

# Određivanje ekotoksičnosti SARS-CoV-2 antivirusa

---

Jezerčić, Tijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:382504>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Tijana Jezerčić

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Tijana Jezerčić

Predala je izrađen završni rad dana: 9. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 12. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Tijana Jezerčić

**ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI SARS-CoV-2 ANTIVIROTIKA**

**Voditelj rada:** izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Dr. sc. Martina Miloloža

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2024.



*Ovaj završni rad izrađen je u sklopu istraživačkog projekta Okolišni aspekti SARS-CoV-2 antivirusa (IP-2022-10-2822) financiranog od Hrvatske zaklade za znanost.*

*Ovaj završni rad izrađen je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dajane Kučić Grgić na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u akademskoj godini 2023./2024.*

*Prvenstveno se želim zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić, što je prihvatila moju molbu da pišem rad pod njezinim mentorstvom. Zahvalna sam joj na prilici da sudjelujem na ovom projektu i da se upoznam s poslom kojim se želim baviti u budućnosti. Njezina spremnost da odgovori na svako moje pitanje s razumijevanjem i pruži pomoć kad god je to bilo potrebno, bila je neprocjenjiva.*

*Također, želim izraziti zahvalnost asistentici dr. sc. Martini Miloloži, koja je bila uz mene tijekom cijelog procesa. Hvala joj na strpljenju kojeg je uvijek imala za mene i na znanju koje mi je prenijela tijekom rada u laboratoriju, koji je uz to što je bio koristan bio i izrazito zanimljiv. Svojom dobrom voljom i spremnosti na rad mi je uvelike uljepšala i olakšala čitav proces kako rada, tako i pisanja.*

*Na kraju se želim zahvaliti svim osobama u svome životu, mojoj obitelji i prijateljima koji su bili sa mnom od početka mog akademskog obrazovanja bez čijih savjeta i podrške bi moj put bio nezamisliv.*

## SAŽETAK

Koronavirus, bolest uzrokovana SARS-CoV-2 virusom koja primarno napada dišne puteve je uzrok smrti više od 7 milijuna ljudi širom svijeta. Iako su antivirusni lijekovi ključni za liječenje mnogih bolesti, mogu imati štetne učinke na vodene organizme. U sklopu ovog rada ispitao se utjecaj antivirusnih lijekova protiv SARS-CoV-2 virusa na bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp. U eksperimentu s bakterijom *Pseudomonas putida*, bakterijske suspenzije bile su izložene različitim koncentracijama ribavirina, emtricitabina, sofosbuvira, oseltamivira, nirmatrelvira i atazanavira. Ispitivane koncentracije bile su za ribavirin, emtricitabin, sofosbuvir, oseltamivir i nirmatrelvir: 0,006 mmol/L, 0,013 mmol/L, 0,025 mmol/L, 0,05 mmol/L i 0,1 mmol/L, te atazanavir: 0,00019 mmol/L, 0,00038 mmol/L, 0,00075 mmol/L, 0,0015 mmol/L i 0,0030 mmol/L. Nakon 16 sati, određivao se ukupni broj živih stanica bakterija (CFU) kako bi se procijenilo koliko je svaki od antivirotika inhibirao rast bakterija. Rezultati su pokazali da su veće koncentracije antivirusnih lijekova rezultirale većom inhibicijom bakterija. Emtricitabin je bio najtoksičniji pri 0,1 mmol/L, inhibirajući rast bakterija za 98,94%, dok je oseltamivir bio najmanje toksičan, inhibirajući rast za 30,59 % pri 0,1 mmol/L i nije pokazao inhibiciju pri nižim koncentracijama. Eksperiment s mikroalgom *Chlorella* sp. se provodio na sličan način gdje su suspenzije mikroalge dodane u otopine s istim antivirusnim koncentracijama kao u eksperimentu s bakterijom. Ukupni broj živih stanica mikroalge (CFU) se određivao uz pomoć Thoma-ove komore svakih 24 sata tijekom tri dana, te je za konačni CFU uzeta srednja vrijednost. Slično rezultatima s bakterijom, veće koncentracije antivirusnih lijekova dovele su do značajnije inhibicije rasta mikroalge. Atazanavir pri 0,003 mmol/L bio je najtoksičniji, inhibirajući rast mikroalge za 58,52%, dok je nirmatrelvir bio najmanje toksičan, inhibirajući rast za 48,15% pri 0,1 mmol/L.

**Ključne riječi:** ekotoksičnost, SARS-CoV-2, antivirolici, *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp.

## ABSTRACT

### Determination of the ecotoxicity of SARS-CoV-2 antivirals

Coronavirus, caused by the SARS-CoV-2 virus, targets the respiratory tract and has led to over 7 million deaths globally. While antivirals are crucial for treating many diseases, they can have detrimental effects on aquatic organisms. This study explored the impact of SARS-CoV-2 antivirals on the bacterium *Pseudomonas putida* and the microalgae *Chlorella* sp. In the experiment involving *Pseudomonas putida*, bacterial suspensions were exposed to varying concentrations of ribavirin, emtricitabine, sofosbuvir, oseltamivir, nirmatrelvir, and atazanavir. The antiviral concentrations were: ribavirin, emtricitabine, sofosbuvir, oseltamivir, and nirmatrelvir at 0.006 mmol/L, 0.013 mmol/L, 0.025 mmol/L, 0.05 mmol/L, and 0.1 mmol/L, respectively, and atazanavir at 0.00019 mmol/L, 0.00038 mmol/L, 0.00076 mmol/L, 0.0015 mmol/L, and 0.0030 mmol/L. After 16 hours, the colony-forming units (CFU) were counted to assess bacterial viability. The results indicated that higher antiviral concentrations resulted in greater bacterial inhibition. Emtricitabine was the most toxic at 0.1 mmol/L, inhibiting bacterial growth by 98.94%, while oseltamivir was the least toxic, inhibiting growth by 30.59% at 0.1 mmol/L and showing no inhibition at lower concentrations. The experiment with *Chlorella* sp. followed a similar protocol. Microalgae suspensions were added to solutions with the same antiviral concentrations as the bacterial experiment. Live cell counts were performed using a Thoma's chamber every 24 hours over three days, and the average CFU was calculated. Similar to the bacterial results, higher antiviral concentrations led to more significant inhibition of microalgae growth. Atazanavir at 0.003 mmol/L was the most toxic, reducing microalgae growth by 58.52%, while nirmatrelvir was the least toxic, inhibiting growth by 48.15% at 0.1 mmol/L.

**Key words:** ecotoxicity, SARS-CoV-2, antiviral drugs, *Pseudomonas putida*, *Chlorella* sp.



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. COVID-19 .....	2
2.2. Primjena antivirusika u liječenju virusnih oboljenja .....	4
2.2.1. Virusi .....	4
2.2.2. Antivirusici .....	5
2.2.2.1. Ciljani antivirusici .....	6
2.2.2.2. Antivirusici širokog spektra djelovanja .....	6
2.2.3. Ispitivani antivirusici .....	7
2.2.3.1. Ribavirin .....	7
2.2.3.2. Oseltamivir .....	8
2.2.3.3. Sofosbuvir .....	9
2.2.3.4. Emtricitabin .....	10
2.2.3.5. Atazanavir .....	11
2.2.3.6. Nirmatrelvir .....	12
2.3. Ekotoksikologija .....	13
2.4. Testovi ekotoksičnosti .....	15
2.4.1. <i>Pseudomonas putida</i> .....	15
2.4.2. <i>Chlorella</i> sp. ....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Antivirusici .....	19
3.1.2. Bakterije .....	20
3.1.3. Mikroalga .....	20
3.2. Mediji i kemikalije .....	21
3.2.1. Hranjivi agar .....	21

3.2.2. Fiziološka otopina .....	22
3.2.3. Mineralni medij .....	22
3.2.4. Bazalni medij.....	23
3.3. Mjerni instrumenti i oprema.....	24
3.4. Metode rada.....	25
3.4.1. Priprema otopina antivirusika .....	25
3.4.2. Uzgoj bakterije .....	27
3.4.3. Uzgoj mikroalge .....	27
3.4.4. Sterilna tehnika rada.....	28
3.4.5. Određivanje ekotoksičnosti antivirusika primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i> .....	28
3.4.6. Određivanje ekotoksičnosti antivirusika primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp. ....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4.1. Test ekotoksičnosti antivirusika primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i> .....	32
4.2. Test ekotoksičnosti antivirusika primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp. ....	35
5. ZAKLJUČAK .....	44
6. LITERATURA .....	45
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	52
ŽIVOTOPIS .....	53

## 1. UVOD

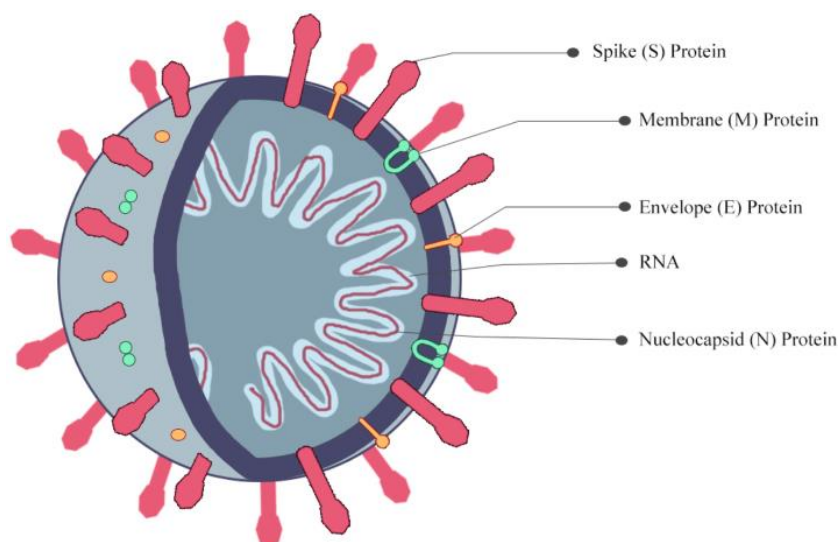
Pandemija COVID-19, uzrokovana virusom SARS-CoV-2, dovela je do globalnih zdravstvenih izazova, rezultirajući s više od 7 milijuna smrtnih slučajeva diljem svijeta [1]. Brz razvoj i primjena antivirusnih lijekova bili su ključni u ublažavanju širenja i ozbiljnosti virusa. Antivirolici su skupina lijekova koja se koristi za liječenje virusnih infekcija. Njihova glavna funkcija je inhibirati razmnožavanje virusa unutar organizma, čime pomažu u kontroli i smanjenju simptoma virusnih bolesti [11]. Međutim, iako su ovi lijekovi neophodni u borbi protiv pandemije, njihov utjecaj na okoliš, posebice na vodene ekosustave, ostaje uglavnom neistražen. Antivirusni lijekovi, kada se ispuste u okoliš, mogu potencijalno poremetiti ekološku ravnotežu utječući na neciljane organizme. Ovaj rad imao je za cilj istražiti utjecaj šest često korištenih antivirusnih lijekova ribavirina, emtricitabina, sofosbuvira, oseltamivira, nirmatrelvira i atazanavira na dva ključna vodena mikroorganizma: bakteriju *Pseudomonas putida* i mikroalgu *Chlorella* sp. Ovi organizmi su odabrani zbog svog ekološkog značaja; *Pseudomonas putida* je važan razlagač u vodenom okolišu [47], dok je *Chlorella* sp. primarni proizvođač ključan za proizvodnju kisika i kruženje hranjivih tvari [56].

