

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Toxicita vybraných antiarytmik  
(verapamilu a diltiazemu) pro vodní organismy  
(*Daphnia magna*)**

Bakalářská práce

**Eliška Dokoupilová**

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2018

**Dokoupilová E., 2018:** Toxicita vybraných antiarytmik (verapamilu a diltiazemu) pro vodní organismy (*Daphnia magna*) [Toxicity of selected antiarrhythmics (verapamil and diltiazem) to aquatic organisms (*Daphnia magna*). Bc. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This bachelor thesis deals with a group of antiarrhythmic drugs and their toxicity to aquatic organisms. The theoretical part of the thesis summarizes the basic characteristics and distribution of antiarrhythmics, their mechanism of action and therapeutic use in the treatment of cardiovascular diseases together with their occurrence in the aquatic environment. Toxicology testing and related adverse effects of drugs on aquatic organisms are also described.

The experimental part presents the results from a 21 day chronic toxicity test of verapamil and its degradation products on number of juveniles, number of broods and the body size of cladoceran *Daphnia magna*.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 18. dubna 2018

.....

Podpis

## **Cíl práce**

Cílem práce bylo v teoretické části popsat účinky léků používaných jako antiarytmika a shrnout související nežádoucí účinky na vodní organismy popsané v různých toxikologických studiích.

Experimentálním cílem práce bylo otestovat působení zástupce této skupiny léků (verapamilu) a jeho produktů fotodegradace na hrotnatku (*Daphnia magna*).

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za odborné vedení práce, cenné rady při zpracování a věnovaný čas. Oceňuji také její vstřícnost a ochotu s čímkoliv pomoci.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michalu Šorfovi, Ph.D. za poskytnutí možnosti provést test toxicity s vybavením pracoviště katedry biologie ekosystémů, za pomoc se statistickým zpracováním v programu Statistica i za rady při vyhodnocování výsledků.

Děkuji také Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za provedení HPLC analýz.

Poděkování patří i Mgr. Kateřině Kocourkové za veškerou pomoc poskytnutou po celou dobu experimentu chronické toxicity.

Na závěr děkuji své rodině a svému příteli Radkovi za velkou podporu při psaní této práce.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Antiarytmika v léčbě kardiovaskulárních onemocnění .....	3
1.1.1	Mechanismus účinku.....	4
1.1.2	Základní rozdělení a charakteristika .....	6
1.1.3	Verapamil .....	10
1.1.4	Diltiazem .....	11
1.2	Toxicita a vliv na vodní organismy .....	12
2	Materiály a metody.....	24
3	Výsledky.....	26
4	Diskuze.....	31
5	Závěr.....	33
6	Seznam použité literatury .....	34
7	Přílohy .....	42

# 1 Úvod

Farmaceutika a výrobky osobní péče se v posledních letech staly velkým problémem životního prostředí. Široké využívání léčivých přípravků a produktů osobní hygieny v nemocnicích, domácnostech, zemědělských a průmyslových zařízeních zvýšilo jejich vypouštění do životního prostředí a jejich toxicita se začala projevovat v různých biologických složkách ekosystémů, v největším rozsahu u vodních organismů. Rostoucí obavy vyvolává zejména problematika léků a jejich metabolitů ve vodním prostředí. (Narvaez & Jimenez, 2012).

Interakce probíhající mezi různými třídami léčiv přítomnými v prostředí v neznámých poměrech a množstvích mohou produkovat sloučeniny s vyšší toxicitou, jejichž účinky nebyly dosud detailně studovány (Marin-Morales et al., 2016). Mnohé léky se navíc z velké části vylučují z lidského organismu nemetabolizovány (Winker et al., 2008), což z nich v případě, že následně nepodlehnu chemickým či mikrobiálním přeměnám, činí trvale kontaminující látky v životním prostředí (Marin-Morales et al., 2016). Tyto sloučeniny tvoří vysoce heterogenní skupinu chemických látek s různorodou chemickou strukturou, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a různými biologickými účinky.

Mechanismy působení farmak jsou relativně konzervativní napříč celou živočišnou říší, a proto léčiva vyvolávající účinek u lidí nebo hospodářských zvířat mají vysokou pravděpodobnost, že budou biologicky aktivní i u druhů volně žijících živočichů (Corcoran et al., 2010).

S rozvojem citlivých analytických metod schopných detekovat koncentrace v nanogramových a subnanogramových množstvích se v posledních letech objevila častá detekce těchto látek ve stopových koncentracích ve vzorcích z čističek odpadních vod, z povrchových a podzemních vod a v některých zemích i ve zdrojích pitné vody (Fent et al., 2006, Jones et al., 2001).

Koncentrace léků zjištěných ve vodním prostředí není určována pouze vylučováním nemetabolizovaných léčiv a náhodnými úniky, např. nesprávným způsobem likvidace po uplynutí spotřební lhůty, ale též nízkou účinností čisticích procesů v čistírnách vod (Corcoran et al., 2010). Úlohu hrají i fyzikálně-chemické vlastnosti látek, které rozhodují o tom, jak se konkrétní složka rozděluje mezi vodní sloupec a sediment (Corcoran et al., 2010).

Rozsáhlé farmakologické a toxikologické studie zabývající se chronickými a akutními testy toxicity u savců, ryb i bezobratlých živočichů jsou základem pro ekotoxikologické

hodnocení léčivých přípravků (Owen et al., 2007). Některé z těchto studií se soustřeďují na aktivní molekuly léků, zatímco jiné studují komplexněji údaje o účincích ve směsi více léčiv. Příkladem je studie Cleuverse (2005), který vyhodnotil toxicitu směsi antihypertenziv – atenololu, metropololu a propranololu za použití imobilizačního testu hrotnatky *Daphnia magna* a testu inhibice růstu zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*. Bylo zjištěno, že pro různé úrovně koncentrací byl celkový účinek směsi mnohem vyšší než součet jednotlivých účinků v obou testovaných organismech (Godoy et al., 2015). Autoři naopak v testech s použitím vodní rostliny okřehek menšího (*Lemna minor*) zjistili, že kombinované účinky antihypertenziv propranololu a losartanu byly nižší než účinky jednotlivě působících léčiv. Standardní údaje o akutní ekotoxicitě ( $EC_{50}^1$ ,  $LC_{50}^2$ ,  $IC_{50}^3$ ,  $NOEC^4$ ,  $LOEC^5$ ) byly stanoveny u řady léčivých přípravků, avšak tyto údaje nemusí být vhodné pro specifické řešení otázky environmentálních účinků a následně pro posouzení rizik a nebezpečnosti (Fent et al., 2006, Saari et al., 2017). Testy akutní toxicity přinášejí primární údaje o míře a charakteru působení látek na celý organismus nebo na jednotlivé orgány při krátkodobém působení, ale nemohou postihnout reálnou situaci, kdy jsou organismy vystaveny účinkům látek dlouhodobě, v případě organismů žijících v přírodních vodách po celý život (Linhart, 2012). Proto podle nařízení Evropské komise z roku 2003 je potřeba při hodnocení rizik vzít v úvahu jak krátkodobé tak i dlouhodobé údaje o toxicitě dostupné i pro jiné organismy než jsou tzv. modelové organismy, tj. řasy, perloočky a ryby. Příkladem je studie Godoye et al. (2015), kteří zvažovali ekotoxikologické údaje též pro okřehek *Lemna minor*, vířníka *Brachionus koreanus* a mořského měkkýše *Mytilus galloprovincialis*. V další studii pak pro odvození předpokládané koncentrace bez pozorovaného účinku (PNEC) zahrnuli Godoy et al. (2015) též sladkovodního prvoka *Spirostomum ambiguum* a mořskou bakterii *Vibrio fischeri*, tedy organismy představující další trofickou úroveň.

Aby bylo možné stanovit přesné posouzení rizik pro přítomnost léčiv v životním prostředí, bylo by potřeba dalších studií vyhodnocujících akutní a hlavně chronické účinky na organismy v daném prostředí nejen u výchozí sloučeniny (léčiva), ale též jejich metabolitů. Další naléhavou potřebou jsou dodatečné studie zaměřené na potenciální interakce mezi farmaceutickými směsmi. V tomto ohledu nelze současný stav poznání považovat za dostatečný (Godoy et al., 2015).

---

<sup>1</sup> Účinná koncentrace

<sup>2</sup> Letální koncentrace

<sup>3</sup> Inhibiční koncentrace

<sup>4</sup> Koncentrace bez pozorovaného účinku

<sup>5</sup> Nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem

## 1.1 Antiarytmika v léčbě kardiovaskulárních onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění se řadí k celosvětovým hlavním příčinám morbidity (chorobnosti) a mortality (úmrtnosti). Vývoj terapeutických látek pro léčbu kardiovaskulárního onemocnění je dlouhodobě pro farmaceutické firmy prioritou kvůli obrovskému potenciálnímu trhu s těmito léky (Liu et al., 2010). Častá detekce farmak této třídy ve vodním prostředí a jejich následné účinky na necílové organismy jsou odrazem rychle rostoucího farmaceutického průmyslu (Maszkowska et al., 2014) a vysoké spotřeby těchto léků po celém světě spojené s nárůstem počtu nových pacientů trpících kardiovaskulárním onemocněním (Gu et al., 2012).

Farmakologicky lze v dnešní době ovlivnit všechny základní patofyziologické poruchy krevního tlaku, čerpací funkce, prokrvení myokardu, cévní stěny a srdečního rytmu. Antiarytmika jsou léčiva k ovlivnění poruch srdečního rytmu. Tyto poruchy zahrnují jevy velmi odlišné svou závažností, od naprosto nevýznamných extrasystol, které ani farmakologickou léčbu nevyžadují, až po maligní arytmie, u kterých je potřeba použít maximální léčebné prostředky (Vítovec & Špinar, 2000). K nejobtížnější farmakoterapii v obvyklé kardiologické praxi patří léčba arytmií. Vznik arytmií je založen na poruše tvorby vzruchu (automacii), šíření vzruchu (vodivosti) nebo jejich kombinací (Martínková, 2007). Abnormality v automacii srdce mohou vznikat také při poškození rytmu jediné buňky. Příčinou může být vliv katecholaminů, účinek léčiv se stimulačními účinky na myokard, degenerativní onemocnění, místní ischemie nebo nekróza myocytů při infarktu myokardu (Hynie, 2001). Aritmie se rozeznávají podle původu na supraventrikulární a komorové a vzhledem k frekvenci srdce na bradyarytmie (bradykardie) s frekvencí nižší než 60/min a tachyarytmie (tachykardie) s frekvencí vyšší než 100/min (Hynie, 2001).

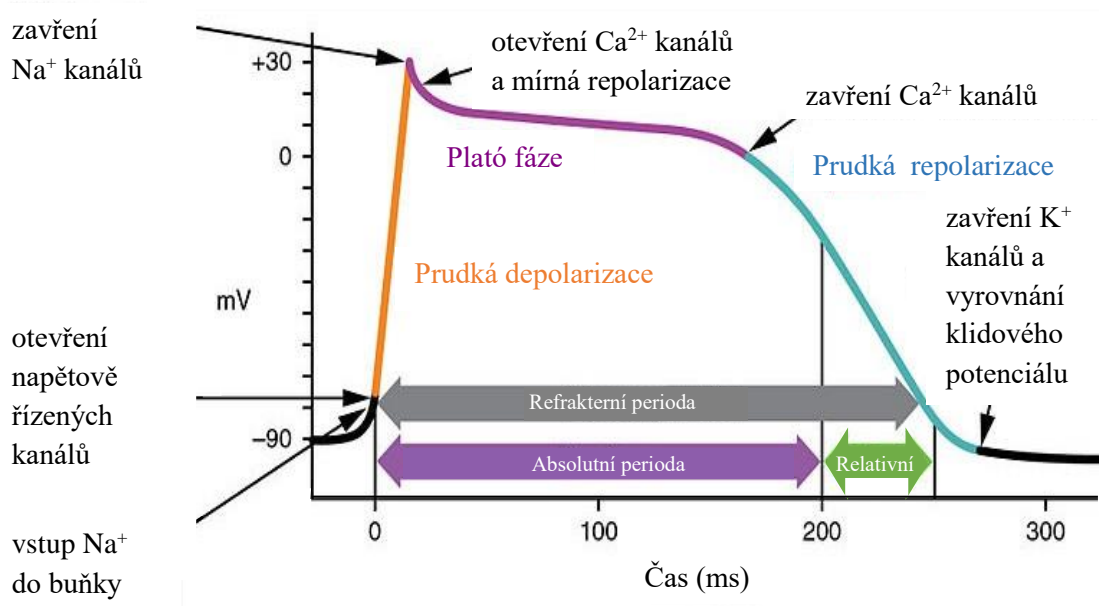
Antiarytmika (antidysrytmika) se používají k léčbě poruch srdečního rytmu a vedení elektrických vzruchů v srdci nebo k prevenci jejich vzniku. Tato farmaka ovlivňují vzrušivý proces, probíhající v převodním srdečním systému a v kontraktilní srdeční svalovině. Jejich účinky, které jsou podmíněny působením na elektrofyziologické pochody v srdci, mění hemodynamiku i kontrakci srdce (Lüllmann, 2004).

