



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## EKOTOXICITA LÉČIV SNIŽUJÍCÍCH HLADINU CHOLESTEROLU V KRVI

ECOTOXICITY OF CHOLESTEROL-LOWERING-DRUGS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Königsmarková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1146/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Kristýna Königsmarková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Ekotoxicita léčiv snižujících hladinu cholesterolu v krvi

### Zadání bakalářské práce zadání:

1. Bude vypracována literární rešerše zaměřená na současné poznatky o environmentální problematice léčiv snižujících hladinu cholesterolu v krvi
2. U zástupců této skupiny léčiv budou provedeny dostupné testy ekotoxicity v akvatickém uspořádání
3. Na základě výsledků testů bude posouzen vliv výše uvedených léčiv na akvatický ekosystém

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

---

Kristýna Königsmarková  
student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová,  
Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Předložená bakalářská práce je zaměřena na ekotoxikologické testování léčiv snižujících hladinu cholesterolu v krvi. Na problematiku nejprve nahlíží z teoretického hlediska – popisuje vliv residuí léčiv na životní prostředí, rozdělení hypolipidemik, rizika zvýšené hladiny cholesterolu, následně se zabývá ekotoxikologií a uvádí principy ekotoxikologického testování. V experimentální části byla testována tato léčiva: Corsim, Atoris, Lipanthyl Supra, Lipanthyl 267M. Dále byla testována i kyselina klofibrová – metabolit fibrátů. Rezidua těchto léčiv se vyskytují zejména v akvatickém ekosystému, z toho důvodu byly k hodnocení ekotoxicity použity testy na vodních organismech. Testovacími organismy byly *Thamnocephalus platyurus*, *Lemna minor* a *Vibrio fischeri*. Na základě výsledků testů byly stanoveny hodnoty  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  a  $IC_{50}$ . Pomocí těchto hodnot pak byla hodnocena ekotoxicita výše uvedených hypolipidemik.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis is focused on the ecotoxicological testing of blood cholesterol lowering drugs. At first it considers the issue from a theoretical point of view – describes the effect of residual drugs on the environment, the distribution of hypolipidemics, the risks of elevated cholesterol, then deals with ecotoxicology and introduces the principles of ecotoxicological testing. In the experimental part, these following drugs were tested: Corsim, Atoris, Lipanthyl Supra, Lipanthyl 267M. In addition, clofibric acid – the metabolite of fibrates was tested. Residues of these drugs are found mainly in the aquatic ecosystem, that is why tests of aquatic organisms have been used to evaluate ecotoxicity. Test organisms were *Thamnocephalus platyurus*, *Lemna minor* and *Vibrio fischeri*.  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  and  $IC_{50}$  values were determined on the basis of test results. Using these values, the ecotoxicity of the above mentioned hypolipidemics was evaluated.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

ekotoxicita, testy ekotoxicity, léčiva, cholesterol, hypolipidemika

## **KEYWORDS**

ekotoxicity, ekotoxicity tests, pharmaceuticals, cholesterol, hypolipidemics

KÖNIGSMARKOVÁ, K. *Ekotoxicita léčiv snižujících hladinu cholesterolu v krvi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. XY s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych chtěla poděkovat MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D za odborné vedení, vstřícný přístup a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce.*

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Léčiva .....	8
2.1.1	Vymezení pojmů lék a léčivá látka .....	8
2.1.2	Historický kontext .....	8
2.1.3	Výskyt a množství léčiv v životním prostředí.....	8
2.1.4	Hodnocení distribuce a vydaných léčiv v ČR .....	9
2.2	Léčiva snižující hladinu cholesterolu v krvi.....	9
2.2.1	Cholesterol .....	9
2.2.2	Rizika zvýšené hladiny cholesterolu .....	11
2.2.3	Farmakologická léčba .....	11
2.2.4	Výskyt léčiv na snížení hladiny cholesterolu v životním prostředí .....	16
2.3	Ekotoxikologie.....	16
2.3.1	Definice a vymezení oboru.....	16
2.3.2	Cíle ekotoxikologie .....	17
2.3.3	Ekotoxicita a metodiky vedoucí k jejímu hodnocení .....	18
2.3.4	Vybrané testy ekotoxicity.....	19
3	Experimentální část.....	22
3.1	Složení a základní fyzikální vlastnosti vybraných farmak .....	22
3.2	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	24
3.3	Test inhibice růstu okřehku menšího Lemna minor .....	27
3.4	Bioluminiscenční test na Vibrio fischeri .....	28
	Materiál a pomůcky.....	28
	Provedení testu .....	28
	Vyhodnocení testu.....	29
4	Výsledky a diskuze.....	30
4.1	Referenční testy .....	30
4.1.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	30
4.1.2	Inhibice růstu okřehku menšího L. minor .....	31
4.2	Corsim .....	32
4.2.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	32
4.2.2	Inhibice růstu okřehku menšího Lemna minor .....	33
4.3	Atoris .....	33
4.3.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	33
4.3.2	Inhibice růstu okřehku menšího Lemna minor .....	34

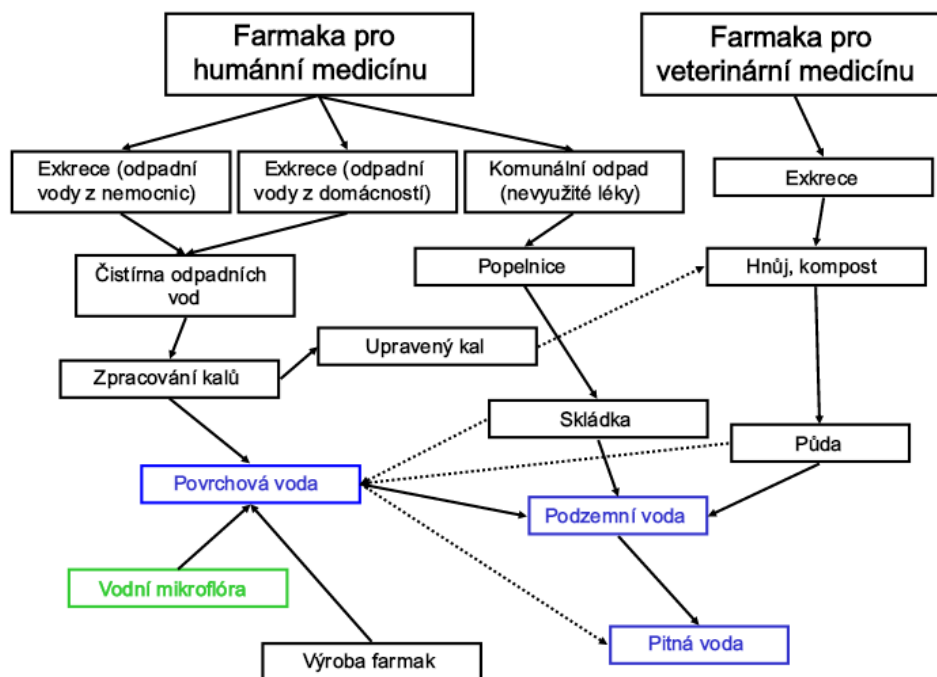
4.4	Lipanthyl Supra .....	35
4.4.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	35
4.4.2	Inhibice růstu okřehku menšího Lemna minor .....	36
4.5	Lipanthyl 267M .....	36
4.5.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	36
4.5.2	Inhibice růstu okřehku menšího Lemna minor .....	37
4.6	Kyselina klofibrová .....	37
4.6.1	Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> .....	37
4.7	Srovnání toxicity pomocí bioluminiscenčního testu na V. fischeri.....	38
4.8	Hodnocení ekotoxicity vybraných farmak .....	38
5	Závěr.....	41
6	Použitá literatura .....	42
7	Seznam použitých zkratek.....	47
8	Přílohy .....	48

# 1 ÚVOD

V dnešní době si lze na trhu povšimnout stále narůstajícího počtu různých typů léčiv. Navyšující produkce i spotřeba těchto přípravků má za důsledek jejich výraznější vliv na složky životního prostředí. Ve většině případů projde část přijatého léčiva trávicím traktem, které je poté vyloučeno organismem, a to zejména do odpadních vod. V čistírnách odpadních vod (ČOV) často dojde k nedokonalému odstranění jednotlivých polutantů, a tedy i léčiv. Tím pádem registrujeme i nárůst koncentrací léčiv a jejich reziduí v povrchových a také v podzemních vodách. Pokud se například použijí čistírenské kaly jako hnojiva, týká se tato problematika také půd. Následně dojde k proniknutí do potravních řetězců. Dalším významným zdrojem kontaminace je nesprávné zacházení s léky s prošlou trvanlivostí, kdy může dojít například k průsaku účinných složek ze skládek do půdy.

Problematicke vlivu uvolněných léčiv se věnuje stále větší pozornost, a to z toho důvodu, že v poslední době dochází k potvrzování teorií pojednávajících o jejich trvalém setrvání v ekosystémech. Hovoří se o tzv. pseudorezistenci, kdy látky, které sice podléhají degradaci, se v přírodě vyskytují v nezanedbatelných koncentračních hladinách díky jejich kontinuálnímu přísunu z různých zdrojů. Potravinou i jinými způsoby se dostávají do organismů. V nich se buď metabolizují tak, že konečný metabolit nevykazuje nežádoucí účinky, anebo dojde k dalším nežádoucím přeměnám. Mohou vyvolat jak změny fyziologické, tak biochemické. Jejich nepřetržité vypouštění i v malých koncentracích může vyvolat chronickou toxicitu.

Zatímco voda se považuje za velmi dynamické médium schopné rychlého transportu a zprostředkování kontaktu s léčivými i na delší vzdálenosti, půda a sedimenty, nebo organismy jsou spíše dlouhodobé rezervoáry těchto látek. Znečištění jedné složky životního prostředí má obvykle za následek brzké kontaminování i složek ostatních [1].



Obrázek 1: Schéma možných průniků reziduí léčiv do složek životního prostředí [2]

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Léčiva

#### 2.1.1 Vymezení pojmů lék a léčivá látka

Lék obsahuje jednu nebo více léčivých látek, které působí svým účinkem, a pomocných látek, které pomáhají léčivou látku zpracovat do formy léku.

- **Léčivá látka** – svým účinkem působí na organismus, který ovlivňuje farmakologicky (různými mechanismy působení), imunologicky (posílení nebo oslabení imunitního systému) nebo metabolicky (ovlivnění přeměny látek a energií v živých organismech) [3].
- **Pomocná látka** – nemá léčivý účinek, její funkcí usnadnění přípravy, uchovávání nebo podání léků. Vlastností pomocných látek lze také využít při rozpadu tablety v organismu atd. Pomocné látky jsou například barviva, plniva, rozpouštědla [4].

#### 2.1.2 Historický kontext

Látky sloužící k předcházení, léčení či zmírnění příznaků chorob jsou lidstvem využívány od nepaměti. Počátky farmacie se datují již kolem 5. století před našim letopočtem. V té době se jednalo o látky rostlinného a živočišného původu. Jejich působení na ekosystémy neobnášelo rizika, také jejich užívání nebylo v tak velkém množství jako dnes. Největší rozvoj léčiv byl zaznamenán po 2. světové válce a v souvislosti s revolucí velké škály technických a vědeckých poznatků trvá dodnes. Aktuální světová průmyslová výroba léčiv úzce souvisí s jejich rozsáhlým užíváním a od toho se odvíjí i jejich rapidnější uvolňování do životního prostředí v nezanedbatelných množstvích [5].

#### 2.1.3 Výskyt a množství léčiv v životním prostředí

Podle databáze pro posouzení nebezpečnosti léků na životní prostředí National Centers of Coastal Ocean Science (NCCOS), jsou léčiva přítomna v koncentračních hladinách od nanogramů po miligramy v jednom litru ve všech složkách životního prostředí téměř na většině míst světa. Největší znečištění léčivými a jejich rezidui lze detekovat ve vodním ekosystému. Nejvíce kontaminované jsou především vody povrchové v okolí hustě obydlených oblastí. Vyspělost zdravotnictví a technologií ČOV jsou jedním z hlavních faktorů míry znečištění. V odpadních vodách se biologicky aktivní substance vyskytují v koncentracích pod 1 mg/l a můžeme je tak zařadit do skupiny stopových znečištění. Některá farmaka jsou však vůči čistírenským procesům velmi odolná, kupříkladu poměrně perzistentní antiepileptikum karbamazepin, jeho degradační produkt nebo také klofibrová kyselina byly detekovány ve výtocích z čistíren odpadních vod, řekách, jezerech, a dokonce i mořské vodě [6].

Mimo hormonální látky jsou nejfrekventovanější léčiva v našich odpadních vodách tyto:

- Diklofenak (spotřeba cca 20 tun/rok)
- Ibuprofen (spotřeba cca 200 tun/rok)
- Karbamazepin (spotřeba cca 7,5 tun/rok)
- Kyselina salicylová (spotřeba snad až 600 tun/rok)
- Kyselina klofibrová (spotřeba cca 10 tun/rok) [7].



## 2.1.4 Hodnocení distribuce a vydaných léčiv v ČR

Podle aktuálních dat Státního ústavu pro kontrolu léčiv za posledních 10 let v České republice obecně zaznamenáváme pokles distribuce léčiv. V roce 2006 tato hodnota činila 320,01 mil. balení, v roce 2015 267,16 mil. balení (rozdíl 53 mil. balení). Nicméně stále se objevují na trhu nové typy léčiv a spotřeba globálně stoupá. Tím je způsoben nárůst množství léčiv uvolněných do životního prostředí.

Při porovnání dat z posledních dvou let, rok 2015 oproti roku 2014 zaznamenává nárůst o 1,10 %. Dodávky léčiv do sítě zdravotnických zařízení za posledních 10 let demonstruje tabulka 1. Také počet denních dávek zaznamenal nárůst. V roce 2015 tato hodnota činila 6 480,98 milionů, což značí nárůst o 2,96 % oproti roku 2014. Pořadí nejvíce distribuovaných léčiv dle skupin (od nejvíce distribuovaných po nejméně distribuované) bylo v roce 2015 následující: léky na kardiovaskulární systém, nervový systém, trávicí trakt a metabolismus, respirační systém, muskuloskeletární systém. Toto pořadí se shoduje i s nejčastěji vydanými skupinami léčiv. V roce 2015 bylo v lékárnách a zdravotnických zařízeních vydáno nejvíce léčiv na onemocnění kardiovaskulárního systému (37,3 mil. balení). Na druhém místě byla nejčastěji vydávána léčiva ovlivňující nervový systém (20,5 mil. balení), dále léčiva na trávicí trakt a metabolismus (16,7 mil. balení) následovaná léčivy pro respirační systém (10,6 mil. balení) [8].

Tabulka 1: Přehled distribuce léčivých přípravků ČR [8]

Rok	Počet balení (v mil.)	Nárůst/pokles (v %)
2006	320,01	-13,27
2007	343,12	7,22
2008	317,73	-7,40
2009	312,30	-1,71
2010	304,59	-2,47
2011	296,69	-2,59
2012	280,13	-5,58
2013	268,63	-4,11
2014	264,25	-1,63
2015	267,16	1,10

Poznámka: Přehled obsahuje zejména údaje z hlášení distributorů dle pokynu SÚKL DIS-13, aktuální verze, o distribuci léčivých přípravků, nejedná se o reálnou spotřebu léků pacienty, tedy o data, která by popisovala konkrétní výdeje pacientům.

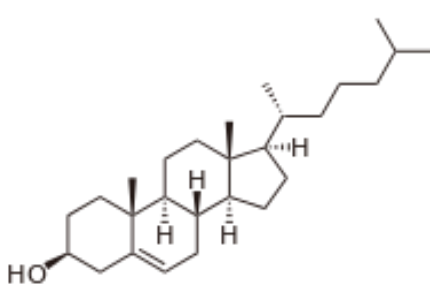
## 2.2 Léčiva snižující hladinu cholesterolu v krvi

### 2.2.1 Cholesterol

Cholesterol je organická látka, kterou řadíme ke steroidům. Vyznačuje se lipidovou povahou. Je stavební složkou buněk a tkání v našem těle, podílí se na stavbě biomembrán, kde zajišťuje jejich kompaktnost, je potřebný i pro tvorbu hormonů a vitamínu D. Cholesterol je nejvíce koncentrovaný v mozku, nadledvinách, kožním tuku, dále ve slezině a krevním séru.

