

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

**TOXIKOLOGICKÝ SCREENING POMOCÍ NIŽŠÍCH ORGANISMŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: mgr. Jitka Vytlačilová

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2006

Michaela Lébllová

Prohlašuji:

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci použila jsou uvedeny v seznamu použité literatury.



Michaela Leblová

Děkuji mgr. Jitce Vytlačilové za cenné rady, připomínky a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce.

Michaela Lébllová

<b>1. ÚVOD</b>	6
1.1. Cíl práce	8
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	9
2.1. Hodnocení toxicity chemických látek	10
2.1.1. Testy <i>in vivo</i>	12
2.1.1.1. Využití laboratorních zvířat	12
2.1.1.2. Využití raných vývojových stádií obratlovců	14
2.1.2. Alternativní metody testování	15
2.1.2.1. Metody <i>in vitro</i>	16
2.1.2.1.1. Buněčné kultury	17
2.1.2.1.2. Tkáňové kultury	18
2.1.2.1.3. Nižší organismy	19
2.1.2.1.3.1. <i>Bakterie</i>	19
2.1.2.1.3.2. <i>Bezobratlí</i>	20
2.1.3. Metody <i>in silico</i> - odhady toxicity chemických látek výpočtem	23
2.1.3.1. Modely (Q)SAR	24
2.2. Testovaný organismus <i>Artemia salina</i> , L.	25
2.2.1. Taxonomické zařazení	25
2.2.2. Anatomie a morfologie	26
2.2.3. Vývojová stádia	32
2.2.4. Celosvětové rozšíření	34
2.3. Testované chemické látky	36
2.3.1. Anthranilanilidy	36
2.3.2. 3-Aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony	38
2.3.3. 3-Aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thiony	39
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	40
3.1. Metodika testování látek pomocí <i>Artemia salina</i> , L.	41
3.1.1. Vlastí provedení	41
3.1.2. Vyhodnocení	42

3.2. Testovaný organismus	43
3.2.1. Skladování cyst	43
3.2.2. Líhnutí vajíček	43
3.3. Chemikálie, pomůcky a zařízení	44
3.3.1. Použité chemické látky	44
3.3.2. Pomůcky a přístroje	45
3.4. Příprava a provedení experimentu	46
3.4.1. Příprava mořské vody	46
3.4.2. Příprava testovacího organismu <i>Artemia salina</i> , L.	46
3.4.3. Příprava testovaných látek	47
3.4.4. Vlastní provedení pokusu	47
3.4.5. Vyhodnocení výsledků	48
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>49</b>
4.1. RAM 108	51
4.2. RAM 109	54
4.3. RAM 110	55
4.4. RAM 111	58
4.5. RAM 112	61
4.6. RAM 113	62
4.7. RAM 212	63
4.8. $MnCl_2$	66
<b>5. DISKUZE</b>	<b>67</b>
<b>6. ZÁVĚR</b>	<b>77</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>80</b>

# **1.**

# **ÚVOD**

V posledních několika desetiletích se z toxikologie začalo stávat dynamicky se rozvíjející odvětví vědy, které se zabývá m.j. účinky chemikálií na objekty testování v pokusech *in vivo*, popř. *in vitro*. Objekty testování jsou v tomto případě chápány jako testované organismy, izolované orgány, tkáně, buněčné linie a buňky (Tichý, M., 2003).

Vycházíme-li z hlavního cíle moderní toxikologie, tzn. zjistit nežádoucí a škodlivé vlastnosti chemických sloučenin a jejich směsí a předejít tak jejich škodlivým dopadům na člověka a životní prostředí, musíme před zavedením jakékoli chemické látky pro širší použití ověřit její biologickou účinnost jednou z dostupných testovacích metod. Studie prováděné *in vivo* mohou zhruba odhadnout neúčinnou dávku, ve které daná látka nebude mít žádný efekt. Nikdy ale nebudeme mít absolutní jistotu, že látka, kterou jsme takto otestovaly, bude pro člověka stejně neškodná, jako pro testovaný organismus. Je ale také pravdou, že v dnešní době již máme k dispozici mnohé techniky a testy, které nám umožní toto riziko snížit, ne-li úplně ho eliminovat. Při výběru testovací metody vycházíme ze znalosti chemické struktury, fyzikálních a chemických vlastností testované látky, zamýšleného způsobu použití dané látky, doby expozice a také z již známých vlastností strukturně podobných sloučenin (Kupec, J., 2004).

Toxicita chemických látek je hodnocena podle toho jakým způsobem účinkuje (kvalitativní hodnocení) a podle rozsahu daného účinku (velikosti) (kvantitativní hodnocení). Ke kvantitativnímu hodnocení se využívá měření závislosti míry účinku na dávce látky. Z grafického vyjádření této závislosti potom můžeme stanovit toxické indexy, např. LC50 (střední smrtící koncentrace, která určuje množství látky, která usmrtila 50% testovaných objektů (Tichý, M., 2003).

K testům toxicity můžeme přistupovat jako k prostředkům, které nám v rámci prvotního screeningu pomáhají rozeznat biologicky aktivní látky. Pro účel pre-screeningu nemusí být testy vysoce specifické, postačí, když prokáží, že je daná sloučenina toxická, popř. se projevuje jiným účinkem na živé organismy. Pro screening potenciálně toxických látek stejně tak jako pro stanovení akutní toxicity byla vyvinuta řada alternativních metod, které jsou v současné době široce používány, ale žádný z těchto testů ještě plně nenahradil testy, při kterých je potřeba využít laboratorní zvířata.

## 1.1. Cíl práce

Předkládaná diplomová práce je výsledkem spolupráce katedry farmaceutické botaniky a ekologie s katedrou anorganické a organické chemie. Cílem práce bylo provést toxikologický screening sedmi vybraných anthranylových salicylanilidů pomocí bezobratlého organismu *Artemia salina*, L. a zároveň ověřit vhodnost testovaného organismu v rámci rychlého prescreeningového hodnocení akutní toxicity. Kvalifikační práce je součástí výzkumu a vývoje metod zahrnujících testování biologické aktivity s upřednostněním *in vivo* testů na nižších bezobratlých organismech toxikologické skupiny katedry farmaceutické botaniky a ekologie.



**2.**

# **TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. *Hodnocení toxicity chemických látek*

V České republice je uvádění chemických látek a přípravků na trh regulováno zákonem č. 356/2003 Sb., o chemických přípravcích a o změně některých zákonů, ve znění zákona č. 186/2004Sb. Tento zákon upravuje práva a povinnosti osob mj. při zkoušení nebezpečných vlastností látek. Zákon se nevztahuje na léčiva, krmiva, potraviny a tabákové výrobky, kosmetické prostředky, jaderné materiály, omamné a psychotropní látky, zdravotnické prostředky, hnojiva, pomocné půdní látky, pomocné rostlinné přípravky a substráty, nerostné suroviny, veterinární přípravky s výjimkou dezinfekčních, desinsekčních a deratizačních přípravků v podobě určené ke konečnému použití, nestanoví-li zvláštní předpisy jinak.

Látky, které mají jednu nebo více nebezpečných vlastností, popsanych v daném zákoně pod body a)-o), mohou být zkoušeny pouze předepsanými metodami stanovenými vyhláškou č. 389/2005 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí, a vyhláškou č. 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků, a to pouze při dodržování zásad správné laboratorní praxe podle vyhlášky č. 279/2005 Sb., o zásadách správné laboratorní praxe.

Zkoušení nebezpečných vlastností podle písmene f) až o), při němž jsou používána laboratorní zvířata, může být provedeno pouze tehdy, nelze-li k jejich zjištění použít jiných postupů (Bittnerová, D., 2005).

Zákon č. 77/2006 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, uvádí, že zvířata jsou stejně jako člověk živými tvory schopnými na různém stupni pociťovat bolest a utrpení, a zasluhují si proto pozornost, péči a ochranu ze strany člověka. Zvířetem je ve smyslu tohoto zákona obratlovec kromě člověka, nikoliv však plody (féty) nebo embrya. Na tato zvířata se dále vztahují přísná kritéria týkající se zacházení s nimi (tzn. chov, jakákoli manipulace...), která vyplývají z tohoto zákona.

Tento právní předpis ve své třetí části říká, že pokusy na zvířatech mohou být povoleny pouze po ověření, že při současném stavu nelze zjistit poznatky nebo jejich využití jinými metodami nebo postupem, a to je-li předpokládána bolest, utrpení nebo poškození pokusných zvířat s ohledem na cíl pokusů eticky opodstatněna ([www.mvcr.cz/sbirka/2006](http://www.mvcr.cz/sbirka/2006)).

Vyhláška 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků, popisuje metody pro zkoušení nebezpečných

vlastností chemických látek a chemických přípravků, které jsou klasifikovány jako vysoce toxické, toxické, zdraví škodlivé, žíravé, dráždivé, senzibilizující, karcinogenní, mutagenní, nebo toxické pro reprodukci.

Součástí vyhlášky je i požadavek na provádění alternativních testovacích metod, jsou-li tyto metody dostupné.

„ Je nutno neustále vyvíjet a ověřovat alternativní metody, které mohou poskytovat stejnou úroveň informací jako současné testy na zvířatech a budou při tom využívat menšího počtu zvířat, způsobí méně utrpení nebo se úplně obejdou bez používání zvířat.

V souladu s příslušnými právními předpisy, které upravují ochranu zvířat, je nutno neustále ověřovat v registrech mezinárodně ověřených a uznaných alternativních metod, zda k plánovanému pokusu existuje alternativní metoda, při které nemusí být použito zvíře.

Pokud budou takové alternativní metody k dispozici musí být jejich použití pro charakterizaci rizika, následnou klasifikaci a označování látky podle nebezpečnosti bráno v úvahu všude tam, kde je to možné.

Při hodnocení a interpretaci pokusů na zvířatech a testů *in vitro* je nutno mít na zřeteli, že přímá extrapolace na člověka je možná pouze v omezené míře.

Výsledky testování mohou být použity pro klasifikaci a označování nových i existujících látek podle účinků na zdraví člověka na základě vlastností zjištěných a kvantifikovaných těmito metodami. Tyto výsledky mohou být dále použity pro studie zaměřené na posuzování rizika nových i existujících látek.“ ([www.mvcr.cz/sbirka/2004](http://www.mvcr.cz/sbirka/2004))

Na sklonku loňského roku byla schválena koncepce nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami, tzv. **REACH** systém (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*). Vznik této právní normy se jevil jako nezbytnost, hlavně poté, co bylo zjištěno, že společnost má k dispozici dostatečné informace o nebezpečných vlastnostech pouze u 10% používaných látek. Tento fakt vyplývá z toho, že v EU platilo od roku 1981 rozdělení chemických látek na „nové“ a „existující“, které byly do roku 1981 řádně zaregistrovány a u nichž nebyly požadovány zkoušky na neškodnost. **REACH** stírá hranice mezi těmito látkami a nařizuje novou registraci pro stávající i nové látky. Jako součást podkladů pro registraci je požadován soubor informací o látce, o jejím bezpečném používání a odstraňování, a zpráva o její chemické bezpečnosti při všech očekávaných způsobech jejího použití (Bláha, K., 2005). Aby se zamezilo zkouškám na zvířatech, provádějí se zkoušky na obratlovcích pro účely tohoto nařízení pouze jako poslední

možnost. Je rovněž nutné přijmout opatření, kterými se omezí zdvojování jiných zkoušek (www.mpo.cz).

Všechna legislativní opatření vedou tedy k nalezení nových vhodných metod pro testování nežádoucích účinků na biologické systémy, a také k redukci počtu zvířat používaných pro testování chemických sloučenin.

Podle Evropského centra pro Validaci Alternativních Metod Spojených Výzkumných Center Evropské Komise (ECVAM JRC EC) je alternativní metodou jakákoli metoda, která pomůže zredukovat, vylepšit nebo nahradit používání pokusů na zvířatech ve výzkumu, testování nebo výuce tím, že podává informace stejné úrovně jako informace získané se zvířaty (Tichý, M., 2005). Tato definice je založena na koncepci 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*), kterou definovali v roce 1959 Russel a Burce.

Mezi alternativní metody jsou v dnešní době nejčastěji řazeny testy *in vitro* (tzn. testy prováděné na tkáních, tkáňových řezech a buňkách), testy, které pro stanovení využívají organismy, které nepodléhají regulaci ve smyslu zákona na ochranu zvířat, tzn. nižší organismy a časná vývojová stádia obratlovců, a metody využívající matematické modelování (Tichý, M., 2005).

### **2.1.1. Testy *in vivo***

#### **2.1.1.1. Využití laboratorních zvířat**

Dříve než je povoleno použít nově zavedenou látku v širším měřítku, je třeba ověřit na testovaném organismu její neúčinnou dávku.

Volba pokusného zvířete pro testování je dána určitými konvencemi a hlavně předpokládaným charakterem účinků látky, zamýšleným způsobem použití a dobou expozice. Pokusné zvíře musí být přesně definováno (původ, pohlaví, stáří, zdravotní stav...). Ve studiích je obvyklé zastoupení samců a samic 1:1, není-li požadováno jinak. Klasické studie se provádějí zejména na laboratorních myších a potkanech, králících, morčatech nebo psech. V určitých případech lze pro testování použít i primáty (Kupec, J., 2004).

Nedostatečné testování vedlo v předchozích letech k mnoha tragédiím. Nejznámější je zřejmě případ s thalidomidem. Ten již po řadu let slouží jako ilustrace neadekvátního testování na zvířatech. V roce 1957 bylo na Německý trh uvedeno nové převratné sedativum Contergan s účinnou látkou thalidomid. Tento lék byl považován za zcela netoxický a vhodný i pro děti a těhotné ženy, kterým byl indikován pro potlačení nevolností a zvracení. Výsledky testů, které byly získány před tím, než byl lék dostupný pro veřejnost, prokázaly jeho

neškodnost, resp. prokázaly pouze nízkou akutní toxicitu pro laboratorní zvířata, embryotoxicita nebyla testována vůbec. Později se ukázalo, že je thalidomid vysoce teratogenní. Tato látka způsobuje poruchy zakládání končetin plodu, tzv. *fokomelii*. Reprodukční studie se začaly provádět až v roce 1961, kdy už byl znám teratogenní účinek sloučeniny a kdy byly léčivé přípravky obsahující thalidomid staženy z oběhu (Zurlo, J. et al., 1994). Po dlouhém testování prokázaly základní studie na králících a myších negativní vliv látky na plod. Nicméně bylo zjištěno, že toto specifické poškození lze u plodu vyvolat pouze během desetihodinového intervalu v desátém dnu gravidity (Lüllmann, H. et al., 2002).

Případ thalidomidu a jeho teratogenního vlivu byl jedním z mnoha důkazů toho, že výsledky testů, které jsou prováděny se zvířaty, nejsou dostačující. Tyto případy ukázaly, že je potřeba zavést přísnou regulaci a rozsáhlé testování všech nových látek.

Při studiích využívajících jako testované objekty obratlovce nastává několik zásadních problémů. Jedná se hlavně o splnění podmínek pro chov a provádění testů na laboratorních zvířatech, rozdíly v metabolismu testovaného zvířete a člověka, extrapolace zjištěných výsledků na člověka. V neposlední řadě musíme brát ohled i na časovou náročnost jednotlivých testů a finanční zátěž, kterou s sebou tyto náročné metody přinášejí.

Již v roce 1831 formuloval britský fyziolog Marshall Hall 5 principů, na které by mělo být pamatováno při používání laboratorních zvířat k výzkumným účelům. 1. nikdy nepoužívat k experimentu zvíře, pokud mohou být informace, které potřebujeme zjištěny pouhým pozorováním. 2. pokud nemá pokus jasně definovaný a splnitelný cíl, tak by neměl být proveden. 3. vědci jsou povinni se seznámit s pracemi svých předchůdců, aby se tak vyloučila možnost, že by byl pokus zbytečně opakován. 4. k pokusu by se měla použít co nejméně citlivá zvířata (mělo by tím být zabráněno jejich zbytečnému utrpení). 5. každý pokus by měl být proveden za podmínek, které umožní získat nejlepší možné výsledky a v důsledku toho snížit počet potřebných opakování experimentu (Zurlo, J. et al., 1994).

Stále je zde naděje, že v budoucnu dojde ke snížení počtu zvířat používaných pro testy *in vivo*. Tento názor je také publikován v zásadním rozboru OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) „**Health effects test guidelines for *in vivo* testing**“. Autoři zjistili, jak zdokonalit stávající testy. Zásadní body této práce jsou: 1. eliminace nadbytečných testů; 2. použití jednoho pohlaví při testování; 3. simultánní aplikace některých testů stejným zvířatům; 4. hojnější použití screeningových metod při primárním testování ([www.oecd.org](http://www.oecd.org)).

Využití zvířat pro různé toxikologické endpointy dominují tři testy:

1. **dvougenerační test reprodukční toxicity**
2. **vývojový test toxicity**
3. **in vivo test mutagenity**

Při těchto testech je využito zhruba 72% z celkového počtu testovaných zvířat. Právě k nim by měly být v co možná nejkratší době nalezeny adekvátní alternativy.

V roce 2002 bylo pro testování použito celkem 10,7 mil. zvířat. Asi 10% z nich se uplatnilo při testování toxicity a stanovení bezpečnosti chemických látek. Zbývajících 90% zvířat bylo použito pro různé jiné vědecké účely ([www.jrc.it](http://www.jrc.it)).

Zacházení se zvířaty v průběhu testu se v České republice řídí zákonem na ochranu zvířat proti týrání a také doporučeními OECD, které byla vydána pod názvem „OECD guidelines for testing of chemicals“.

### 2.1.1.2. Využití raných vývojových stádií obratlovců

Zákony na ochranu zvířat chrání pouze obratlovce, kteří dosáhli určitého stupně vývoje. Z tohoto důvodu bylo navrženo několik alternativních testů, které používají raná vývojová stadia obratlovců. Zvířata v tomto stádiu vývoje ještě nemají dostatečně vyvinutou nervovou soustavu, je tedy velmi nepravděpodobné, že by trpěla bolestí (Fenten, J.; Baals, M., 1993).

**HET-CAM** (Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane) ([www.invittox.com](http://www.invittox.com)).

**HET-CAM** test slouží ke zjištění iritačního potenciálu chemických sloučenin. Potenciální dráždivost sloučenin je zde stanovena pomocí pozorování nepříznivých změn, které nastanou na chorioallantoické membráně vejce po jeho vystavení testované chemikálii. Základem tohoto testu je stanovení výskytu cévního poškození nebo koagulace v důsledku přítomnosti chemikálie pro stanovení potenciálního poškození mukózních membrán (zvláště v oku) *in vivo*.

Slepičí vajíčka jsou devět dní po snesení uchovávána v inkubátoru. Po této době je odstraněna skořápka okolo vzduchové komůrky a po vynětí vnitřních membrán zůstane odhalena chorionallantoická membrána. Tato membrána obsahuje žíly i tepny, ale žádné nervy. Testované látky jsou podány přímo na tuto membránu. Po pěti minutách jsou na membráně hledány známky cévního poškození. Dráždivost je hodnocena podle rozsahu a závažnosti poškození.

Test má několik výhod, patří mezi ně jeho rychlost, citlivost, jednoduchost provedení a cenová dostupnost.

Hlavní nevýhodou této metody je subjektivní vyhodnocování výsledků. To může být překonáno pomocí používání standardů a využíváním všeobecného schématu pro hodnocení iritujících účinků chemikálií. Pětiminutová expozice se pro zjištění iritačních popř. toxických účinků ukázala dostatečnou (tzn. nezdá se, že by delší expozice přinesla hodnotnější informace). Za úvahu stojí, jestli mají být testy na slepičích vejcích považovány za testy na zvířatech. I přesto, že použití tohoto testu vede k redukci počtu savců potřebných pro konvenční testy oční dráždivosti a obejde se bez zvířecího utrpení, je tato metoda stále považován za hranici mezi *in vivo* testy a alternativními metodami.

V současné době nachází **HET-CAM** test uplatnění jako předstupeň k Draizeho testu dráždivosti, který je prováděn na očích králíků.

### **2.1.2. Alternativní metody testování**

Při hodnocení alternativních testů můžeme vycházet z již zmiňované koncepce 3R (Zurlo, J. et al., 1994).

**Alternativa snížení počtu:** Jedná se o metody, při kterých je pro pokus použit minimální počet zvířat, a přitom jsou dosaženy stejné výsledky jako s použitím většího souboru jedinců. Například screeningové testy zaručí, že budou dále testovány pouze látky s prokazatelnou toxicitou, čímž se sníží nároky na počet testovaných zvířat.

**Alternativa zmírnění:** Pokud je potřeba provést test na laboratorním zvířeti, musíme během testu minimalizovat jeho bolest a stres, zajistit jeho dobrý zdravotní stav a připravit pro něj vhodné životní podmínky. Na konci experimentu by měla být použita co nejhumánnější a nejrychlejší metoda utracení.

**Alternativa náhrady:** Tyto alternativy absolutně eliminují použití obratlovců při testování. Jedná se buď o eliminaci relativní, kdy obratlovec slouží jako zdroj orgánů, tkání nebo buněk, ale sám o sobě není podroben testování. Nebo jde o eliminaci absolutní, kdy obratlovců nejsou použiti vůbec a místo nich se při testech uplatňují bezobratlé organismy, dostupná data nebo matematické modely.

Mnoho *in vitro* testů slouží jako nahrazující a zmírňující alternativa hned poté, co projdou validací. Validace je proces, při kterém je posuzována vhodnost použití testu pro daný účel společně s jeho spolehlivostí a reprodukovatelností (Frazier, J. M., 1990).