Ekotoksikologija, grana znanosti koja proučava učinke toksičnih tvari na žive organizme u ekosustavima, pruža ključne alate za procjenu utjecaja ovih lijekova. Testovi ekotoksičnosti, kao što su oni provedeni na *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp., omogućuju procjenu potencijalne štetnosti tvari na različite organizme u okolišu. Najčešći organizmu na kojima se provode testovi ekotoksičnosti su ribe, alge, bakterije, ali i sisavci uključujući štakore, miševe i dr. [33, 34]. U ovom eksperimentu, suspenzije bakterija i mikroalgi bile su izložene različitim koncentracijama antivirusnih lijekova. Utjecaj antivirusnika na bakteriju procijenjen je brojanjem ukupnog broja živih stanica (CFU) nakon 16 sati izlaganja, dok je rast mikroalgi praćen brojanjem živih stanica u Thoma-ovoj komori pod svjetlosnim mikroskopom tijekom tri dana. Ovakav pristup omogućuje procjenu inhibicijskih učinaka ovih lijekova u ekološki relevantnim koncentracijama te pruža uvid u njihove potencijalne ekotoksikološke učinke. Razumijevanje ekoloških posljedica široke upotrebe antivirusnih lijekova ključno je za razvoj održive farmaceutske prakse i očuvanje vodenih ekosustava. Ova studija nastoji pridonijeti vrijednim podacima o tome kako antivirusni agensi mogu utjecati na mikrobiološki život, čime će se informirati buduće procjene rizika za okoliš i regulatorne politike.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. COVID-19

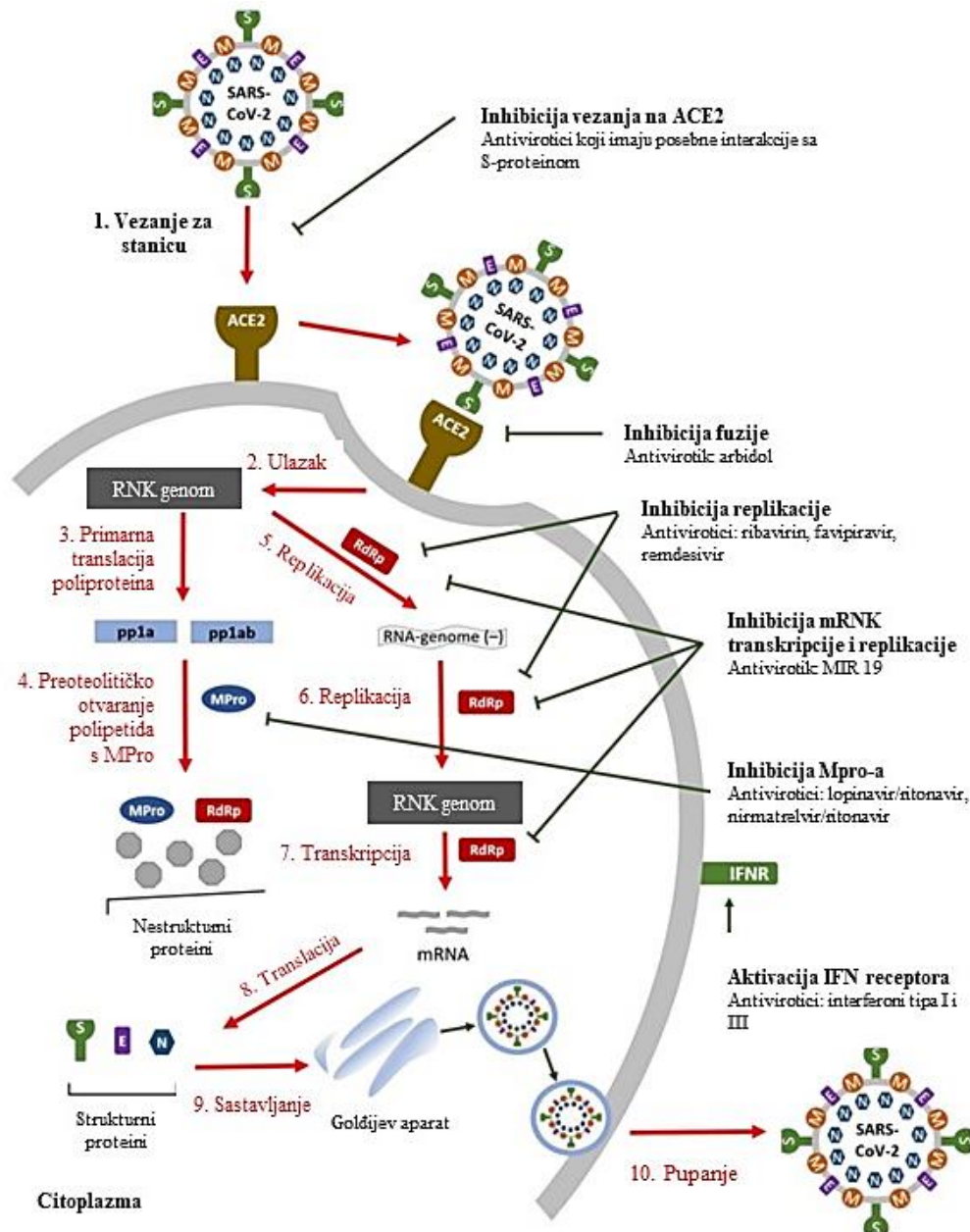
COVID-19 je zarazna bolest uzrokovana koronavirusom. Prije izbijanja pandemije u prosincu 2019. u Wuhanu, Kina, virus je bio potpuno nepoznat. Tijekom prve dvije godine pandemije zabilježeno je više od 200 milijuna slučajeva COVID-19 diljem svijeta, a procjenjuje se da je više od 6 milijuna ljudi umrlo od zaraze. Time je COVID-19 postao četvrti vodeći uzrok smrti u svijetu (4,4%) u 2020. godini [1]. Znanstveni dokazi pokazuju da se SARS-CoV-2 proširio sa šišmiša na ljude preko nepoznatog posrednika sisavca. [2] Struktura SARS-CoV-2 sastoji se od četiri strukturalna proteina: šiljastog (S) glikoproteina, glikoproteina male ovojnice (E), membranskog (M) proteina i nukleokapsidnog (N) proteina koji je vezan za jednolančani genom virusne ribonukleinske kiseline (RNA) pozitivnog polariteta (Slika 2.1).



**Slika 2.1.** Struktura SARS-CoV-2 virusa [3].

Proteinska ovojnica (E) najmanja je od glavnih strukturalnih proteina koronavirusa, a sastoji se od 76-109 aminokiselina. E protein je važan kod SARS-CoV-2 virusa zbog svoje uloge u otpuštanju i ubacivanju virusa u stanice domaćina te mijenjanju staničnih procesa kako bi kontrolirao patogenost virusa. Smatra se značajnim čimbenikom virulentnosti (sposobnost patogena ili mikroorganizma da uzrokuje štetu domaćinu) kod SARS-CoV-2 virusa. Membranski (M) protein je ključan za virus, posebno tijekom pupanja i sastavljanja. M protein stupa u interakciju s drugim strukturalnim proteinima kao što su šiljak (S) i proteinska ovojnica (E), čineći ga vitalnim za razumijevanje koronavirusa. Budući da pomaže S proteinu, koji je

uključen u vezivanje i ulazak u stanicu, bilo koje mutacije u M proteinu mogu značajno utjecati na njegove interakcije sa stanicom domaćinom [3].



Slika 2.2. Životni ciklus SARS-CoV-2 i mehanizmi djelovanja antivirusnih lijekova [4].

S protein se veže na stanicu domaćina prepoznajući receptor ACE2. Primarna funkcija ACE2 receptora u kontekstu infekcije koronavirusom je djelovanje kao ulazna točka za virus u stanice domaćina. SARS-CoV-2 koristi šiljasti (S) protein na svojoj površini kako bi se vezao za ACE2 receptor na površini ljudskih stanica. Ovo vezanje predstavlja prvi korak u procesu ulaska

virusa u stanice domaćina. Šiljasti protein SARS-CoV-2 povezuje se s ACE2 receptorom s visokim afinitetom. Ova interakcija omogućuje spajanje virusne ovojnice s membranom stanice domaćina, čime se omogućava ulazak virusne RNK u stanicu i početak infekcije (Slika 2.2). IFN receptor, odnosno receptor za interferon, ključna je komponenta imunološkog odgovora tijela na virusne infekcije, uključujući one uzrokovane koronavirusima. Interferoni su proteini koje stanice proizvode kao odgovor na prisutnost virusa, a njihova primarna funkcija je pojačavanje antivirusnog odgovora i reguliranje imuniteta [5]. COVID-19 se prvenstveno prenosi s osobe na osobu putem malih kapljica koje izlaze iz nosa ili usta prilikom kašljanja ili kihanja. Ljudi se mogu zaraziti udisanjem tih kapljica ili dodirivanjem površina na kojima su kapljice sletjele, a zatim dodirivanjem lica. Razdoblje inkubacije, odnosno vrijeme između infekcije i pojave prvih simptoma, kreće se od 1 do 14 dana, s prosjekom od 5 do 6 dana. Aktivna replikacija virusa događa se u gornjem respiratornom traktu i plućima [6]. Infekcije SARS-CoV-2 često uzrokuju simptome slične gripi, kao što su glavobolja, groznica, grlobolja, bol u leđima, kašalj i gubitak okusa ili mirisa. Iako su mnogi slučajevi infekcije asimptomatski ili blagi, postoje i oni koji pokazuju ozbiljne ishode, praćeni sustavnom upalom, oštećenjem tkiva i srčanim oboljenjima. Teška bolest COVID-19 može rezultirati oštećenjem više organa i biti fatalna, pri čemu rizik uvelike ovisi o prisutnosti drugih oboljenja poput dijabetesa, pretilosti, hipertenzije i drugih [7, 8]. Potoji nekoliko načina kojima se nastoje ublažiti ili ukloniti simptomi uzorkovani SARS-CoV-2 virusom. Neki od njih su: monoklonska antitijela koja blokiraju ulazak virusa u stanice, kortikosteroidi, antivirolici, protuupalni agensi te terapija kisikom i mehanička ventilacija [9]. Najbolji oblik terapije je sama prevencija bolesti. Kao jedan od vidova prevencije infekcije, razvijena su cjepiva. Cjepivima se nastoji aktivirati urođene imunološke stanice tijekom infekcije SARS-CoV-2 koje potiču T i B limfocite na učinkovit odgovor, uključujući izlučivanje specifičnih protutijela i ubijanje zaraženih stanica, što ubrzava razvoj stečenog imunološkog pamćenja [10]. Postoje dvije vrste cjepiva za prevenciju infekcije: mRNA vaccine kojima pripadaju Pfizer-BioNTech i Moderna vaccine, te vaccine s virusnim vektorom AstraZeneca i Johnson & Johnson [9].

## **2.2. Primjena antivirusika u liječenju virusnih oboljenja**

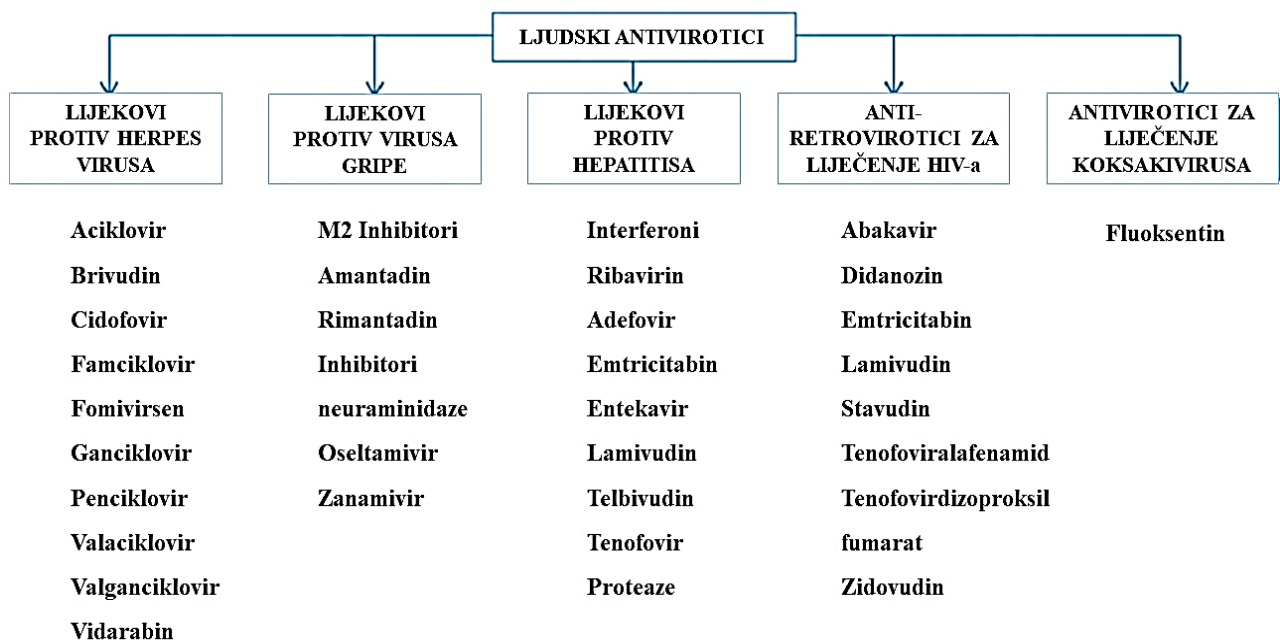
### **2.2.1. Virusi**

Virusi su patogeni uzročnici brojnih teških bolesti kod ljudi, životinja i biljaka. Kada dođu u kontakt sa stanicama domaćina, spajaju se s njima i ubacuju svoj genetski materijal u stanicu domaćina. Virusna oboljenja ne mogu se liječiti antibioticima, već posebnim klasama lijekova

nazvanim antivirusni, koji se koriste za liječenje specifičnog ili širokog spektra virusnih infekcija. Antivirusni prekidaju replikacijski ciklus virusa u različitim fazama, smanjujući njegovu infektivnost i skraćujući trajanje bolesti. Neke virusne infekcije mogu se izliječiti bez antivirusnih ako je imunološki sustav dovoljno jak, dok druge zahtijevaju antivirusno liječenje [11].

