

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**

(diplomová práce)

**Ekotoxikologické hodnocení nesteroidního a protizánětlivého léčiva**  
**Ecotoxicological evaluation of the non-steroidal and anti-inflammatory drug**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.**

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

**Hradec Králové 2011**

**Veronika Horáková**

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

5. května 2011

Veronika Horáková

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

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického školského výzkumu 263 002: Studium biologicky aktivních látek perspektivních v prevenci a léčbě civilizačních onemocnění.

## Obsah

1. ÚVOD .....	6
1.1. Historie léčiv, NSAID .....	6
1.2. Cíl práce.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. Ekotoxikologie, ekotoxikologické testy .....	9
2.1.1. Léčiva a životní prostředí .....	10
2.1.2. Experimentální design testů toxicity .....	11
2.1.3. Vyhodnocení výsledků.....	13
2.1.4. Faktory ovlivňující toxicitu látek .....	13
2.1.5. Standardizace.....	14
2.1.6. Testy ekotoxicity a legislativa .....	15
2.2. Nesteroidní antiflogistika (NSAID) .....	16
2.2.1. Zánět .....	16
2.2.2. NSAID.....	16
2.3. Diklofenak .....	18
2.3.1. Farmakologie, farmakokinetika, farmakodynamika .....	18
2.3.2. Diclofenac AL 50.....	21
2.3.3. Spotřeba léčiv obsahujících diklofenak v České republice .....	22
2.3.4. Diklofenak a životní prostředí.....	23
2.4. Testované organismy .....	25
2.4.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> , Nanney& McCoy.....	25
2.4.2. <i>Thamnocephalus platyurus</i> , Packard.....	27
2.4.3. <i>Brachionus calyciflorus</i> , Pallas .....	29
2.4.4. <i>Sinapis alba</i> , L.....	31
2.5. Použité testy - princip .....	34
2.5.1. Vícegenerační test s organismem <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	34
2.5.2. THAMNOTOXKIT F <sup>TM</sup> .....	34

2.5.3.	ROTOXKIT F CHRONIC.....	35
2.5.4.	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i> .....	35
3.	METODIKA .....	36
3.1.	Materiály .....	36
3.1.1.	Použité chemikálie .....	36
3.1.2.	Použité pomůcky.....	37
3.1.3.	Použité přístroje.....	38
3.1.4.	Provedení testů.....	38
3.2.	Pracovní postup.....	39
3.2.1.	Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	39
3.2.2.	THAMNOTOXKIT F™.....	40
3.2.3.	ROTOXKIT F CHRONIC.....	41
3.2.4.	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i> .....	43
4.	VÝSLEDKY .....	45
4.1.	Vícegenerační test s prvokem <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	45
4.2.	THAMNOTOXKIT F™ .....	48
4.3.	ROTOXKIT F CHRONIC.....	50
4.4.	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i> .....	54
5.	DISKUZE .....	56
6.	ZÁVĚR .....	59
7.	SEZNAM LITERATURY.....	61

Abstrakt

# 1. ÚVOD

## 1.1. Historie léčiv, NSAID

Udržení nebo znovuzískání lidského zdraví nutilo lidstvo od nepaměti hledat a používat různé prostředky s předpokládaným léčivým účinkem. Jejich zdroje a charakter se postupně měnily v souladu se snahou po přizpůsobování okolní přírody lidským potřebám a v závislosti na pokroku lidského poznání přírody. Nejstarším a nejdelším vývojovým úsekem je etapa přírodních léčiv založená na empirii lidového léčitelství, kde byly prvotní poznatky získávány při obstarávání potravy. V období renesance (15. – 16. století) převládala alchymie a chemiatrie (předchůdce dnešní farmaceutické chemie), které vycházely z předpokladu, že látky chemického charakteru jsou jako léčiva rovnocenné látkám přírodního původu. Chemiatrie v 17. a 18. století byla v některých laboratořích zaváděna k výukovým účelům vysokých škol a postupně se některé přetvářely na první farmaceutické manufaktury. Do poloviny 19. století farmaceutická chemie zahrnovala v rozhodující míře anorganické sloučeniny. Poté nastal zlom a začaly se izolovat sloučeniny s organickými molekulami. Zásadní byla syntéza kyseliny močové z kyanatanu sodného v roce 1828, které odstartovala vývoj organických sloučenin [1].

Ke konci 19. století byla synteticky připravena kyselina salicylová z fenolu, která po své acetylaci vedla k přípravě kyseliny acetylsalicylové, jež byla v roce 1899 uvedena do praktického použití pod názvem ASPIRIN - antipyretikum, analgetikum, antiflogistikum [2].

Během druhé světové války a v poválečné době nastalo svým způsobem zlaté období ve vývoji nových léčiv. V této době se začínala zvyšovat pozornost podrobnému průzkumu biochemických pochodů, fyzikálně-chemických vlastností léčiv a vývoji tzv. prekurzorů. Nová léčiva v poválečném období podstatně změnila celou situaci v terapii. S vyšší účinností se zvýšilo riziko vedlejších škodlivých reakcí. Toto vedlo k povinné dokumentaci celého výzkumu a vývoji jednotlivých léčiv, která se stávala mnohem detailnější a obsáhlejší. Díky této dokumentaci a důslednějším zkoušením léčiv se zvyšovaly náklady na vývoj nových léčiv.

Zatímco v roce 1970 se odhadovaly náklady asi na 50 miliónů dolarů, v roce 2000 to bylo již kolem miliardy dolarů. Také se značně protáhla doba od přípravy léčiva po schválení dokumentace. V dnešní době se tato doba může pohybovat až kolem 14 let [1].

V roce 1952 bylo vyrobeno druhé antiflogistikum fenylbutazon. V šedesátých letech přibyl indometacin a ibuprofen, který měl ve srovnání s předchozími látkami podstatně lepší snášenlivost. V sedmdesátých letech byl do praxe uveden diklofenak, další dodnes velmi oblíbené antirevmatikum, a naproxen. Prvním antirevmatikem s dlouhým biologickým poločasem byl piroxikam, zajišťující účinnost po celých 24 hodin při jedné denní dávce. Devadesátá léta přinesla zcela novou generaci NSAID tzv. selektivní inhibitory cyklooxygenázy II, vyznačující se prakticky absencí gastrointestinálních nežádoucích účinků [2].

## 1.2. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit možný vliv diklofenaku na životní prostředí použitím akutních a chronických testů toxicity. Použit byl léčivý přípravek Diclofenac AL 50 ve srovnání se standardem diklofenaku.

Experimentálně byl tento vliv ověřován na organismech – zástupcích jednotlivých trofických úrovní. Konkrétně byli použiti - *Tetrahymena thermophila* (Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*), *Thamnocephalus platyurus* (THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>), *Brachionus calyciflorus* (ROTOXKIT F CHRONIC) a semena *Sinapis alba* (Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*).



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Tato kapitola je zaměřena na zpracování údajů o ekotoxikologii a ekotoxikologických testech obecně, dále o nesteroidních antiflogisticích, o jednotlivých testech a používaných organismech.

### 2.1. Ekotoxikologie, ekotoxikologické testy

Ekotoxikologie je vědní disciplína, která se zabývá studiem toxického působení látek lidského či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Kromě sledování účinků látek na živé systémy je předmětem ekotoxikologické práce i monitoring toxických látek v životním prostředí [3].

Původní definice ekotoxikologie je přisuzována Truthautovi (1977), který ekotoxikologii definoval jako odvětví toxikologie zabývající se studiem toxických účinků způsobených přírodními nebo syntetickými polutanty na jednotlivé prvky ekosystému, zvířata, lidi, rostliny a mikroorganismy [4].

Hlavním cílem ekotoxikologie je poznání interakcí mezi živými organismy a chemickými látkami přítomnými v prostředí na všech úrovních biologické organizace s cílem využít tyto poznatky pro účelnou ochranu živých organismů, jejich populací, společenstvech a ekosystémů před chemickým znečištěním [3].

Nástrojem ekotoxikologie jsou ekotoxikologické biotesty. Ekotoxikologické biotesty jsou experimenty s živými organismy, na nichž pozorujeme, zda bude daná látka působit toxicky. Testy probíhají ze přesně definovaných podmínek (jsou standardizovány). Můžeme je rozdělit na nespecifické, tzn. ty, které se zabývají celkovými toxickými účinky všech látek přítomných v testovaném vzorku, nebo specifické, které prokazují přítomnost určité chemické látky nebo konkrétní toxický účinek. Dále můžeme biotesty dělit na ty, které jsou prováděny v krátkém časovém intervalu (tzv. akutní testy) a u kterých jsou zkoumány především kvalitativní parametry (mortalita, imobilita) a na ty, které jsou prováděny v delším časovém úseku.

Takové nazýváme chronické testy a je u nich hodnocena především reprodukce a jiné fyziologické procesy (vliv na růst organismu, genetické změny). Tyto testy zahrnují více životních stadií organismu či více generací [5].

Další dělení [3, 6] může být podle:

- cílového ekosystému (sladkovodní, půdní, mořské, sedimenty)
- trofické úrovně testovaného organismu (producenti, konzumenti, destruenti)
- složitosti testovaného vzorku
- sledované odpovědi (letální účinky, reprodukční aktivita)
- pokročilosti designu testovacího systému (1., 2. a 3. generace)
- jiné

Odhad, zda zkoumaná látka představuje riziko pro životní prostředí, je založen na srovnání hodnot PEC (předpokládaná koncentrace v životním prostředí) a PNEC (předpokládaná neškodná koncentrace). Je-li poměr PEC a PNEC menší než 1, je riziko způsobené přítomností látky v prostředí nízké [6].

### 2.1.1. Léčiva a životní prostředí

Léčiva obecně se používají k prevenci, diagnostice a léčbě nemocí u lidí i zvířat. Celosvětový průměr spotřeby léčiv se neustále zvyšuje. Většina z těchto léčiv není v těle zcela zmetabolizována na neaktivní metabolity a je vylučována močí nebo stolicí z těla ven a následně vstupuje do životního prostředí. V současné době už máme technologie, které mohou detekovat kontaminanty v koncentracích ng/l.

Ke kontaminaci životního prostředí léčivy přispívá i fakt, že velké množství obyvatel nevrací již nepoužitelná léčiva do lékáren k odborné likvidaci, ale odstraňují je sami vhozením do komunálního odpadu nebo spláchnutím do umyvadla nebo do záchodové mísy [7].

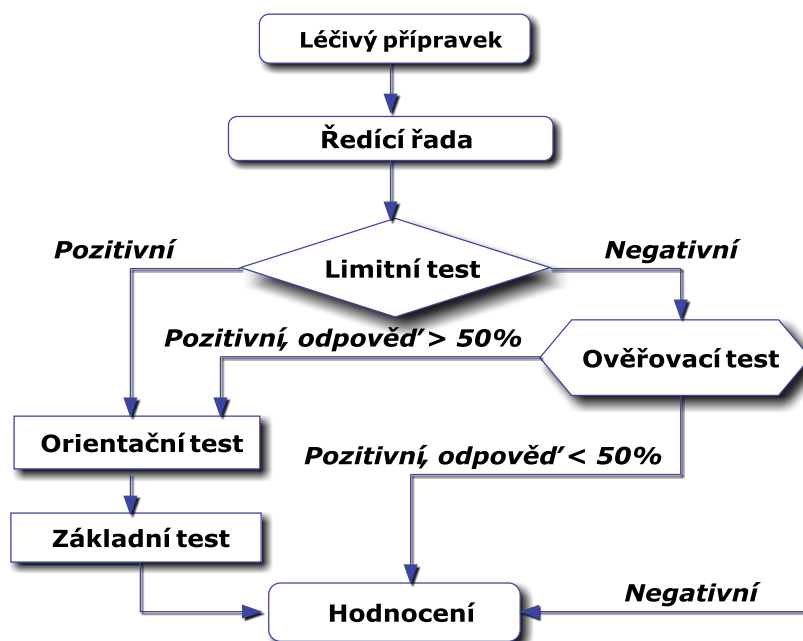
### 2.1.2. Experimentální design testů toxicity

Každý experiment musí být prováděn určitým způsobem, který vede k předem vytčenému cíli. U ekotoxikologických testů je sledovaným cílem odpověď na určitou otázku, obvykle na míru toxických účinků látky či vzorku na živé organismy.

Toxicita látek může být podstatně ovlivněna mnoha faktory (viz. kapitola Faktory ovlivňující ekotoxikologické biotesty), proto je nutné na začátku experimentu jasně definovat, za jakých podmínek bude test prováděn. Nejprve je nutné zvolit pro testování na živém organismu vhodného zástupce. Poté je potřeba připravit ředící řadu testovaného léčiva a jeho standardu.

Obecné provedení testu ekotoxicity je znázorněno ve schématu č. 1.

Schéma č. 1: Obecné provedení testu ekotoxicity – modifikováno [3]



Po přípravě ředící řady proběhne tzv. limitní test, jehož cílem je zjistit, zda vzorek vykazuje toxické účinky či nikoli. Je-li limitní test vyhodnocen jako negativní, bude následovat test ověřovací. V opačném případě bude-li test vyhodnocen jako pozitivní, bude následovat test orientační.

Ověřovací test je znovupřeměřením předchozího testu s více nasazením. Pokud i tento test vyjde jako negativní, bude následovat jeho zhodnocení. Vyjde-li ovšem jako pozitivní a bude-li míra sledované odpovědi nižší než 50%, pak již bude následovat vyhodnocení. Bude-li však míra vyšší než 50%, bude následovat test orientační, jehož úkolem je zjistit rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu  $EC_{50}$  testované látky.

Tzv. základní test slouží k vlastnímu určení  $EC_{50}$  ( $LC_{50}$ ). Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěné v orientačních testech. Po určité době expozice se odečítá počet organismů, jež vykazaly odpověď na expozici testovanému vzorku. Ze zjištěných údajů se spočítá hodnota  $EC_{50}$  ( $LC_{50}$ ).

