

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

(rigorózní práce)

EKOTOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ LÉČIVA DIAZEPAMU
ECOTOXICOLOGICAL SCREENING OF DIAZEPAM DRUG

Vedoucí rigorózní práce: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Specialista: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

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

Hradec Králové 2015

Tereza Šilhavá

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). 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.“

V Hradci Králové dne 30.3.2015

.....

Tereza Šilhavá

Na začátku bych velmi ráda poděkovala RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za její profesionální přístup, odborné vedení a podporu, bez kterých by tato práce těžko vznikala. Mockrát děkuji.

Tato rigorózní práce vznikla za grantové podpory číslo: SVV - 260 - 184.

Obsah

1. ÚVOD.....	6
1.1. Úvod.....	6
1.2. Cíl práce	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Ekotoxikologie	8
2.1.1. Testy akutní toxicity	9
2.1.2. Testy chronické toxicity.....	10
2.1.3. Klasifikace toxicity	10
2.2. Diazepam.....	11
2.2.1. Benzodiazepiny.....	11
2.2.2. Diazepam (Valium).....	13
2.2.3. Spotřeba léčivých přípravků v ČR obsahující diazepam	15
2.2.3.1. Spotřeba v roce 2011	15
2.2.3.2. Spotřeba v roce 2012	16
2.2.3.3. Spotřeba v roce 2013	16
2.2.3.4. Spotřeba v roce 2014	16
2.2.3.5. Spotřeba tablet, inj. a rekt. roztoků v letech 2011 - 2013	16
2.2.4. Měsíční výdeje z veřejné lékárny základního typu v roce 2013	18
2.2.5. Přípravky obsahující diazepam na českém trhu.....	19
2.3. Testované organismy	19
2.3.1. <i>Brachionus calyciflorus</i> , Pallas.....	19
2.3.2. <i>Thamnocephalus platyurus</i> , Packard	21
2.3.3. <i>Desmodesmus subspicatus</i> , Chod.	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1. Testované organismy	26
3.1.1. <i>Brachionus calyciflorus</i> , Pallas.....	26
3.1.2. <i>Thamnocephalus platyurus</i> , Packard	26
3.1.3. <i>Desmodesmus subspicatus</i> , Chod.	26
3.2. Chemikálie, přístroje a pomůcky	26

3.2.1.	Chemikálie	26
3.2.2.	Přístroje	27
3.2.3.	Pomůcky	27
3.3.	Vlastní provedení experimentů	27
3.3.1.	Provedení experimentu Rotoxkit F Chronic	27
3.3.2.	Provedení experimentu Thamnotoxkit F TM	29
3.3.3.	Provedení řasového růstového inhibičního testu	31
4.	VÝSLEDKY TESTŮ	33
4.1.	Výsledky testu Rotoxkit F Chronic	33
4.2.	Výsledky testu Thamnotoxkit F TM	35
4.3.	Výsledky testu řasového růstového inhibičního testu	37
5.	DISKUZE	40
6.	ZÁVĚR	45
6.1.	Použitá literatura	47
	Abstrakt (CZ)	53
	Abstract (EN)	54

1. ÚVOD

1.1. Úvod

Dnešní moderní společnost klade neustále větší zátěž na životní prostředí. Neustále narůstá lidská populace a s ní jsou spjaté určité souvislosti.

Dnes již lidé neumírají kvůli diabetu typu I, protože existuje inzulin. Je možno transplantovat některé orgány také díky následnému celoživotnímu užívání imunosupresiv. Umíme léčit i vyléčit některé typy rakoviny a mnohé další nemoci, které byli dříve pro lidstvo smrtelné. Zároveň jsou léčivé přípravky (alespoň ve vyspělých zemích) často cenově dostupnější díky existenci generik po vypršení patentu originálních léčivých přípravků.

Musíme si ovšem uvědomit, že užitím léčivého přípravku člověkem (zvířetem) jeho efekt často nekončí. Léčivá látka se dále vylučuje ať už v nezměněném stavu, nebo ve formě metabolitu/ů (ty mohou být aktivnější nebo méně aktivní než samotná užitá léčivá látka) a ty pak dále mohou ovlivňovat organismy v životním prostředí a následně i nás díky potravnímu řetězci.

Léčiva je možné detekovat v povrchových vodách v množstvích od ng/l do µg/l. Avšak tyto koncentrace jsou většinou minimálně o 3 až 4 řády nižší než koncentrace mající farmakologický efekt (Heath, E. et al.; 2012).

Nesmíme ovšem zapomínat, že se léčivé látky nedostávají do prostředí jenom díky trávicímu/vylučovacímu traktu, kůží a plícemi. Často se lidé zbavují medikamentů nesprávným způsobem, a to vyhazováním do normálního odpadu nebo splachováním do odpadních vod namísto odnesení nepotřebných/prošlých léčivých přípravků do lékáren.

Ještě donedávna se zkoumání vlivu léčivé látky na životní prostředí nevěnovala téměř žádná pozornost. Nyní je situace lepší, ale stále ještě není ideální. Stále chybí velké množství dat. Nesmíme také zapomínat, že je potřeba získat poznatky i o vlivu směsí léčivých látek a ne jen o léčivé látce samotné.

1.2. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit vliv Diazepamu Slovakofarma 5 mg a standardu diazepamu na životní prostředí pomocí testů toxicity. Pro posouzení byl vybrán Rotoxkit F Chronic za použití konzumenta *Brachionus calyciflorus*, Thamnotoxkit FTM s konzumentem *Thamnocephalus platyurus* a růstový inhibiční test se zelenou řasou (producentem) *Desmodesmus subspicatus*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Ekotoxikologie

Jak je patrné ze samotného názvu, ekotoxikologie je vědní obor, který vychází z ekologie a toxikologie. Ovšem kromě těchto dvou zmíněných disciplín se využívají i poznatky mnoha disciplín dalších, například z lékařství, chemie, geologie, klimatologie, atd. (Anděl, P.; 2011).

Poprvé byl samotný termín ekotoxikologie použit francouzským členem akademie věd panem Reném Truhautem, a to zhruba na přelomu šedesátých a sedmdesátých let minulého století.

Rozdíl mezi toxikologií a ekotoxikologií je v tom, že zatímco toxikologie zkoumá vliv toxické látky na člověka, tak ekotoxikologie zkoumá vliv toxikantu na živé organismy, společenstva a ekosystémy s cílem využít tyto poznatky na jejich ochranu (Kočí, V. et al.; 2009).

Význam ekotoxikologie je naprosto zřejmý i z toho důvodu, že v dnešní době se těžko obejdeme bez použití chemických látek v životním prostředí. Díky tomu je nutné najít kompromis mezi použitím chemických látek a ochraně organismů. Jako příklady použití chemických látek lze uvést následující:

- tenčení ozonové vrstvy díky používání freonů a dalších látek
- používání umělých hnojiv, pesticidů, atd.
- narušováním vztahů mezi jednotlivými organismy (úbytek včel jako důsledek používání insekticidů)
- a mnoho dalších (Anděl, P.; 2011).

U látky je vždy důležité uvědomit si jaké má vlastnosti, zda se rozpouští ve vodě nebo v tucích, zda je náchylná k oxidaci, atd. tudíž je nutné znát její chemické, biologické a fyzikální vlastnosti, které ovlivňují koncentrace látky v životním prostředí. Na druhé straně je neméně důležité vědět, jak prostředí ovlivňuje samotné látky a jaká je možnost vystavení organismu látce (Komínková, D.; 2008).

Jedna ze speciálních odvětví ekotoxikologie je například hydroekotoxikologie, která zkoumá vliv přírodních látek a člověka na vodní organismy (Komínková, D.; 2008).

Ekotoxikologické biotesty je možné dělit podle více hledisek např.:

- podle doby expozice: akutní, semichronické (semiakutní) a chronické testy.
- podle trofické úrovně organismů: testy s producenty, konzumenty a destruenty
- podle cílového ekosystému: sedimenty, půdní, sladkovodní, mořský.
- podle testované matrice: půda, vzduch, voda, odpad, atd.
- podle složitosti testovaného vzorku: směsi, čisté chemické látky, přírodní vzorky.
- podle pokročilosti designu testovacího systému: 1. generace - klasické testy, 2. generace - mikrobiotesty, 3. generace - biosondy, biosenzory a biomarkry
- podle počtu testovacích organismů: jednodruhové, vícedruhové s přírodními společenstvy nebo laboratorními směsmi druhů.
- dle sledované odpovědi: letální či subletální účinky, reprodukce, hodnocení fyziologické aktivity
- a další. (Kočí, V. et al.; 2009).

Je důležité si uvědomit, že doba působení látky ve smyslu akutní a chronické expozice může být různá pro různé organismy (rozdílná délka života). Např. expozice v řádech dní může znamenat pro ryby akutní expozici, avšak pro bakterii expozici chronickou (Kočí, V. et al.; 2009).

2.1.1. Testy akutní toxicity

U těchto testů se hodnotí relativní toxicita chemických látek na vybrané organismy při krátkodobé expozici různým koncentracím. Akutní toxicita se může projevit jako mortalita, nepohyblivost, ztráta rovnováhy a snížení růstu. Tyto testy se provádí jako závislé na čase (výstupem je 24h nebo 96hLC₅₀ nebo 48hEC) nebo jako nezávislé na čase, tzn. vystavení organismu účinkům látky pokračuje dokud dopad na organismus nemá ekonomický nebo jiný význam a může být podle toho determinován (Komínková, D.; 2008).

Mezi základní testy akutní toxicity patří následující testy:

- testy na perloočce *Daphnia magna* a rybce *Brachydanio rerio*, *Oryzias latipes*, *Poecilia reticulata* (Komínková, D.; 2008).

2.1.2. Testy chronické toxicity

Testy chronické toxicity umožňují sledovat vliv chemické látky po delší časový úsek. Vliv je většinou sledován po více vývojových stádiích nebo generací. Doba trvání testů chronické toxicity se může velmi lišit - např. 21 dnů pro *Daphnia magna* a až 300 dní pro ryby (Komínková, D.; 2008).

2.1.3. Klasifikace toxicity

Toxicita je schopnost látky způsobit poškození organismu a je neměnná v čase. Látka je buď za daných podmínek toxická nebo ne (Kočí, V. et al.; 2009).

Zákon č. 350/2011 Sb. zařazuje látku/směs v závislosti na intenzitě nebezpečných vlastností do jedné nebo více skupin nebezpečnosti:

a) výbušné látky nebo směsi, b) oxidující látky nebo směsi, c) extrémně hořlavé látky nebo směsi, d) vysoce hořlavé látky nebo směsi, e) hořlavé látky nebo směsi, f) vysoce toxické látky nebo směsi, g) toxické látky nebo směsi, h) zdraví škodlivé látky nebo směsi, i) žíravé látky nebo směsi, j) dráždivé látky nebo směsi, k) senzibilizující látky nebo směsi, l) karcinogenní látky nebo směsi, m) mutagenní látky nebo směsi, n) látky nebo směsi toxické pro reprodukci, o) látky nebo směsi nebezpečné pro životní prostředí.

Chemické látky a odpad se dále dle získaných hodnot klasifikují do tříd toxicity/nebezpečnosti/rizika odpadu.

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. č. 1: Systém klasifikace toxicity (Tsiridis, V. et al.; 2002).

Třída	TU	Riziko toxicity
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. č. 2: Systém klasifikace rizika odpadu vypuštěného do vodního prostředí (Persoone, G. et al.; 2003).

LC ₅₀	Hodnocení
< 1	vysoce toxický vodním organismům
> 1 < 10	toxický vodním organismům
> 10 < 100	mírně toxický vodním organismům
> 100	relativně netoxický

Tab. č. 3: Klasifikace chemikálií podle nebezpečnosti pro životní prostředí - vodní prostředí (Knight, D., J. et al.; 2003).

2.2. Diazepam

2.2.1. Benzodiazepiny

Před objevem benzodiazepinů se jako anxiolytika a sedativa používal meprobamát a barbituráty. Tyto látky ovšem byly vytěsněny benzodiazepiny, které mají širší terapeutický profil a ne příliš mnoho interakcí v porovnání s předcházejícími léčivými látkami (Lincová, D. et al.; 2007).

Chlordiazepoxid, jakožto první z benzodiazepinů, byl náhodně syntetizován na počátku 60. let dvacátého století v laboratořích farmaceutické firmy Hoffman - La Roche.

Od tohoto objevu se připravovaly a testovaly tisíce látek a zhruba 20 se jich používá v klinické praxi (Rang, H. P. et al.; 2012).

Základní chemická struktura benzodiazepinů se skládá ze sedmičlenného diazepinového kruhu spojeného s benzenovým jádrem, které může mít na 4 hlavních místech různé substituenty (Lincová, D. et al.; 2007).