V roce 2002 ECVAM a ECVAM Working group on chemicals předložily rozsáhlou analýzu týkající se alternativních (ne zvířecích) metod pro výzkum chemikálií. V této zprávě jsou popsány způsoby, jakými lze snížit počet testovaných zvířat, zmírnit jejich utrpení nebo

je v pokusech plně nahradit alternativními metodami. Dále je zde zdůrazněna potřeba uvedení v platnost nové chemické legislativy **REACH** ([www.jrc.it](http://www.jrc.it)).

V polovině roku 2004 byla provedena analýza dosavadních výsledků. V této práci jsou zmíněny pochybnosti o tom, jestli budou alternativní metody schopné plně nahradit pokusy na zvířatech. Ze závěrů nezávislé studie provedené SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic Product and Non Food Products*) vyplývá, že v následujících deseti letech nebude možné testování na zvířatech zcela nahradit alternativními metodami. Stále bude nezbytné používat zvířata alespoň ve finální fázi testování látek ([ec.europa.eu/enterprise](http://ec.europa.eu/enterprise)). Názor, že v blízké budoucnosti budeme muset pro spolehlivou předpověď nežádoucích účinků látek stále využívat zvířata, vyjádřila ve stejném roce i CSTE (Committee on Toxicity, Ecotoxicity and Environment) ([ec.europa.eu/comm](http://ec.europa.eu/comm)).

Evropská komise, průmysl a společnost na ochranu zvířat mají v této době společný cíl, vyvinout a validovat alternativní metody, které by v následujících deseti letech plně nahradily pokusy se zvířaty ve většině oblastí testování chemických látek.

#### 2.1.2.1. Metody *in vitro*

*In vitro* testy se skládají ze tří základních komponent: biologický model, měřený endpoint a testovací protokol. Biologický model je systém použitý pro hodnocení účinku (např. hepatocyty). Čím větší je schopnost tohoto modelu reprezentovat celý organismus, tím přesnější data pokusem získáme. Měřený endpoint je standard, který je používán pro předpověď toxicity (např. úmrtnost). Testovací protokol je zápis všech událostí, které během provádění testu nastaly (Zurlo, J. et al., 1994).

Informace o současném stavu *in vitro* testování jsou k dispozici na stránkách ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), které jsou ústředním bodem výměny informací o *in vitro* metodách a ostatních alternativních metodách ([ecvam.jrc.it](http://ecvam.jrc.it)).

Primární úloha ECVAM je koordinovat nezávislé validační studie alternativních testů a vytvářet jejich databázi. V roce 1993 bylo validováno osm alternativních testů (na leptavost kůže, fototoxicitu, embryotoxicitu a *in vitro* stanovení perkutánní absorpce). Tyto testy, kromě testů na embryotoxicitu, byly uznány regulačními autoritami a zahrnuty do „**OECD Test Guidelines**“. K dnešnímu datu je validováno již šestnáct testů.

*In vitro* studie jsou jednou ze složek tzv. „inteligentní taktiky testování“ (ITS). Návrh na používání této strategie pro testování chemických sloučenin vznikl společně s novou koncepcí chemické politiky **REACH** ([www.jrc.it](http://www.jrc.it)).



### 2.1.2.1.1. *Buněčné kultury*

V buněčných kulturách je přerušeno propojení mezi individuálními buňkami. Izolované buňky jsou obvykle pěstovány jako monovrstva (tzn. jako "koberec" o tloušťce jedné buňky), jež je rozprostřena na dně kultivační nádoby. Buňky jsou uchovávány v pufrovaném roztoku s živinami za podmínek podobných jejich přirozenému prostředí (Fenten, J.; Baals, M., 1993).

Příkladem *in vitro* testu při kterém jsou používány buněčné kultury je „*Neutral red test*“. Endpointem je integrita buněčné membrány. V tomto testu jsou buňky kultivovány v plastových Petriho miskách. V každé misce je jiná koncentrace testované látky. Neutrální červeň, která barví pouze živé buňky, je ke kultuře přidána po odstranění testované chemikálie. Podle počtu obarvených buněk tedy zjistíme, kolik jich přežilo působení testované látky (Zurlo, J. et al., 1994).

Tento test má v dnešní době mnoho modifikací. Například : „*THE FRAME MODIFIED NEUTRAL RED UPTAKE CYTOTOXICITY TEST*“ ([www.invittox.com](http://www.invittox.com))

Základem testu je cytotoxický vliv některých chemických sloučenin na 3T3-L1 buňky. Míra tohoto působení testovaných látek je stanovena pomocí počtu životaschopných buněk. Pokud jsou zdravé 3T3-L1 buňky uchovávány v kultuře, jsou schopny se časem kontinuálně dělit a rozmnožovat. Některé chemikálie do těchto procesů zasahují a tím inhibují rychlost růstu buněk. Stupeň inhibice růstu v závislosti na koncentraci testované látky poskytuje informace o toxicitě testované látky.

3T3-L1 buňky jsou uchovávány v kultuře a jsou vystavovány různým koncentracím testovaných sloučenin. Po 24, 48 a 72 hodinách jsou kultury vizuálně posouzeny a pomocí Neutral Red Uptake metody je stanovena životaschopnost buněk. Procento inhibice růstu je stanoveno porovnáním počtu buněk, které zůstaly naživu v přítomnosti testované látky, a počtu životaschopných buněk v kontrolách. Dále jsou stanoveny parametry IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> a IC<sub>80</sub> (tzn. koncentrace, které způsobí 20, 50 a 80% inhibici růstu). Hodnoty IC jsou obvykle vyjádřeny v jednotkách mmol/l. Získané hodnoty IC umožňují srovnání relativní toxicity testovaných sloučenin.

Udržení a kultivace buněčných linií 3T3-L1 a jim podobných buněk je relativně jednoduché a finančně nenáročné. Využití takovýchto pokusů pro zjištění cytotoxicity nabízí rychlé a reprodukovatelné testování mnoha sloučenin.

Nevýhody této metody jsou dány některými vlastnostmi testovaných sloučenin. Například: nestálé sloučeniny mají za podmínek, při kterých je test prováděn, tendenci se

vypařovat, proto mohou být zjištěné hodnoty  $IC_{50}$  rozdílné, hlavně pokud je toxicita testovaných sloučenin nízká. Potíže nastávají i u látek, které nejsou stabilní ve vodném prostředí, popř. s vodou reagují výbušně. Tato metoda testování není vhodná ani pro sloučeniny nerozpustné ve vodě, ačkoli někteří autoři pozměnili metodiku pokusu tak, aby bylo možné testovat i tyto látky. V těchto experimentech použili místo klasického vodného rozpouštědla rostlinný olej (Riddell, R.J et al., 1986). Další problémy souvisí s přirozenou podstatou buněk, jako je rychlý růst nebo nediferencované buňky s velmi nízkou metabolickou aktivitou. Z těchto důvodů se často objevují potíže s extrapolací získaných výsledků na biologické systémy. Tato metoda úplně zanedbává toxicitu metabolických produktů, které vznikají aktivací netoxické látky v organismu. Sloučeniny, které působí výhradně na dělicí se buňky se mohou zdát méně toxické než ve skutečnosti jsou. Dále může být podceňena toxicita látek, které se významněji vážou na krevní bílkoviny.

Jak již bylo řečeno, výsledky Neutral Red Uptake testu jsou získány po 24, 48 a 72 hodinách. Test, který trvá déle než 72 hodin se používá pro zkoušení látek, které působí hlavně na buněčné lysozomy. Pokud jsou totiž buňky červenému barvivu vystaveny po dobu delší než 72 hodin, dochází k jeho vychytávání převážně buněčnými endosomy. Z tohoto důvodu mohou být u chemikálií, které přednostně působí na tyto endosomy, zjištěny chybné výsledky (buďto vysoká či naopak nízká životnost buněk). Proto bývá tato metoda spojena ještě s dalším testem, který je schopen stanovit životaschopnost buněk (Panacer, D.S et al., 1986).

Získané výsledky mohou zkreslit krystalky tvořící se při precipitaci červeného barviva, kterou mohou indukovat některé testované látky. Aby bylo zabráněno případným nepřesnostem v interpretaci takto získaných výsledků, je důležité provádět vizuální kontrolu jednotlivých testů.

#### **2.1.2.1.2. Tkáňové kultury**

První pokusy s kulturami tkání byly provedeny v roce 1885, kdy se podařilo německému vědci Wilhelmu Rouxovi přemístit část tkáně kuřecího embrya do zahřátého roztoku solí a tam ho několik dní uchovat. Tkáňové kultury našly uplatnění až ve chvíli, kdy byla objevena antibiotika, která inhibují růst bakterií.

Pro testování je možné použít tkáňovou kulturu pocházející z normální i abnormální buňky člověka či zvířete.

Uchování a následná kultivace tkáňových kultur je složitá z několika důvodů. Jednotlivé buňky se namísto toho, aby si zachovaly vlastnosti tkání, ze kterých pocházejí,

snaží v kultuře „dediferencovat“, tzn. získávat vlastnosti nesespecializovaných buněk. Proto je výhodné pro testování používat málo diferencované buňky, např. fibroblasty.

Primární tkáňové kultury získané ze specifického orgánu jsou velmi užitečné, ale své původní vlastnosti si zachovávají pouze po krátkou dobu (dny, max. týdny). Je potřeba vyvinout metodu, která zaručí, že buňkám zůstanou během kultivace jejich původní funkce. Jednou z možností jak toho lze dosáhnout je společná kultivace s buňkami pocházejícími z téhož orgánu. Studie, které byly s takovými buňkami provedeny ukázaly, že jsou schopny zachovat si své původní vlastnosti a přežít mnohem déle. Další možností je „imortalizace“ buněk, při které jsou do DNA primárních buněk zakódovány virové geny (Zurlo, J. et al., 1994).

### **Použití trojrozměrného modelu lidské kůže**

Pomocí těchto modelů lze testovat leptavé účinky látek na kůži, kožní dráždivost a fototoxicitu. Zkouška leptavosti (korozivity) byla v rámci EU validována a měla by být tedy přednostně použita při zkouškách potenciálně leptavých látek (ecvam.jrc.it).

Test *EPISKIN*<sup>TM</sup> byl schválen jako náhrada *in vitro* testu kožní korozivity pro stanovení nebezpečnosti a označení látek poškozujících kůži poleptáním. Tento test je také používán jako alternativa k Draizeho testu s králíky, pomocí kterého se do dnešní doby určovala schopnost látek kůži poškodit.

*EPISKIN*<sup>TM</sup> je trojrozměrný model lidské kůže složený z epidermis s funkční *stratum corneum*. Použití modelu při tomto testu zahrnuje topickou aplikaci testované látky na povrch kůže a následné zhodnocení účinku na buněčnou životaschopnost. Cytotoxicita je potom vyjádřena jako snížení mitochondriální dehydrogenázové aktivity (www.invitox.com).

Prediktivní hodnota alternativních testů využívajících kultury buněk a tkání je v dnešní době značně limitována. *In vitro* testy s kulturami nemohou na rozdíl od pokusů prováděných na živých zvířatech objasnit neznámé mechanismy účinku. (ww.jrc.it).

### **2.1.2.1.3. Nižší organismy**

#### **2.1.2.1.3.1. Bakterie**

Bakterie jsou v dnešní době používány pro řadu testů v oblasti chemického screeningu. Zřejmě nejznámějším testem je Amesův test.

#### **Amesův test**

Tento test hodnotí mutagenní potenciál testovaných látek pomocí jejich účinku na 5 kmenů *Salmonella typhimurium*<sup>his-</sup>.

V 60. letech 20. století vyvinul Bruce Ames test, který pro stanovení mutagenního potenciálu chemických sloučenin používá bakterii *Salmonella typhimurium*. Amesovi se podařilo vyšlechtit kmen *S. typhimurium*, který má mutantní gen pro syntézu histidinu. Jedinci s takto defektním genem v nepřítomnosti této aminokyseliny v živném médiu zahynou. Amesův test je založen na předpokladu, že v přítomnosti látky s určitým mutagenním potenciálem dochází k reverzním mutacím defektního genu pro histidin. Tyto mutace vedou k tomu, že je bakterie znovu schopna histidin syntetizovat a začít růst v médiu, které tuto aminokyselinu neobsahuje (Nečas, O. et al., 2000).

Provedení testu: Na živnou půdu jsou naočkovány vhodné kmeny *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102), které jsou přes noc inkubovány. Kultura bakterií je smíchána s testovanou látkou a agarem. Tato směs je přidána k dalším agarovým plátům v Petriho miskách, které jsou inkubovány ve tmě po dobu 48-72 hodin. Po této době je spočítáno množství kolonií, které prodělaly reverzní mutaci. Je určen poměr žijících bakterií, které nebyly vystaveny mutagenu a u kterých tedy došlo ke spontánní mutaci a přeživších bakterií, které mutagenu vystaveny byly. Je potřeba provést řadu testů, protože různé kmeny podléhají mutacím, které způsobují různé chemikálie ([www.invitox.com](http://www.invitox.com)). Pokud došlo k reverzním mutacím u většího množství jedinců, kteří byly vystaveni testované látce, je tato látka považována za mutagenní.

Při modifikaci tohoto testu mohou být použity i jiné typy bakterií, např. kmeny *E. coli*, které jsou závislé na přítomnosti tryptofanu v médiu. Základ testu je velmi podobný, jen se liší typ bakterie a aminokyseliny.

#### 2.1.2.1.3.2. Bezobratlí

Od chvíle, kdy Russel a Burch navrhli koncepci 3R (*Reduce, Refine, Replacement*), se začaly vyvíjet alternativní metody testování chemických látek, jejichž používání by vedlo k ušetření citlivých zvířat, zejména savců. Některé z těchto metod pronikly i do toxikologie. Velkým pokrokem bylo zjištění, že pro stanovení akutní toxicity není zapotřebí používat klasický test na stanovení LD<sub>50</sub> (Guilhermino, L. et al., 2002).

Tento test byl používán na celém světě déle než padesát let. Jako první ho použil v roce 1927 britský vědec J. W. Trevan, který s jeho pomocí určil účinek řady chemických sloučenin, např. digitoxinu. Cílem tohoto testu je stanovit, jaké množství podané látky usmrtí polovinu testovaných zvířat. Odtud také název testu LD<sub>50</sub> (Lethal Dose).

V roce 1991 představitelé regulačních výborů v Japonsku, Evropě a USA odsouhlasili vyřazení testu LD<sub>50</sub> z povinných testů při hodnocení akutní toxicity (Zurlo, J. et al., 1994).

Jako alternativy ke klasickému testu LD<sub>50</sub> byly navrženy testy zahrnující *stanovení přibližné letální dávky* (Approximate Lethal Dose), „*Up and Down*“ *regulační proces a testy akutní toxicity v rozmezí neletálních dávek* (Tichias, K. et al., 1998).

Metoda *stanovení přibližné letální dávky* vychází z podávání odstupňovaných dávek testované látky jednomu zvířeti, namísto celé skupiny. Pro tento test může být použito 4-10 testovaných zvířat. „*Up and down*“ *regulace* také zahrnuje podání rostoucích koncentrací látky jednomu zvířeti. Koncentrace se při jednotlivých podáních zvyšuje o koeficient 1,3. Pokud dojde k úhynu zvířete, je za letální považována koncentrace podaná před dávkou, která úhyn způsobila, tzn. poslední koncentrace je ponížena o faktor 1,3 (Zurlo, J. et al., 1994).

V roce 1989 byla vyvinuta další metoda pro stanovení akutní toxicity. Při tomto testu je jako endpoint brán výrazný projev toxicity látky. Dávka vyšší, než ta, která tento projev způsobí, by vedla ke smrti testovaného subjektu. Výhoda této metody spočívá v posunu škály intoxikace k nižšímu toxicitnímu rozsahu a průměrná bolest, která je těmito koncentracemi způsobena je mnohem menší, zatímco vědecká hodnota získaných výsledků je mnohem vyšší (Tamborgini, P., 1990).

Studie publikované za poslední desetiletí naznačují, že by se testy akutní toxicity na bezobratlých mohly uplatnit při stanovení letálních dávek pro savce a člověka. Při předpovědi akutní orální toxicity jsou dokonce některé testy používající bezobratlé vodní organismy přesnější než klasický test LD<sub>50</sub> prováděný na krysách (Calleja, M. C. et al., 1992).

Hlavní výhodou použití bezobratlých při prvotním screeningu je snížení počtu savců potřebných pro stanovení toxicity. Navíc jsou tyto metody levnější než biologické testy se savci a jsou také méně náročné na prostor.

Problémem při používání bezobratlých jako organismů pro prvotní screening jsou odlišnosti v biologickém uspořádání vyšších organismů. Přestože by měla být tato odlišnost brána v potaz, neměl by být opomíjen fakt, že jsou tyto organismy využívány v rámci prescreeningu. Z důvodu této variability by se měly konečné biologické zkoušky ještě uskutečnit s menším počtem savců. Navzdory tomuto požadavku (použití savců pro konečné testování), používání testů na bezobratlých znamená významné snížení počtu savců pro testování (Guilhermino, L. et al., 2002).

Potíže s extrapolací výsledků, které byly zjištěny pomocí bezobratlých, na obratlovce jsou známy. Jedná se hlavně o účinky, jejichž manifestace je spojena s ovlivněním fyziologických a biologických pochodů. Bezobratlí jsou široce využíváni při testování toxicity chemických sloučenin. Vývoj testů, které používají bezobratlé, je podporován

biologickými i toxikologickými charakteristikami těchto organismů. Z biologického hlediska se jedná hlavně o možnost vývoje za přesně stanovených podmínek. Toxikologický význam vyplývá hlavně ze specifčnosti odpovědi jednotlivých organismů na různé skupiny chemikálií. Nicméně specifická odpověď obratlovců, která je asociována s metabolickými pochody, může limitovat extrapolaci naměřených výsledků na obratlovce (Lagadig, L.; Caquet, T., 1998).

Výhod použití bezobratlých organismů při toxikologických testech je několik. Jsou to velmi malé organismy s vysokou plodností a krátkým životním cyklem, proto mohou být kultivovány za laboratorních podmínek. Krátký životní cyklus bezobratlých druhů představuje možnost jak ušetřit čas i finance. Ve skutečnosti znamená pojem „krátkodobý“ u testů s bezobratlými časový úsek od dvou do čtyř dnů, kdežto krátkodobé testy prováděné na hlodavcích trvají jeden až dva týdny. Čas, který laborant stráví pozorováním zvířat a zaznamenáváním poznatků, je tak podstatně kratší než u klasických testů *in vivo*. Tyto faktory spolu s nižšími náklady na pořízení a chov bezobratlých znamenají v důsledku celkově menší finanční náročnost testů toxicity (Lagadig, L.; Caquet, T., 1998).

Testované organismy se mohou vyvíjet synchronně. Mladí jedinci se líhnou ze známého, přesně definovaného genetického „materiálu“ za stejných fyziologických podmínek a přesnost získaných výsledků je tak významně vyšší (Persoone, G.; Jansen, C. R., 1993). Některé druhy bezobratlých jsou partenogenetické, čímž je u nich redukována genetická odlišnost. To je jeden z hlavních argumentů, které vedly k širšímu používání sladkovodních korýšů (zejména *Daphnia magna*) v testech akutní toxicity (Adema, D. M. M., 1978).

Při řadě pokusů, ve kterých byla srovnávána citlivost bezobratlých a savců vůči působení toxických látek, byl nalezen uspokojivý vztah mezi  $EC_{50}$  různých chemikálií pro *D. magna* a orální  $LD_{50}$  těch samých sloučenin pro krysy. Přestože zmíněná relace nevykazuje známky linearitu, předpokládá se, že při použití screeningových testů s *D. magna* může být identifikováno více toxických látek (Guilhermino, L. et al., 2002).

Pomocí testů s *D. magna*, *Microtox* testu a testů provedených na cystách *Artemia salina*, *Streptocephalus proboscideus*, a *Brachionus calyciflorus* byla stanovena akutní toxicita padesáti chemikálií v programu MEIC (Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity Chemicals). Statistická analýza dat prokázala, že použití sady testů na bezobratlých je uspokojivým nástrojem pro předpověď toxicity pro člověka (Calleja, M. C. et al., 1994).

### 2.1.3. Metody *in silico* - odhady toxicity chemických látek výpočtem

Základem těchto metod jsou dostatečně rozsáhlé soubory kvalitních dat, které byly vytvořeny během testování potenciálně toxických látek *in vivo*. Z metod *in silico* byl vytvořen celý nový obor toxikologie, tzv. predikční toxikologie (Tichý, M. et al., 2005).

Predikční toxikologie je nejnovější součástí toxikologie a slouží ke studiu a aplikaci postupů a metod, které umožňují určit účinek chemikálií a jeho velikost předem – bez použití pokusných zvířat. Využívá k tomu shromážděné pokusné údaje a vytváří expertní počítačové systémy, pomocí nichž pak odhaduje toxicitu nových, dosud netestovaných látek (Nesměrák, K., 2005).

Odhady získávané pomocí metod *in silico* jsou po validaci rovnocenné s korespondujícími údaji získanými *in vivo*. Případné chyby těchto metod jsou dány nepřesnými údaji, které byly získány experimentem, a které byly pro daný model použity.

K vytvoření počítačových modelů dochází zobecněním získaných údajů. Obvykle je pro toto zobecnění použita metoda *QSAR* (Tichý, M., 1983).

Data, která jsou použita pro vytváření jednotlivých modelů jsou ovlivňována podmínkami pokusu, při kterém byla získána. Veškeré faktory ovlivňující získané parametry se promítají do správnosti použité *in silico* metody. Mezi tyto faktory můžeme zařadit dobu expozice a podmínky, za kterých k ní došlo, věk testovaného subjektu a jeho zdravotní stav.

Při použití těchto predikčních metod je nutno brát v potaz, že látka nikdy nereaguje s lidským organismem jako entita. Ve většině případů se jedná o směsi látek, které se mohou navzájem ovlivňovat. Tento fakt může být důvodem nepřesných výsledků, kterým se v některých případech nepodaří zabránit (Kaiser, K L. E. et al., 1994).