Hlavním úkolem léčby arytmií je obnovit normální srdeční rytmus, zamezit opakování arytmií, utlumit hemodynamické následky a zmenšit riziko jejich závažné formy - komorovou fibrilaci, která je nejčastější příčinou náhlé smrti (Martínková, 2007).

### 1.1.1 Mechanismus účinku

Na buněčné úrovni je podkladem vzruchu akční potenciál. Určuje jej napěťová a časová aktivita iontových kanálů, které vyvolávají depolarizaci, respektive repolarizaci buněčné membrány tím, že regulují vstup a výstup iontů membránou (Lüllmann et al., 2004). Iontové změny probíhající během akčního potenciálu jsou počátečním stimulem pro svalovou kontrakci. Akční potenciál má pět fází – prudkou depolarizaci, mírnou repolarizaci, fázi plató, strmou terminální repolarizaci a závěrečnou fázi vyrovnání klidového potenciálu v době diastoly (Hynie, 2001). Jednotlivé fáze akčního potenciálu a znázornění pohybu iontů membránou jsou ukázány na Obr. 1.

Celý děj začíná prudkou depolarizací (cca 2 ms) vyvolanou rychlým vstupem iontů  $\text{Na}^+$  do buňky. Ve tkáních s nízkým diastolickým potenciálem (v sinusovém a AV uzlu) depolarizaci vyvolává vstup  $\text{Ca}^{2+}$ . Následuje mírná repolarizace způsobená inaktivací sodíkového kanálu krátkodobým vstupem  $\text{K}^+$ . Poté dochází k fázi dlouhého plató (100 – 400 ms). Jedná se o specifickou zvláštnost buněk myokardu, která je výsledkem vstupu některých iontů (především  $\text{Ca}^{2+}$ ) a nepatrného výstupu  $\text{K}^+$ . Terminální strmá repolarizační fáze je vyvolána převahou výstupu iontů oproti vstupu, jedná se především o výstup  $\text{K}^+$ . Následuje diastolický (klidový) membránový potenciál, který je určen relativně vysokou prostupností membrány pro  $\text{K}^+$  na základě aktivního koncentračního gradientu (intracelulárně cca 120 mmol/l, extracelulárně cca 4 mmol/l, rovnovážný  $\text{K}^+$  potenciál cca -90 mV). Tento gradient je aktivně vytvářen iontovými pumpami (Lüllmann et al., 2004).



**Obr. 1:** Akční potenciál buňky myokardu (upraveno podle commons.wikimedia.org).



Buňky sinoatriálního a ventrikuloatriálního uzlu společně s dalšími oddíly převodního systému srdečního se navíc vyznačují ještě pomalým nepolarizujícím pacemakerovým proudem, zajišťujícím automacii srdce. Při některých formách arytmií je možné použít léčiva, která funkci atrioventrikulárního a sinoatriálního uzlu selektivně stimulují nebo inhibují (Lüllmann et al., 2007).

Všechny antiarytmické léky přímo nebo nepřímo mění membránové iontové vodivosti ovlivněním iontových kanálů, které se podílejí na pohybu iontů sodíku, vápníku a draslíku směrem do buňky a ven, čímž se mění fyzikální vlastnosti srdečních akčních potenciálů a následně dojde k potlačení arytmiie. Například některé léky se používají k blokování rychlých sodíkových kanálů. Tyto kanály určují, jak rychle membrána depolarizuje (fáze 0) během akčního potenciálu. Vzhledem k tomu, že rychlost vedení se vztahuje k rychlosti depolarizace membrány, blokátory sodíkových kanálů snižují rychlost vedení zpomalením depolarizace. Snížení rychlosti vedení může pomoci odstranit tachyarytmie. Jiné typy antiarytmických léků ovlivňují trvání akčních potenciálů a zejména účinnou refrakterní dobu. Prodloužením refrakterní doby je často možné zrušit opakované tachyarytmie. Tyto léky typicky blokují draslíkové nebo vápníkové kanály a zpožďují repolarizaci akčních potenciálů (fáze 3). Léky, které blokují pomalý vstup kalciových kanálů, se také využívají při snížení vodivosti na AV uzlu, protože tyto buňky, jako jsou SA uzlovité buňky, závisí na pohybu iontů vápníku směrem dovnitř, aby se depolarizovaly (Klabunde, 2012).

Tvary příslušných iontových pohybů a akčních potenciálů se liší v různých oblastech myokardu. Heterogenita různých oblastí myokardu znamená, že jedno určité antiarytmikum může mít v různých oblastech naprosto odlišné účinky na pohyb iontů, funkční parametry, jako excitabilitu a refrakterní fázi, a na průběh potenciálů. To proto, že farmaka blokující iontové kanály mohou mít různé afinity k určitému iontovému kanálu podle jeho aktuálního funkčního stavu – v závislosti na tom, zda je kanál právě v klidovém, otevřeném nebo inaktivovaném stavu. Pokud se látka naváže na makromolekulu  $\text{Na}^+$  kanálu v klidovém stavu, pak vazba a tím i účinek bude tím silnější, čím nižší je membránový potenciál (v poškozených, částečně depolarizovaných buňkách). Také trvání akčního potenciálu spolurozhoduje o afinitě. Při dlouhotrvajících akčních potenciálech (v převodním systému komor, v kontraktilní svalovině) je účinnost vyšší než při krátkých akčních potenciálech (ve svalovině síní). Důsledkem takové přednostní vazby na určité struktury je dobrá účinnost lidokainu proti takovým vzruchům, které vznikají v poškozených oblastech myokardu, např.

v okrajových oblastech infarktu. Podobný příklad poskytne závislost na frekvenci u antiarytmického působení chinidinu. Toto léčivo se váže přednostně na protein otevřeného sodného kanálu. Jestliže proteiny prošly dostatečně dlouhou klidovou fází, chinidin vstup  $\text{Na}^+$  neovlivní. Teprve po rychlém sledu série impulzů vyvolává blokádu, jejíž intenzita se zvyšuje při zvyšující se frekvenci impulzů (Lüllmann et al., 2004).

Následky utlumení pohybu iontů v srdci vyvolané antiarytmiky jsou závislé na ovlivňované oblasti a na patofyziologické situaci. Antiarytmika mohou dokonce sama arytmie vyvolat. Příkladem je blokáda sodíkových kanálů, která může zpomalením vedení normálních impulzů podpořit vznik krouživých vzruchů, které jsou zdrojem arytmie. Podobné impulzy mohou vznikat i u inhibice draslíkových kanálů prodloužením refrakterní fáze, která sice poskytuje buňce ochranu před převedením příliš časně vznikající extrasystoly, avšak buňka sama se za tohoto stavu může stát počátkem vzniku arytmie (Lüllmann et al., 2007, Klabunde, 2012).

### **1.1.2 Základní rozdělení a charakteristika**

Pro arytmie různého typu a s odlišnou lokalizací v srdci se používají antiarytmika spadající do několika skupin s odlišnými mechanismy účinku (Hynie, 2001). Ačkoli byla navržena různá klasifikační schémata, v současné době se klasifikace antiarytmik řídí původním dělením podle Vaughana – Williamse z roku 1970 do čtyř základních tříd (Vítovec & Špinar, 2000). Léky třídy I jsou dále rozděleny do podtříd kvůli jemným, avšak významným rozdílům v jejich účincích na akční potenciál.

Mnoho léků z třídy I a III sdílí podobné mechanismy účinků s léky, které spadají do ostatních tříd. Například amiodaron, antiarytmický prostředek třídy III, má rovněž blokační účinky na sodík a vápník. Mnoho sloučenin třídy I ovlivňuje také draslíkové kanály. Některé z těchto léků, by se proto mohly hodit k léčbě stejně dobře jako jiné třídy, které jsou častěji předepisovány. Z tohoto důvodu mohou různé zdroje informací klasifikovat některé antiarytmické léky jinak než jiné zdroje (Klabunde, 2012).

Jednotlivé skupiny látek s antiarytmickými účinky shrnuje Tab. I.

**Tab. I:** Dělení antiarytmik do jednotlivých tříd (Vítovec & Špínar, 2000, Hynie 2001).

<b>Třída</b>	<b>Mechanismus účinku</b>	<b>Příklady látek</b>
<b>I</b> Ia	Inhibice rychlého Na <sup>+</sup> kanálu, prodloužení akčního potenciálu	Chinidin Prokainamid Disopyramid Ajmalin
Ib	Zkrácení akčního potenciálu	Lidokain Mexiletin Tokainid Trimekain Fenytoin
Ic	Bez vlivu na akční potenciál	Flekainid Propafenon Lorkainid
<b>II</b>	Snížení sympatické aktivity, blokáda β- receptorů	Propranolol Atenolol
<b>III</b>	Inhibice depolarizace (prodloužení akčního potenciálu), blokáda K <sup>+</sup> kanálů, zpomalení repolarizace	Amiodaron Sotalol Bretylium
<b>IV</b>	Inhibice pomalého Ca <sup>2+</sup> kanálu	Verapamil Diltiazem Nifedipin

Blokátory sodíkového kanálu (třída I) tvoří největší skupinu. Na molekulární úrovni snižují rychlost depolarizace, blokují vstup Na<sup>+</sup> do buňky. Na úrovni tkáňové prodlužují depolarizační fázi a zpomalují vedení vzruchu. Blokádu Na<sup>+</sup> kanálů antiarytmiky mohou být ovlivněny i vzrušivé pochody v jiných orgánech, např. v centrálním nervstvu, jedná se tedy o specifický mechanismus orgánově nespecifický (Lüllmann et al., 2004).

Třída Ia blokuje výstup K<sup>+</sup> z buňky, tím se prodlužuje depolarizace a s ní i efektivní refrakterní perioda. Nejznámější látkou z této skupiny je chinidin. Kombinace chinidinu s jinými léčivy může vyvolat lékové interakce, např. jako blokátor cytochromu P450 snižuje metabolismus warfarinu zodpovědného za blokádu vitamínu K potřebného pro syntézu koagulačních faktorů a tím vyvolá nebezpečí krvácení. Je také spojován s alergickými reakcemi, které vedou k lýze buněk (alergie typu 2, trombocytopenie). Dlouhodobá léčba

chinidinem se projevuje gastrointestinální nesnášenlivostí a vzácněji cinchonismem (neostré vidění, třes a ztráta sluchu). V současné době se v léčbě používá jen výjimečně (Martínková, 2007).

Třída Ib zahrnuje léčiva používaná při léčbě komorových tachyarytmií. Přednostním lékem z této skupiny je lidokain, který je aplikován v rané fázi infarktu myokardu. Riziko léčby lidokainem se objevuje u nemocných s hypotenzí, kdy pokles průtoku portálním oběhem sníží biodegradaci lidokainu a podpoří jeho nežádoucí účinky postihující nervovou soustavu (Martínková, 2007).

Třída Ic je odlišná tím, že pouze blokuje Na<sup>+</sup> kanál. Léčba může způsobit komorovou fibrilaci, protože zpomalení vodivosti ve zdravé myokardiální tkáni může vyvolat proarytmogenní účinky. Hlavní využití je při léčbě supraventrikulárních arytmii a fibrilací síní. První volbou z této skupiny je propafenon (Martínková, 2007).

Beta-adrenergní blokátory (třída II) blokadou  $\beta_1$ -receptorů chrání srdce před zvýšenou spotřebou kyslíku následkem aktivace sympatiku, neboť znemožňují zvýšení srdeční práce. Využití je v léčbě anginy pectoris k zabránění srdečního přetížení. Používají se také ke snížení vysokého krevního tlaku a ochraně insuficientního srdce před silnými stimulačními vlivy sympatiku. Snížením aktivity  $\beta_1$ -receptorů inhibují stimuly ke zvýšení frekvence a zrychlení kontrakce (Lüllmann et al., 2007). Mezi nežádoucí účinky patří srdeční insuficience, způsobená snížením tepového objemu a tepové frekvence, poruchy prokrvení, AV blokáda nebo bradykardie (Lüllmann et al., 2007). Beta-blokátory jsou také řazeny do skupiny endokrinních disruptorů, protože zejména při reakci na stres narušují endokrinní systém (Massarsky et al., 2011). Některé látky s této skupiny (např. propranolol) se také vyznačují dobrou preventivní schopností na vznik migrény (Hynie, 2001).