### 2.1.3. Vyhodnocení výsledků

Po získání dat ze základního testu se vypočítají potřebné parametry jako  $EC_{50}$  (střední účinná koncentrace která představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% úhyn či 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku). Výsledky z jednotlivých testů se poté porovnávají s výsledky pro jiné organizmy.

### 2.1.4. Faktory ovlivňující toxicitu látek

Toxicita látky je její neměnná vlastnost. Z farmakologických předmětů je zřejmé, že toxicita závisí na dávce léčivé látky (tzn., že látka v určité koncentraci působí léčivými účinky, v koncentraci vyšší pak účinky toxickými pro organismus). Přesto je možno ji v určitém smyslu ovlivňovat různými faktory [3]:

- chemicko-fyzikální faktory: koncentrace, rozpustnost, struktura látky
- doba a způsob expozice
- environmentální faktory: teplota, vlhkost, intenzita světla
- interakce mezi jednotlivými toxickými látkami
- biologické faktory: pohlaví, stáří, zdravotní stav, genetická proměnlivost
- faktory výživy

### 2.1.5. Standardizace

Ekotoxikologické biotesty jsou používány v legální kontrole chemikálií a kvalitativním hodnocení odpadních vod. Tyto biotesty musí poskytovat přibližně stejné výsledky, ať už jsou prováděny v různých laboratořích, nebo ve stejné laboratoři v jiný čas, tj. výsledky všech testů musí být reprodukovatelné a opakovatelné. K dosažení vysoké opakovatelnosti a reprodukovatelnosti potřebují být podmínky testů striktně řízeny. Od 80. let vyvíjí různé organizace (například OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development, CEN - The European Committee for Standardization, ISO - International Organization for Standardization, US EPA - The U.S. Environmental Protection Agency) pokyny pro příslušné biotesty za účelem standardizace zkušebních a hodnotících metod. V současné době jsou v platnosti v České republice ČSN (Česká státní norma), ale současně jsou platné nově přijímané normy, které jsme jako členové OECD přejali [5, 6, 8].

Pokud bude biotest opakován několikrát nebo bude prováděn ve stejný čas, ale na různých místech (v různých laboratořích), výsledky nebudou nikdy naprosto stejné, a to díky biologické různorodosti testovaných organismů (genetická výbava) a díky vlivům životního prostředí. Genetickou variabilitu můžeme eliminovat tak, že použijeme například organismus *Daphnia magna*, který se množí partenogenezí, tzn., že produkuje geneticky identické potomky. Přesto musíme brát v úvahu, že mohou být různé genotypy těchto organismů, což by znamenalo, že různé genotypy jsou jinak tolerantní vůči toxinům. Variabilita životního prostředí může být redukována striktním dodržováním podmínek daného prostředí. Některé environmentální podmínky mohou být snadno kontrolovány - jako teplota, osvětlení, vlhkost. Ale jiné nikoli, především dodávky potravy ve stejné kvalitě, kterou je obtížné kontrolovat a která může mít velký dopad na vývoj testovaného organismu [5].

## 2.1.6. Testy ekotoxicity a legislativa

V právních předpisech týkajících se kontaminace životního prostředí existují určité mezery. Ty pravděpodobně vznikají proto, že nejsou dostupné dostačující údaje pro kvantifikaci přesného profilu znečištění. Chybí i hojné průkazné studie o chronické toxicitě, takže nelze odvodit rizika dlouhodobé expozice léčiv a jejich metabolitů na faunu a flóru. Proto byly připraveny zákony, které vyžadují posouzení rizik léčiva pro životní prostředí jako součást registrace nového léčiva. EU vydala potřebné směrnice k posouzení rizik léčiv v rámci registračního řízení, jejíž pravidla jsou stanovena EMEA (Evropská agentura pro léčivé přípravky) [9].

Nejdůležitějšími dvěma zákony v ČR, kde je ekotoxicita zmiňována jako nebezpečná vlastnost, jsou Zákon o odpadech (Zákon č. 185/2001 S.) a Zákon o chemických látkách (Zákon č. 157/1998 Sb.) s příslušnými prováděcími předpisy.

Mezi další právní předpisy zabývající se ekotoxicitou jsou [6]:

- Zákon o léčivech 378/2007 Sb.
- Vyhláška MŽP a ministerstva zdravotnictví 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů
- Vyhláška MŽP 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady
- Vyhláška MŽP 382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě
- Vyhláška MŽP 306/1998 Sb., kterou se stanoví postup hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí
- Směrnice EU 93/67/EHS, kterou se stanoví zásady posuzování rizik pro člověka a životní prostředí u látek oznámených v souladu se směrnicí Rady 67/548/EHS
- další předpisy

## 2.2. Nesteroidní antiflogistika (NSAID)

### 2.2.1. Zánět

Zánět je nejstarší obranný mechanismus organismu, který může být vyvolán různými podněty. Jsou to například faktory: mechanické (odřeniny), fyzikální (popáleniny), chemické (žíraviny), nutriční (hypoxie), biologické (bakterie). Lokální zánět se projevuje zčervenáním (*rubor*), otokem (*tumor*), bolestivostí (*dolor*), zvýšením místní teploty (*calor*) a poškozením funkce (*functio laesa*). Systémový zánět je doprovázen horečkou, může vyústit až do zhroucení organismu a k smrti [10, 11].

Hlavními mediátory zánětu jsou histamin, serotonin, kininy, prostaglandiny, leukotrieny.

Cílem protizánětlivých látek je potlačit nepřiměřenou, neúčelnou reakci organismu na zánětlivý podnět, zabránit rozvoji zánětlivých změn bez ovlivnění nebo s minimálním ovlivněním fyziologických funkcí [10].

### 2.2.2. NSAID

Nesteroidní antiflogistika patří mezi jedny z nejpoužívanějších léčiv. Jsou to látky různé chemické struktury, ale stejného mechanismu účinku a podobných nežádoucích účinků. Jedná se o látky, které mají antiflogistický, analgetický, antipyretický a antitrombický účinek [2].

Základním mechanismem účinku NSAID je inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX), který řídí přeměnu kyseliny arachidonové na prostanoidy - prostaglandiny a tromboxany (prostaglandiny se podílejí na vzniku a rozvoji zánětu - vazodilatace, zvýšená permeabilita cév; tromboxany mají vazokonstrikční účinek a stimulují agregaci krevních destiček) [10].



Existují dva typy toho enzymu: COX-1 a COX-2. COX-1 je tzv. konstitutivní. Její funkcí je syntéza prostaglandinů, které převážně tvoří ochranu žaludeční sliznice a které pomáhají agregaci trombocytů. COX-2 je tzv. inducibilní, což znamená, že její koncentrace se zvyšuje ve tkáních, ve kterých probíhá zánět. Vyvolává bolest, horečku a další projevy zánětu. Z výše uvedeného vyplývá, že antiflogistika by měla převážně inhibovat COX-2 při minimální inhibici COX-1 [12].

Podle míry inhibice COX-1 a COX-2 můžeme NSAID rozdělit do několika skupin.

Tabulka č. 1: Rozdělení NSAID [12]

Skupina		Látka	Poznámka	
I.	COX-1 selektivní	aspirin	malé dávky → selekt. Inh. TXA <sub>2</sub>	
II.	COX-2 neselektivní	aspirin	vysoké dávky → poškození GITu a ledvin	
	II.a	vyšší afinita k COX 1	indometacin, piroxikam	velmi toxická- poškození ledvin a GITu
	II.b	vyšší afinita k COX-2	ibuprofen, diklofenak, naproxen	vyšší af. ke COX-2, nižší ke COX-1 → OTC
III.	COX-2 preferenční	nimesulid, meloxicam	v doporučených dávkách minimální NÚ	
IV.	COX-2 selektivní	celecoxib, rofekoxib		

Nesteroidní antiflogistika působí proti bolesti, zánětu a horečce. Využívají se k symptomatickému potlačení bolesti periferním mechanismem a částečně i ovlivněním vnímání bolesti v CNS. Nepůsobí na viscerální bolest. NSAID zasahují do akutní fáze zánětu, jsou to látky první volby v terapii revmatických onemocnění. Řada z nich má i antiagregační účinky, terapeuticky využitelné jen u kyseliny acetylsalicylové [8, 13].

NSAID se podávají perorálně, rektálně, parenterálně a lokálně. Po perorálním podání se dobře vstřebávají z trávicího ústrojí. Vazba na bílkoviny je velmi vysoká a může být příčinou klinicky významných lékových interakcí. Dobře pronikají do tkání a tělesných tekutin, prostupují hematoencefalickou bariérou a většinou i bariérou placentární. V játrech dochází k intenzivní biotransformaci a většina podané látky je vylučována jako neaktivní metabolit močí nebo stolicí [8, 13].

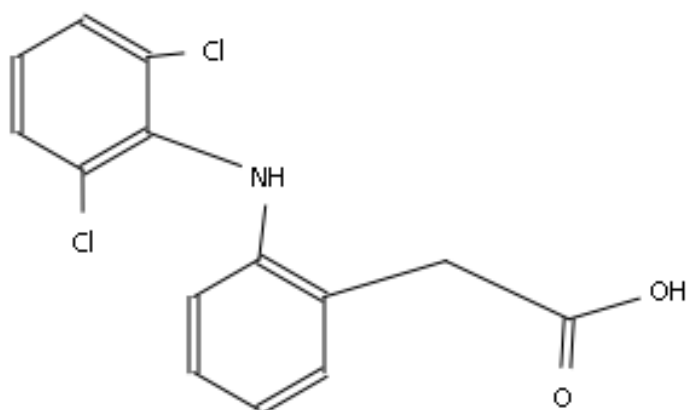
Indikace NSAID jsou v současné době velmi široké a asi neexistuje lékařský klinický obor, který by NSAID nevyužíval. Základní indikací jsou muskuloskeletální choroby, zejména zánětlivá revmatická onemocnění, degenerativní kloubní choroby, akutní i chronické vertebrogenní syndromy a traumata. Antiflogistické působení je využíváno i v léčbě zánětů jiného původu, např. u zánětu žil, adnexitid, apod. Analgetický účinek NSAID je využíván v léčbě bolesti nejrůznějšího původu v monoterapii či kombinaci s jinými analgetiky v chirurgii, stomatologii, onkologii, atd. [2].

Mezi nežádoucí účinky NSAID patří často zažívací problémy a léze žaludeční sliznice - tzv. NSAID gastropatie (díky inhibici COX-1). Dále se mohou vyskytovat poruchy ledvinných funkcí (retence tekutin, hyperkalémie), poruchy krvetvorby (prodloužené krvácení), hepatopatie, různé alergické reakce (urtikaria, rýma), bronchospasmus aj. Z nežádoucích účinků vyplývají i kontraindikace NSAID - přecitlivělost, gastropatie, krvácivé stavy, snížená funkce ledvin, astma, těhotenství [2].

## 2.3. Diklofenak

### 2.3.1 Farmakologie, farmakokinetika, farmakodynamika

Diklofenak je léčivo patřící do skupiny II.b nesteroidních antiflogistik. Po chemické stránce je to kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]benzenoctová [14].



Diklofenak je velmi často užívanou látkou. Je silně účinný a podává se v nízkých dávkách. Je to nesteroidní antirevmatikum, antiflogistikum s velmi dobrým analgetickým, protizánětlivým, antipyretickým i antiuratickým účinkem.

Biologická dostupnost perorálně podaného diklofenaku je pro značný efekt prvního průchodu játry jen asi 50%. Vazba na plazmatické bílkoviny je vysoká, přesahuje 99%. Diklofenak se metabolizuje v játrech především hydroxylací a konjugací.

Inaktivní metabolity jsou asi z 30% vylučovány stolicí a z 70% renálně. Pouze 1 - 5% podaného léčiva se vylučuje v nezměněné formě. Plazmatický poločas eliminace diklofenaku je asi 2 hodiny, ale v synoviální tekutině se prodlužuje až na 6 hodin. Nežádoucí účinky se vyskytují asi u 10 až 20% léčených a jsou spíše mírné: bolesti hlavy, nespavost, podrážděnost, gastrointestinální poruchy, exantémy, fotosenzitivita, častěji než po jiných nesteroidních protizánětlivých látkách se může vyskytnout vzestup sérových aminotransferas. Pro perorální použití je dostupný jak v retardovaných formách umožňujících podávání jednou denně, tak v lékových formách s rychlým nástupem účinku. Lze tedy volit délku a nástup účinku podle potřeb pacienta. Dobře potlačuje bolest projevující se u kloubního revmatismu a dny [10, 15].

Je vhodný i při akutních svalových bolestech a u bolestí hlavy, pooperačních bolestí, v gynekologii, u nádorových bolestí a dalších. Celkové podání je možné doplnit lokální léčbou (masti, gely). Lokálně se diklofenak používá i v očním lékařství [8, 13].

Používá se ve formě sodné nebo draselné soli.