*In silico* testy můžeme rozdělit do následujících skupin (Tichý, M. et al., 2005):

- modely vytvořené a analyzované pomocí metod (*Q*)*SAR*
- kineticko-fyziologické simulační modely (*PBSM*, Physiologically Based Simulation Models)
- modely založené na biologické podobnosti a allometrických rovnicích
- systémy založené na znalostech a souborech pravidel
- modely vytvořené pomocí molekulové grafiky
- kombinace modelů s umělou neuronovou sítí (*ANN*, Artificial Neural Network)

U každého modelu musí být uvedena pravděpodobnost jeho správnosti.

### 2.1.3.1. Modely (Q)SAR

*SAR* je kvalitativní vztah mezi chemickou strukturou a potenciálním biologickým účinkem, *QSAR* je matematické vyjádření vztahu chemických vlastností k biologickému účinku.

Principy *(Q)SAR* mohou být použity k dodání následujících typů informací o chemických sloučeninách: 1. fyzikálně chemické vlastnosti, 2. potenciální toxické vlastnosti, 3. distribuce a osud v životním prostředí, 4. biokinetické procesy (Nendza, M.; Hermens, J., 1994).

Chemická struktura látky je v tomto kontextu chápána jako konstituce, tzn. uspořádání atomů v molekule a kvalita vazeb, které tyto atomy spojují. Biologická účinnost jako velikost (kvantita) biologického účinku. Účinek znamená kvalitu odpovědi organismu, interakce mezi látkou a biologickým systémem, a účinnost vyjadřuje jeho kvantitu.

Při použití metody *(Q)SAR* jsou metodami matematické statistiky analyzována data o biologických a fyzikálně chemických, chemických nebo fyzikálních vlastnostech série látek. Pomocí těchto metod je vytvořena např. matematická formule, která zobecňuje experimentálně získaná data o látkách vybraných v dané sérii pro všechny látky, které by do série podle stanovených kritérií patřily. Série látek je skupina sloučenin vybraná pro testování podle určitých kritérií. Při výběru látek je vhodné dodržet dva základní požadavky: 1. látky v sérii by měly vykazovat stejný mechanismus účinku a 2. série by měla obsahovat látky s co možná největším rozdílem fyzikálně chemických vlastností. Tato série může být složena ze strukturně podobných látek (*strukturně homogenní série*) nebo z látek strukturně rozdílných (*strukturně heterogenní série*) (Tichý, M., 2005).



## 2.2. *Testovaný organismus Artemia salina*, L.

### 2.2.1. Taxonomické zařazení



obr. 1 *Artemia salina*. Převzato z dragonja.nib.si.

říše: *ANIMALIA* (ŽIVOČICHOVÉ)

kmen: *ARTHROPODA* (ČLENOVCI)

podkmen: *CRUSTACEA* (KORÝŠI)

třída: *Branchiopoda* (lupenonožci)

řád: *Anostraca* (žábronožky)

rod: *Artemia*

druh: *Artemia salina*, L. (žábronožka solná)

## 2.2.2. Anatomie a morfologie

### podkmen: *CRUSTACEA*

Korýši mají článkované tělo členěné na jednotlivé oddíly (hlava, hrud' a zadeček). Hlava často srůstá s několika hrudními články za vzniku hlavohrudi. Celé tělo je obvykle pokryto kutikulou, která může vytvářet krunýř (Sedlák, E.; 2003).

Hlavu korýšů tvoří šest článků. První segment (*akron*) je bez končetin, zbylých pět článků nese končetiny, resp. orgány končetinového původu. Jedná se zejména o tykadla prvního a druhého páru (*anthenuly* a *antheny*), kusadla (*mandibuly*) a dva páry čelistí (*maxily*). První pár tykadel má smyslovou funkci. Mohutný pár druhých tykadel s mnoha brvami umožňuje vznášení na vodě a zčásti je zodpovědný i za pohyb (Papáček, M. et al., 1994).

Počet článků, které tvoří hrud' je variabilní. Končetiny (*thoracopody*) připojené k prvním třem článkům jsou často přeměněny v čelistní nožky (*maxilipedy*). Ostatní hrudní končetiny mají většinou funkci pohybovou, mohou sloužit k dýchání, filtraci potravy nebo k rozmnožování.

Anatomie končetin odpovídá jejich funkci, mohou být jednovětevné a sloužit k lezení, nebo rozeklané (dvouvětevné), uzpůsobené k plavání, přihánění a filtraci vody, dýchání apod. Dvouvětevné končetiny se skládají z několika částí. Na nerozeklané části (*protopodit*) můžeme nalézt vnitřní výběžky (*endity*), které jsou u ústních končetin a slouží k jemnému zpracování potravy, a výběžky vnější (*epipodity*), které vytváří žábry. Rozeklanou část končetiny tvoří *exopodit* a *endopodit*.

Na zadečku již obvykle končetiny nejsou. Poslední tělní článek (*telson*) může nést dva výběžky tvořící vidličku (*furka*).

Trávicí soustava je trubicovitá, u různých skupin korýšů různě diferencovaná. Do střeva obvykle ústí vývody jaterní žlázy (*hepatopankreas*).

Základními orgány dýchací soustavy jsou žábry, které jsou umístěny na končetinách ve formě epipoditových přívěsků. Někteří korýši mohou dýchat celým povrchem těla.

Otevřená cévní soustava dominuje dorzální céva. U některých nižších skupin korýšů byla cévní soustava zredukována pouze na srdce (perloočky) nebo dokonce vymizela úplně (klanonožci).

Vylučovací orgány jsou umístěny buď u baze druhého páru čelistí (maxilární žlázy) nebo u baze druhého páru tykadel (antenální žlázy).

U nižších skupin korýšů je nervová soustava tvořena párovými ganglii v jednotlivých tělních člancích, přičemž první (nadhltanové ganglion) je největší. U některých tříd dochází ke splynutí ganglií v hlavě s vytvořením nadhltanového mozkového ganglia, které je obvykle děleno na tři části: *protocerebrum*, které inervuje oči, *deutocerebrum*, které inervuje tykadla prvního páru (antenuy) a *tritocerebrum*, které inervuje tykadla druhého páru (anteny). Oči jsou buď jednoduché pohárkové (naupliová očka) nebo složené (Sedlák, E.; 2003).

Pohlavní žlázy korýšů jsou párovité. Některé končetiny samců mohou být uzpůsobeny k přichycení samice při kopulaci, jiné jsou upraveny pro samotné rozmnožování, tzn. slouží k přenosu spermatoforů do pohlavních vývodů samice. U nižších tříd je patrný pohlavní dimorfismus, například velmi nápadné rozmnožovací končetiny u samců. Korýši jsou obvykle gonochoristi, u některých tříd dochází i k nakladi a vývoji z neoplozených vajíček (parthenogenese). Samice kladou v průběhu léta neoplozená vajíčka, z nichž se vyvíjí další partenogenetická generace samic. Ve stresových podmínkách (např. nedostatek potravy) se z některých vajíček vylíhnou i drobní samci (Papáček, M. et al., 1994).

Vývoj probíhá přímo nebo přes larvální stádium. Základními typy larev jsou *nauplius* a *zoea*. *Nauplius* je larválním stádiem u všech tříd korýšů, má nečláňkované oválné tělo, jediné oko a tři páry končetin, ze kterých v průběhu vývoje vznikají dva páry tykadel a kusadla. Další články s končetinami dorůstají teprve postupně (Papáček, M. et al., 1994). *Zoea* se vytváří pouze u mořských druhů třídy *Malacostraca* (Sedlák, E.; 2003).

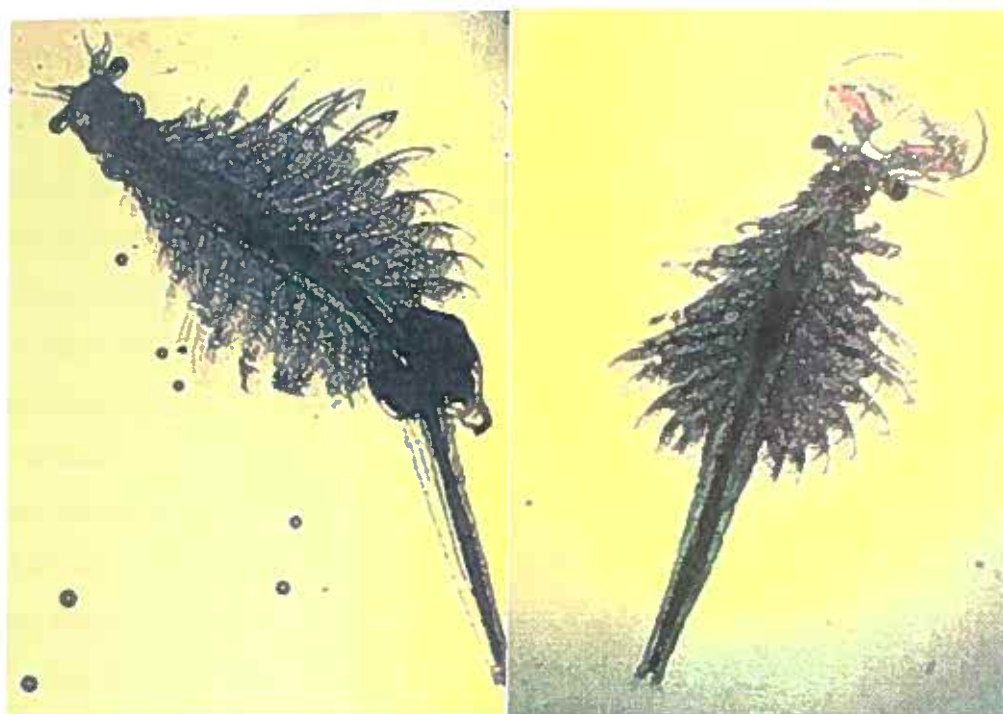
#### **třída: *Branchiopoda* (lupenonožci)**

Charakteristickým rysem této třídy jsou hrudní lupenité nožky, které nesou žábry a slouží k filtraci potravy a k pohybu (Sedlák, E.; 2003).

#### **řád: *Anostraca* (žábronožky)**

Žábronožky mají asi dvoucentimetrové, protáhlé, mírně zploštělé tělo jantarové barvy. U tohoto řádu nepokrývá povrch těla krunýř. Na hlavě je jedno jednoduché naupliové očko umístěné mezi složenýma očima, které jsou na stopkách. Hrudní nožky jsou uzpůsobeny k dýchání, filtraci potravy a plavání (žábronožky plavou obvykle hřbetem dolů, otáčejí se pouze při výjimečně, například při víření). Samčí tykadla druhého páru jsou zvětšená, hákovitá, druhově specifická a slouží k přichycení samice během kopulace (tzv. objímavé končetiny) (Sedlák, E.; 2003)..

rod: *Artemia*



obr. 2 Zástupci rodu *Artemia*. Vpravo samice, vlevo samec. Snímky ze stereomikroskopu. (Lavens, P.; Sorgeloos, P., 1996).

Tělo, obvykle 8-12 mm dlouhé, je rozděleno na 3 části: hlava, hrud' a zadeček. (Cassel, J. D.; 1937). Celé je pokryto tenkou, pružnou kutikulou z chitinu, ke které jsou přichyceny svaly. V larválním stadiu je kutikula tenká 0,3 – 1,0 $\mu$ m po celém povrchu těla. Je rozdělená na vnější a vnitřní fibrózní prokutikulu bez diferenciované exogenní a endogenní části. Kutikula pokrývající dospělé se od larvální liší, její tloušťka se mění s částmi těla i pohlavím. Vnitřní kutikula je členěná na více částí. Rozdíly v jejím složení u larev a dospělců jsou dány odlišnými metodami syntézy sloučenin, ze kterých se skládá (Freeman, 1989).

Hlava představuje nejspecializovanější část těla, je členěná do šesti segmentů, které obsahují mj. smyslové a nervové tkáně, část exkrečních orgánů a trávicího systému. *Prostomia* je bez tykadel. Ta jsou připojena k metamerním částem (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, a).

K první metamerní části jsou připojena prvotní tykadla. Jedná se o válcové trubičky s velmi poddajnými stěnami, které se mohou ohnout všemi směry. Centrální dutinu každého tykadla tvoří sinus inervovaný 2 nervy, z nichž alespoň jeden vede ze špičky tykadla do gangliových buněk (Tyson, G. E., 1980). Druhý segment hlavy nese pár spojených sekundárních

tykadel, která se podstatně liší u samčích a samičích jedinců (Cassel, J. D., 1937). Třetí segment hlavy je výrazný díky kusadlům. Každé kusadlo je vybaveno zuby, které slouží k mechanickému zpracování částic získaných filtrováním vody. Čtvrtý segment nese primární horní čelist. Pátá část je kompletně spojená se čtvrtou částí a společně s ní vytváří základ sekundární horní čelisti (G. R. J.; Macrae, 2002, a).

Hrud' je složena z jedenácti segmentů, z nichž každý má pár spojených listovitých přívěsků (*phylopod* nebo plovacích nohou), které slouží k pohybu, osmoregulaci, dýchání a výživě. Plovací nožky prvního a posledního segmentu jsou nejmenší, velikost a délka se zvětšují z obou stran směrem ke středu hrudi (tvoří okolo těla malý oblouk). Hrudní končetiny vymezují ventrální kanál („food groove“), kterým je vedena potrava. Trny a brvy pokrývající nožičky značně zvětšují jejich funkční oblast a díky nim se žábřonozkám také lépe plave. Okraje brv jsou pokryty štětkami (*setulae*), které tvoří účinný nástroj na filtrování potravy. Inervace těchto brv zatím nebyla uspokojivě popsána. Larvy se živí pomocí tykadel a filtrací vody přes čelisti (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, a). Dospělci využívají k získání potravy „food groove“, resp. brvy a štětky na jejich základních člancích (Barlow, D. I.; Sleight, M. A., 1980). Distální exopodit plní svou roli při dýchání (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, a).

Zadeček (*abdomen*) leží hned pod hrudí a skládá se z osmi prstencových částí. Nejdůležitější částí břišní dutiny jsou gonopody, které mohou být tvořeny samčími (penis) nebo samičími segmenty (Graafův folikul) (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, a).

Zaživací systém je uložen volně v hemolymfě krevního řečiště. Histologicky se člení na tři části: *stomodeum* (krátká část trávicí trubice složená z primitivních úst, jícnu a střední části trávicí trubice), *proctodeum* (koncové, zadní střevo) a *caeca* (slepá střeva, ve která ústí jícn a střední část trávicího traktu) (Schrehardt, A., 1987).

Povrch střední části trávicí trubice je lemován dlouhými drobnými mikroklky, které jsou pokryty vrstvou mukopolysacharidů (Kikuchi, S., 1972). Vnitřní část vylučovací trubice je obklopena peritrofickou membránou. U nauplií tyto mikroklky chybí, ale peritrophická membrána pravděpodobně pochází z měchýřků, ve kterých jsou uloženy trávicí enzymy (Schrehardt, A., 1987).

Žábřonozky mají otevřený oběhový systém, stejně jako většina korýšů. Srdce je jednoduchá podélná trubice uložená dorzálně k zaživacímu traktu (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, a). Krevní buňky jsou améboidního tvaru, s poměrně malým jádrem a cytoplazmou plnou granul (Martin, G. G. et al., 1999).

U dospělců jsou za vylučování zodpovědné maxilární žlázy, zatímco u nižších vývojových stádií jsou to žlázy tykadel, které postupem času zakrní (Warren, H. S., 1938). Larvální tykadlové žlázy jsou uloženy na boku hlavy nebo po obou stranách zaživacího traktu, kde vyrůstají sekundární tykadla. Maxilární žlázy vyčnívají z těla hned za kusadly (Martin, G. G. et al., 1999).

Nervová soustava žábřonožek je tvořena mozkovým gangliem. Doposud byly popsány dva typy nervových buněk : větší gangliové buňky (obsahující velké množství cytoplasmy a jádro s malým množstvím chromatinu) a menší neurony s jedním nervovým výběžkem (obsahující méně cytoplasmy a relativně velké jádro plné chromatinu) (Benesch, R., 1969).

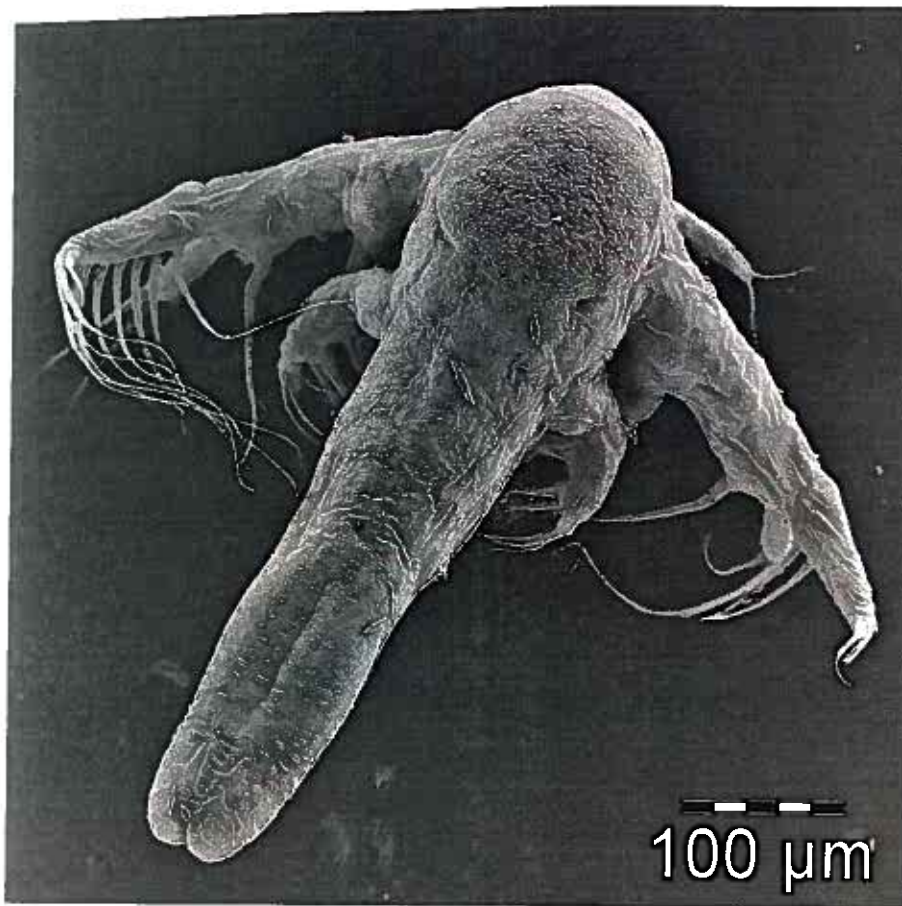
Protocerebrum dostává nervové signály z frontálních orgánů a očí nauplií. V deutocerebru, které je od protocerebra zřetelně odděleno, se nacházejí propojená pravá a levá ganglia prvního tykadla (Hanström, B., 1928).

Tito korýši mají dvě oddělené složené oči na pohyblivých stopkách. Jedno složené oko tvoří asi tři sta jednoduchých oček, která jsou složena z krystalického kužele a buněk retinuly (nervový receptor tvořící část složeného oka). Krystalický kužel je zodpovědný za adaptaci na světlo (Nilsson, D. E.; Odselius, R., 1981) .

U nauplií plní funkci zrakového orgánu jediné středové oko uprostřed hlavy (Warren, H. S., 1930).

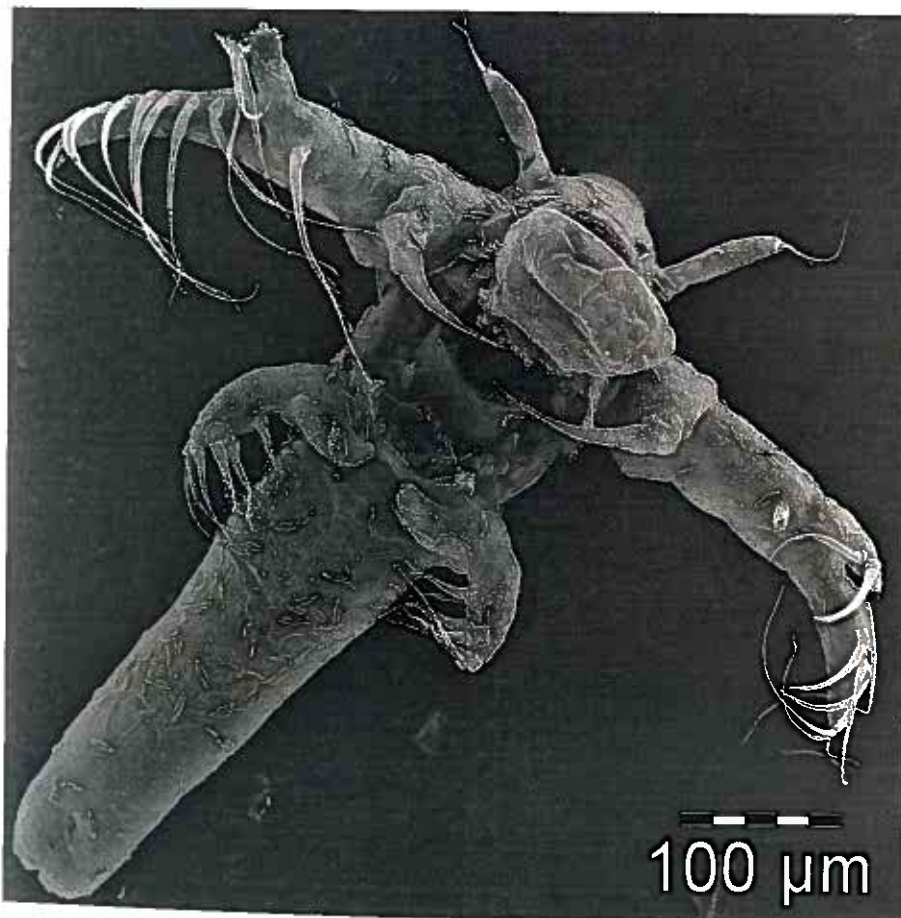
Samičí reprodukční orgány tvoří pár vaječnicků a vejcovodů vedoucí do jediného Graafova folikulu. Dospělá samice ovuluje zhruba každých 140 hodin, v závislosti na okolních podmínkách a podle toho, jestli se jedná o vejcorodost nebo vejcoživorodost (Metalli, P.; Ballardin, E., 1970) .