Blokátory draslíkových kanálů (třída III) prodlužují trvání akčního potenciálu (prodloužení plató fáze) a tím i dobu absolutní refrakterní periody. Tento účinek, který je na molekulární úrovni důsledkem blokády K<sup>+</sup> kanálu v buňkách myokardu, lze často využít při potlačení opakovaných tachyarytmií. Lékem první volby je obvykle Amiodaron. Nežádoucím účinkem může být hyper- i hypofunkce štítné žlázy, vyvolaná přítomností jódu v molekule amiodaronu. K nejzávažnějším komplikacím se řadí plicní fibróza. Dalším nejvíce předepisovaným léčivem je sotalol zpomalující repolarizaci (Martínková, 2007).

Blokátory vápníkových kanálů (třída IV) jsou léky, které specificky blokují průnik Ca<sup>2+</sup> do buněk hladkého svalstva, buněk srdečního svalu a buněk převodního systému. Výsledkem jejich působení je snížení stažlivosti (kontraktilita myokardu), vazodilatace (rozšíření cév) a zpomalení šíření vzruchu. Snížení koncentrace volného vápníku v buňkách patří mezi hlavní

podmínky dosažení poklesu tonu svaloviny cév provázené snížením periferní rezistence, vazodilatací a tím i poklesem krevního tlaku. Blokátory vápníkových kanálů nepředstavují homogenní skupinu z hlediska struktury a chemického složení, ale ani z hlediska nežádoucích účinků a terapie (Vítovec & Špinar, 2000). Při léčbě se uplatňují nejen jako antiarytmika (zpomalení atomacie v SA uzlu i vedení v AV uzlu), ale také jako atianginózní látky (úprava průtoku koronárními, mozkovými i ledvinnými cévami) a antihypertenziva. Každý ze tří hlavních zástupců (verapamil, diltiazem a nifedipin) má jiné ze tří přítomných vazebných míst na L kanálu (tzv. napětově řízený pomalý vápníkový kanál), což vysvětluje odlišnosti účinků jednotlivých látek (Hynie, 2001). Kromě těchto léčiv první generace, byly do léčby zavedeny látky druhé generace (např. amlodipin nebo isradipin), které vykazují ještě selektivnější účinky na cévy a menší působení na srdce. Selektivita blokátorů vápníkových kanálů k určité tkáni, je závislá na množství vyskytujících se L kanálů. Blokátory vápníkových kanálů se rozlišují na dihydropyridiny a non-dihydropyridiny, které se dále dělí na fenylalkylaminy a benzothiazepiny (Vítovec & Špinar, 2000). Nifedipin, zástupce dihydropyridinů, vykazuje mnohem selektivnější účinek na cévy než ostatní látky (Hynie, 2001). Verapamil a diltiazem se řadí mezi non-dihydropyridiny. Dilataci cév způsobují zejména dihydropyridiny. Verapamil má hlavní účinek na srdce, zatímco diltiazem má vliv jak na cévy, tak i na myokard (Martínková, 2007). V myokardu působí blokátory vápníkových kanálů nejen na svalová vlákna, ale i na převodní systém srdeční. Následně dochází jak ke snížení síly kontrakce (negativně ionotropní účinek), tak ke snížení srdeční frekvence (negativně chronotropní účinek) a vodivosti (negativně dromotropní účinek). Tato skupina antiarytmik má stejně jako některé beta-blokátory profylaktické účinky při vzniku migrény (Hynie, 2001). Hlavními indikacemi podání blokátorů vápníkových kanálů je angina pectoris, hypertenze, supraventrikulární tachyarytmie a spazmy mozkových cév. V důsledku silných vazodilatačních účinků mohou vznikat nežádoucí účinky, např. pokles krevního tlaku, bolest hlavy, návaly, nauzea. Diltiazem a verapamil by neměly být podávány pacientům, kteří jsou léčeni beta-blokátory, z důvodu zvýšení negativně ionotropního a negativně dromotropního účinku (Hynie, 2001).

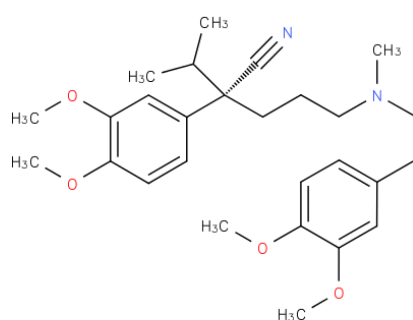
Mezi nezařazená antiarytmika, která nejsou zahrnuta ve výše uvedené klasifikaci, patří srdeční (digitalisové) glykosidy a adenosin. Srdeční glykosidy zpomalují rychlost vedení AV uzlem a zkracují refrakterní fázi. Také se podílejí na zvýšení aktivity vagu (bloudivého nervu). Používají se zejména při léčbě fibrilace síní. Hlavním zástupcem je digoxin. Adenosin je zodpovědný za aktivaci adenosinových receptorů v SA a AV uzlu a v síních,

kteřá vede k otevření  $K^+$  kanálů a hyperpolarizaci. Tím se sníží automatice a zpomalí se vedení vzruchu v uzlech (Martínková, 2007).

Jako antiarytmika za účelem doplnění elektrolytů se dále užívají i soli hořčíku a draslíku (Hynie, 2001).

### 1.1.3 Verapamil

Verapamil (Obr. 2) je řazen do třídy fenylalkylaminů a spolu s diltiazemem patří mezi kationicky-amfifilní látky, jejichž pozitivně nabitý dusík v molekule je důležitý pro vazbu na kanálový protein (Lüllmann et al., 2004).



**Obr. 2:** Strukturní vzorec verapamilu (ChEBI).

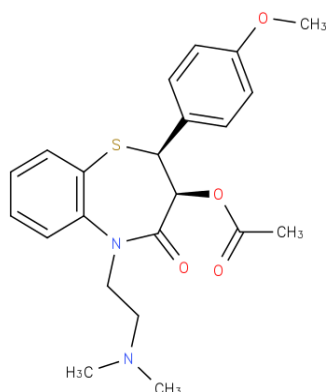
Verapamil omezuje vstup  $Ca^{2+}$  do buněk hladkého svalstva cév, do myocytů, ale i do srdečního převodního systému. V srdci je vtok  $Ca^{2+}$  důležitý v AV uzlu (převod vzruchu ze síní a komory), pro depolarizaci SA uzlu (vznik elektrického impulsu) a ve svalovině myokardu při elektromechanickém spřažení. Verapamil proto působí negativně dromotropně, negativně chronotropně a negativně ionotropně (Lüllmann et al., 2007). Působí vazodilataci (především koronárního řečiště) a zpomaluje vedení vzruchu v srdci. Prodlužuje vedení AV uzlem a snižuje automaticitu SA uzlu (Martínková, 2007). Používá se při supraventrikulárních arytmiích, k profylaxi záchvatů anginy pectoris a také jako antihypertenzivum (Lüllmann et al., 2007). Verapamil je ve formě hydrochloridu rozpustný ve vodě. Vazba verapamilu na bílkoviny krevní plazmy je přibližně 90 %, biologický poločas činí 3 – 7 hodin a trvání účinku s vysokou variabilitou je 1,5 – 10 hodin (Vítovec & Špinar, 2000). Distribuční objem<sup>6</sup> verapamilu je zhruba 4,0 l/kg, což nasvědčuje silnému nahromadění látky ve tkáních (Lüllmann et al., 2004).

<sup>6</sup> Distribuční objem (Vd) vyjadřuje poměr mezi množstvím léčiva v těle a jeho koncentrací v krvi. Distribuční objem je definován jako teoretický objem, ve kterém by se muselo celkové množství podaného léku rovnoměrně rozpustit, aby bylo dosaženo stejné koncentrace léčiva jako v krvi.

V neionizovaném stavu lehce proniká biologickými membránami, v nabitě formě se hromadí na interfázích styku lipidy-voda. Navzdory téměř kompletní resorpci z gastrointestinálního traktu (přibližně 90 %) po perorálním podání je celková biologická dostupnost léčiva nižší (asi 25 – 35 %), což odráží podstatný první průchod jaterním metabolismem. Z důvodu vysoké nesystémové eliminace představuje perorální dávkování verapamilu 8 až 10násobně vyšší dávku v porovnání s intravenózními dávkami potřebnými pro dosažení srovnatelných farmakodynamických účinků (80 mg per os a 5 mg i.v.). Velikost tohoto rozdílu vysvětluje i vyšší rychlost jaterního metabolismu farmakologicky účinnějšího S-enantiomeru verapamilu než jeho méně účinný R-enantiomer (Lüllmann et al., 2004). Při opakovaném podání u pacientů s jaterní poruchou může dojít k opožděnému vylučování a hromadění léku v organismu. Léčebné plazmatické koncentrace verapamilu dosahují asi 0,2 – 0,4 µg/ml aktivní látky. Účinek léku po intravenózním podání přichází do 5 minut s vyvrcholením za 10 – 20 minut na AV uzel, doba trvání je až 6 hodin. Při léčbě verapamilem by se současně neměly podávat beta-blokátory z důvodu zvýšení negativního účinku na srdce (Vítovec & Špinar, 2000). Podávání verapamilu může být doprovázeno i nežádoucími účinky jako jsou bradykardie, AV blok až asystolie. Další nežádoucí účinky mohou vyplynout z poklesu krevního tlaku (edémy bérců, bolesti hlavy). Kontraindikace verapamilu jsou stávající poruchy převodu, zřetelná srdeční insuficience a jaterní choroby (Lüllmann et al., 2004).

#### 1.1.4 Diltiazem

Diltiazem je řazen do třídy benzothiazepinů (Obr. 3). S ostatními blokátory vápníkových kanálů není chemicky příbuzný, ale vyznačuje se podobnými účinky jako verapamil (Vítovec & Špinar, 2000).



**Obr. 3:** Strukturální vzorec diltiazemu (ChEBI).

Diltiazem má kardioprotektivní účinky, které spočívají ve zlepšení kyslíkové bilance myokardu. Vykazuje i slabý antiagregační vliv. Stejně jako verapamil působí negativně ionotropně, negativně chronotropně a vyvolává vazodilataci periferních arteriol. Snižuje výskyt extrasystol a potlačuje supraventrikulární arytmie, zpomaluje srdeční frekvenci a působí pokles krevního tlaku (Vítovec & Špinar, 2000). V porovnání s verapamilem je jeho účinnost slabší, intravenózně se podává 20 mg (Lüllmann et al., 2004). Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo přibližně za 5 – 7 hodin po podání. Na bílkoviny krevní plazmy se váže z 80 %. Z organismu se vylučuje zejména močí formou neúčinných metabolitů. Podíl nezměněné látky při perorálním podání dosahuje pouze 0,1 – 4 % (Vítovec & Špinar, 2000). Na jeho biologickou dostupnost má výrazný vliv efekt prvního průchodu játry.

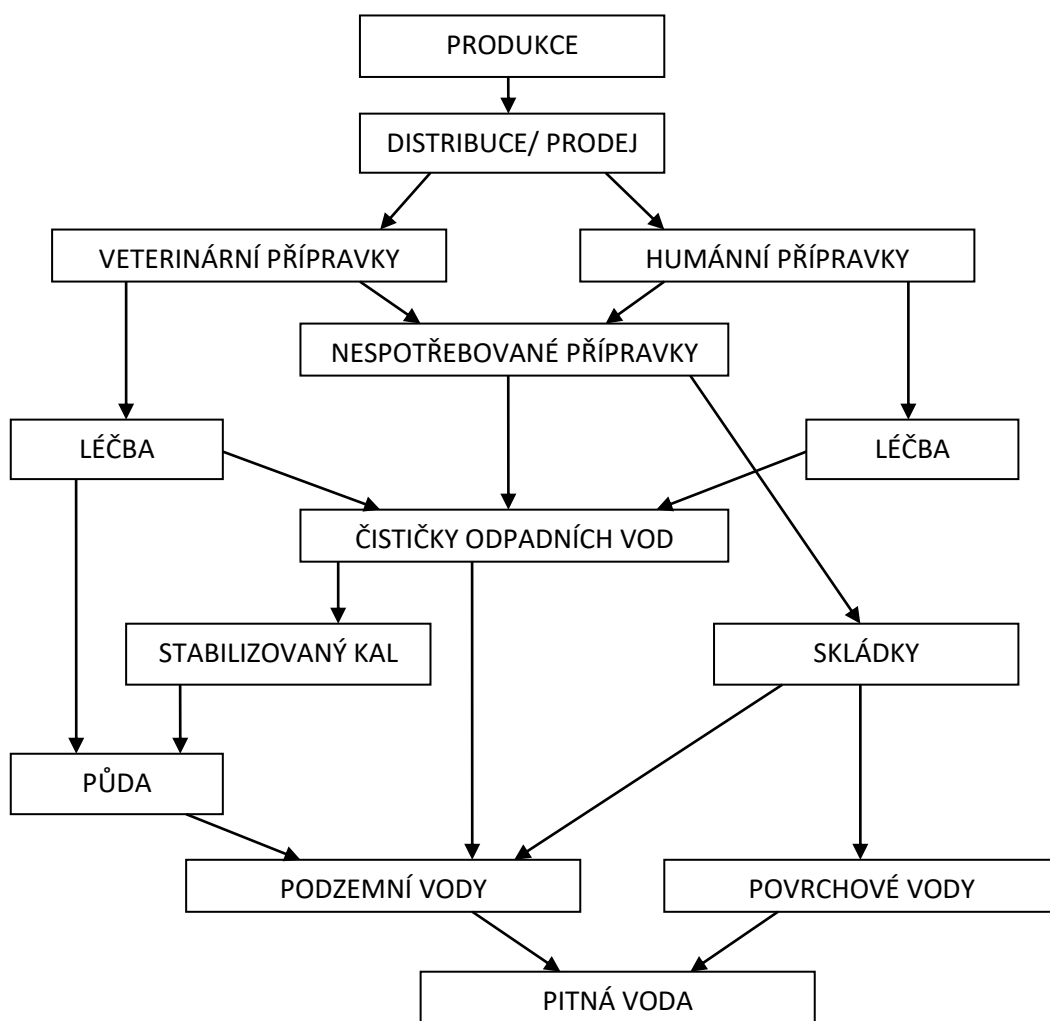
## **1.2 Toxicita a vliv na vodní organismy**

Celosvětová tržní hodnota a míra předepisování antiarytmik se každým rokem podstatně zvyšují. V posledních deseti letech se počet lékařských předpisů zdvojnásobil (Massarsky et al., 2011). Rozsáhlé použití těchto léčiv, zejména beta-blokátorů a blokátorů kalciových kanálů, vede k jejich přítomnosti ve vodním prostředí.

Vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem vzbuzují farmaka obecně (včetně antiarytmik) stále větší obavy ohledně možného vlivu na vodní organismy.

Podobně jako ostatní léčivé přípravky a jejich metabolity se antiarytmika dostávají do životního prostředí prostřednictvím odpadních vod z ČOV (Saari et al., 2017). Do ČOV vstupují tyto látky jednak z komunálních odpadních vod, kam se dostávají jako nemetabolizované nebo metabolizované léčivé látky vyloučené pacienty, jednak z výrobních farmaceutických a zdravotnických provozů. Zejména odpadní vody nemocnic a farmaceutického průmyslu mohou obsahovat vysoké koncentrace těchto produktů, až 1 mg/l (Gros et al., 2010). Dalším významným zdrojem jsou léky s prošlou spotřební lhůtou, které do koloběhu pronikají buď spláchnutím do odpadu nebo formou průsaků ze skládek (Kotyza et al., 2009). Heberer (2002) ve svém přehledném článku dokládá, že čistírenský kal používaný v zemědělských oblastech jako druhotné hnojivo je naplněn zdravotnickým odpadem, který kontaminuje půdu a může se vyplavovat do povrchových vod loužením. Obr. 4 shrnuje hlavní cesty, jakými se léčiva a jejich metabolity dostávají do životního prostředí.





**Obr. 4:** Schéma kontaminace životního prostředí léčivy (upravené dle Kotyzy a kol., 2009).

V čistírnách odpadních vod mohou sloučeniny podstoupit různé strukturální změny (Michael et al., 2014). Jedná se o procesy biotické (biodegradace, zejména bakteriemi a houbami) a abiotické (např. hydrolýza) (Kern et al., 2010). Biotické procesy jsou obvykle značně omezené, protože farmaceutické sloučeniny jsou navrhovány tak, aby byly odolné proti biodegradaci (Fatta-Kassinos et al., 2011). Odbourávání v čistírnách odpadních vod není kvantitativní. Často je pozorováno přetrvávání léčiv v přírodních vodách za čistírnou odpadních vod i tehdy, kdy se jedná o látky s krátkým poločasem degradace – to je způsobeno nepřetržitým přísunem takových látek do životního prostředí (Wolfe et al., 2015); v těchto případech se zavádí pojem pseudo-perzistence.

Při biologické nebo abiotické částečné degradaci léčiv během čištění odpadních vod mohou vznikat nové chemické entity s různými vlastnostmi, známé jako transformační produkty (Kern et al., 2010). Abiotické environmentální faktory (např. teplota, sluneční záření, salinita, pH) mohou významně přispět k transformaci léčiv, které pak vstupují do prostředí.

Transformační produkty mohou být dále distribuovány do povrchových nebo podzemních vod a případně dále degradovány (Michael et al., 2014).

Andreozzi a kol. (2003) dělí abiotické fotochemické transformace na přímou a nepřímou fotolýzu, kdy za přímou fotolýzu považuje přímou absorpci slunečního světla substráty a za nepřímou reakci za přítomnosti organických látek, které nazývá senzibilizátory.

Modernější fotochemické přístupy (Klementová, 2012) označují jako fotolýzu pouze reakce, kdy absorpcí vysokoenergetických kvant záření dochází ke štěpení vazeb. Jako fotosensitizované jsou pak označovány reakce, kde určitá absorbující látka, sensitizátor, absorbuje záření a absorbovanou energii je schopna přenést buď na substrát nebo na rozpuštěný kyslík. Tímto mechanismem vznikají silné oxidační částice jako je singletový kyslík (Michael et al., 2014).

Strukturální transformace mohou být také důsledkem použití technologických procesů, jako je zpracování odpadních vod pokročilými oxidačními procesy. Jedná se o poměrně účinné nové metody pro úpravu odpadních vod (Klavarioti et al., 2009, Malato et al., 2009). Tyto procesy zahrnují použití a generování silných oxidačních činidel, převážně hydroxylových radikálů. Identifikace transformačních produktů přítomných v ekologických vzorcích je obtížná úloha, zejména z důvodu možných rozdílů v koncentraci, při které jsou generovány a extrahovány během extrakce na pevné fázi. Tento úkol představuje důležitou analytickou výzvu, protože vytvořené transformační produkty jsou nové chemické entity, pro které nejsou v současné době stanovené standardy (Michael et al., 2014)

Pochopení transformace léčiv je nezbytným předpokladem pro přesné určení jejich konečného environmentálního osudu, provádění přesných posouzení rizik a zlepšení jejich odstranění. TP mohou mít stejný způsob působení jako původní sloučenina (tj. aktivní část zůstává nedotčená během transformace) a vyvolat toxikologický účinek na necílové organismy v systémech životního prostředí, ať už vodních nebo suchozemských (Fatta-Kassinos et al., 2011). Protože TP se obvykle vyskytují ve směsi s mateřskou sloučeninou, jejich příspěvek se od příspěvku mateřské sloučeniny obtížně odlišuje (Escher & Fenner, 2011).

TP se mohou lišit od původních sloučenin dvěma způsoby: v jejich biokoncentraci (toxikokinetice) a v jejich způsobu toxického působení (toxikodynamice). Ve vzácných případech může přeměna vytvořit nové toxikofory, které mohou vést k vyšší toxicitě podobným nebo odlišným způsobem účinku (Michael et al., 2014). Zkoušky toxicity s různými organismy ukázaly, že chronická expozice léčivým přípravkům a jejich TP je kritičtější než akutní expozice, protože akutní expozice neodráží skutečné podmínky

prostředí, kde jsou organismy nepřetržitě vystavovány farmaceutickým zbytkům na subterapeutických úrovních (Lindberg et al., 2007).

Zprávy o možných ekotoxikologických účincích metabolitů a zbytků transformačních produktů antihypertenziv jsou však vzácné (Godoy et al., 2015). Jejich environmentální analýzu navíc komplikují i přírodní degradační procesy (Narvaez & Jimenez, 2012).

Jak uvádí Berkner a Thierbach (2014), na metabolity a produkty transformace by měla být zaostřena pozornost stejně jako na mateřské sloučeniny, případně ještě více, protože v některých případech je jejich perzistence a mobilita vyšší než u původních sloučenin.

Z dostupných informací o výskytu antiarytmik ve vodním prostředí je známo, že se tyto látky objevují jak na přítoku, tak i odtoku z čističek odpadních vod obvykle v koncentracích desítek až stovek ng/l, někdy i v jednotkách µg/l (Corcoran et al., 2010). Nejčastěji jsou z této skupiny farmak detekovány beta-blokátory (Marin-Morales et al., 2016). V rámci této třídy se většina studií zaměřuje zejména na atenolol, metoprolol a propranolol (Maurer et al., 2007). Atenolol byl nalezen v nemocničním odpadu v Portugalsku v koncentracích do 8,0 µg/l (Wilde et al., 2012). V Brazílii je nejvíce zjišťovaným antihypertenzivem v nemocničním odpadu metoprolol v koncentracích až 9,9 µg/l (Larsson et al., 2007).

Jak uvádí Godoy (2015), pouze 2 % studií ze 79 článků publikovaných v letech 1998 až 2015 hodnotí kontaminaci životního prostředí verapamilem. Diltiazem je zmiňován v 7 % těchto studií, což svědčí o jeho vyšší frekvenci detekce ve vodních matricích.

Na odtoku ze sedmi čističek odpadních vod v Novém Mexiku byly stanovené koncentrace verapamilu v rozmezí 14 – 190 ng/l (Batt et al., 2008). Nejvyšší koncentrace (800 ng/l) byly naměřeny na odtoku ČOV v Austrálii (Khan & Ongerth, 2004).

Informace o výskytu diltiazemu a verapamilu ve vodním prostředí České republiky shrnuje Golovko et al. (2014). Na přítoku ČOV dosahoval diltiazem koncentrace 100 ng/l, verapamil se vyskytoval v rozmezí mezi 11 – 72 ng/l.

Jak uvádí Deo a Halden (2013), detekce diltiazemu v USA se nevyskytuje jen v odpadních vodách. Tab. II ukazuje zjištěné koncentrace diltiazemu a verapamilu v přírodních a upravených vodách v USA. Tento výskyt může mít spojitost s tím, že se odhaduje až 1 miliarda přípravků na předpis, která je vyřazena každý rok v USA, z nemocnic, pečovatelských zařízení a lékáren (Corcoran et al., 2010).

**Tab. II:** Maximální koncentrace blokátorů kalciových kanálů v odpadních a přírodních vodách v USA (Deo a Halden, 2013).

Účinná látka	Surové odpadní vody [ng/1]	Upravené odpadní vody [ng/1]	Povrchové vody [ng/1]	Podzemní vody [ng/1]	Surová pitná voda [ng/1]	Hotová pitná voda [ng/1]	Kal z ČOV [µg/1]
diltiazem	57	200	130	28	N	N	225
verapamil	N	190	N	N	N	N	N

N= nedetekován

Přítomnost antiarytmik v přírodním prostředí může vést k toxikologickým účinkům na necílové organismy, proto je důležité posoudit environmentální riziko těchto kontaminantů (Godoy et al., 2015).

Vzhledem ke konzervativní povaze fyziologických procesů mají mnohé vodní druhy (obzvláště ryby a obojživelníci) podobné cílové receptory, které interagují s léky u lidí (Owen et al., 2007, Gunnarsson et al., 2008). Za předpokladu, že léčivo působí primárně prostřednictvím stejného cíle také u necílových druhů, je možné předpovědět pravděpodobnost farmakologických interakcí u živočichů žijících ve volné přírodě (Fick et al., 2010).

Fick et al. (2010) provedli studii, jejímž cílem bylo vypočítat u 500 léčivých přípravků předpokládanou kritickou environmentální koncentraci (CEC), tj. koncentraci povrchových vod, o které se očekává, že vyvolá farmakologický účinek na ryby, a to pomocí literárních údajů o lidských účincích spolu s předpokládaným biokoncentračním faktorem pro ryby u každého léčiva na základě lipofilnosti. Předpovězené hodnoty CEC lze použít jako předběžné rizikové indikátory specifického potenciálu léčiv, které mohou způsobit nepříznivé farmakologické účinky.

Hodnoty CEC byly vypočteny z následující rovnice (Fick et al., 2010):

$$CEC = \frac{HTPC}{CR \cdot P_{blood:water}}$$

Použitý koncentrační poměr (CR) mezi lidskými terapeutickými plazmatickými koncentracemi (HTPC) a měřenou nebo teoreticky předpokládanou plazmatickou koncentrací v ustáleném stavu ryb (FSSPC) byl pro každý farmaceutický přípravek 1.

CR odráží pouze pravděpodobnost vzniku farmakologických interakcí a nikoli to, zda by interakce byly nepříznivé nebo ne.

Teoretické faktory biokoncentrace v plazmě ( $P_{\text{blood: water}}$ ) byly pro každý léčivý přípravek odhadnuty z rovnice:  $\log P_{\text{blood:water}} = 0,73 \cdot \log Kow < 0,88$ .

Tento přístup tedy bere v úvahu jak odhadovanou účinnost popsanou v HTPC, tak i fyzikálně-chemické vlastnosti, jak je popsáno v logKow každého léku. Stanovená hodnota CEC pro verapamil byla 24 ng/l (Fick et al., 2010).