Tabulka č. 2: Přípravky obsahující diklofenak a jejich lékové formy, které se v současnosti vyskytují na českém trhu [16]

Almiral	INJ SOL, POR TBL FLM, DRM GEL
Apo-diclo	POR TBL ENT
Diclofen	POR TBL FLM
Diclofenak	POR TBL FLM, POR CPS RDR, DRM GEL
Dicloream	INJ DOL, RCT SUP, POR TBL ENT, POR TBL PRO
Diky	DRM SPR SOL
Dolmina	POR TBL PRO, POR TBL FLM, DRM GEL, INJ SOL
Dorosan	SRM SPM
Flector	DRM GEL, POR GRA, DRM EMP TDR
Monoflam	POR TBL ENT, RET SUP, POR CPS RDR, INJ SOL
Myogit	POR TBL ENT
Olfen	DRM GEL, CPS RET, POR TBL ENT, INJ SOL
Uniclophon	OPT GTT
Uno	POR TBL RET, DRM EMP MED
Veral	POR TBL ENT, INJ SOL, DRM GEL
Voltaren	INJ SOL, POR TBL FLM, POR TBL PRO, POR TBL ENT, POR TBL OBD, DRM GEL, OPT GTT SOL, POR CPS MOL, POR PLV SOL

### 2.3.2. Diclofenac AL 50

- 1) složení: diclofenacum natricum 50 mg v 1 potahované tbl s acidoresistentní vrstvou
- 2) indikace: akutní artritidy, včetně dnavé artritidy; chronické artritidy, zejména revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida a jiné zánětlivě revmatické nemoce páteře, artrózy, spondylartrózy, mimokloubní revmatismus, bolestivé pouřazové nebo pooperační otoky nebo záněty
- 3) dávkování a způsob použití: u dospělých obvykle nepřekračujeme celkovou denní dávku 150 mg, u mladistvých (nad 15 let) se celková denní dávka 1-2 mg/kg tělesné hmotnosti podá v 1-3 jednotlivých dávkách; časový odstup mezi jednotlivými dávkami nesmí být kratší než 4 hodiny; užívání tablet po jídle může zpomalit vstřebávání účinné látky
- 4) kontraindikace: známá přecitlivělost na diklofenak nebo na pomocné látky, neobjasněné poruchy krvetvorby, peptický vřed žaludku a duodena, poslední trimestr gravidity
- 5) lékové interakce: může dojít ke zvýšení hladiny a účinku digoxinu a solí lithia; naproti tomu může snížit účinek močopudných látek; mohou být zesíleny některé nežádoucí účinky současně podávaných léků: pak může docházet k nadměrné zadržování draslíku v těle při užívání močopudných prostředků šetřících draslík, může být zvýšeno riziko krvácení ze žaludku a střev při současném podávání hormonů kůry nadledvin a jiných protizánětlivých látek, a mohou být zvýšeny nežádoucí účinky methotrexátu
- 6) nežádoucí účinky: účinky na gastrointestinální trakt - nauzea, anorexie, pálení žáhy, bolesti v epigastriu, zvracení, průjem, zácpa; drobné krvácení do GIT může ve výjimečných případech vést k anemii; mohou se vyskytnout žaludeční nebo duodenální vředy, které mohou krváčet a vzácně dochází i k jejich perforaci [15]

### 2.3.3. Spotřeba léčiv obsahujících diklofenak v České republice

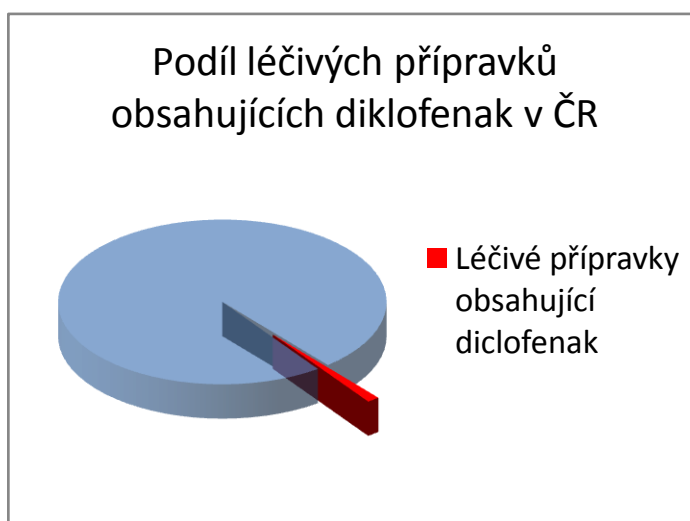
Ve čtvrtém čtvrtletí roku 2009 byla spotřeba léčiv obsahujících diklofenak 964 093 balení léčivých přípravků. Podrobněji viz. tabulka č. 3 [17].

Tabulka č. 3: Spotřeba léčiv obsahujících diklofenak, 4. čtvrtletí 2009

způsob podání	počet balení	finanční vyjádření (Kč)	počet DDD celkem	DDD/1000obyv/den
Parent. podání	114218	6356777	463577	0,48534
Perorální podání	472727	47948404	9466315	9,91068
Rektální podání	9986	879273	77650	0,08130
Kožní podání	360759	47316900	0	0,00000
Oční podání	6403	1024318	0	0,00000

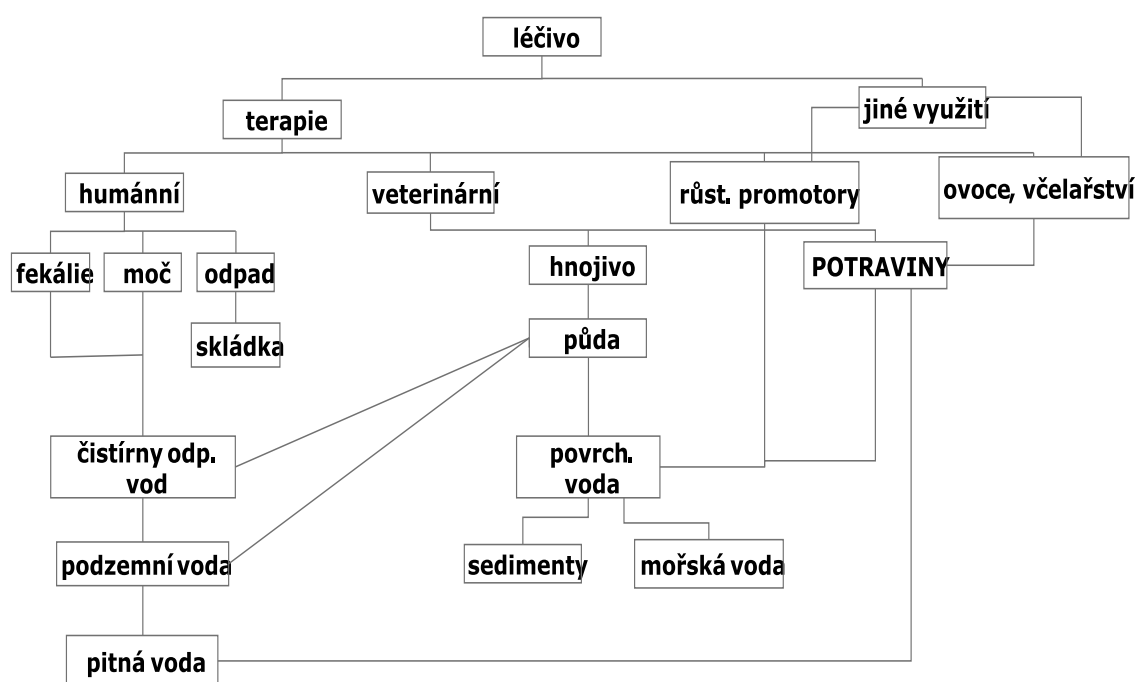
Podíl léčivých přípravků obsahující diklofenak v České republice byl ve třetím čtvrtletí roku 2009 cca 1,237% z celkového množství všech léčivých přípravků na českém trhu (vypočteno z údajů zveřejněných SÚKLEM). Názorně viz. schéma č.3 [17].

Schéma č. 2: Podíl léčivých přípravků obsahujících diklofenak v ČR [17]



### 2.3.4. Diklofenak a životní prostředí

Schéma č. 3: Možnosti toho, jak se léčivo dostává do životního prostředí [18, 19]



Diklofenak, jak bylo již zmíněno, se vylučuje převážně močí v podobě svých metabolitů, ale 1 - 5% se vylučuje v nezměněné formě.

Obecně nesteroidní antiflogistika patří k jedněm z nejpoužívanějších skupin léčiv nejen v České republice, ale i na celém světě, s odhadovanou roční spotřebou několika kilotun. To je řadí na šesté místo nejprodávanějších léků. Kromě toho jsou mnohé z nich dostupné i bez lékařského předpisu, což jejich spotřebu značně zvyšuje. V důsledku toho dosahují tyto látky vysokých koncentrací i v životním prostředí, hlavně pak ve vodním prostředí (viz. schéma č.1) [19, 20].

Příklady ekotoxicity diklofenaku je mnoho. Pro názornost je uvedena ekotoxicita prokázaná u vodních živočichů, například u mušlí Baltského moře, kde byl doložen negativní vliv léčiva jak na pevnost schránek mušlí, tak na fyziologické změny těchto živočichů (snížený metabolismus, snížený růst). Ze sladkovodních živočichů například u pstruha obecného dochází k poškození ledvin a žáber [19, 21].

Velkým problémem jsou klesající populace supů hlavně v Pákistánu, Indii, Bangladéši a jižním Nepálu v důsledku veterinárního používání diklofenaku, kdy dochází k expozici supů při konzumaci živočišných těl zvířat, které byly krátce před smrtí ošetřeny tímto léčivem. Zatímco byl diklofenak považován za bezpečný u skotu, ukázalo se, že pro supy je to jedna z nejvíce toxických látek s  $LD_{50}$  v rozmezí 0,098 do 0,225 mg/kg a to v důsledku hromadění kyseliny močové v těle a ledvinového selhání. Ztráta desítek miliónů supů má zásadní dopad na ekologii jednotlivých území, protože jsou hlavním druhem zastupujícím mrchožrouty. To má za důsledek nejen na životní prostředí, ale i na lidské zdraví. Konkrétně v jižní Asii se zvýšil počet divokých psů, vztekliny a TBC [8, 22, 23, 24].



## 2.4. Testované organismy

### 2.4.1. *Tetrahymena thermophila*, Nanney& McCoy



Obrázek č. 1 : *Tetrahymena thermophila* [25]

Taxonomické zařazení [26]:

nadříše	<i>Eukaryota</i>
říše	<i>Protozoa</i>
kmen	<i>Ciliophora</i> (nálevníci)
třída	<i>Oligomenophorea</i> (chudoblanní)
řád	<i>Hymenostomatida</i>
čeleď	<i>Tetrahymenidae</i> (vejcovkovití)
rod	<i>Tetrahymena</i>
druh	<i>Tetrahymena thermophila</i>

Říše: *Protozoa* (prvoci)

Tělo mají tvořeno jednou buňkou, která vykonává všechny základní funkce živočišného organismu. Většina z nich má tělo asymetrické (hlavně bičíkovci a nálevníci), ostatní mají tělo symetrické (bilaterálně, radiálně, atd.). Organelami pohybu jsou panožky (*pseudopoda*), bičíky (*flagella*) nebo brvy (*cillie*).

Přijímají a zpracovávají potravu trávicími organelami (buněčná ústa, buněčný hltan, trávicí vakuola, buněčná řiť). K příjmu potravy mohou sloužit i panožky.

Někteří jedinci přijímají potravu celým povrchem těla (tzv. osmotrofní výživa). Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně. K pohlavnímu rozmnožování patří gamogamie (hlavně výtrusovci) a konjugace (obrvení prvoci). K nepohlavnímu rozmnožování patří podélné (bičíkovci) nebo příčné (nálevníci) dělení [26, 27, 28].

Kmen: *Ciliophora* (obrvení)

Tento kmen je vývojově nejpokročilejší skupinou prvoků. Charakteristickým rysem je přítomnost dvou kvalitativně odlišných typů jader: většího (vegetativního) a menšího (generativního). Jako pohybové organely slouží brvy nebo jejich modifikace [27].

Třída: *Oligohymenophorea*

Tato třída obsahuje nejrozšířenější nálevníky vůbec a také nejlépe známé druhy. Životní cyklus se často vyznačuje polymorfií [28].

Řád: *Hymenostomatida*

Mezi znaky tohoto řádu patří jednodílné perorální kinety (= undulující membrány, tj. bičík spojený s tělem buňky jemnými mikrotubululy). Do životního cyklu běžně patří polymorfická stadia (potraviný přijímací jedinci, potravu nepřijímající buňky po dělení, atd.). Mají širokou ekologickou valenci. Někteří jsou volně žijící, jiní parazitují [28].

*Tetrahymena spp.*

Díky svému rychlému množení a snadné kultivaci je zvláště oblíbeným objektem pro fyziologická, biochemická a molekulárně-biologická bádání.

Je to malá (40 – 60  $\mu\text{m}$  dlouhá), štíhlá a vpředu mírně našpičatělá vejcovka, která má charakteristická malá, silně dopředu posunutá ústa s malým počtem podélných řad brv. Žije ve sladkých kalných vodách. Živí se bakteriemi. Ty si přisouvá k buněčným ústům tak, že vířením brv vytváří proud vody, který přihání tyto bakterie k jejím ústům [27, 28]. Hraje klíčovou roli (spolu s bakteriemi) v recyklaci odumřelých organických zbytků - je to destruent [30].

Využívá se v testu PROTOXKIT F<sup>TM</sup>.

#### 2.4.2. *Thamnocephalus platyurus*, Packard



Obr. č. 2: *Thamnocephalus platyurus* - nauplius [31]

Taxonomické zařazení [26]:

nadříše	<i>Eukaryota</i>
říše	<i>Animalia</i>
kmen	<i>Arthropoda</i> (členovci)
podkmen	<i>Crustacea</i> (korýši)
třída	<i>Branchiopoda</i>
řád	<i>Anostraca</i> (žábřonožky)
čeleď	<i>Thamnocephalidae</i>
rod	<i>Thamnocephalus</i>
druh	<i>Thamnocephalus platyurus</i>

Říše: *Animalia* (živočichové)

Živočichové jsou mnohobuněčné organismy, jejichž buňky jsou tvarově i funkčně rozlišeny a jsou sdruženy ve více či méně specializované tkáně. Tyto organismy se množí jak pohlavně (dělením mateřské buňky, nejčastěji oplozeného vajíčka), tak i nepohlavně.