Organismus si dokáže cholesterol tvořit sám, a to hlavně v játrech a trávicím ústrojí. Ve velkém množství se dostává do těla také potravou. Nejvíce cholesterolu obsahují vejce, živočišné tuky (máslo, sádlo, škvarky), uzeniny, vnitřnosti či tučné mléčné výrobky (smetana, sýry s vysokým obsahem tuku, plnotučné mléko). Množství cholesterolu, které si tělo samo vytvoří, je dáno geneticky a je zcela dostačující. V závislosti na příjmu cholesterolu potravou, si tělo reguluje svoji vnitřní produkci. Komplikace nastávají, pokud je vnější příjem dlouhodobě zvýšený, tělo přebytečný cholesterol odbourává v játrech, následně dochází k poškození receptorů zodpovědných za jeho zpracování, a jako důsledek dojde ke zvýšení hladiny cholesterolu v krvi [9, 10, 11].

Tabulka 2: Cholesterol – obecné informace [12]

Strukturní vzorec	
Systematický název	(10R,13R)-10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahydro-1H-cyklopenta[a]fhenanthren-3-ol
Triviální název	Cholesterol
Sumární vzorec	$C_{27}H_{46}O$

Celkové množství cholesterolu v krvi, se udává v mmol/l. Pokud je hodnota hladiny cholesterolu do 5,0 mmol/l, považujeme tento stav za bezrizikový. Hodnota 5,1-6,0 mmol/l je považována za zvýšenou, nad 6,0 za extrémně vysokou. Lidem s touto hladinou hrozí velké riziko kardiovaskulárních onemocnění. Transport cholesterolu v těle je zprostředkován pomocí lipoproteinů, které se dělí na čtyři různé typy:

- **HDL** (High density lipoproteins) – složka celkového cholesterolu. Říká se mu také dobrý cholesterol. Výška jeho hladiny ukazuje, nakolik je naše tělo schopné se cholesterolu zbavovat jeho transportem do jater. Čím vyšší hladina, tím lépe. Nefyziologická je hladina menší než 1,2 mmol/l u mužů a 1,0 mmol/l u žen.
- **LDL** (Low density lipoproteins) – složka celkového cholesterolu. Říká se mu také špatný cholesterol, protože se velkou měrou podílí na ateroskleróze. Za nefyziologickou se považuje jeho hladina nad 3 mmol/l.
- **VLDL** (Very low density lipoproteins) – tento lipoprotein přenáší v krvi tuky, zejména triglyceridy. Jejich hladina není závislá na příjmu tuků z potravy, jsou vytvářeny v játrech.

Podle vzniku se rozlišuje cholesterol exogenní neboli vnější (z potravy) a endogenní neboli vnitřní (syntetizován v těle) [11, 13].

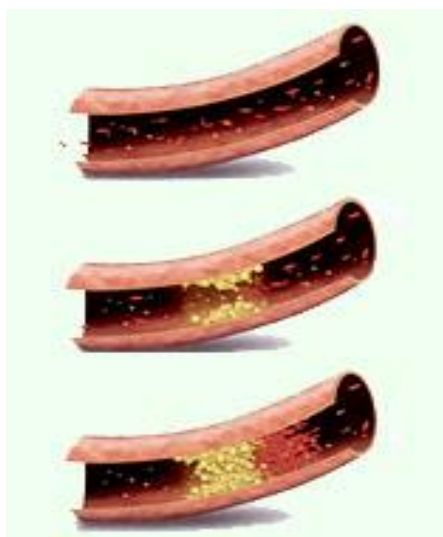
### 2.2.2 Rizika zvýšené hladiny cholesterolu

Vysoký cholesterol (hypercholesterolémie) je v dnešní době poměrně rozšířené onemocnění. Jedná se o zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou na celém světě nejčastější příčinou úmrtí. V České republice způsobují dokonce více než 50 % všech úmrtí. Ischemická choroba srdeční (ISCH) je nejrozšířenější forma KVO. Podstata ISCH spočívá v ateroskleróze – poškozování a zužování věnčitých tepen cholesterolem se vznikem krevních sraženin, kdy dojde k jejich ucpání, tedy i k nedostatečnému prokrvení srdce a omezení jeho funkce. Dalším možným projevem KVO je mozková mrtvice. Dochází při ní k náhlému uzávěru mozkové tepny a následné nedostatečné prokrvenosti mozku. Další podoba KVO je ischemická choroba dolních končetin. Jedná se o onemocnění tepen dolních končetin. Dlouhodobá neprokrvenost vede ke vzniku kožních defektů, které se velmi špatně hojí, a v případě celkového tepenného ucpání je dolní končetina ohrožena odumřením tkáně a infekcí.

Pokud chceme předejít zvýšení hladiny cholesterolu nebo dosáhnout normalizace vyšší hodnoty je třeba dodržovat zdravý životní styl. Mezi nejvíce doporučované způsoby prevence patří: dostatečný pohyb, cvičení, zdravá strava (dostatek vitamínů, vlákniny atd.), nekuřáctví aj. [14]

### 2.2.3 Farmakologická léčba

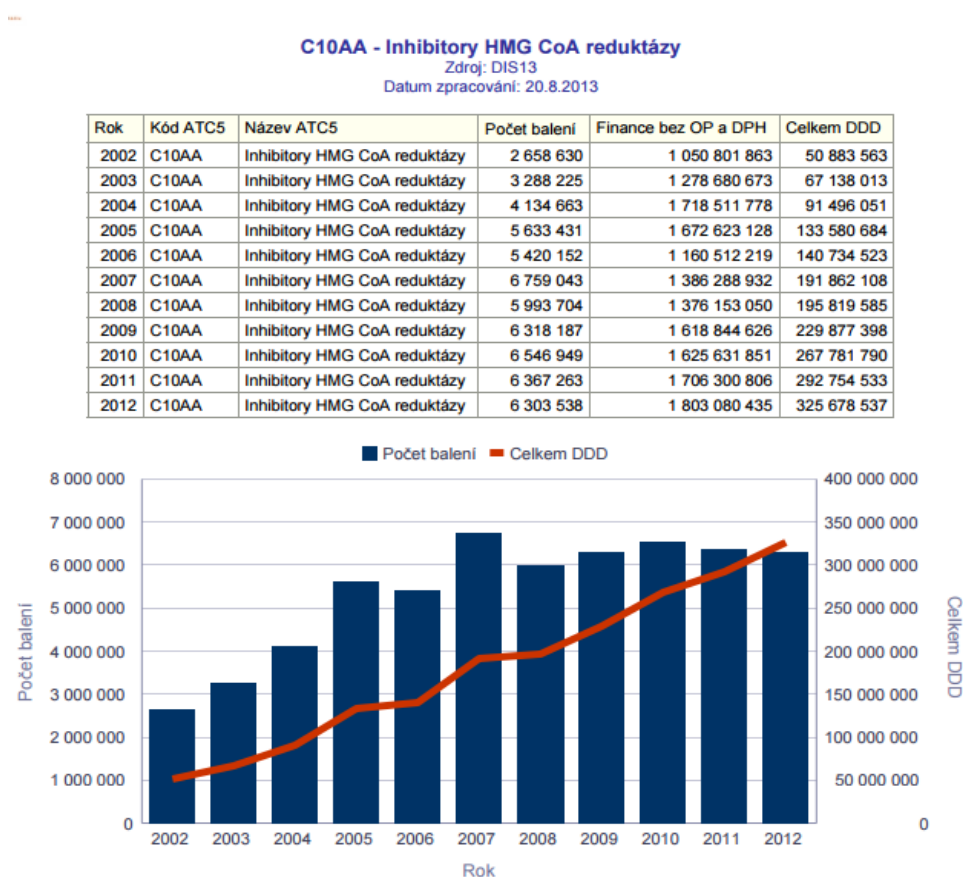
V případě vrozené hypercholesterolémie je farmakologická léčba nezbytná. U méně závažných forem tohoto onemocnění mnohé studie prokázaly, že dodržováním zdravého životního stylu je možné dosáhnout zásadních změn v množství LDL cholesterolu, a tím snížit nebo zcela vyloučit nutnost farmakologické léčby. Pro většinu lidí v dnešní době je však oproti tomuto po všech stránkách náročnému způsobu léčby výhodnější užívat léčiva. Léky na snížení cholesterolu se vyznačují vysokou účinností. Podávají se jak na vysoký cholesterol, tak i na projevy aterosklerózy. Proto je většina z těchto léků nezbytnou součástí léčby u pacientů po infarktu myokardu, s anginou pectoris a dalšími projevy ISCH. Nejvíce jsou používány zejména tyto léky: statiny, ezetimib, a fibráty [13].



Obrázek 2: Postupné ukládání cholesterolu do stěny cévy [13]

### 2.2.3.1 Statiny

V České republice se statiny objevily na trhu poprvé v osmdesátých letech minulého století a od té doby dochází k postupnému a rapidnímu nárůstu dodávek této skupiny léků. Trend nárůstu dodávek se projevuje ve všech základních ukazatelích, které se využívají při sledování vývoje dodávek léčivých přípravků, tedy v počtech dodaných balení, počtech definovaných denních dávek a finančních nákladech v cenách původce. Podle dat Státního ústavu pro kontrolu léčiv byly na začátku sledovaného období, v roce 2002, zaznamenány dodávky statinů v množství 2 658 630 ks balení. Například jen do konce roku 2012 došlo k 137% nárůstu v počtech dodaných balení. Z údajů (viz Obrázek 3) lze usoudit, že trend nárůstu dodávek této skupiny léků pokračuje dodnes a bude pokračovat i nadále. S tím samozřejmě souvisí i jejich čím dál větší uvolněné množství a vliv na životní prostředí [15].



Obrázek 3: Tabulka a graf zobrazující vývoj dodávek statinů v počtech dodaných balení, definovaných denních dávkách (DDD) a finančních nákladech v letech 2002–2012 [15]

Léčbou pomocí statinů lze dosáhnout okolo 40 % snížení koncentrace LDL-cholesterolu, v kombinaci s iontoměničím (jako je např. makromolekulární pryskyřice) až 60 %. Po podání statinů se ze střeva vstřebá okolo 30 % dávky, dochází k vychytávání játry, kde se i metabolizují a poté vylučují žlučí.

Statiny jsou inhibitory HMG-CoA reduktázy. HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A), má funkci katalyzovat majoritní krok syntézy cholesterolu – přeměnu HMG-CoA na kyselinu mevalonovou. Inhibicí je omezena intrahepatální syntéza cholesterolu, což vede ke zvýšení počtu LDL-receptorů na hepatocytech, zvýšenému vychytávání LDL játry a následně dojde ke snížení krevního cholesterolu v oběhu. Jakmile se však zablokuje syntéza cholesterolu, začnou ho více absorbovat buňky ve střevech. Z tohoto důvodu se doporučuje jako doplněk ke statinům brát ezetimib.

Statiny se vyznačují i dalšími účinky, a to například inhibicí proliferace buněk hladkého svalů ve stěně cév, zlepšení funkce endoteliálních buněk, stabilizace aterosklerotického plátu, mají také antiagregační a protizánětlivé působení.

Navzdory tomu, že se jedná o velice účinné léky, které rapidně sníží rizika spojená s aterosklerózou, statiny jsou velice často negativně komentovány pro své nežádoucí účinky. Podle výsledků mnoha studií dochází při léčbě k rapidnímu snižování koncentrace koenzymu Q10 (cholesterol je prekurzor CoQ10), což může být faktor hrající roli při vzniku některých níže uvedených nežádoucích účinků – zřejmě vlivem poškození struktury membrán. Mezi nežádoucí účinky patří: těžké poškození svalů (statinová myopatie), která může vyústit až v jejich rozpad – rhabdomyolýzu. U těžkých zánětů se pak ze svalů mohou uvolnit látky, které se filtrují do moči (myoglobinurie) a poškodí ledviny (renální selhání). V současné době je také prokázána možnost rozvoje diabetu 2. typu, především u osob s dalšími rizikovými faktory pro vznik tohoto onemocnění. Diabetogenní účinek mají všechny statiny a u lidí s rizikovými faktory diabetu 2. typu je přibližně desetiprocentní riziko rozvoje cukrovky 2. typu. Tyto případy však bývají ojedinělé. Jako další nežádoucí účinky při léčbě statiny bývají zmiňovány poruchy paměti, zmatenost, deprese, sexuální poruchy či nespavost. Nežádoucí účinky statinů lze zmírnit například snížením jejich dávky [16, 17, 18].

Příklady statinů:

- Atorvastatin – např. léky Atoris, Larus, Sortis, Torvacard, Lipitor a další.
- Rosuvastatin – např. léky Mertenil, Rosucard, Rosuvastatin, Sorvasta a další.
- Simvastatin – např. léky Corsim, Vasilip, Zocor a další.
- Fluvastatin – např. léky Lescol a Fluvastatin.
- Pravastatin, Lovastatin apod [13].

Obrázek č. 4 zobrazuje vývoj v dodávkách těchto léčivých látek v letech 2002–2012. V České republice jsou nejčastěji předepisovány léky s obsahem atorvastatinu a simvastatinu.

Atorvastatinem je léčeno více, jak padesát procent pacientů. Léčivé přípravky s obsahem této účinné látky jsou indikovány při léčbě primární hypercholesterolemie a smíšené hyperlipidemie, a dále při prevenci kardiovaskulárních příhod u dospělých pacientů s vysokým rizikem první kardiovaskulární příhody.

Léčivé přípravky s obsahem simvastatinu jsou na trhu v České republice od roku 1991. Využívají se především při léčbě primární hypercholesterolemie, kdy dieta a ostatní nefarmakologická léčba není účinná, v neposlední řadě také v rámci kardiovaskulární prevence u pacientů s rozvinutým kardiovaskulárním onemocněním nebo s diabetem mellitus, kteří mají normální nebo zvýšené koncentrace cholesterolu. Ve srovnání s novějšími statiny simvastatin hůře interaguje v kombinaci s jinými léky, jeho užívání je kontraindikováno při současném podávání např.: ketokonazolu, inhibitorů HIV-proteázy a některých antibakteriálních přípravků.