Benzodiazepiny je skupina látek, které mají obecně následující účinky:

- způsobují anterográdní amnézii
- mají protikřečový efekt

- redukují svalový tonus a koordinaci
- navozují spánek a sedaci
- snižují úzkostné stavy a agresi (Rang, H. P. et al.; 2012)

Mechanismus účinku: Benzodiazepiny se vážou na vysoce afinitní místa na GABA_A - receptoru, čímž tak alostericky zesilují vazbu i účinek kyseliny γ -aminomáselné (GABA). (Navázáním GABA na GABA_A - receptor dojde k otevření kanálu pro chloridové ionty, které vstupem do buňky hyperpolarizují membránu, a tím dojde ke snížení excitability cílové buňky) (Lüllmann, H. et al.; 2012).

Nežádoucí účinky: přetrvání účinku do následujícího dne, závratě, deprese, pády, ataxie a léková závislost. Dlouhodobé užívání benzodiazepinů snižuje duševní výkonnost a vyvolává lékovou závislost (Perlík, F.; 2011).

Jednotlivé benzodiazepiny se velmi liší v délce účinku a mohou se velmi zhruba rozdělit na krátce-, středně- a dlouhodobě působící látky. Délka jejich působení samozřejmě ovlivňuje jejich použití (Rang, H. P. et al.; 2012).

Účinná látka	Eliminační poločas (h)	Doba působení	Použití
midazolam	2-3	krátká	i.v. celkové anestetikum, p.o. hypnotikum
oxazepam	6-10	krátká	anxiolytikum
alprazolam	8-14	střední	anxiolytikum
lorazepam	8-24	střední	anxiolytikum
nitrazepam	15-30	střední	hypnotikum
diazepam	30-80	dlouhá	anxiolytikum, myorelaxans, antiepileptikum

Tab. č. 4: Doba působení vybraných benzodiazepinů a jejich hlavní použití (Perlík, F., ©; 2011).

2.2.2. Diazepam (Valium)

ATC klasifikace diazepamů:

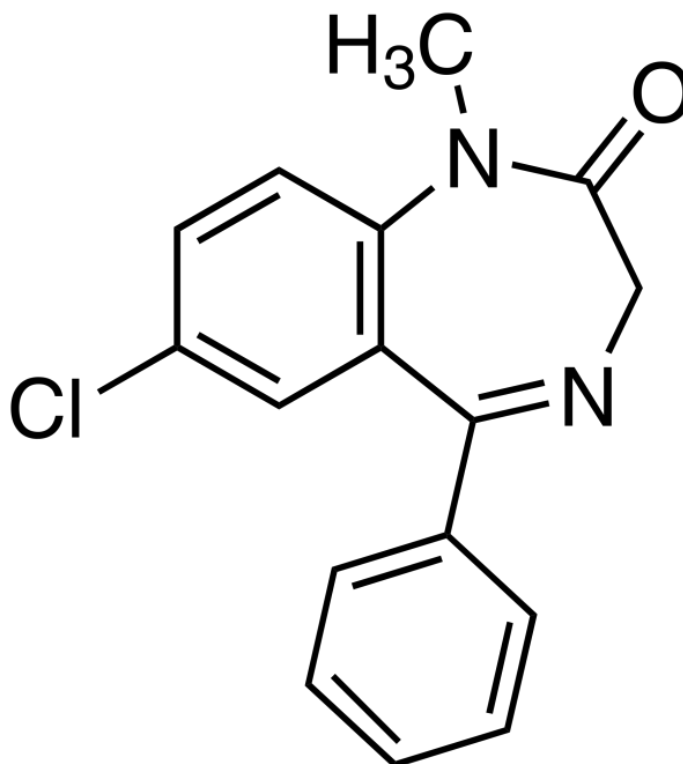
N	Nervový systém
N05	Psycholeptika
N05B	Anxiolytika
N5BA	Benzodiazepinové deriváty
N05BA01	Diazepam

(Kašparová, L. et al.; 2009, upraveno)

Léčivá látka diazepam (a řada dalších benzodiazepinů) byla objevena ve společnosti La Roche Dr. Leem Šternbachem, kterému roku 1941 firma Hoffmann-La Roche pomohla uprchnout před nacizmem do USA, jelikož byl židovského původu. Roku 1963 byl diazepam pod obchodním názvem Valium schválen a stal se velmi populárním (<http://en.wikipedia.org>).



Obrázek č. 1: Diazepam (Roche) vyráběný pod obchodním názvem Valium ©
(<http://www.drugvalley.com>, ©)



Obrázek č. 2: Diazepam – chemický vzorec

chemický vzorec: 5-fenyl-7-chlor-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-on

Sumární vzorec: C₁₆H₁₃ClN₂O

CAS 439-14-5

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% (<http://www.lekopis.cz>).

Mechanismus účinku: viz výše (benzodiazepiny)

Farmakokinetika: Rychle se vstřebává z trávicího systému, maximální koncentraci v plazmě dosahuje za 0,5 – 2 hodiny, silně se váže s proteiny krevní plazmy (98 – 99 %); biotransformací v játrech vzniká několik aktivních metabolitů s různým biologickým poločasem (hlavním aktivním metabolitem je desmethyldiazepam – nordazepam). Průměrný poločas diazepamu v plazmě je 30 hodin (20 – 100 h). Diazepam se lehce rozpouští v tukové tkáni, přechází hematoencefalickou bariérou a je poměrně rychle redistribuován do tukové tkáně. Nebyla zjištěna jednoduchá korelace mezi plazmatickou koncentrací diazepamu nebo jeho metabolitů a terapeutickým efektem.

Asi 10 % se vylučuje stolicí, zbytek močí, převážně ve formě metabolitů (SPC diazepam, <http://www.sukl.cz>)

Indikace: Diazepam se hlavně používá k léčbě úzkosti. Dále se mimo jiné používá jako myorelaxans, antikonvulzivum (při status epilepticus a léky navozené záchvaty), sedativum a hypnotikum. Následně může být také použit samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivými přípravky při analgosedaci (Dodd-Butera, T. et al.; 2005).

Kontraindikace: přecitlivělost na diazepam nebo jiné benzodiazepiny, požívání alkoholu v průběhu terapie, akutní nebo závažná chronická respirační nedostatečnost, současné terapie ritonavirem, syndrom spánkové apnoe, glaukom s uzavřeným úhlem, těhotenství, kojení; zvýšené opatrnosti je třeba u myasthenia gravis; opatrnosti je třeba u chronické respirační nedostatečnosti, těžké poruchy funkce jater nebo ledvin, u pacientů starších 65 let (Anders M. et al.; 2009).

Nežádoucí účinky: ospalost a závratě následující den, ataxie a zmatenost, amnézie, nárůst agrese, závislost, svalová slabost; ojediněle: bolest hlavy, hypotenze, poruchy vidění, atd. (British National Formulary; September 2011).

Lékové interakce: Při aplikaci diazepamu současně se solí lithia byla pozorována výrazná hypotermie. Cimetidin prodlužuje biologický poločas diazepamu. Dosud nebyla ujasněna vhodnost kombinace s thymoleptiky, proto je vhodnější se takovému postupu a kombinaci vyhnout. Při neuroleptických procedurách může zmírňovat některé extrapyramidální příznaky (SPC diazepam, <http://www.sukl.cz>).

Rifampicin způsobuje významné zvýšení metabolismu diazepam (Baxter, K.; 2012).

2.2.3. Spotřeba léčivých přípravků v ČR obsahující diazepam

2.2.3.1. Spotřeba v roce 2011

V roce 2011 se spotřebovalo celkem 373 385 balení (injekce, tablety, rektální roztoky), což odpovídá 5 740 813 definovaným denním dávkám (DDD) za cenu 18 356 525 Kč (počítáno bez obchodní přírážky a DPH) (<http://www.sukl.cz/rok>).

2.2.3.2. Spotřeba v roce 2012

V roce 2012 se oproti roku 2011 spotřebovalo balení méně než v předešlém roce, a to 350 191 balení (injekce, tablety, rektální roztoky), což odpovídá 5 308 456 definovaným denním dávkám (DDD) za cenu 19 048 770 Kč (opět počítáno bez obchodní příirážky a DPH) (<http://www.sukl.cz/rok>).

2.2.3.3. Spotřeba v roce 2013

Po menším propadu v roce 2012 se spotřeba balení téměř shoduje s rokem 2011, jelikož bylo spotřebováno 373 835 balení (injekce, tablety, rektální roztoky), což odpovídá 5 603 835 definovaným denním dávkám (DDD) za cenu 20 183 239 Kč (bez obchodní příirážky a DPH) (<http://www.sukl.cz/rok>).

2.2.3.4. Spotřeba v roce 2014

Informace o spotřebě v roce 2014 v době sepisování této práce obsahovaly údaje za 3 čtvrtletí roku 2014. Ovšem dá se předpokládat, že spotřeba bude podobná jako v předešlých letech (2011 - 2013) (<http://www.sukl.cz/rok>).

2.2.3.5. Spotřeba tablet, inj. a rekt. roztoků v letech 2011 - 2013

a) Injekce (Apaurin)



Obr. č. 3: Apaurin injekce (<http://www.lekarna-doktorka.cz>, ©).

Období	Počet balení	DDD celkem	Finance bez OP a DPH
2 011	9 128	91 280	391 823
2 012	8 665	86 647	387 832
2 013	9 102	91 031	414 033

Tab. č. 5: Spotřeba injekcí (<http://www.sukl.cz/rok>, upraveno)

b) Perorální tablety (Diazepam Slovakofarma 10 a 5 mg)



Obrázek č. 4: Diazepam tablety (<http://www.docsimon.cz>, ©)

Období	Počet balení	DDD celkem	Finance bez OP a DPH
2 011	354 426	5 610 490	16 380 759
2 012	331 884	5 183 590	17 121 150
2 013	352 734	5 465 247	18 432 761

Tab. č. 6: Spotřeba perorálních tablet (<http://www.sukl.cz/rok>, upraveno)

c) Rektální roztoky (Diazepam desitin rectal tube 10 a 5 mg)



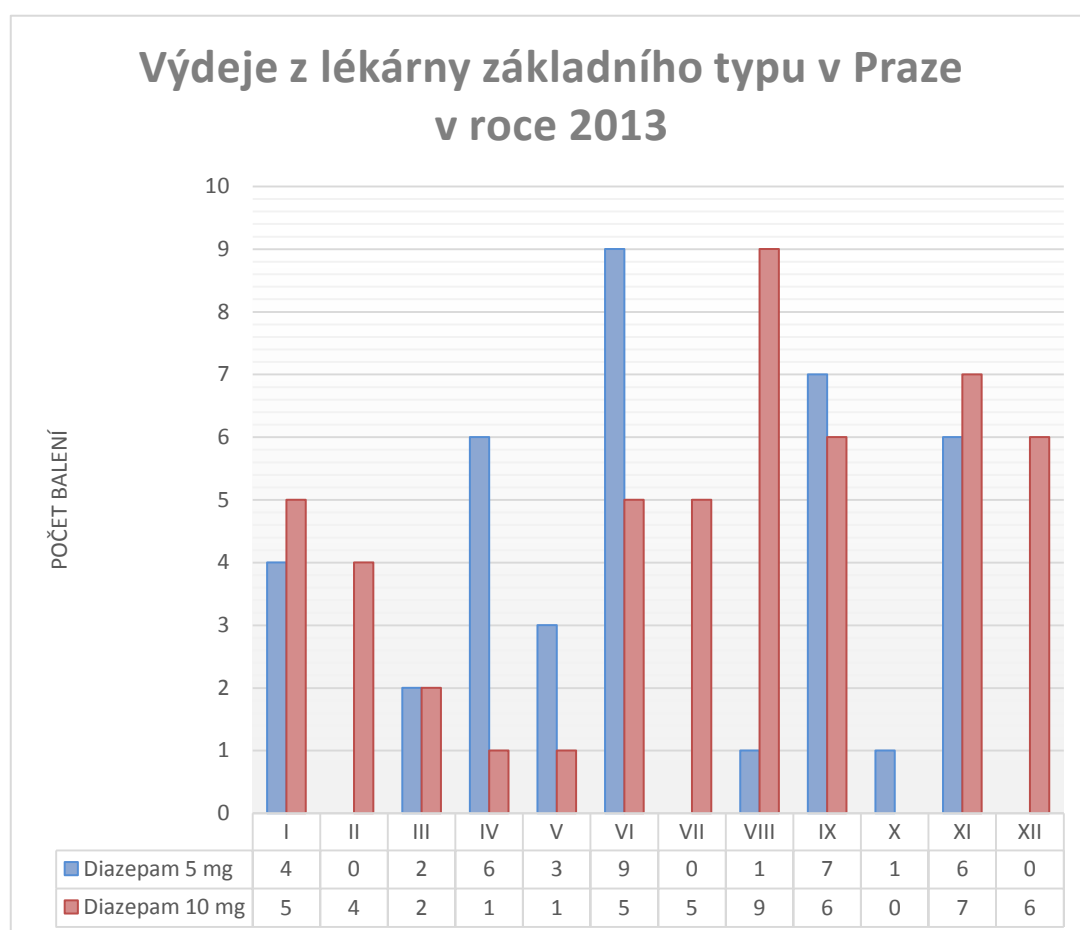
Obr. č. 5: Rektální roztoky diazepamu (<http://www.desitin.cz>, ©)

Období	Počet balení	DDD celkem	Finance bez OP a DPH
2 011	9 831	39 043	1 583 943
2 012	9 642	38 217	1 539 788
2 013	11 999	47 558	1 336 446

Tab. č. 7: Spotřeba rektálních roztoků
(<http://www.sukl.cz/rok>, upraveno)

Z výše uvedených tabulek je zřejmé, že spotřeba perorálních tablet jednoznačně převládá nad ostatními léčivými přípravky.