### 2.2.2. Antivirusni

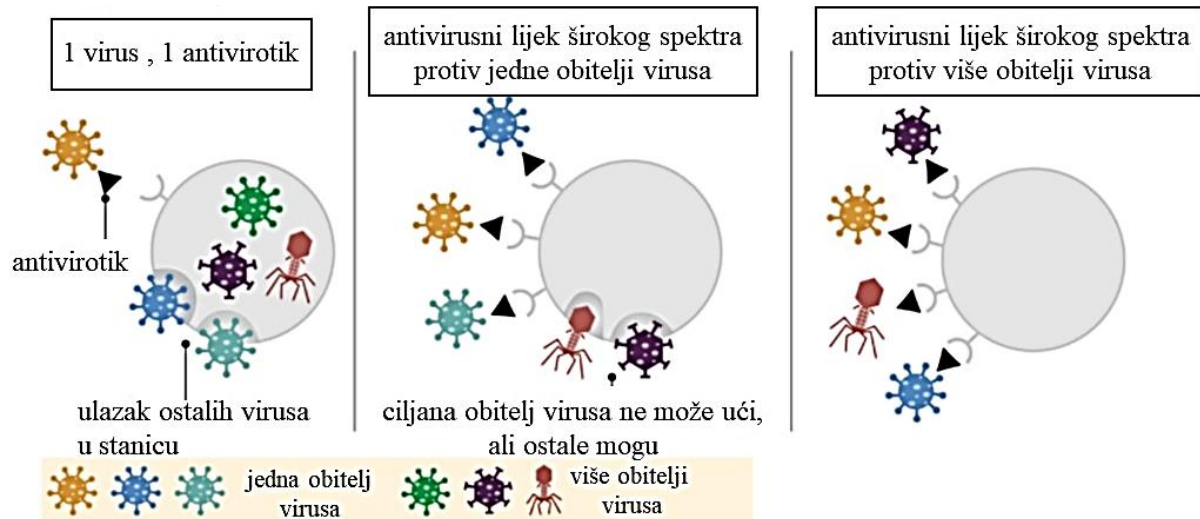
Antivirusni su podijeljeni u tri glavne skupine: za viruse herpesa, hepatitisa i gripe, uz dodatne lijekove za liječenje HIV-a i koksiki virusa (Slika 2.3).



**Slika 2.3.** Podjela antivirusnih uz najčešće korištene antivirusne za svaku vrstu [12].

Stvaranje antivirusnih lijekova temelji se na dva pristupa: ciljanje samih virusa ili faktora stanica domaćina. Antivirusni koji ciljaju viruse vezu se na virusne proteine ili nukleinske kiseline, inhibirajući ulazak virusa, transkripciju, replikaciju genoma te formiranje i otpuštanje zaraznih čestica. Lijekovi usmjereni prema domaćinu oblikuju aktivnost faktora domaćina i puteva uključenih u sintezu, obradu i transport virusnih komponenti, kao i u razvoj antivirusnih i upalnih odgovora. Virusi prepoznaju stanice domaćina putem receptora na površini stanica, koristeći strategiju mimikrije koja im omogućuje vezanje na određene stanice, prelazak plazma membrane, ulazak u stanicu i pristup osnovnim staničnim mehanizmima. Neki virusi koriste

membrane stanica domaćina za replikaciju i/ili sastavljanje novih virusnih čestica [13]. Antiviroci se mogu također podijeliti na ciljane antivirusne koji djeluju na samo jedan ciljani virus, i na antivirusne širokog spektra koji mogu djelovati na jednu ili više obitelji virusa (Slika 2.4).



**Slika 2.4.** Prikaz djelovanja ciljanih antivirusnika i antivirusnika širokog spektra djelovanja. [14]

### 2.2.2.1. Ciljani antivirusnici

Ciljani antivirusni lijekovi su lijekovi dizajnirani da specifično ometaju određene korake u životnom ciklusu virusa, s ciljem inhibicije replikacije ili funkcije virusa uz minimalan utjecaj na stanice domaćina. Podijeljeni su u nekoliko skupina koje inhibiraju različite enzime uključujući: inhibitore proteaza (enzima koje virusi koriste za razgradnju svojih poliproteina na funkcionalne proteine čime se sprječava zrenje i replikacija virusa), inhibitore reverzne transkriptaze (koja je potrebna za pretvorbu viralne RNK u DNK te se time sprječava integracija viralne DNK u genom domaćina), inhibitore RNK polimeraze (enzim potreban za pretvorbu viralne RNK u DNK što sprječava integraciju viralne DNK u genom domaćina) te inhibitore integraze (enzim koji je potreban za integraciju viralne DNK u genom stanice domaćina). Također postoje lijekovi koji inhibiraju fuziju virusa s membranom stanice domaćina, blokirajući ulazak u stanicu domaćina te inhibitori ulaska koji sprječavaju vezivanje virusa za ili ulazak u stanicu domaćina. [11]

### 2.2.2.2. Antivirusnici širokog spektra djelovanja

Antivirusnici širokog spektra djelovanja su lijekovi dizajnirani za djelovanje protiv mnogih različitih virusa, a ne samo protiv jednog specifičnog virusa. Ovi lijekovi mogu djelovati na

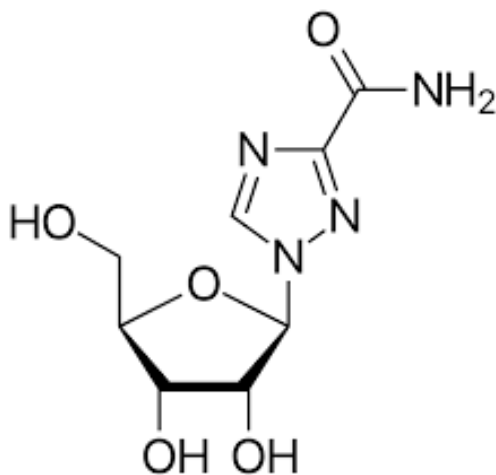


različite faze životnog ciklusa virusa ili ometati važne procese unutar virusa. To ih čini korisnim za liječenje raznih virusnih infekcija, posebno kada više virusa može biti prisutno ili kada specifičan virus još nije identificiran. Postoji nekoliko vrsta antivirusa sa širokim spektrom djelovanja: interferoni (proteini koje stanice domaćina proizvode kao odgovor na virusnu infekciju), ribavirin, favipiravir, arbidol, remdesivir, ritonavir i mnogi drugi [15].

### 2.2.3. Ispitivani antivirusi

#### 2.2.3.1. Ribavirin

Ribavirin je sintetski guanozinski nukleozid širokog spektra djelovanja protiv nekoliko RNA i DNA virusa te antivirusno sredstvo koje ometa sintezu virusne mRNA. Ovaj spoj pripada klasi organskih spojeva poznatih kao triazolni ribonukleozidi i ribonukleotidi. Glavne strukturne komponente ribavirina su: ribozni dio, modificirani ribozni šećer, koji omogućava lijekovima da oponašaju prirodne nukleozide unutar virusnih nukleinskih kiselina, triazolni prsten, koji je bitan za inhibiciju virusne replikacije te karboksamidnu grupu (-CONH<sub>2</sub>) koja omogućava ribavirinu da se veže za virusne enzime i inhibira njihovu aktivnost (Slika 2.5).



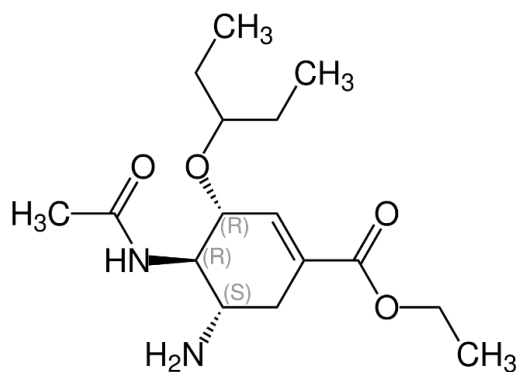
Slika 2.5. Strukturna formula ribavirin antivirusa [16].

Ribavirin se koristi za liječenje kronične infekcije virusom hepatitisa C (HCV) u kombinaciji s drugim antivirusnim lijekovima, s ciljem izlječenja ili postizanja trajnog virološkog odgovora (SVR). Ribavirin posreduje u izravnom antivirusnom djelovanju protiv brojnih DNA i RNA virusa povećanjem učestalosti mutacija u genomima nekoliko RNA virusa. Član je nukleozidnih antimetabolitnih lijekova koji ometaju umnožavanje virusnog genetskog materijala inhibiranjem aktivnosti enzima RNA ovisne RNA polimeraze, zahvaljujući svojoj sličnosti s građevnim blokovima molekula RNA. Zabilježeno je da ribavirin može biti učinkovit

samo u ranim fazama virusnih hemoragijskih groznica, uključujući Lasserovu groznicu, krimsko-kongoansku hemoragijsku groznicu, venezuelansku hemoragijsku groznicu i infekciju hantavirusom. Prije razvoja novijih lijekova, dvojna terapija ribavirinom i peginterferonom alfa-2a/peginterferonom alfa-2b smatrana je prvom generacijom i standardnim antivirusnim liječenjem. Noviji lijekovi za liječenje virusne infekcije hepatitisa C sada se koriste za smanjenje ili eliminaciju upotrebe ribavirina, koji je povezan s ozbiljnim nuspojavama, te za poboljšanje terapijske učinkovitosti kod pacijenata s neuspješnom terapijom peginterferonom alfa-2a/peginterferonom alfa-2b i ribavirinom [17]. Kada se koristi za liječenje infekcija virusom hepatitisa C (HCV), ribavirin je uvijek dio kombiniranih terapija jer monoterapija ribavirinom nije učinkovita u liječenju kronične infekcije hepatitisom C. Dodatno, uključivanje ribavirina u terapijski režim može povećati rizik od anemije [18].

### 2.2.3.2. Oseltamivir

Oseltamivir je antivirusni inhibitor neuraminidaze koji se koristi za liječenje i prevenciju infekcija virusima influence A i B. Ovaj spoj pripada klasi organskih spojeva poznatih kao gama aminokiseline i njihovi derivati. Oseltamivir je kompleksna molekula s nekoliko ključnih strukturnih elemenata: cikloheksenski prsten, acetamido grupa (-NHCOCH<sub>3</sub>) i amino grupa (-NH<sub>2</sub>) koje su vezane za cikloheksenski prsten te karboksilatnu estersku grupu (Slika 2.6).



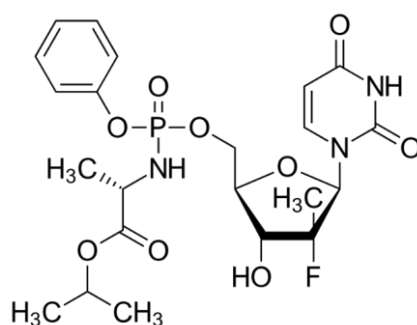
**Slika 2.6.** Strukturna formula oseltamivir antivirusika [16].