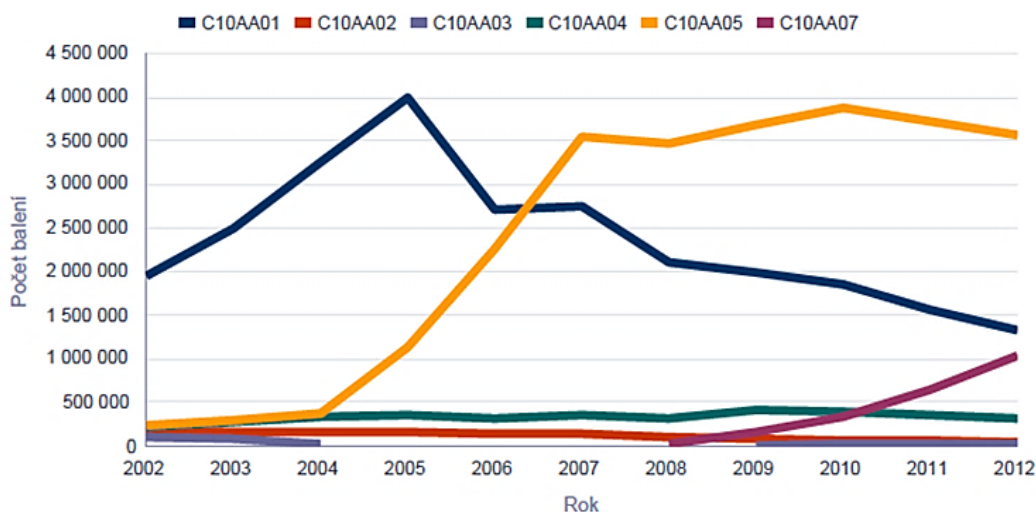
Rosuvastatin patří k novým a velmi účinným statinům. Primárně účinkuje v játrech. Je indikován k léčbě dospělých pacientů, dospívajících i dětí od 10 let s primární hypercholesterolemií, jako doplněk k dietám v případech, kdy reakce na samotnou pohybovou aktivitu a dietní opatření není účinná. Dále se využívá v prevenci kardiovaskulárních příhod u pacientů s vysokým rizikem první kardiovaskulární příhody. U této léčivé látky je větší riziko nežádoucích účinků, vzniku myopatie aj. [15]

#### C10AA - Inhibitory HMG CoA reduktázy

Zdroj: DIS13

Datum zpracování: 20.8.2013

Kód ATC7	Název ATC7	Počet balení										
		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
C10AA01	Simvastatin	1 940 905	2 496 029	3 259 865	3 991 720	2 708 113	2 739 566	2 099 608	1 995 489	1 856 257	1 555 940	1 320 793
C10AA02	Lovastatin	170 376	166 255	152 376	162 489	133 805	134 319	92 465	77 263	66 616	52 593	41 853
C10AA03	Pravastatin	97 390	72 647	14 618					730	21 852	31 962	20 165
C10AA04	Fluvastatin	220 331	266 085	326 092	347 848	323 814	343 956	322 592	406 622	401 447	357 792	319 718
C10AA05	Atorvastatin	229 628	287 209	381 712	1 131 374	2 254 420	3 541 202	3 463 639	3 672 270	3 873 376	3 727 032	3 558 768
C10AA07	Rosuvastatin							15 400	165 813	327 401	641 944	1 042 241



Obrázek 4: Tabulka a graf zobrazující vývoj dodávek léčivých látek (statinů) v počtu dodaných balení v letech 2002–2012 [15]

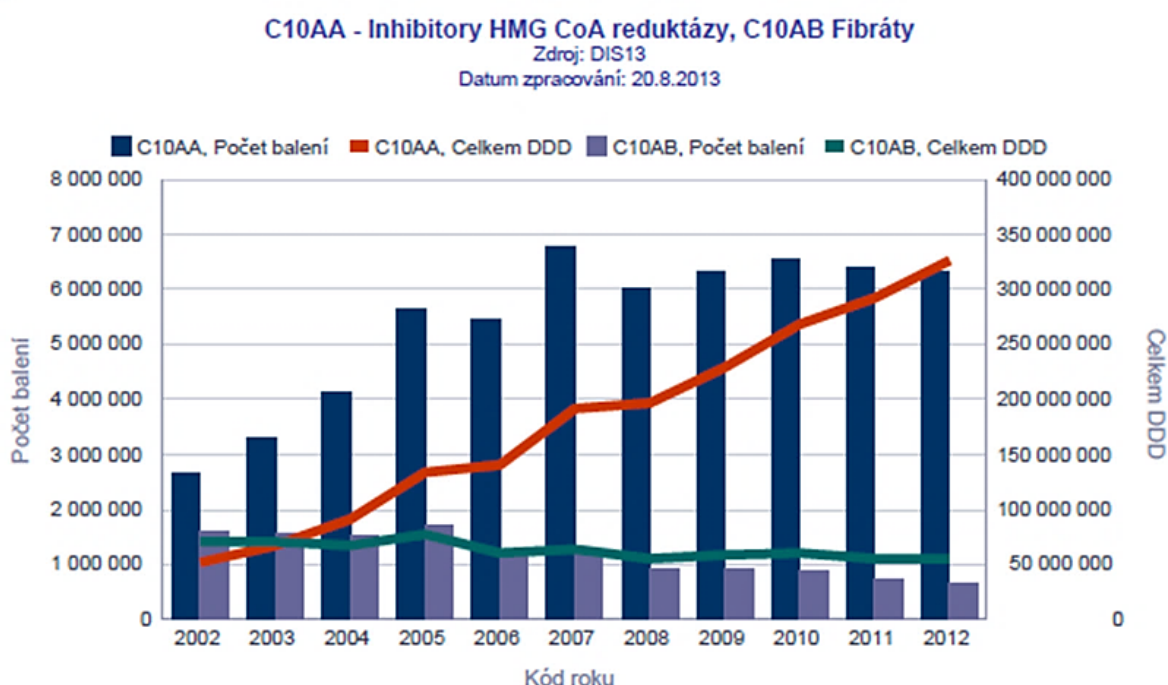
#### 2.2.3.2 Ezetimib

Ezetimib je látka inhibující vstřebávání cholesterolu ve střevě. Blokuje přenašeč sterolů, protein Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), který je nepostradatelný pro tuto absorpci. Pokud se bere samotný, začne tělo vyrábět více cholesterolu. Ve většině případů je léčba podpořená i statiny, které tento cholesterol následně sníží. Účinky ezetimibu a statinů se výhodně doplňují. Toho využívají mnohé farmaceutické firmy, které vyvíjejí léky, které jsou kombinací obou, například léčivo Inegy. Ezetimib se v určitých případech používá také v monoterapii, když léčba statinem není tolerována. V České republice je v současnosti registrováno několik léčivých přípravků s ezetimibem (Tezzimi, Ezen, Egitim), ale dodávky na trh byly zaznamenány pouze u léčivého přípravku Ezetrol.

I lék ezetimib se vyznačuje některými nežádoucími účinky. Řadíme mezi ně například průjemy, křeče v dutině břišní a jiné zažívací potíže [13, 19].

### 2.2.3.3 Fibráty

Před nástupem statinů byly používány v léčbě poruch lipidového metabolismu především látky zvané fibráty. V České republice jsou doposud používány dvě léčivé látky z této skupiny, a to především fenofibrát a ciprofibrát. Ještě v roce 2002 nebyl rozdíl v dodávkách statinů a fibrátů tak zřetelný (statinů dodáno přibližně o jeden milion kusů balení více). Nejvyšší dodávky fibrátů byly zaznamenány v roce 2005, celkem 1 723 112 ks balení, v roce 2006 dochází k poklesu dodávek dodaných balení o 30 %. Na dalším poklesu dodávek léčivých přípravků ze skupiny fibrátů mohlo mít vliv i rozhodnutí pracovní skupiny pro farmakovigilanci (PhVWP) Evropské lékové agentury z roku 2007, kterým byly fibráty, v hlavní indikaci smíšené hyperlipidémie, určeny až jako lék druhé volby, v případě, že nelze podat statiny. Trend poklesu dodávek pokračoval až do roku 2012. Nástup dodávek statinů pozorujeme od roku 2006 a jejich dominantní postavení na trhu dokládají údaje z roku 2012: dodáno bylo více jak šest milionů kusů balení statinů oproti necelým 660 tisícům kusů balení léčivých přípravků ze skupiny fibrátů [20].



Obrázek 5: Graf zobrazující vývoj dodávek statinů (inhibitorů HMG CoA reduktázy) v porovnání s fibráty v počtech dodaných balení, definovaných denních dávkách (DDD) a finančních nákladech v letech 2002–2012 [20]

Význam fibrátů spočívá ve funkci zvýšení „dobrého“ HDL-cholesterolu. Škodlivý LDL-cholesterol umí fibráty snížit minimálně. Dále umí snížit hladinu triacylglycerolů, lze je podávat v kombinaci se statiny. Nebo v případech, kdy léčba statiny není tolerována.

Léčivou látku fenofibrát obsahuje např. lék: Lipanthyl 267M, Lypanthyl Supra, Febira a další. Dodávky mají i léčivé přípravky s ciprofibrátem, na trhu je léčivý přípravek Lipanor [15].

### 2.2.3.4 Další látky snižující hladinu cholesterolu v krvi

Iontoměničce, zejména makromolekulární pryskyřice, patří mezi vyhledávaná léčiva, a to hlavně pro jejich nízkou cenu. V porovnání s výše uvedenými léčivy je však jejich účinnost minimální. Při jejich užívání hrozí riziko potíží trávicího traktu.

Kyselina nikotinová má také vliv na snížení hladiny cholesterolu. Při nadužívání se ale vyznačuje velkým množstvím vedlejších účinků, takže je jen zřídka ve farmaceutickém průmyslu využívána [13].

## **2.2.4 Výskyt léčiv na snížení hladiny cholesterolu v životním prostředí**

Při zaměření se na vodní ekosystém lze konstatovat, že čím dál větší pozornost by se měla z hlediska ochrany životního prostředí soustředit na specificky účinné látky, které jsou součástí léků. Tyto látky se dostávají do vody ve většině případů až po jejich užití. U léků jakožto nezbytných přípravků pro lidské zdraví nelze předpokládat, že by někdy byla jejich produkce a distribuce legislativně omezena, ba naopak vzhledem k rozvoji farmaceutického průmyslu a medicíny se stále vyvíjejí nové druhy a celková produkce stoupá. Výjimkou nejsou ani léčiva na snížení hladiny cholesterolu v krvi. Jejich vyšší distribuce i výdej se pojí s nárůstem hladin jejich reziduí v ekosystémech.

Jedním z metabolitů fibrátů je kyselina klofibrová. Tato kyselina je izomerem herbicidu mecopropu, který byl pro svou nebezpečnost zakázán. Také v České republice byla detekována, a to v komunálních vodách., kde zjištěné koncentrace na přítoku do ČOV jsou v rozsahu 10 až 20 ng/l. V ČOV nedochází k její dokonalé degradaci a je dále vypouštěna do recipientů. Její stopy byly detekovány i v podzemních zdrojích pitné vody. Před deseti lety byla situace v této oblasti horší. Spotřeba fibrátů činila více jak 10 tun ročně. Informace o výskytu léčiv na snížení hladin cholesterolu v prostředí České republiky jsou velmi omezené. Co se týká situace v Evropě tak po detekci značných množství reziduí v roce 1992 v Německu byly prováděny mnohé studie, které měly za úkol analyzovat většinu vod. Například v Severním moři byla na všech analyzovaných místech nalezena koncentrace kyseliny klofibrové v rozmezí od 1 do 2 ng/l. Také ve velmi významných evropských řekách jako je například Dunaj nebo Pád byla nalezena vysoká koncentrace tohoto rezidua. V kohoutkové vodě v Berlíně byla zaznamenána koncentrace této látky mezi 10 až 165 ppt. Kyselina klofibrová byla nalezena dokonce i v jezerech ve Švýcarsku, a to i přesto, že tam fibráty nebyly průmyslově vyráběny. Po exkreci z organismu se tam následně dostala povrchovou a podzemní vodou. Postupem času byly fibráty globálně nahrazeny ve velkém množství statiny. Nicméně jejich vliv na životní prostředí tím zdaleka neskončil [21, 22, 23, 24].

Lipitor je léčivo obsahující atorvastatin. Například v USA je to jedno z nejvíce vydávaných léčiv vůbec. Jen za období od 1998 do 1999 vzrostl jeho prodej o 46 %. Prodej ostatních léků obsahujících statiny vzrostl o 20 %. Obrovské množství populace ve světě tyto léky pravidelně užívá a farmaceutické firmy plánují nárůst jejich distribuce. Předpokládají skutečnost, že mnoho lidí statiny bude potřebovat, jen u nich ještě nebyla vysoká hladina cholesterolu diagnostikována. Velké množství statinů ve většině případů vstupuje po exkreci do akvatického ekosystému, kde následně pokračuje v inhibici HMG-CoA reduktáz v jakémkoliv organismu, do kterého díky tomuto koloběhu vstoupí [22].

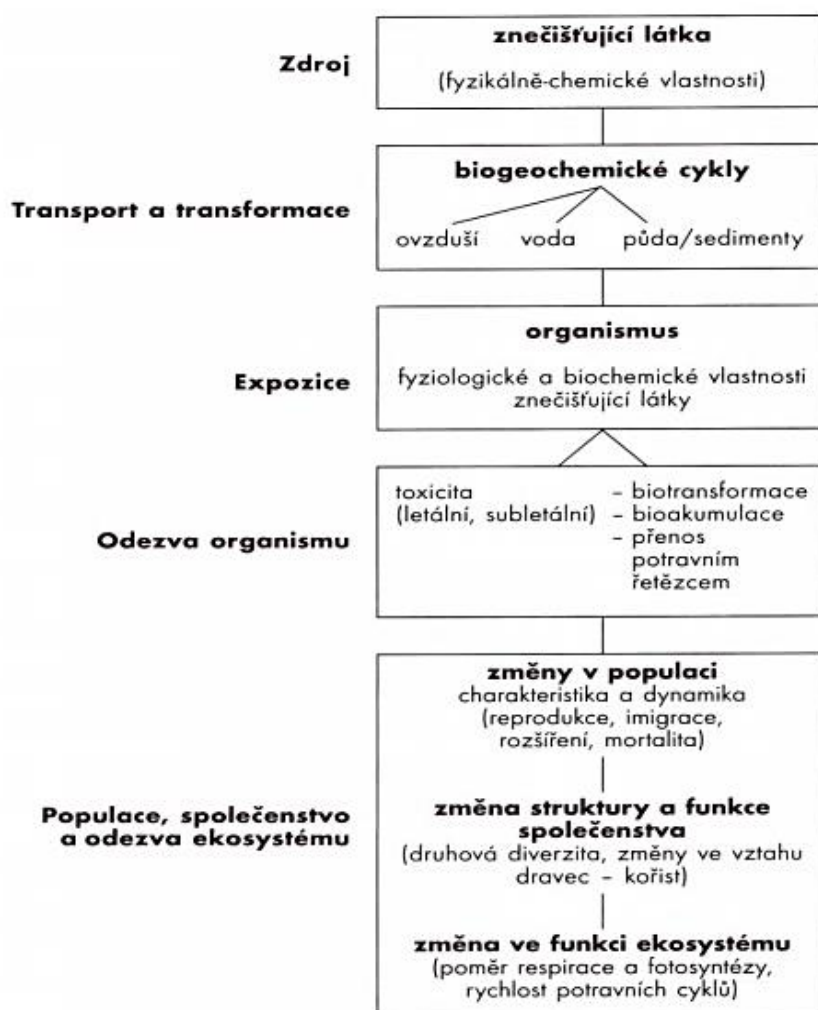
## **2.3 Ekotoxikologie**

### **2.3.1 Definice a vymezení oboru**

Ekotoxikologie je interdisciplinární obor, postavený na základech ekologie a toxikologie. Ekologie je vědní disciplína, která studuje vzájemné interakce mezi organismy a prostředím, i mezi organismy navzájem. Toxikologie se zabývá studiem negativního vlivu chemických sloučenin na organismy. Pro popis na obecné úrovni bude dále pro látky nebo sloučeniny



s toxickým vlivem, používán pojem toxikant. Propojením těchto definic lze ekotoxikologii popsat jako vědu, která se zabývá negativním vlivem toxikantů na všechny biologické úrovně živé přírody. Do biologických úrovní živé přírody zahrnujeme buňky, orgány, organismy, ale i celé ekosystémy. V užším slova smyslu tato věda studuje působení cizorodých látek na volně žijící organismy v jejich prostředí, v širším pojetí se zabývá také studiem přenosu toxikantů z prostředí na člověka, ať už je to prostřednictvím potravního řetězce, na jehož vrcholu stojí, či z vody, půdy nebo ovzduší. Nezabývá se tedy jen účinkem toxikantů, ale i jejich pohybem a přeměnou. Vliv a dopady toxikantu na ekosystém zobrazuje obrázek 6. Ekotoxikologie zahrnuje poznatky celé škály dalších vědních disciplín jako je např.: chemie životního prostředí, analytická chemie, fyzika, pedologie, hydrochemie, geologie, klimatologie, lékařství a další [25, 26, 27].



Obrázek 6: Schéma zobrazující osudy toxikantu v ekosystému [26]

### 2.3.2 Cíle ekotoxikologie

Významem ekotoxikologie je z vědeckého hlediska rozšiřování poznatků, analýza a pochopení různorodých účinků chemických látek na všechny biologické úrovně živé přírody. Mezi technické cíle ekotoxikologie zahrnujeme vytváření přístrojů a metod pro testování toxicity daných látek nebo nástrojů pro odhad škodlivosti a rizik. Z praktického hlediska je hlavním cílem ochrana živé přírody, tedy i prevence poškození a vystavení ekosystémů toxickým rizikům. Dále prognóza a odhad toxicity chemikálií, stejně tak jako rizik, která jsou vázána s životním cyklem těchto látek [25, 28].

### 2.3.3 Ekotoxicita a metodiky vedoucí k jejímu hodnocení

Ekotoxicita je definována jako nebezpečná vlastnost, kterou mají chemické látky, jež představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí [29].