Jsou to heterotrofní organismy, tzn., že nejsou schopny samy vytvářet organické látky z anorganických látek a jsou proto ve své výživě závislí na existenci autotrofních organismů [26, 27].

Kmen: *Anthropoda* (členovci)

Členovci jsou nejpočetnější kmen žijící prakticky po celém světě ve všech biotopech (mořských, sladkovodních i suchozemských). Na jejich těle rozlišujeme většinou hlavu, hrud' a zadeček, ale u některých skupin některé části splývají nebo dochází k jejich dalšímu členění. Tělo členovců pokrývá chitinová kutikula, která nejen chrání tělo, ale která i splňuje funkci vnější kostry. Trávící soustava tvoří úplnou trubici a má u jednotlivých skupin velmi rozmanitou strukturu. Členovci mají 3 typy dýchacích orgánů: žábry, plicní vaky nebo dýchají celým povrchem těla. Rozmnožují se převážně pohlavně. Jsou to gonochoristé, často s výrazným pohlavním dimorfismem [27].

Třída: *Brachiopoda*

Drobní, převážně sladkovodní korýši. Hrudní nožky jsou lupenité, nesou žábry a slouží také k filtraci potravy, často i jako pohybové orgány. Mnoho druhů žije pouze v periodických stojatých vodách, jejich vajíčka potom vyžadují periodu vyschnutí [26].

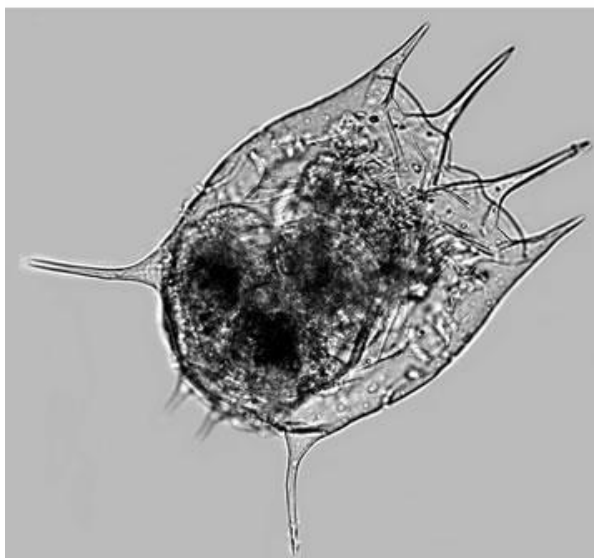
Řád: *Anostraca* (žábronožky)

Žábronožky mají protáhlé, z boku mírně stlačené tělo bez krunýřku, měřící 1 – 2 cm. Mají zřetelně rozlišenou hlavu, hrud' a zadeček. Hrudní nožky slouží k plavání, dýchání a filtraci potravy. Plavou obráceny hřbetní stranou dolů. Žijí ve stojatých vodách bez ryb či jiných predátorů, často v periodických jarních nebo letních tůních. Jsou rozšířené po celém světě [26,27].

Druh: *Thamnocephalus platyurus*

*Thamnocephalus* je součástí zooplanktonu. Přijímá potravu pomocí filtrace vody. Je-li tento organismus stresován, snižuje se tato filtrace potravy a dochází k úhynu organismu. Tohoto jevu se využívá v ekotoxikologickém testu THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>. Je to konzument.

### 2.4.3. *Brachionus calyciflorus*, Pallas



Obrázek č. 3: *Brachionus calyciflorus* [32]

Taxonomické řazení [26]:

nadříše	<i>Eukaryota</i>
říše	<i>Animalia</i>
kmen	<i>Rotifera</i> (vířníci)
třída	<i>Monogononta</i> (točivky)
řád	<i>Ploima</i>
čeleď	<i>Brachionidae</i>
druh	<i>Brachionus calyciflorus</i>

Kmen: *Rotifera*

Převážně sladkovodní živočichové, ale také půdní a mořští, volně pohybliví i přisedlí. Jejich tělo je menší než 1mm, je váčkovité nebo trubicovitě protáhlé. Obvykle rozlišujeme hlavu, trup a nohu. Na hlavě mají vířivý orgán, kterým si přihánějí potravu a který jim umožňuje plavání.

Trávicí soustava je diferencovaná na ústa, žvýkací hltan, žaludek, střevo, kloaku a anus.

Vířníci jsou gonochoristé (mají oddělená pohlaví). U některých se vyskytují pouze partenogenetické samice. Pokud jsou přítomni samci, jsou mnohem menší, nemají trávicí soustavu a žijí jen několik dní. Nepohlavní rozmnožování vířníci nemají.

U některých sladkovodních druhů a u všech půdních je vytvořena schopnost anabiózy (utlumením životních procesů na nejmenší možnou míru), která bývá nastartována vysycháním prostředí. Během tohoto procesu vyloučí tělo želatinový obal, který ztuhne v cystu. V tomto obalu vydrží dehydratované tělo až několik let a krátkodobě snese i extrémní teploty. Díky této schopnosti a malé velikosti těla mají vířníci kosmopolitní rozšíření [26,27].

Hrají roli v přirozených procesech samočištění a čištění odpadních vod. Vířníci se využívají i jako zkušební materiál v ekotoxikologických biotestech. Ve světě má velkou tradici i masový chov vířníků v akvakulturách.

Třída: *Monogononta*

Tuto třídu tvoří pouze sladkovodní druhy žijící přisedle i planktonicky. Běžná je partenogeneze i heterogonie.

Druh: *Brachionus calyciflorus*

*Brachionus calyciflorus* je sladkovodní korýš, který je velmi důležitým členem mnoha vodních společenstev. Je jednou z hlavních složek sladkovodního zooplanktonu. Je to konzument.

Využívá se v ekotoxikologickém testu ROTOXKIT F<sup>TM</sup> a ROTOXKIT F CHRONIC.

#### 2.4.4. *Sinapis alba*, L.



Obrázek č. 4: *Sinapis alba* [33]

Taxonomické řazení [34]:

říše	<i>Plantae</i>
oddělení	<i>Spermatophyta</i> (Semenné rostliny)
pododdělení	<i>Angiospermophyta</i> (Krytosemenné rostliny)
třída	<i>Magnoliopsida</i> (Dvouděložné rostliny)
řád	<i>Capparales</i>
čeleď	<i>Brassicaceae</i> (Brukvovité)
druh	<i>Sinapis alba</i> (Hořčice bílá)

Oddělení: *Spermatophyta*

Semenné rostliny tvoří nejpočetnější skupinu mezi cévnatými rostlinami, z toho tvoří podstatnou část rostliny krytosemenné neboli kvetoucí. Podstatným krokem ve vývoji těchto rostlin byla heterosporie (tzn. tvorba dvou druhů výtrusů - mikrospor a megaspor). Tyto výtrusy se rozvíjejí ve dva druhy gametofytů: mikrogametofyt (samčí), který produkuje spermatickou buňku, a megagametofyt (samičí), který produkuje vaječnou buňku. U krytosemenných rostlin se vytváří pár nepohyblivých spermatických buněk, které jsou přinášeny přímo do samičího gametofytu pylovou láčkou. Následuje oplodnění (splnutí samičí a samčí gamety) a vznik zygoty.

Diploidní zygota se rozvíjí do nového sporofytního embrya a samičí gametofyt slouží jako výživné pletivo [34].

Další charakteristikou semenných rostlin je produkce dřeva - sekundárního xylému, který umožňuje vývoj základního stonku spolu s mechanismem obnovy vnější kůry - tvorbou peridermu.

Pododdělení: *Angiospermophyta*

Krytosemenné rostliny jsou charakterizovány vajíčky (megasporangium), které jsou uvnitř uzavřené dutiny vytvořené z jednoho nebo několika vzájemně srostlých plodolistů (megasporofyl). Pylová zrna (mikrospory) nejsou přenesena přímo na mikropyle vajíčka, ale na povrch blizny, která je schopna nejen pyl přijmout, ale také asistovat při vývoji pylové láčky. Samčí a samičí gametofyty (pylová zrna a zárodečník) postrádají gametangia a jsou extrémně zjednodušené a specializované. Pro tyto rostliny je dále typická trojitá karyogamie (tzn., že jedna ze dvou samčích gamet splývá s vaječnou buňkou a druhá se spojenými dvěma jádry centrální buňky samičího gametofytu - výsledkem je diploidní zygota a triploidní endosperm - tj. dvojitě oplození krytosemenných rostlin) [34].

Třída: *Magnoliopsida*

Embryo této třídy je tvořeno obvykle dvěma dělohami, které mají tři cévní svazky. Listy jsou většinou řapíkaté se síťnatou žilnatinou. Cévní svazky jsou uspořádány do kruhu. Kořenový systém je obvykle tvořen hlavním a vedlejšími kořeny. Jsou to rostliny dřevnaté nebo bylinné, často sekundárně tloustnoucí. Květy pěti- nebo čtyřčetné.

Čeleď: *Brassicaceae*

Jsou to jednoleté až vytrvalé byliny. Listy mají střídavé nebo pouze přizemní, popřípadě členěné až složené. Květy mají pravidelné se čtyřmocnými tyčinkami a vytvářejí hroznovité květenství. Plodem je šešule, šešulka anebo struk. Je to hospodářsky významná čeleď (zelenina, olejniny, okrasné rostliny) [34, 35].



Druh: *Sinapis alba*

Hořčice bílá vytváří značně rozvětvenou kořenovou soustavu. Lodyha je přímá, dutá, hranatá s výškou 60 – 100 cm. Květenstvím je dlouhý žlutý hrozen a opyluje se cizím pylem.

Plodem je krátká silná šešule. Celé rostlina i plod jsou kryty tuhými trichomy. Semeno je drobné, kulaté a světle žluté. Obsahuje 25 – 35 % oleje a glykosid sinalbin. Olej je využíván k potravinářským (výroba stolní hořčice, koření) nebo k technickým účelům v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu - příprava mastí a náplastí na prokrvení pokožky, při revmatismu a ischemických potížích [35, 36].

## 2.5. Použité testy - princip

### 2.5.1. Vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*

Vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila* je vodní ekotoxikologický biotest inhibice příjmu potravy tohoto prvoka. Tento test je snadno proveditelný, využívá jednoduché technologie. Spočívá ve sledování rychlosti úbytku potravy v testovací kultuře [30].

Na začátku testování známe množství tetrahymeny a její potravy. Po přidání toxické látky dochází ke zpomalení příjmu potravy organismem. Množství potravy pak stanovujeme spektrofotometricky jako množství zákalu a porovnááme jej s kontrolou.

Jelikož *Tetrahymena* přijímá potravu konstantní rychlostí, je možné již po 24 hodinách porovnávat rychlosti úbytku potravy v testovaných koncentracích a v kontrole, a tím pozorovat fyziologické účinky toxické látky [3, 30].

Pro svou diplomovou práci jsem použila modifikovaný vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*, vycházející z testu PROTOXKIT F<sup>TM</sup>.

### 2.5.2. THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>

THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup> je ekotoxikologický biotest používaný k hodnocení tuhých odpadů a kalů, říčních sedimentů a odpadních vod. Je to akutní test letality využívající k zachycení možných toxických účinků látek využívá sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* [37, 38].

Během tohoto testu je organismus vystaven odstupňované koncentrační řadě zkoumané látky. Sleduje se jeho mortalita po 24 hodinách, výsledkem je LC<sub>50</sub> [3, 38].

### 2.5.3. ROTOXKIT F CHRONIC

ROTOXKIT F CHRONIC je chronický a citlivý biotest využívající juvenilní stadium vířníka (*Brachionus calyciflorus*). Test probíhá 48 hodin. Citlivost tohoto testu je srovnatelná s testy, které jsou aplikovány na jiných bezobratlých organismech. Vířníci rodu *Brachionus* mají kosmopolitní rozšíření a nacházejí se v různých vodních lokalitách na všech kontinentech.

Organismus je vystavován koncentrační řadě toxické látky a sleduje se jeho mortalita po 48 hodinách a jeho reprodukce [3, 39].

Pro tuto diplomovou práci byl použit ROTOXKIT F CHRONIC.

### 2.5.4. Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

V tomto testu se jedná o kultivaci semen hořčice bílé v Petriho miskách na filtračním papíru, který je nasycený roztokem testované látky, po dobu 72 hodin při absenci světla a při teplotě 20 °C.

Pozoruje se vliv toxických látek na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé.

Porovnává se průměrná délka kořene u semen ovlivněných zkoumanou látkou a semen, která jsou v médiu (živném roztoku). Vypočítává se průměrná inhibice či stimulace růstu pro jednotlivé koncentrace testované látky – 72h IC<sub>50</sub> [3].

Tento test vychází z Metodických pokynů MŽP, ČSN EN ISO 7346-2 (757761) a ČSN EN ISO 6341 (757751).