Oseltamivir fosfat je predlijek koji se u tijelu pretvara u aktivni metabolit, oseltamivir karboksilat, snažan i selektivan inhibitor enzima neuraminidaze virusa influence [19]. Oseltamivir smanjuje izlučivanje virusa i njegovu infektivnost. Djeluje tako da sprječava pupanje virusa iz stanice domaćina, njegovu replikaciju i širenje. Klinička učinkovitost oseltamivira je najveća kada se primjenjuje unutar 48 sati od pojave simptoma gripe, jer se nakon tog perioda značajno smanjuje njegova učinkovitost. Za zdrave osobe s niskim rizikom

od komplikacija, primjena oseltamivira nakon 48 sati od pojave simptoma općenito nema značajnu korist, jer je gripa samoograničavajuća bolest. Međutim, antivirusno liječenje može biti korisno ako se započne nakon 48 sati kod pacijenata s teškom, kompliciranom ili progresivnom bolešću ili kod hospitaliziranih pacijenata [20, 21]. U okolišu, oseltamivir se očekivano blago adsorbira na suspendirane čestice i sediment. Međutim, ova adsorpcija može biti jača nego što procjene sugeriraju, jer se kationi općenito snažnije adsorbiraju na sediment nego neutralne molekule. Tijekom konvencionalnog pročišćavanja otpadnih voda, oseltamivir karboksilat nije adekvatno uklonjen, ali značajno uklanjanje može se postići naknadnom ozonizacijom, koja također rezultira gubitkom aktivnosti neuraminidaze oseltamivir karboksilata. Nakon ispuštanja u okoliš, oseltamivir i oseltamivir karboksilat se slabo razgrađuju, što dovodi do njihove prisutnosti u površinskim vodama u koncentracijama do 200 ng/L [22].

### 2.2.3.3. Sofosbuvir

Sofosbuvir je antivirusni lijek izravnog djelovanja koji se koristi za liječenje kroničnog hepatitisa C, infekcije jetre uzrokovane virusom hepatitisa C (HCV), kao dio kombinirane terapije. Od 2011. godine, mogućnosti liječenja kroničnog hepatitisa C značajno su napredovale s razvojem izravno djelujućih antivirusnih lijekova (DAA), poput sofosbuvira. Sofosbuvir pripada klasi organskih spojeva poznatih kao pirimidin 2'-dezoksiribonukleozidi. Kao predlijevak nukleotidni analog, sofosbuvir se metabolizira u svoj aktivni oblik, koji djeluje kao neispravan supstrat za sintezu NS5B, ključne RNA polimeraze za replikaciju virusa hepatitisa C. Time se inhibira visoka stopa replikacije i genetska raznolikost virusa [23]. Sofosbuvir je strukturno analog uridina, jedne od osnovnih građevnih jedinica RNK na kojeg su vezani fosforamidna grupa koja omogućava ulazak lijeka u stanice i njegovo aktiviranje unutar stanice te fluor koji doprinosi stabilnosti i učinkovitosti lijeka (Slika 2.7).

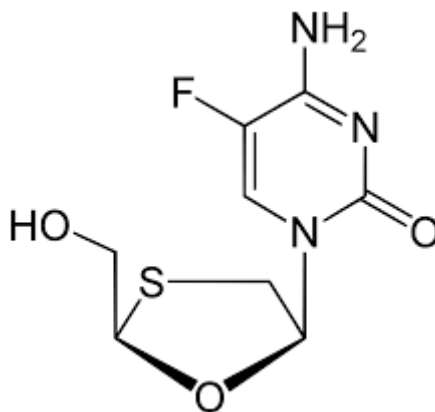


Slika 2.7. Strukturna formula sofosbuvir antivirusika [16].

Sofosbuvir i drugi antivirusni lijekovi izravnog djelovanja su moćne opcije za liječenje hepatitisa C, jer pružaju visoku otpornost na razvoj rezistencije [24]. Ovo je važna prednost u odnosu na lijekove koji ciljaju druge virusne enzime poput proteaza, gdje se brza rezistencija pokazala problematičnom. Ovisno o genotipu, sofosbuvir se često koristi u kombinaciji s drugim antivirusnim lijekovima kao što su ledipasvir, velpatasvir, elbasvir, grazoprevir i ribavirin, s ciljem postizanja trajnog virološkog odgovora (SVR) nakon 12 tjedana terapije. Postizanje SVR i iskorjenjivanje HCV infekcije povezano je sa značajnim dugoročnim zdravstvenim koristima, uključujući smanjenje oštećenja jetre, poboljšanu kvalitetu života, smanjenu incidenciju hepatocelularnog karcinoma i smanjenu smrtnost [25, 26]. Liječenje sofosbuvikom povezano je s minimalnim nuspojavama, najčešće glavoboljom i umorom, što je velika prednost u odnosu na starije režime temeljene na interferonu i ribavirinu, koji su imali značajne nuspojave poput reakcija na mjestu infuzije, smanjenja krvne slike i neuropsihijatrijskih učinaka [27].

#### 2.2.3.4. Emtricitabin

Emtricitabin, često nazivan FTC, je antiretrovirusni lijek koji se koristi za liječenje i prevenciju HIV infekcije. Pripada skupini nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze (NRTI), lijekova koji blokiraju enzim reverznu transkriptazu, ključan za repliciranje HIV virusa. Kao sintetički analog citidina, emtricitabin se unutar stanica pretvara u aktivni oblik, emtricitabin trifosfat. Ovaj aktivni metabolit natječe se s prirodnim molekulama za ugradnju u DNK lanac koji virus stvara. Emtricitabin je analog citidina, jednog od osnovnih građevnih blokova DNK koji u svojoj strukturi sadrži atome fluora i sumpora koji doprinose učinkovitosti i stabilnosti lijeka. Emtricitabin također sadrži modificirani deoksiribozni šećer, što omogućava integraciju u virusnu DNK (Slika 2.8).

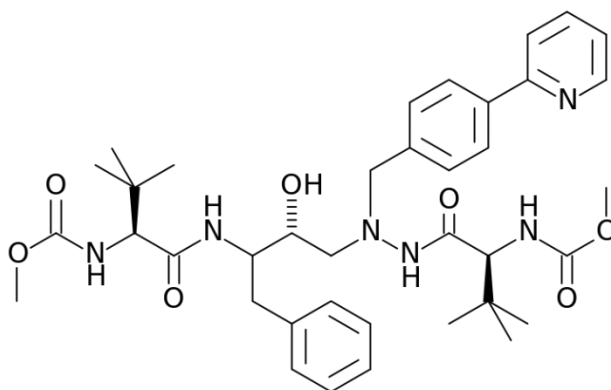


**Slika 2.8.** Strukturna formula emtricitabin antivirotika [16].

Kada emtricitabin trifosfat uđe u DNK lanac, prekida njegov rast i time sprečava daljnju virusnu replikaciju. Emtricitabin se najčešće koristi u kombinaciji s drugim antiretrovirusnim lijekovima, poput tenofovira disoproksil fumarata ili tenofovira alafenamida, kako bi se povećala učinkovitost liječenja i smanjio rizik od razvoja rezistencije. Ove kombinacije ne samo da liječe HIV, već se i koriste za prevenciju HIV-a kod osoba s visokim rizikom. Lijek se dobro apsorbira nakon uzimanja, s oko 93% biodostupnosti. Najviša koncentracija u krvi postiže se unutar 1-2 sata, a lijek se ravnomjerno distribuira po tijelu, uključujući cerebrospinalnu tekućinu. Izlučuje se putem bubrega, a poluvrijeme eliminacije je oko 10 sati, što omogućuje doziranje samo jednom dnevno. Emtricitabin se obično dobro podnosi, no može uzrokovati nuspojave poput glavobolje, mučnine, proljeva i osipa. Dugotrajna uporaba može dovesti do razvoja rezistencije, stoga je važno koristiti ga u kombinaciji s drugim lijekovima. Uvođenje emtricitabina, zajedno s drugim NRTI-ima, značajno je poboljšalo liječenje HIV-a. Kombinirani režimi koji uključuju emtricitabin vrlo su uspješni u smanjenju virusnog opterećenja i poboljšanju imunološkog zdravlja. Kao ključna komponenta modernih antiretrovirusnih terapija, emtricitabin igra ključnu ulogu u učinkovitom upravljanju HIV infekcijom i prevenciji njezina širenja [28, 29].

#### **2.2.3.5. Atazanavir**

Atazanavir je antiretrovirusni lijek koji pripada klasi inhibitora proteaze i koristi se za liječenje infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV). Ovaj lijek se izdvaja od drugih inhibitora proteaze po svojoj mogućnosti da se uzima jednom dnevno, dok mnogi drugi zahtijevaju više doza tijekom dana. Također, atazanavir ima manji utjecaj na lipidni profil pacijenata, što znači da manje utječe na razine kolesterola i drugih masnih tvari u krvi. Atazanavir pripada klasi organskih spojeva poznatih kao derivati valina, koji uključuju spojeve s valinom ili njegovim derivatima nastalim reakcijama s amino ili karboksi skupinama ili zamjenom vodika glicina heteroatomima. Atazanavir u svojoj strukturi sadrži karbamatnu grupu koja doprinosi njegovoj sposobnosti da inhibira HIV proteazu, fenilnu grupu koja dodaje hidrofobnost molekuli što pomaže njezinoj interakciji s enzimima te hidroksilnu skupinu koje sudjeluje u formiranju vodikovih veza sa ciljanim enzimom (Slika 2.9).

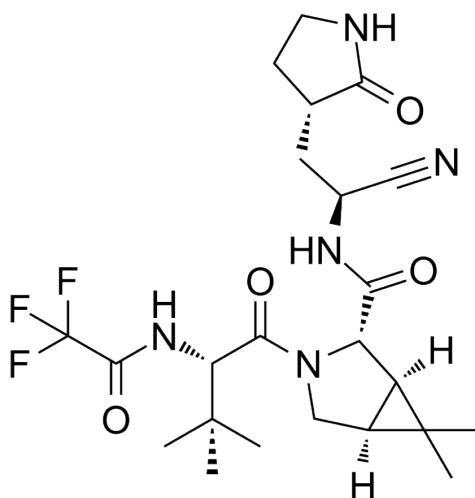


**Slika 2.9.** Struktura formula atazanavir antivirusna [16].

Kao i drugi inhibitori proteaze, atazanavir se koristi u kombinaciji s drugim antiretrovirusnim lijekovima. HIV-1 proteaza je enzim neophodan za razgradnju virusnih poliproteina na funkcionalne proteine koji su ključni za stvaranje infektivnih HIV-1 čestica. Atazanavir se veže na aktivno mjesto ovog enzima, inhibirajući njegovu funkciju. Ova inhibicija sprječava razgradnju virusnih poliproteina, što rezultira stvaranjem nezrelih, neinfektivnih virusnih čestica [30]. Inhibitori proteaze gotovo uvijek se koriste u kombinaciji s najmanje dva druga antiretrovirusna lijeka. Atazanavir se može koristiti u kombiniranim lijekovima, uključujući druge antiretrovirusne lijekove, a ponekad se uzima s ritonaviro, koji djeluje kao pojačivač i povećava razinu atazanavira u krvi. Moguće nuspojave atazanavira uključuju gastrointestinalne simptome, glavobolje, osip na koži, povećanje razine bilirubina u krvi (što može uzrokovati žuticu), te probleme s funkcijom bubrega. Rijetko, ali ozbiljno, mogu se javiti i problemi sa srcem te hepatotoksičnost [28].

#### 2.2.3.6. Nirmatrelvir

Nirmatrelvir je inovativni lijek namijenjen liječenju COVID-19, zarazne bolesti koju uzrokuje SARS-CoV-2 virus. Kao dio kombinirane terapije, nirmatrelvir pomaže u smanjenju težine bolesti i prevenciji potencijalnih komplikacija. Nirmatrelvir u svojoj strukturi sadrži piperidinsku grupu koja se uključuje u stvaranje stabilne spiralne strukture, što je važno za efikasnu inhibiciju enzima 3CL proteaze, cijanidnu skupinu koja doprinosi afinitetu prema ciljanom enzimu te karbamatna skupinu koja pomaže u stabilizaciji molekule i povećava specifičnost za proteazu (Slika 2.10).