Testování ekotoxicity na organismech akvatického ekosystému má nenahraditelný význam při klasifikaci nově distribuovaných chemických látek a přípravků včetně léčiv. U látek s významným praktickým užitím je nezbytné znát možné škodlivé účinky na biologické systémy. Pro testy se volí organismy, které zastupují producenty, konzumenty i destruenty, tj. nejdůležitější složky ekosystémů. Testování je závažné při vyšetřování původů havárií na povrchových a podpovrchových vodách. Dále se uplatňuje při hodnocení odpadů určených na skládkování. [27, 30, 31, 32].

#### 2.3.3.1 Testy akutní a semichronické toxicity

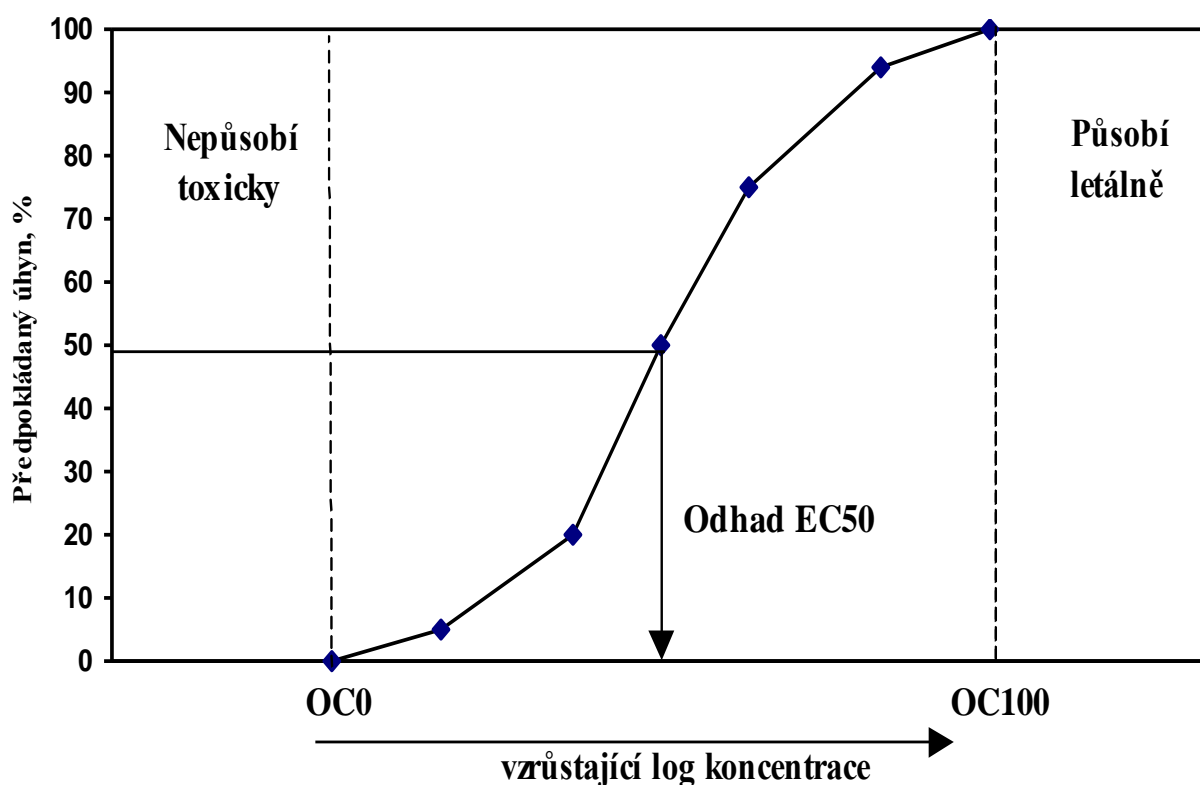
Základní princip, na kterém jsou založeny veškeré testy toxicity, spočívá ve faktu, že reakce organismu na vystavení (expozici) toxické látky je závislá na dávce této látky. Testy akvatické toxicity jsou koncipovány tak, aby popsaly vztah mezi koncentrací podané dávky a odezvou daného biologického systému. Tento vztah graficky charakterizuje křivka dávka – účinek. Zatímco testy akutní toxicity jsou nejčastěji prováděny tak, aby se následně vyhodnotila okamžitá odezva, kterou je ve většině případů úmrtnost daných organismů (v mírnějším případě jejich stresové chování), chronické testy sledují různé subletální efekty dlouhodobé expozice jako jsou například změny v růstu, chování, rozmnožování atd. Výsledky ekotoxikologických testů představují vypočtené hodnoty:  $LC_{50}$  – letální koncentrace, která vyvolá 50% úhyn testovaných organismů;  $EC_{50}$  – efektivní koncentrace, která vyvolá 50 % úhyn, či imobilizaci testovaných organismů;  $IC_{50}$  – inhibiční koncentrace, která způsobí 50 % inhibici růstu ve srovnání s kontrolou. Ke kalkulaci ekotoxikologických hodnot někdy slouží i určené indexy: NOEC, LOEC aj. Všechny tyto hodnoty bývají udávány v jednotkách mg/ml nebo ml/l. Podle indexu lze testovanou látku klasifikovat do třídy toxicity a odhadnout míru jejího toxického účinku na vodní organismy [27, 30, 33, 34].

#### 2.3.3.2 Principy testů

U látky, o které není znám její ekotoxikologický efekt, se nejdříve provede tzv. **orientační test**, který slouží k určení koncentračního rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ,  $LC_{50}$ ) testované látky. Volí se zde zpravidla široké koncentrační rozpětí, nasazuje se menší počet testovaných organismů. Účel tohoto testu spočívá ve vyhodnocení nejvyšší koncentrace látky, při které ještě nedochází k úhynu či imobilizaci organismů ( $OC_0$ ) a nejnižší koncentrace, která již úhyn či imobilizaci zapříčiňuje ( $OC_{100}$ ). Na podkladě výsledků tohoto testu se provede **základní (definitivní) test**, sloužící k přesnému určení hodnot  $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$ ,  $IC_{50}$ . Pro test se volí většinou 7 různých koncentrací roztoku v rozmezí, které bylo stanoveno orientačním testem. Ředění se provádí tak, aby kolem předpokládané hodnoty  $EC_{50}$  došlo k úhynu nebo imobilizaci 5-95 % organismů ve třech či více ředěních. Nejvyšší a nejnižší koncentrace odpovídají hodnotám  $OC_0$  a  $OC_{100}$  (zjištěné orientačním testem). Distribuce koncentrací by měla být symetricky rozložena kolem hodnoty  $EC_{50}$ . Způsob rozložení testovaných koncentrací zobrazuje obrázek 7. Koncentrační řada by měla být logaritmická, následující koncentrace by měla být vždy  $k$  krát větší nežli předchozí. Koeficient  $k$  se vypočítá z následujícího vztahu, kde  $n$  představuje počet hledaných koncentrací:

$$\log k = \frac{\log \frac{OC_0}{OC_{100}}}{n-1} \quad (1)$$

Pro každou koncentraci se nasazují 2-3 paralelní stanovení. Odečítá počet uhynulých či imobilizovaných organismů. V ideálním případě obdržíme 5 hodnot, tj. parciálních mortalit (úhynů větších než 0 % a menších než 100 %). Zjištěné procentuální mortality se následně převedou na probitové hodnoty. Převod dat na probity lze uskutečnit pomocí tabulky (příloha č. 1) nebo výpočetními programy. Následně se pomocí rovnice regrese křivky dávka – účinek vypočítá hodnota EC<sub>50</sub> [33, 34].



Obrázek 7: Způsob rozložení testovaných koncentrací (křivka dávka – účinek) [34]

#### 2.3.4 Vybrané testy ekotoxicity

Bakalářská práce se zabývala stanovením ekotoxicity léčiv na snížení hladiny cholesterolu v krvi. Rezidua těchto látek se vyskytují zejména v akvatickém ekosystému, z toho důvodu byly k hodnocení ekotoxicity vybrány akvatické organismy reprezentující tento ekosystém.

**Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>** je testem akutní toxicity se sladkovodními korýši *Thamnocephalus platyurus*. Tento ekotoxikologický test se vyznačuje vysokou citlivostí. Test je vhodný například pro hodnocení říčních sedimentů, odpadních vod, výluhů tuhých odpadů a hodnocení nově zaváděných chemických látek. Slouží ke zjištění vlivu chemických látek na mortalitu organismu a stanovení akutní toxicity 24hLC<sub>50</sub> [35, 36].

Testovací organismus *T. platyurus* patří do řádu žábřonožek (*Anostraca*) do třídy lupenonožců (*Branchiopoda*). Jedinci se nevyznačují schránkou, jejich těla jsou protáhlá, měkká a složená z mnoha článků. Larvy se líhnou z cyst, dospělci dorůstají délky až 7 mm [37].



Obrázek 8,9: *Thamnocephalus platyurus* dospělý jedinec [38, 39]

Testovaná látka je rozpuštěna ve standardní ředící vodě, z tohoto roztoku je poté připravena koncentrační řada. Těmto různým koncentracím testované látky jsou následně po dobu 24 hodin organismy vystaveny. Zároveň se nasazuje kontrola, která obsahuje pouze standardní ředící vodu. Principem testu je sledovat mortalitu organismu *T. platyurus* nasazeného do koncentrační řady testované látky, v porovnání s organismy v kontrolních šachtách. Test se považuje za platný, pokud mortalita kontroly nepřesáhne 10 %. Jedinci se považují za mrtvé, pokud se během 10 sekund pozorování nepohybují [35, 36].

**Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*** se využívá k hodnocení toxicity roztoků a suspenzí, také pro testování povrchových a odpadních vod. Cílem je stanovení účinků testované chemikálie na vegetativní růst sladkovodní rostliny – okřehku menšího (*Lemna minor*). Sleduje se přírůstek biomasy nebo inhibice růstu podle růstové křivky. Dále se stanovuje hodnota  $168hIC_{50}$  [40].

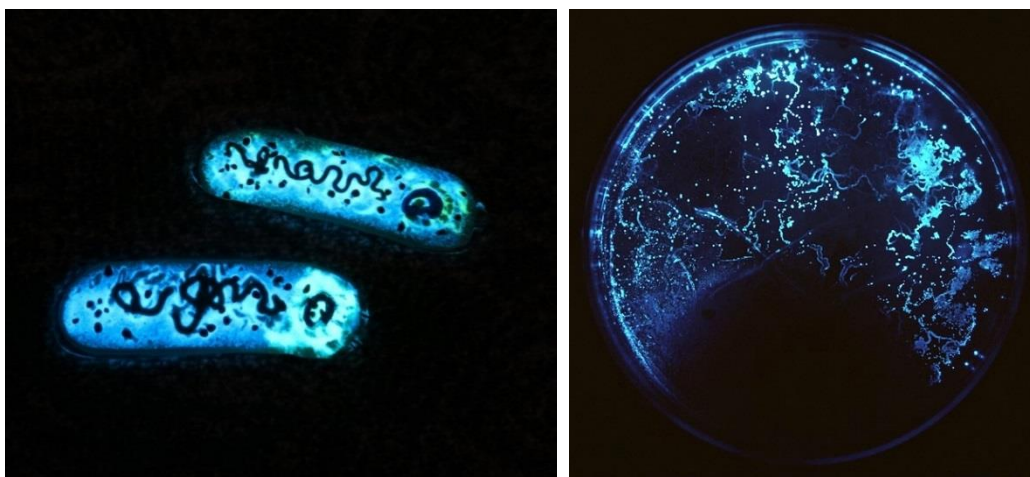
Vodní rostlina okřehek menší, lidově žabinec se taxonomicky řadí do oddělení rostlin krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložných (*Liliopsida*), čeledě *Lemnaceae*. Dále patří do skupiny rostlin tzv. měkké vegetace, která zahrnuje rostliny plovoucí na vodní hladině (natantní) a rostliny ponořené (submerzní). Okřešky vyhledávají pro svůj růst hladiny stojatých vod a jsou potravou pro vodní ptactvo a některé ryby. Pokud mají příznivé podmínky pro růst, vytváří na vodní hladině kolonie, které nepropouští světlo, což má za následek zhoršení kvality vody pod nimi. Zdraví jedinci se vyznačují plochým a kožovitým lístkem s kořínkem. Kolonie tvoří 2-5 lístků. Okřehek je znám pro své akumulární schopnosti, zejména u sloučenin těžkých kovů, fosforu aj. [40, 41].



Obrázek 10: Okřehek menší – *Lemna minor* [42]

Okřehky se nechají růst po dobu 7 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné v živném roztoku označovaném jako Steinbergovo médium (SM). Společně s testem se nasadí testovací rostliny i do kontroly, což je roztok bez testované chemikálie obsahující jen SM. Kultura okřehku by se měla skládat z mladých kolonií světle zelené barvy bez viditelného poškození (nekróza, chloróza). Účinek testované látky je vyhodnocen na základě srovnání růstu (počtu lístků) v testovacích koncentracích s růstem v kontrolách. Stanovuje se hodnota  $IC_{50}$ , v tomto testu lze zjišťovat i hodnoty LOEC a NOEC. Existují případy, kdy testovaná látka povzbuzuje růst a tím pádem se hodnota  $IC_{50}$  nestanovuje. Výsledky se považují za platné, pokud průměrný počet lístků v kontrole vzrostl na konci testu na osminásobek a pH v kontrole se nezměnilo o více než 1,5 jednotky [41, 43].

**Bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri*** hodnotí účinky testované látky na testovacím zástupci destruentů v ekosystému. Destruenti představují významný článek v ekosystémech, podílí se na rozkladu organické hmoty, organických látek, a to nejen přírodního původu, ale mnohdy jsou využíváni v rámci sanačních a dekontaminačních technologií [44].



Obrázek 11, 12: *Vibrio fischeri* [45, 46]

*V. fischeri* je druh mořských gramnegativních bakterií, které se vyznačují přirozeným emitováním světla, bioluminiscencí. Luminiscence nastává při oxidaci luciferinu, přítomného v těle organismů, na oxyluciferin. Tuto reakci katalyzuje enzym luciferáza. Negativním působením testované látky na bakterie dochází k inhibici luminiscence, což je účinek hodnocený v tomto ekotoxikologickém testu. Na konci testu lze také stanovit hodnotu  $EC_{50}$  nebo  $EC_{20}$ .

Používají se bakteriální suspenze připravované z komerčně dostupných bakterií, které musí být uchovávány v mrazáku při teplotě  $-18\text{ °C}$  až  $-20\text{ °C}$ . Ihned po rozmrazení a rehydrataci se bakterie začínají rozmnožovat a jsou připravené na použití. Test je považován za platný, jestliže hodnota korekčního faktoru  $f_k$  je pro 15ti i 30ti minutovou expozici v rozsahu hodnot 0,6 až 1,8. Paralelní stanovení pro kontroly se od svých průměrů nesmí neodchylovat o více jak 3 %, a totéž platí i pro paralelní stanovení vzorků [47].

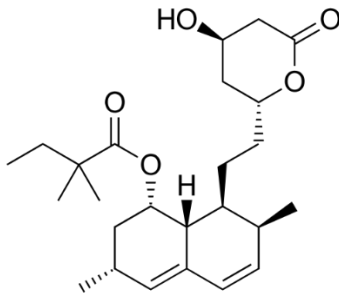
### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem zadané bakalářské práce bylo ekotoxikologické hodnocení vybraných léčiv na snížení hladiny cholesterolu v krvi. Jako testovací látky byla použita léčiva Corsim (účinná látka simvastatinum) a Atoris (účinná látka atorvastatinum) ze skupiny statinů. Dále také Lipanthyl a Lipanthyl Supra (účinná látka fenofibratum) ze skupiny fibrátů. Pro testování byla vybrána i kyselina klofibrová jako metabolit fibrátů. Pro ekotoxikologické testování byly zvoleny následující testy toxicity: alternativní test Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> na testovacím organismu *T. platyurus*, bioluminiscenční test na *V. Fischeri* a test inhibice růstu okřehku menšího *L. minor*, patřící mezi testy fytoxicity. Na základě tohoto testování byly následně vypočteny toxikologické indexy a byla posouzena ekotoxicita.