## 3. METODIKA

### 3.1. Materiály

#### 3.1.1. Použité chemikálie

1) léčivý přípravek: Diclofenac AL 50

Tabulka č. 4: Diclofenac AL 50, přehled dle SÚKL [40]

kód SÚKLu	0058142
název léčivého přípravku	Diclofenac AL 50
cesta podání	perorálně
léková forma	potahované tablety
velikost balení	30
síla	50mg
režim prodeje	na lékařský předpis
země držitele registrace	Německo
ATC skupina	M01AB05

složení: Diclofenacum natricum 50 mg v 1 potahované tabletě; Lactosum monohydricum, Maydis amyllum, Povidonum 25, Silica colloidalis anhydrica, Cellulosi pulvis, Magnesii stearas. Potah: Copolymeri methacrylati L dispersio 30%, Acetytriethylis citras, Hypromellosem 2910, Macrogolum 400, Macrogolum 6000, Magnesii stearas, Talcum, Titanii dioxidum, Ferri oxidum flavum, Ferri oxidum rubrum [18]

popis tablet: hnědé, kulaté, bikonvexní tablety, průměr asi 8 mm

## 2) standard diklofenaku [41]

- společnost: Sigma-Aldrich spol. s.r.o.
- název produktu: Diclofenac sodium
- molekulová hmotnost: 318.1
- vzhled: bílý prášek
- akutní toxicita: LD<sub>50</sub> u křesy po orálním podání - 53mg/kg  
LD<sub>50</sub> u psa po orálním užití - 59mg/kg  
LD<sub>50</sub> u králíka po orálním užití - 157mg/kg

## 3) ostatní chemikálie:

- dichroman draselný (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)
- deionizovaná voda

### 3.1.2. Použité pomůcky

Černý papír

Eppendorfovy zkumavky

Filtrační papír

Kádinky

Laboratorní lžičky

Mikropipety

Milimetrový papír

Ochranné rukavice

Petriho misky

Pinzeta

Plastové destičky

Podložní sklíčko

Stojan na zkumavky

Váženky

Zkumavky

### 3.1.3. Použité přístroje

Analytické váhy *KERN ABJ*

Inkubátor *AQUALYTIC*

Laminár *Biohazard aura 2000 M.A.C*

Lednice

Stereomikroskop *LEICA EZ 4D*

Počítač

Předvážky *440/47N KERN*

Reader *ANTHOS 2010*

Ultrazvuková lázeň *SONOREX DIGITAL 10P*

### 3.1.4. Provedení testů

- dichroman draselný byl používán jako standardní testovaná látka pro ověření správnosti průběhu experimentu
- každý experiment byl opakován nejméně třikrát pro ověření správnosti výsledků
- testovaná koncentrace účinné látky léčiva (Diclofenac AL 50) odpovídala koncentraci standardu (diklofenaku)

## 3.2. Pracovní postup

### 3.2.1. Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Vlastní provedení testu

Nanesení jednotlivých koncentrací na destičky. Do sloupce číslo 1 bylo naneseno postupně: 180  $\mu$ l peptonu; 120  $\mu$ l peptonu + 60  $\mu$ l látky o koncentraci  $c_1$  (nejvyšší koncentrace); 60  $\mu$ l peptonu + 60  $\mu$ l tetrahymeny; 60  $\mu$ l peptonu + 60  $\mu$ l tetrahymeny + 60  $\mu$ l látky o koncentraci  $c_1$ . Podrobněji viz. tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Nanesení jednotlivých látek na destičku, objemy udané v  $\mu$ l

	1	2	3	4	5	...	10
<b>P</b>	180	180	180	180	180	180	180
<b>P + L</b>	120+60	120+60	120+60	120+60	120+60	120+60	120+60
<b>P + T</b>	60+60	60+60	60+60	60+60	60+60	60+60	60+60
<b>1</b>	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60
<b>2</b>	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60
<b>3</b>	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60	60+60+60

Po nanesení látek na destičku byla změřena absorbance v čase  $T_0$  při vlnových délkách 492 nm a 562 nm. Po té byla destička umístěna do inkubátoru. Po 24 hodinách byla znovu změřena absorbance. Podle naměřených hodin byla spočítána  $EC_{50}$ .

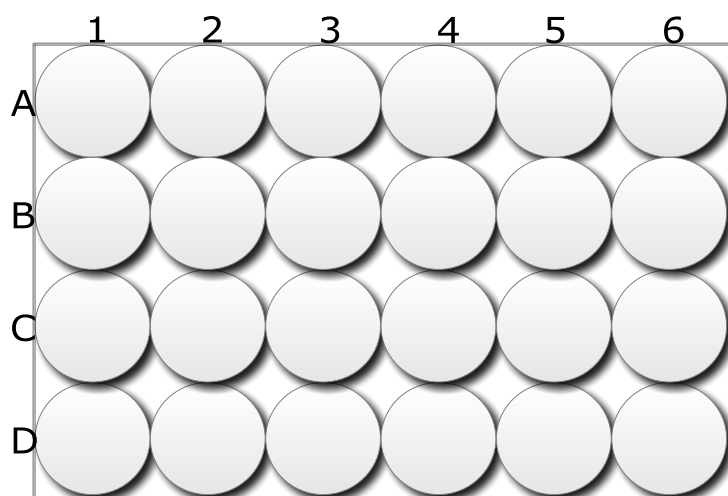
### 3.2.2. THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>

#### Vlastní provedení testu

Inkubace cyst byla provedena dle návodu k testu THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup> [38].

Na destičku (viz. obrázek č. 5) bylo naneseno do každé jamky po 1 ml testovaného roztoku a to tak, že ve sloupci číslo 1 byla nejvyšší koncentrace a ve sloupci číslo 6 koncentrace nejnižší. Do každé jamky řady A bylo přesunuto 10 čerstvě vylíhlých jedinců *Thamnocephalus platyurus*. Poté bylo všech 10 jedinců přesunuto z řady A do řady B. Byly použity celkem tři destičky - zvlášť destička na K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, roztok tablety diklofenaku, roztok standardu diklofenaku a médium.

Obrázek č. 5: Destička používaná pro THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>



Tabulka č. 6: Přehled jednotlivých koncentrací látek v jednotlivých jamkách v mg/l

látka \ jamka	1	2	3	4	5	6
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	2	1	0,5	0,25	0,125	0,065
roztok standardu diklofenaku	100	50	10	1	0,1	0,01
roztok tablety diklofenaku	100	50	10	1	0,1	0,01



Po rozdělení organismů byla destička překryta parafilmem a umístěna na 24 hodin do inkubátoru o teplotě 25 °C bez přítomnosti světla. Po dané době byla vyndána z inkubátoru a bylo spočítáno množství uhynulých organismů s následným výpočtem LC<sub>50</sub>.

### 3.2.3. ROTOXKIT F CHRONIC

#### Vlastní provedení testu

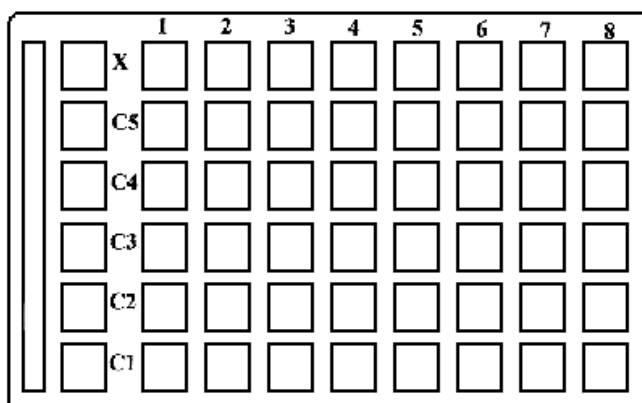
Jak pro roztok standardu, tak pro roztok testované látky bylo připraveno 6 koncentrací látek. Ve zkumavce číslo jedna byla koncentrace roztoku nejvyšší a ve zkumavce číslo šest byla koncentrace nejnižší. Podrobněji viz. tabulka č. 7. Testované látky byly ředěny zásobním roztokem, který byl připraven z MgSO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KCl a deionizované vody.

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

<b>zkoušený roztok</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>roztok léčiva</b>	100	50	10	1	0,1	0,01
<b>roztok standardu</b>	100	50	10	1	0,1	0,01
<b>roztok K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	10	5,6	3,2	1,8	1,0	0,05

Na každý zkoušený roztok byla připravena jedna destička (viz. obrázek č. 6)

Obrázek č. 6: Destička používaná při testu ROTOXKIT F CHRONIC [39]



První sloupec sloužil jako ředící řada, kam bylo umístěno několik jedinců *Brachionus calyciflorus*. Poté byli po jednom přemístováni do sloupce 1,2,3, atd. Po naplnění byly destičky umístěny do inkubátoru na 48 hodin bez přítomnosti světla. Po 48 hodinách byli spočítáni dospělí jedinci, kteří přežili a nově narození jedinci. Z těchto údajů byla vypočítána inhibice růstu a populační růstový poměr.

### 3.2.4. Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

Vlastní provedení testu

Pro zkoumané látky byla připravena ředící řada složená z osmi zkumavek. V první zkumavce byla nejvyšší koncentrace zkoumané látky a v poslední byla koncentrace nejnižší. Pro přehlednost jsou koncentrace uvedeny v tabulce č. 8.

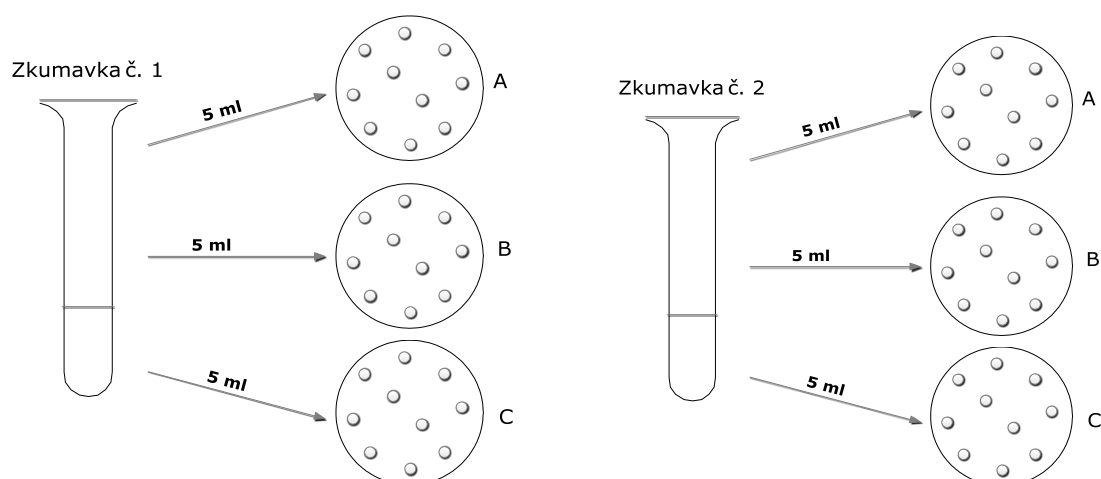
tabulka č. 8: Koncentrace látek v ředících řadách uvedená v mg/l

látka	1	2	3	4	5	6	7	8
roztok $K_2Cr_2O_7$	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625
roztok standardu diklofenaku	100	75	50	30	20	10	5	1
roztok tablety diklofenaku	100	75	50	30	20	10	5	1

Ke každé zkumavce (viz. tabulka č.8 + zkumavka s připraveným médiem) byly připraveny 3 Petriho misky, do kterých byl na dno umístěn filtrační papír. Na filtrační papír bylo nanášeno po 5 ml z každé zkumavky, tzn. 3 Petriho misky s 5 ml roztoku stejné koncentrace (viz. schéma č. 4). Do každé z nich bylo rovnoměrně rozprostřeno 10 semen *Sinapis alba*. Petriho misky byly uzavřeny a umístěny na 72 hodin do termostatu s teplotou 20 °C.

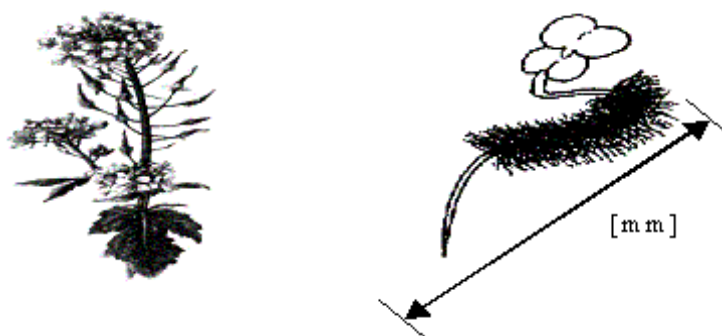
Testované látky byly ředěny zásobním roztokem, který byl připraven z  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ,  $NaHCO_3$ , KCl a deionizované vody.

Schéma č. 4: Rozdělení jedné zkumavky na 3 Petriho misky



Po 72 hodinách následovalo vyhodnocení testu, které spočívalo v přeměření vyklíčeného semene od hypokotylu (prvního lodyžního článku klíčící rostliny mezi dělohami a kořínkem, tedy prvního článku stonku, který je přítomen již v klíčku semene) po konec kořínku. Pro každou koncentraci testované látky byl vypočten aritmetický průměr délky kořene ze všech paralelních stanovení. Z průměrných délek v jednotlivých koncentracích byla vypočtena inhibice růstu.