**Slika 2.10.** Strukturna formula nirmatrelvir antivirusika [16].

Nirmatrelvir je specifičan inhibitor proteaze, usmjeren na ključni enzim SARS-CoV-2 virusa. Slično drugim inhibitorima proteaze, kao što su oni korišteni u liječenju HIV-a, nirmatrelvir blokira enzim 3CL-proteazu. Ovaj enzim je presudan za razgradnju virusnih poliproteina na njihove funkcionalne komponente, što omogućava replikaciju virusa. Blokiranjem 3CL-proteaze, nirmatrelvir sprječava formiranje zrelih virusnih čestica, rezultirajući proizvodnjom nezrelih i nefunkcionalnih virusa, čime se smanjuje količina virusa u organizmu i usporava napredovanje bolesti. Ovaj lijek se koristi u kombinaciji s ritonavinom, koji djeluje kao pojačivač. Ritonavir inhibira enzim CYP3A4, čime povećava koncentraciju nirmatrelvira u krvi i poboljšava njegovu učinkovitost. Ova kombinacija posebno je korisna za liječenje blage do umjerene COVID-19 infekcije kod osoba s visokim rizikom od razvoja teškog oblika bolesti. Standardna doza nirmatrelvira u kombinaciji s ritonavinom uzima se oralno u obliku tableta, dva puta dnevno tijekom pet dana. Ključno je pridržavati se preporuka o doziranju i trajanju terapije kako bi se postigla maksimalna učinkovitost lijeka. Kao i svi lijekovi, nirmatrelvir može izazvati nuspojave. Moguće nuspojave uključuju gastrointestinalne probleme poput mučnine, proljeva i bolova u stomaku, glavobolje, osip na koži, te povećanje razine jetrenih enzima. Iako rijetke, ozbiljne nuspojave mogu uključivati teške alergijske reakcije ili interakcije s drugim lijekovima [31].

### 2.3. Ekotoksikologija

Ekotoksikologija je znanost koja proučava utjecaj otrovnih tvari na okoliš, spajajući principe ekologije i toksikologije. Ona nam pomaže razumjeti kako različite onečišćujuće tvari, poput kemikalija (teški metali, pesticidi, lijekovi, industrijske kemikalije) i fizičkih čestica

(mikroplastika), utječu na živi svijet, populacije i ekosustave. Glavni cilj ekotoksikologije je procijeniti i smanjiti rizike koje zagađivači predstavljaju za okoliš, promičući održivost i očuvanje prirodne ravnoteže. Ona ispituje akutnu i kroničnu toksičnost tvari. Akutna toksičnost mjeri neposredne učinke tvari nakon kratkotrajne izloženosti, dok kronična toksičnost procjenjuje dugoročne učinke nakon produžene izloženosti, uključujući razvojne, reproduktivne ili promjene u ponašanju organizama. Ključni pojmovi u ekotoksikologiji uključuju bioakumulaciju i biomagnifikaciju. Bioakumulacija se odnosi na nakupljanje toksičnih tvari u organizmu kroz vrijeme, često kroz hranidbeni lanac. Biomagnifikacija opisuje povećanje koncentracije toksičnih tvari kako se kreću uzlaznim razinama hranidbenog lanca, što znači da najveći grabežljivci mogu imati veće razine toksina u svojim tijelima. Ekotoksikologija procjenjuje utjecaje na okoliš analizom razina izloženosti, toksičnosti i vjerojatnosti štetnih učinaka te praćenjem zdravlja ekosustava tijekom vremena kako bi se identificirale promjene povezane s izloženošću toksičnim tvarima. Ispitivanje ekotoksičnosti se provodi laboratorijskim i terenskim ispitivanjima. Također, ekotoksikologija uključuje strategije ublažavanja i sanacije, poput sprječavanja ispuštanja štetnih tvari i uklanjanja zagađivača s kontaminiranih mjesta, koristeći bioremedijaciju (mikroorganizmi) i fitoremedijaciju (biljke). Ekotoksikologija igra ključnu ulogu u zaštiti okoliša, omogućujući nam bolje razumijevanje i upravljanje utjecajem zagađivača te razvoj strategija za očuvanje prirodnih resursa i zdravlja ekosustava (Slika 2.11) [32].



**Slika 2.11.** Područje proučavanja ekotoksikologije [32].



U ekotoksikologiji se kao jedan od parametara ekotoksičnosti koristi efektivna vrijednost.  $EC_{50}$ , ili polumaksimalna učinkovita koncentracija, je parametar koji se koristi za mjerenje koncentracije tvari potrebne za postizanje specifičnog učinka u 50% populacije pod definiranim uvjetima. Ovaj parametar je široko primjenjivan u raznim područjima, poput farmakologije i toksikologije. U farmakologiji,  $EC_{50}$  označava koncentraciju lijeka koja izaziva odgovor na pola puta između osnovne i maksimalne vrijednosti. U toksikologiji,  $EC_{50}$  se koristi za procjenu akutne toksičnosti tvari, mjereći koncentraciju koja uzrokuje uništavanje 50% populacije unutar određenog vremena izloženosti. Vrijednost  $EC_{50}$  može se dobiti laboratorijskim testiranjem ili predvidjeti pomoću modela kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (QSAR) temeljenih na molekularnim deskriptorima.  $EC_{50}$  je ključan parametar za procjenu snage i toksičnosti tvari, te se koristi za usmjeravanje razvoja lijekova, odabir doze i procjenu rizika za okoliš [33].

## **2.4. Testovi ekotoksičnosti**

Kako bi se bolje razumjelo koliko je određena tvar štetna za okoliš provode se testovi toksičnosti. Testovi toksičnosti koriste se za izlaganje bioloških organizama okolišnim medijima poput zraka, vode, sedimenta i tla kako bi se procijenili učinci onečišćenja na preživljavanje, rast, reprodukciju i ponašanje tih organizama. Ovi testovi pomažu u utvrđivanju jesu li koncentracije onečišćivača dovoljno visoke da izazovu smrtonosne, subletalne ili općenito štetne učinke. Testovi toksičnosti pridonose procjeni ekološkog rizika na specifične načine i u različitim fazama procjene. Ispitivanja toksičnosti mogu karakterizirati prirodu toksičnih učinaka, bilo akutnih, nesmrtonosnih, kroničnih ili drugih. Akutna i kronična ispitivanja provode se s raznim organizmima kao što su ribe, rakovi, alge i mikroorganizmi. Dugotrajniji testovi, koji obuhvaćaju razdoblje sazrijevanja i reprodukcije, koriste se za procjenu kroničnih toksičnih učinaka. Za opisivanje kemikalija koriste se tri specifična svojstva: toksičnost u vodi (utjecaj tvari na žive organizme, na temelju testova toksičnosti za vodene životinje i biljke), razgradivost (postojanost tvari u okolišu, temeljena na molekularnoj strukturi ili analitičkom ispitivanju) te bioakumulacija/biokoncentracija (akumulacija tvari u živim organizmima, koja može ali ne mora dovesti do toksičnih učinaka) [34].

### **2.4.1. *Pseudomonas putida***

*Pseudomonas putida* je štapičasta, gram-negativna, aerobna bakterija koja često nastanjuje razne vrste tla i vodena staništa. Može rasti i u anaerobnim uvjetima gdje može koristiti nitrate kada kisik nije dostupan kao terminalni akceptor elektrona u metabolizmu. Ove bakterije su pokretne zahvaljujući jednoj ili više polarnih flagela te su ravne do blago zakrivljene štapičaste

strukture, duljine 1,5–5,0  $\mu\text{m}$  i promjera 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  (Slika 2.12). *Pseudomonas putida* je kemoorganotrofna, što znači da koristi organske spojeve za energiju i ne zahtijeva specifične faktore rasta. Najbolje raste na temperaturama između 25–30°C i pri pH iznad 4,5. Jedan od značajnih sojeva, KT2440, kolonizira korijenje biljaka u simbiotskom odnosu gdje bakterija uzima hranjive tvari s površine korijena, potičući vlastiti rast, dok zauzvrat potiče rast biljaka i štiti ih od patogena. Zbog tih korisnih svojstava, istraživači koriste *Pseudomonas putida* u bioinženjeringu za razvoj biopesticida i poboljšanje zdravlja biljaka [35, 36]. Ova bakterija ima raznolik aerobni metabolizam koji može razgraditi organska otapala poput toluena i pretvoriti stirensko ulje u biorazgradive plastike nazvane polihidroksialkanoati (PHA) [37]. To pomaže u razgradnji polistirenske pjene, za koju se prije smatralo da nije biorazgradiva. Ono što *Pseudomonas putida* čini jedinstvenom jest činjenica da su mnogi njezini geni uključeni u razgradnju aromatskih i alifatskih ugljikovodika, opasnih kemikalija nastalih izgaranjem goriva, ugljena, duhana i drugih organskih tvari. Postoji značajan interes za sekvenciranje genoma *Pseudomonas putida* zbog njezine učinkovitosti u bioremedijaciji [38]. Ima kružni genom s najmanje osamdeset gena iz obitelji oksidoreduktaza, uključenih u razgradnju tvari u okolišu [39].



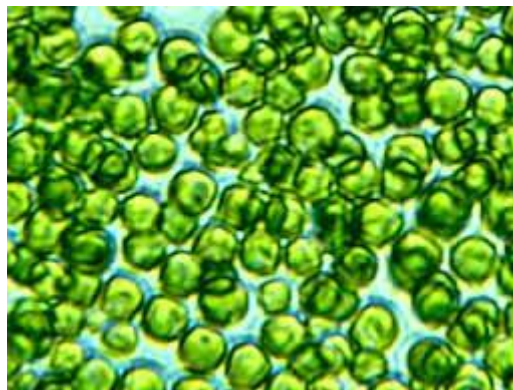
**Slika 2.12.** Prikaz mikrofotografije uzorka bakterije *Pseudomonas putida* obojenog po Gramu [40].

*Pseudomonas putida* je značajna za okoliš zbog svog složenog metabolizma i sposobnosti kontrole onečišćenja [41]. Iako je aerobna bakterija, proizvodi katalazu kako bi se zaštitila od toksičnih nusproizvoda kisika poput superoksida i vodikovog peroksida [42]. *Pseudomonas putida* također posjeduje važne lipide koji omogućuju prilagodbu na fizičke i kemijske stresove, mijenjajući stupanj zasićenosti masnih kiselina i stvarajući ciklopropanske masne kiseline. Ove karakteristike omogućuju joj preživljavanje u kontaminiranim područjima [43]. Kao nepatogena bakterija, rijetko uzrokuje bolesti kod ljudi, uglavnom kod imunokompromitiranih pacijenata, uzrokujući septikemiju (prisutnost bakterija u krvi), upalu pluća i infekcije urinarnog trakta [44]. Kada je izložena antibioticima, može razviti urođene ili stečene

mehanizme otpornosti [45]. Urođena otpornost je stabilna i prisutna u svim sojevima, dok se stečena otpornost razvija kroz kromosomske mutacije ili stjecanje mobilne ekstrakromosomske DNA [46]. Sojevi *Pseudomonas putida* ne ugrožavaju okoliš niti biološku raznolikost, čineći ih sigurnim za primjenu u bioremedijaciji [47].

#### 2.4.2. *Chlorella* sp.

*Chlorella* sp. je prva alga koju je izolirao Beijerinck i koja je poslužila kao model za proučavanje fotosinteze, prvo u radovima Warburga, a kasnije Calvina i Bensona na asimilaciji ugljičnog dioksida u biljkama. Također, *Chlorella* sp. je jedna od prvih mikroalgi koja se razmatrala za masovni uzgoj i prva mikroalga koja je proizvedena komercijalno. U početku se smatrala izvorom hrane bogatim proteinima, no predložena je i kao izvor biogoriva. *Chlorella* sp. je eukariotska mikroalga s visokim fotosintetskim učinkom. Zahvaljujući učinkovitoj fotosintezi, *Chlorella* se reproducira u samo nekoliko sati, zahtijevajući samo sunčevu svjetlost, vodu, ugljikov dioksid i malu količinu hranjivih tvari [48]. Većina vrsta *Chlorella* su slatkovodne, često prisutne u vodama bogatim hranjivim tvarima, a također rastu na tlu. Poznato je i nekoliko morskih vrsta. Rod *Chlorella* obuhvaća male, sferične do jajolike, nepomične, jednostanične ili kolonijalne mikroalge s jednim kloroplastom koji sadrži pirenoid (uloga mu je koncentracija i fiksacija ugljikovog dioksida za potrebe fotosinteze) (Slika 2.13) [49].