#### 3.1 Složení a základní fyzikální vlastnosti vybraných farmak

- Corsim<sup>®</sup> 10 – účinná látka: simvastatinum 10 mg  
pomocné látky: monohydrát laktózy, mikrokrytalická celulóza, předbobtnalý škrob, butylhydroxyanisol, kyselina askorbová, kyselina citrónová, koloidní bezvodý oxid křemičitý, magnesium-stearát (v jádru tablety); hypromelóza, červený a žlutý oxid železitý, triethyl-citrát, oxid titaničitý, mastek, povidon 40 (v potahu tablety)

Tabulka 3: Fyzikálně – chemické vlastnosti simvastatinu [48, 49]

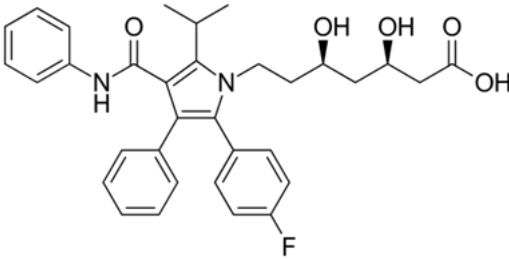
Název	Sumární vzorec	Mr [g/mol]	Rozpustnost ve vodě při 25 °C [mg/ml]	Teplota tání [°C]
simvastatinum	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	418,574	0,765	135-138
Strukturní vzorec				



Obrázek 13: Potahované tablety Corsim<sup>®</sup> 10 [50]

- Atoris<sup>®</sup> 10 – účinná látka: atorvastatinum 10 mg  
pomocné látky: monohydrát laktózy, mikrokrytalická celulóza, roztok hydroxidu sodného 0,02 mol/l, natrium-lauryl-sulfát, hyprolóza, sodná sůl kroskaramelózy, krosповidon, magnesium-stearát (v jádru tablety); mastek, oxid titaničitý, makrogol 3000 a polyvinylalkohol (v potahu tablety).

Tabulka 4: Fyzikálně – chemické vlastnosti atorvastatinu [51, 52]

Název	Sumární vzorec	Mr [g/mol]	Rozpustnost ve vodě při 25 °C [mg/ml]	Teplota tání [°C]
atorvastatinum	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558,65	1,230	159-161
Strukturní vzorec				



Obrázek 14: *Potahované tablety Atoris® 10* [53]

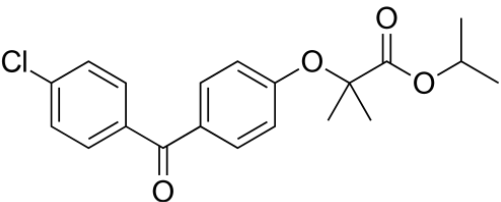
- Lipanthyl 267M – účinná látka: fenofibratum (mikronizovaný) 267,0 mg  
pomocné látky: monohdrát laktózy, přebobtnatělý škrob, natrium-lauryl-sulfát, krosповidon, magnesium-stearát (uvnitř tobolky); želatina, oxid titaničitý, červený a žlutý oxid železitý (tobolka).



Obrázek 15: *Tobolka Lipanthyl 267M* [54]

- Lipanthyl Supra – účinná látka: fenofibratum 160 mg  
pomocné látky: monohdrát laktózy, mikrokrystalická celulóza, natrium-lauryl-sulfát, povidon 25, krosповidon, koloidní bezvodý oxid křemičitý, natrium-stearyl-fumarát (v jádru tablety); mastek, oxid titaničitý, sójový lecithin, xanthanová klovatina a polyvinylalkohol (v potahu tablety).

Tabulka 5: Fyzikálně – chemické vlastnosti fenofibrátu [55, 56]

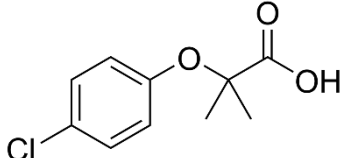
Název	Sumární vzorec	Mr [g/mol]	Rozpustnost ve vodě při 25 °C [mg/ml]	Teplota tání [°C]
fenofibratum	$C_{20}H_{21}ClO_4$	360,834	0,420	80-81
Strukturní vzorec				



Obrázek 16: Potahované tablety Lipanthyl Supra [57]

- Kyselina klofibrová

Tabulka 6: Fyzikálně – chemické vlastnosti kyseliny klofibrové [58, 59]

Název	Sumární vzorec	Mr [g/mol]	Rozpustnost ve vodě při 25 °C [mg/ml]	Teplota tání [°C]
kyselina klofibrová	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>3</sub>	214,645	0,583	120-122
Strukturní vzorec				

Vybraná farmaka byla v pevném skupenství. Lipanthyl (po odstranění tobolky) a kyselina klofibrová ve formě bílého krystalického prášku. Léčiva Atoris, Corsim a Lipanthyl Supra ve formě oválných potahovaných tablet. Jelikož potahy těchto přípravků obsahují pomocné, většinou nerozpustné látky (usnadňující polknutí tablety), bylo nezbytné je nejprve odstranit skalpelem. Až následně byly upravené tablety bez potahu pomocí třecí misky s tloučkem rozmělněny na krystalický prášek. Farmaka byla poté převedena do zásobních roztoků. Tyto zásobní roztoky poté sloužily k vytvoření koncentračních řad viz tabulka 8 a 10. Jednotlivé roztoky nebyly zcela homogenní, představovaly spíše suspenze. K lepšímu rozpuštění nebyla použita žádná organická rozpouštědla, a to z toho důvodu, že byla snaha o testování látek v reálné podobě, jak se mohou ve vodách vyskytovat. Daná rozpouštědla by navíc mohla negativně ovlivňovat průběhy jednotlivých testů.

Všechny koncentrace v toxikologických testech byly připraveny ředěním dle následující rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2, \text{ kde} \quad (2)$$

$c_1$  koncentrace zásobního roztoku testované látky

$V_1$  objem zásobního roztoku testované látky

$c_2$  požadovaná koncentrace testované látky

$V_2$  objem požadovaného roztoku

### 3.2 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

24hLC<sub>50</sub> ekotoxikologický test byl prováděn v multišachtové testovací destičce za použití čerstvě vylíhlého stádia larev sladkovodního korýše *T. platyurus*, které byly vylíhnuty z cyst. Cysty byly skladovány v suchém stavu v ledničce při 5 ± 2 °C.

#### Materiál a pomůcky

Veškerý potřebný materiál, včetně cyst testovacího organismu a chemikálií potřebných pro přípravu standardní ředící vody jsou součástí toxkitu Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>. Dále byl použit Inkubátor typu Novital CO *Vatutto 20* – inkubace s osvětlením, standardní laboratorní sklo, světelná deska.



## Příprava ředící vody

Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna přibližně 800 ml destilované vody. Následně do ní byly převedeny solné roztoky, které byly součástí toxkitu ve formě 15 ml ampulí. Nejprve byla otevřena ampule s roztokem označená číslem 1 ( $\text{NaHCO}_3$ ) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován i s ostatními ampulemi obsahujícími solné roztoky, tj. dvě ampule označené číslem 2 ( $\text{CaSO}_4$ ), jedna ampule s číslem 3 ( $\text{MgSO}_4$ ) a jedna ampule s číslem 4 ( $\text{KCl}$ ). Pořadí bylo dodrženo. Na závěr byla baňka doplněna stříčkou s destilovanou vodou po rysku a protřepána. Standardní sladká voda sloužila dále jako ředící médium pro přípravu koncentrační řady testované látky a také jako médium pro inkubaci cyst. Do dalšího použití byla skladována v temnu v ledničce. Před samotným použitím ji bylo nutné nechat zteplat na laboratorní teplotu a provzdušnit (cca 15 min) [36].

Tabulka 7: Seznam koncentrovaných solí použitých na přípravu standardní sladké vody

Číslo roztoku	Sůl	Počet ampulí
1	$\text{NaHCO}_3$	1
2	$\text{CaSO}_4$	2
3	$\text{MgSO}_4$	1
4	$\text{KCl}$	1

## Inkubace cyst

Inkubace cyst byla započata přesně 24 hodin před začátkem testování a prováděla se v naředěné standardní sladké vodě. Pro přípravu tohoto naředěného média bylo třeba smíchat 2,5 ml standardní sladké vody a 17,5 ml destilované vody (poměr 1:8). Vialka s cystami byla naplněna přibližně 1 ml naředěné standardní sladké vody a byla 30 minut protřepávána. Po uplynutí této doby byly hydratované cysty kvantitativně přeneseny do malé Petriho misky, kam bylo přidáno 10 ml naředěné standardní sladké vody. Následně byla Petriho miska zakryta víčkem a inkubována při teplotě 25 °C po dobu 20 až 24 hodin za kontinuálního osvětlení (3 000 až 4 000 lux).



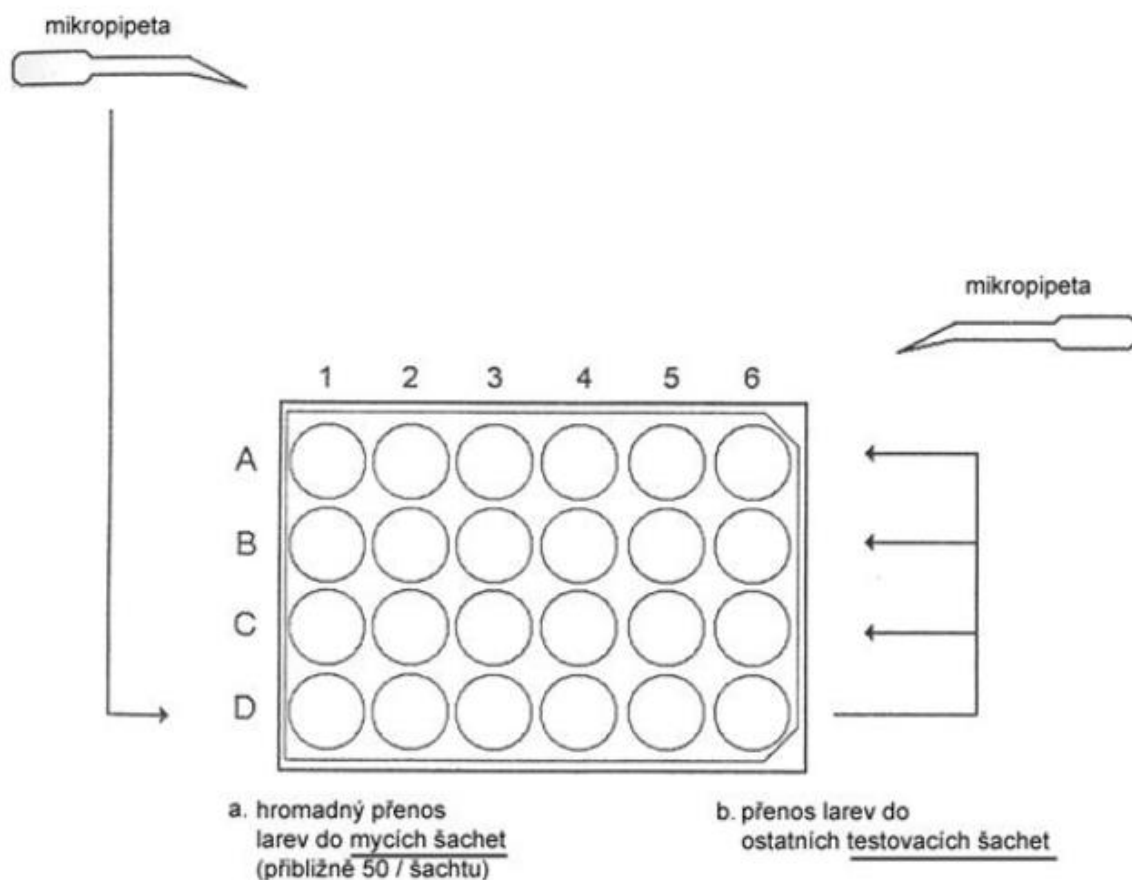
Obrázek 17: *Thamnocephalus platyurus* – cysty před inkubací

## Nasazení testu

Do multišachtové destičky byly nasazeny byly 2-3 koncentrační řady o 5 různých koncentracích. (viz tabulka 8). Každá koncentrace testované látky byla přenesena do šachet jednoho sloupce testovací desky. Přenos roztoků byl vždy prováděn od kontroly (sloupec 1 viz obrázek 18) směrem k nejvyšší koncentraci (sloupec 6). Přenos čerstvě vylíhlých jedinců korýše *T. platyurus* byl proveden pasteuovou pipetou ve dvou krocích. V prvním kroku bylo přeneseno přibližně 40 larev z Petriho misky do tzv. rozplavné šachty (řádek D), což představovalo minimalizaci zředění vlastní testované koncentrace. Ve druhém kroku se do každé testovací šachty (řádky A, B, C) nasadilo přesně po deseti larvách. Důležité bylo nabírat při transportu co nejmenší množství kapaliny. Kompletně naplněná testovací destička byla poté zakryta parafilmem a pevně uzavřena plastovým víčkem. V této fázi byla vložena do temného inkubátoru a inkubována při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin.

Tabulka 8: Koncentrační řady pro organismus *T. platyurus*

Testované léčivo	Orientační test [mg/l]	Základní test [mg/l]
Corsim	0,01; 0,1; 1; 10; 100	20; 40; 80; 160; 320
Atoris	0,01; 0,1; 1; 10; 100	20; 40; 80; 160; 320
Lipanthyl 267M	0,01; 0,1; 1; 10; 100	20; 40; 80; 160; 320
Lipanthyl Supra	0,01; 0,1; 1; 10; 100	20; 40; 80; 160; 320
Kyselina klofibrová	0,01; 0,1; 1; 10; 100	20; 40; 80; 160; 320



Obrázek 18: Schéma plnění multišachtové destičky [36]

## Vyhodnocení výsledků

Po skončení 24 hodinové inkubační doby byla testovací destička vyjmuta z inkubátoru a následně byl zaznamenán počet mrtvých jedinců. Pro každou koncentraci byla poté spočtena procentuální mortalita. Dále byl sestrojen graf závislosti procentuální mortality převedené na probitové hodnoty na logaritmu koncentrace testovaných léčiv. Z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota hodnota 24hLC<sub>50</sub> [36].

### 3.3 Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

168hIC<sub>50</sub> ekologický test byl proveden na čerstvě namnoženém okřehku menším, který byl kultivován ve Steinbergově médiu za kontinuálního osvětlení.

#### Materiál a pomůcky

Testovací organismus pocházející z laboratorní kultivace, chemikálie viz tabulka 9, běžné laboratorní sklo: kádinky o objemu 150 ml aj., zářivka 6500-10000 lux.

#### Příprava Steinbergova média (SM)

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky makrosložek a mikrosložek, které slouží k přípravě SM. Makrosložky představují zásobní roztoky č. 1, 2 a 3, mikrosložky č. 4 až 8. Složení a koncentrace jednotlivých roztoků jsou uvedeny v tabulce č. 9. Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna přibližně 900 ml destilované vody. Následně se do ní přidalo po 20 ml každé makrosložky a poté po 1 ml každé mikrosložky, aby se zamezilo srážení. Nakonec byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. SM pro testování bylo připraveno 1-2 dny před použitím, aby se stabilizovalo pH. Uskladněno bylo v temnu a chladu.

Tabulka 9: Složení a koncentrace jednotlivých roztoků pro přípravu SM

Číslo roztoku	Makrosložky [g/l]		Číslo roztoku	Mikrosložky [mg/l]	
1	KNO <sub>3</sub>	17,5	4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120
1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5	5	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	180
1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63	6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44
2	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,0	7	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180
3	Ca(NO <sub>3</sub> ) · 4H <sub>2</sub> O	14,75	8	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	760
			8	EDTA	1500

#### Nasazení testu

Ve 200 ml odměrných baňkách byly nejdříve pomocí SM naředěny příslušné koncentrace testovaných léčiv. Použité koncentrační řady pro testy jsou uvedeny v tabulce 10. Z důvodu malého množství testované látky nebyl proveden test s kyselinou klobfibrovou. Následně bylo 100 ml každé jednotlivé koncentrace převedeno do 150 ml kádinek (pro každou koncentraci 2 kádinky). Poté bylo do každé kádinky pomocí skleněné tyčinky nasazeno 9 lístků okřehku menšího *L. minor*. Počet lístků v každé koncentraci i kontrole byl stejný. Nakonec byly kádinky zakryty Petriho miskou a vystaveny kontinuálnímu osvětlení se světelnou intenzitou 6 500 až 10 000 lux. Na začátku a na konci testu bylo v jednotlivých koncentracích i v kontrole změřeno a zaznamenáno pH.