2.2.4. Měsíční výdeje z veřejné lékárny základního typu v roce 2013.



Graf. č. 1: Výdeje z lékárny základního typu v Praze v roce 2013

2.2.5. Přípravky obsahující diazepam na českém trhu

Na českém trhu jsou v současné době dostupné následující přípravky obsahující léčivou látku diazepam:

Apaurin	INJ SOL 10X2ML/10MG
Diazepam desitin rectal tube 10 mg	RCT SOL 5X2.5ML/10MG
Diazepam desitin rectal tube 5 mg	RCT SOL 5X2.5ML/5MG
Diazepam Slovakofarma 10 mg	POR TBL NOB 20X10MG
Diazepam Slovakofarma 5 mg	POR TBL NOB 20X5MG

Tab. č. 8: Přípravky obsahující diazepam na českém trhu (<http://www.sukl.cz/modules>, upraveno).

Všechny přípravky uvedené v tabulce jsou vázány na lékařský předpis a jsou hrazené zdravotními pojišťovnami. Diazepam je dále zmíněn v Zákoně o návykových látkách (167/1998 Sb. a o změně některých dalších zákonů).

Jak vidíme z výše uvedené tabulky, léčivý přípravek Diazepam Slovakofarma 2 mg již není na českém trhu registrován.

2.3. Testované organismy

2.3.1. *Brachionus calyciflorus*, Pallas

Taxonomické zařazení:

Říše:	Animalia
Podříše:	Metazoa
Kmen:	Aschelminthes (Hartman, P. at al.; 1998)
Třída:	Rotatoria
Podtřída:	Eurotatoria
Nadřád:	Monogononta
Řád:	Ploima
Čeleď:	Brachionidae
Rod:	Brachionus

(Bartoš, E.; 1959)

Vířníci jsou rozšířeni po celém světě, v Evropě je známo více než 1 000 druhů. Tyto organismy jsou většinou sladkovodní, žijící v mokrých nebo vlhkých oblastech. V

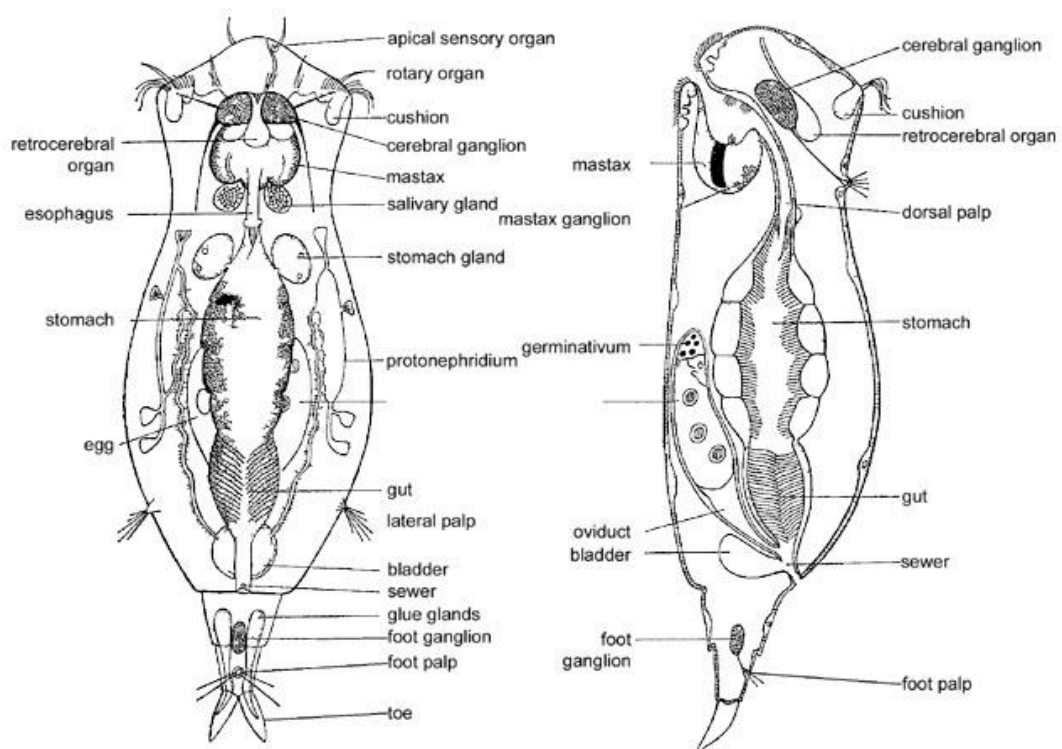
suchých obdobích jsou schopni přežít i několik let tím, že se zapouzdří a přečkají sucho v dormantním režimu (Kriska, G.; 2013).

Vířníci mají nečlánkovité tělo kryté kutikulou (často ztlustělá vytvářející krunýř). Ztracené části těla nelze regenerovat, jelikož tělo má stálý počet buněk (eutelie) (Hartman, P. et al.; 1998).

Velikost těla: 25 μm - 2 mm, ovšem většina vířníků dosahuje délky kolem 200 - 400 μm (velikost podobná obrněným prvokům).

Stažitelné tělo vířníků se dělí na 3 (vzácně 4) segmenty: hlava (krk), tělo a noha.

Hlava nese nápadnou korunu tvořenou brvami a smyslovými štětínami. Tato koruna slouží k pohybu vířníka a zároveň přihání potravu k ústnímu otvoru (Kriska, G.; 2013).



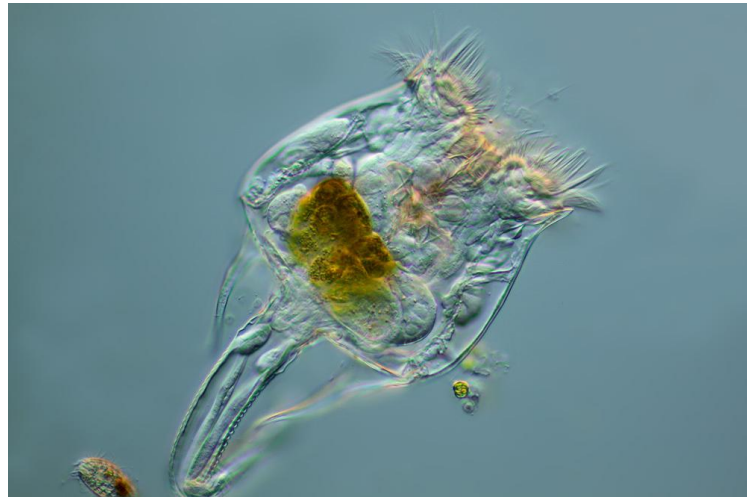
Obr. č. 6: Stavba těla vířníků (<http://www.cladocera.de>, ©).

Vířníci jsou odděleného pohlaví. Vajíčka se ovšem většinou vyvíjejí partenogeneticky. Samečci jsou mnohem menší než samičky a ani nemají trávicí trakt. Po oplození vajíček samečky vznikají zimní vajíčka se silnou blánou. Tato vajíčka

mohou přečkávat i nepříznivé podmínky (zamrznutí, vyschnutí, nedostatek kyslíku) (Hartman, P. et al.; 1998).

Vířníci se široce uplatňují v ekotoxikologii, jak naznačuje práce od Terry W. Snella a Colina R. Janseena (1995), kde se tito autoři pokusili shrnout práce vykonané za použití vířníků (endopointy např. mortalita, chování, rozmnožování, atd.).

Gilbert a Walsh (2005) studovali chování 4 geografických kmenů *B. calyciflorus* (z Texasu, Floridy, Georgie a Austrálie) při rozmnožování a také jejich genetickou rozdílnost. V rámci práce zjistili, že kmeny z Floridy a Georgie kopulovali mezi sebou a také analýza DNA potvrdila podobnost těchto dvou kmenů. Oproti tomu kmeny z Floridy, Texasu a Austrálie mezi sebou nekopulovali. DNA analýza zároveň potvrdila genetickou rozdílnost.



Obr. č. 7: *Brachionus calyciflorus* (<http://aquanetviet.org>, ©).

2.3.2. *Thamnocephalus platyurus*, Packard

Taxonomické zařazení:

Říše:	Animalia
Podříše:	Metazoa
Kmen:	Arthropoda
Podkmen:	Crustacea
Třída:	Anostraca

(Hartman, P. et al.; 1998)

Tělo mnohobuněčných je složeno z většího počtu buněk, které jsou sdruženy ve specializované tkáni. Celá tato skupina je rozdělena do 3 hlavních podskupin:

fagocytelovci, houbovci a tkáňovci. Tkáňovci (Eumetazoa) se člení na 2 pododdělení: paprscíté a dvoustranné. Mezi dvoustranné patří např. kroužkovci, ploštěnci, měkkýši, členovci, atd. (Ambrožová, J.; 2001).

Členovci jsou největším kmenem bezobratlých a živočichů vůbec, suchozemští, vodní i pohyb ve vzduchu. Velikost je velmi různá (Šifner, F.; 2004).

Tělo je pokrytu kutikulou (obsahuje chitin), která vytváří vnější kostru. Tělo je vnitřně i z vnějšku rozděleno na články, které se sdružují ve funkční celky (hlava, hrud', zadeček, trup) (Hartman, P. et al.; 1998).

Na každém článku je původně pár členěných končetin (arthropodie).

Nervová soustava je gangliová, každému článku odpovídá jeden ganglion (Šifner, F.; 2004).

Mají otevřený krevní systém. Ve vodním prostředí dýchají buď celým povrchem těla, nebo žábry, které jsou nejčastěji umístěny na nohou. K dýchání kyslíku z ovzduší se vyvinuly různé typy plic, nejdokonalejší jsou tracheje (Hartman, P. et al.; 1998).

Žábřonožky mají podlouhlé tělo tvořené hlavou, hrudí (11 článků) a zadečkem (9 článků) s furkou (vidlice). Nemají krunýř. Hrudní nožky mají několik funkcí: pohyb, příjem potravy, dýchání i smyslová funkce. Živí se organickým detritem a drobnými organismy (filtrace z vody) (Hartman, P. et al.; 1998).

Žábřonožky plavou většinou hřbetem dolů. Je u nich vyvinut výrazný pohlavní dimorfismus. Samci mají mohutné antény, samice mají nápadné vaječné vaky (lokalizované na zadečku). Z vajíček se líhnou naupliové larvy (Hartman, P. et al.; 1998).

Thamnocephalus platyurus pochází ze Severní Ameriky, ale používá se v mnoha laboratořích při testech toxicity. Výhodou testů je dostupnost klidových stádií (Kočí, V. et al.; 2009).



Obr. č. 8: *Thamnocephalus platyurus* (<http://www.ebpi.ca>, ©).

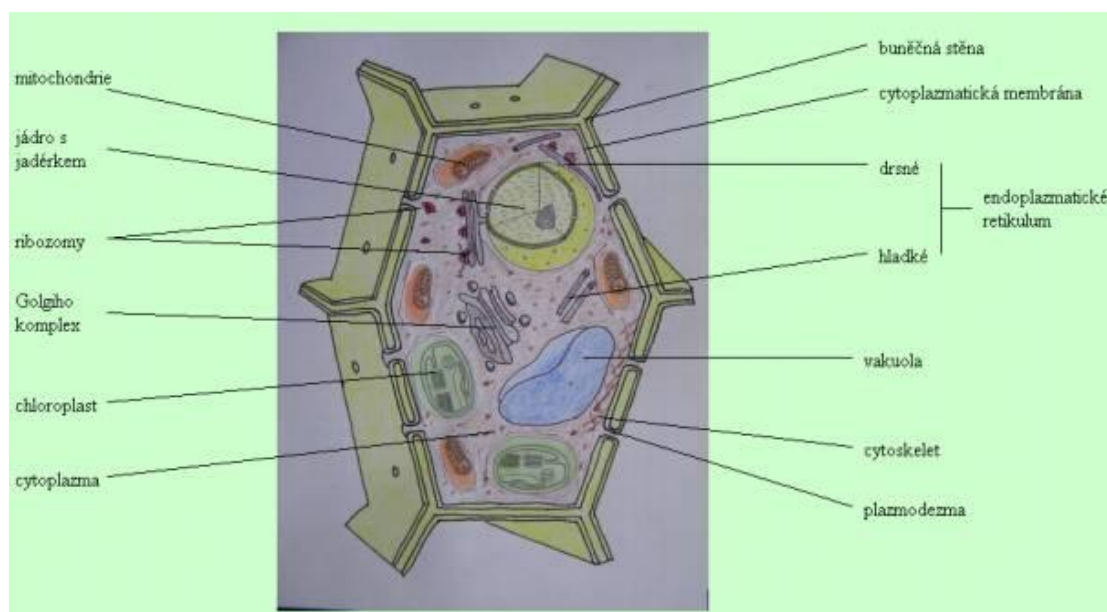
2.3.3. *Desmodesmus subspicatus*, Chod.