**Slika 2.13.** Prikaz mikroalge *Chlorella* sp. pod povećanjem [50].

Neke vrste *Chlorelle* mogu proizvesti velike količine izvanstanične sluzi. Stanice *Chlorelle* su autospore koje se razmnožavaju nespolno putem mitoze, najčešće stvaranjem četiri stanice kćeri unutar roditeljske stanice [51]. Kada ove stanice kćeri sazriju, stijenka roditeljske stanice puca i nove stanice se oslobađaju. Kompletan slijed genoma *Chlorella variabilis* otkrio je prisutnost gena povezanih s mejozom, što ukazuje na moguću prisutnost skrivenog spolnog

razmnožavanja unutar ovog roda [52]. Zelena mikroalga *Chlorella* široko se prodaje kao zdrava hrana, dodatak prehrani i nutraceutik (bioaktivna tvar koja povoljno djeluje na zdravlje ljudi) [53]. Danas se *Chlorella* proizvodi i prodaje kao dodatak zdravoj prehrani u mnogim zemljama, uključujući Kinu, Japan, Europu i Sjedinjene Države. Zbog visokog sadržaja hranjivih tvari i pozitivnih učinaka na zdravlje, *Chlorella* se smatra važnom funkcionalnom namirnicom. Sastoji se od 55-60% proteina, 1-4% klorofila, 9-18% dijetalnih vlakana te brojnih minerala i vitamina [54]. Protein *Chlorelle* sadrži sve esencijalne aminokiseline potrebne za prehranu heterotrofnih organizama. Detoksikacija metala i pesticida koju provodi *Chlorella* povezana je s porfirinskim prstenovima u klorofilu ili glutationom (antioksidans) induciranim putem proizvodnje vitamina B12. *Chlorella* također nakuplja velike količine luteina, koji je povezan s prevencijom i liječenjem makularne degeneracije (degeneracija žute pjege) [55]. Dugo se koristi kao dodatak prehrani za ljude i kao hrana za životinje u akvakulturi. Osim toga, zelena alga pokazuje se korisnom za čišćenje okoliša, poput bioremedijacije industrijskih dimnih plinova i otpadnih voda. Nedavno, zbog porasta obnovljive energije, *Chlorella* je privukla neviđeni interes kao sirovina za biogoriva i biodizel. Iako sustav ekspresije gena mikroalgi nije toliko razvijen kao sustavi sisavaca, bakterija, kvasca ili biljaka, pokazuje značajne prednosti i sve se više koristi za ekspresiju rekombinantnih proteina [56].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Antiviroci

Za ispitivanje ekotoksičnosti primjenom različitih testnih organizama korišteno je šest različitih antivirusa (Slika 3.1). Korišteni spojevi su ribavirin (RIB), oseltamivir (OSE), sofosbuvir (SOF), emtricitabin (EMT), nirmatrelvir (NIR) i atazanavir (ATA), kako je prikazano na Slici 3.1 i Tablici 3.1. Ispitivane koncentracije RIB, EMT, SOF, OSE i NIR antivirusa bile su 0,006 mmol/L, 0,013 mmol/L, 0,025 mmol/L, 0,050 mmol/L, i 0,100 mmol/L, dok su za antivirus atazanavir koncentracije bile 0,00019 mmol/L, 0,00038 mmol/L, 0,00075 mmol/L, 0,00150 mmol/L i 0,0030 mmol/L.



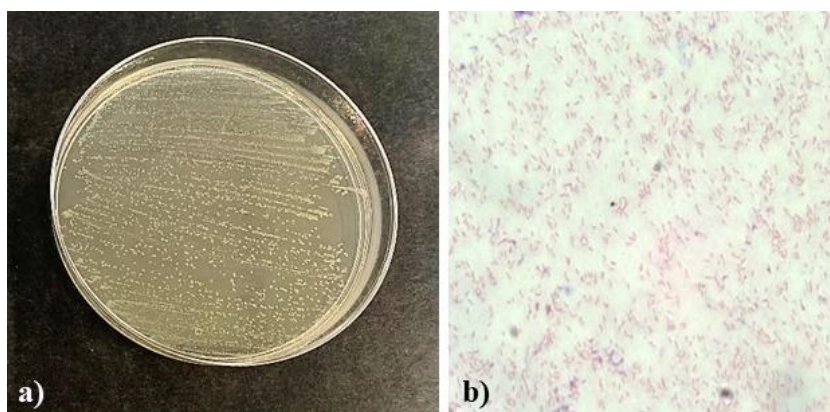
**Slika 3.1.** Prikaz antivirusa korištenih za provedbu testova ekotoksičnosti: a) ribavirin, b) oseltamivir, c) sofosbuvir, d) emtricitabin, e) nirmatrelvir te f) atazanavir.

**Tablica 3.1.** Popis antivirusa korištenih u ovome radu uz prikaz njihovih fizikalno – kemijskih svojstava.

Naziv spoja	Kratice	CAS	Molekulska formula	Mr (g/mol)	Čistoća	Proizvođač
Ribavirin	RIB	36791-04-5	$C_8H_{12}N_4O_5$	224,20	99,50 % ± 0,60 %	Sigma Aldrich
Oseltamivir	OSE	196618-13-0	$C_{16}H_{28}N_2O_4$	312,40	99,60 % ± 0,30 %	Sigma Aldrich
Sofosbuvir	SOF	1190307-88-0	$C_{22}H_{29}FN_3O_9P$	529,50	≥ 99,00 %	Biosynth
Emtricitabine	EMT	143491-57-0	$C_8H_{10}FN_3O_3S$	247,25	99,93 % ± 0,22 %	Sigma Aldrich
Nirmatrelvir	NIR	2628280-40-8	$C_{23}H_{32}F_3N_5O_4$	499,50	≥ 95,00 %	Sigma Aldrich
Atazanavir	ATA	198904-31-3	$C_{38}H_{52}N_6O_7$	704,90	96,20 % ± 0,70 %	Sigma Aldrich

### 3.1.2. Bakterije

Ekotoksičnost različitih koncentracija antivirusa određivala se primjenom testnog organizma bakterije *Pseudomonas putida* (Slika 3.2). Bakterijska kultura je uzgajana na hranjivome agaru u termostatu pri 37 °C tijekom 24 h. Navedena kultura pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.2.** Izrasle kolonije testnog organizma *Pseudomonas putida* na hranjivom agaru pri temperaturi 37 °C nakon 24 sata i (b) mikrografija trajnog preparata bakterije obojanog prema Gramu i mikroskopiranog svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem  $P = 1000x$ .

### 3.1.3. Mikroalga

Ekotoksičnost različitih koncentracija antivirusa se također određivala i primjenom testnog organizma mikroalge *Chlorella* sp. (Slika 3.3). Mikroalga je uzgajana u bazalnome mediju uz

aeraciju. Navedena kultura pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.3.** Mikrofotografija nativnog preparata mikroalge *Chlorella* sp. uslikana svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem  $P = 400x$ .

## 3.2. Mediji i kemikalije

### 3.2.1. Hranjivi agar

Za uzgoj bakterije *Pseudomonas putida* se koristio hranjivi agar. Hranjivi agar se pripremio na način da se u 1000 mL destilirane vode otopi 8 g nutrient broth-a (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991) i 18 g agara (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991) (Slika 3.4). Zatim je bilo potrebno ostaviti pripremljenu otopinu da bubri 15 minuta, a nakon toga ju zagrijavati iznad plamenika da tri puta provrije. Nakon hlađenja se dobivena smjesa prelila u bočice od 50 mL, koje su se zatvorile čepom i prekrile aluminijskom folijom te stavile na sterilizaciju u autoklav pri 121 °C i 1 atm tijekom 15 min.



**Slika 3.4.** Prikaz potrebnih nutrijenata za pripravu hranjivog agara za uzgoj bakterije.

### 3.2.2. Fiziološka otopina

Fiziološka otopina se koristila za pripremu decimalnih razrjeđenja u svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica bakterija (CFU). Pripremila se otapanjem 9 g natrijeva klorida u 1000 mL deionizirane vode kako bi se dobila 0,9%-na otopina NaCl (Slika 3.5). Fiziološka otopina se zatim razdijelila u 160 epruveta te je tako sterilizirana vlažnom sterilizacijom.



Slika 3.5. Natrijev klorid potreban za pripremu fiziološke otopine.

### 3.2.3. Mineralni medij

Za preduzgoj i provedbu testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* koristio se mineralni medij. Sastav mineralnoga medija je bio prema ISO metodi (ISO 10 712:1995) uz manju izmjenu; bez dodatka glukoze [57]. U 1000 mL destilirane vode su se otopile sljedeće soli (Slika 3.6): 0,5 g NaNO<sub>3</sub>, 0,12 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O i 0,5 mg C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>FeO<sub>7</sub>. Također je namješten pH mineralnoga medija pomoću 1 M HCl i 1 M NaOH, koji je iznosio pH = 7,18. Nakon što je namješten pH medija, medij je steriliziran vlažnom sterilizacijom.

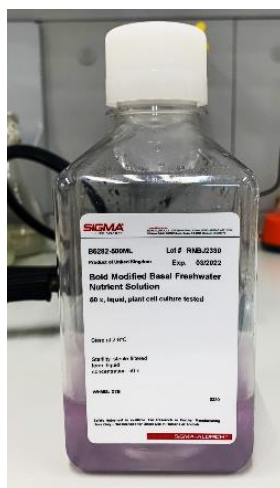




**Slika 3.6.** Soli potrebne za pripravu mineralnog medija za uzgoj i provedbu testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*: a)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , b)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , c)  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , d) željezov citrat i e)  $\text{NaNO}_3$

### 3.2.4. Bazalni medij

Mikroalga *Chlorella* sp. je uzgajana u bazalnome mediju *Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution* (Sigma-Aldrich, SAD) (Slika 3.7). U odmjernu tikvicu od 1000 mL je dodano 20 mL koncentriranog bazalnog medija te je dodana deionizirana voda do oznake. Također je namješten pH medija na  $\text{pH} = 8,111$  pomoću 1 M HCl ili NaOH. Nakon pripreme, medij je steriliziran u autoklavu.

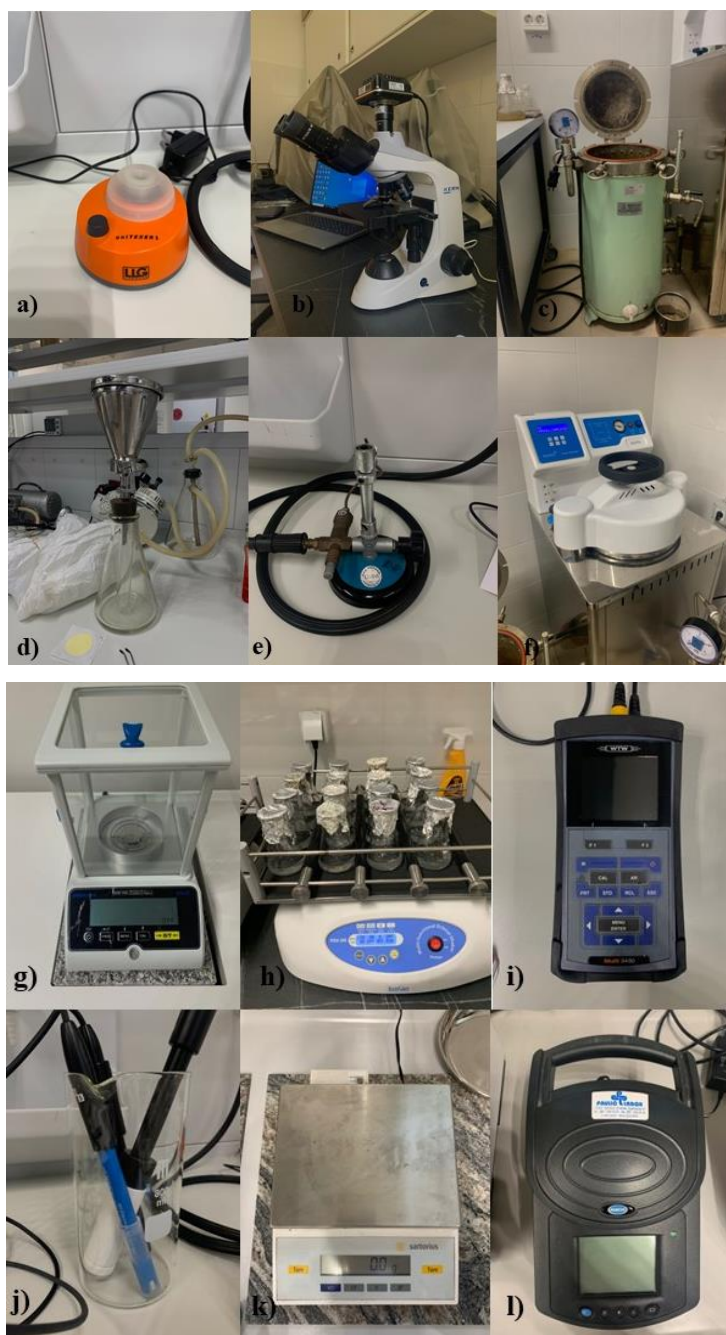


**Slika 3.7.** Bočica s koncentriranim bazalnim medijem korištenoga za uzgoj i provedbu testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