Tabulka 10: Koncentrační řady pro organismus *L. minor*

Testované léčivo	Základní test [mg/l]
Corsim	0,01; 0,1; 1; 10; 100
Atoris	0,01; 0,1; 1; 10; 100
Lipanthyl 267M	0,01; 0,1; 1; 10; 100
Lipanthyl Supra	0,01; 0,1; 1; 10; 100
Kyselina klofibrová	—

### Vyhodnocení testu

Účinek testovaných léčiv byl posuzován podle rychlosti růstu. Pro stanovování inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí byl pro každou koncentraci a kontrolu spočítán počet lístků na konci testu. Jednotlivé růstové rychlosti byly vypočítány podle vzorce:

$$\mu_i = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}, \text{ kde} \quad (3)$$

$\mu_i$  růstová rychlost v testované koncentraci

$N_0$  počet lístků na začátku testu

$N_n$  počet lístků na konci testu

$t_n$  doba trvání testu

Z jednotlivých hodnot  $\mu$  pro každou testovanou koncentraci i kontrolu se následně spočítala procentuální inhibice růstu  $I_\mu$  dle následujícího vzorce:

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i)}{\mu_c} \cdot 100, \text{ kde} \quad (4)$$

$I_\mu$  inhibice růstu

$\mu_i$  růstová rychlost v testované koncentraci

$\mu_c$  růstová rychlost v kontrole

Dále byly sestrojeny grafy závislosti procentuální inhibice růstu na logaritmu koncentrace testovaných léčiv. Z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota 168hIC<sub>50</sub> [43].

### 3.4 Bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri*

V testu byly použity lyofilizované bakterie *V. fischeri* schopné bioluminiscence. Tyto bakterie jsou použitelné ihned po rozmrazení a rehydrataci.

#### Materiál a pomůcky

Pro měření byl kromě automatických pipet, série skleněných kyvet a jiného běžného laboratorního skla použit luminometr LUMIStox 300 s termoblokem s řízenou teplotou.

#### Provedení testu

Z důvodu nedostatečného množství bakterií, byla využita metoda screeningového stanovení inhibice luminiscence testovaného vzorku oproti kontrole. Byly připraveny roztoky všech vybraných farmak o koncentraci 100 mg/l. *V. fischeri* jsou mořské bakterie, proto jako referenční roztok (blank) a jako ředící médium sloužil 2 % roztok chloridu sodného. Aby

roztoky vzorků nebyly silně zakalené a nedocházelo ke ztrátám luminiscence, byl pro dokonalejší rozpuštění jednotlivých farmak využit ultrazvuk. Díky tomuto kroku nebylo nutné později provádět korekci. Na zajištění dobrých životních podmínek pro testovací organismus mělo být splněno kritérium pH všech testovaných vzorků v rozmezí 6 až 8,5.

Z každého 100 mg/l roztoku daného léčiva bylo následně automatickou pipetou odebráno 500  $\mu$ l a převedeno do skleněné kyvety, která byla poté vložena do termobloku. V termobloku byly vzorky temperovány na teplotu  $15 \pm 1$  °C. Po uplynutí 15 min bylo do každé kyvety se vzorkem léčiva přidáno 500  $\mu$ l suspenze bakterií. Na měření se používá série takto připravených zkušebních skleněných kyvet. Doba inkubace, po jejímž uplynutí byla změřena změna intenzity luminiscence, byla 15 a 30 minut. Ze změny intenzity světla se vypočítává toxický účinek.



Obrázek 19: Luminometr LUMISTox 300 s termoblokem

### Vyhodnocení testu

Pro platnost výsledků screeningového testu bylo zapotřebí vypočítat hodnotu korekčního faktoru podle následujícího vztahu:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}, \text{ kde} \quad (5)$$

$f_{kt}$  odpovídá korekčnímu faktoru pro expozici po daném čase, 30 min

$I_{kt}$  odpovídá intenzitě luminiscence kontrolního vzorku po expozici po daném čase, 30 minut  
[rel. jednotka luminiscence]

$I_0$  odpovídá intenzitě luminiscence kontrolní suspenze bezprostředně před přidáním vody k zředění [rel. jednotka luminiscence]

Pro validitu testu musí hodnota korekčního faktoru náležet do intervalu 0,6-1,8 [47].

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ekotoxicita vybraných farmak byla hodnocena pomocí vybraných ekotoxikologických testů uvedených a popsáných v experimentální části. U alternativních testů Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> byly nejprve provedeny orientační testy. Na základě jejich výsledků byly vytvořeny koncentrační řady pro testy základní (viz tabulka 8). Pro testy inhibice růstu okřehku menšího *L. minor* byla z důvodu malého množství dostupných léčiv zvolena orientační řada za řadu základního testu (viz tabulka 10). Z důvodu malého množství testované látky nebyl tento test fytoxicity proveden s kyselinou klofibrovou. Bioluminiscenční test na *V. fischeri* byl proveden za účelem porovnání toxicity, kdy byla posuzována toxicita jednotlivých léčiv prostřednictvím inhibice luminescence vůči kontrole v %. Výpočet hodnoty EC<sub>50</sub> nebyl prováděn. K ověření správnosti testů, kvality a citlivosti organismů byly provedeny referenční testy prostřednictvím standardu dichromanu draselného. V případě bioluminiscenčního testu na *V. fischeri* byl proveden referenční test toxicity prostřednictvím standardu 7,5 % NaCl.

Aby byly výsledky této bakalářské práce dostatečně přehledné, byly uvedeny příklady křivek dávka – účinek a výpočtů toxikologických indexů pouze pro referenční testy. Výsledky jednotlivých ekotoxikologických testů byly pro přehlednost zpracovány do tabulek. V průběhu testů byla sledována kritéria podmiňující validitu jako jsou např. pH či teplota. Tato kritéria byla ve shodě s podmínkami vyžadovanými pro jednotlivé testy.

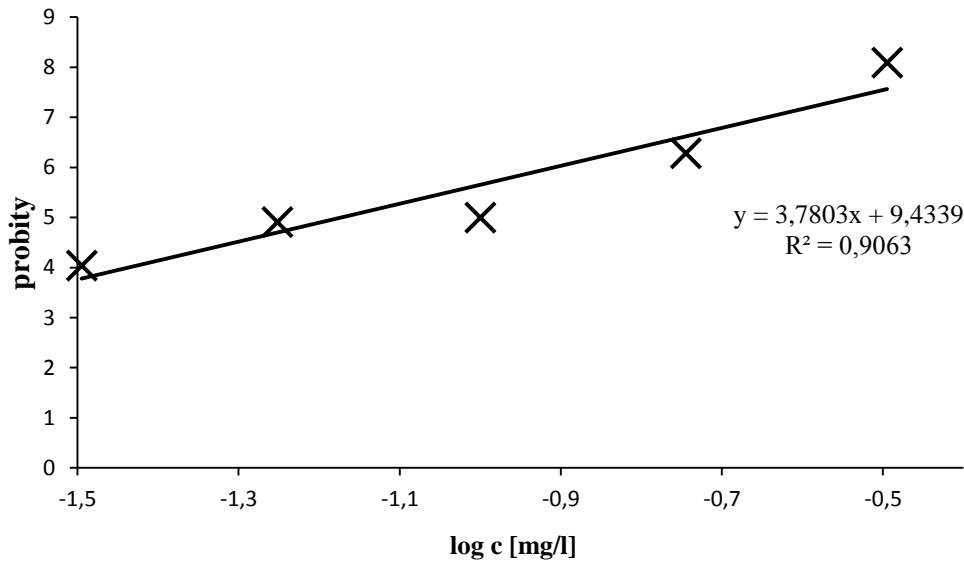
### 4.1 Referenční testy

Všechny referenční testy byly provedeny podle stejné metodiky a stejných podmínek jako testy s testovanými látkami. Jako reference byl pro testy s organismy *T. platyurus* a *L. minor* použit roztok dichromanu draselného. Získané hodnoty LC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> pro referenční testy jsou uvedeny v tabulce 13 a vyhovovaly limitům pro daný organismus a standard.

#### 4.1.1 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Tabulka 11: Referenční test akutní toxicity pro *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0,32	5/30	16,66	4,04	-1,49
0,18	14/30	46,67	4,91	-1,25
0,10	15/30	50	5,00	-1,00
0,056	27/30	90	6,28	-0,74
0,032	30/30	100	8,09	-0,49



Obrázek 20: Křivka dávka – účinek referenčního testu Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný:  $y = 3,7803 \cdot x + 9,4339$

Za y byla dosazována 50 % mortalita, která odpovídá dle probitové převodové tabulky (viz příloha 1) číslu 5.

$$x = \frac{5 - 9,4339}{3,7803} = -1,1729$$

$$c = 10^x = 10^{-1,1729} = 0,067 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Referenční hodnota LC<sub>50</sub> pro 24 hodinový test akutní toxicity na *T. platyurus* s K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> se dle literatury pohybuje v rozmezí 0,065-0,095 mg/l. Referenční test byl proveden metodicky správně, protože hodnota 0,067 mg/l do tohoto intervalu náleží.

#### 4.1.2 Inhibice růstu okřehku menšího *L. minor*

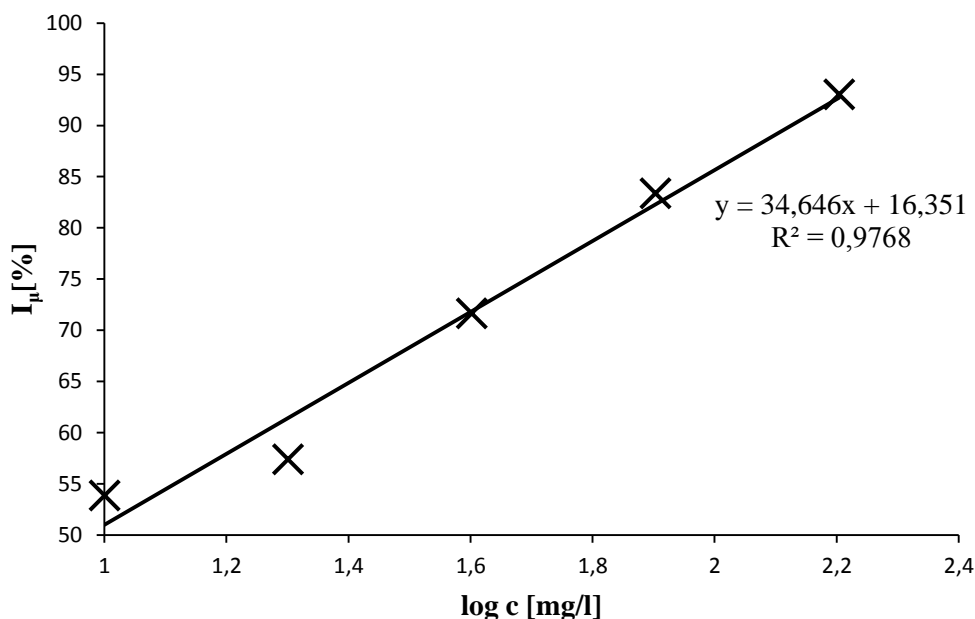
Tabulka 12: Referenční test inhibice růstu *L. minor*

c [mg/l]	Růstová rychlost $\mu$	Inhibice růstu $I_\mu$ [%]	log c
0	0,0132	0	-
10	0,0048	53,86	1,00
20	0,0043	57,39	1,30
40	0,0024	71,65	1,60
80	0,0022	83,36	1,90
160	0,0009	93,02	2,20

Příklad výpočtu růstové rychlosti  $\mu$  a inhibice růstu  $I_\mu$  pro  $c_5 = 160$  mg/l:

$$\mu_1 = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} = \frac{\ln 10,5 - \ln 9}{168} = 0,0009$$

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i)}{\mu_c} = \frac{(0,0132 - 0,0009)}{0,0132} \cdot 100 = 93,02 \%$$



Obrázek 21: Křivka dávka – účinek referenčního testu inhibice růstu *L. minor*

Rovnice regrese odečtená z grafu pro dichroman draselný:  $y = 34,646 \cdot x + 16,351$

Za  $y$  byla dosazována 50 % inhibice růstu a následně po odlogaritmování byla vypočtena hodnota  $IC_{50}$ .

$$x = \frac{50 - 16,351}{34,646} = 0,9712$$

$$c = 10^x = 10^{0,9712} = 9,359 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Referenční hodnota  $IC_{50}$  pro 168 hodinový test inhibice růstu okřehku menšího *L. Minor* s  $K_2CrO_7$  se dle literatury pohybuje v rozmezí 5,5-10,0 mg/l. Referenční test byl proveden metodicky správně, protože hodnota 9,358 mg/l do tohoto intervalu náleží.

Tabulka 13: Výsledky referenčních ekotoxikologických testů

Organismus	Toxikologický index	c [mg/l]
<i>T. platyurus</i>	$LC_{50}$	0,067
<i>L. minor</i>	$IC_{50}$	9,359

## 4.2 Corsim

### 4.2.1 Thamnotoxkit F™

Orientační test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 8. Získané hodnoty z orientačního testu jsou uvedeny v tabulce 14. Zároveň s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.



Tabulka 14: Orientační test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
0,01	0/20	0	0	-2
0,1	0/20	0	0	-1
1	0/20	0	0	0
10	0/20	0	0	1
100	14/20	70	5,52	2

Na základě výsledků orientačního testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 8. Výsledky získané ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Základní test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
20	8/20	40	4,75	1,30
40	12/20	60	5,25	1,60
80	13/20	65	5,39	1,90
160	16/20	80	5,84	2,20
320	18/20	90	6,28	2,50

Hodnota 24hLC<sub>50</sub> byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 31,83 mg/l.

#### 4.2.2 Inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Test byl proveden s koncentrační řadou, která je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: *L. minor* – výsledné inhibice růstu

c [mg/l]	Průměrný počet lístků	Růstová rychlost	Inhibice růstu [%]	log c
0	72	0,0123	0	
0,01	69	0,0121	2,05	-2
0,1	53	0,0106	14,73	-1
1	52	0,0104	15,65	0
10	36	0,0083	33,33	1
100	10	0,0006	94,93	2

Hodnota 168hIC<sub>50</sub> testu na okřehku menším *L. minor* byla vyhodnocena pomocí metody porovnání rychlosti růstu. Touto metodou byla hodnota IC<sub>50</sub> stanovena na 7,48 mg/l.

### 4.3 Atoris

#### 4.3.1 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Nejprve byl proveden orientační test s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 8. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 17. Zároveň s testovanou látkou byla sledována i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 17: Orientační test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
0,01	0/20	0	0	-2
0,1	0/20	0	0	-1
1	0/20	0	0	0
10	2/20	10	3,72	1
100	16/20	70	5,52	2

Na základě výsledků orientačního testu byla určena koncentrační řada pro základní test. Použité koncentrace jsou uvedeny v tabulce 8. Výsledky získané ze základního testu prezentuje tabulka 18.

Tabulka 18: Základní test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	1/20	5	3,36	
20	10/20	50	5,00	1,30
40	14/20	70	5,52	1,60
80	16/20	80	5,84	1,90
160	18/20	90	6,28	2,20
320	20/20	100	8,09	2,50

Hodnota 24hLC<sub>50</sub> byla vypočtena z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 25,45 mg/l.