Taxonomické zařazení:

Říše: Eukaryota
Oddělení: Chlorophyta
Třída: Chlorophyceae
(Kalina, T.; 1994)

Buňky eukaryotických organismů jsou podstatně větší (3-100 i více mikrometrů).

Buněčná stěna řas, hub a lišejníků je polysacharidová, protoplast pokrývá plazmalema (plazmatická membrána). V protoplastu rozlišujeme jádra a cytoplazmu s četnými organelami (Kalina, T.; 1994).



Obr. č. 9: Rostlinná - eukaryotická buňka (<http://elearning.scio.cz>, ©).

Dělení jádra probíhá dvojitým způsobem - mitózou a meiózou.

Mikrotubuly patří k charakteristickým strukturám eukaryotických buněk. Vystupují v souvislosti s dělením jádra (vřeténko) a dělením buňky, zakládají hlavní struktury bičíku a vytvářejí vnitrobuněčný systém, cytoskeleton, který určuje tvar buňky a směr vnitrobuněčných transportů.

Mitochondrie řas a hub jsou oválné, tyčinkovité i dlouze vláknité a větvené, prorůstají celou buňku.

Chloroplasty (plastidy, chromatofory) nacházíme pouze v buňkách fotoautotrofních řas, mechorostů a cévnatých rostlin. Jejich hlavní funkcí je fotosyntéza.

Zelené řasy (Chlorophyta) tvoří začátek mohutné a složitě diferencované vývojové větve směřující k zeleným rostlinám (Kalina, T.; 1994).

Třída Chlorophyceae se vyznačuje obrovskou šíří, a tudíž nemají společnou ekologii, snad jen to, že velká většina zástupců jsou sladkovodní typy, ale zahrnuje také značné množství zástupců půdních, aerických a extrémofilních (<http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyceae>).

Chloroplasty zelených řas jsou většinou vybaveny pyrenoidem (bílkovinné tělíčko lokalizované v chloroplastu).

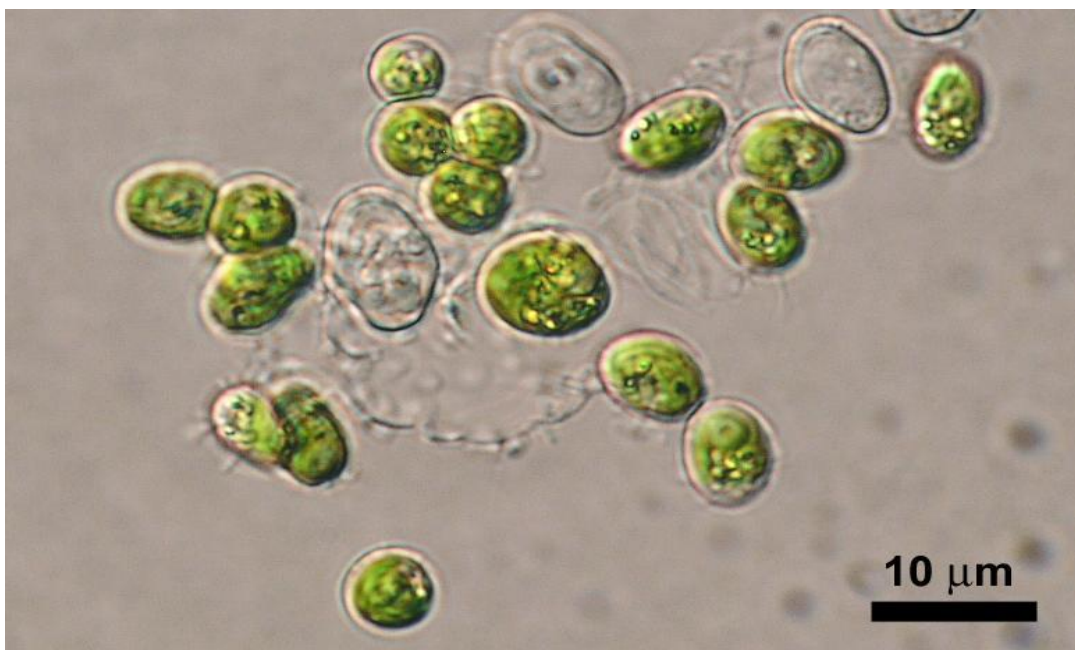
Hlavní zásobní látkou zelených řas je škrob (α -1, 4 - glukán) uložený v chloroplastech nebo na povrchu pyrenoidu (Kalina, T.; 1994).

Scenedesmus je na počet druhů nejbohatší rod zelených řas (zhruba 150). Většinou se jedná o planktonní druhy. Pro rod *Scenedesmus* je typické sdružování buněk do coenobií po 4, eventuelně po 8, velmi vzácně po 16. Typy, u nichž mohou z různých pólů trčet do prostoru nejrůznější ostny, byly přearazeny do rodu *Desmodesmus* (<http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyceae>).

Rod *Desmodesmus* je charakterizován plochými koloniemi, pro které je typické:

- kolonie jsou rovné nebo lehce zakřivené s buňkami v jedné řadě
- obvykle jsou tvořeny 2, 4 nebo 8 buňkami (vzácněji 16 nebo 32)
- buňky jsou vejčité až elipsoidní, se zaoblenými hroty, a nesoucí dlouhé ostny

Rozmnožování je hlavně asexuální pomocí autospór (<http://www.nhm.ac.uk>).



Obr. č. 10: *Desmodesmus subspicatus* (<http://ccala.butbn.cas.cz>, ©)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Testované organismy

3.1.1. *Brachionus calyciflorus*, Pallas

Tento sladkovodní vírník (ve formě cyst) byl součástí balení toxkitu Rotoxkit F Chronic od společnosti MicroBioTests Inc., Belgie

3.1.2. *Thamnocephalus platyurus*, Packard

Thamnocephalus platyurus je žábřonozka, která je součástí planktonu. Test Thamnotoxkit (společnost MicroBioTests Inc., Belgie) již obsahuje cysty tohoto členovce.

3.1.3. *Desmodesmus subspicatus*, Chod.

Zelená řasa z kultivace Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

3.2. Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.2.1. Chemikálie

- *Diazepam Slovakofarma 5 mg* (testovaný léčivý přípravek)
 - popis balení: krabička, obsahující 20 tablet ve dvou blistrech (2x10 tablet)
 - léková forma: bílé, ploché tablety (číslo 5 na jedné straně, na straně druhé půlící rýha)
 - složení (účinná látka, látky pomocné): diazepam, monohydrát laktosy, kukuřičný a bramborový škrob, glycerol, želatina, kalcium stearát a sodná sůl karboxymethylškrobu (SPC diazepam, <http://www.sukl.cz>)
- *Diazepam* (standard účinné látky)
 - dodáno od: Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové

- *další chemikálie:* dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$), deionizovaná voda

3.2.2. **Přístroje**

Inkubátor, vortex, analytické váhy, spektrofotometr, chladnička, mikroskop, počítač, ultrazvuková lázeň

3.2.3. **Pomůcky**

Zkumavky, stojan na zkumavky, váženky, kádinky, laboratorní lžičky, lihové popisovače, filtrační papír, mikropipety, černý papír

3.3. **Vlastní provedení experimentů**

V rámci rigorózní práce jsme zjišťovali toxicitu diazepamu pomocí následujících testů:

- Rotoxkit F Chronic
- Thamnotoxkit FTM
- Řasový růstový inhibiční test

3.3.1. **Provedení experimentu Rotoxkit F Chronic**

Tento 48 hodinový test chronické toxicity se obecně používá díky své univerzálnosti pro všechny odpady a chemikálie jak v suchozemském prostředí, tak i v prostředí vodném. Jeho předností je rychlost, nenáročnost a citlivost za nízkou cenu.

Testovaný organismus:

Jako testovaný organismus jsme v testu používali vířníka *Brachionus calyciflorus*, který žije ve sladkovodním prostředí. Vířník je již dodáván ve formě cyst (nutnost skladování v chladničce při 4 °C, ve tmě; tytéž podmínky skladování platí pro řasy a matrix rozpouštějící médium) jako součást balení Rotoxkit F Chronic.

Princip testu:

Hodnotila se reprodukční schopnost vířníků (vylíhlých z cyst) v přítomnosti testované látky po dobu 48 hodin. Hodnota EC₅₀ sloužila jako ukazatel toxicity.

Balení toxkitu:

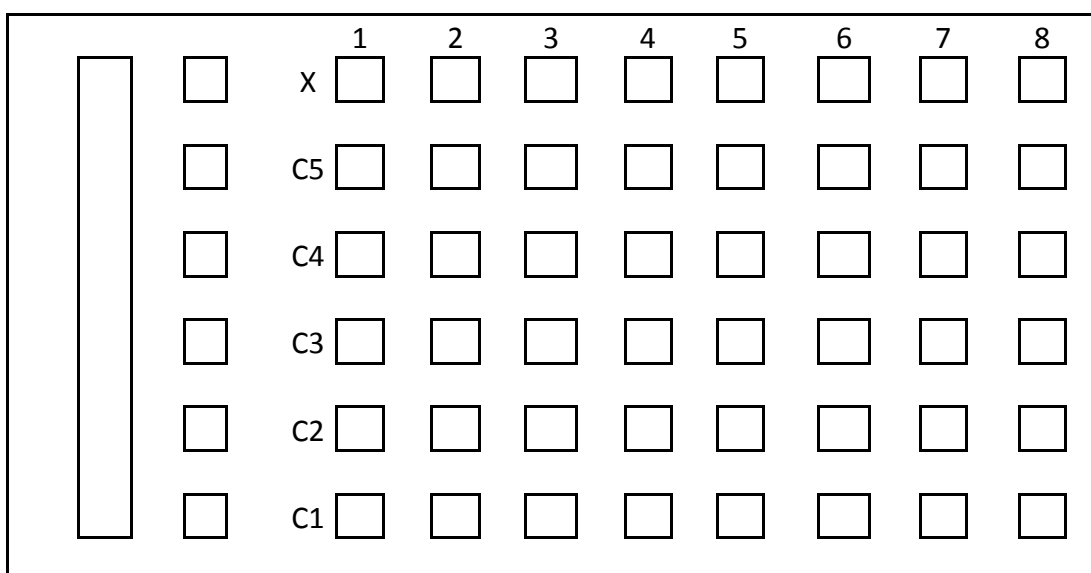
Balení toxkitu obsahovalo skoro vše, co bylo k provedení testu nezbytné (vířníky, řasy, koncentrované roztoky solí, zkumavky s Roti-Rich práškem, Lugolův roztok, jamkové destičky, atd.). Kromě testu jsme ještě potřebovali inkubátor, mikroskop, centrifugu a běžné laboratorní sklo.

Příprava před zahájením testu:

Před zahájením testu jsme museli připravit standardní vodu = EPA médium (smícháním koncentrovaných roztoků solí - NaHCO_3 , CaSO_4 a MgSO_4 a deionizované vody), nechat vylíhnout vířníky z cyst (líhnutí probíhá v líhnoucí jamce a trvá 16-18 hodin v inkubátoru za osvětlení) pomocí standardní vody a vířníky následně nakrmit Roti-Rich suspenzí (zvýšení reprodukční schopnosti vířníků). Dále jsme museli ještě připravit řasy (krmivo vířníků během testu) rozvolněním z matrix a koncentrace testované látky (naředěním zásobního roztoku standardní vodou). Do každé zkumavky obsahující koncentrace jsme přidali řasy.

Vlastní provedení testu:

Při provedení testu jsme použili jamkové destičky, jež byly součástí toxkitu (viz. obrázek).



Obr. č. 11: (Popis destičky: zleva - 1 podlouhlá líhnoucí jamka, 6 promývacích jamek, 48 testovacích jamek; X - kontrola, 1 - 8 paralelní stanovení, C1 (nejvyšší) - C5 (nejnižší) koncentrace látky)

Každou jamku v řadě jsme plnili 1 ml testované látky příslušné koncentrace (kontrola 1 ml standardní vody v každé jamce). Poté jsme z líhnuocí jamky přendali vylíhlé aktivní vířníky do promývacích jamek (pod mikroskopem) v počtu 10 - 15 (předtím jsme ještě sesbírali skořápky po vylíhnutí filtračním papírem), abychom předešli zředění v testovacích jamkách. Následně jsme pomocí polyethylenové mikropipety umístili po 1 vířníku do každé jamky.