### 3.3. Mjerni instrumenti i oprema

U ovom istraživanju koristili su se sljedeći uređaji:

- standardno stakleno laboratorijsko posuđe, sterilni nastavci za pipete, poluautomatske pipete, petrijeve zdjelice
- homogenizator, LLG Labware LLG-uniTEXER 1, Njemačka, za homogeniziranje uzoraka prilikom pripreme decimalnih razrjeđenja
- svjetlosni mikroskop uz kameru, KERN & SOHN GmbH, KERN OBE 132, Njemačka, za mikroskopiranje nativnih preparata *Chlorella* sp. i trajnog preparata *Pseudomonas putida* obojanog prema Gramu
- autoklav za nečistu sterilizaciju, INKOLAB, Hrvatska
- autoklav za čistu sterilizaciju, Raypa Steam Sterilizer, AE-B Series
- vakuum pumpa za provedbu membranske filtracije, tj. filtriranje otopina antivirusa, sterilni membranski filter papir (ReliaDisc™, Ahlstrom-Munksjö, Finska)
- ultrazvučna kupelj za otapanje antivirusa
- plamenik za sterilnu tehniku rada
- precizna vaga, Sartorius BSA 822, Njemačka, za precizno vaganje odvaga antivirusa tijekom pripreme otopina
- analitička vaga, Solis Semi-Micro and Analytical Balances-SAB 125i, Adam Equipment, Velika Britanija
- rotacijska tresilica, Biosan, PSU-20i Multi-functional Orbital Shaker, Latvija
- pH elektroda Sentix 940 spojena na mikroprocesorski pH mjerač, WTW 2FD47F Multi 3430 Multiparameter Meter, Njemačka
- spektrofotometar, Hach DR/2400 Portable Spectrophotometer, Velika Britanija
- Thoma-ova komora



**Slika 3.8.** Prikaz korištenih instrumenata za pokus: a) homogenizator, b) svjetlosni mikroskop, c) autoklav za nečistu sterilizaciju, d) aparatura za membransku filtraciju, e) plamenik, f) autoklav za čistu sterilizaciju, g) analitička vaga, h) tresilica, i) pH-metar, j) elektrode za mjerenje pH i koncentracije otopljenog kisika, k) precizna vaga i l) spektrofotometar.

### 3.4. Metode rada

#### 3.4.1. Priprema otopina antivirusa

Prvi korak prije postavljanja pokusa obuhvaćao je pripremu otopina antivirusa. Odgovarajuće odvage svakoga antivirusa su odvagane na 5-decimalnoj vagi. Pri vaganju svih antivirusa su

se lađice prebrisale etanolom, kao i špatulica kojom se izuzimao uzorak. Izvagane mase su se zatim prebacile u odmjerne tikvice od 50 mL poštivajući sterilnu tehniku rada te su se otopile u mineralnom ili bazalnome mediju (ovisno o pokusu) (Slika 3.9). Tako su pripremljene temeljne otopine RIB, OSE, SOF, EMT i NIR koncentracije 0,1 mmol/L, te 0,003 mmol/L za ATA. Pripremljene temeljne otopine antivirusika NIR (0,1 mmol/L) i ATA (0,003 mmol/L) su otopljene u mediju uz pomoć ultrazvuka te potom filtrirane kroz sterilni membranski filter papir veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ .



**Slika 3.9.** Prikaz pripremljenih otopina antivirusika koncentracije 0,1 mmol/L (NIR) i 0,003 mmol/L (ATA) u mediju.

Za pripremu radnih otopina se u odmjerne tikvice od 25 mL dodao potrební volumen temeljne otopine od 0,1 mmol/L. Radne koncentracije su iznosile 0,05 mmol/L, 0,025 mmol/L, 0,013 mmol/L i 0,006 mmol/L. Navedene koncentracije se odnose na sve antivirusike osim ATA, za koji su ispitivane koncentracije bile 0,003 mmol/L, 0,0015 mmol/L, 0,00075 mmol/L, 0,00038 mmol/L i 0,00019 mmol/L (Slika 3.10). ATA se ispitivao u navedenim koncentracijama jer je njegova maksimalna topljivost u vodi 0,003 mmol/L. Nakon pripreme svih otopina antivirusika, namještena im je pH vrijednost na 7,700 (za pokus s bakterijom) i 7,054 (za pokus s mikroalgom) pomoću 1 M HCl i/ili 1 M NaOH.



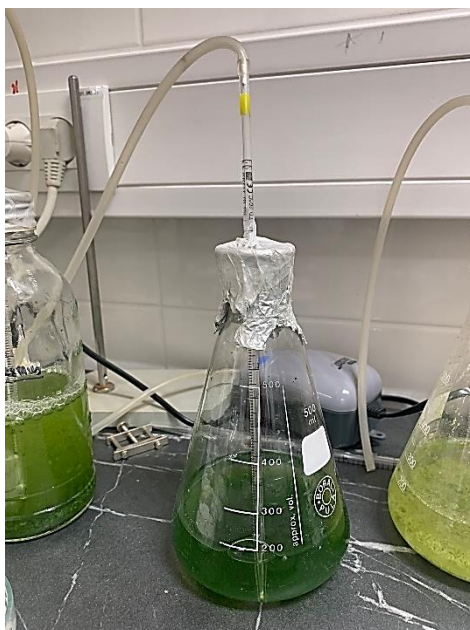
**Slika 3.10.** Prikaz pripremljenih radnih otopina antivirusa u odmjernim tikvicama od 25 mL.

### 3.4.2. Uzgoj bakterije

Bakterija *Pseudomonas putida* je uzgajana na hranjivom agaru pri temperaturi od 37 °C kroz 24 sata u termostatu. 24-satna kultura se koristila za provedbu testa ekotoksičnosti. Prije postavljanja pokusa bakterijska je kultura stavljena na preduzgoj tijekom  $5 \pm 0,1$  h u svrhu prilagodbe na uvjete mineralnoga medija [58]. Spektrofotometrom je određena optička gustoća bakterijske suspenzije gdje se 0,5 mL suspenzije dodalo u 4,5 mL deionizirane vode te je očitana vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini  $\lambda = 436$  nm. Početna optička gustoća bakterijske suspenzije iznosila je  $OG = 0,2$ .

### 3.4.3. Uzgoj mikroalge

Mikroalga se uzgajala dva tjedna u bazalnom mediju uz aeraciju (Slika 3.11). Aeracijom se postizala homogenizacija suspenzije, sprječavalo se taloženje mikroalge, ali se i osiguravala koncentracija otopljenoga kisika potrebna mikroalgama. Iz guste suspenzije mikroalgi, izuzeto je 0,5 mL te se spektrofotometrijski pri valnoj duljini  $\lambda = 670$  nm očitala optička gustoća. Gusta suspenzija je razrijeđena po potrebi kako bi početna optička gustoća za pokus iznosila  $OG = 0,02$ .



**Slika 3.11.** Uzgoj testnog organizma mikroalge *Chlorella* sp. u bazalnome mediju uz areaciju.

#### **3.4.4. Sterilna tehnika rada**

Pri radu s mikroorganizmima je bitno svaki korak provoditi u sterilnim uvjetima. Svo posuđe koje se koristilo je prethodno bilo dobro oprano i prekriveno aluminijskom folijom te sterilizirano u autoklavu. Najprije je bilo potrebno pripremiti površinu na kojoj se radio pokus tako što se upalio plamenik i površina dezinficirala dezinfekcijskim sredstvom (izosanom). Pri korištenju bilo kojeg od laboratorijskog posuđa se nakon skidanja folije uvijek moralo proći otvorom kroz plamen kako bi se održali sterilni uvjeti, kao i nakon korištenja. Također je bilo bitno da se svo otvoreno posuđe nalazi u blizini plamenika.

#### **3.4.5. Određivanje ekotoksičnosti antivirusika primjenom bakterije *Pseudomonas putida***

Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* provodio se prema ISO uputama ISO 10 712:1995 uz manju modifikaciju [57]. Naime, mineralni medij korišten za provedbu pokusa koristio se bez dodatka glukoze. Pokus je postavljen u Erlenmeyerovim tikvicama od 100 mL uz radni volumen od 20 mL. U svaku je tikvicu dodan odgovarajući volumen bakterijske suspenzije, mineralnog medija i otopine antivirusika. Tako pripremljene tikvice su stavljene na rotacijsku tresilicu pri sobnoj temperaturi i 150 o/min, kako bi se osiguravala homogenizacija uzoraka. Početni uvjeti u tikvicama su izlistani u Tablici 3.3. Postavljene su i slijepe probe, koje nisu sadržavale otopinu antivirusika. Nakon 16 h provedbe pokusa, određivao se ukupni broj živih stanica bakterija (CFU). Određivao se pripravom decimalnih razrjeđenja tako da se 1 mL suspenzije otpipetirao u epruvetu s fiziološkom otopinom od 9 mL,

čime se dobilo  $10^{-1}$  razrjeđenje. Zatim se iz te epruvete, koja je dobro homogenizirana, također izuzelo 1 mL i dodalo u sljedeću epruvetu od 9 mL ( $10^{-2}$  razrjeđenje). Na tako opisani način su se pripremila preostala razrjeđenja do  $10^{-6}$ . Bitno je napomenuti da je prije svakog izuzimanja bilo potrebno dobro homogenizirati svako razrjeđenje. Iz posljednje se epruvete poluatomatskom pipetom izuzimao 1 mL potrebnog razrjeđenja i dodao u Petrijevu zdjelicu te zalio hranjivim agarom i dobro homogenizirao. Pripremljene Petrijeve zdjelice su se stavile u termostat 24 sata pri temperaturi od 37 °C. Nakon 24 sata se pratio broj izraslih kolonija na način da se brojalo koliko je kolonija izraslo u svakoj od ispitivanih koncentracija antivirusika.

**Tablica 3.2.** Početni uvjeti provedbe testa ekotoksičnosti antivirusika primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

OG <sub>0sr.</sub>	CFU <sub>0</sub> / st/mL	logCFU <sub>0</sub> / -	pH-vrijednost <sub>0</sub> / -	T / °C
0,27	$2,5 \cdot 10^7$	7,40	7,18	23,4

Nakon što su se izrasle kolonije na hranjivome agaru izbrojale, izračunat je ukupni broj živih stanica bakterija (CFU) prema formuli (1):

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}} \quad (1)$$

Inhibicija se računala s obzirom na CFU vrijednost u svakome uzorku i na CFU vrijednost u slijepoj probi prema formuli (2):

$$INH = \frac{CFU_{kontrola} - CFU_{uzorak}}{CFU_{kontrola}} \times 100\% \quad (2)$$

gdje je CFU<sub>kontrola</sub> ukupan broj živih stanica u kontrolnim tikvicama, a CFU<sub>uzorak</sub> predstavlja ukupan broj živih stanica bakterije u tikvicama s otopinom antivirusika.

EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> vrijednosti su se procjenjivale iz jednadžbe pravca koja je dobivena linearizacijom eksperimentalnih podataka – inhibicije (INH) i ispitivanih koncentracija antivirusika (*c*). Dakle, iz odnosa  $\ln\gamma$  i  $\ln(c)$ , gdje se  $\ln\gamma$  računao prema formuli (3):

$$\ln\gamma = \ln\left(\frac{INH/\%}{100 - INH/\%}\right) \quad (3)$$

gdje INH predstavlja inhibiciju rasta bakterije za određenu ispitivanu koncentraciju antivirusika.

### 3.4.6. Određivanje ekotoksičnosti antivirusika primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp. proveden je prema OECD uputama [59, 60]. Pokus je postavljen u Erlenmeyerovim tikvicama od 100 mL uz radni volumen od 20 mL. U svaku je tikvicu dodan odgovarajući volumen suspenzije mikroalge, bazalnog medija i otopine antivirusika (Slika 3.12). Tako pripremljene otopine su stavljene na rotacijsku tresilicu pri sobnoj temperaturi i 150 o/min u svrhu homogenizacije. Postavljene su i slijepe probe, koje su sadržavale sve osim otopine antivirusika. Početni uvjeti pri kojima se provodio ovaj pokus su izlistani u Tablici 3.4.