Jiné přístupy posouzení rizik pro vodní prostředí porovnávají maximální naměřené environmentální koncentrace (MEC) s toxikologicky relevantními předpokládanými koncentracemi bez účinku (PNEC) (Godoy et al., 2015). Je třeba zdůraznit, že MEC poskytuje důležitý odhad koncentrace nebo dávky vnější expozice. Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) vydala v roce 2006 směrnici o hodnocení rizika pro životní prostředí u humánních léčivých přípravků, jejímž cílem je odhadnout tato rizika pomocí stupňovitého postupu. Jestliže je PEC (předpokládaná koncentrace prostředí) povrchové vody pod hodnotu 0,01 µg/l a nejsou zřejmé žádné jiné environmentální problémy, předpokládá se, že léčivo pravděpodobně nepředstavuje riziko pro životní prostředí. Směrnice EMA uznává, že prahová hodnota 0,01 µg/l nemusí být použitelná pro velmi specifické a vysoce účinné farmaceutické přípravky, jako jsou syntetické hormony, které mohou mít nepříznivé účinky v prostředí ve stopových koncentracích (Christen et al., 2010). Protože je tato směrnice již poněkud zastaralá, vzhledem k novým poznatkům by zasloužila inovaci.

Ekotoxicita chemických látek se posuzuje podle výsledků testů toxicity na vodních organismech. Různé laboratoře postupují podle shodných metodik, které jsou standardizovány na mezinárodní úrovni. Standardizaci vykonává mezinárodní organizace ISO (International Organization for Standardization) a Organization for Economic Cooperation and Development, OECD (OECD, 2004). Česká republika je členem OECD se všemi závazky od roku 1995 (Svobodová, 2007). Jednotlivé metodiky testů toxicity prováděné na vodních organismech jsou uvedené v Tab. III.

**Tab. III:** Souhrn standardních testů toxicity prováděných na vodních organismech dle OECD (OECD, 2004).

Skupina	Druh	Použitý test	Číslo testu dle OECD	Doba trvání	Stanovené hodnoty toxicity
Řasy	-	Růstový inhibiční	201	72h	IC <sub>50</sub>
	<i>Lemna sp.</i>	Růstový inhibiční	221	7 dní	EC <sub>50</sub>
Korýši	<i>Daphnia sp.</i>	Akutní imobilizační	202	24h nebo 48h	EC <sub>50</sub>
	<i>Daphnia magna</i>	Reprodukční	211	21 dní	EC <sub>50</sub> , NOEC, LOEC
Ryby	-	Test akutní toxicity	203	96 h	LC <sub>50</sub>
	-	Prolongovaný	204	14 dní	LC <sub>50</sub> , NOEC, LOEC
	-	Embryolarvální	210	-	NOEC, LOEC
	-	Embryonální	212	-	NOEC, LOEC

Prvním krokem ke zjišťování toxicity látky jsou akutní testy, jejichž cílem je stanovit dávkovou závislost pro akutní účinek testované látky. Účinek se vyjadřuje procentuálním podílem jedinců v daném souboru, u kterých se příslušný účinek projevil, na logaritmu dávky. Nejčastěji se při testech akutní toxicity zjišťuje letální účinek (mortalita) vyjadřovaný hodnotou LD<sub>50</sub>. Jedná se o dávku, která po jednorázovém podání usmrtí 50 % testovaných zvířat (Linhart, 2012).

K vyhodnocení dlouhodobého působení látek slouží subchronické a chronické testy trvající v rozmezí 14 až 90 dnů. Testuje se více dávkových hladin. Jedna skupina zůstává neexponována a slouží jako kontrolní skupina k odlišení spontánních reakcí organismu a experimentem vyvolaného stresu od účinků podávané látky. Základním ukazatelem je růst, přežití a reprodukce oproti kontrolní skupině. Kromě toho se během studie měří biochemické parametry, které slouží k diagnostice funkčních poruch. Jedná se například o obsah biologicky významných iontů v séru a jejich rovnováha, hematologické parametry, aktivita enzymů v plazmě nebo v séru a indikátory genotoxického účinku – detekce mikrojadérek v kostní dřeni, stanovení DNA aduktů ve vzorcích tkání a v bílých krvinkách (Linhart, 2012). Projevem neurotoxických účinků mohou být také pozorované změny v chování organismů. Zvolená nejvyšší dávková hladina by měla v optimálním případě vyvolat výraznou toxickou odpověď, ale zároveň by během studie nemělo uhynout víc než 10 %

testovaných zvířat. Nejnižší dávková hladina by neměla způsobit toxickou odpověď. Všechna přeživší zvířata se po skončení experimentu utratí a histopatologicky prozkoumají. Tím se získávají zásadně důležité podklady pro vyhodnocení, na které orgány daná látka působí. Výsledkem těchto studií jsou hodnoty NOEC a LOEC. Pro návrhy chronických studií, které se liší dobou trvání, slouží subchronické studie. Většinou jsou při nich podávány opakované dávky testované látky po celou dobu dospělého života organismu (Linhart, 2012). Možnost, že léčiva mohou mít negativní účinky na vodní organismy je v poslední době široce diskutována a dokumentována ve vědecké literatuře (Bruce et al., 2010, Massarsky et al., 2011, Godoy et al., 2015, Marin-Morales et al., 2016, Saari et al., 2017). Podle přehledu Godoye et al. (2015) bylo zjištěno 34 druhů antiarytmických molekul v upravené vodě, ale pouze 16 z těchto molekul bylo studováno s ohledem na jejich ekotoxikologické účinky. Proto je zřejmé, že existuje značný nedostatek znalostí týkajících se ekotoxikologických údajů této terapeutické třídy.

Většina studií zabývajících se účinkami diltiazemu a verapamilu na vodní organismy vyhodnotila standardní ekotoxicitu, např. přežití, růst nebo reprodukci (Li et al., 2010, Le et al., 2011, Overturf et al., 2012), zatímco jiné měly za cíl stanovit biochemické a subcelulární odpovědi (Ajima et al., 2017a, Ajima et al., 2017b). Studie, které zkoumaly více koncentrací určitého léku, zaznamenaly hodnoty NOEC, LOEC nebo EC/LC50, naopak několik studií hodnotilo méně než tři koncentrace nebo hlásily nekonzistentní vztahy mezi dávkou a odezvou (Saari et al., 2017). Koncentrace diltiazemu a verapamilu, při nichž byly zaznamenány biologické účinky, jsou obecně mezi  $\mu\text{g/l}$  a  $\text{mg/l}$ , typicky alespoň o jeden řád vyšší než koncentrace detekovaná v povrchových vodách ( $\text{ng/l}$ ) (Corcoran et al., 2010). Ačkoliv se léčiva neobjevují jako izolované látky v životním prostředí, ale jako složité směsi, většina výzkumů se provádí s použitím jediného farmaceutického přípravku (Vasquez et al., 2014). Proto jsou údaje o stanovení toxicity směsi antiarytmik dosud nedostačující.

Při shromažďování údajů o farmakologických účincích verapamilu na ryby byl vystaven jeleneček velkohlavý (*Pimephales promelas*) v larválním stádiu koncentraci  $600 \mu\text{g/l}$  verapamilu po dobu 28 dní. Tato dávka výrazně snížila růstovou rychlost, přežití nebylo při této koncentraci nijak ovlivněno (Overturf et al., 2012).

Embryo-larvální test toxicity verapamilu provedený na vývojových stádiích kapra obecného (*Cyprinus carpio*) prokázal významné snížení srdeční frekvence embryí a larev již v koncentraci  $1 \text{ mg/l}$  po akutní expozici (Steinbach et al., 2013). Letální koncentrace verapamilu se snížily s nárůstem věku ryb, protože v porovnání se staršími jedinci (larvami)

neměla embrya plně vyvinuté žábry a proto nebyl vstup verapamilu tak snadný. U kaprů vystavených 4,63 µg/l verapamilu byl ve srovnání s kontrolou pozorován významně vyšší výskyt edémů a malformací (zakřivení páteře, nevyvinuté oči, deformace střev, ploutví a lebky). U juvenilního jedince pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) byl studován vliv verapamilu pomocí akutních testů toxicity. V této studii byl určen medián letální koncentrace verapamilu 2,72 mg/l po 96hodinovém působení. Se zvyšujícími se koncentracemi verapamilu byly zjevně zesíleny i změny v chování. Po krátkodobé expozici subletální koncentrace 0,27 mg/l verapamilu by ve srovnání s kontrolou zjištěn oxidační stres (Li et al., 2010).

Při testu chronické toxicity s použitím hrotnatky velké (*Daphnia magna*) byly při expozici 4,2 mg/l verapamilu nepříznivě ovlivněny některé parametry, jako je procento přežití, délka těla, doba první reprodukce a počet potomků. Během 21denní dlouhodobé expozice však verapamil také výrazně snížil hladinu exprese genu VTG (Vitellogenin), což je biomarker reprodukční schopnosti (Le et al., 2011).

Pomocí testů prováděných s *Daphnia magna* určili Villegas-Navarro et al. (2003) toxicitu pro čtyři kardioaktivní léky. Hodnota letální koncentrace po 48hodinové expozici verapamilem byla 7,04 mg/l. Verapamil navíc vyvolal pozitivní chronotropní a ionotropní účinky, zatímco u lidí je jeho účinek opačný.

Ajima et al. (2017a) zkoumali mutagenní účinky dlouhodobé expozice verapamilu u tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*) při 60denní expozici; studie se zaměřila také na hematologické parametry a aktivity oxidativních enzymů. Ajima et al. (2017a) prokázali, že dlouhodobá expozice verapamilu v subletální koncentraci 1,15 mg/l může vést k mutagenním účinkům a oxidačním dysfunkcím. Ve stejném roce provedli titíž autoři podobnou studii se stejným organismem, zabývající se účinky verapamilu na aktivitu acetylcholinesterázy a antioxidantních enzymů, stejně jako exprese mRNA genů souvisejících se stresem v mozkových a svalových tkáních. Letální koncentrace verapamilu byla po 96hodinové expozici 2,29 mg/l. Transkripce genů se zvyšovala v závislosti na dávce a byla významně up-regulována při 0,29 a 0,57 mg/l ve srovnání s kontrolou (Ajima et al., 2017b).

Kim et al. (2007) provedli studii akutní toxicity diltiazemu pro bakterie (*Vibrio fischeri*), sladkovodní bezobratlé (*Daphnia magna*) a japonské medaky (*Oryzias latipes*). Mezi testovanými organismy byly nejvíce náchylné hrotnatky. Letální koncentrace po 48hodinové expozici byla 28 mg/l, po 96hodinové expozici 26,6 mg/l.

Cílem studie Steinbacha et al. (2016) bylo zhodnotit biokoncentraci, metabolismus, poločas rozpadu diltiazemu s následným vlivem na hematologické parametry, histologii a



enzymatickou aktivitu u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Bylo zjištěno, že diltiazem metabolizuje hlavně desmethylací a desacetylací podobně jako u savců. V koncentraci 0,03 µg/l byl diltiazem a jeho metabolity identifikovány v játrech a ledvinách, což naznačuje potenciál pro příjem a metabolismus u necílových organismů ve vodním prostředí. V porovnání s kontrolou došlo po 42denní expozici 3 µg/l diltiazemu k výraznému zvýšení počtu zralých neutrofilních granulocytů v krvi. Při koncentraci 30 µg/l byly zaznamenány histologické změny v srdci, játrech a ledvinách. Na konci expozice byla značně zvýšena aktivita kreatinkinázy, což indikovalo poškozená svalů a ledvin.

Výsledky studií zabývajících se toxicitou verapamilu a diltiazemu pro vodní organismy shrnuje Tab. IV.