Samčí rozmnožovací aparát se sestává z páru varlat, které obsahují somatické a zárodečné buňky, přídatných žláz a dvojitého penisu (Cassel, J. D., 1937).



**obr. 3** *Artemia salina*, L.  
48 hodin starý jedinec.

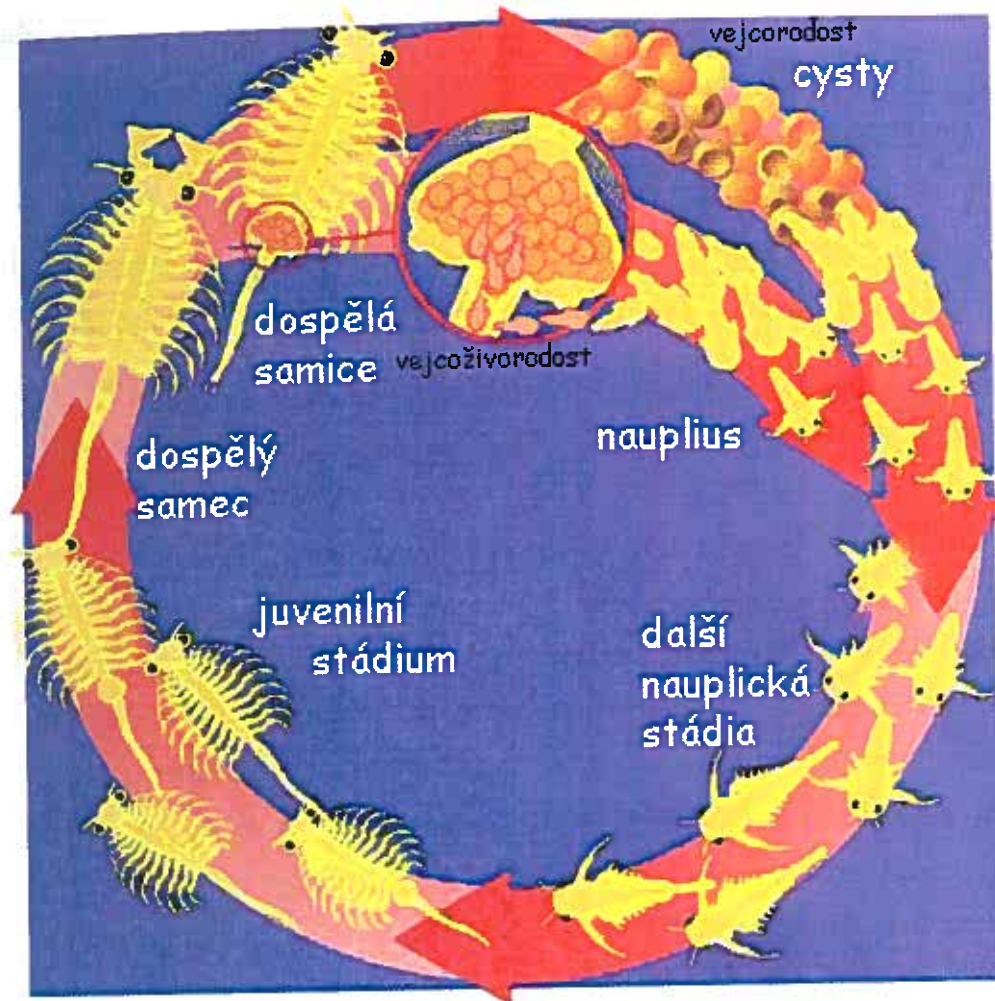
Dorzální pohled.  
(obr. poskytla mgr. J.  
Vytlačilová)



**obr. 4:** *Artemia alina*, L.  
48 hodin starý jedinec.

Ventrální pohled.  
(obr. poskytla mgr. J.  
Vytlačilová)

### 2.2.3. Vývojová stádia



obr. 5 Vývojový cyklus žábronožky. Převzato z [ut.water.usgs.gov](http://ut.water.usgs.gov) s úpravou.

Postembryotický vývoj žábronožek začíná naupliem, pokračuje larválním a juvenilním stádiem a končí dospělým jedincem.

Podle morfologických změn, které nastávají během vývoje je ale stádií mnohem více, např. Freeman (Freeman, J. A., 1989) popsal devatenáct a Benesch (Benesch, R., 1969) dokonce dvacet čtyři larválních stádií. Většina studií v dnešní době vychází ze Schrehardtova schématu (Schrehardt, A., 1987), ve kterém pomocí elektronového mikroskopu popsal vývojová stádia druhu *Artemia franciscana* vedoucí k dospělci následovně: jeden nauplius, čtyři metanauplická stádia, sedm postmetanauplických a pět postlarválních stádií (Schrehardt, A., 1987).

Schredhardtův popis vychází z fází mezi jednotlivými svlékáními kutikuly.

K rozlišení nauplií a metanauplií slouží růst nebo zmenšení tykadel či kusadel. Metanauplia a postmetanaupliární stádia vývoje jsou charakterizována členěním a dalším



vývojem maxil, hrudních segmentů a hrudních končetin (Schrehardt, A., 1987). Postlarvální stádium se vyznačuje přeměnou tykadel a reprodukčních orgánů do jejich konečné podoby (Criel, G. R. J.; Macrae, 2002, b).

Cysty žábronožek jsou pravděpodobně ze všech vývojových stádií, která se během života různých zvířat střídají, nejodolnější vůči nepříznivým podmínkám. Po té, co jsou žábronožky schopny pohybu, stávají se z nich organismy s nejlepší osmoregulací ve zvířecí říši. Díky této adaptaci se z tohoto korýše stal organismus široce využívaný ke studiu obecných biologických pochodů (Clegg, J. S.; Trotman, C. N. A., 2002).

V závislosti na okolních podmínkách může žábronožka klást vajíčka jedním z těchto dvou způsobů: *Vejcoživorodost*, kdy se nauplia líhnou ihned po naklazení. Nebo, při nepříznivých podmínkách okolí, *vejcorodost*, jejímž výsledkem jsou cysty, které ihned vstupují do diapauzy (stádia vegetativního klidu) (Lavens, P.; Sorgeloos, P., 1987). Schopnost těchto cyst přežít v extrémně nepříznivých podmínkách (např. při 103°C bez významného vlivu na pozdější líhnutí) je obdivuhodná (Hinton, H. E., 1968). Pro vysvětlení vysoké odolnosti cyst v extrémních podmínkách bylo vyvinuto několik teorií, např.: Teorie vypaření vody (WRH) zdůrazňuje důležitost přítomnosti disacharidu trehalosy, která mimo jiné chrání membrány a proteiny před škodlivými účinky dehydratace svou schopností nahradit strukturální vodu, která je asociovaná s jejich povrchem. V pozdějších vývojových stádiích už nebyla přítomnost trehalosy pozorována (Crowe, J. H. et al., 1981).

Diapauza je ukončena podněty okolí, jejichž intenzita se druh od druhu liší (Lavens, P.; Sorgeloos, P., 1987). Končí ve chvíli, kdy jsou přijatelné podmínky pro pokračování vývoje, tzn. optimální dostupnost kyslíku, optimální teplota a složení vody. Inertní kutikula, která kryje embryo je nepropustná pro netěkavé roztoky a to je s největší pravděpodobností příčinou toho, že se žábronožky adaptovaly na život v prostředí s vysokou salinitou (De Chaffoy, D. et al., 1978). Larvy, které se líhnou po skončení diapauzy jsou morfologicky stejné jako ty, které se vylíhly hned po naklazení vajíček (Liang, P.; MacRae, T. H., 1999).

#### 2.2.4. Celosvětové rozšíření

Zástupci rodu *Artemia* obývá všech pět kontinentů, žijí v řadě slaných jezer, pobřežních lagunách a v místech na výrobu soli.

Již v roce 1915 publikovat Abonyi seznam osmdesáti míst, na kterých se žábřonožky vyskytují, rozmístěných v jednadvaceti státech. V roce 1980 se počet známých míst rozrostl na dvě stě padesát a počet zemí na čtyřicet osm (Persoone, G.; Sorgeloos, P., 1980). Jedna z posledních studií uvádí zhruba pět set lokalit výskytu tohoto koryše (Triantaphyllidis, G. V. et al., 1998).

Rozložení těchto míst je velmi nerovnoměrné.

Rozšíření populací žábřonožky je limitováno dvěma kritickými faktory. První z nich je dán tím, že jsou to organismy žijící celoročně ve vodě (kromě cyst), a druhým jsou podmínky životního prostředí, které musí být optimální (Lenz, P. H., 1987).

V přirozeném prostředí je těžké najít pozitivní či negativní interakce mezi jednotlivými faktory, jako je salinita, teplota a dostatek potravy, které ovlivňují životní vývoj žábřonožek (Browne, R. A., 1982).

Společným rysem všech míst, na kterých se žábřonožky nacházejí je jejich vysoká salinita. Bezpochyby je tento abiotický faktor jedním z rozhodujících prvků, které mají vliv na rozšíření jednotlivých druhů. Vysoká koncentrace solí je také mj. spojená s menším výskytem přirozených predátorů, kterých mají žábřonožky velké množství. Ostatní faktory (teplota, množství světla a potravy) ovlivňují především kvantitativní aspekt rozšíření populace a mohou také způsobit dočasnou absenci těchto koryšů. Na druhou stranu, ne všechna vodstva vyznačující se vysokou salinitou žábřonožky obývají. Většinou se nenachází ve vodách s extrémní koncentrací soli (>200ppt) nebo jezerech s vysokým obsahem síranů. V Austrálii je menší výskyt rodu *Artemia* přisuzován přítomnosti kompetujícího rodu *Parartemia*. V ostatních případech, tzn. pokud se nejedná o extrémní koncentrace soli nebo o přítomnost kompetujícího druhu, jde s největší pravděpodobností o nedostatek cest, kterými se mohou žábřonožky rozšířit (vítr, ptáci...) (Van Stappen, G., 2002).

Žábřonožky byly nalezeny i v jezerech, jejichž salinita se pohybovala okolo 340 ppt (Post, F. J.; Youssef, N. N., 1977). V tomto extrémním případě zvířata ale jen stěží přežívala a jejich normální fyziologické a metabolické funkce byly vážně narušené. Opačný extrém, tzn. minimální salinita, při které jsou žábřonožky ještě schopny přežít byla méně než 45 ppt (Persoone, G.; Sorgeloos, P., 1980). Při takto nízké koncentraci solí ale dospělci rychle umírají a

nauplia dorůstají velmi pomalu. Důvodem, proč tyto organismy vyhledávají místa s takto vysokou, popř. nízkou koncentrací solí je ten, že nemají žádný přirozený obranný mechanismus proti predátorům. Žábřonožky jsou složkou zooplanktonu, kterým se živí převážné množství vodních živočichů. Pokud tedy budou žít v prostředí, kde je salinita tak vysoká, že tam jiné organismy žít nemohou, několikanásobně se zvýší jejich šance na přežití. Pro většinu přirozených nepřátel těchto koryšů je optimální salinita prostředí mezi 80-100 ppt (Hedgpeth, J. W., 1959).

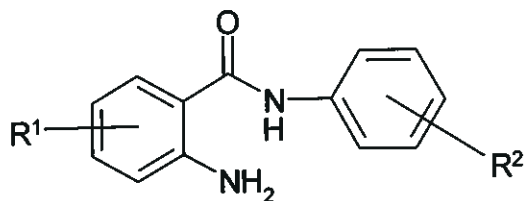
Zatím nebyla jasně definovaná optimální salinita prostředí jednotně pro všechny zástupce rodu *Artemia*. Z fyziologických důvodů musí být tato koncentrace někde mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou, spíše ale v blízkosti nižší hranice. Čím vyšší je totiž salinita prostředí, tím víc energie spotřebují žábřonožky na regulaci osmózy. V neposledním případě hraje okolní salinita důležitou roli, při vývoji z cyst, ty se začnou vyvíjet dál ve chvíli, kdy jsou v jejich okolí optimální podmínky, včetně salinity. Například pro organismy žijící v zátocě San Francisco Bay je tato hraniční hodnota 85 ppt, nad touto hranicí líhnutí nezačne, protože se cysty nedostatečně hydratují a dostatečná hydratace cyst je nezbytnou podmínkou líhnutí (Lavens, P.; Sorgeloos, P., 1987).

Stejně jako snáší žábřonožky různou salinitu, jsou také schopny přežít ve vodě, ve které je poměr hlavních kationtů a aniontů zcela odlišný od mořské vody (Persoone, G.; Sorgeloos, P., 1980). Poměr  $Na^+/K^+$  je v mořské vodě 28, ale žábřonožky jsou schopny žít při hodnotách 8-173. Iontové složení přirozeného prostředí žábřonožek může rozhodovat o ekologické izolaci některých druhů a také může být jedním z důvodů morfologických odlišností, které u jednotlivých druhů nacházíme (Bowen, S. T. et al., 1985).

Dalším z limitujících faktorů výskytu je teplota vody. Žádný druh žábřonožky nebyl nalezen v zemi s velmi chladným klimatem. Zdá se, že *A. franciscana* není schopna přežít delší dobu při teplotách nižších než 5°C (Gajardo, G.; Beardmore, J. A., 1993). Ovšem kromě cyst, které přežijí i mnohem nižší teplotu, nejnižší naměřená teplota, které byly cysty vystaveny a byly schopny se potom vylíhnout, byla v blízkosti absolutní nuly (2K) (Skoultchi, A. I.; Morowitz, H. J., 1964). Maximální teplota, která žábřonožkám vyhovuje se pohybuje okolo 35°C, ale fyziologická adaptace jim umožňuje přežít po krátký čas (několik týdnů) při 40°C (Clegg, J. S. et al., 2001). Tento fakt opět neplatí pro cysty, které byly vystaveny teplotám přes 100°C a stejně si uchovaly schopnost se vylíhnout (Vanhaecke, P.; Sorgeloos, P., 1989). Pro většinu druhů se optimální teplota pohybuje mezi 25 a 30°C.

## 2.3. *Testované chemické látky*

### 2.3.1. Anthranilanilidy



$R^1; R^2 \dots -H; -NH_2; -OH; -X; \text{alkyl} \dots$

Anthranilanilidy, jsou látky, které byly odvozeny od salicylanilidů záměnou fenolické skupiny v poloze 2 za aminoskupinu. Jedná se tedy o jejich izosterní dusíkatá analoga.

Salicylanilidy jsou již řadu let známy svými biologickými účinky, které mohou být v závislosti na substituci velmi rozdílné. Mezi sloučeninami s touto chemickou strukturou nacházíme zástupce z řady neuroleptik, antimykotik, analgetik, antiflogistik, diuretik, choloretik a dalších. Dříve byly tyto sloučeniny používány ve velkém množství v medicíně, kosmetice (např. jako desinfekční prostředky) i v technických oborech (průmyslové antioxidanty) (Kubicová, L.; Waisser, K., 1992).

Řady toxikologických studií, které byly se salicylanilidy provedeny, prokázaly, že mají tyto látky nízkou toxicitu (akutní i chronickou) a jejich aplikace nevede k žádným orgánovým změnám. Po zavedení do praxe se ale začaly objevovat první nežádoucí účinky halogenovaných salicylanilidů, po které se u exponovaných jedinců objevila fotokontaktní dermatitida. Výsledky následných studií vedly k odklonu od používání těchto látek v medicíně (Kubicová, L.; Waisser, K., 1992).

Objev nových mechanismů účinku salicylanilidů a jejich strukturních analogů vede k širšímu studiu jejich potenciální antimykobakteriální a antifungální aktivity (Pravda, M. et al., 2004.; Waisser, K. et al., 2003).

U salicylanilidů byla objevena schopnost inhibovat bakteriální dvoukomponentový regulační systém. (Macielag, M., J. et al., 1998; Ellsworth, E. L. et al., 1999). Bakterie díky tomuto systému rychle a flexibilně reagují na změny prostředí, včetně působení antibiotik. Salicylanilidy inhibicí důležitých signálních drah bakterií způsobí smrt bakteriální buňky. Výhoda použití látek s tímto mechanismem účinku spočívá v tom, že u člověka nebyly podobné signální dráhy nalezeny (Kauppi, A. N. et al., 2003).

O biologické aktivitě anthranilanilidů toho zatím moc známo není. Dříve byly používány jako meziprodukty pro syntézu heterocyklů a barviv, a proto nebylo potřeba

detailněji studovat jejich působení na biologické systémy. Struktura těchto látek obsahuje místo fenolické skupiny aminoskupinu, z toho lze usuzovat, že nebudou vyvolávat alergii v takovém rozsahu jako salicylanilidy.

Biologická aktivita byla studována u šestnácti různě substituovaných amidů kyseliny anthranilové. Jednalo se například o studium vlivu na centrální nervový systém a motorickou aktivitu, na kardiovaskulární systém, potenciální antiflogistické a analgetické účinky (Heindel, N. D. et al., 1971).

Centrální nervový systém ovlivňovaly deriváty anthranilanilidů substituované v poloze 5 chlorem nebo v poloze 2 methylem, popř. methylem či fenylem na dusíku amidové funkční skupiny. Při studiu těchto látek byla pozorována zjevná myorelaxace. Další látka působící tlumivě na centrální nervový systém je 5-chloranthranilanilid, na jehož aminoskupině v poloze 2 byla provedena substituce methylem. Nesubstituovaný 5-chloranthranilanilid sice neovlivňuje centrální nervový systém, ale byl studován pro svůj antiflogistický účinek, kterým předčil kyselinu acetylsalicylovou. Jako další potenciálně antiflogistické látky se ukázaly anthranilanilidy substituované na aminoskupině v poloze 2 methylsulfonylskupinou, které v poloze 4' obsahovaly akceptory elektronů (Nakamura, K. et al., 1993).

Jako potenciální neuroleptika byla studována skupina různě substituovaných anthranilanilidů. Kladný vliv na účinek měly zejména substituce v acylové části molekuly, konkrétně substituce fluorem v poloze 4 a aminoskupinou v poloze 2 (Norman, M. H. et al., 1996).

U anthranilanilidů, které byly v polohách 2', 3', nebo 4' monosubstituovány, popř. v polohách 2',4' nebo 2', 6' nebo 3', 5' disubstituovány methylem byla studována antikonvulzivní aktivita (Clark, C. R. et al., 1986).

Anthranilanilidy se substituovaným benzoylem navázaným na aminoskupině v poloze 2 jsou inhibitory koagulačního faktoru Xa. Mohly by se tedy stát léčivy používanými při léčbě tromboembolie (Yee, Y. K. et al., 2000).

Pro své insekticidní účinky byly patentovány anthranilanilidy s disubstituovanou aminoskupinou v poloze 2, substituované v kyselé části molekuly minimálně jedním, maximálně čtyřmi atomy chloru nebo bromu (J. R. Geigy A, 1961).

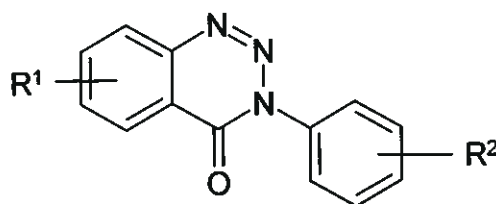
U některých anthranilanilidů, obzvláště pak u látek, které obsahují v poloze 3, popř. 3 a 5 nitroskupinu, byl pozorován cestocidní účinek. Nejúčinnější ze série testovaných látek byl 2'-chlor-3,4',5'-trinitroanthranilanilid (Piskov, V. B. et al., 1973).

Při testování různě substituovaných *N*-fenylanthranilových kyselin byla nalezena antimykobakteriální aktivita proti všem testovaným kmenům (Goldberg, A. A et al., 1948).

Uzavření kruhu na 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony vede ke ztrátě tohoto účinku (Kubicová, L. et al., 2000).

V neposlední řadě byla u anthranilanilidů studována i antivirová aktivita proti viru *Herpes simplex*. Jednalo se o studium především některých halogenovaných sloučenin s acetylovanou aminoskupinou. U těchto látek se ale nepodařilo prokázat příznivou aktivitu. Stejně tak jako při testech proti viru HIV, kde byly zkoušeny anthranilanilidy s halogenalkanoyl skupinou vázanou na benzamidový kruh pomocí amidové vazby. Antivirová aktivita byla ale prokázána u látek, u kterých je halogenalkanoyl vázán na benzamidový kruh thioesterovou vazbou (Turpin, J. A. et al., 1999).

### 2.3.2. 3-Aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony



$R^1$ ;  $R^2$  ... -H; -NH<sub>2</sub>; -OH; -X; alkyl...

Tyto látky jsou izosterními analogy derivátů chinazolinu a benzoxazinu, mezi kterými se nachází řada látek s biologickou aktivitou (Waisser, K.; Kubicová, L., 1993).

U těchto sloučenin, na rozdíl od jejich otevřených analog, nebyla nalezena antimykobakteriální ani antifungální aktivita (Kubicová, L. et al., 2000). Jistý antimikrobiální účinek vykazují 3-sulfonyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony (Jinbo, Y.; Takeuchi, Y., 2001), thiokyanomethyloxo-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony a thiokyanothiomethyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ony, které byly pro tento svůj účinek i patentovány (Shankar, R. B. et al., 1998).