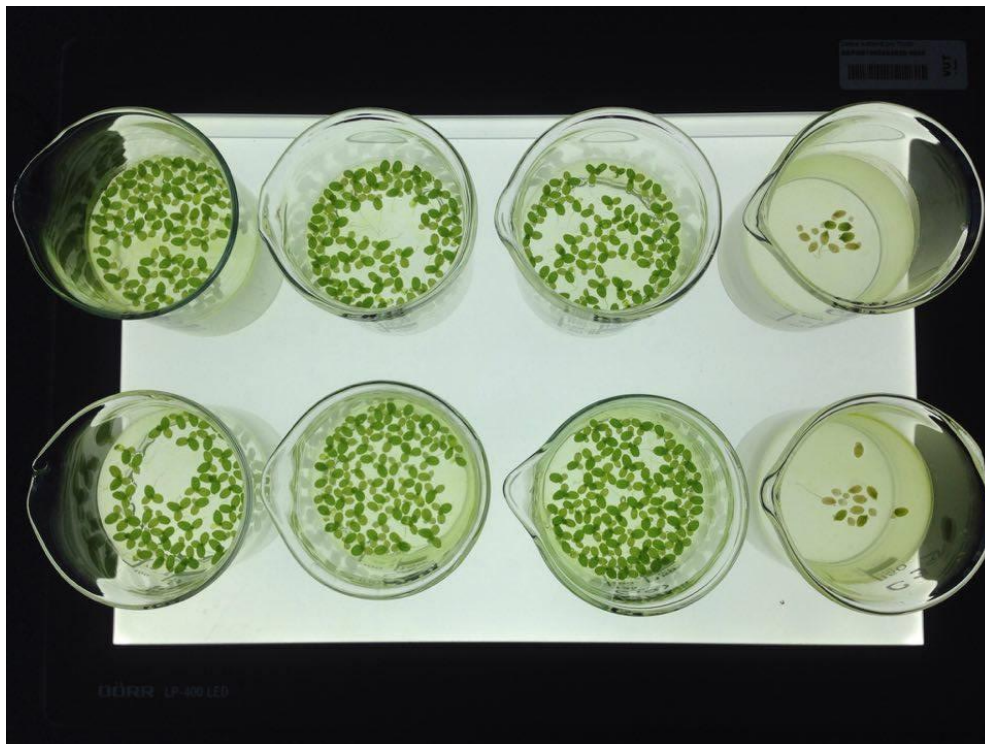
#### 4.3.2 Inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Základní test byl proveden s koncentrační řadou, která je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19: *L. minor* – výsledné inhibice růstu

c [mg/l]	Průměrný počet lístků	Růstová rychlost	Inhibice růstu [%]	log c
0	162	0,0172	0	
0,01	151	0,0168	2,31	-2
0,1	145	0,0165	3,83	-1
1	136	0,0161	6,05	0
10	23	0,0056	67,54	1
100	13	0,0022	87,27	2

Hodnota 168hIC<sub>50</sub> testu na okřehku menším *L. minor* byla vyhodnocena pomocí metody porovnání rychlosti růstu. Touto metodou byla hodnota IC<sub>50</sub> stanovena na 5,13 mg/l.



Obrázek 22: *L. minor* po 168 hod testu léčiva Atoris

#### 4.4 Lipanthyl Supra

##### 4.4.1 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Orientační test byl proveden s koncentrační řadou, která je uvedena v tabulce 8. Získané hodnoty prezentuje tabulka 20. Zároveň s testovaným léčivem byla hodnocena i kontrola, ve které mortalita nepřesáhla 10 %.

Tabulka 20: Orientační test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
0,01	0/20	0	0	-2
0,1	0/20	0	0	-1
1	0/20	0	0	0
10	1/20	5	3,36	1
100	11/20	55	5,13	2

Výsledky orientačního testu sloužily k určení rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 8. Výsledky získané ze základního testu prezentuje tabulka 21.

Tabulka 21: Základní test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	2/20	10	3,72	
20	3/20	15	3,96	1,30
40	8/20	40	4,75	1,60
80	10/20	50	5,00	1,90
160	14/20	70	5,52	2,20
320	17/20	85	6,04	2,50

Hodnota 24hLC<sub>50</sub> byla zjištěna ze závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 74,15 mg/l.

#### 4.4.2 Inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Test byl proveden s koncentrační řadou, která je uvedena v tabulce 10. Z důvodu opakované stimulace růstu nebyla v tomto případě hodnota 168IC<sub>50</sub> vyhodnocována.

### 4.5 Lipanthyl 267M

#### 4.5.1 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Orientační test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 8. Získané hodnoty z orientačního testu prezentuje tabulka 22. Kontrola byla hodnocena zároveň s testovaným léčivem, mortalita nepřesáhla hranici 10 %.

Tabulka 22: Orientační test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
0,01	0/20	0	0	-2
0,1	0/20	0	0	-1
1	1/20	5	3,36	0
10	1/20	5	3,36	1
100	12/20	60	5,25	2

Na základě výsledků orientačního testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 8. Výsledky získané ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 23.

Tabulka 23: Základní test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	1/20	5	3,36	
20	3/20	15	3,96	1,30
40	6/20	30	4,48	1,60
80	10/20	50	5,00	1,90
160	17/20	85	6,04	2,20
320	19/20	95	6,64	2,50

Hodnota 24hLC<sub>50</sub> byla spočtena z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí rovnice regresní přímky a činila 63,92 mg/l.

#### 4.5.2 Inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Test byl nasazen s koncentrační řadou, která je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 24.

Tabulka 24: *L. minor* – výsledné inhibice růstu

c [mg/l]	Průměrný počet lístků	Růstová rychlost	Inhibice růstu [%]	log c
0	123,5	0,0156	0	
0,01	123,0	0,0156	0,15	-2
0,1	96,5	0,0141	9,42	-1
1	84,9	0,0134	14,31	0
10	63,0	0,0116	25,70	1
100	15,0	0,0030	80,50	2

Výsledná inhibiční koncentrace  $168hIC_{50}$  testu na okřehku menším *L. minor* byla vyhodnocena pomocí metody porovnání rychlosti růstu. Touto metodou byla hodnota  $IC_{50}$  stanovena na 22,66 mg/l.

#### 4.6 Kyselina klofibrová

##### 4.6.1 Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>

Orientační test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 8. Získané hodnoty z orientačního testu jsou uvedeny v tabulce 25. Zároveň s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 25: Orientační test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	0/20	0	0	
0,01	0/20	0	0	-2
0,1	1/20	5	3,36	-1
1	0/20	0	0	0
10	1/20	5	3,36	1
100	12/20	60	5,25	2

Na základě výsledků bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je zobrazena v tabulce 8. Výsledky získané ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Základní test na organismu *T. platyurus*

c [mg/l]	Počet mrtvých/celkem	Mortalita [%]	Probity	log c
0	2/30	6,67	3,52	
20	7/30	23,33	4,27	1,30
40	9/30	30,00	4,48	1,60
80	16/30	53,33	5,09	1,90
160	17/30	56,66	5,17	2,20
320	30/30	100	8,09	2,50

Hodnota  $24hLC_{50}$  byla určena z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí rovnice regresní přímky a činila 56,40 mg/l.

#### 4.7 Srovnání toxicity pomocí bioluminiscenčního testu na *V. fischeri*

Z důvodu nedostatku bakterií *V. fischeri* pro stanovení hodnot  $EC_{50}$ , pro všechny vzorky farmak, byla zvolena rychlá screeningová metoda, pro zjištění inhibice záření testovaného vzorku oproti kontrolnímu, viz kapitola 3.4. Luminometr vyhodnotil inhibici luminiscence po 15 a 30 minutách oproti kontrole. Tabulka 27 zobrazuje výsledné hodnoty. Z výsledků je patrné, že trend toxicity se jevil stejně jako u organismu *T. platyurus* (viz tabulka 28). Léčivo Atoris vykazovalo největší inhibici (a tedy i toxicitu), dále léčivo Corsim, Lipanthyl 267M, Lipanthyl Supra a metabolit kyselina klofibrová.

Vypočtené parametry pro 7,5 % referenční roztok NaCl jsou uvedeny v tabulce 28. Hodnoty korekčních faktorů  $f_{k15}$  a  $f_{k30}$  se sice pohybovaly v rozmezí 0,6-1,8 a splňovaly podmínku validity testu, nicméně inhibice luminiscence referenčního vzorku byla po 15 minutách 31,35 % a po 30 minutách 27,32 %. Jelikož inhibice luminiscence tohoto kontrolního vzorku má vyjít mezi 40-60 %, tato podmínka validity testu splněna nebyla. Výsledky jsou pouze orientační a vhodné pro porovnání trendu toxických efektů vybraných farmak.

Tabulka 27: Základní test na organismu *T. platyurus*

Test. látka	c [mg/l]	Inhibice emise, 15 min [%]	Inhibice emise, 30 min [%]
Atoris	100	56,76	56,78
Corsim		21,19	20,12
Lipanthyl Supra		15,18	15,35
Lipanthyl 267M		17,08	18,59
Kys. klofibrová		15,91	17,33

Vzorky léčiva Corsim a referenčního roztoku NaCl vykazovaly po 30 min menší inhibici záření, než po prvních 15 minutách. Inhibice vzorku Atoris se v těchto dvou časech lišila pouze o 0,02 %. Tento jev může být zapříčiněn rychlou adaptací nové generace mikroorganismů na dané toxikanty [60, 61].

Tabulka 28: Vypočtené parametry pro 7,5 % ref. roztok NaCl

Číslo vzorku	$I_0$ [rel. jedn. lum.]	$I_{15}$ [rel. jedn. lum.]	$I_{30}$ [rel. jedn. lum.]	$f_{k15}$ [1]	$\overline{f_{k15}}$	$f_{k30}$ [1]	$\overline{f_{k30}}$
1	187	130,5	117,7	0,698	0,702	0,629	0,637
2	179,4	126,6	115,6	0,706		0,644	

#### 4.8 Hodnocení ekotoxicity vybraných farmak

V rámci bakalářské práce byla hodnocena ekotoxicita vybraných léčiv na snížení hladiny cholesterolu v krvi. Testována byla tato léčiva: Corsim, Atoris, Lipanthyl Supra, Lipanthyl 267M a kyselina klofibrová která byla vybrána jako metabolit fibrátů. Pro testování byly použity tři testy ekotoxicity. Testy byly vybrány tak, aby k posouzení ekotoxicity došlo v rámci širší škály organismů. Testování byli zástupci říše živočichů, rostlin i prokaryot. Proveden byl alternativní test toxicity na organismu *T. platyurus*, test fytoxicity na okřehku menším *L. minor* a bioluminiscenční test na *V. fischeri*, jehož výsledky sloužily k porovnání toxických trendů farmak a srovnání s ostatními testy. K ověření správnosti postupů byly

před vlastním testováním léčiv provedeny referenční testy. Výsledné hodnoty LC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> byly ve shodě s výsledky odpovídajícími standardu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Tyto testy byly provedeny podle stejné metodiky a při stejných podmínkách jako následné testy s vybranými farmaky.

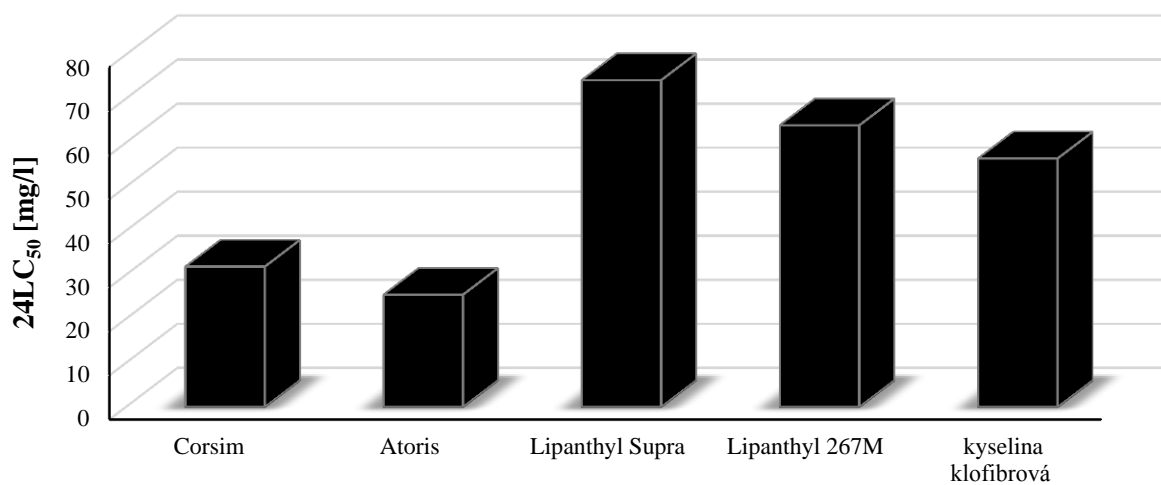
Pro lepší srovnání a hodnocení efektů vybraných léčiv byly všechny získané ekotoxikologické indexy shrnuty do následující tabulky.

Tabulka 29: Výsledné hodnoty LC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> a inhibice luminiscence testovaných léčiv

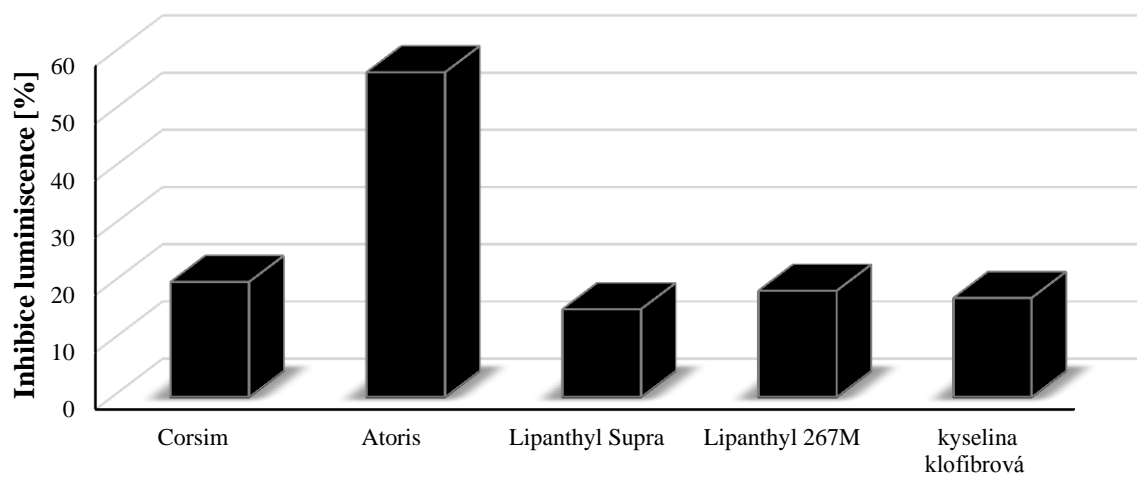
Testovací organismus	Corsim <sup>®</sup> 10	Atoris <sup>®</sup> 10	Lipanthyl Supra	Lipanthyl 267M	Kyselina klofibrová
<i>Thamnocephalus platyurus</i> 24LC <sub>50</sub> [mg/l]	31,83	25,45	74,15	63,92	56,40
<i>Lemna minor</i> 168IC <sub>50</sub> [mg/l]	7,48	5,13	stimulace	22,66	–
<i>Vibrio fischeri</i> inh. luminiscence [%]	20,12	56,78	15,35	18,59	17,33

Z uvedených výsledků testovaných farmak vyplývá, že nejvyšší ekotoxicita byla prokázána u léčiva Atoris obsahující účinnou látku atorvastatin. Nejnižší hodnoty LC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> pro toto léčivo byly stanoveny ve všech provedených testech. O něco nižší ekotoxicitu a tedy o něco vyšší hodnoty LC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub> vykazovalo léčivo Corsim obsahující účinnou látku simvastatinum, což bylo opět prokázáno u všech testů ekotoxicity. Pro organismus *T. platyurus* byl po léčivu Corsim nejvíce toxický metabolit fibrátů – kyselina klofibrová, méně toxicky se jevila léčiva Lipanthyl 267M a Lipanthyl Supra obsahující fenofibrát. Tento trend efektů vybraných léčiv na organismus *T. platyurus* se prakticky shodoval s výsledky bioluminiscenčního testu na organismu *V. fischeri*, rozdíly byly nepatrné. Pro lepší porovnání výsledků těchto dvou testů byly sestrojeny následující dva grafy. Grafy na obrázku 23 a 24 jednoznačně potvrzují, že největší ekotoxicitu vykazovalo léčivo Atoris, následně Corsim. Léčiva ze skupiny fibrátů se jevila méně toxická, a lze tedy konstatovat, že statiny představují větší ekotoxikologické nebezpečí.