Destičky s naplněnými jamkami jsme přikryli parafilmem a umístili do inkubátoru na 48 hodin při teplotě 25 °C.

Vyhodnocení testu:

Výsledkem tohoto testu byl výpočet procentuální inhibice růstu.

Po uplynutí 48 hodin od umístění vířníků do inkubátoru jsme spočítali uhynulé jedince. Následně jsme přidali Lugolův roztok (fixační činidlo) pro lepší počítání celkového počtu vířníků (ROTOXKIT F CHRONIC).

V tomto experimentu byl testován diazepam ve formě standardu a jako tableta z léčivého přípravku Diazepam Slovakofarma 5 mg. Jako kontrola byl proveden test s dichromanem draselným.

3.3.2. Provedení experimentu Thamnotoxkit FTM

Tento test akutní vodní toxicity trvajících 24 hodin je vhodný pro testování chemických látek, odpadních vod a výluh odpadů jak ve sladkých, tak i slaných vodách. Jeho předností je opět rychlost, jednoduchost, citlivost a nízká cena.

Testovaný organismus:

V tomto testu se použily larvy členovce (žábronožky) *Thamnocephalus platyurus*, jenž byl součástí balení ve formě cyst (skladování v chladničce při teplotě 5°C +/- 2°C a v suchu).

Princip testu:

Vylíhlé larvy se vystavily na 24 hodin účinkům testované látky. Procentuální mortalita byla ukazatelem toxicity.

Balení toxkitu:

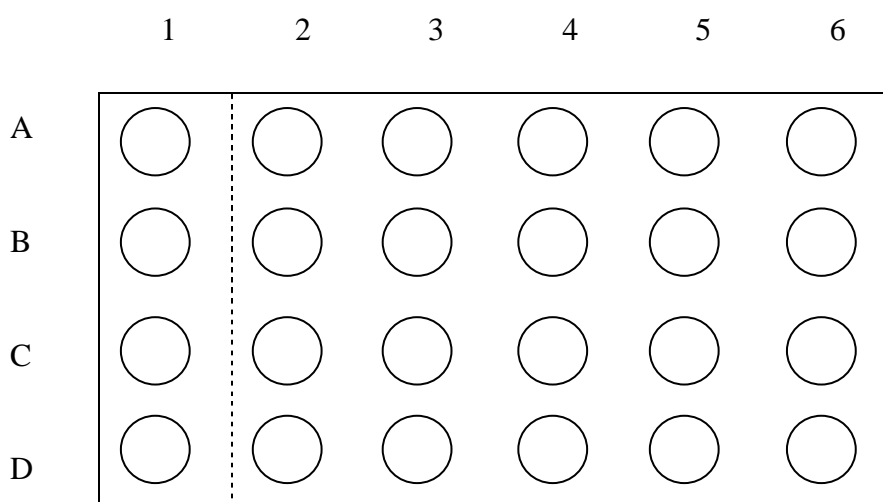
Balení testu obsahovalo vše pro provedení pokusu (cysty organismu, koncentrované roztoky solí, Petriho misky, atd.). Potřeba byl jen inkubátor, mikroskop a laboratorní sklo.

Příprava před zahájením testu:

Před zahájením testu jsme připravili standardní sladkovodní roztok (vznikl smícháním deionizované vody a koncentrovaných roztoků solí - NaHCO_3 , CaSO_4 , MgSO_4 , KCl), nechali vylíhnout organismy z cyst (24 hodin před začátkem testu pomocí zředěného standardního roztoku, líhnutí bylo v Petriho misce v inkubátoru) a připravili koncentrace testované látky (ze zásobního roztoku naředěním pomocí standardního média).

Vlastní provedení testu:

Jamková destička (viz. obrázek) se plnila zleva vždy po 1 ml do každé jamky nejdříve standardním sladkovodním roztokem (kontrola 1a-1d) a následně koncentracemi od nejnižší (2a-2d) po nejvyšší (6a-6d).



Obr. č. 12: (Popis destičky: sloupec 1 - kontrola, 2 - 6 jednotlivé koncentrace látky, A - D - paralelní stanovení)

Pod mikroskopem jsme vždy přenesli zhruba 50 larev pomocí polyethylenové pipety z Petriho misky do každé jamky řady D (D1 - D6). Pak jsme přendali vždy 10 larev do příslušných jamek stejného sloupce (A - C).

Po naplnění jsme destičku přikryli parafilmem, uzavřeli víčkem a vložili na 24 hodin do inkubátoru při teplotě 25°C.

Vyhodnocení testu:

Po uplynutí 24 hodin jsme spočítali počet uhynulých larev pod mikroskopem v každé jamce. Vypočítala se procentuální mortalita. Jako kontrola správnosti testu byl proveden test referenční toxicity s dichromanem draselným (THAMNOTOXKIT FTM).

3.3.3. Provedení řasového růstového inhibičního testu

Tento 3-denní test chronické toxicity je vhodný pro posouzení toxicity chemických látek a odpadů vypuštěných do vodního i suchozemského prostředí.

Testovaný organismus:

V tomto testu jsme použili zelenou řasu *Desmodesmus subspicatus*, která byla v iniciální koncentraci naředěna ze zásobní kultury dlouhodobě kultivované na Farmaceutické fakultě (původ: Botanický ústav Akademie věd České republiky, Vědecké pracoviště Třeboň) růstovým médiem.

Princip testu:

Řasy se vystavily na 72 hodin účinkům toxické látky. Vypočítala se procentuální inhibice růstu řas.

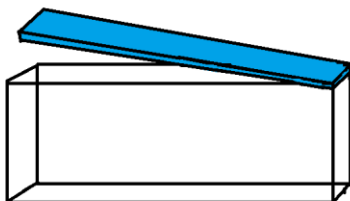
Příprava před zahájením testu:

Před vlastním zahájením testu jsme připravili koncentrace testované látky (C1 - C7) naředěním do kultivačního média. C0 (kontrola) obsahovala jen kultivační médium (US. EPA). Také jsme museli připravit řasové inokulum.

Vlastní provedení testu:

Do všech koncentrací testované látky (C1 - C7) jsme nakonec přidali řasové inokulum tak, aby byla koncentrace řas v každé podlouhlé kyvetě stejná ($1 \cdot 10^4$ řas v 1 ml).

Poté jsme podlouhlé kyvety přendali na táč v promíchaném (náhodném) pořadí a s víčky pootevřenými (výměna plynů) jsme je vložili do inkubátoru za stálého bočního osvětlení 10 000 luxů po dobu 72 hodin při teplotě 21 - 25 °C).



Obr. č. 13: Podlouhlá kyveta použitá pro inkubaci řas (0 - 72 hodin) s pootevřeným víčkem pro výměnu CO₂.

Pro každý toxikant jsme provedli 3 paralelní stanovení. Jako test referenční toxicity posloužil test s dichromanem draselným.

Vyhodnocení testu:

V Bürkerově komůrce pod mikroskopem jsme spočítali počet buněk vždy po 24, 48 a 72 hodinách (vždy po protřepání každé kyvety).

Ze 3 paralelních stanovení jsme vypočítali průměrné hodnoty počtů buněk (po 24, 48, 72 hodinách) a vypočetli inhibici nárůstu řas a inhibici růstové rychlosti pro každou koncentraci (ALGALTOXKIT FTM, OECD 201).

4. VÝSLEDKY TESTŮ

4.1. Výsledky testu Rotoxkit F Chronic

Experimentální podmínky: 25 °C, tma

Délka trvání testu: 48 hodin

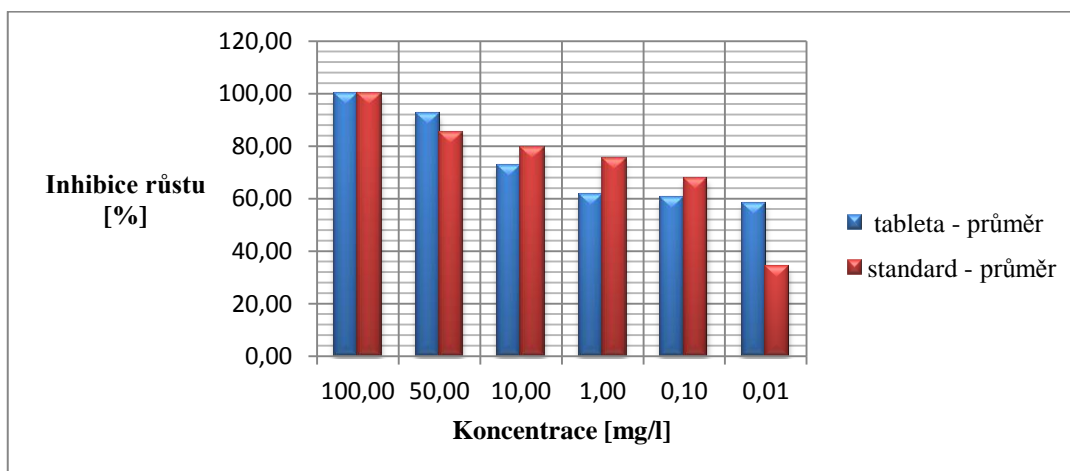
U testu s vířníkem *Brachionus calyciflorus* byly získány ze 3 měření následující hodnoty:

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice růstu [%]	2. měření Inhibice růstu [%]	3. měření Inhibice růstu [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	97,37	88,90	91,35	92,54	3,56
10,00	63,16	79,60	75,26	72,67	6,96
1,00	60,53	62,50	61,50	61,51	0,80
0,10	59,20	61,50	60,25	60,32	0,94
0,01	57,90	58,60	58,10	58,20	0,29

Tab. č. 9: Průměrné hodnoty procentuální inhibice růstu u tablety diazepamu

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice růstu [%]	2. měření Inhibice růstu [%]	3. měření Inhibice růstu [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	81,58	88,90	85,75	85,41	3,00
10,00	76,32	83,60	79,00	79,64	3,01
1,00	73,68	78,90	74,15	75,58	2,36
0,10	71,05	62,30	70,00	67,78	3,90
0,01	36,84	32,40	33,65	34,30	1,87

Tab. č. 10: Průměrné hodnoty procentuální inhibice růstu u standardu diazepamu



Graf č. 2: Procentuální inhibice růstu u tablety a standardu diazepamu.

Statisticky byly získány následující hodnoty:

- hodnota $48EC_{50}$ pro tabletu diazepamu: 0,008 mg/l (95% interval spolehlivosti 0,001 - 0,141 mg/l)
 - hodnota $48EC_{50}$ pro standard diazepamu: 0,034 mg/l (95% interval spolehlivosti 0,012 - 0,093 mg/l)
-
- hodnota $48EC_{50}$ pro dichroman draselný: 4,182 mg/l (95% interval spolehlivosti 3,182 - 5,497 mg/l)
 - hodnota $48EC_{50}$ pro dichroman draselný dle specifikačního listu: 5 mg/l (95% interval spolehlivosti 3,5 - 6,5 mg/l)

4.2. Výsledky testu Thamnotoxkit FTM

Experimentální podmínky: 25 °C, tma

Délka trvání testu: 24 hodin

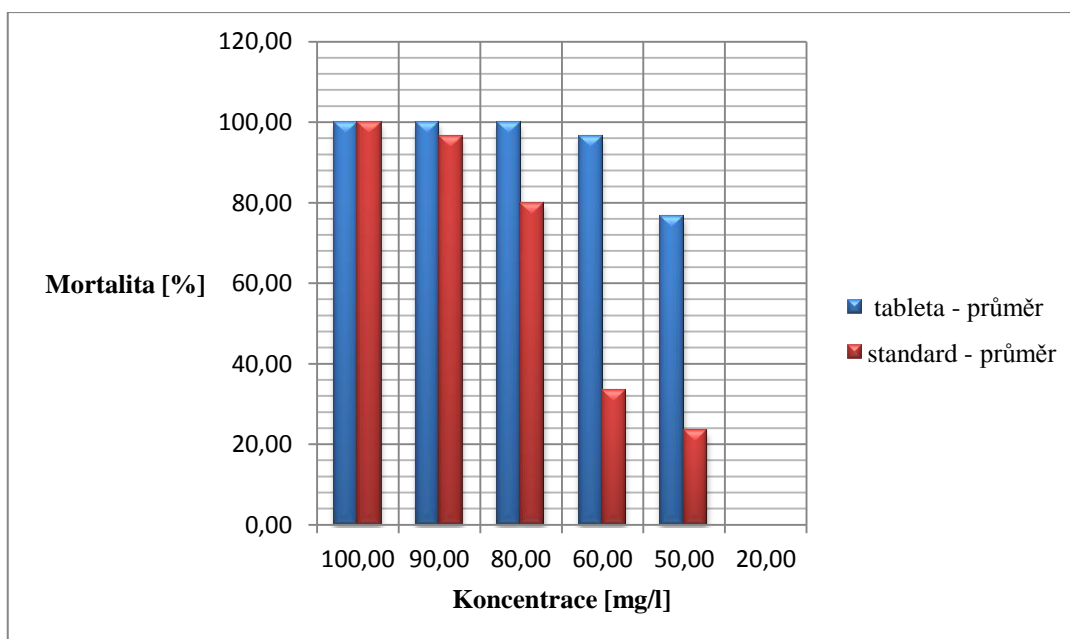
U testu s žábřonožkou *Thamnocephalus platyurus* byly získány ze 3 měření následující hodnoty:

Koncentrace [mg/l]	1. měření Mortalita [%]	2. měření Mortalita [%]	3. měření Mortalita [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
90,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
80,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
60,00	100,00	100,00	90,00	96,67	4,71
50,00	70,00	80,00	80,00	76,67	4,71
20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. č. 11: Průměrné hodnoty procentuální mortality u tablety diazepamu

Koncentrace [mg/l]	1. měření Mortalita [%]	2. měření Mortalita [%]	3. měření Mortalita [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
90,00	100,00	90,00	100,00	96,67	4,71
80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	0,00
60,00	30,00	30,00	40,00	33,33	4,71
50,00	20,00	20,00	30,00	23,33	4,71
20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. č. 12: Průměrné hodnoty procentuální mortality u standardu diazepamu



Graf č. 3: Procentuální mortalita u tablety a standardu diazepamu.