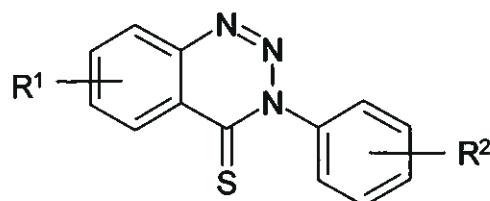
Nesubstituovaný 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on vykazuje herbicidní a insekticidní účinky. Používá se také pro své repelentní účinky na ptactvo. U této látky byl podrobně prostudován její toxický vliv na člověka, mj. proto že při širším používání vstupuje do potravního řetězce (Clark, L. et al., 1991).

Jako potencionální antiepileptika byly testovány sloučeniny odvozené od 3-benzyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-onu. Při podávání potkanům se jevily jako netoxické a relativně dobře účinné po p.o. podání. Nejúčinnějšími látkami z této skupiny byly nesubstituovaný 3-benzyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on a 2,3-dichlorbenzylderivát (Komet, M. J., 1997).

Studium 3-substituovaných derivátů 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-onu, které obsahují v poloze 3 aryl, prokázalo, že tyto látky mají afinitu k 5-HT<sub>1a</sub> serotoninovým, D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> dopaminovým a α<sub>1</sub> a α<sub>2</sub> adrenergním receptorům (Caliendo, G. et al., 2000).

Deriváty 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-onu obsahující v obou částech molekuly chlor a substituované v poloze 2' různými skupinami byly patentovány pro své sedativní, hypnotické, myorelaxační a antisklerotické vlastnosti (Goedecke A.-G., 1970).

### 2.3.3. 3-Aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony



R<sup>1</sup>; R<sup>2</sup> ... -H; -NH<sub>2</sub>; -OH; -X; alkyl...

Vlastnosti těchto látek nebyly v literatuře doposud popsány. Nesubstituovaný 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thion a některé jeho deriváty se využívají při organických syntézách. 4-Sulfanyl-1,2,3-benzotriazin byl studován kvůli potenciální adrengní aktivitě, kterou se při podrobnějších studiích nepodařilo prokázat (Grundmann, Ch., 1959).

Od 4-sulfanyl-1,2,3-benzotriazinu odvozené organofosfáty byly patentovány jako insekticidy (Schicke, H. G., 1964).

**3.**

# **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



### 3.1. Metodika testování látek pomocí *Artemia salina*

Krátkodobé testy s *A. salina* pro stanovení parametrů toxicity odlišných chemických látek jsou využívány v mnoha laboratořích po celém světě. Bylo vypracováno několik metodik pro samotné provedení testu (např. Solis, P. N. et al., 1993).

Při vlastním testování jsme vycházeli z postupů navržených skupinou Paula Vanhaecke (Vanhaecke et al., 1981).

#### 3.1.1. Vlastí provedení

##### *Líhnutí a příprava nauplií*

Podrobně popsány později v kapitole 3.4.2 Příprava testovacího organismu *Artemia salina*.

##### *Obecný test pro stanovení toxicity*

Test je prováděn v malých Petriho miskách. Do každé z nich je pomocí pipety přeneseno asi deset nauplií. Množství vody, která se do misky dostane s nauplii by mělo být minimální. Do každé misky se přidá 10ml roztoku chemikálie o příslušné koncentraci. Petriho misky se uzavřou a nechají inkubovat ve tmě při 25°C.

Po 24 hodinách se spočítají uhynulí jedinci. Za mrtvé jsou považovány všechny larvy, u kterých není pozorován pohyb déle než deset sekund.

##### *Předběžný test*

Tento test je prováděn kvůli stanovení „kritického rozmezí“ koncentrací testované látky. Je připravena sada odstupňovaných koncentrací, kterých je dosaženo postupným ředěním nejkonzentrovanejšího roztoku testované látky. Příklad ředění chemických látek: 10 000, 1 000, 100, 10... mg/l. Předběžný test je proveden pouze s jednou Petriho miskou pro každou koncentraci. Miska, ve které je pouze mořská voda a nauplia, slouží jako kontrola.

##### *Konečný test*

Cílem testu je co nejpřesněji stanovit hodnotu EC<sub>50</sub>, tzn. koncentraci, při které uhyne během 24 hodin 50% jedinců. „Kritické rozmezí“ koncentrací je známo díky předběžnému testu. U konečného stanovení je použito jemnějšího ředění. Pro testování by mělo stačit pět odstupňovaných koncentrací. Uspokojivé hodnoty EC<sub>50</sub> jsou dosaženy pokud je rozsah úmrtnosti v miskách od 5 do 95%. Pokud tomu získané hodnoty neodpovídají je další test

proveden s jinými koncentracemi z „kritického rozmezí“. U všech koncentrací musí být přítomna kontrola. Pro dostatečné výsledky je potřeba každý test minimálně třikrát opakovat.

### ***Kontrola citlivosti nauplií***

Při každém pokusu musí být, pro ověření stability a citlivosti dané metody, paralelně proveden test se standardním toxinem (např. laurylsíran sodný).

### **3.1.2. Vyhodnocení**

Hodnoty  $EC_{50}$  mohou být získány grafickou interpolací. Z dosažených výsledků jsou spočítána procenta úmrtnosti u jednotlivých koncentrací. Poté je sestrojena grafická závislost úmrtnosti na koncentraci a z přímky, která vznikne proložením získaných bodů, je odečtena hodnota  $EC_{50}$ .

Získané výsledky jsou považovány za platné pokud není procento úmrtnosti v kontrolách vyšší než pět.

## **3.2. Testovaný organismus Artemia salina**

### **3.2.1. Původ a skladování cyst**

Cysty, které byly pro experimenty použity dodává na náš trh německá firma JBL (*Novo-Temia, Artemia Eggs*).

Cysty žábřonožek se dají zakoupit ve většině obchodů, které nabízejí sortiment pro akvaristy. Jsou prodávány v neprodyšných sáčcích nebo konzervách. Po otevření musí být zajištěno uchování bez přístupu vzdušné vlhkosti a světla.

Vajíčka jsou uchovávána v lednici při 5 °C. Jsou uzavřena ve skleněné lahvi, která je umístěna v exsikátoru. Hygroskopickou náplní je v tomto případě oxid fosforečný (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Líhňivost cyst je dodavatelem garantována po dobu dvou let.

### **3.2.2. Líhnutí vajíček**

Vajíčka žábřonožek jsou umístěna do mořské vody o známém pH, teplotě, salinitě a množství rozpuštěného kyslíku. Během několika hodin dochází k vylíhnutí. Teplota 25°C zaručuje, že nauplia, která budou použita pro pokus jsou vylíhnutá do 24 hodin. Kvalitní cysty zaručují vysokou líhňivost, která se blíží 100%. Nevylíhlá vajíčka zůstávají obvykle ležet na dně a prázdné skořápky plavou na hladině. Při jednom cyklu líhnutí získáme pro následující pokus stovky organismů, u kterých je, díky stejným podmínkám vývoje, zaručena vysoká homogenita.

### 3.3. Chemikálie, pomůcky a zařízení

#### 3.3.1. Použité chemické látky

##### *Pro přípravu mořské vody:*

Destilovaná voda

Chlorid sodný (NaCl) (PLIVA - Lachema a. s.)

Chlorid hořečnatý ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (PENTA)

Síran sodný ( $Na_2SO_4$ ) (PENTA)

Chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ ) (PENTA)

Chlorid draselný (KCl) (PLIVA - Lachema a. s.)

##### *Pomocné látky:*

Dimethylsulfoxid (Fluka)

Hydroxid sodný – 0,04M roztok

Kyselina chlorovodíková – 0,1M roztok

##### *Testované látky:*

Chlorid manganatý p. a. ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (Fluka)

RAM 108 (3',4'-dichloranthranilanilid)

RAM 109 (anthranilanilid)

RAM 110 (4'-metylanthranilanilid)

RAM 111 (3',4'-dichlorthioanthranilanilid)

RAM 112 (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on)

RAM 113 (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion)

RAM 212 (4', 5-dichloranthranilanilid)

Všechny testované látky, kromě  $MnCl_2$ , byly získány z katedry anorganické a organické chemie.

### 3.3.2. Pomůcky a laboratorní vybavení

#### ***Pomůcky:***

Kádinky 25 a 50 ml

Váženka

Laboratorní lžička

Teflonové míchadlo

Automatické mikropipety a špičky 20-200  $\mu$ l; 50-200  $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l; 0,5-5,0 ml

Skleněné zásobní lahve s plastovým uzávěrem 100 ml; 250 ml; 500 ml a 1000 ml

Petriho misky skleněné (průměr 10 cm)

Petriho misky plastové (průměr 10 cm) s perforovanou přepážkou

Teploměr

Zkumavky se zábrusem

Stojan na zkumavky

Mikrotitrační desky s 96 jamkami

Stereomikroskop

#### ***Přístroje:***

Předvážky Kern 440-47N

Analytické váhy Kern Abj

Míchačka MM2A (Laboratorní přístroje Praha)

pHmetr pH/Cond 340

Oxymetr Oxi 340

Termostat VTB Binder

Ultrazvuková lázeň Bandeln

Stereomikroskop

### 3.4. Příprava a provedení experimentu

#### 3.4.1. Příprava mořské vody

Standardní uměle vytvořená mořská voda používaná pro líhnutí cyst a pro samotný experiment má obvykle salinitu  $35 \pm 1\text{‰}$  (Vanheacke et al., 1981).

Pro její přípravu je použita směs solí.

Složení (na 1000 ml): chlorid sodný (NaCl) 23,00g

chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 11,00 g

síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 9,07 g

chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ) 2,11g

chlorid draselný (KCl) 0,70 g

destilovaná voda do 1000 ml

Po navážení všech součástí je voda ve skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem umístěna na míchačku a tam je pomocí teflonového míchadla zajištěno šetrné míchání až do rozpuštění všech komponent roztoku.

Po rozpuštění všech solí se pH vody pohybuje okolo  $8 \pm 0,2$ . Pokud se naměřená hodnota pH liší, tak je upravena pomocí roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Před použitím vody pro vlastní pokus je možné ji zfiltrovat kvůli odstranění případných mechanických nečistot.

Množství rozpuštěného kyslíku by nemělo klesnout pod 90%.

#### 3.4.2. Příprava testovacího organismu *Artemia salina*, L.

Pro každý test bylo použito 0,5g cyst a na jejich líhnutí 25 ml uměle připravené mořské vody. Vajíčka navážená do skleněné Petriho misky byla smáčena 3 ml připravené mořské vody.

Po 5 minutách bylo opatrně přidáno zbývajících 22 ml mořské vody. Petriho miska s vajíčky uzavřená víčkem byla umístěna asi 30cm od lampy se 100W žárovkou. V této vzdálenosti se teplota pohybuje mezi 25 a 30°C.

Po jedné hodině zahřívání je miska s vajíčky přemístěna do inkubátoru. Tady za nepřítomnosti světla a při konstantní teplotě 25°C zůstávají 24 hodin.

Druhý den je polovina Petriho misky zakryta materiálem nepropouštějícím světlo (např. černým papírem) a miska je znovu umístěna asi 30 cm od lampy se 100W žárovkou. Díky fototaxi se žábřonožky nahromadí na nezakryté straně Petriho misky.

Asi po 30 minutách jsou z hladiny filtračním papírem odstraněny skořápky. Z osvětlené strany misky jsou pomocí mikropipety postupně odebírána nauplia do druhé plastové Petriho misky s dělicí příčkou, ve které je asi 10 ml připravené mořské vody.

Část plastové Petriho misky, do které byla umístěna nauplia je zakryta neprůsvitným materiálem. Celá miska se přesune na 30 minut znovu pod lampu se 100W žárovkou.

Po této době je asi 20ml suspenze nauplií ze strany, která nebyla zakryta přenesena do lahve s 25ml připravené mořské vody. Z této lahve jsou potom žábřonožky odebírány pro vlastní pokus.

### **3.4.3. Příprava testovaných látek**

Všechny testované látky, kromě standardního toxinu (chlorid manganatý,  $MnCl_2$ ), byly testovány v milimolárních koncentracích. Množství látky, které odpovídalo nejvyšší koncentraci, bylo naváženo a rozpuštěno v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo byla použita připravená mořská voda o  $pH\ 8,0 \pm 0,2$  s přídavkem DMSO (0,0-2,0%). Pro dokonalé rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň, ve které se testované látky rozpouštěly několik hodin.

Koncentrační řada byla připravena ředěním vzorku s nejvyšší koncentrací (ředící faktor: 1,25 a 1,5).

### **3.4.4. Vlastní provedení pokusu**

Vychází z metodiky, kterou navrhl Paul Vanhaecke a spol. (podrobněji v kapitole 3.1. Metodika testování látek pomocí *Artemia salina*).

Pokusy byly prováděny v plastových 96 jamkových testovacích destičkách. Každá destička má 8 řad (A-H) a 12 sloupců (1-12). Sloupce odpovídají jednotlivým koncentracím a řady opakováním jedné koncentrace. V každém sloupci je jedna jamka vyhrazena pro kontrolu pokusu.

Do každé jamky bylo umístěno 100 $\mu$ l vzorku. Po lehkém protřepání bylo do každé jamky přidáno 50 $\mu$ l suspenze nauplií (asi 10-20 jedinců).

Při každém pokusu byl proveden paralelní test se standardním toxinem (chlorid manganatý  $\text{MnCl}_2$ ).

Nakonec byly přikryté desky přemístěny na dalších 24 hodin do inkubátoru s konstantní teplotou 25°C.

Po 24 hodinách byly pomocí stereomikroskopu spočítáni uhynulý jedinci. Žijící larvy byly usmrceny pomocí 50  $\mu\text{l}$  0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Nakonec byl odečet všech jamek proveden ještě jednou.

Pokusy se všemi testovanými látkami byly provedeny třikrát.

### 3.4.5. Vyhodnocení výsledků

Získaná data je možné hodnotit pokud úmrtnost v kontrolách nepřesáhla 5%.

Po odečtení výsledků ze všech jamek a přepočet na procenta mortality byla stanovena hodnota  $\text{EC}_{50}$  s 95% intervaly spolehlivosti. Pro statistické zpracování těchto dat byl použit program Prisma 4,0.

Pro lepší představu o toxicitě testovaných látek byly tam, kde to získané výsledky umožnily, dopočítány hodnoty  $\text{EC}_{10}$ ,  $\text{EC}_{25}$  a  $\text{EC}_{80}$ .

Z primárních dat byl sestrojena grafická závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci testovaného roztoku.

Vypočítané hodnoty  $\text{EC}_{10}$ ,  $\text{EC}_{25}$ ,  $\text{EC}_{50}$  a  $\text{EC}_{80}$  byly zpracovány graficky.



# **4.**

## **VÝSLEDKY**

## Výsledky měření:

### 1. *Tabulky primárních výsledků jednotlivých měření.*

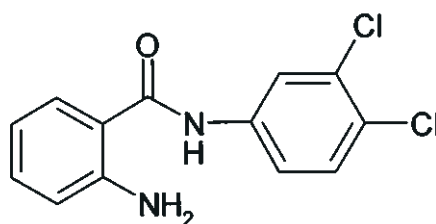
- koncentrace (mmol/l) je vyjádřena pomocí hodnoty X. Poslední hodnota ve sloupci představuje vždy kontrolní pokus, tzn. místo roztoku testované látky je v jamce pouze připravená mořská voda
- hodnoty Y odpovídají procentům úmrtnosti při paralelních stanoveních

### 2. *Konečné hodnoty EC (mmol/l) pro jednotlivé látky.*

- hodnoty EC<sub>50</sub> jsou doplněny o hodnoty EC<sub>10</sub>, EC<sub>25</sub> a EC<sub>80</sub>
- tam, kde to primární výsledky jednotlivých stanovení dovolily jsou tyto hodnoty ještě doplněny o 95% intervaly spolehlivosti

### 3. *Grafické znázornění závislosti úmrtnosti testovaného organismu Artemia salina na koncentracích roztoků testovaných látek*

#### 4.1. RAM 108 (3',4'-dichloranthranilanilid)



RAM 108 je bílá krystalická, ve vodě těžce rozpustná látka.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{10}Cl_2N_2O$

Relativní molekulová hmotnost: 281,14

Tato látka byla testována v koncentracích 15,0 – 0,02 mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 7,99 – 8,12

teplota (°C) ... 24,4 – 25,8

salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,4 - 8,9

přídavek DMSO (%; v/v) ... 0 – 1

1. Primární výsledky měření optimálního rozložení testovaných koncentrací

RAM 108								
koncentrace (mmol/l)		mortalita (%)						
	X	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
1	1,48	100	100	100	100	100	100	100
2	0,99	100	100	100	100	100	100	100
3	0,66	100	100	100	100	100	100	100
4	0,44	100	100	100	100	100	100	100
5	0,29	100	100	100	86	80	72	85
6	0,19	74	72	100	100	66	91	75
7	0,13	68	62	95	72	83	62	60
8	0,09	44	66	83	81	73	62	36
9	0,06	35	36	11	35	63	52	11
10	0,04	0	7	23	11	13	0	17
11	0,03	0	0	0	12	3	0	0
12	0,02	0	0	0	0	0	0	0
13	0,00	0	0	0	0	0	0	0

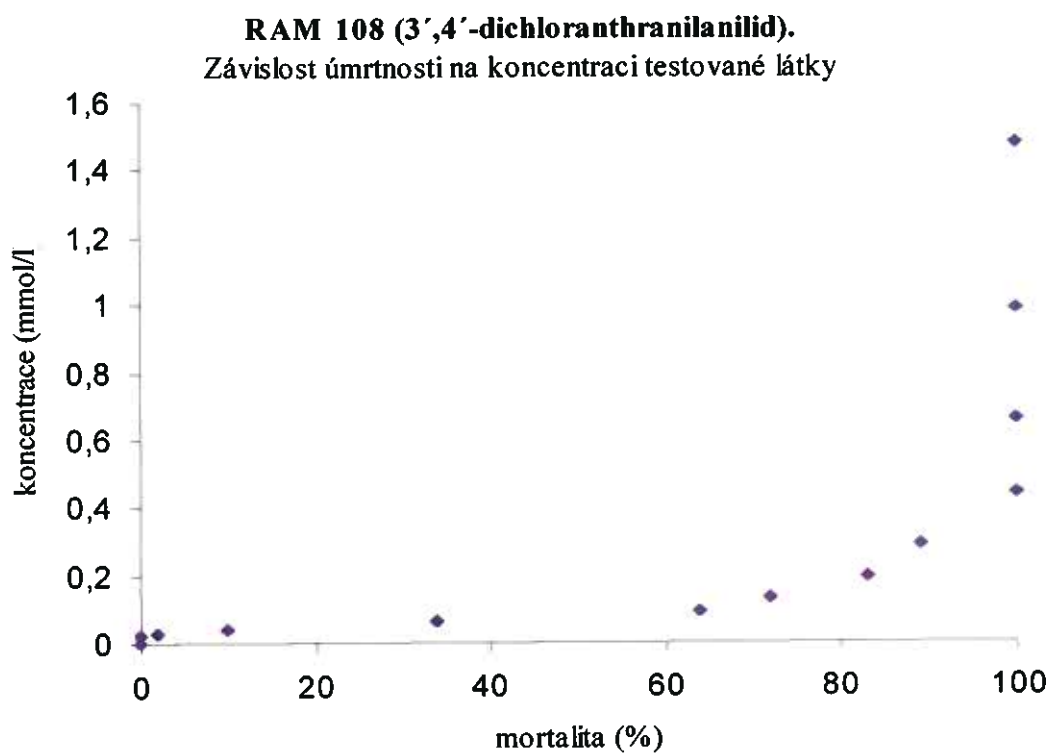
tab. 1 Primární výsledky měření. X... koncentrace RAM 108 v mmol/l. 13. koncentrace je kontrolní test. Y1-7... paralelní stanovení.

2. Konečné hodnoty EC (mmol/l)

RAM 108	
EC (mmol/l)	
EC <sub>10</sub>	0,030
EC <sub>25</sub>	0,048
EC <sub>50</sub>	<b>0,077 (0,069-0,086)</b>
EC <sub>80</sub>	0,140

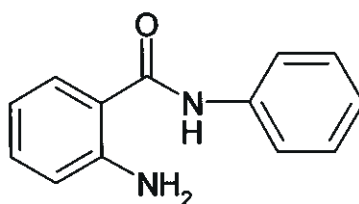
tab. 2 Konečné hodnoty EC (mmol/l). U hodnoty EC<sub>50</sub> doplněno o interval spolehlivosti 95%.

3. Grafické znázornění závislosti úmrtnosti testovaného organismu *Artemia salina* na koncentracích roztoků testovaných látek



**graf 1** Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci testované látky – RAM 108 (3',4'-dichloranthranilanilid). Hodnoty na ose y odpovídají průměru hodnot Y1-Y7 z tab.1.

#### 4.2. RAM 109 (anthranilanilid)



RAM 109 je bílá, krystalická látka, téměř nerozpustná ve vodě.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{12}N_2O$

Relativní molekulová hmotnost: 212,25

Látka byla testována v koncentracích 7,5 – 0,09 mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 8,00

teplota (°C) ... 25,8

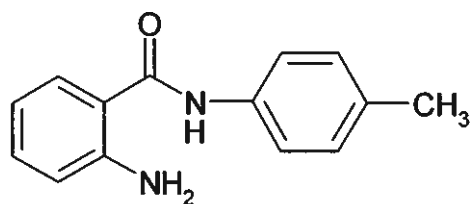
salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 8,5

přídavek DMSO (%; v/v) ... 0

Při testovaných koncentracích (7,5 – 0,09 mmol/l) se látka jevila jako netoxická.

### 4.3. RAM 110 (4'-methylantranilanilid)



RAM 110 je bílá krystalická látka téměř nerozpustná ve vodě.