**Tab. IV:** Ekotoxikologické údaje ze studií verapamilu a diltiazemu na vodních organismech.

Použitá látka	Druh organismu	Délka expozice	Ekotoxická koncentrace (mg/l)	Biologický účinek	Zdroj
Verapamil	<i>Spirostomum ambiguum</i> (prvok)	48 h	5,1	Morfologické změny	(Nałęcz-Jawecki & Persoone, 2006)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (řasa)	72 h	4,01	Růstová inhibice	(Minguez et al., 2016)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ryba)	96 h	2,72	50% mortalita	(Li et al., 2010)
		96 h	0,27	Oxidační stres	
	<i>Cyprinus caprio</i> (ryba)	31 dní	0,0046	Malformace a edémy	(Steinbach et al., 2013)
		4 dny	1,0	Snížení srdeční frekvence	
	<i>Daphnia magna</i> (korýš)	21 dní	4,2	Snížení reprodukce	(Le et al., 2011)
		48 h	7,04	50% mortalita	(Villegas-Navarro et al., 2003)
	<i>Pimephales promelas</i> (ryba)	28 dní	0,6	Růstová inhibice	(Overturf et al., 2012)
	<i>Oreochromis niloticus</i> (ryba)	60 dní	1,15	Mutagenní účinky	(Ajima et al., 2017a)
		96 h	2,29	50% úhyn	(Ajima et al., 2017b)
Diltiazem	<i>Daphnia magna</i> (korýš)	48 h	28	50% úhyn	(Kim et al., 2007)
		96 h	26,6	50% úhyn	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ryba)	42 dnů	0,3	Histopatologické změny	(Steinbach et al., 2016)
			0,003	Zvýšený počet neutrofilů v krvi	

Farmakologie učinila obrovské pokroky v tvorbě vhodných modelů používaných k identifikaci a pochopení mechanismů působení chemických látek na necílové organismy. Z důvodu potřeby větší citlivosti a dalšího pochopení farmakodynamiky je zvýšený zájem o in vitro modely. Jedním typem in vitro testu je použití bezobratlých. Tyto organismy mají méně vyvinuté kortikální a sensorické systémy a vyznačují se rychlou regenerací tkání. Test *D. magna* se doporučuje jako výhodný oproti jiným modelům pro hodnocení toxicity ve vodě. Jednou z výhod, kterou lze zdůraznit je, že je tělo *D. magna* je téměř průhledné. Transparentnost je užitečnou vlastností pro získání poznatků o fyziologii, neboť umožňuje výzkumníkovi aplikovat optické metody pro vizualizaci fyziologických funkcí a měření současně několika různých parametrů. *D. magna* je používána převážně ke studiu léků s účinky na srdce, protože tento orgán lze snadno pozorovat pomocí optických metod. Navíc má biologický test *D. magna* řadu dalších praktických výhod, například: jednoduchost, krátký životní cyklus, diskrétní růst, nízké náklady na údržbu, kultivaci v laboratoři a snadnou manipulaci (Villegas-Navarro et al., 2003).

Ze studie, kterou provedl Villegas-Navarro et al. (2003) je zřejmé, že srdce *D. magna* není podobné srdci savců, členovců a jiných koryšů. Verapamil vykazoval pozitivní inotropní a chronotropní účinky (zrychlení srdeční frekvence a zesílení svalové kontrakce) v srdci *D. magna* již při nízkých koncentracích, přesně opačné účinky způsobené u lidí. Tento zvláštní účinek byl revertován zpět ve vysokých koncentracích, na úkor srdeční frekvence. Specifická odezva srdce *D. magna* na nízkou koncentraci naznačuje přítomnost verapamilového receptoru. Vápníkové kanály bezobratlých obsahují alfa-1 podjednotky, které byly izolovány a klonovány. Existují zprávy o tom, že koryši jsou necitliví na organické blokátory vápníkových kanálů, ale jsou citliví na anorganický blokátor kanálů, jako je  $\text{Sr}^{2+}$ . Tato data podporují návrh, že srdce *D. magna* může mít verapamilové receptory, které jsou funkčně odlišné od receptorů savčího srdce.

Díky jedinečné charakteristice reakce srdce *D. magna* na verapamil vyhovuje tento organismus specifickému vědeckému účelu ke studiu jejího kalciového kanálu a podobnosti odpovědi na adrenergní agonisty a antagonisty ve vysokých dávkách.

## 2 Materiály a metody

Test chronické toxicity byl inspirován metodikou OECD č. 211 (OECD, 2004) za použití hrotnatky *Daphnia magna*. Navíc oproti metodice OECD č. 211 byla kromě reprodukční schopnosti (počet juvenilních jedinců a snůšek) sledována též velikost těla hrotnatky. Experiment trval 21 dní, přežití a počet potomků byly zaznamenávány každý druhý den při výměně média nebo krmení probíhající vždy přibližně ve stejnou dobu. Médium bylo měněno po čtyřech dnech, mezitím byly hrotnatky obden krmeny zelenou řasou *Desmodesmus subspicatus* v koncentraci 3 mg C/l.

K pokusu byly použity 24 hodin staří juvenilové hrotnatek pocházejících z laboratorního chovu *D. magna*. Hrotnatky v počtu 1 na kádinku byly odděleně inkubovány v 50 ml média. Celkový počet 45 kádinek byl rozdělen do tří sad po patnácti kádinkách, v každé sérii bylo použito jiné médium – médium s verapamilem, médium s produkty fotochemického rozkladu a kontrola. Do média byly přidávány řasy jako potrava pro hrotnatky, médium bylo ředěno bublanou vytemperovanou vodou. Kontrolní sada kádinek obsahovala jen potravu a bublanou vytemperovanou vodu. Všechny kádinky s juvenilny byly uchovávány v temperovaném boxu s teplotou 19,7 °C a nastavenou světelnou periodou 16:8, tj. 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Zásobní roztok verapamilu byl připraven rozpuštěním 4,9 mg verapamilu ve 100 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v temnu při pokojové teplotě. Stabilita byla ověřena pomocí HPLC. Ze zásobního roztoku verapamilu bylo pro test toxicity odměřeno 5 ml na 1 l vody (ředění 200×).

Pro přípravu směsi produktů fotodegradace bylo k roztoku verapamilu přidáno Fe (III) v koncentraci 0,08 mmol/l. Roztok byl ozařován ve skleněných kyvetách s víčkem ve fotochemickém reaktoru Rayonet R 100 osazeném lampami RPR 3000Å po dobu 20 minut. Příprava produktů fotodegradace verapamilu byla prováděna ve čtyřdenních intervalech a vystačila vždy pro dvě výměny média. Stabilita směsi byla ověřena pomocí HPLC. Z ozářené směsi bylo pro test toxicity odměřeno 40 ml na 1 l vody (ředění 25×).

Při založení pokusu bylo několik náhodně vybraných juvenilních hrotnatek zafixováno přídatkem formaldehydu a uchováno pro následné změření velikosti těla.

Na konci pokusu pak byly všechny přeživší samice vloženy jednotlivě do malých zkumavek a zafixovány formaldehydem. Jejich velikost těla byla porovnána mezi jednotlivými typy média.

Chromatografická stanovení pomocí HPLC byla prováděna na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate systém (USA) s kolonou Phenomenex Luna C 18 (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m). Jako mobilní fáze byla použita směs 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu v poměru 60:40, eluce byla prováděna isokraticky. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, nastříkovaný objem vzorku byl 20 $\mu$ l. Pro zpracování chromatografických dat byl použit program Chromeleon. Detekce byla prováděna spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem PDA 3000RS s využitím vlnových délek 254 nm a 278 nm a fluorescenčním detektorem FLD 3000RS s excitační vlnovou délkou 231 nm a emisní vlnovou délkou 328 nm.

Pro vyhodnocení dopadu verapamilu a produktů jeho fotodegradace na celkový počet juvenilů, počet snůšek a velikost těla hrotnatek byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným mnohonásobným porovnáním. Všechna data byla logaritmičsky transformována log (x+1). Statistické zpracování bylo provedeno v programu Statistica 13.2 (Statistica, 2015).

### 3 Výsledky

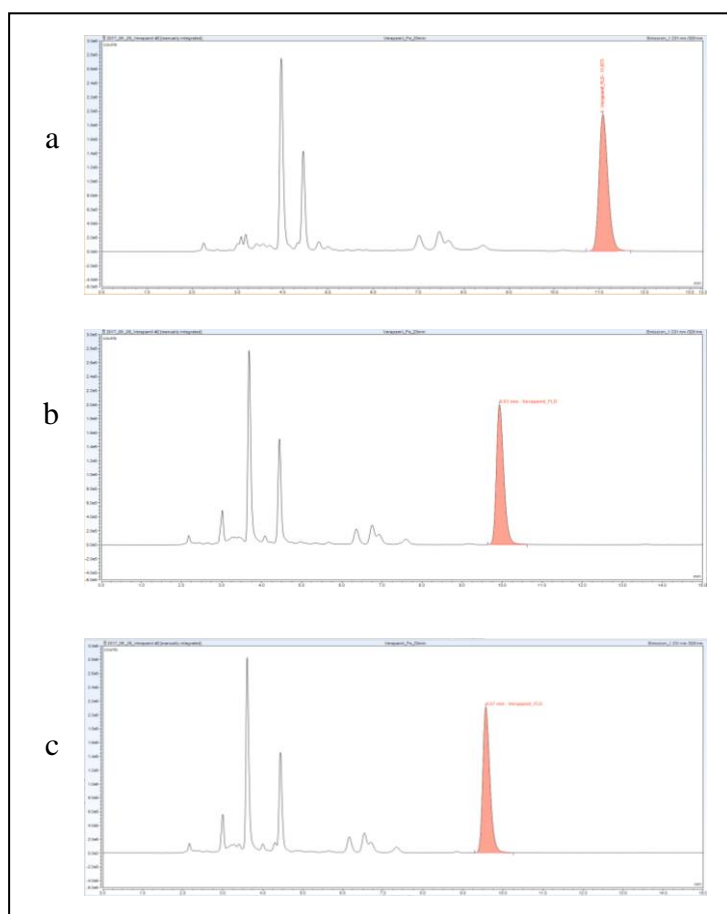
Před započítím testu chronické toxicity byla testována stabilita roztoku verapamilu i roztoku po fotochemické degradaci.

Koncentrace verapamilu v jeho zásobním roztoku poklesla za 28 dní testování na 92 % původní hodnoty, koncentrace verapamilu v ozářené směsi se snížila o cca 4 % (Tab. V).

**Tab. V:** Koncentrace ozářeného a neozářeného verapamilu u jednotlivých kontrol stability.

Čas (dny od ozáření)	Koncentrace verapamilu (%)	
	Verapamil neozář.	Verapamil ozář. 20 minut
0	100	100
12	91	96
28	92	98

U ozářené směsi nedocházelo ke změnám v koncentraci produktů (Obr. 5).



**Obr. 5:** Chromatogramy vzorků ozářeného verapamilu ze tří dat měření stability: a – v den ozáření, b – 12 dnů po ozáření, c – 28 dnů po ozáření.

V chronickém testu toxicity při teplotě média 19,7 °C bylo pozorováno, že se hrotnatky začaly rozmnožovat v desátém dni pokusu. Pět jedinců uhynulo (následkem manipulace při výměnách média) před koncem pokusu, tito jedinci byli vyřazeni z měření parametrů pro statistické vyhodnocení.

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky sledovaných parametrů v jednotlivých typech média jsou shrnuty v Tab. VI. Veškerá data naměřených parametrů obsahuje Příloha 1.

**Tab. VI:** Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky sledovaných parametrů sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci pokusu.

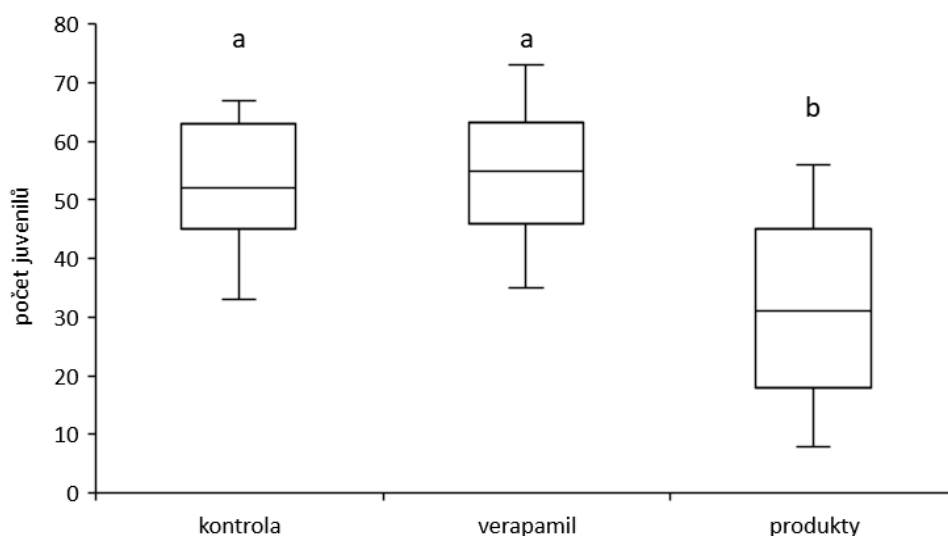
typ média (N)	celkem juvenilů	počet snůšek	velikost na konci pokusu (μm)
kontrola (13)	52,5 ± 10,6	3,8 ± 0,6	3503,9 ± 429,7
verapamil (14)	54,1 ± 10,4	3,6 ± 0,6	3510,7 ± 308,5
produkty (13)	32,1 ± 15,2	3,3 ± 1	2932,7 ± 541,7

N= počet opakování

**Tab. VII:** Výsledky Kruskal-Wallisova testu porovnávacího sledované parametry hrotnatek v kontrole, roztoku verapamilu a produktů jeho fotodegradace.

Význam zkratk: H – testové kritérium, d.f. – počet stupňů volnosti, P – pravděpodobnost. Porovnání mezi jednotlivými zásahy je znázorněno pomocí indexů u Obr. 6 – 8.