Statisticky byly získány následující hodnoty:

- hodnota 24hLC₅₀ pro tabletu diazepam: 45,25 mg/l (95% interval spolehlivosti 42,41 - 48,28 mg/l)
- hodnota 24hLC₅₀ pro standard diazepam: 70,02 mg/l (95 % interval spolehlivosti 63,39 - 77,34 mg/l)

- hodnota 24hLC₅₀ pro dichroman draselný: 0,090 mg/l (95 % interval spolehlivosti 0,06622 - 0,1235 mg/l)
- hodnota 24hLC₅₀ pro dichroman draselný dle specifikačního listu: 0,086 mg/l (95 % interval spolehlivosti 0,069 - 0,092 mg/l)

4.3. Výsledky testu řasového růstového inhibičního testu

Experimentální podmínky: 25°C, souvislé boční osvětlení (10 000 luxů), pH 8

Délka trvání testu: 72 hodin

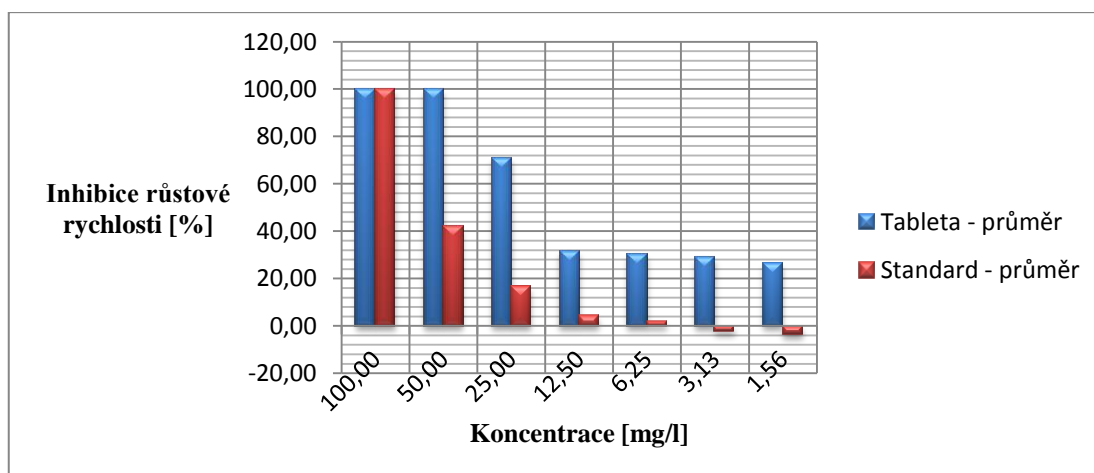
U testu s řasou *Desmodesmus subspicatus* byly získány ze 3 měření následující hodnoty:

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	2. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	3. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
25,00	70,55	71,40	70,83	70,93	0,35
12,50	31,60	31,60	31,58	31,59	0,01
6,25	30,78	29,76	30,11	30,22	0,42
3,13	29,16	28,77	28,96	28,96	0,16
1,56	26,35	26,35	26,33	26,34	0,01

Tab. č. 13: Průměrné hodnoty inhibice růstové rychlosti řasové suspenze u tablety diazepamu

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	2. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	3. měření Inhibice růst. rychlosti [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	42,12	41,74	41,99	41,95	0,16
25,00	16,25	17,04	16,86	16,72	0,34
12,50	4,41	4,48	4,45	4,45	0,03
6,25	2,59	1,68	2,12	2,13	0,37
3,13	-2,53	-2,31	-2,33	-2,39	0,10
1,56	-3,26	-3,87	-3,69	-3,61	0,26

Tab. č. 14: Průměrné hodnoty inhibice růstové rychlosti řasové suspenze u standardu diazepamu



Graf č. 4: Inhibice růstové rychlosti u tablety a standardu diazepamu.

Statisticky byly získány následující hodnoty:

Inhibice růstové rychlosti:

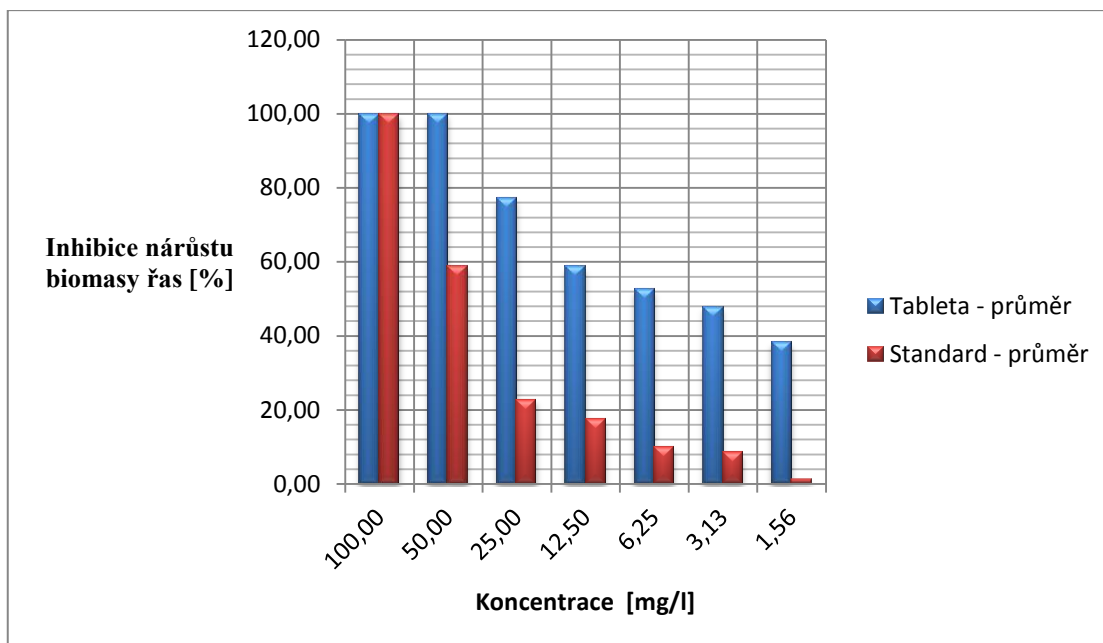
- hodnota 72hIC₅₀ pro tabletu diazepam: 11,44 mg/l (95 % interval spolehlivosti 7,524 - 17,39 mg/l)
 - hodnota 72hIC₅₀ pro standard diazepam: 51,55 mg/l (95% interval spolehlivosti 45,52 - 58,38 mg/l)
-
- hodnota 72hIC₅₀ pro dichroman draselný: 1,615 mg/l (95 % interval spolehlivosti 0,6926 - 3,764 mg/l)
 - hodnota 72hIC₅₀ pro dichroman draselný dle ISO normy 8692/2012 (Kvalita vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas) by měla spadat do intervalu 0,39 - 1,4395 mg/l

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	2. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	3. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
25,00	77,82	76,36	77,00	77,06	0,60
12,50	58,79	58,45	58,55	58,60	0,14
6,25	52,61	52,50	52,58	52,56	0,05
3,13	47,70	47,89	47,81	47,80	0,08
1,56	38,07	38,29	38,15	38,17	0,09

Tab. č. 15: Průměrné hodnoty inhibice nárůstu biomasy řas u tablety diazepam

Koncentrace [mg/l]	1. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	2. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	3. měření Inhibice nárůstu biomasy řas [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
100,00	100,00	99,50	99,70	99,73	0,21
50,00	58,90	58,62	58,72	58,75	0,12
25,00	22,40	23,19	22,75	22,78	0,32
12,50	17,80	17,07	17,43	17,43	0,30
6,25	9,83	10,22	10,11	10,05	0,16
3,13	8,54	8,54	8,53	8,54	0,00
1,56	0,62	1,80	0,96	1,13	0,50

Tab. č. 16: Průměrné hodnoty inhibice nárůstu biomasy řas u standardu diazepam



Graf č. 5: Inhibice nárůstu biomasy řas u tablety a standardu diazepamu.

Inhibice nárůstu biomasy řas:

- hodnota 72hIC₅₀ pro tabletu diazepamu: 4,138 mg/l (95 % interval spolehlivosti 2,870 - 5,965 mg/l)
 - hodnota 72hIC₅₀ pro standard diazepamu: 39,06 mg/l (95 % interval spolehlivosti 32,88 - 46,38 mg/l)
-
- hodnota 72hIC₅₀ pro dichroman draselný: 10,15 mg/l (95 % interval spolehlivosti 3,828 - 26,92 mg/l)
 - hodnota 72hIC₅₀ pro dichroman draselný dle ISO normy 8692/2012 (Kvalita vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas) by měla spadat do intervalu 0,39 - 1,4395 mg/l

5. DISKUZE

Stále nám chybí léčiva na některé nemoci, i když některé choroby již umíme léčit nebo alespoň zmírnit. Prvotním zájmem při vývoji vhodného léčiva je ovšem léčba člověka, teprve až pak je to možný vliv léčiva (jeho metabolitu/ů) na životní prostředí a organismy v něm obsažené.

Informovanost ohledně situace o vlivu léčiv na životní prostředí se postupně zlepšuje, ovšem stále nám chybí data. Nesmíme zapomínat, že stejně důležité jako znát data o jednotlivé látce, je znát data o směsích léčiv.

Diazepam jakožto látka s působením na nervový systém byl detekován ve více oblastech.

Skupina okolo Zuccata (2004) detekovala diazepam v povodí největší italské řeky Pád. Detekce diazepam (kromě jiných látek) probíhala v letech 1997 a 2001 pomocí analytických metod. Diazepam byl detekován v následujících koncentracích: 0,5 - 0,7 ng/l v roce 1997 a v roce 2001 v rozmezí od nedetekován po 2,1 ng/l.

Diazepam byl také detekován v národním španělském parku L'Albufera v následujících množstvích: 1,5 ng/l (průměrná hodnota) ve vodních vzorcích, 0,54 ng/g (průměrná hodnota) ve vzorcích sedimentu a 0,34 ng/g (průměrná hodnota) v půdních vzorcích (Vazquez-Roing, P. et al.; 2011).

Také řeka Somes (jedna z největších v Rumunsku) nezůstala výjimkou. Na 100 km vzdálenosti byl diazepam nalezen ve třech ze čtyř odběrových míst v hodnotách kolem 30 ng/l. Detekce probíhala pomocí GC/MS spektrometrie (Moldovan, Z.; 2006).

Ve Slovinsku skupina okolo Kosjeka (2012) objevila přítomnost diazepam (mezi dalšími benzodiazepiny) ve dvou ze tří měst (odebrání vzorků v zimě a na jaře 2011). Největší hodnota diazepam byla naměřena ve městě B (zhruba 105 000 obyvatel, nemocnice, čistírna odpadních vod), a to 111 ng/l.

Valcárcel et al. (2012) zkoumali přítomnost zneužitelných léčivých látek (a metabolitů) v povrchových vodách řeky Tagus (provincie Toledo) a v pitné vodě ve

dvou blízkých městech. Diazepam byl naměřen v rozmezí od 3,96 do 40,90 ng/l v povrchových vodách (naopak v pitné vodě nalezen nebyl).

Zajímavá práce byla provedena skupinou kolem Magdy Berretty (2014), která zkoumala přítomnost léčiv a přípravků osobní hygieny ve vzorcích sedimentu ze zálivu Todos os Santos v Brazílii. Diazepam byl detekován v 70,6% vzorcích - nejvyšší naměřená koncentrace 0,71 ng/g v sušině (v suchém vzorku mořského sedimentu).