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{14}N_2O$

Relativní molekulová hmotnost: 226,28

Látka byla testována v koncentracích 5,00 – 0,06 mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 7,98 – 8,00

teplota (°C) ... 25,0 – 25,6

salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,8 - 9,3

přídavek DMSO (%; v/v) ... 0 – 0,5

1. Primární výsledky měření optimálního rozložení testovaných koncentrací

RAM 110								
koncentrace (mmol/l)		mortalita (%)						
	X	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
1	5,00	97	96	91	95	99	98	96
2	3,33	87	94	93	92	91	89	90
3	2,22	83	86	85	79	66	80	83
4	1,48	48	46	48	45	46	48	49
5	0,99	43	46	60	42	40	46	48
6	0,66	39	40	42	48	46	43	42
7	0,44	39	38	41	38	37	36	34
8	0,29	37	36	24	29	30	34	32
9	0,20	22	24	26	28	32	20	18
10	0,13	16	17	18	19	15	16	18
11	0,09	9	12	10	9	8	9	10
12	0,06	8	5	3	5	6	7	5
13	0,00	0	0	0	0	0	0	0

tab. 3 Primární výsledky měření. X... koncentrace RAM 110 v mmol/l. 13. koncentrace je kontrolní test. Y1-7... paralelní stanovení.

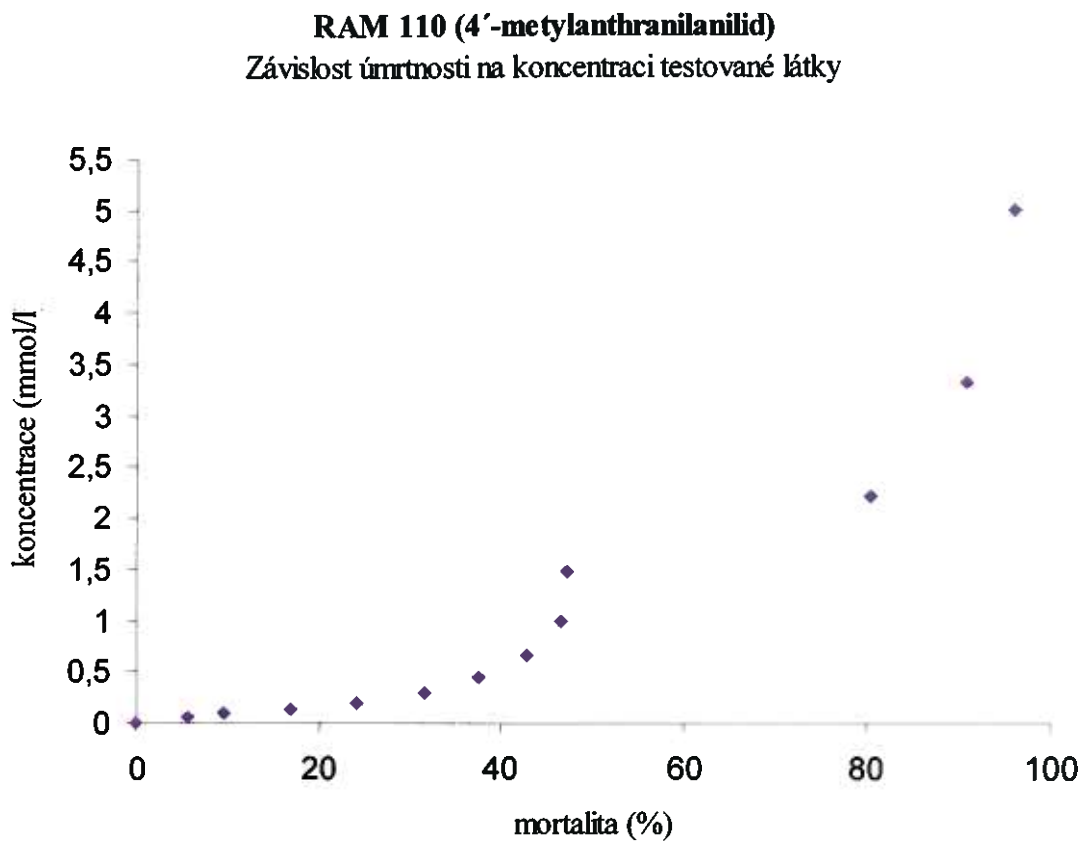
2. Konečné hodnoty EC (mmol/l)

RAM 110	
EC (mmol/l)	
EC <sub>10</sub>	0,0965
EC <sub>25</sub>	0,2805
EC <sub>50</sub>	<b>0,8141 (0,7433 – 0,8917)</b>
EC <sub>80</sub>	3,123

tab. 4 Konečné hodnoty EC (mmol/l). U hodnoty EC<sub>50</sub> doplněno o interval spolehlivosti 95%.

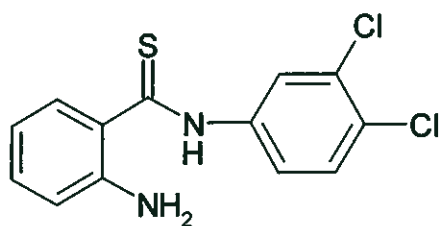


3. Grafické znázornění závislosti úmrtnosti testovaného organismu *Artemia salina* na koncentracích roztoků testovaných látek



**graf 2** Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci testované látky – RAM 110 (4'-metylanthranilanilid). Hodnoty na ose y odpovídají průměru hodnot Y1-Y7 z tab. 3.

4.4. RAM 111 (3',4'-dichlorthioanthranilanilid)



RAM 111 je žlutá, krystalická, ve vodě téměř nerozpustná látka.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{10}Cl_2N_2S$

Relativní molekulová hmotnost: 297,21

Látka byla testována v koncentracích  $0,99 - 0,2 \cdot 10^{-3}$  mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 8,03 – 8,08

teplota (°C) ... 25,2 – 25,4

salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 9,1 - 12,3

přídavek DMSO (%; v/v) ... 1,0

1. Primární výsledky měření optimálního rozložení testovaných koncentrací.

RAM 111									
koncentrace (mmol/l)		mortalita (%)							
	X	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	
1	0,3300	100	100	100	100	100	100	100	100
2	0,3330	100	100	100	100	100	100	100	100
3	0,2220	100	100	100	100	100	100	100	100
4	0,1480	100	100	100	100	100	100	100	100
5	0,0990	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0,0660	100	100	100	100	100	100	100	100
7	0,0440	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0,0290	100	100	100	100	100	100	100	100
9	0,0200	100	100	100	100	100	100	100	100
10	0,0130	98	99	92	96	99	100	96	
11	0,0090	92	96	98	94	92	94	82	
12	0,0060	85	80	95	90	94	90	89	
13	0,0040	78	82	75	80	82	79	80	
14	0,0030	68	72	65	50	64	52	54	
15	0,0020	15	18	19	12	15	13	15	
16	0,0010	13	15	10	13	12	10	10	
17	0,0008	3	5	8	5	3	3	5	
18	0,0005	0	0	0	0	0	0	0	
19	0,0003	0	0	0	0	0	0	0	
20	0,0002	0	0	0	0	0	0	0	
21	0,0000	0	0	0	0	0	0	0	

tab. 5 Primární výsledky měření. X... koncentrace RAM 111 v mmol/l. 21. koncentrace je kontrolní test. Y1-7... paralelní stanovení.

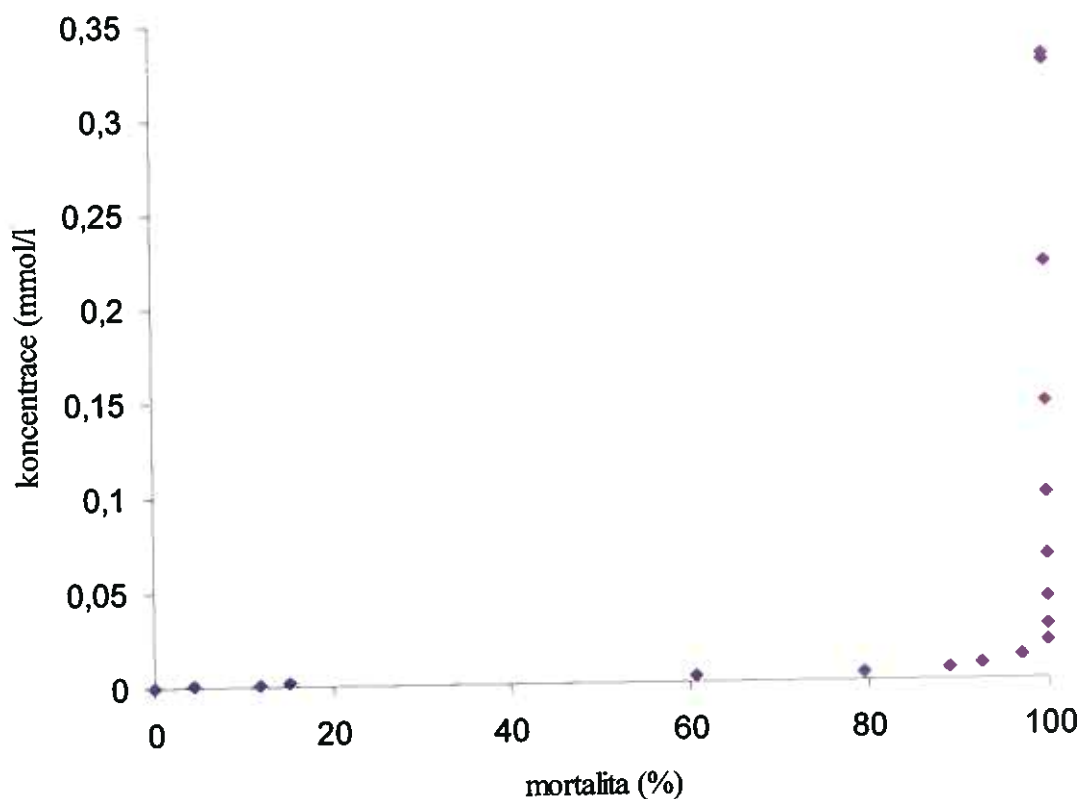
2. Konečné hodnoty EC (mmol/l)

RAM 111	
EC (mmol/l)	
EC <sub>10</sub>	0,001526
EC <sub>25</sub>	0,002070
EC <sub>50</sub>	<b>0,002810 (0,002740 – 0,002882)</b>
EC <sub>80</sub>	0,004130

tab. 6 Konečné hodnoty EC (mmol/l). U hodnoty EC<sub>50</sub> doplněno o interval spolehlivosti 95%.

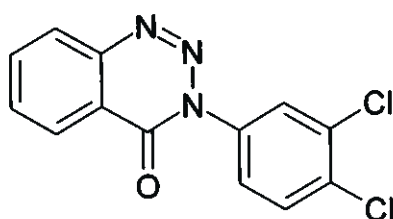
3. Grafické znázornění závislosti úmrtnosti testovaného organismu *Artemia salina* na koncentracích roztoků testovaných látek

**RAM 111 (3',4'-dichlorthioanthranilanilid).**  
Závislost úmrtnosti na koncentraci testované látky



graf 3 Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci testované látky – RAM 111 (3',4'-dichlorthioanthranilanilid). Hodnoty na ose y odpovídají průměru hodnot Y1-Y7 z tab. 5.

4.5. RAM 112 (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on)



RAM 112 je bílá, krystalická, ve vodě téměř nerozpustná látka.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_7Cl_2N_3O$

Relativní molekulová hmotnost: 292,12

Látka byla testována v koncentracích 5,0 – 0,3·10<sup>-3</sup> mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 7,98

teplota (°C) ... 25,0

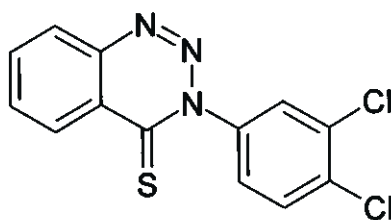
salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,8

přídavek DMSO (%; v/v) ... 0

Při testovaných koncentracích se látka jevila jako netoxická.

4.6. RAM 113 (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion)



RAM 113 je bílá, krystalická, ve vodě téměř nerozpustná látka.

Sumární vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S

Relativní molekulová hmotnost: 308,18

Látka byla testována v koncentracích 3,39 – 0,3·10<sup>-3</sup> mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 8,01 – 8,25

teplota (°C) ... 24,4 – 25,3

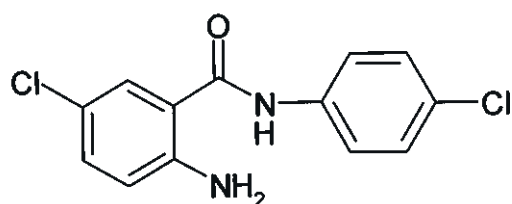
salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,5 - 10,1

přídavek DMSO (% v/v) ... 0 – 2,0

Z naměřených výsledků nebylo možné stanovit hodnoty EC<sub>50</sub>.

4.7. RAM 212 (4', 5-dichloranthranilid)



RAM 212 je bílá, krystalická, ve vodě téměř nerozpustná látka.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{10}Cl_2N_2O$

Relativní molekulová hmotnost: 281,14

Látka byla testována v koncentracích  $5,51 - 0,4 \cdot 10^{-3}$  mmol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 8,01 – 8,08

teplota (°C) ... 25,1 – 25,3

salinita (‰) ... 34 - 35

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,6 - 9,0

přídavek DMSO (%; v/v) ... 1,0

1. Primární výsledky měření optimálního rozložení testovaných koncentrací.

RAM 212										
koncentrace (mmol/l)		mortalita (%)								
	X	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7		
1	4,1500	100	100	100	100	100	100	100	100	
2	2,7700	100	100	100	100	100	100	100	100	
3	1,8400	100	100	100	100	100	100	100	100	
4	1,2300	100	100	100	100	100	100	100	100	
5	0,8200	100	100	100	100	100	96	100		
6	0,5500	100	86	83	75	90	83	77		
7	0,3600	100	67	85	90	73	72	70		
8	0,2400	71	80	69	71	70	68	67		
9	0,1600	69	64	67	70	63	62	63		
10	0,1100	56	58	52	56	54	52	46		
11	0,0700	52	54	53	56	57	51	52		
12	0,0500	48	46	49	43	51	51	50		
13	0,0300	27	35	32	31	29	32	34		
14	0,0200	32	35	37	32	28	31	42		
15	0,0100	30	29	26	28	36	25	35		
16	0,0090	41	26	25	23	21	36	29		
17	0,0060	28	26	35	42	34	25	26		
18	0,0040	26	34	32	24	22	21	24		
19	0,0030	19	21	18	26	22	21	21		
20	0,0020	18	19	24	26	23	18	17		
21	0,0010	15	21	19	20	15	16	16		
22	0,0008	10	8	8	9	7	5	7		
23	0,0006	0	0	0	0	0	0	0		
24	0,0004	0	0	0	0	0	0	0		
25	0,0000	0	0	0	0	0	0	0		

tab. 7 Primární výsledky měření. X... koncentrace RAM 212 v mmol/l. 25. koncentrace je kontrolní test. Y1-7... paralelní stanovení.

2. Konečné hodnoty EC (mmol/l)

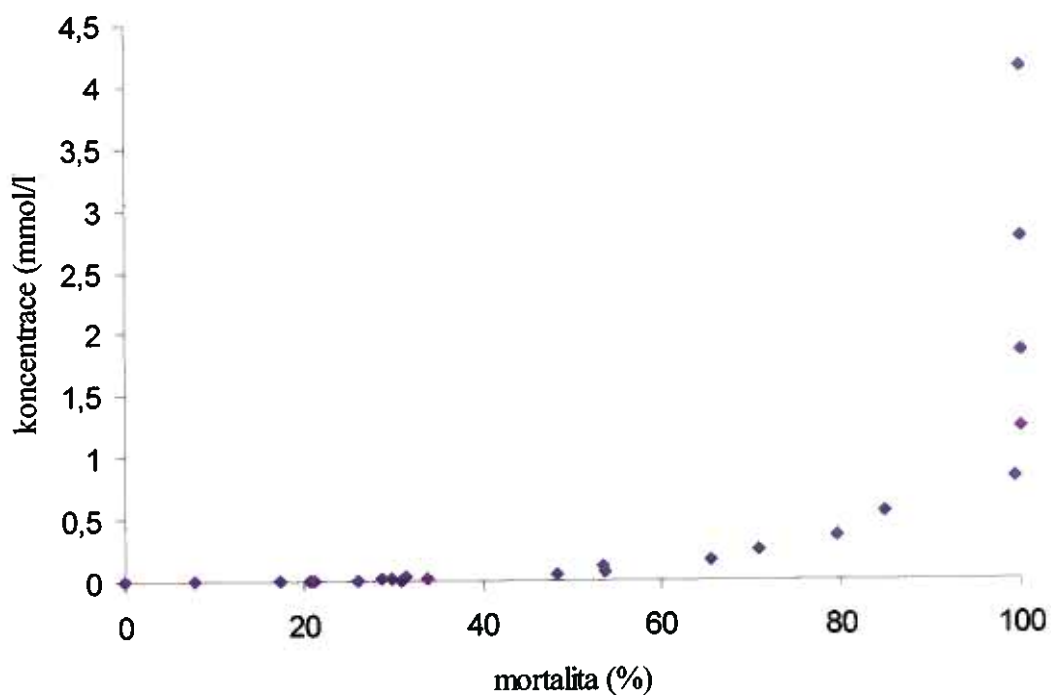
RAM 212	
EC (mmol/l)	
EC <sub>10</sub>	0,02027
EC <sub>25</sub>	0,02998
EC <sub>50</sub>	0,04434 (0,03939 – 0,04991)
EC <sub>80</sub>	0,07265

tab. 8 Konečné hodnoty EC (mmol/l). U hodnoty EC<sub>50</sub> doplněno o interval spolehlivosti 95%.



3. Grafické znázornění závislosti úmrtnosti testovaného organismu *Artemia salina* na koncentracích roztoků testovaných látek

**RAM 212 (4', 5-dichloranthranilanilid)**  
Závislost úmrtnosti na koncentraci testované látky



**graf 4** Závislost úmrtnosti *A. salina* na koncentraci testované látky – RAM 212 (4', 5-dichloranthranilanilid). Hodnoty na ose y odpovídají průměru hodnot Y1-Y7 z tab. 7.

#### 4.8. MnCl<sub>2</sub> (chlorid manganatý)

Chlorid manganatý je narůžovělá, krystalická, ve vodě dobře rozpustná látka.

Tato látka byla použita při každém pokusu jako standardní toxin pro ověření citlivosti testovaných žábřonožek.

Molekulová hmotnost:

Testované koncentrace 0,1990 – 0,0023 mol/l.

Podmínky experimentu: pH připravené mořské vody ... 7,99 – 8,25

teplota (°C) ... 24,4 - 25,8

množství rozpuštěného kyslíku (mg/l) ... 7,4 - 12,3

přídavek DMSO (%; v/v) ... 0

##### 1. Primární výsledky měření optimálního rozložení testovaných koncentrací.

MnCl <sub>2</sub>								
koncentrace (mol/l)		mortalita (%)						
	X	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
1	0,1990	100	100	100	100	100	100	100
2	0,1327	100	100	100	100	100	100	100
3	0,0884	100	100	100	100	100	100	100
4	0,0590	100	100	100	100	100	100	100
5	0,0393	100	62	60	67	70	83	88
6	0,0262	87	90	65	64	60	59	55
7	0,0175	62	65	67	47	59	51	50
8	0,0116	43	46	70	46	53	40	41
9	0,0078	35	39	37	30	30	29	36
10	0,0052	26	23	25	27	33	25	16
11	0,0035	12	15	18	10	11	12	10
12	0,0023	0	0	0	0	0	0	0
13	0,0000	0	0	0	0	0	0	0

tab. 9 Primární výsledky měření. X... koncentrace RAM MnCl<sub>2</sub> v mmol/l. 13. koncentrace je kontrolní test. Y1-7... paralelní stanovení.

2. Konečné hodnoty EC<sub>50</sub>(mmol/l): 0,01313 mol/l (0,01211 – 0,01423).

**5.**

**DISKUZE**

V rámci katedry farmaceutické botaniky a ekologie je rozvíjen výzkum a vývoj metod používajících pro prvotní screening biologické aktivity chemických sloučenin organismus *Artemia salina*, L. Cílem této práce bylo mimo jiné ověřit vhodnost použití tohoto organismu v rámci prescreeningového hodnocení akutní toxicity.

Testy používající jako testovaný organismus žábřonožku solnou mají oproti jiným testům, které se řadí mezi alternativní, řadu výhod. Pomineme-li časovou a finanční nenáročnost, úsporu prostoru a pracovních sil, jedná se hlavně o to, že i když je test řazen mezi alternativní, jedná se *de facto* o test prováděný *in vivo*. Znamená to, že v průběhu testu pracujeme s intaktním organismem, který má zachovány životní funkce a ve kterém po celou dobu testování probíhají biochemické pochody.

Nevýhodou tohoto testu je, že musí být prováděn v prostředí s určitou salinitou (34-35‰), která umožňuje žábřonožkám růst a vývoj. V důsledku toho mohou být získaná data do jisté míry zkreslená a mohou tak negativně ovlivnit objektivní posouzení výsledné toxicity dané látky. Testované látky také mohou interagovat s rozpuštěnými elektrolyty a měnit své chování vůči organismu.

V závislosti na mineralizaci prostředí může být snížena citlivost některých testovaných organismů vůči toxickým látkám. Při porovnání standardního testovacího sladkovodního organismu, např. *Daphnia magna* (hrotnatka velká), a *Artemia salina* bylo prokázáno, že hrotnatka velká podává citlivou odezvu na přítomnost toxických látek až do úrovně celkové mineralizace 5,24 g/l. Při vysokých úrovních celkové mineralizace se sladkovodní organismy nacházejí ve velmi stresujícím prostředí. Podmínky jsou pro ně tak nepříznivé, že nejsou schopny citlivě reagovat ani na přítomné vysoce toxické látky. Proto je pro testy, ve kterých očekáváme celkovou mineralizaci prostředí vyšší než 5,24 g/l, výhodnější použít organismy, kterým takto vysoké hodnoty vyhovují, např. *A. salina*. Celkově vyšší mineralizaci prostředí je možné očekávat například při testech toxicity, které slouží k monitoringu znečištěných půd a vod. Žábřonožka solná dovoluje při takovýchto testech odhalit podstatně vyšší koncentrace toxické látky, než jak to za běžných podmínek umožňuje *D. magna* (Čížek, Š. et al., 2003).