Výsledky testu fytotoxicity na *L. minor* sice také korespondují s trendem výsledků ostatních ekotoxikologických testů, nicméně léčivo Lipanthyl Supra ze skupiny fibrátů vykazovalo stimulaci růstu oproti kontrole. *L. minor* jako zástupce říše rostlin se vyznačuje rozdílným metabolismem, jiným příjmem živin, a tedy i toxikantů. Literatura uvádí, že při větší přítomnosti organických látek, jako jsou například sacharidy v živném médiu, lze docílit stimulace růstu. Lipanthyl Supra obsahuje velké množství pomocných látek (viz bod 3.1), které mohly zmiňovanou stimulaci podpořit [62].



Obrázek 23: Grafické znázornění výsledků LC<sub>50</sub> pro alternativní test na *T. platyurus*



Obrázek 24: Grafické znázornění výsledných inhibicí luminiscence *V. fischeri*



## 5 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na ekotoxikologické hodnocení vybraných léčiv na snížení hladiny cholesterolu v krvi. K testování byla vybrána léčiva: Atoris, a Corsim ze skupiny statinů, Lipanthyl Supra a Lipanthyl 267M ze skupiny fibrátů a metabolit fibrátů kyselina klofibrové. V teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše. Byly zde popsány vlastnosti vybraných léčiv a jejich osud a výskyt v životním prostředí. Další část práce byla zaměřena na ekotoxikologii a ekotoxikologické testování. K ekotoxikologickému hodnocení vybraných léčiv byly použity tři testy. Testovanými organismy byly: *Thamnocephalus platyurus*, *Vibrio fischeri* a *Lemna minor*. Jednalo se o zástupce říší živočichů, prokaryota i rostlin. Tento výběr poskytl následné hodnocení na úrovni více ekosystémů. Všechny testy ekotoxicity byly provedeny v souladu s danou metodikou. Korektnost a citlivost testovaných organismů byla ověřena referenčními testy. Standardní kontrolní látkou byl dichroman draselný  $K_2Cr_2O_7$  pro test na *T. platyurus* a *L. minor*, 7,5 % roztok NaCl pro bioluminiscenční test na *V. fischeri*. Tento organismus z říše prokaryota poskytl nejrychlejší informace o efektech testovaných látek vůči kontrole. Jako nejcitlivější organismus se jevil *T. Platyurus*. Výsledné hodnoty  $LC_{50}$  a  $IC_{50}$   $K_2Cr_2O_7$  splňovaly limity pro dané standardy. Referenční roztok NaCl interval nespĺňoval a z toho důvody byly výsledky bioluminiscenčního testu vhodné pouze pro porovnání efektů toxikantů a nikoli na výpočet ekotoxikologických indexů. Z testovaných léčiv vykazoval jednoznačně nejvyšší ekotoxicitu přípravek Atoris a to všech provedených testech. O něco nižší ekotoxicitu a tedy o něco vyšší hodnotu  $LC_{50}$  a  $IC_{50}$  vykazoval Corsim a to opět u všech výše uvedených testů. Vyšší hodnoty  $LC_{50}$  a  $IC_{50}$ , tedy i nejnižší ekotoxicitu vykazovala léčiva Lipanthyl Supra, Lipanthyl 267M a metabolit kyselina klofibrová. Rozdíly mezi zjištěnými ekotoxikologickými hodnotami těchto léčiv byly nepatrné. Porovnáním ekotoxicity léčiv ze skupiny statinů a fibrátů můžeme vyvodit jednoznačný závěr. Atoris a Corsim vykazují nižší hodnoty  $LC_{50}$  a  $IC_{50}$  oproti ostatním farmakům. Lze tedy konstatovat, že statiny představují větší ekotoxikologické nebezpečí pro životní prostředí než fibráty. Tento trend efektu toxicity potvrdil i srovnávací bioluminiscenční test na *V. fischeri*.

Testy ekotoxicity jsou velmi cenné při hodnocení efektů látek na životní prostředí. Navyšující produkce i spotřeba léčiv má za důsledek jejich výraznější vliv na složky životního prostředí, proto je třeba se problematikou léčiv a jejich vlivem na biologické systémy dále zabývat a zdokonalovat metody hodnocení toxikantů.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JJEMBA, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, vol. 63, is. 1, pp. 113-130.
- [2] HEBERER, Thomas. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*. 2002, **131**(1 - 2), pp. 5-17.
- [3] HAMPL, F., PALEČEK, J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2002. ISBN 80-7080-495-5.
- [4] Encyklopedie SÚKL: Z čeho se lék skládá? Co je léčivá a pomocná látka? In: *O lécích.cz* [online]. Státní ústav pro kontrolu léčiv [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz/encyklopedie/z-ceho-se-lek-sklada-co-je-leciva-a-pomocna-latka>
- [5] KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK, Zdeněk KAFKA a Tomáš VANĚK. Léčiva – „nový“ enviromentální polutant. *Chemické listy*. 2009,**103**(7), 540-547. ISSN 1213-7103-0009-2770.
- [6] KÜMMERER, Klaus.: *Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks*, 3. vyd., Springer, Berlin 2008, 521 s
- [7] VÁŇA, Miroslav et al.: *Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV*, VTEI 52, 2010, s. 1-3.
- [8] Hodnocení distribuovaných a vydaných léčivých přípravků za rok 2015. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, 2010 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/hodnoceni-distribuvanych-a-vydanych-lecivych-pripravku-za>.
- [9] N. B. MYANT. *The Biology of Cholesterol and Related Steroids* [online]. Burlington: Elsevier Science, 1981 [cit. 2016-05-15]. ISBN 978-148-3281-230. Dostupné z: [https://books.google.co.uk/books?id=cEIfAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.uk/books?id=cEIfAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- [10] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [11] Zvýšený cholesterol, vznik a léčba. *Vše pro zdraví* [online]. Listy jižní Moravy, 2014 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.vseprozdravi.cz/nemoci/zvyseny-cholesterol.html>
- [12] Cholesterol. In: *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5775.html?rid=5baf1021-df1f-41e4-9094-121ce45568cd>
- [13] ŠTEFÁNEK, Jiří. Vysoký cholesterol. In: *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Praha, 2011 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=vysoky-cholesterol>
- [14] SLIMÁKOVÁ, Margit. Cholesterol – kde je pravda. In: *Margit* [online]. 2012 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.margit.cz/cholesterol-kde-je-pravda/>
- [15] Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Hodnocení vývoje distribuce vybrané skupiny léčivých přípravků – statiny*. [online]. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Praha, 2010 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/lecive-pripravky-pro-lecibu-poruch-tukoveho-metabolismu>

- [16] MARTÍNKOVÁ, Jiřina, Stanislav MIČUDA a Jolana CERMANOVÁ. *Vybrané kapitoly z klinické farmakologie pro bakalářské studium : Terapie hyperlipidemii* [online]. ©2001. [cit. 2010-07-05]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/bak/kapitoly/hypolipidemika-bak.doc>
- [17] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [18] *Remedia: Co se děje v současnosti kolem statinů?* [online]. 2013, (2) [cit. 2016-05-15]. ISSN 0862-8947. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Co-se-deje-v-soucasnosti-kolem-statinu/6-F-1tf.magarticle.aspx>
- [19] Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Souhrn údajů o přípravku: Ezetrol 10 mg tablety* [online]. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, 2010. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC54107.pdf&type=spc&as=ezetrol-10-mg-tablety-spc>
- [20] Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Hodnocení vývoje distribuce vybrané skupiny léčivých přípravků – fibráty*. [online]. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Praha, 2010 [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/lecive-pripravky-pro-lecbu-poruch-tukoveho-metabolismu>
- [21] SVOBODA, Jan, Josef FUKSA, Lenka MATOUŠKOVÁ, Lucie SCHÖNBAUEROVÁ, Alena SVOBODOVÁ, Miroslav VÁŇA a Václav ŠTASTNÝ. Léčiva a čistírny odpadních vod - možnosti odstraňování a reálná data. *Vodní hospodářství*. 2009, (VTEI 02), 9-11.
- [22] BUHNER, Stephen Harrod. *The lost language of plants: the ecological importance of plant medicines to life on earth*. White River Junction, Vt.: Chelsea Green Pub., c2002. ISBN 18-901-3288-8.
- [23] BUSER, Hans-Rudolf, Marcus MÜLLER a Norbert THEOBALD. Occurency of Pharmaceutical Drug Clofibrac Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. *Enviromental science & technology*. 1997, **32**(1), 188-192.
- [24] VÁŇA, Miroslav, Filip WANNER, Josef FUKSA a Lenka MATOUŠKOVÁ. Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV. *VTEI: Příloha Vodní hospodářství*. 2010, **52**(2), 1-3.
- [25] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-726-2301-X.
- [26] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [27] HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0548-X.
- [28] FARGAŠOVÁ. *Environmentálna toxikológia a všeobecná ekotoxikológia*. Bratislava: Orman, 2008. ISBN 978-80-969675-6-8.

- [29] TRUHAUT, René. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1977, 1(2), 151-173. DOI: 10.1016/0147-6513(77)90033-1. ISSN 01476513. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0147651377900331>
- [30] SHAW, Ian C. a John CHADWICK. *Principles of environmental toxicology*. Bristol, PA: Taylor, c1998. ISBN 07-484-0355-8.
- [31] SVOBODOVÁ, Zdeňka. *Ekotoxikologie: praktická cvičení část I*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. ISBN 80-851-1495-X.
- [32] FARGAŠOVÁ, A. *Ekotoxikologické biotesty*. 1. vyd. Bratislava: Perfekt, 2009. 317 s. ISBN 978-80-8046-422-6
- [33] HOFFMAN, David J. *Handbook of ecotoxicology*. Vyd. 2. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. ISBN 978-156-6705-462.
- [34] KOČÍ, V., RAKOVNICKÝ, T., ŠVAGR, A.: *Testy akutní a semichronické toxicity*. Praha: VŠCHT Praha, 2001. 11 s
- [35] MARŠÁLEK Blahoslav. *Mikrobiotesty – druhá generace ekotoxikologických biotestů* [online]. Botanický ústav AV ČR, Brno [cit. 2017-04-02]. Dostupné z [www: http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB\\_dalsi\\_mater/Prehled\\_mikrobiotestu.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf)
- [36] Standard operational procedure: *Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>: Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Belgium: Microbiotests Inc., 1995. 28 p.
- [37] SCHÜÜRMAN, Gerrit. a B. A. MARKERT. *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998. ISBN 04-711-7644-3.
- [38] *Thamnocephalus platyurus* [online]. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z [www: http://www.bioassay.narod.ru/museum/img/sleep/Thano-eggs1.jpg](http://www.bioassay.narod.ru/museum/img/sleep/Thano-eggs1.jpg)
- [39] *BIOHIDRICA® RAPIDTOXKIT assay* [online]. 2017, [cit. 2017-04-02]. Dostupný z [www: http://www.biohidrica.cl/assay\\_rapidtoxkit.htm](http://www.biohidrica.cl/assay_rapidtoxkit.htm).
- [40] ŠVAGR, A., JIRKŮ, J.: *Test toxicity při semichronické expozici vůči okřešku menšímu (Lemna minor)*. Praha: VŠCHT Praha, 2003. 10 s.
- [41] SVOBODOVÁ Zdeňka, MÁCHOVÁ Jana a kol. *Ekotoxikologie – praktická cvičení část II*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2000. 134 s. ISBN 80-85114-89-5.
- [42] *PhotoGyps – Lemna minor gallery* [online]. 2017, [cit. 2017-04-02]. Dostupné z [www: http://www.photogyps.com/lemna-minor.html](http://www.photogyps.com/lemna-minor.html)
- [43] ČSN EN ISO 75 7745. *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) – Zkouška inhibice růstu okřešku*. Praha: Český normalizační institut, 2017. 28 s.
- [44] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.

- [45] *Biology gallery – Luminiscent bacteria* [online]. 2017, [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: [http://www.biology.pl/bakterie\\_sw/bac\\_mf\\_en.html](http://www.biology.pl/bakterie_sw/bac_mf_en.html)
- [46] Symbiosis spring 2011 – Symbiosis between *Vibrio fischeri* and the Hawaiian squid, *Euprymna scolopes* [online]. 2017, [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: <http://sp11symbiosis.providence.wikispaces.net/Symbiotic+Relationship+between+E.+scolopes+and+V.+fischeri>
- [47] ISO 11348-3. *Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria*. ISO International Standards for Business, Government and Society, 2007.
- [48] Simvastatin. In: *Toxnet: Toxicology data network* [online]. Rockville Pike: U.S. National Library of Medicine, 2004 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7208>
- [49] Simvastatin. In: *Wikimedia commons* [online]. 2017 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Simvastatin#/media/File:Simvastatin\\_M1.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Simvastatin#/media/File:Simvastatin_M1.png)
- [50] Corsim 10. In: *Pro. med. cs.: Léky na lékařský předpis* [online]. Praha a.s., 2015 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://www.promedcs.cz/leky-na-lekarsky-predpis/corsim-10-corsim-20-corsim-40>
- [51] Atorvastatin. In: *Toxnet: Toxicology data network* [online]. Rockville Pike: U.S. National Library of Medicine, 2004 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7039>
- [52] Atorvastatin. In: *Wikimedia commons* [online]. 2017 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atorvastatin.svg?uselang=cs>
- [53] *Atoris 10 – Mims gallery* [online]. 2017, [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: <https://goo.gl/images/6XeIy6>
- [54] Želatinové tobolky. In: *Dacompharma* [online]. 2016, [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: <http://www.dacompharma.cz/cs/zelatinove-tobolky>
- [55] Fenofibrate. In: *Toxnet: Toxicology data network* [online]. Rockville Pike: U.S. National Library of Medicine, 2004 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7736>
- [56] Fenofibrate. In: *Wikimedia commons* [online]. 2017 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fenofibrate\\_structure.svg?uselang=cs](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fenofibrate_structure.svg?uselang=cs)
- [57] *Lipanthyl Supra – Mims gallery* [online]. 2017, [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: <https://goo.gl/images/0AFakc>
- [58] Clofibric acid. In: *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2695.html?rid=16214f18-457b-48ac-82ee-7f5227ffea72>
- [59] Clofibric acid. In: *Wikimedia commons* [online]. 2017 [cit. 2017-04-30]. Dostupné z www: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clofibric\\_acid.png?uselang=cs](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clofibric_acid.png?uselang=cs)

[60] DENICH, T.J, L.A BEAUDETTE, H LEE a J.T TREVORS. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, **52**(2), 149-182. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00155-0. ISSN 01677012.

Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001550>

[61] ZHANG, Yong-Mei a Charles O. ROCK. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, **6**(3), 222-233. DOI: 10.1038/nrmicro1839. ISSN 1740-1526. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1839>

[62] VIDAKOVIĆ-CIFREK, Željka, Sonja SORIĆ a Marija BABIĆ. *Growth and photosynthesis of Lemna minor L. exposed to different light conditions and sucrose supplies*. DOI: 10.2478/v10184-012-0018-4. ISBN 10.2478/v10184-012-0018-4. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/botcro.2013.72.issue-2/v10184-012-0018-4/v10184-012-0018-4.xml>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ČOV	čistírna odpadních vod
NCCOS	<i>National Centers of Coastal Ocean Science</i>
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
DDD	definovaná denní dávka
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> – „dobrý“ cholesterol
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i> – „špatný“ cholesterol
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
KVO	kardiovaskulární onemocnění
ISCH	ischemická choroba srdeční
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
EC	efektivní koncentrace
LC	letální koncentrace
IC	inhibiční koncentrace
NOEC	<i>No Observed Effect Concentration</i> (koncentrace nevyvolávající viditelný efekt)
LOEC	<i>Lowest Observed Effect Concentration</i> (nejnižší koncentrace s pozorovanými efekty)
OC <sub>0</sub>	orientační koncentrace 0
OC <sub>100</sub>	orientační koncentrace 100
SM	Steinbergovo médium
ČSN	Česká technická norma
EN	Evropská norma
ISO	<i>International Organisation for Standardisation</i> (Mezinárodní organizace pro normalizaci)

## 8 PŘÍLOHY

Příloha 1: *Převedení procentuálních mortalit na probity [34]*

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09