Některé práce ohledně toxicity diazepamů na životní prostředí byly již citovány v rámci diplomové práce i informace, že mnoho nepublikovaných prací bylo provedeno samotnou firmou Hoffmann - La Roche. Firma byla kontaktována, ale bohužel odpověď nepřišla.

Na začátku rigorózní práce jsme si stanovili počáteční nejvyšší koncentraci 100 mg/l (léčivý přípravek, standard). V průběhu práce jsme provedli celkem 3 testy - nejprve Rotoxkit F Chronic, následně Thamnotoxkit FTM a jako poslední řasový růstový inhibiční test. Opět jsme se setkali se špatnou rozpustností jak tablety, tak i standardu diazepamů jako v diplomové práci (Šilhavá, T.; 2010).

U testu s vířníkem *Brachionus calyciflorus* byla 100 procentní inhibice růstu při nejvyšší koncentraci (100 mg/l) jak u tablety, tak i u standardu. V koncentracích 50 a 0,01 mg/l působila tableta větší inhibicí růstu než standard.

Diazepam tableta působila větší procentuální mortalitu (u testu s žábřonozkou *Thamnocephalus platyurus*) ve všech koncentracích (mimo nejnižší koncentrace) než standard kromě koncentrace nejvyšší (100 mg/l) kdy jak standard, tak i tableta způsobili 100 procentní inhibici. Při nejnižší koncentraci (20 mg/l) nezpůsobily obě látky žádnou mortalitu.

Situace u řasového růstového inhibičního testu byla následující: tableta diazepamů způsobovala 100 % inhibice u prvních dvou koncentrací (100, 50 mg/l), kdežto standard způsoboval skoro ve všech měřeních 100% inhibici jen u nejvyšší koncentrace (100 mg/l). U standardu jsme se i setkali se stimulací růstu při nejnižších koncentracích.

Koch (1993) se spolupracovníky použil pro testování akutní toxicity kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) jakožto alternativní metodu pro predikci akutní toxicity

jakýchkoliv chemických substancí. V rámci testovaných substancí byl i diazepam, u kterého byla zjištěna následující hodnota: $IC_{50} = 290 \text{ mg/l}$ (210 minut).

Skupina okolo Jeong-Wook Kwona (2009) detekovala diazepam pomocí LC/MS ve všech 10 vzorcích rybích jater (Hornyhead turbot, *Pleuronichthys verticalis*, platýsovití; ryby odchyceny blízko výpustí odpadních komunálních vod v jižní Kalifornii) v koncentracích od 23 - 110 ng/g (mokrý hmotnost, vzorek nevysušen).

A. T. Natarajan a spolupracovníci (1993) testovali 10 chemikálií (mezi nimi i diazepam) za použití embryonálních fibroblastů křečička čínského, aby zjistili, zda tyto látky mohou vyvolávat aneuploidii. Skoro všechny látky vykazovaly pozitivní efekt (koncentrace diazepam 10,0 - 75,0 $\mu\text{g/ml}$). Diazepam byl rozpuštěn v DMSO (dimethylsulfoxid).

Calleja a kolektiv (1993) zkoušeli, zda testy akutní toxicity (Artoxkit M, Streptoxkit F, Rotoxkit F, Daphnia magna test, MicrotoxTM) na bezobratlých (*Artemia salina*, *Streptocephalus proboscideus*, *Daphnia magna*, *Brachionus calyciflorus*) a bakterii (*Photobacterium phosphoreum*) mají potenciál jakožto alternativa k testům používajícím buňky nebo tkáňové kultury od lidí nebo jiných obratlovců. Testy pak byly porovnány s testy na hlodavcích a ekotoxikologickými testy pro predikci smrtelné dávky pro člověka. Prvních 50 chemikálií z MEIC programu (multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity) bylo testováno (vyjma dextropropoxyfenu). Pro diazepam byly získány následující hodnoty - 24hL(E)C₅₀: *Artemia salina*: 2,35 $\mu\text{mol/l}$ (0,67 mg/l), *Streptocephalus proboscideus*: 2,55 $\mu\text{mol/l}$ (0,73 mg/l), *Daphnia magna*: 1,69 $\mu\text{mol/l}$ (0,48 mg/l). Výsledkem byl závěr, že tyto testy na bezobratlých mohou sloužit jako skřínink pro toxicitu, který snižuje náklady, čas i teplotně závislá zvířata.

Henrik Lilius (1994) zkoumal s kolektivem toxicitu 50 chemikálií (mezi nimi i diazepam) na čerstvých hepatocytech (3 hodinový test, hepatocyty byly označeny radioaktivním izotopem rubidia -⁸⁶Rb) získaných ze pstruha duhového a na *Daphnii magna* (3 a 24 hodinový imobilizační test). Pro diazepam byly získány následující hodnoty: 24hEC₅₀ pro *Daphnii magna* - 0,015 mM (+/- 0,0013) (4,27 mg/l) a 3hEC₅₀ pro hepatocyty - 2,314 mM (+/- 0,373) (0,66 g/l).

SPC diazepam poskytuje informace o preklinických testech vztahujícím se k bezpečnosti. Dle SPC se neprokázalo, že by diazepam způsoboval mutagenitu a

kancerogenitu v pokusech na zvířatech. Hodnoty LD₅₀ u myši a potkanů se pohybovaly v intervalu od 600 - 1200 mg/kg hmotnosti zvířete.

V diplomové práci (2010) jsme prováděli testy na následujících testech toxicity: vícegenerační test toxicity za použití prvoka *Tetrahymena pyriformis*, Rapidtoxkit s koryšem *Thamnocephalus platyurus* a test na inhibici klíčení semen se *Sinapis alba*. Jako nejcitlivější organismus byla shledána semena *Sinapis alba*, u kterých docházelo při použití tablety k více jak 50-ti procentní inhibici růstu kořenů u všech koncentrací (1 500 - 23,44 mg/l).

Toxicita	Název testu	Doba expozice	Testovaný organismus
akutní	Rapidtoxkit	60 minut	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
akutní	Růstový inhibiční test	24 hodin	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
akutní	Thamnotoxkit F TM	24 hodin	<i>Thamnocephalus platyurus</i>
semichronická	Rotoxkit F Chronic	48 hodin	<i>Brachionus calyciflorus</i>
chronická	Řasový růstový inhibiční test	72 hodin	<i>Desmodesmus subspicatus</i>
chronická	Inhibice klíčení semen	72 hodin	<i>Sinapis alba</i>

Tab. č. 17: Shrnutí testů provedených v rámci diplomové a rigorózní práce (Šilhavá, T.; 2010).

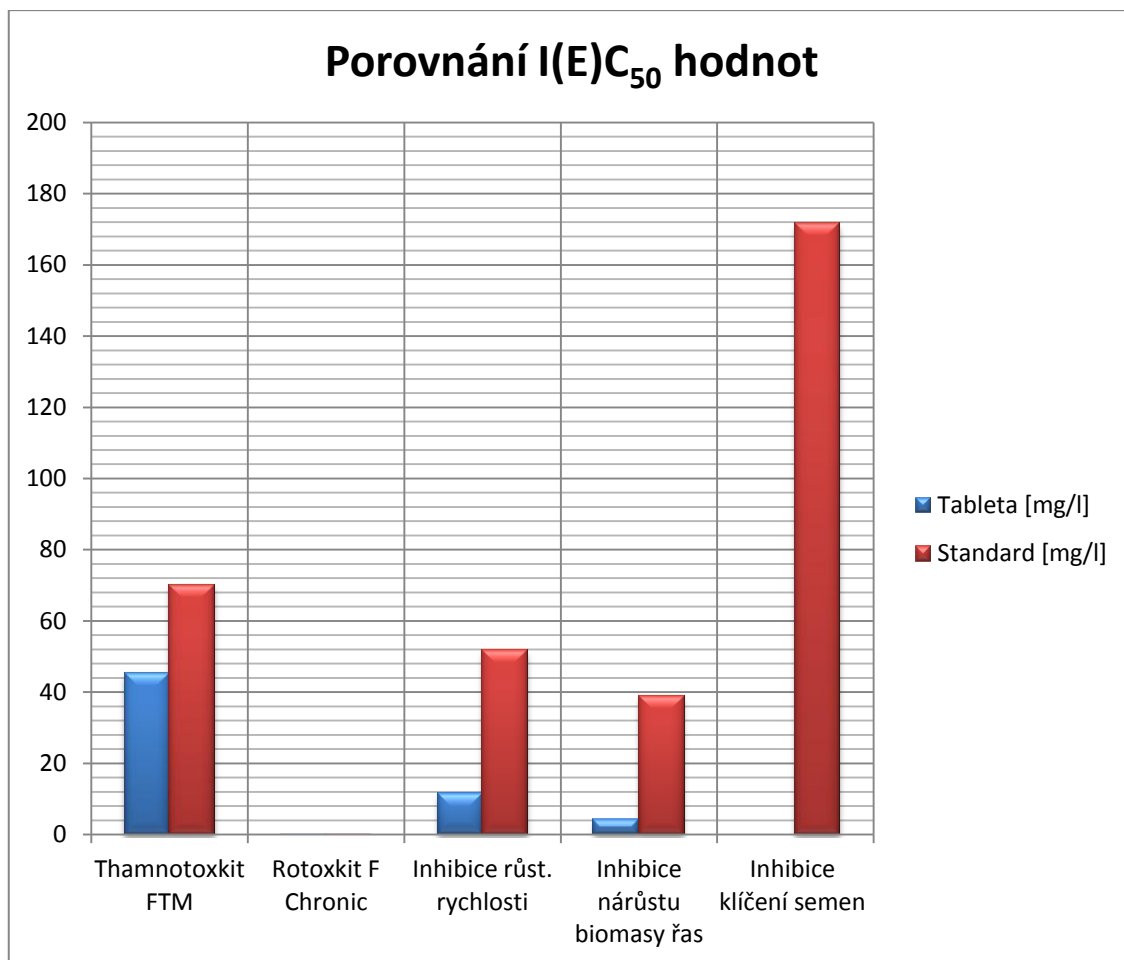
Název testu	Tableta [mg/l]	Standard [mg/l]
Rapidtoxkit	Není aplikovatelné	Není aplikovatelné
Růstový inhibiční test	24hIC ₅₀ = 507,9	24hIC ₅₀ = 3397
Thamnotoxkit F TM	24hLC ₅₀ = 45,25	24hLC ₅₀ = 70,02
Rotoxkit F Chronic	48hEC ₅₀ = 0,008	48hEC ₅₀ = 0,034
Řasový růstový inhibiční test	72hIC ₅₀ = 11,44 ¹	72hIC ₅₀ = 51,55 ¹
	72hIC ₅₀ = 4,138 ²	72hIC ₅₀ = 39,06 ²
Inhibice klíčení semen	Nešlo spočítat*	72hIC ₅₀ = 171,6

* Ve všech koncentracích byla inhibice kořene více jak 50 procent (i u nejmenší koncentrace).

¹ Inhibice růstové rychlosti

² Inhibice nárůstu biomasy řas

Tab. č. 18: Shrnutí výsledků testů provedených v rámci diplomové a rigorózní práce (Šilhavá, T.; 2010).



Graf č. 6: Porovnání výsledků testů se standardem a tabletou diazepam (Rapidtoxkit a Růstový inhibiční test s prvokem *T. pyriformis* nebyl zahrnut do grafu).

Nejcitlivější organismus ze všech byl *Brachionus calyciflorus*, u něhož se tableta i standard vyhodnotili jako vysoce toxické pro vodní organismy (tableta - 48hEC₅₀: 0,008 mg/l; standard: 0,034 mg/l). Diazepam byl také u tohoto organismu vyhodnocen jako extrémně toxický (způsobující velmi vysokou akutní toxicitu) jak u tablety, tak i u standardu (TU hodnota pro tabletu: 12 500, pro standard 2 941,18).

U zbývajících organismů (*T. platyurus* a *Desmodesmus subspicatus*) byl diazepam shledán toxickým (způsobující akutní toxicitu) opět u tablety i standardu. Jen u inhibice nárůstu biomasy řas byl efekt tablety shledán jako velmi toxický (způsobující vysokou akutní toxicitu).

Porovnáním výsledků této práce s některými výše uvedenými články lze vyslovit domněnku, že *Brachionus calyciflorus* je mnohem lepší ukazatel toxicity než například *Artemia salina* nebo *Daphnia magna*.

6. ZÁVĚR

V rámci rigorózní práce jsme si vytyčili za cíl získat další informace o vlivu diazepamu na životní prostředí za pomoci dalších tří testů (tři testy byly již provedeny v rámci diplomové práce - vícegenerační test toxicity s prvokem *Tetrahymena pyriformis*, Rapidtoxkit s žábřonožkou *Thamnocephalus platyurus* a inhibice klíčení semen se *Sinapis alba*), a to konkrétně s následujícími testy: Rotoxkit F Chronic, Thamnotoxkit FTM a řasový růstový inhibiční test za použití zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*.