Další faktor, na který musíme brát ohled je extrapolace získaných dat na člověka. I přes sebevětší úsilí bude mít lidský organismus vždy svá specifika, která testovaným organismům chybí.

V rámci testování chemických látek je potřeba mít stále na vědomí, že látky, které se již po prvotních testech toxicity jeví jako vysoce toxické by již neměly být testovány dále. Proto by měl být vytvořen takový koncept testování, který by zabránil falešně negativním,

popř. pozitivním výsledkům. V rámci tohoto konceptu by měla být *A. salina* zařazena do fáze prescreeningu, který by umožnil zachytit potenciálně toxické látky.

### Screening pomocí *Artemia salina*, L.

Pro samotné testování byly použity 24 hodin staré larvy *Artemia salina*, L. Pro screening je možné použít i starší nauplia. Práce, které se zabývají srovnáním citlivosti jednotlivých vývojových stádií tohoto koryše uvádějí, že nejvíce senzitivní bývají vůči působení chemikálie 72 hodin stará nauplia. Pro ilustraci uvádím příklad, kdy byly testovány čtyři karbamátové sloučeniny na 24, 48 a 72 hodinových larvách *A. salina*. (Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S., 1998).

Testovaná látka	Mr	LC50 ( $\mu\text{mol/l}$ )		
		stáří larev <i>A. salina</i> , L.		
		24 h.	48 h.	72 h.
<i>Carbaryl</i>	201,2	137	29,4	1,74
<i>Oxamyl</i>	608,5	284	62,3	7,49
<i>Propoxur</i>	209,2	>>>2390	963	155
<i>Aldicarb</i>	190,3	>>>2630	1120	316

tab.10 Porovnání citlivosti tří vývojových stádií *A. salina*, L. vůči karbamátovým sloučeninám.

Z těchto výsledků je patrné, že citlivost k jednotlivým látkám významně závisí na stáří použitých nauplií. Obvykle jsou starší jedinci citlivější než ti mladší. *Artemia salina* stará 48 hodin je 2 - 4krát citlivější vůči karbamátovým sloučeninám než 24 hodin starí jedinci. Nauplia stará 72 hodin jsou, v porovnání se 24 hodin starými larvami, citlivější 8 - 79krát.

Při testování jsou standardně používána 24 hodin stará nauplia. Jejich citlivost je ve srovnání se staršími jedinci poněkud nižší, ale pro potřeby primárního screeningu dostatečná. Z hlediska vybavení laboratoře pro dlouhodobější standardní vývoj *A. salina* nebylo možné provádět testy se staršími jedinci.

Ve srovnání s jinými organismy, které jsou používány při screeningových testech akutní toxicity chemických sloučenin, je citlivost *A. salina* v některých případech větší, v jiných menší. Získané výsledky významně závisí na testované látce a na organismu, se kterým *A. salina* porovnááme.

Pro příklad porovnávání citlivosti jednotlivých druhů uvádím test, při kterém byla stanovována akutní toxicita pěti povrchově aktivních látek pro tři různé organismy (Liwarska-Bizukojc, E. et al., 2005).

Testovaná látka	Mr	LC50 (µmol/l)		
		<i>Physa acuta</i>	<i>Artemia salina</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
A1	288	94	142	127
A2	344	48	117	326
A3	420	49	28	5,2
N1	640	8,3	0,97	11
N2	528	8,9	8,6	47

**tab. 11** Porovnání hodnot LC<sub>50</sub> tří vodních organismů. Testované látky: A1...Dodecylsulfát sodný; A2...Dodecylbenzensulfonát sodný; A3...Alkyltrioxyethylensulfát sodný; N1...Dekaoxyethylenalkylether; N2...Nonylfenylheptaoxyethylenglykoether. A1-A3: anionaktivní tenzidy; N1-N2: neionogenní tenzidy.

Z výše uvedených hodnot LC<sub>50</sub> je vidět, že *Artemia salina* je mnohem citlivější k působení neionogenních tenzidů. Ze tří testovaných organismů se svou citlivostí vůči tenzidům řadí mezi *Physa acuta* a *Raphidocelis subcapitata*, i když, jak je patrné z tab.11 záleží na testované látce. Vůči sloučenině A3 je *Artemia salina* nejvíce odolná. Naproti tomu na přítomnost látky N1 je 8krát citlivější než *Physa acuta* a 11krát citlivější než *Raphidocelis subcapitata*.

Oblíbenost používání *A. salina* pro testování akutní toxicity v poslední době roste. Testy, které jsou s těmito korýši prováděny, mají řadu výhod. Hlavními z nich jsou jednoduchost, časová a finanční nenáročnost, reprodukovatelnost výsledků a rychlost s jakou jsou potřebná data získána.

Jisté zjednodušení testování přinesla dostupnost sady ARTOXKIT M<sup>TM</sup>. Jedná se o komerčně vyráběný set pro testování toxicity chemických látek. Každý *toxkit* obsahuje všechny komponenty potřebné pro provedení šesti kompletních 24 hodinových biologických testů.

*Artoxkit* je jedním z rychlých testů toxicity, které byly v poslední době uvedeny na trh. Cílem těchto testovacích sad není úplné nahrazení stávajících testů akutní toxicity, ale usnadnění práce a úspora času při testování velkého množství látek.

*Artemia salina* je při testování toxicity chemických sloučenin často srovnávána s jiným vodním organismem – *Daphnia magna* (hrotnatka velká). Oba dva druhy patří do stejné třídy (*Branchiopoda*) a v ekosystému zaujímají obdobné postavení v rámci potravního řetězce, proto je při některých testech možná jejich zaměnitelnost. *D. magna* je ale narušena od *A. salina* sladkovodním organismem. *D. magna* je používána při standardních testech toxicity. Ve srovnání s hrotnatkou je citlivost žábřonožky poněkud nižší (Toussaint, M. W. et al., 1995).

## ***Stanovení toxikologických indexů pro testované látky***

V rámci této práce byly testovány látky odvozené od biologicky aktivních sloučenin (salicylanilidů, chinazolinu a benzoxazinu). Konkrétně se jedná o analoga anthranilanilidů, thioanthranilanilidů, 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-onů a 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů.

Všechny testované látky jsou sloučeniny téměř nerozpustné ve vodě, proto byla ve většině případů jako rozpouštědlo použita připravená mořská voda s přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO) (0,5-2,0% v/v). V této koncentraci nemá DMSO na testovaný organismus žádný vliv.

Nerozpustnost látky je jednou z příčin nereprodukovatelnosti některých stanovení. Z tohoto důvodu jsou používána přídatná rozpouštědla. Jako rozpouštědlo pro lipofilní látky nejčastěji slouží DMSO, ethanol, methanol nebo aceton. Přítomnost pomocného rozpouštědla v roztoku testované látky může vést k interakcím mezi ním a testovanou chemikálií. Tyto interakce se mohou projevit jako aditivní, synergistické nebo antagonistické (Calleja, M. C.; Persoone, G., 1993). Dalším faktem, na který je potřeba brát ohled při použití pomocného rozpouštědla, je změna biologické dostupnosti látky. V případě, že je rozpustnost sloučeniny zvýšena chemickým rozpouštědlem, je možné, že bude mít látka, která bude podána sama, na organismus úplně opačný vliv (Berling, R.; Dave, G., 1981).

DMSO je obecně hodnocen jako nejlepší přídatné rozpouštědlo při testování toxicity lipofilních látek pomocí živých organismů (rostlin i živočichů). V používaných koncentracích neovlivňuje životní děje v testovaných organismech a ve většině případů neinterferuje s testovanými látkami.

Pro další zvýšení rozpustnosti testované látky nám sloužilo použití ultrazvuku při dispergaci sloučeniny do prostředí připravené mořské vody. I přesto, že jsme použili přídatné rozpouštědlo (DMSO) i ultrazvuk, tak se testované látky nepodařilo dokonale rozpustit. Ve většině případů vznikla jemná suspenze, která byla použita pro další testování.

Námi testované látky lze rozdělit do dvou skupin. Do první patří deriváty anthranilanilidu a jejich thioanaloga (thioanthranilanilidy). Z této skupiny bylo testováno pět látek: RAM 108, RAM 109, RAM 110, RAM 111 a RAM 212.

Druhou skupinu tvoří cyklická analoga anthranilanilidů a thioanthranilanilidů, tzn. 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-ony a 3-aryl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony, z těchto látek byly testovány - RAM 112 a RAM 113.



Základní látkou první skupiny je sloučenina **RAM 109** (nesubstituovaný anthranilanilid). Tato látka se v testovaných koncentracích jevila jako netoxická. Její rozpustnost byla v porovnání se substituovanými deriváty lepší, rozpouštěla se pouze pomocí ultrazvuku bez přídavku DMSO.

Methylací RAM 109 (anthranilanilidu) v poloze 4' byla získána látka **RAM 110** (4'-metylanthranilanilid). Tato methylace měla za následek zvýšení toxicity pro *A. salina*. Látka byla testována v koncentracích 5,00 – 0,06 mmol/l a s přídavkem 0,5%(v/v) DMSO a s použitím ultrazvuku došlo k jejímu rozpuštění.

Další látka z této skupiny byla od základního skeletu odvozena disubstitucí v polohách 3', 4' chlorem. Při testování sloučeniny **RAM 108** (3',4'-dichloranthranilanilid) bylo v porovnání se dvěma předchozími látkami pozorováno významné zvýšení toxicity. Substituce dvěma atomy chloru však vedle zvýšení toxicity vedla k dalšímu snížení rozpustnosti. Bez přídavku DMSO se látka nerozpustila vůbec, s přidáním 1%(v/v) DMSO a pomocí ultrazvuku se podařilo připravit jemnou suspenzi, která byla použita pro další testování.

Přesun jednoho atomu chloru z polohy 3' u RAM 108 do polohy 5 u látky **RAM 212** (4', 5-dichloranthranilanilid) měl za následek vzestup účinku. Porovnáním získaných dat bylo zjištěno, že hodnota EC<sub>50</sub> pro látku RAM 212 je nižší než v případě látky RAM 108. Rozpustnost je srovnatelná s RAM 108, tzn. s použitím DMSO (1% v/v) a ultrazvuku nedošlo ani po několika hodinách k dokonalému rozpuštění ale pouze k dispergaci částic a vzniku jemné suspenze.

Ještě prudší vzestup účinku jsme mohli pozorovat u thioanalogu látky RAM 108, tzn. u **RAM 111** (3',4'-dichlorthioanthranilanilid). Náhrada oxo-skupiny izosterní thio-skupinou znamenala v tomto případě další vzestup účinku, ale také snížení rozpustnosti testované látky. Přidání 1%(v/v) DMSO a ultrazvuk pouze umožnily rozmělnění shluků částic a jejich dispergaci za vzniku suspenze. Tato látka byla pro testovaný organismus *A. salina* v testovaných koncentracích (0,9 - 0,2.10<sup>-3</sup>mmol/l) nejvíce toxická. V porovnání s RAM 108 je toxicita této látky 27krát vyšší.

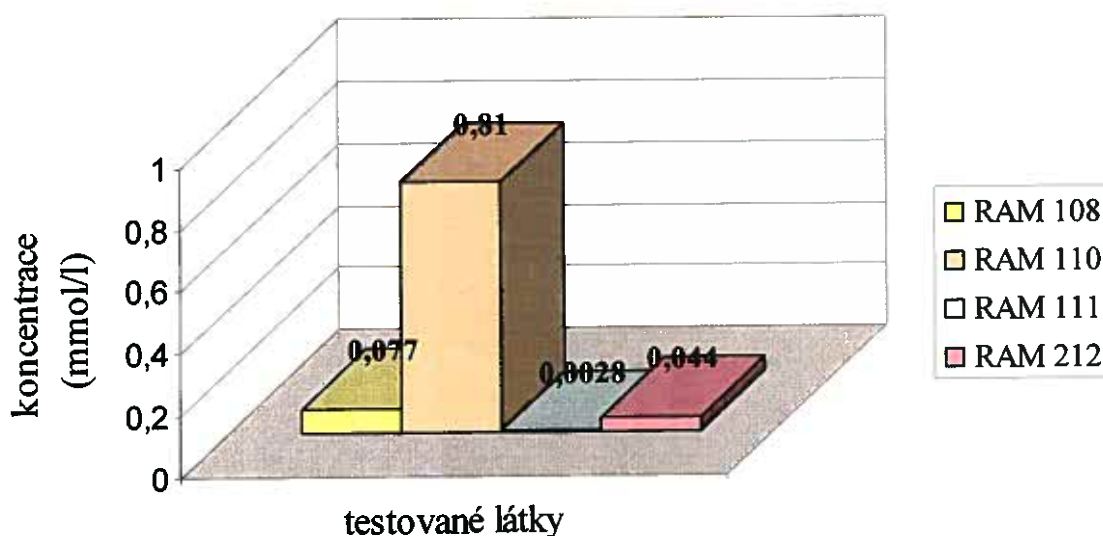
U cyklických analog (thio)anthranilanilidů (RAM 112 a RAM 113) nebyla v průběhu testování prokázána toxicita vůči *A. salina*. Výsledky testů sloučeniny **RAM 112** (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on), která je cyklickým analogem RAM 108, se i u nejvyšší koncentrace (5mmol/l) shodovaly s výsledky získanými při paralelním kontrolním pokusu (tzn. při pokusu, u kterého byla místo roztoku testované látky použita pouze

připravená mořská voda s přidavkem DMSO). Látka se vůči *Artemia salina* v testovaných koncentracích ( $5 - 0,3 \cdot 10^{-3}$  mmol/l) neprojevila vůbec toxicky.

Poslední testovanou látkou byla RAM 113 (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion). Tato sloučenina je thioanalogem látky RAM 112. Záměna oxo-skupiny za izosterní thio-skupinu měla i v tomto případě za následek pokles rozpustnosti ale jen nepatrný nárůst účinku. Ani u této látky se při testovaných koncentracích ( $3,39 - 0,3 \cdot 10^{-3}$  mmol/l) nepodařilo potvrdit toxické vlastnosti. Nejvyšší dosažená úmrtnost byla 20% u maximální měřené koncentrace (3,39 mmol/l). Vyšších koncentrací nebylo možné dosáhnout díky zmíněné nerozpustnosti této látky. Při použití 2%(v/v) DMSO a ultrazvuku se ani po pěti hodinách nepodařilo látku rozpustit. Podařilo se jen, stejně tak jako v případě RAM 111, rozrušit velké shluky částic a dispergovat je v suspenzi.

Při porovnávání toxicity testovaných látek jsme vycházeli z hodnot  $EC_{50}$ .

### Porovnání toxicity testovaných látek



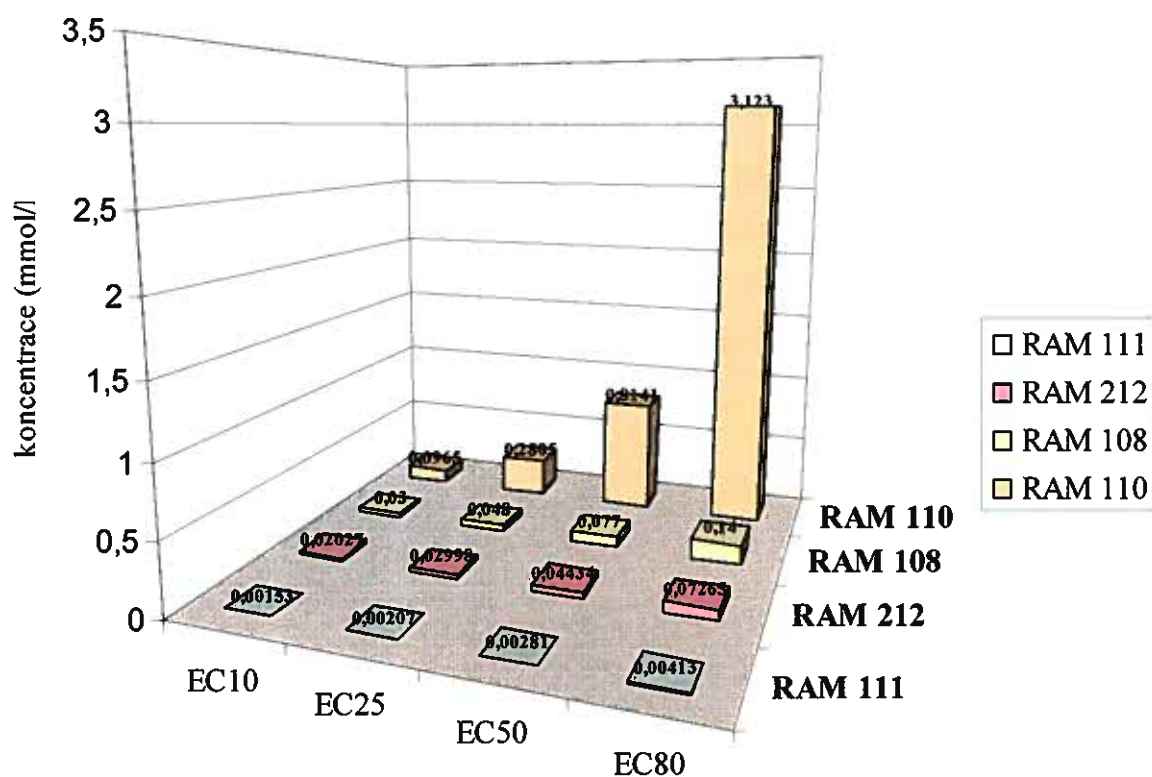
graf 5 Porovnání hodnot  $EC_{50}$  testovaných látek RAM 108, RAM 110, RAM 111 a RAM 212.

Ze všech sedmi látek, pro které byly stanoveny hodnoty  $EC_{50}$ , na testovaný organismus *Artemia salina* toxicky působily čtyři (RAM 108, RAM 110, RAM 111 a RAM 212). Všechny látky, které projevily toxický potenciál vůči *A. salina*, patří do první skupiny testovaných sloučenin, tzn. mezi deriváty anthranilanilidů a jejich thioanalog.

Ze získaných výsledků je patrné, že nejvíce toxická byla pro *A. salina* látka s označením RAM 111 (3',4'-dichlorthioanthranilanilid). Ve srovnání s RAM 212 byla její

hodnota  $EC_{50}$  15krát nižší, u RAM 108 byla tato hodnota 28krát menší a v případě RAM 110 dokonce 290krát nižší. Na zvýšení účinku má s největší pravděpodobností vliv náhrada oxo-skupiny izosterní thio-skupinou.

### Porovnání velikosti efektivní koncentrace testovaných látek



graf 6 Porovnání hodnot  $EC_{10}$ ,  $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$  a  $EC_{80}$  u testovaných látek RAM 108, RAM 110, RAM 111 a RAM 212.

U vybraných anthranilanilidů (RAM 108, RAM 109 a RAM 110) byla v rámci práce na katedře anorganické a organické chemie stanovena jejich antimykobakteriální aktivita. Byly provedeny 14 a 21 denní testy s mykobakteriemi *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii* (Kolář, P., 2005).

Testovaná látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. kansasii</i>		<i>M. avium</i>	
	14 d.	21 d.	14 d.	21 d.	14 d.	21 d.
<b>RAM 109</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	500	500
<b>RAM 110</b>	>250	250	>250	>250	250	>250
<b>RAM 108</b>	62	62	31	62	>62	>62

tab. 12 *In vitro* antimykobakteriální aktivita anthranilanilidů. MIC ( $\mu\text{mol/l}$ ).

Nejcitlivější byly mykobakterie v přítomnosti látky RAM 108 (3',4'-dichloranthranilanilid). Tato látka byla jednou z těch, které působily toxicky na *A. salina*.

I přes veškerá úskalí prováděného testu s *A. salina*, jako je vysoká salinita prostředí a nerozpustnost testovaných látek, korelují výsledky získané testováním substituovaných anthranilanilidů s těmi, které byly získány při testech antimykobakteriální aktivity, které nechala provést katedra anorganické a organické chemie. V porovnání s námi získanými výsledky se shoduje i pořadí látek, v jakém projevují toxicitu vůči testovaným organismům.

## **6.**

# **ZÁVĚR**

Cílem této práce bylo provést toxikologický screening sedmi vybraných potenciálně biologicky aktivních sloučenin pomocí bezobratlého organismu *Artemia salina*, L. Společně s toxikologickým screeningem látek byla ověřena i vhodnost testovaného organismu pro rychlé prescreeningové testy.

Pro testování byla použita 24 hodin stará nauplia. Některé práce uvádějí, že použití 72 hodin starých jedinců je vhodnější z hlediska jejich zvýšené citlivosti vůči přítomným toxickým látkám. Senzitivita 24 hodin starých nauplií je sice poněkud nižší, ale pro testy prováděné v rámci prescreeningu dostatečná. Provádět testy s jedinci staršími než 24 hodin nebylo možné z hlediska vybavení laboratoře pro dlouhodobější standardní vývoj *A. salina*.

Při primárním screeningu byl toxický účinek prokázán u čtyř ze sedmi testovaných látek (**RAM 108**, **RAM 110**, **RAM 111** a **RAM 212**). Tyto sloučeniny jsou odvozeny od anthranilanilidu a jeho thioanaloga (thioanthranilanilid), přičemž samotný anthranilanilid nevykazoval při testovaných koncentracích toxické účinky vůči *A. salina*.