Obrázek č. 7: Hodnocený hypokotyl *Sinapis alba* [42]



Pro všechny koncentrace byl vypočten aritmetický průměr délky kořenů a spočítána inhibice růstu.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena thermophila*

Podmínky testu: tma, 25 °C

Délka testu: 24 hod

Tabulka č. 9: Koncentrace  $K_2Cr_2O_7$  v jednotlivých sloupcích (mg/l)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
66,67	33,33	16,67	8,33	4,17	2,08	1,04	0,52	0,26	0,13

Tabulka č. 10: Inhibice růstu *Tetrahymena thermophila* (%) v závislosti na koncentraci (mg/l), při různé vlnové délce -  $K_2Cr_2O_7$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
492 nm	70,0	66,7	59,5	42,9	39,0	18,2	9,4	4,7	0,0	0,0
562 nm	66,7	62,5	41,7	41,0	33,3	15,4	14,8	6,1	0,0	0,0

Tabulka č. 11: Koncentrace léčiva a standardu v jednotlivých sloupcích (mg/l)

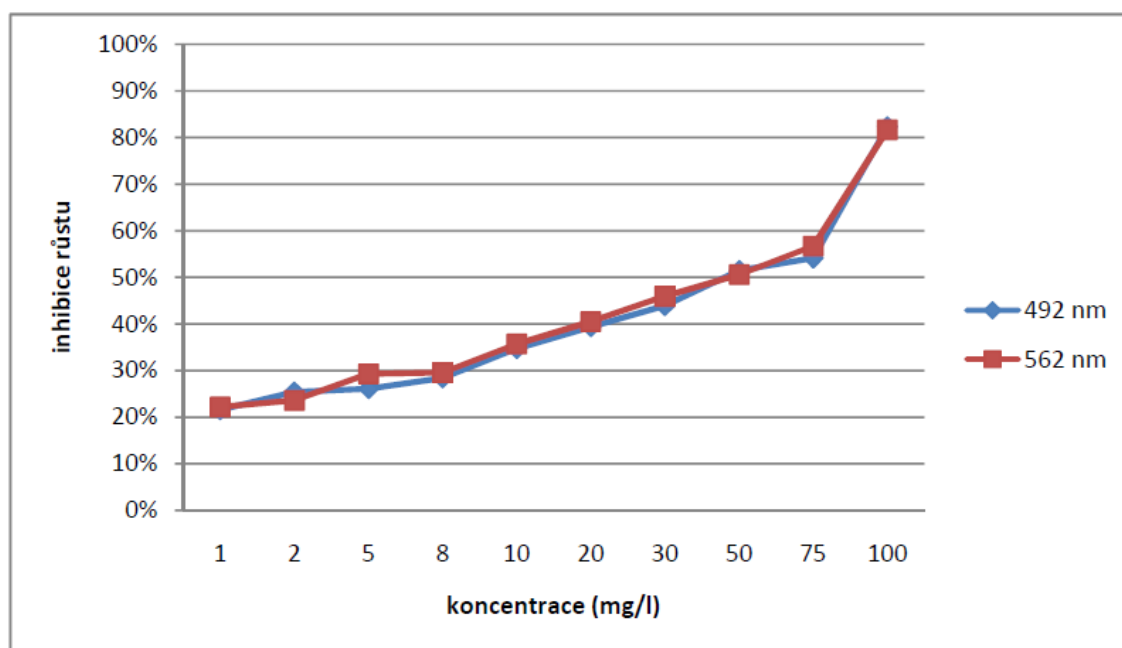
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	75	50	30	20	10	8	5	2	1

Tabulka č. 12: Inhibice růstu *Tetrahymena thermophila* (%) v závislosti na koncentraci (mg/l), při různé vlnové délce – léčivo

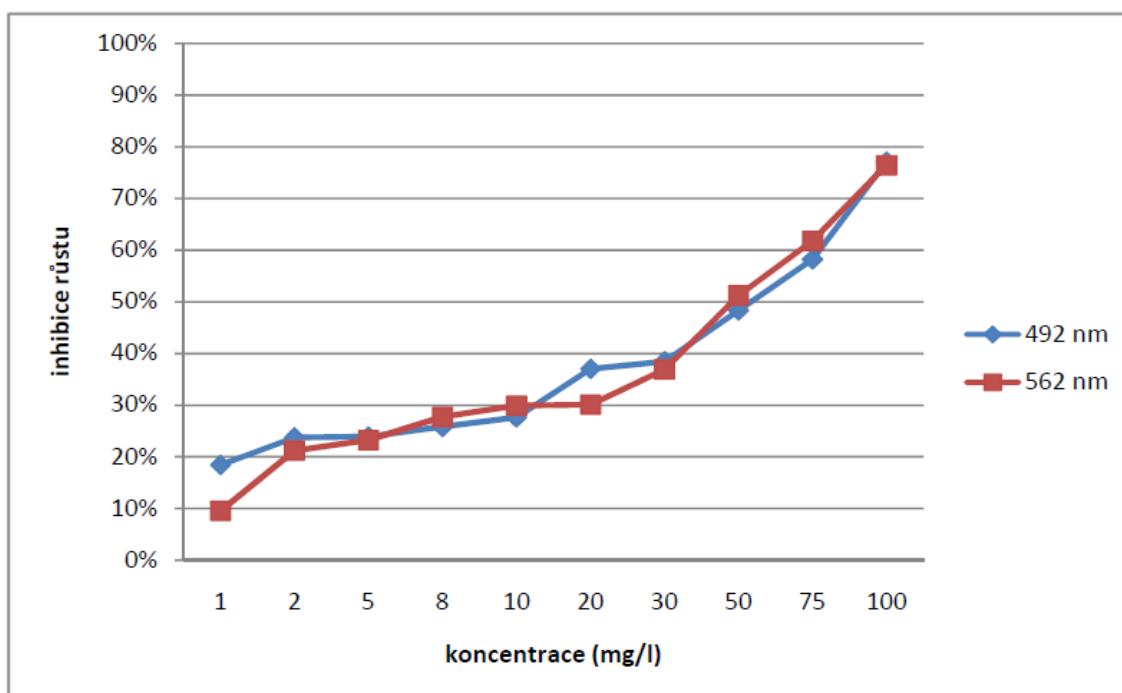
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
492 nm	82,3	54,1	51,5	43,9	39,4	34,7	28,4	26,1	25,4	21,6
562 nm	81,6	56,7	50,6	45,9	40,5	35,7	29,6	29,3	23,6	22,2



Graf č. 1: Inhibice růstu (%) v závislosti na koncentraci (mg/l) při vlnových délkách 492 nm a 562 nm - léčivo



Graf č. 2: Inhibice růstu (%) v závislosti na koncentraci (mg/l) při vlnových délkách 492 nm a 562 nm - standard



## 4.2. THAMNOTOXKIT F™

Podmínky testu: tma, 25 °C

Délka testu: 24 hodin

Tabulka č. 14: Koncentrace léčiva a standardu v jednotlivých sloupcích (mg/l)

1	2	3	4	5	6
50	30	10	5	2	1

Tabulka č. 15: Koncentrace K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (mg/l)

1	2	3	4	5	6
2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

Tabulka č. 16: Mortalita jedinců v jednotlivých testovaných látkách (%)

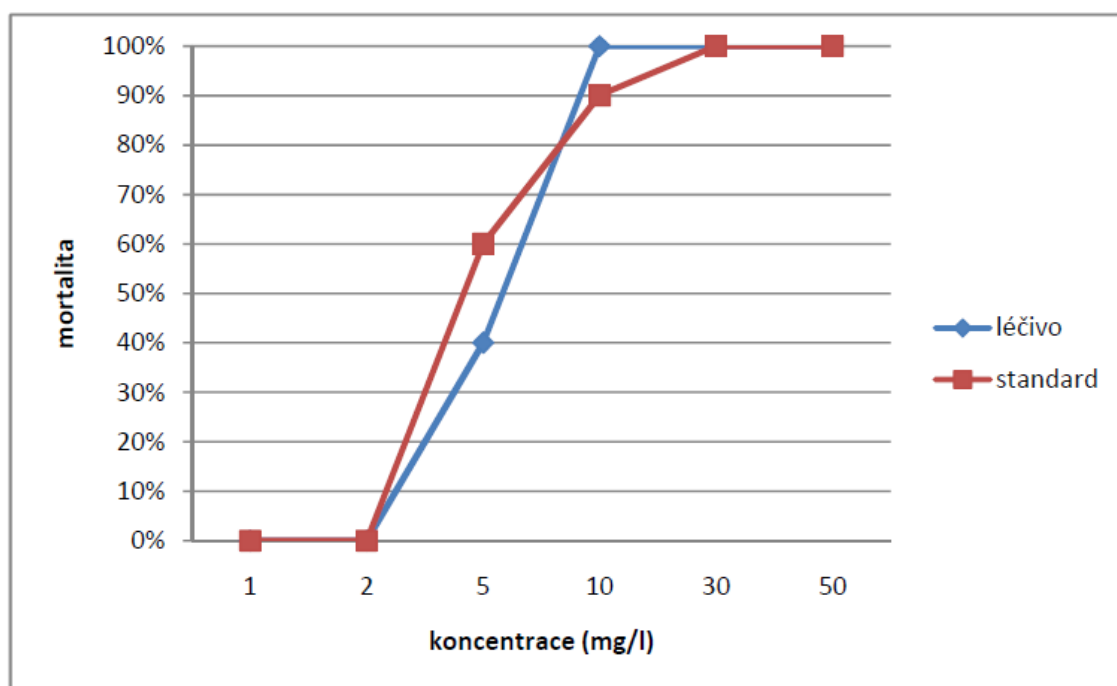
	1	2	3	4	5	6
standard	100	100	90	60	0	0
léčivo	100	100	100	40	0	0
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	90	90	50	10	0	0

Z výše uvedených hodnot byly získány tyto výsledky:

- 24h EC<sub>50</sub> pro léčivo - 5,058 mg/l
- 24h EC<sub>50</sub> pro standard - 4,573 mg/l (4,386 – 4,573 mg/l)
- 24h EC<sub>50</sub> pro K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – 0,1556 mg/l (0,1135 – 0,2133 mg/l)



Graf č. 3: Mortalita jedinců (%) v závislosti na koncentraci (mg/l) testované látky



### 4.3. ROTOXKIT F CHRONIC

Podmínky testu: 25 °C, tma

Délka testu: 48 hodin

Tabulka č. 17: Koncentrace jednotlivých látek v mg/l

	1	2	3	4	5	6
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	2	1	0,5	0,25	0,125	
<b>standard</b>	100	50	10	1,0	0,1	0,01
<b>léčivo</b>	100	50	10	1,0	0,1	0,01

Tabulka č. 18: Počet dospělých jedinců v jednotlivých jamkách roztoku léčiva

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	1	2	2	1	1	2	2
<b>B</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>C</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>D</b>	1	1	1	1	2	1	1
<b>E</b>	1	1	1	1	1	1	2
<b>F</b>	1	1	1	1	2	1	1

Tabulka č. 19: Počet dospělých mrtvých jedinců/počet nově žijících jedinců v testovaných koncentracích - léčivo

	1	2	3	4	5	6	7							
<b>A</b>	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0	2	0	2	0
<b>B</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	1
<b>C</b>	0	0	0	3	0	4	0	5	0	4	0	0	0	3
<b>D</b>	0	4	0	0	0	3	0	4	0	9	0	4	0	5
<b>E</b>	0	4	0	4	0	2	0	3	0	4	0	4	0	9
<b>F</b>	0	5	0	4	0	3	0	3	0	7	0	5	0	4

Tabulka č. 20: Počet všech živých jedinců po 48 hodinách - léčivo

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>B</b>	1	1	1	0	4	3	2
<b>C</b>	1	4	5	6	5	1	4
<b>D</b>	5	1	4	5	11	5	6
<b>E</b>	5	5	3	4	5	5	11
<b>F</b>	6	5	4	4	9	6	5

Tabulka č. 21: Počet dospělých jedinců v jednotlivých jamkách roztoku standardu

	1	2	3	4	5	6	7
A	1	2	2	1	1	1	2
B	1	1	1	2	2	2	1
C	1	1	1	1	1	1	2
D	2	1	2	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1

Tabulka č. 22: Počet dospělých mrtvých jedinců/počet nově žijících jedinců v testovaných koncentracích - standard

	1	2	3	4	5	6	7							
A	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	0
B	1	0	1	0	1	0	2	0	2	0	2	0	1	0
C	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	3	0	3	0	4	0	2	0	0	0	3	0	4
F	0	4	0	2	0	4	0	3	0	3	0	3	0	4

Tabulka č. 23: Počet všech živých jedinců po 48 hodinách - standard

	1	2	3	4	5	6	7
A	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0
D	2	1	2	1	1	1	1
E	4	4	5	3	1	4	5
F	5	3	5	4	4	4	5

Tabulka č. 24: Počet dospělých jedinců v jednotlivých jamkách kontroly

	1	2	3	4	5	6	7
kontrola	1	1	1	1	1	1	1

Tabulka č. 25: počet dospělých mrtvých jedinců/počet nově žijících jedinců v testovaných koncentracích - kontrola

	1	2	3	4	5	6	7							
kontrola	0	4	0	4	0	5	0	4	0	4	0	5	0	5

Tabulka č. 26: Počet všech živých jedinců po 48 hodinách - kontrola

	1	2	3	4	5	6	7
<b>kontrola</b>	5	5	6	5	5	6	6

Tabulka č. 27: Počet dospělých jedinců v jednotlivých jamkách roztoku K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

	1	2	3	4	5	6	7
<b>B</b>	1	1	1	1	1	1	2
<b>C</b>	1	1	1	1	1	1	2
<b>D</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>E</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>F</b>	2	1	1	1	1	1	1

Tabulka č. 28: Počet dospělých mrtvých jedinců/počet nově žijících jedinců v testovaných koncentracích K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

	1	2	3	4	5	6	7							
<b>A</b>	0	3	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0
<b>B</b>	0	2	0	3	0	1	0	3	0	1	0	2	0	2
<b>C</b>	0	4	0	3	0	4	0	1	0	3	0	3	0	2
<b>D</b>	0	4	0	4	0	2	0	2	0	4	0	3	0	3
<b>E</b>	0	5	0	3	0	3	0	4	0	4	0	3	0	4