Léčivý přípravek zůstal stejný jako v diplomové práci - tablety Diazepam Slovakofarma 5 mg a standard získaný od Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové.

V testu s vířníkem *Brachionus calyciflorus* (Rotoxkit F Chronic) jsme vylíhlé vířníky (předtím nakrmené Roti-Rich suspenzí) po jednom přendávali do jamek již obsahující příslušné koncentrace testované látky a řasy (potrava pro vířníky). Destička se následně zakryla parafilmem a nechala se kultivovat po dva dny v inkubátoru. Následně se spočítal počet živých/mrtvých a procentuální inhibice růstu. Skoro u všech koncentrací došlo k minimálně 50-ti procentní inhibici růstu.

Při testu s žábřonožkou *Thamnocephalus platyurus* jsme do každé jamky destičky napipetovali po 1 ml testované látky (kontroly) a následně nasadili po 10 vylíhlých vířnicích. Následně se destička přikryla parafilmem a nechala se kultivovat v inkubátoru po dobu 24 hodin. Poté se spočítali uhynulí korýši v každé jamce pomocí mikroskopu. Následně se vypočítala procentuální mortalita. Zjistili jsme, že tableta způsobila větší mortalitu než standard (jen u nejvyšší koncentrace 100 mg/l byla 100 procentní mortalita totožná pro standard i tabletu). Situace u dvou nejvyšších koncentrací byla poměrně vyrovnaná - 100 procentní mortalita u tablety a také u standardu (jen v jednom měření byla mortalita 90-ti procentní). U nižších koncentrací převažovala mortalita způsobená tabletou a u nejnižší koncentrace u obou látek nedocházelo k mortalitě vůbec.

U posledního testu s řasou *Desmodesmus subspicatus* jsme do podlouhlých průsvitných kyvet s již obsaženými koncentracemi látek (kontrol) přidali řasové inokulum. Kyvety se zavřely a protřepaly. Následně se v proházeném pořadí s pootevřenými víčky daly do inkubátoru na 72 hodin. Odečet počtu buněk probíhal vždy

po 24 hodinách pod mikroskopem v Bürkerově komůrce po protřepání kyvet. Následně se vypočítala procentuální inhibice nárůstu biomasy řas a inhibice růstové rychlosti. Tableta diazepamu působila větším inhibičním efektem než standard diazepam, který naopak v nejnižších koncentracích způsoboval také stimulaci růstu řas.

Vypočítaná hodnota $48hEC_{50}$ potvrdila, že nejvíce náchylným organismem k účinkům diazepamu je *Brachionus calyciflorus*.

6.1. Použitá literatura

ALGALTOXKIT FTM, Freshwater Toxicity Test with Microalgae, STANDARD OPERATIONAL PROCEDURE. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

Ambrožová, J.: Aplikovaná a technická hydrobiologie. 1.vyd, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2001, s. 226.

Anděl, P.: Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring. 1. vyd, Evernia s.r.o., Liberec, 2011, s. 243.

Anders, M.; Bartůňková, J.; Bultas, J. et al.: REMEDIA COMPENDIUM. 4.vyd, Panax Co, spol. s.r.o., Praha, 2009, s. 946.

Bartoš, E.: FAUNA ČSR, svazek 15, VÍŘNÍCI - ROTATORIA. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1959, s. 969.

Baxter, K. (eds.): Stockley's Drug Interactions Pocket Companion 2012. Pharmaceutical Press, Amersham, 2012, s. 603.

Beretta, M.; Britto, V.; Mascarenhas Tavares, T. et al.: Occurrence of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. J Soils Sediments, **14**, 2014, s. 1278 - 1286.

British National Formulary 62 September 2011. British Medical Association, Royal Pharmaceutical Society, BMJ Group and Pharmaceutical Press, United Kingdom, 2011, s. 1052.

Calleja, M., C.; Persoone, G.; Geladi, P.: The Predictive Potential of a Battery of Ecotoxicological Tests for Human Acute Toxicity, as Evaluated with the First 50 MEIC Chemicals. ATLA, **21**, 1993, s. 330 - 349.

Dodd-Butera, T.; Broderick, M.: Diazepam. Elsevier Inc., 2005, s.783-785.

Gilbert, J. J.; Walsh, E. J.: *Brachionus calyciflorus* is a species complex: Mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. Hydrobiologia, **546**, 2005, s. 257 - 265.

Hartman, P.; Přikryl, I.; Štědranský, E.: Hydrobiologie. 2.vyd, Informatorium, spol. s.r.o., Praha, 1998, s. 335.

Heath, E.; Kosjek, T.: Sources, Occurrence and Fate of Halogenated Heterocyclic Pharmaceuticals in the Environment. Top Heterocycl Chem, **27**, 2012, s. 247 - 268.

<http://aquanetviet.org/post/205119/so-s-nh-s-t-ng-tr-ng-v-th-nh-ph-n-c-c-acid-b-o-lu-n-tr-ng-n-c-ng>, obrázek stažen 15.2.2015.

<http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>, obrázek stažen 8.2.2015.

<http://www.cladocera.de/rotifera/rotifera.html>, obrázek stažen 22.2.2015.

<http://www.desitin.cz/pro-pacienty/diazepam-desitinr-rectal-tube/>, obrázek stažen 7.2.2015.

<http://www.docsimon.cz/zbozi/diazepam-tbl-20x-5mg>, obrázek stažen 7.2.2015.

<http://www.docsimon.cz/zbozi/diazepam-tbl-20x-10mg>, obrázek stažen 7.2.2015.

<http://www.drugvalley.com/products.php?product=Valium-5mg-by-Roche-x1-Strip>, obrázek stažen 7.2.2015.

http://www.ebpi.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=59:thamnocephalus-platyurus-rapid-&catid=38:thamnocephalus-platurus&Itemid=69, obrázek stažen 15.2.2015.

http://elearning.scio.cz/resources/Bi1/Bi1_Zdroj04_rostlinna_bunka.htm, obrázek stažen 8.2.2015.

http://en.wikipedia.org/wiki/Leo_Sternbach, staženo 7.2.2015.

<http://www.lekarna-doktorka.cz/zbozi/3838989503253/apaurin-inj-10x2ml-10mg>, obrázek stažen 7.2.2015.

<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/taxonomy/index.html>, staženo 8.2.2015.

http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Diazepamum.htm, staženo 27.1.2015.

<http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyceae>, staženo 8.2.2015.

http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bcat_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=diazep&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail=yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20.

<http://www.sukl.cz/rok-2011-1>, data stažena 21.12.2014.

<http://www.sukl.cz/rok-2012>, data stažena 21.12.2014.

<http://www.sukl.cz/rok-2013-2>, data stažena 21.12.2014.

<http://www.sukl.cz/rok-2014-1>, data stažena 21.12.2014.

Kalina, T.: Systém a vývoj sinic a řas. 1.vyd, vydavatelství Karolinum, 1994, s. 165.

Kašparová, L.; Novotná, H.; Švihovec, J.: MEDICAL TRIBUNE BREVÍŘ 2009. 18. vyd, MEDICAL TRIBUNE CZ, s.r.o., Praha, 2009, s. 1246.

Knight, D. J.; Thomas, M. B.: Practical guide to chemical safety testing, Smithers Rapra Technology, 2003, s. 474.

Koch, H., P.; Hofeneder, M.; Bohne, B.: The Yest Test: An Alternative Method for the Testing of Acute Toxicity of Drug Substances and Environmental Chemicals. Meth Find Exp Clin Pharmacol, **15**, 1993, s. 141 - 152.

Kočí, V.; Mocová, K.:EKOTOXIKOLOGIE PRO CHEMIKY. 1. vyd, Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 2009, s. 199.

Komínková, D.: EKOTOXIKOLOGIE. 1. vyd., Česká technika - nakladatelství ČVUT, Praha, 2008, s. 156.

Kosjek, T.; Perko, S.; Zupanc, M. et al.: Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. WATER RESEARCH, **46**, 2012, s. 355 - 368.

Kriska, G.: *Freshwater Invertebrates in Central Europe: A Field Guide*. Springer-Verlag Wien, 2013, s. 411.

Kwon, J.-W.; Armbrust, K., L.; Vidal-Dorsch, D. et al.: Determination of 17 α -Ethinylestradiol, Carbamazepine, Diazepam, Simvastatin, and Oxybenzone in Fish Livers. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, **92**, 2009, s. 359 - 370.

Lilius, H.; Isomaa, B.; Holmström, T.: A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **30**, 1994, s. 47 - 60.

Lincová, D.; Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd, Galén, Praha, 2007, s. 672.

Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *BAREVNÝ ATLAS FARMAKOLOGIE*. 4.vyd, Grada Publishing, a.s., Praha, 2012, s.384.

Moldovan, Zaharie: Occurences of pharmaceuticals and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, **64**, 2006, s. 1808 - 1817.

Natarajan, A., T.; Duivenvoorden, W., C., M.; Meijers, M. et al.: Induction of mitotic aneuploidy using Chinese hamster primary embryonic cells. Test results of 10 chemicals. *Mutation Research*, **287**, 1993, s. 47 - 56.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201 (2011): Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

Perlík, F.: *ZÁKLADY FARMAKOLOGIE*. 2. vyd, Galén, Praha, 2011, s.182 .

Persoone, G.; Marsalek, B.; Blinova, I. et al.: A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wasterwaters. *Environmental Toxicology*, **18**, 2003, s. 395-402.

Rang, H.P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. et al.: *RANG AND DALE'S Pharmacology*. 7. vyd, Elsevier Inc., 2012, s.777.

ROTOXKIT F CHRONIC, Chronic Toxicity Test for Freshwater, STANDARD OPERATIONAL PROCEDURE. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

Snell, T., W.; Janssen, C. R.: Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia*, **313/314**, 1995, s. 231 - 247.

SPC Diazepam Slovakofarma 5 mg, staženo 26.1.2015 z www.sukl.cz

Šifner, F.: Stručný přehled systému prvoků a bezobratlých živočichů. Univerzita Karlova v Praze - Pedagogická fakulta, 2004, s. 80.

Šilhavá, T.: Ekotoxikologický screening vybraného léčiva III (diplomová práce), Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie. 2010, s. 61.

THAMNOTOXKIT FTM, Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater, STANDARD OPERATIONAL PROCEDURE. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

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

Valcárcel, Y., Martínez, F.; González-Alonso, S. et al.: Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus river basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environment International*, **41**, 2012, s. 35 - 43.

Vazquez-Roig, P.; Andreu V.; Onghena, M. et al.: Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, **400**, 2011, s. 1287 - 1301.

Zákon č. 167/1998 Sb. o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, staženo 26.2.2015. (<http://www.anv.cz/legislativa/191-zakon-o-navykovych-latkach-a-o-zmene-nekterych-dalsich-zakonu>)

Zákon č. 350/2011 Sb. Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon), staženo 8.3.2015. <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2011-350>

Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Fanelli, R. et al.: Pharmaceuticals in the Environment: Changes in the Presence and Concentrations of Pharmaceuticals for Human Use in Italy. *Pharmaceuticals in the Environment*, 2004, s. 45 - 53.

Abstrakt (CZ)

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Tereza Šilhavá

Konzultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Ekotoxikologické hodnocení léčiva diazepamu

V dnešní době stále chybí informace o vlivu léčivých přípravků na životní prostředí. V této práci jsme studovali vliv diazepamu ve formě tablety (5 mg) i standardu na následujících organismech: *Brachionus calyciflorus* (Rotokit F Chronic), *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotoxkit FTM), *Desmodesmus subspicatus* (řasový růstový inhibiční test). Nejcitlivějším organismem byl shledán vířník *Brachionus calyciflorus* i v porovnání s již provedenými testy v rámci diplomové práce (Rapidtoxkit, Růstový inhibiční test - *Tetrahymena pyriformis*, Inhibice klíčení semen - *Sinapis alba*).

Klíčová slova: ekotoxikologie, diazepam, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Desmodesmus subspicatus*

Abstract (EN)

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Tereza Šilhavá

Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of Thesis: Ecotoxicological screening of diazepam drug

Nowadays, information about the influence of medicinal products on the environment is still missing. We have studied the effect of diazepam tablet (5 mg) and the standard on the following organisms: *Brachionus calyciflorus* (Rotokit F Chronic), *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotokit FTM), *Desmodesmus subspicatus* (algal growth inhibition test). *Brachionus calyciflorus* was found out as the most sensitive organism also in comparison with already performed tests within the diploma thesis (Rapidtookit, Growth inhibition test - *Tetrahymena pyriformis*, Growth seeds inhibition test - *Sinapis alba*).

Key words: ecotoxicology, diazepam, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Desmodesmus subspicatus*