paracetamol was 2341,67 mg/l.

The tests evaluated the inhibition of the protozoan's growth; the inhibition of the crustacean's food intake, and the inhibition of seed germination in higher plants. The most sensitive organism was the producer of *Sinapis alba* L., the least sensitive was the consumer *Thamnocephalus platyurus* Packard.

The values of IC₅₀ were calculated based on the results of the *Sinapis alba* L. test. Paracetamol, as well as the pharmaceuticals Paralen 500 tbl. and Panadol tbl. were classified as substances that do not show acute toxicity to the environment.

Key words: ecotoxicity, paracetamol, *Tetrahymena pyriformis*, *Thamnocephalus platyurus*, *Sinapis alba*.