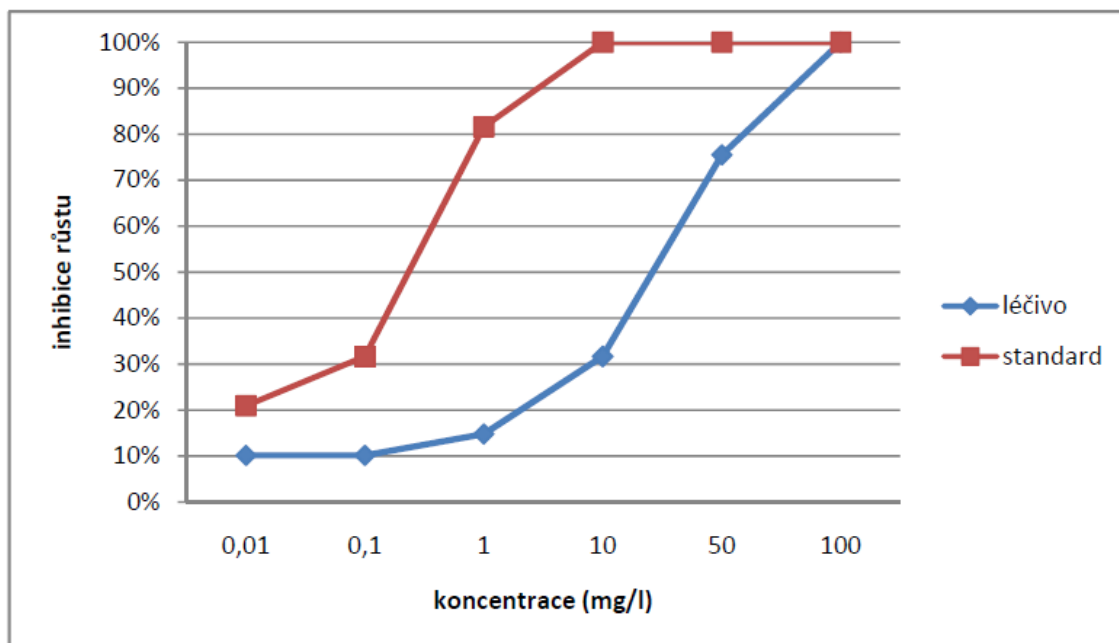
Tabulka č. 29: Počet všech živých po 48 hodinách - K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	4	1	1	3	3	3	2
<b>B</b>	4	3	2	4	2	5	4
<b>C</b>	5	4	5	2	4	4	3
<b>D</b>	5	5	3	3	5	4	4
<b>E</b>	7	4	4	5	5	4	5

Z výše uvedených hodnot byly získány tyto výsledky:

- 48h EC<sub>50</sub> pro léčivo: 1,363 mg/l (0,7848 – 2,366 mg/l)
- 48h EC<sub>50</sub> pro standard: 0,02932 mg/l (0,02071 – 0,04150 mg/l)
- 48h EC<sub>50</sub> pro K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 10,61 mg/l (5,942 – 18,95mg/l)

Graf č. 4: Inhibice růstu (%) v závislosti na koncentraci (mg/l)



#### 4.4. Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

Podmínky testu: 20 °C, tma

Délka testu: 72 hodin

Tabulka č. 30: Použité koncentrace standardu a léčiva (mg/l)

1	2	3	4	5	6	7	8
100	75	50	30	20	10	5	1

Tabulka č. 31: Použité koncentrace dichromanu draselného (mg/l)

1	2	3	4	5	6	7	8
200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563

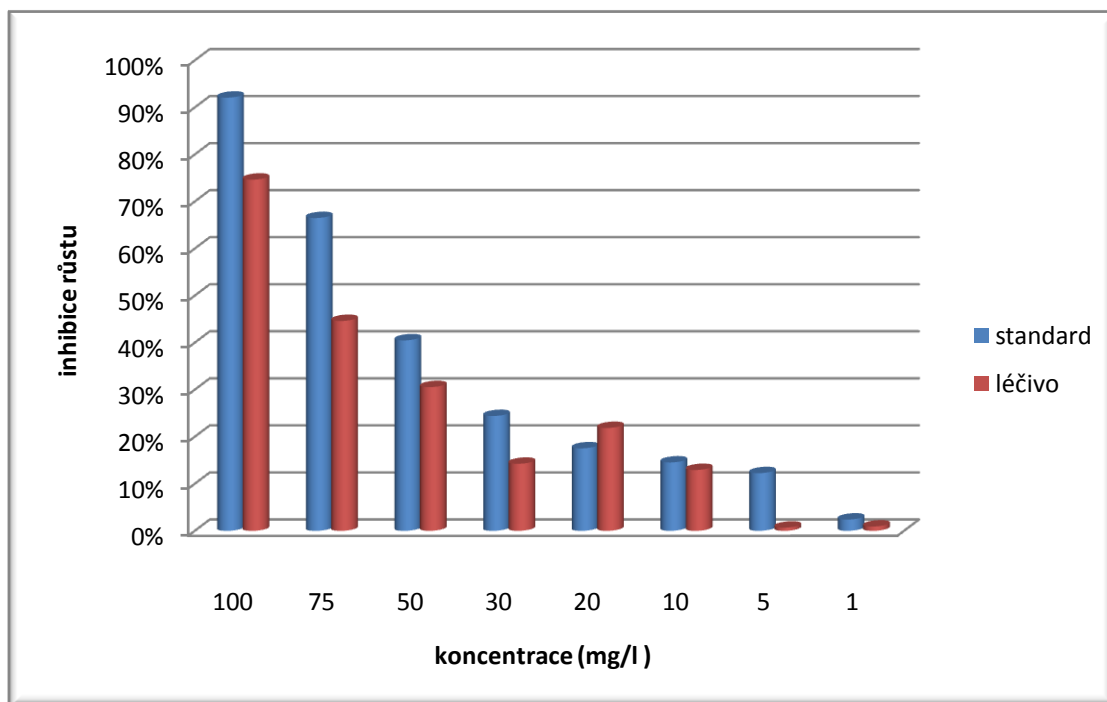
Tabulka č. 32: Inhibice růstu kořene (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8
standard	92,09	66,50	40,49	24,41	17,54	14,54	12,26	2,40
léčivo	74,66	44,62	30,55	14,26	21,87	12,94	0,92	0,68
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	90,90	79,40	76,90	70,50	55,10	43,40	21,60	5,10

Z výše uvedených hodnot byly získány tyto výsledky:

- hodnota 72h IC<sub>50</sub> pro léčivo 71,42 mg/l (62,51- 81,60 mg/l)
- hodnota 72h IC<sub>50</sub> pro standard 54,23 mg/l (49,43 – 59,50 mg/l)
- hodnota 72h IC<sub>50</sub> pro K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 11,81 mg/l (9,78 – 14,26 mg/l)

Graf č. 5: Inhibice růstu (%) kořene v závislosti na koncentraci (mg/l) testované látky



## 5. DISKUZE

Se zvyšující se spotřebou léčiv (v rámci této práce diklofenaku) se zvyšuje i jejich vliv na životní prostředí. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.3.3., jen za 3. čtvrtletí 2009 bylo u nás v České republice spotřebováno 964 093 léčivých přípravků obsahujících diklofenak. Weigelem byla zkoumána ekotoxicita diklofenaku v ústí Labe u Severního moře a byla zjištěna jeho hodnota 6200 ng/l. V průzkumu Ternes (1998) byla zjištěna přítomnost diklofenaku ve všech zkoumaných vzorcích z čistíren odpadních vod a to v koncentracích okolo 1600 ng/l, a ve všech vzorcích testovaných říčních vod v koncentracích okolo 800 ng/l. Paxéus naměřil hodnoty ve vybraných čistírnách odpadních vod v 5 zemích EU mezi 140 – 1480 ng/l. Maximální naměřená koncentrace diklofenaku v povrchové vodě je 1030 ng/l. Tato hodnota byla změřena Hebererem v Berlíně [7, 43, 44, 45].

V této práci byl použit jeden test akutní toxicity, dva testy semichronické a jeden test chronický. Jako počáteční nejvyšší koncentrace léčiva a standardu byly zvoleny hodnoty 100 mg/l (testy se *Sinapis alba*, *Brachionus calyciflorus*, *Tetrahymena thermophila*), eventuelně 50 mg/l (test s *Thamnocephalus platyurus*). Léčivo i standard byly špatně rozpustné - bylo potřeba vždy použít ultrazvukové lázně.

V ekotoxikologických studiích odpadních vod se podle výsledků Manusadžianase ukázal jako citlivější test s organismem *Thamnocephalus platyurus* (THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>) nežli test s *Tetrahymena thermophila* [46].

V semichronickém testu s organismem *Tetrahymena thermophila* byly zjištěny hodnoty 24 EC<sub>50</sub> pro léčivo při 492 nm 32,88 mg/l (23,07 – 46,86 mg/l) a pro 24 EC<sub>50</sub> standardu při 492 nm 40,43 mg/l (29,65 – 55,08 mg/l).



Ferrari [47] a kolektiv se zabývali ekotoxikologickými vlivy v odpadních vodách u diklofenaku, karbamazepinu a kyseliny klofibrové. V akutních testech toxicity vyšel diklofenak jako nejtoxičtější léčivo, naopak v chronických testech vyšel jako nejméně toxický z této zkoušené trojice. Jedním z organismů testovaných na akutní toxicitu byla bakterie *Vibrio fischeri*, u níž byla stanovena 30min EC<sub>50</sub> 11,54 µg/l. Dalšími testovanými organismy byli vodní korýši ze stejné třídy jako *Thamnocephalus platyurus*: *Daphnia magna*, u níž byla zjištěna 48 EC<sub>50</sub> 224,3 µg/l a *Ceriodaphnia dubia* s 48 EC<sub>50</sub> 22,704 µg/l. Z tohoto testu byla zjištěna vysoká citlivost organismu *D. magna* na diklofenak.

V této práci byly zjištěny hodnoty akutního testu s *Thamnocephalus platyurus*: 24 EC<sub>50</sub> pro léčivo 5,058 mg/l a 24 EC<sub>50</sub> pro standard 4,573 mg/l (4,386 – 4,573 mg/l).

Cleuvers a kolektiv [19] zkoumali vliv samotného diklofenaku a směsí s ním na životní prostředí. Použili test na akutní toxicitu s organismem *Daphnia magna*, kde byla zjištěna 48h EC<sub>50</sub> diklofenaku 68 mg/l, a test chronický s řasou *D. subspicatus*, kde byla EC<sub>50</sub> 71,9 mg/l (65,5 – 79,1 mg/l). Směrnice EU 93/67/EHS klasifikují léčiva podle nejnižší naměřené EC<sub>50</sub> do několika tříd: EC<sub>50</sub> < 1 mg/l (látky velmi toxické pro vodní organismy), EC<sub>50</sub> 1 - 10mg/l (látky toxické pro vodní organismy) a EC<sub>50</sub> 10 – 100 mg/l (látky škodlivé pro vodní organizmy). Z tohoto dělení vyplývá, že diklofenak je škodlivý pro vodní organizmy.

Při semichronickém testu se semeny *Sinapis alba*, byla zjištěna inhibiční koncentrace diklofenaku 72h IC<sub>50</sub> – 71,42 mg/l (62,51- 81,6 mg/l) a standardu 72h IC<sub>50</sub> - 54,23 mg/l (49,43 – 59,50 mg/l). Zde byla při nejvyšší koncentraci (tj. 100 mg/l) naměřena inhibice 92,09 % u standardu a 74,66 % u léčiva.

V chronickém testu toxicity s organismem *Brachionus calyciflorus* (ROTOXKIT F CHRONIC) byly zjištěny hodnoty 48h EC<sub>50</sub> pro diklofenak 1,363 mg/l (0,7848 – 2,366 mg/l) a pro standard 0,02932 mg/l (0,0271 – 0,0415 mg/l). Test s tímto organismem provedl Ferrarri. Ten vyhodnotil LOEC diklofenaku 0,025 mg/l.

Chronickou toxicitou diklofenaku se zabývali i Brandhof a Montforts [49]. Ti pozorovali jeho vliv na sladkovodní rybu *Danio rerio*. U ní stanovili hodnoty 72h EC<sub>50</sub> na 5,3 mg/l a NOEC 1,5 mg/l. Hoeger a kolektiv [49] stanovili chronickou toxicitu diklofenaku na pstruhovi obecném - NOEC 0,5 mg/l.

Buser a Müller [50] se zabývali degradací diklofenaku v životním prostředí. Zjistili, že poločas rozpadu diklofenaku je méně než jeden den, což je velmi krátká doba eliminace. Nicméně diklofenak je natolik používaná léčivá látka, která je účinná již v nízkých koncentracích, že i přes svoji rychlou eliminaci je rizikem pro životní prostředí [51]. Byly vytvořeny studie o rozkladu diklofenaku ve vodě pomocí ozonu a peroxidu vodíku, kde bylo zjištěno v testu při použití O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o koncentraci 1 mg/0,4 mg), že již po deseti minutách bylo rozloženo 99,4% diklofenaku [18].

Z výsledků a z dohledaných literárních zdrojů lze tedy vyvodit závěr, že diklofenak a jeho rezidua v životním prostředí jsou méně toxická při akutní expozici. S prodloužením expozice se toxicita léčiva na organismy zvyšuje. Je třeba brát v úvahu i fakt, že diklofenak není jediné léčivo v životním prostředí, které jej ovlivňuje, ale že se jedná o směsi mnoha různých látek, přestože koncentrace diklofenaku v životním prostředí dosahují koncentrace pouze v ng.

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv diklofenaku na životní prostředí v rámci biotestů. Jako zdroj diklofenaku bylo zvoleno léčivo Diclofenac AL 50 od firmy Aliud Pharma GmbH and Co. KG a standard diklofenaku p.a. od společnosti Sigma-Aldrich spol. s.r.o.

K testování byly vybrány celkem čtyři testy, z toho jeden test akutní, dva semichronické a jeden chronický, které zastupovaly jednotlivé trofické úrovně – producenty, konzumenty a destruenty.