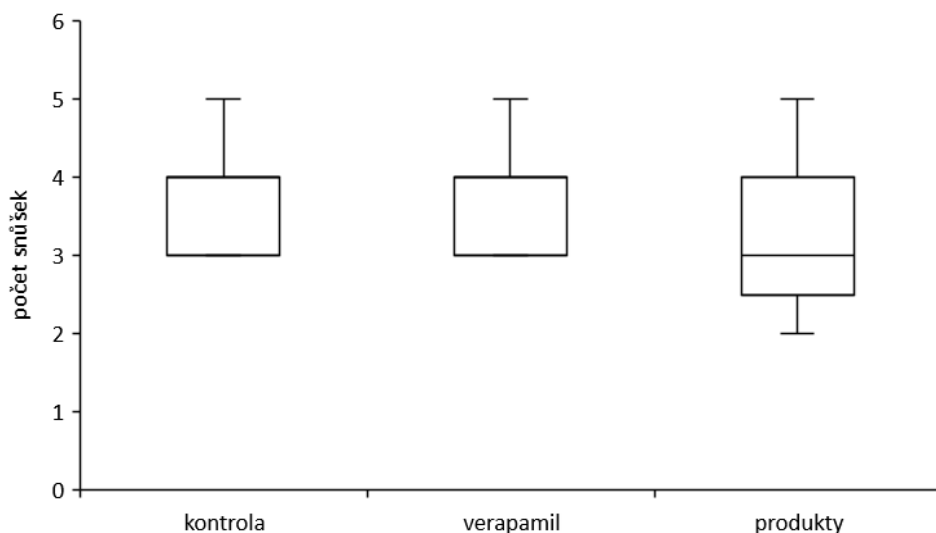
parametr	H	d.f.	P
počet juvenilů	13,1	2	0,001
počet snůšek	2,31	2	0,32
velikost těla	7,59	2	0,02



**Obr. 6:** Počet juvenilů během vystavení hrotnatek třem odlišným typům média po dobu 21 dní. Data udávají medián (svislá čára), horní a dolní kvartil (horní a dolní hranice boxu) a rozsah hodnot (minimum a maximum). Indexy značí průkazné rozdíly mezi skupinami: zkoumaná média označená stejnými indexy nejsou průkazně odlišná na hladině  $P < 0,05$ .

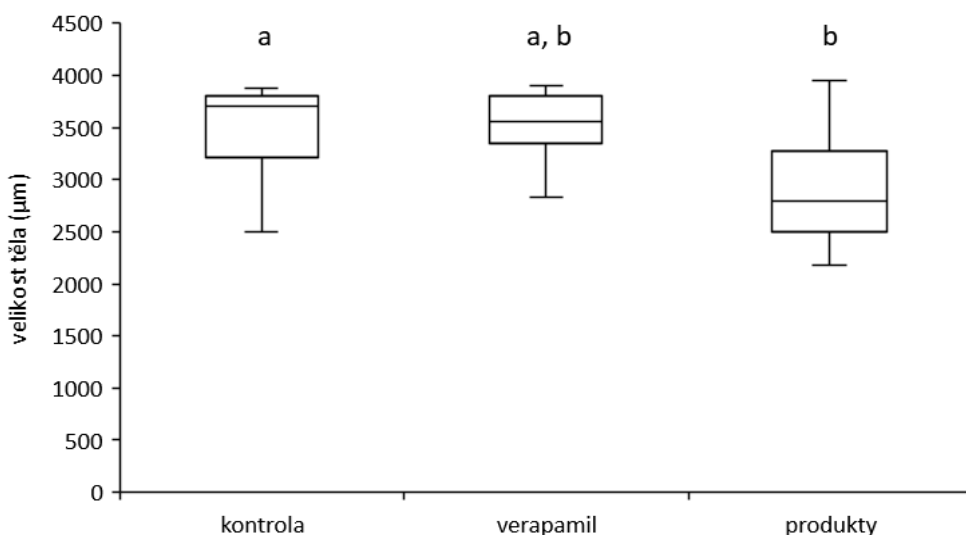
Obecně byly zaznamenány výrazně nižší hodnoty sledovaných parametrů u hrotnatek při vystavení produktům fotodegradace. Hrotnatky vystavené směsi produktů fotodegradace verapamilu vykazovaly nižší počet juvenilů (průměrný počet 32) ve srovnání se samicemi v kontrole (průměrný počet 52,5) i samicemi vystavených působení samotného verapamilu (průměrný počet 54; Obr. 6). V porovnání s kontrolou či samotným roztokem verapamilu se v této směsi rodilo signifikantně méně jedinců.





**Obr. 7:** Porovnání počtu snůšek hrotnatek v kontrolních nádobách a s expozicí v roztoku verapamilu a produktů jeho fotodegradace. Data udávají medián (svislá čára), horní a dolní kvartil (horní a dolní hranice boxu) a rozsah hodnot (minimum a maximum).

Ačkoli vykazuje hodnota spodního kvartilu u produktů fotodegradace nižší hodnoty ve srovnání s kontrolou a verapamilem tak rozdíl není průkazný (Obr. 7).



**Obr. 8:** Velikost těla změřená na konci pokusu u jednotlivých jedinců v kontrole, roztoku verapamilu a směsi produktů fotodegradace. Data udávají medián (svislá čára), horní a dolní kvartil (horní a dolní hranice boxu) a rozsah hodnot (minimum a maximum). Indexy značí průkazné rozdíly mezi skupinami: zkoumaná média označená odlišnými indexy jsou průkazně odlišná na hladině  $P < 0,05$ . Médium označené dvěma stejnými indexy, se neliší ani od jednoho z nich.

Hrotnatky, které byly inkubovány ve směsi produktů fotodegradace verapamilu, vykazovaly výrazně menší velikost těla (průměrná velikost 2933  $\mu\text{m}$ ) v porovnání s kontrolou (průměrná velikost 3504  $\mu\text{m}$ ) a roztokem verapamilu (průměrná velikost 3511  $\mu\text{m}$ ). I když rozptyl minimální a maximální hodnoty je blízký kontrole, spodní i horní kvartil jsou výrazně níže, stejně jako medián (Obr. 8).

Signifikantní rozdíl mezi třemi zásahy byl nejvíce viditelný u směsi produktů fotodegradace. Tento typ média výrazně ovlivnil každou samici v celkovém počtu juvenilů a ve velikosti těla změřené na konci pokusu. Samotný roztok verapamilu výrazný efekt neměl, hodnoty u měřených parametrů byly hodně podobné jako u kontroly.

## 4 Diskuze

V práci Klementové et al. (2017) bylo potvrzeno, že verapamil může za podmínek odpovídajících parametrům v přírodních vodách podléhat v přítomnosti iontů železa fotokatalyzované degradaci.

Jak potvrdily studie pro metabolity pesticidů, mohou degradační produkty vykazovat nescifickou toxicitu vyšší než původní mateřská molekula. Ve studii metabolitů herbicidu diuronu v testu Microtox® (Tixier et al., 2000) bylo prokázáno, že degradační produkty vykazují vyšší nescifickou toxicitu (ovlivňující i jiné organismy než původní cílové organismy), v tomto případě organismus *Vibrio fischeri*. Podobně v následné studii (Tixier et al., 2002) bylo dokázáno, že transformační produkty i dalších herbicidů na bázi fenylničoviny (diuron, chlorotoluron, isoproturon) vzniklé činností půdních bakterií *Arthrobacter* sp. N2 vykazují až 600krát vyšší nescifickou toxicitu vůči *Vibrio fischeri* v testu Microtox®.

Podobné závěry byly učiněny také v práci Keltnerové (2016), kde jeden z metabolitů herbicidu atrazinu, desethylatrazin, který byl též nalezen ve směsi fotochemicky vzniklých degradačních produktů daného herbicidu, má výrazné toxické účinky na okřehek (*Lemna minor*).

Proto se jevílo užitečné soustředit se v testu toxicity verapamilu nejen na verapamil samotný, pro nějž existují údaje o toxikologických parametrech (Villegas-Navarro et al., 2003; Nałęcz-Jawecki & Persoone, 2006; Li et al., 2010; Le et al., 2011; Overturf et al., 2012; Steinbach et al., 2013; Minguez et al., 2016; Ajima et al., 2017a; Ajima et al., 2017b) ale též na produkty fotochemické degradace tohoto farmaka.

Výsledky analýzy složení směsi po fotodegradaci v této studii metodou HPLC ukazovaly, že docházelo k malému rozkladu ve směsi produktů, proto bylo nutné připravit vždy novou reakční směs pro každou výměnu média. Vyloučily se tak případné rušivé vlivy způsobené vznikem nových produktů.

Jednotlivé chromatogramy ze tří kontrol stabilit ukazovaly, že byl pík verapamilu po ozáření asi osmkrát nižší než na počátku. Píky produktů po ozáření byly srovnatelné s velikostí píku verapamilu (v součtu). Pro test toxicity byla proto dávkována osmkrát vyšší koncentrace ozářené směsi než čistého verapamilu, aby bylo dosaženo podobné koncentrace ozářených vzorků jako výchozí koncentrace verapamilu.

Výsledky chronického testu toxicity verapamilu na hrotnatce *Daphnia magna* prezentované v této práci prokázaly, že reakční směs obsahující produkty fotokatalyzované degradace má výrazně negativní vliv na reprodukční schopnost a růst hrotnatek.

U testů toxicity na živých organismech jsou výsledky vždy ovlivněny například tím, jak jsou testované organismy vystaveny například stresu různého charakteru. U provedeného testu byly všechny zjišťované parametry během testu ovlivněny stresem způsobeným změnou prostředí (změnou látky v roztoku).

V testech toxicity se posuzuje, zda je ovlivněna tzv. fitness daného organismu. V biologickém slova smyslu se termínem fitness označuje schopnost organismu, případně populace či druhu, přežít a reprodukovat se v prostředí, v němž se nachází (Orr, 2009). Důsledkem přežití a rozmnožení je přenesení genů (alel) do další generace.

Fitness hrotnatek odráží v provedeném experimentu nejlépe celkový počet juvenilů v odlišných prostředích použitých v pokusu. Počítání jednotlivých vajíček hrotnatek se u testů toxicity neprovádí, protože tento metodický přístup má za následek konec samice v pokusu. Lepší postup tvoří vyhodnocení samotného vylíhnutí jedinců, které zpětně odpovídá počtu vajíček/embryí.

V případě provedeného testu bylo prokázáno, že počet juvenilů byl výrazně nižší v prostředí s produkty fotodegradace verapamilu ve srovnání s kontrolou a samotným verapamilem.

Studie Eichelbaum et al. (1979) a Reder-Hilz et al. (2004) zabývající se produkty metabolismu v lidském těle identifikovaly řadu produktů, v obou studiích bylo shodných osm produktů metabolismu. Některé z těchto produktů byly identifikovány při anaerobní biodegradaci verapamilu (Trautwein et al., 2008) či při degradaci AOP technikami např. oxidací ozónem a kyslíkovými radikály (Krishna et al., 2016) vznikajícími při netermickém plasmatickém vývoji nebo při katalytické fotodegradaci verapamilu (Klementova et al., 2017).

Produkty katalytické fotodegradace verapamilu v homogenní fázi v přítomnosti Fe(III) a v heterogenní fázi na TiO<sub>2</sub> se ukázaly být shodné (Dušáková, 2017) s produkty oxidace ve studii Krishna et al. (2016) dle hodnot m/z z HPLC-MS analýzy.

Zjištění, který/které z produktů fotochemické degradace verapamilu je zodpovědný za toxické účinky reakční směsi na hrotnatky, by jistě bylo velmi záslužné, ale k takovému výsledku by bylo potřeba nejprve spolehlivě identifikovat všechny vznikající produkty a následně získat standardy jednotlivých produktů a s nimi pak jednotlivě provést sérii dlouhodobých testů toxicity.

## 5 Závěr

Verapamil samotný se v chronickém testu toxicity s hrotnatkou *Daphnia magna* neprojevil jako toxický v koncentracích  $9,98 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $9,78 \cdot 10^{-5}$  mol/l při testu trvajícím 21 dní.

Produkty fotochemické degradace verapamilu vykazovaly signifikantní snížení počtu juvenilů, což je nejspolehlivější měřítko fitness organismu. Vliv produktů fotodegradace byl výrazný i u velikosti těla změřené na konci pokusu. U počtu snůšek bylo také zjevné snížení hodnot, ale z důvodu většího rozptylu minimálních a maximálních hodnot nebyl rozdíl mezi jednotlivými médii průkazný.

Test chronické toxicity ukázal, že minimálně jeden z produktů vznikající fotochemickým odbouráním verapamilu za podmínek, které jsou relevantní přírodním vodám, je toxický. Z výsledků zatím získaných nelze prokázat, zda případně nejde o synergický efekt více látek samostatně vykazujících nižší toxicitu.