Všechny testované látky jsou velmi špatně rozpustné ve vodě, a proto bylo při jejich rozpouštění použito pomocné rozpouštědlo DMSO (dimethylsulfoxid) a použit ultrazvuk. DMSO je rozpouštědlo, které je pro svoje vhodné vlastnosti preferováno při řadě toxikologických testů prováděných na živých organismech.

Test s každou látkou byl proveden v sedmi paralelních stanoveních a třikrát opakován. Z naměřených výsledků byla získána pro každou látku specifická hodnota  $EC_{50}$ . Pomocí této hodnoty jsme porovnávali účinnost jednotlivých látek. Hodnoty  $EC_{50}$  se pohybovaly v rozmezí od 0,00281 mmol/l u **RAM 111** do 0,8141 mmol/l u látky **RAM 110**.

Nejvyšší toxicitu při testovaných koncentracích ( $0,9 - 0,2 \cdot 10^{-3}$  mmol/l) projevil derivát thioanthranilanilidu látka **RAM 111** (3',4'-dichlorthioanthranilanilid).

Naopak nulová nebo téměř nulová toxicita byla prokázána u látek **RAM 112** ((3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on) a **RAM 113** (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion).

Tyto látky v testovaných koncentracích (RAM 112:  $5 - 0,3 \cdot 10^{-3}$  mmol/l; RAM 113:  $3,39 - 0,3 \cdot 10^{-3}$  mmol/l) nepůsobily na *A. salina* toxicky. U **RAM 113** byla u maximální koncentrace (3,39 mmol/l) nejvyšší dosažena úmrtnost 20%. Vyšších koncentrací se nepodařilo dosáhnout díky špatné rozpustnosti této látky. I při použití 2% (v/v) DMSO a ultrazvuku látka vytvořila pouze jemnou suspenzi.

V průběhu všech experimentů byl paralelně prováděn test se standardním toxinem  $MnCl_2$ . Tento test probíhal za stejných podmínek jako experimenty s testovanými látkami a sloužil pro ověření citlivosti testovaného organismu *Artemia salina*, L.

Testované vývojové stádium *Artemia salina*, L. – 24 hodin stará nauplia, se ukázalo být dobrým nástrojem primárního screeningu. Test s tímto organismem je velmi jednoduchý, časově i ekonomicky nenáročný a spolehlivý.

Naše výsledky jsme měli možnost porovnat s hodnotami získanými při testování antimykobakteriální aktivity vybraných substituovaných anthranilanilidů v rámci výzkumu katedry anorganické a organické chemie (KAOCH). Navzdory tomu, že byly látky testovány v prostředí s relativně vysokou salinitou (34 - 35‰) a tomu, že se nerozpustily optimálně, námi získané výsledky korelují s těmi, které byly získány KAOCH.

**7.**

**SEZNAM POUŽITÉ  
LITERATURY**



**Adema D.M.M.:** *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests, *Hydrobiologia* 59, 1978. s. 125-134.

**Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S.:** Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropina, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity, *Environmental Pollution* 104, 1999. s. 469 - 476.

**Barlow, D. I.; Sleight, M. A.:** The propulsion and use water currents for swimming and feeding in larval and adult *Artemia*. Přezato z: Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (eds.): The brine shrimp *Artemia*, Vol. 1, Universa Press, Wettern, Belgium, 1980. s. 61-73.

**Benesch, R.:** Zur Ontogenie und Morphologie von *Artemia salina*, L., *Zoologische JahrbucherAbteilung für Anatomie und Ontologie der Tiere* 86, 1969. s. 307-458.

**Berling, R.; Dave, G.:** Influence of co-solvent and ultrasonication on the acute toxicity of quaternary amine and organophosphorus compound to *Daphnia magna*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 27, 1981. s. 316 - 325.

**Bittnerová, D.:** Registrace nových chemických látek výrobci v ČR. Převzato z: Tichý, M.; Hanousková, O. (eds.): Alternativní metody testování toxicity chemikálií, Chrudim, 27. – 28. dubna 2005. s.9 – 21.

**Bláha, K.:** REACH – návrh nové právní úpravy EU v oblasti nakládání s chemickými látkami. Převzato z: Tichý, M.; Hanousková, O. (eds.): Alternativní metody testování toxicity chemikálií, Chrudim, 27. – 28. dubna 2005. s. 5 – 8.

**Bowen, S. T. et al.:** Ecological isolation in *Artemia*: population differences in tolerance of anion concentrations, *Journal of Crustacean Biology* 5, 1985. s. 106 – 129.

**Browne, R. A.:** The cost of reproduction in brine shrimp, *Ecology* 63, 1982. s. 43 – 47.

**Caliendo, G. et al.:** Synthesis by microwave irradiation and binding properties of novel 5-HT<sub>1a</sub> receptor ligands, *Eur. J. Med. Chem.* 36, 2001. s. 873-886.

**Calleja, M. C.; Persoone, G.:** Cyst-based toxicity tests. IV. The potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC program, *ATLA* 20, 1992. s. 396 - 405.

**Calleja, M. C.; Persoone, G.:** The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates, *Chemosphere* 26, 1993. s. 2007 - 2022.

**Calleja, M. C.; Persoone, G.; Geladi, P.:** Comparative Acute Toxicity of the First 50 Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity Chemicals to Aquatic Non-Vertebrates, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 1994. s. 69-78.

**Cassel, J. D.:** The morphology of *Artemia salina* (Linnaeus), M. A. Thesis, Stanford University, California, USA, 1937.

**Clark, C. R.; Lin, Ch.; Samson, R. T.:** Anticonvulsant activity of 2-aminobenzanilides and 3-aminobenzanilides, *J. Med. Chem.* 29, 1986. s. 1534-1537.

**Clark, L.; Shah, P. S.; Mason, J. R.:** Chemical repellency in birds: relationship between chemical structure and avoidance response, *J. Exp. Zool.* 206, 1991. s. 310-322.

**Clegg, J. S.; Hoa, N. V.; Sorgeloos, P.:** Thermal tolerance and heat shock proteins in encysted embryos of *Artemia* from widely different thermal habitats, *Hydrobiologia* 466, 2001. s. 221 - 229.

**Clegg, J. S.; Trotman, C. N. A.:** Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology. Převzato z Abatzopoulos, Th. J.; Beardmore, J. A.; Clegg, J. S.; Sorgeloos, P. (eds.): *Artemia* basic and applied biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2002. 286 s.

**Criel, G. R. J.; Macrae, T. H.:** *Artemia* morphology and structure. Převzato z: Abatzopoulos, Th. J.; Beardmore, J. A.; Clegg, J. S.; Sorgeloos, P. (eds.): *Artemia* basic and applied biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2002, a. 286 s.

**Criel, G. R. J.; Macrae, T. H.:** Reproductive biology of *Artemia*. Převzato z: Abatzopoulos, Th. J.; Beardmore, J. A.; Clegg, J. S.; Sorgeloos, P. (eds.): *Artemia* basic and applied biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2002, b. 286 s.

**Crowe, J. H. et al.:** Ice information during freezing of *Artemia* cyst of variable water content, *Molecular Physiology* 1, 1981. s. 145 -152.

**Čížek, Š.; Kočí, V.; Kochánková, L.:** Srovnání citlivosti *Artemia salina* a *Daphnia magna* v závislosti na celkové mineralizaci prostředí. Sborník přednášek: 19. Aktuální otázky vodárenské biologie, Chrudim, 2003.

**De Chaffoy, D.; De Maeyer-Criel, G.; Hondo, M.:** On the permeability and formation of the embryonic cuticle during development *in vivo* and *in vitro* of *Artemia salina* embryos, *Differentiation* 12, 1978. s. 99 – 109.

[dragonja.nib.si/Secovlje/foto/ArtemiaSalina\\_760-492m.jpg](http://dragonja.nib.si/Secovlje/foto/ArtemiaSalina_760-492m.jpg)

[ec.europa.eu/comm/health/ph\\_risk/committees/sct/documents/out217\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/comm/health/ph_risk/committees/sct/documents/out217_en.pdf)

[ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/antest/\(4\)\\_chapter\\_2.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/antest/(4)_chapter_2.pdf)

[ecvam.jrc.it](http://ecvam.jrc.it)

**Ellsworth, E. L.; Olson, E. R.; Showalter, H. D. H.:** Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria, *Chemtracts* 12, 1999. s. 656-661.

**Fenten, J.; Balls M.:** Developing alternatives to Animal experimentation, Glaxo Group Research, Hobsons, Cambridge, 1993. 20s.

**Frazier, J.M.:** Scientific criteria for validation of *in vitro* toxicity tests. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development (*OECD Monograph No. 36*), 1990.

**Freeman, J. A.:** The integument of *Artemia* during early development. Převezato z: MacRae, T. H.; Bagshaw, J. C.; Warner, A. H.(eds.): Biochemistry and cell biology of *Artemia*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989. 264 s.

**Gajardo, G.; Beardmore, J. A.:** Electrophoretic evidence suggest that the *Artemia* found in the Salar de Atacama, Chile, is *Artemia franciscana* Kellogg, *Hydrobiologia* 257, 1993. s. 65 – 71.

**Goedecke A.-G.:** Ger. Offen. 2061474. 1970.

**Goldberg, A. A.; Jefferies, H. S.; Turner, H. S.:** Tuberculostatic activity of derivates of diphenylamine-2-carboxylic acid, *Quart. J. Chem.* 21, 1948. s. 10-14.

**Grundmann, Ch. jr.; Ulrich, H.:** Benzo-1,2,3-triazines, *J. Org. Chem.* 24, 1959. s. 272-274.

**Guilhermino, L. et al.:** Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 46, 2000. s. 357 - 362.

**Hanström, B.:** Verleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere. Julius Springer Verlag, Berlin, 1928.

**Hedgpeth, J. W.:** Some preliminary considerations of the biology of inland mineral waters, *Archivio di Oceanografia e Limnologia* 11, 1959. s. 111 – 141.

**Heindel, N. D.; Fives, P. W.; Lemke, T. F.; Carrano, R. A.:** Synthesis and selected pharmacology of anthranilamides, *J. Pharm. Sci.* 60, 1971. s. 703-707.

**Hinton, H. E.:** Reversible suspension of metabolism and the origin of life. *Proceedings of the Royal Society of London B* 171, 1968. s. 43-57.

**J. R. Geigy A. – G.:** Brit. 876 526. 1961.

**Jinbo, Y.; Takeuchi, Y.:** Preparation of 3-sulfonyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones as antibacterial agents or anticonvulsants. Japan Kokai 20011395, 2001.

**Kaiser, K.L.E.; McKinnon, M.; Fort, F.:** Interspecies Toxicity Correlation of Rat, Mouse and Photobacterium Phosphoreum, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1994. s. 1599-1606.

**Kauppi, A. N.; Nordfelth, R.; Hagglund, U.; Wolf-Watz, H.; Elofsson, M.:** Salicylanilides are potent inhibitors of type III. secretion in Yersinia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529, 2003. s. 97-100.

**Kikuchi, S.:** The fine structure of alimentary canal of the brine shrimp, *Artemia salina*: the mitgut. *Annual report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences* 7, 1972. s. 15-47.

**Kolář, P.:** Anthranilanilidy a jejich analoga. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2005. s. 96.

**Kornet, M. J.:** Microwave synthesis and anticonvulsant activity of new 3-Benzyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones, *J. Heterocycl. Chem.* 34, 1997. s. 1391-1393.

**Kubicová, L. a kol.:** Synthesis and biological activity of 2-aminobenzanilides and 3-phenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones. Fourth International Electronics Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4). <http://www.mdpi.org/eccoc-4.htm>. Basel, Switzerland, September 2000, C0015.

**Kubicová, L., Waisser, K.:** Biologická aktivita salicylanilidů. *Česk. Farm.* 41, 1992. s. 208-216.

**Kupec, J.:** Toxikologie, Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 2004. s. 176.

**Lagadig, L.; Caquet, T.:** Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives? *Environ Health Perspect.* 106, 1998. s. 593 - 611.

**Lavens, P.; Sorgeloos, P.:** The cryprobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. Převzato z: Sorgeloos, P.; Bengston, D. A.; Declair, W.; Jaspers, E. (eds.): *Artemia* research and its applications, Vol. 3, Universas Press, Wettern, Belgium, 1987. s. 27-63.

**Lavens, P.; Sorgeloos, P. (eds.):** Manual on the production and use of live food for aquaculture, *FAO Fisheries Technical Paper* No. 361. Rome, FAO, 1996. 295s.

**Lenz, P. H.:** Ecological studies on *Artemia*: a review. Převzato z Sorgeloos, P.; Bengston, D. A.; Declair, W.; Jaspers, E. (eds.): *Artemia* Research and its Applications, Vol. 1, Universa Press, Wettern, Belgium, 1987. s. 5 – 18.

**Liang, P.; MacRae, T. H.:** The synthesis of a small heat shock  $\alpha$ -crystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development, *Developmental Biology* 207, 1999. s. 445 – 456.

**Liwarska - Bizukoje, E. et al.:** Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants, *Chemosphere* 58, 2005. s. 1249 - 1253.

**Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.:** Farmakologie a toxikologie, GRADA Publishing, Praha, 2002. s. 696.

**Macielag, M. J. et al.:** Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria, *J. Med. Chem.* 41, 1998. s. 2939-2945.

**Martin, G. G.; Lin, H. M. J.; Luc, C.:** Reexamination of hemocytes in brine shrimp (Crustacea, Brachiopoda). *Journal of Morphology* 242, 1999. s. 283-294.

**Metalli, P.; Ballardini, E.:** Radiobiology of *Artemia*: radiation effects and ploidy, *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 7, 1970. s. 11-25.

**Nakamura, K.; Tsuji, K.; Konishi, N.; Okumura, H.; Matsuo, M.:** Studies on antiinflammatory agents. II. Synthesis and pharmacological properties of 2'-(phenylthio)methanesulfonanilides and related derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1993. s. 894-906.

**Nečas, O. et al.:** Obecná biologie pro lékařské fakulty. H+H Vyšehradská, Jinočany, 2000. 555 s.

**Nendza, M.; Hermens, J.:** Properties of chemicals and estimation methodologies. Převzato z: Van Leeuwen, C. J.; Hermens, J. L. M. (eds.): Risk assessment of chemicals. An introduction, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 1995. s. 239-292.

**Nesměrák, K.:** Toxikologie dřívě a nyní, 2005. ([www.otvorenave-da.cz/lmgPageC1/Chemie/25nesmerak.pdf](http://www.otvorenave-da.cz/lmgPageC1/Chemie/25nesmerak.pdf))

**Nilsson, D. E.; Odselius, R.:** A new mechanism for light-dark adaptation in the *Artemia* compound eye (Anostraca, Crustacea), *Journal of Comparative Physiology A* 143, 1981. s. 389-399.

**Norman, M. H.; Rigdon, G. C.; Hall, W. R.; Navas, F.:** Structure-activity relationships of a series of substituted benzamides: potent D2/5-HT2 antagonists and 5-HT1a antagonists as neuroleptics agents, *J. Med. Chem.* 39, 1996. s. 1172-1188.

**Panacer, D.S.; Riddell, R.J.; Wilde, S.M.; Clothier, R.H.; Balls, M.:** The importance of exposure period and cell type in in vitro cytotoxicity tests. *ATLA* 14, 1986. s. 86-92.

**Persoone, G.; Sorgeloos, P.:** General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. Převzato z: Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (eds.): The brine shrimp *Artemia*, Vol. 1, Universa Press, Wetteren, Belgium, 1980. s. 3-24.

**Persoone, G.; Jansen, C. R.:** Freshwater invertebrate toxicity tests. Převzato z: Calow, P. (ed.) Handbook of Ecotoxicology. Vol 1, Backwell Scientific, Oxford, 1993. s. 51-65.

**Piskov, V. B.; Kasperovič, V. P.; Pedenčuk, A. K.; Chimenkova, L. P.; Koblova, I. A.:** Amidy i anilidy proizvodnykh antranilovoj kisloty. *Khim. – Farm. Zh.* 7(6), 1973. s. 8-11.

**Post, F. J.; Youssef, N. N.:** A procaryotic intracellular symbiont of the Great Salt Lake brine shrimp *Artemia salina*, *Canadian Journal of Microbiology* 23, 1977. s. 1232 – 1236.

**Pravda, M.; Kubicová, L.; Veselý, O.; Šustr, M.; Buchta, V.:** Systemic antifungal agents – current status and future trends, *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31/32, 2004. s. 67-68.

**Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Balls, M.:** An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays, *Fd. Chem. Toxicol* 24, 1986. s. 469-471.

**Sedlák, E.:** Zoologie bezobratlých. Masarykova univerzita, Brno, 2003. 337s.

**Shankar, R. B.; Romer, D. R.; Pews, R. G.:** Preparation of thiocyanomethyloxo (and thiocyanothiomethyl)-benzotriazin-4(3H)-ones as antimicrobial and marine antifouling agents. PCT Int. Appl. WO 9801037, 1998.

**Schicke, H. G.:** O,O-Dialkyl S-(4-thiono-3,4-dihydro-1,2,3,benzotriazin-2-ylmethyl)dithiophosphates. BE 641818. 1964.

**Schrehardt, A.:** Ultrastructural investigations of the filter-feeding apparatus and the alimentary canal of *Artemia*. Převzato z Sorgeloos, P.; Bengston, D. A.; Declair, W.; Jaspers, E. (eds.): *Artemia* Research and its Applications, Vol. 1, Universa Press, Wetteren, Belgium, 1987. s. 33-52.

**Skoultchi, A. I.; Morowitz, H. J.:** Information storage and survival of biological systems at temperatures near absolute zero, *Yale Journal of Biology and Medicine* 37, 1964. s. 158 – 163.

**Solis, P. N. et al.:** A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp), *Planta Med.* 59, 1993. s. 250 – 253.

**Tamborini, P.; Sigg, H.; Zbinden, B.:** Acute toxicity testing in the nonlethal dose range: a new approach, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 12, 1990. s. 69-87.

**Tichias, K. et al.:** Progress in toxicological testing: Reduction and refinement issues, *ATLA* 26, 1998. s. 619 -627.

**Tichý M.:** Účinnost xenobiotik a chemická struktura, Avicenum, Praha, 1983. 166 s.

**Tichý, M.:** Co a k čemu jsou alternativní metody *in vitro* a *in silico*. Převzato z: Tichý, M.; Hanousková, O. (eds.): Alternativní metody testování toxicity chemikálií, Chrudim, 27. – 28. dubna 2005. s. 43 – 48.

**Tichý, M. et al.:** Alternativní metody testování toxicity chemických látek *in silico*, *Chem. Listy* 99, 2005. s. 675 – 681.

**Tichý, M.:** Toxikologie pro chemiky. Univerzita Karlova, Praha, 2003. 119 s.

**Toussaint, M. W. et al.:** A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1995. s. 907 - 915.

**Triantaphyllidis, G. V.; Abatzopoulos, T. J.; Sorgeloos, P.:** Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca), *Journal of Biogeography* 25, 1998. s. 213 – 226.

**Turpin, J. A.; Song, Y.; Inman, J. K.; Huang, M.; Wallqvist, A. et al.:** Synthesis and biological properties of novel pyridinoalkanoyl thioesters (PATE) as anti-HTV-1 agents that target the viral nucleocapsid protein zinc fingers, *J. Med. Chem.* 42, 1999. s. 67-86.

**Tyson, G. E.:** Fine structure of the type 2 antennular sensillum of the brine shrimp. *American zoologist* 20, 1980. s. 816.

[ut.water.usgs.gov/shrimp/index.html](http://ut.water.usgs.gov/shrimp/index.html)

**Van Stappen, G.:** Zoogeography. Převzato z: Abatzopoulos, Th. J.; Beardmore, J. A.; Clegg, J. S.; Sorgeloos, P. (eds.): *Artemia* basic and applied biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2002, a. 286 s.

**Vanhaecke, P.; Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P.:** Proposal for a short term toxicity test with *Artemia nauplii*, *Ecotoxicology and Environment Safety* 5, 1981. s. 382 – 387.

**Vanhaecke, P.; Sorgeloos, P.:** International study on *Artemia* XLVII. The effect of temperature on cyst hatching, larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp *Artemia* spp., *Anales de la Société Royale Zoologique de Belgique* 119, 1989. s. 7 – 23.



**Waisser, K.; Kubicová, L.:** Biologické účinky látek podobných salicylanilidům. 3-Aryl-2H,4H-benz[e][1,3]oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy, *Česk. Farm.* 42, 1993. s. 218-222.

**Waisser, K. et al.:** Relationships between structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides, *Arch. Pharm.* 336, 2003. s. 53-71.

**Warren, H. S.:** The central nervous system of the adult *Artemia*, *Transactions of the American Microscopical Society* 49, 1930. s. 189-209.

**Warren, H. S.:** The segmental excretory glands of *Artemia salina*, *Journal of Morphology* 62, 1938. s. 263-289.

**[www.invittox.com](http://www.invittox.com)**

**[www.jrc.it](http://www.jrc.it):** Intelligent testing strategies

**[www.mpo.cz/cz/prumysl-a-stavebnictvi/reach](http://www.mpo.cz/cz/prumysl-a-stavebnictvi/reach)**

**[www.mvcr.cz/sbirka/2006/sb029-06.pdf](http://www.mvcr.cz/sbirka/2006/sb029-06.pdf)**

**[www.mvcr.cz/sbirka/2004/sb147-04.pdf](http://www.mvcr.cz/sbirka/2004/sb147-04.pdf)**

**[www.oecd.org](http://www.oecd.org)**

**Yee, Y. K.; Tebble, A. L.; Linebarger, J. H.; Beight, D. W.; Craft, T. J.:** N2-Aroylanthranilamide inhibitors of human factor Xa., *J. Med. Chem.* 43, 2000. s. 873-872.

**Zurlo, J.; Rudacille, D. Goldberg, A. M.:** Animals and Alternatives in Testing: History, Science, and Ethics, Marry Ann Liebert, Inc., NY. 1994.