Test akutní toxicity THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup> byl prováděn s organismem *Thamnocephalus platyurus*. Probíhal v inkubátoru s teplotou 25 °C bez přítomnosti světla. Po 24 hodinách bylo spočítáno množství uhynulých jedinců a ze zjištěných hodnot byla spočítána 24 LC<sub>50</sub>. Byly získány tyto hodnoty: 24h EC<sub>50</sub> pro standard - 4,573 mg/l (4,386 – 4,573 mg/l), 24h EC<sub>50</sub> pro léčivo - 5,058 mg/l, 24h EC<sub>50</sub> pro dichroman draselný – 0,1556 mg/l (0,1135 – 0,2133 mg/l). To, že je tableta pro organismus více toxická, než samotný standard poukazuje na fakt, že se na její toxicitě podílejí i látky pomocné, které jsou v tabletě obsaženy, navíc u tablety můžeme předpokládat vyšší reálnou bioakumulaci a biokoncentraci [51]. Při nejvyšší koncentraci (tj. 50 mg/l) byly usmrceny všechny organismy – jak v roztoku léčiva, tak v roztoku standardu. Totéž následovalo i v koncentraci 30 mg/l.

Semichronický test toxicity (vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena thermophila*) byl prováděn v laminárním boxu. Po té umístěn do inkubátoru s teplotou 25 °C a bez přítomnosti světla. Po 24 hodinách byla přeměřena absorbance. Ze získaných hodnot byla vypočítána procentuální inhibice a pomocí počítačového programu Prisma 24 EC<sub>50</sub>.

Byly získány tyto hodnoty: 24h EC<sub>50</sub> léčiva – při 492 nm 32,88 mg/l (23,07 – 46,86 mg/l), při 562 nm – 30,52 mg/l (22,13 – 42,07 mg/l); 24h EC<sub>50</sub> standardu – při 492 nm 40,43 mg/l (29,65 – 55,08 mg/l), při 562 nm - 39,58 mg/l (30,76 – 50,93 mg/l); 24h EC<sub>50</sub> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - při 492 nm 12,57 mg/l (10,44 – 15,15 mg/l), při 562 nm 18,94mg/l (15,58 – 23,02 mg/l).

V literatuře nacházíme měření při 540 nm či jiných vlnových délkách a v samotném návodu k tomuto testu je uváděno 440 nm. V readru, který byl k testu k dispozici, bylo možné měřit hodnoty absorbance při 465 nm a při 562 nm.

V druhém semichronickém testu toxicity byly používány semena *Sinapis alba*. Po 72 hodinách kultivace o teplotě 20 °C bez přítomnosti světla byly přeměřeny délky vyklíčených kořínků a ze získaných údajů vypočítána inhibice růstu kořene. Byly získány tyto hodnoty: hodnota 72h IC<sub>50</sub> pro léčivo 71,42 mg/l (62,51- 81,60 mg/l), 72h IC<sub>50</sub> pro standard 54,23 mg/l (49,43 – 59,50 mg/l), 72h IC<sub>50</sub> pro K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 11,81 mg/l (9,78 – 14,26 mg/l).

*Brachionus calyciflorus* je organismus, který byl použit v chronickém testu toxicity ROTOXKIT F CHRONIC. Test probíhal v inkubátoru s teplotou 25 °C bez přítomnosti světla po dobu 48 hodin. Po té bylo spočítáno množství nově narozených jedinců. Ze zjištěných údajů byl vypočítán populační růstový poměr a procentuální inhibice. Byly získány tyto hodnoty: 48h EC<sub>50</sub> pro léčivo: 1,363 mg/l (0,7848 – 2,366 mg/l), 48h EC<sub>50</sub> pro standard: 0,02932 mg/l (0,02071 – 0,04150 mg/l), 48h EC<sub>50</sub> pro dichroman draselný: 10,61 mg/l (5,942 – 18,95mg/l).

## 7. SEZNAM LITERATURY

- [1] Hartl, J., Palát, K.: *Farmaceutická chemie I.*, Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, Praha 2007, s. 102, ISBN: 978-80-7184-619-2
- [2] [http://www.pace.cz/go/archiv\\_p0202\\_1](http://www.pace.cz/go/archiv_p0202_1) [staženo 3.1.2011]
- [3] Kočí, V., Mocová, K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2009, s. 190, ISBN: 978-80-7080-699-9
- [4] Forbes, V.E., Forbes, T.L.: *Ecotoxicology in Theory and Practice*, Chapman & Hall, London 2004, s. 264, ISBN: 0-412-43530-6
- [5] Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. : *Bioindicators and biomonitors: Principles, Concepts and Applications*, Chapter 7, Ecotoxicity testing, s. 221- 256, Elsevier Science 2003, ISBN: 0-08- 044177-7
- [6] Kočí, V., Halousková, O. – ed.: *Ekomonitor- ekotoxikologické biotesty I.*, Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s.r.o., 2002, s. 187, ISBN: 80-238-9260-6
- [7] Zhang, Y., et al.: *Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*; *Chemosphere*, 73 (2008), s. 1151–1161, ISSN: 0045-6535
- [8] Fent, K., et al.: *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*; *Aquatic Toxicology*, 76 (2006), s. 122–159, ISSN: 0166-445X
- [9] Santos, L.H.M.L.M., et al.: *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*; *Journal of Hazardous Materials*, 175 (2010), s. 45–95, ISSN: 0304-3894
- [10] Lincová, D., Farghali, H., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, 2007, s. 672, ISBN: 978-80-7262-373-0

- [11] Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, G., Mařha, V.: *Imunitní systém- informace pro každého*, Translation Grada Publishing, a.s., Praha 2005, s. 236, ISBN: 80-247-1196-6
- [12] Fendrich, Z., a kol.: *Farmakologie pro studenty III.*, Praha 2007, Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, s. 164, ISBN: 978-80-246-1419-9
- [13] Lullman, H., et. al.: *Barevný atlas farmakologie*, Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001, New York, s. 382, ISBN: 80-7169-973-X
- [14] Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J.: *Farmakochemie*, Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Praha 2007, s. 448, ISBN: 978-80-7080-639-5
- [15] Mikroverze AISLP- ČR 2010, stav k 1.4.2010
- [16] SÚKL:  
[http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search\\_for\]=&data\[code\]=&data\[atc\\_group\]=&data\[material\]=diklofenak&data\[path\]=&data\[reg\]=&data\[radio\]=none&data\[rc\]=&data\[with\\_adv\]=0&data\[listing\]=20&search=Vyhledat&page=1](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=&data[code]=&data[atc_group]=&data[material]=diklofenak&data[path]=&data[reg]=&data[radio]=none&data[rc]=&data[with_adv]=0&data[listing]=20&search=Vyhledat&page=1) [staženo 20.02.2011]
- [17] SÚKL: <http://www.sukl.cz/4-ctvrtleti-a-za-cely-rok-2009>
- [18] Kummerer, K., ed.: *Pharmaceuticals in the Environment- Sources, Fate, Effects and Risk*, Second Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004, s. 528, ISBN: 3-540-21342-2
- [19] Cleuvers, M.: *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid*; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59 (2004), s. 309–315, ISSN: 0147-6513
- [20] Parolini, M., et al.: *An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)*; *Toxicity In Vitro*, 23 (2009), s. 935-942, ISSN: 0887-2333
- [21] Ericson, H., et al.: *Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels*; *Aquatic Toxicology*, 99 (2010), s. 223–231, ISSN: 0166-445X

- [22] Taggart, M.A., et al.: *Diclofenac residues in carcasses of domestic ungulates available to vultures in India*; Environment International, 33 (2007), s. 759–765, ISSN: 0160-4120
- [23] Naidoo, V. et al.: *Veterinary diclofenac threatens Africa's endangered vulture species*; Regulatory Toxicology and Pharmacology, 53 (2009), s. 205–208, ISSN: 0273-2300
- [24] Oaks, J. L., et al.: *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*; Nature, 427 (2004), s. 630-633, ISSN: 0028-0836
- [25] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/12563> [staženo 7. 2. 2011]
- [26] Sedlák, E.: *Zoologie bezobratlých*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2000, ISBN: 80-210-2396-1
- [27] Rosypal, S., a kol.: *Fylogeneze, systém a biologie organismů*, Státní pedagogické nakladatelství v Praze, 1992, s. 744, ISBN: 80-04-22815-1
- [28] Jírovec, O.: *Protozoologie*, Nakladatelství československé akademie věd, Praha, 1953, s. 643
- [29] Hausmann, K., Hulsmann, N.: *Protozoologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1996, s. 347, ISBN: 80-200-0978-7
- [30] [http://www.biohidrica.cl/assay\\_protokit.htm](http://www.biohidrica.cl/assay_protokit.htm) [staženo 14.2.2011]
- [31] [http://www.ebpi.ca/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54&Itemid=68](http://www.ebpi.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=68) [staženo 7. 2. 2011]
- [32] <http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/organisms/protifera/gbrachionus/brachionuscalyciflorus/brachionuscalyciflorus.html> [staženo 7. 2. 2011]
- [33] [http://www.biotox.cz/botanicus/index.php?id=bph\\_0205](http://www.biotox.cz/botanicus/index.php?id=bph_0205) [staženo 12.02.2011]
- [34] Jahodář, L.: *Farmakobotanika- semenné rostliny*, Nakladatelství Karolinum, Praha 2009, s. 264, ISBN: 978-80-246-1791-6

- [35] Kincl, L., Kincl, M., Jakrlová, J.: *Biologie rostlin*, Nakladatelství FORTUNA Praha, Praha 1993, s. 111, ISBN: 80-7168-090-7
- [36] Benda, V., Babůrek, I., Žďárský, J.: *Biologie II.- Nauka o potravinářských surovinách*, Vysoká škola chemicko-technologická a Praze, Praha 2000, s. 196, ISBN: 80-7080-402-5
- [37] Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W., ed.: *New Microbiotest for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, Klumer Academie/Plenum Publishers, New York 2000, s. ISBN: 0-306-46406-3
- [38] [http://www.biohidrica.cl/pdfs/thamnotoxkit\\_f-protocol.pdf](http://www.biohidrica.cl/pdfs/thamnotoxkit_f-protocol.pdf)  
[staženo 13.2.2011]
- [39] [http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit\\_f-protocol01.pdf](http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit_f-protocol01.pdf)
- [40] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0089025>
- [41] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>  
[staženo 7.2.2011]
- [42] <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm>  
[staženo 13.02.2011]
- [43] Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H.: *Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants – occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea*, *The Science of The Total Environment*, 295 (2002), s. 131–141, ISSN: 0048-9697
- [44] Ternes, T.A.: *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, *Water Research*, 32 (1998), s. 3245–3260, ISSN: 0043-1354
- [45] Paxéus, N.: *Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, b-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment*, *Water Science and Technology*, 50 (2004), s. 253–260, ISSN: 0273-1223



- [46] Manusadžianas, L., et al.: *Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices*, *Aquatic Toxicology*, 63 (2003), s. 27 – 41, ISSN: 0166-445X
- [47] Ferrari, B., et al.: *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 (2003), s. 359–370, ISSN: 0147-6513
- [48] Brandhof, E.-J., Montforts, M.: *Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (2010), s. 1862–1866, ISSN: 0147-6513
- [49] Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.: *Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*)*, *Aquatic Toxicology*, 75 (2005), s. 53–64, ISSN: 0166-445X
- [50] Buser, H.-R., Poiger, T., Müller, M.D.: *Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake*, *Environmental Science & Technology*, 32 (1998), s. 3449–3456, ISSN: 0013-936X
- [51] přednášky ekotoxikologie, RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

## Abstrakt

Horáková Veronika, Ekotoxikologické hodnocení nesteroidního a protizánětlivého léčiva, (diplomová práce)

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie; celkový počet stran: 67

S narůstající spotřebou léčiv se stále více zvyšuje výskyt reziduí léčivých látek v životním prostředí, kde ovlivňují řadu organismů. V této práci byla sledována ekotoxicita diklofenaku. Pro hodnocení tohoto vlivu byly zvoleny čtyři testy toxicity – jeden akutní test (s *Thamnocephalus platyurus*), dva semichronické (s *Tetrahymena thermophila*, *Sinapis alba*) a jeden chronický (s *Brachionus calyciflorus*). Z těchto testů byly zjištěny hodnoty pro diklofenak: 24hEC<sub>50</sub> 5,058 mg/l - THAMNOTOXKIT F™, 24h EC<sub>50</sub> 32,88 mg/l (23,07 – 46,86 mg/l) při 492 nm – vícegenerační test s organismem *Tetrahymena thermophila*, 48h EC<sub>50</sub> 1,363 mg/l (0,7848 – 2,366 mg/l) – ROTOXKIT F CHRONIC, 72h IC<sub>50</sub> 71,42 mg/l (62,51 – 81,60 mg/l) – semichronický test se semeny *Sinapis alba*.

Klíčová slova: ekotoxikologie, diklofenak, *Tetrahymena thermophila*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus*, *Sinapis alba*

## Abstract

Horáková Veronika, Ecotoxicological evaluation of the non-steroidal and anti-inflammatory drug, (graduation thesis)

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology; total number of pages: 67

There is getting more higher occurrence of residuals of healing substance connected with growing consumption of medicals in our environment, where they influence a range of organisms. In this work the ecotoxicity of diclofenac was monitored. Four tests of toxicity were selected for evaluation of this influence – one acute test (with *Thamnocephalus platyurus*), two semi-chronic tests (with *Tetrahymena thermophila*, *Sinapis alba* seeds) and one chronic test (with *Brachionus calyciflorus*). Values for diclofenac have been found from these tests: 24hEC<sub>50</sub> 5,058 mg/l - THAMNOTOXKIT F<sup>TM</sup>, 24h EC<sub>50</sub> 32,88 mg/l (23,07 – 46,86 mg/l) at 492 nm – more generation test with organism *Tetrahymena thermophila*, 48h EC<sub>50</sub> 1,363 mg/l (0,7848 – 2,366 mg/l) – ROTOXKIT F CHRONIC, 72h EC<sub>50</sub> 71,42 mg/l (62,51 – 81,60 mg/l) – a semi chronic test with *Sinapis alba* seeds.

Key words: ecotoxicology, diclofenac, *Tetrahymena thermophila*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus*, *Sinapis alba*