## 6 Seznam použité literatury

- Ajima, M. N. O., Pandey, P. K., Kumar, K., & Poojary, N. (2017a). Assessment of mutagenic, hematological and oxidative stress biomarkers in liver of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sublethal verapamil exposure. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(3), 286–294. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1219914>
- Ajima, M. N. O., Pandey, P. K., Kumar, K., & Poojary, N. (2017b). Neurotoxic effects, molecular responses and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to verapamil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 196, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.03.009>
- Andreozzi, R., Marotta, R., & Paxéus, N. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319–1330. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5)
- Batt, A. L., Kostich, M. S., & Lazorchak, J. M. (2008). Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 80(13), 5021–5030. <https://doi.org/10.1021/ac800066n>
- Berkner, S., & Thierbach, C. (2014). Biodegradability and transformation of human pharmaceutical active ingredients in environmentally relevant test systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(16), 9461–9467. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1868-6>
- Bruce, G. M., Pleus, R. C., & Snyder, S. A. (2010). Toxicological relevance of pharmaceuticals in drinking water. *Environmental Science and Technology*, 44(14), 5619–5626. <https://doi.org/10.1021/es1004895>
- Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 287–304. <https://doi.org/10.3109/10408440903373590>
- Deo, R. P., & Halden, R. U. (2013). Pharmaceuticals in the built and natural water environment of the United States. *Water (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/w5031346>
- Dušáková, M., 2017: Fotochemická degradace verapamilu v homogenní a v heterogenní fotokatalytické reakci. [Photochemical degradation of verapamil in homogeneous and

- heterogeneous photocatalytic reaction. Mgr. Thesis, in Czech.] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Eichelbaum, M., Ende, M., & Remberg, G. (1979). The metabolism of DL-[<sup>14</sup>C]verapamil in man. *Drug Metabolism and Disposition*, 7(3).
- Escher, B. I., & Fenner, K. (2011). Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environmental Science & Technology*, 45, 3835–3847. <https://doi.org/10.1021/es1030799>
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I., & Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.082>
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M., & Larsson, D. G. J. (2010). Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58(3), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.025>
- Godoy, A. A., Kummrow, F., & Pamplin, P. A. Z. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., & Grabic, R. (2014). Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), 7578–7585. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2654-9>
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36(1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>
- Gu, Q., Burt, V. L., Dillon, C. F., & Yoon, S. (2012). Trends in antihypertensive medication use and blood pressure control among united states adults with hypertension: The national health and nutrition examination survey, 2001 to 2010. *Circulation*, 126(17), 2105–2114. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.096156>
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., & Larsson, D. G. J. (2008).

- Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5807–5813. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131, 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Hynie, S. (2001). *Farmakologie v kostce* (2., přeprac.). V Praze: Triton.
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI).  
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do>
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., & Fent, K. (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.11.021>
- Jones, O. a, Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2001). Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environmental Technology*, 22(12), 1383–1394. <https://doi.org/10.1080/09593332208618186>
- Keltnerová, L., 2016: Degradation of atrazine by homogeneous photocatalysis using Fe(III)/UV/air system and evaluation of potential toxicity of atrazine and its metabolites. Mgr. Thesis, in English. – 33 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Kern, S., Baumgartner, R., Helbling, D. E., Hollender, J., Singer, H., Loos, M. J., ... Fenner, K. (2010). A tiered procedure for assessing the formation of biotransformation products of pharmaceuticals and biocides during activated sludge treatment. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(11), 2100. <https://doi.org/10.1039/c0em00238k>
- Khan, S. J., & Ongerth, J. E. (2004). Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere*, 54(3), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.07.001>
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., & Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017>
- Klabunde, R. E. (2012). Cardiovascular Physiology Concepts (2nd Ed.). *Lippincott Williams & Wilkins*, 256. <https://doi.org/citeulike-article-id:2086320>
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment*



- International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.009>
- Klementova, S. (2012). A Critical View of the Photoinitiated Degradation of Herbicides. In *Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds*. InTech.
- Klementova, S., Kahoun, D., Doubkova, L., Frejlichova, K., Dusakova, M., & Zlamal, M. (2017). Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, *16*(1), 67–71. <https://doi.org/10.1039/C6PP00164E>
- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., & Vaněk, T. (2009). Léčiva–,nový “environmentální polutant. *Chemické Listy*, *103*, 540–547.
- Krishna, S., Maslani, A., Izdebski, T., Horakova, M., Klementova, S., & Spatenka, P. (2016). Degradation of Verapamil hydrochloride in water by gliding arc discharge. *Chemosphere*, *152*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.083>
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, *148*(3), 751–755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008>
- Le, T. H., Lim, E. S., Lee, S. K., Park, J. S., Kim, Y. H., & Min, J. (2011). Toxicity evaluation of verapamil and tramadol based on toxicity assay and expression patterns of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, *26*(5), 515–523. <https://doi.org/10.1002/tox.20665>
- Li, Z.-H., Li, P., & Randak, T. (2010). Ecotoxicological effects of short-term exposure to a human pharmaceutical Verapamil in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *152*(3), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.06.007>
- Lindberg, R. H., Björklund, K., Rendahl, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., & Andersson, B. A. V. (2007). Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Research*, *41*(3), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.014>
- Linhart, I. (2012). *Toxikologie* (Vyd. 1.). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Liu, H., Fox, C. J., Zhang, S., & Kaye, A. D. (2010). Cardiovascular pharmacology: An update. *Anesthesiology Clinics*. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2010.09.001>
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (2007). *Barevný atlas farmakologie* (Vyd. 3., ě). Praha: Grada.
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Wehling, M. (2004). *Farmakologie a toxikologie* (Vyd. 1. ěe).

Praha: Grada.

- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., & Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>
- Marin-Morales, M. A., Campos-Pereira, F. D., Navarro, F. F., & de Oliveira, J. A. (2016). Eco-toxicological Impact of Pharmaceuticals for Human Use in Aquatic Systems. In *Aquatic Toxicology* (pp. 1–20). Retrieved from [www.esciencecentral.org/ebooks](http://www.esciencecentral.org/ebooks)
- Martínková, J. (2007). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů* (1. vyd.). Praha: Grada.
- Massarsky, A., Trudeau, V. L., & Moon, T. W. (2011).  $\beta$ -blockers as endocrine disruptors: The potential effects of human  $\beta$ -blockers on aquatic organisms. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jez.672>
- Maszkowska, J., Stolte, S., Kumirska, J., Łukaszewicz, P., Mioduszevska, K., Puckowski, A., ... Białk-Bielin'ska, A. (2014). Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Science of the Total Environment*, 493, 1122–1126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.039>
- Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C., & Alder, a C. (2007). Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Research*, 41(7), 1614–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.004>
- Michael, I., Vasquez, M. I., Hapeshi, E., Haddad, T., Baginska, E., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Metabolites and Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment as Contaminants of Emerging Concern. In *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks* (pp. 413–458). <https://doi.org/10.1002/9781118339558.ch14>
- Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., & Halm-Lemeille, M. P. (2016). Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 4992–5001. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3662-5>
- Nałęcz-Jawecki, G., & Persoone, G. (2006). Toxicity of selected pharmaceuticals to the anostracan crustacean *Thamnocephalus platyurus*: Comparison of sublethal and lethal effect levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit microbiotests. *Environmental Science and Pollution Research*, 13(1), 22–27.

- <https://doi.org/10.1065/espr2006.01.005>
- Narvaez, J. F. N., & Jimenez, C. C. (2012). Pharmaceutical Products in the Environment : Sources , Effects and Risks. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 19, 93–108.
- OECD. (2004). OECD guidelines for the testing of Chemicals. *Test*, (October), 1–21. <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>
- Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2603>
- Overturf, M. D., Overturf, C. L., Baxter, D., Hala, D. N., Constantine, L., Venables, B., & Huggett, D. B. (2012). Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the fathead minnow, *pimephales promelas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(3), 455–464. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9723-6>
- Owen, S. F., Giltrow, E., Huggett, D. B., Hutchinson, T. H., Saye, J. A., Winter, M. J., & Sumpter, J. P. (2007). Comparative physiology, pharmacology and toxicology of  $\beta$ -blockers: Mammals versus fish. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.007>
- Reder-Hilz, B., Ullrich, M., Ringel, M., Hewitt, N., Utesch, D., Oesch, F., & Hengstler, J. G. (2004). Metabolism of propafenone and verapamil by cryopreserved human, rat, mouse and dog hepatocytes: Comparison with metabolism in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(4), 408–417. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0875-z>
- Saari, G. N., Scott, W. C., & Brooks, B. W. (2017). Global scanning assessment of calcium channel blockers in the environment: Review and analysis of occurrence, ecotoxicology and hazards in aquatic systems. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.058>
- Statistica, D. (2015). Dell Statistica data analysis software system, version 13. Dell Inc.
- Steinbach, C., Burkina, V., Schmidt-Posthaus, H., Stara, A., Kolarova, J., Velisek, J., ... Kroupova, H. K. (2016). Effect of the human therapeutic drug diltiazem on the haematological parameters, histology and selected enzymatic activities of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 157, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.137>
- Steinbach, C., Fedorova, G., Prokes, M., Grabicova, K., Machova, J., Grabic, R., ... Kroupova, H. K. (2013). Toxic effects, bioconcentration and depuration of verapamil in the early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Science of the Total*

- Environment*, 461–462, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.002>
- Steinbach, C., Grabic, R., Fedorova, G., Koba, O., Golovko, O., Grabicova, K., & Kroupova, H. K. (2016). Bioconcentration, metabolism and half-life time of the human therapeutic drug diltiazem in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 144, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.038>
- Svobodová, Z. (2007). *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb* (4., přeprac.). Praha: Informatorium.
- Tixier, C., Bogaerts, P., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Twagilimana, L., Cuer, A., ... Veschambre, H. (2000). Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: Structure and toxicity of metabolites. *Pest Management Science*, 56(5), 455–462. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200005\)56:5<455::AID-PS152>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200005)56:5<455::AID-PS152>3.0.CO;2-Z)
- Tixier, C., Sancelme, M., Aït-Aïssa, S., Widehem, P., Bonnemoy, F., Cuer, A., ... Veschambre, H. (2002). Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: Structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*, 46(4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00193-X)
- Trautwein, C., Kümmerer, K., & Metzger, J. W. (2008). Aerobic biodegradability of the calcium channel antagonist verapamil and identification of a microbial dead-end transformation product studied by LC-MS/MS. *Chemosphere*, 72(3), 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.022>
- Vasquez, M. I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.069>
- Villegas-Navarro, A., Rosas-L, E., & Reyes, J. L. (2003). The heart of *Daphnia magna*: Effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 136(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00172-8)
- Vítovec, J., & Špinar, J. (2000). *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění* (1. vyd.). Praha: Grada Publishing.
- Wilde, M. L., Kümmerer, K., & Martins, A. F. (2012). Multivariate optimization of analytical methodology and a first attempt to an environmental risk assessment of  $\beta$ -blockers in hospital wastewater. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(9), 1732–1740. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000035>

- Winker, M., Tettenborn, F., Faika, D., Gulyas, H., & Otterpohl, R. (2008). Comparison of analytical and theoretical pharmaceutical concentrations in human urine in Germany. *Water Research*, 42(14), 3633–3640. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.002>
- Wolfe, D., Schorr, M., Hanson, M., Nelson, C. H., & Richards, S. M. (2015). Hazard assessment for a pharmaceutical mixture detected in the upper Tennessee River using *Daphnia magna*. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 1(1), 1–14.

## 7 Přílohy

Příloha 1: Hodnoty měřených parametrů sečtené z jednotlivých kontrolních dnů a z měření na konci pokusu.

<b>zásah</b>	<b>celkem juvenilů</b>	<b>počet snůšek</b>	<b>velikost na konci pokusu (μm)</b>
kontrola	67	4	3750
kontrola	37	3	3425
kontrola	43	4	2800
kontrola	47	4	3675
kontrola	52	4	3800
kontrola	50	3	2500
kontrola	56	5	3850
kontrola	48	3	3625
kontrola	60	4	3700
kontrola	66	4	3875
kontrola	57	4	3750
kontrola	33	3	3000
kontrola	67	4	3800
verapamil	55	4	3550
verapamil	57	4	3850
verapamil	51	3	3575
verapamil	48	4	3900
verapamil	40	3	2825
verapamil	40	3	3800
verapamil	35	3	3000
verapamil	51	3	3525
verapamil	64	4	3400
verapamil	62	4	3175
verapamil	55	3	3600
verapamil	73	4	3500
verapamil	64	5	3825
verapamil	63	4	3625
produkty	48	4	3050
produkty	23	3	2725
produkty	31	3	2800
produkty	38	3	3250
produkty	15	2	2375
produkty	55	5	3950
produkty	24	3	2500
produkty	20	3	2500
produkty	56	4	3950
produkty	8	2	2175
produkty	16	2	2525
produkty	42	5	3025
produkty	41	4	3300