Slika 3.12. Prikaz postavljenih tikvica za provedbu testa ekotoksičnosti antivirusika primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Tablica 3.3. Početni uvjeti provedbe testa ekotoksičnosti antivirusika primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

OG <sub>0sr.</sub>	CFU <sub>0</sub> / st/mL	logCFU <sub>0</sub> / -	pH-vrijednost <sub>0</sub> / -	T / °C
0,025	6,1 · 10 <sup>5</sup>	5,79	7,62	25,1

Pokus se provodio tijekom 72 sata tijekom kojih se svaka 24 sata određivao ukupan broj živih stanica mikroalgi (CFU). Za određivanje CFU, Pasteur pipetom se izuzeo uzorak uz sterilnu tehniku rada te se CFU određivao pomoću Thoma-ove komorice (Slika 3.13). Brojanje se vršilo na 3 kvadrata te se prebrojalo koliko je stanica unutar svakog od njih. Broj živih stanica u 1 mL, *N*, se računao prema formuli (4):

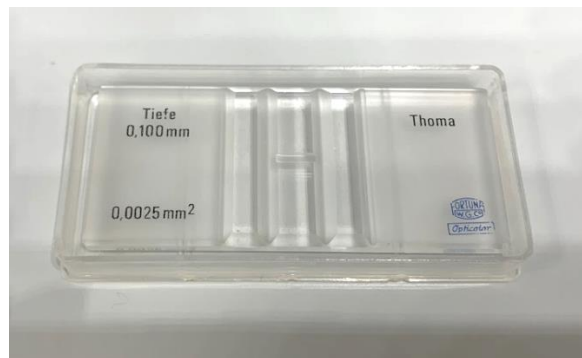
$$N = \frac{n \cdot m \cdot 16 \cdot 10^4}{K} \quad (4)$$



gdje su:  $n$  - recipročna vrijednost razrjeđenja,  $m$  – ukupan broj pobrojanih stanica, 16 - ukupni broj velikih kvadrata,  $10^4$  - korekcija volumena i  $K$  - broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje.

Nakon izvršenog brojanja živih stanica se računala inhibicija prema formuli (2) iz koje su se dalje računale  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  vrijednosti iz jednadžbe pravca na isti način kao u testu ekotoksičnosti bakterije *Pseudomonas putida* prema formuli (3).

Prije i nakon provedbe testa ekotoksičnosti je mjerena pH vrijednost u postavljenim tikvicama, koja se nije značajno mijenjala.



**Slika 3.13.** Thoma-ova komorica pomoću koje je praćen ukupan broj živih stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom 72 h provedbe testa ekotoksičnosti antivirotika.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Test ekotoksičnosti antivirusika primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida* se provodio tijekom 16 h nakon kojih se određivao ukupan broj živih stanica bakterija (CFU). U Tablici 4.1 su prikazani rezultati dobiveni provedbom ovoga testa ekotoksičnosti.

**Tablica 4.1.** Dobivene inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* nakon 16 h provedbe testa ekotoksičnosti za ispitivane koncentracije antivirusika ribavirin (RIB), sofosbuvir (SOF), oseltamivir (OSE), emtricitabin (EMT), nirmatrelvir (NIR) i atanazavir (ATA).

antivirusik	INH / %				
RIB	0,00	10,59	15,88	17,65	23,53
SOF	24,12	27,65	34,12	38,24	61,18
OSE	0,00	0,00	0,00	0,00	30,59
EMT	86,47	97,82	97,94	98,41	98,94
NIR	0,00	0,00	3,55	10,66	13,71
koncentracija	0,006 mM	0,013 mM	0,025 mM	0,05 mM	0,1 mM
antivirusik	INH / %				
ATA	12,69	22,84	28,93	30,96	42,13
koncentracija	0,00019 mM	0,00038 mM	0,00075 mM	0,0015 mM	0,003 mM

U Tablici 4.1 su prikazani iznosi inhibicije za svaku koncentraciju 6 ispitivanih antivirusika. Uočeno je povećanje inhibicije rasta bakterije povećanjem koncentracija antivirusika. RIB ne pokazuje veliki stupanj inhibicije, jer pri najvišoj koncentraciji je uočena inhibicija rasta od 23,53 %. SOF se pokazao kao drugi najetoksičniji antivirusik zbog inhibicije od 61,18 % pri koncentraciji od 0,1 mM. OSE nije inhibirao rast bakterije niti pri jednoj ispitivanoj koncentraciji osim pri najvišoj, za koju je dobiven stupanj inhibicije od 30,59 %. Odnosno dobivene su negativne inhibicije što označava da nije došlo do ekotoksičnog utjecaja OSE na rast bakterije. U tome slučaju, CFU u uzorku s OSE je bio viši u odnosu na CFU u kontroli što ukazuje na pozitivan utjecaj OSE na rast bakterije. S druge strane, najekotoksičniji antivirusik od ispitivanih (RIB, SOF, OSE, EMT i NIR) za bakteriju jest EMT, za koji i pri najnižoj koncentraciji je uočena inhibicija od 86,47 %, a pri najvišoj koncentraciji stupanj inhibicije doseže 98,94 %. Kao najmanje toksičan antivirusik se pokazao NIR, koji pri dvije najniže koncentracije, 0,006 mM i 0,013 mM ne inhibira rast bakterije, dok je pri najvišoj koncentraciji od 0,1 mM inhibicija rasta bakterije iznosila 13,71 %. ATA je također jedan od toksičnijih antivirusika jer inhibicija rasta *Pseudomonas putida* pri koncentraciji od 0,003 mM iznosi 42,13 %. Na Slici 4.1 su prikazane doza odgovor krivulje za svih 6 ispitivanih antivirusika.

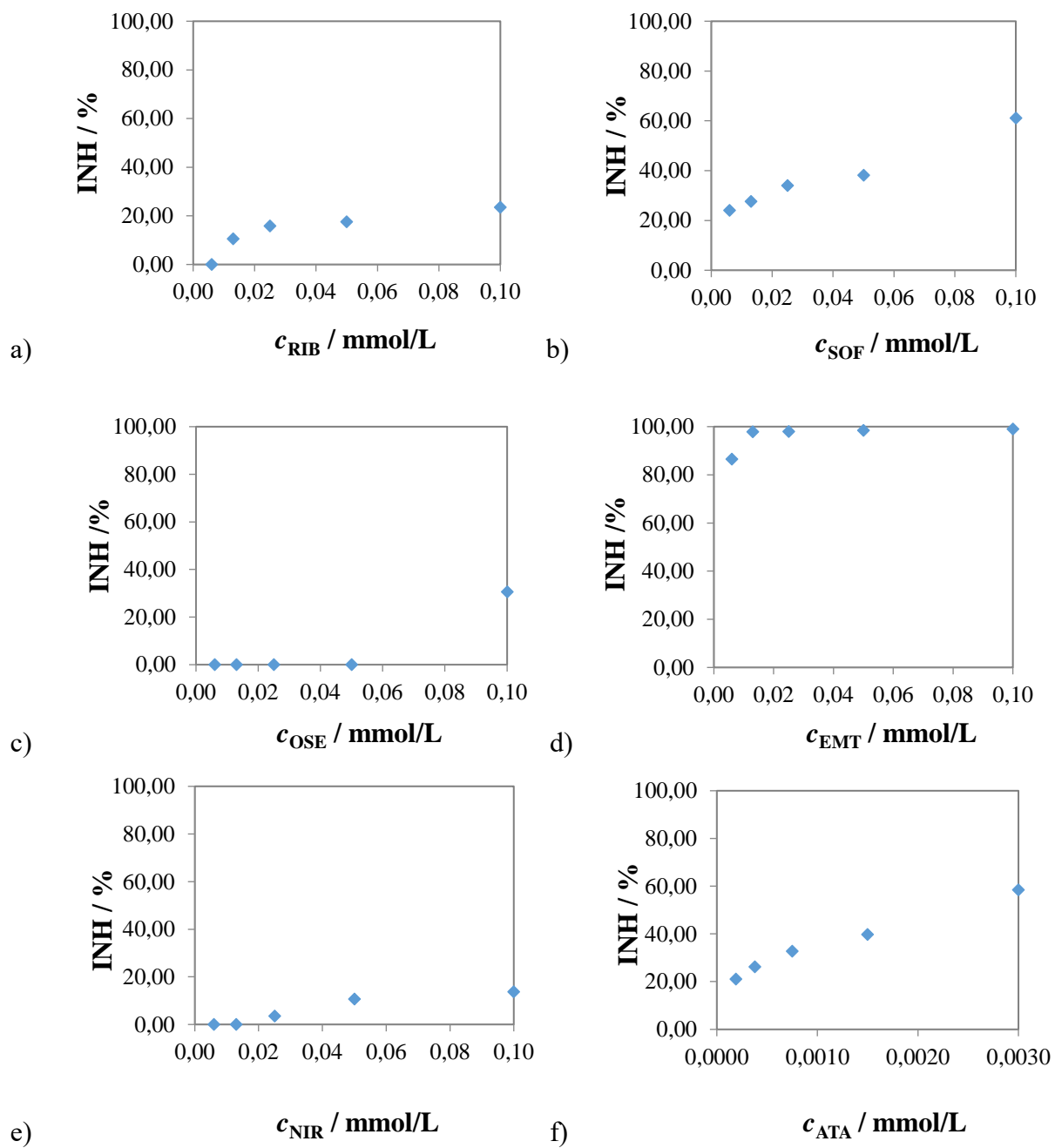
Na temelju izračunatih inhibicija i ispitivanih koncentracija antivirusika, procijenjene su EC vrijednosti, koje su prikazane u Tablici 4.2.

**Tablica 4.2.** Procijenjene EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene provedbom testa ekotoksičnosti za ispitivane antivirusike primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

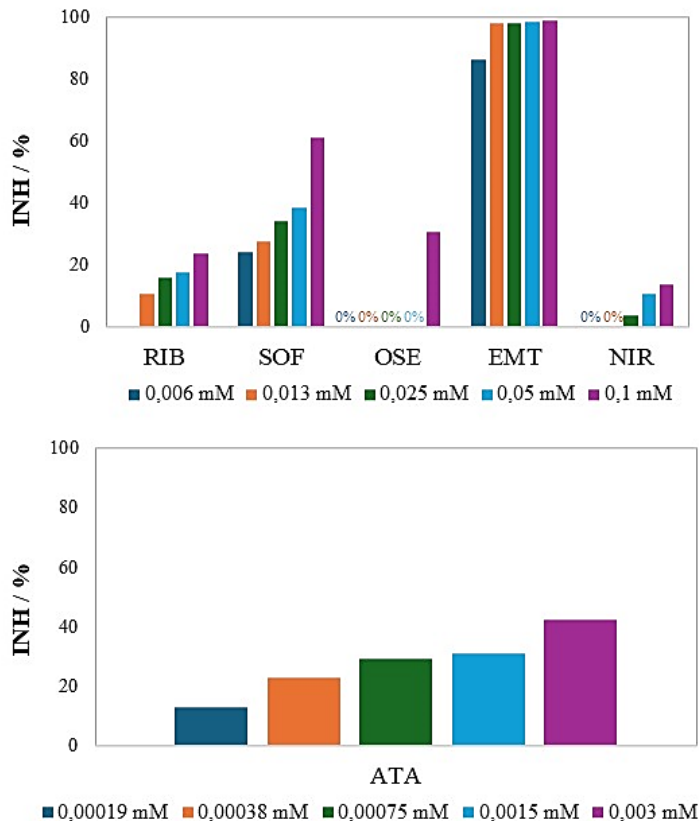
antivirusik	EC <sub>20</sub> / mmol/L	EC <sub>50</sub> / mmol/L
RIB	0,0623	-
SOF	-	0,0565
OSE	-	-
<b>EMT</b>	<b>1,01·10<sup>-8</sup></b>	<b>4,63·10<sup>-7</sup></b>
NIR	0,1337	-
ATA	0,0004	-

Za neke od antivirusika nije bilo moguće izračunati EC vrijednosti. Na primjeru RIB se može vidjeti da je pri najvišoj koncentraciji antivirusika inhibicija iznosila 23,53 % te se iz toga mogla procijeniti EC<sub>20</sub> vrijednost, ali ne i EC<sub>50</sub> vrijednost. Prema EC vrijednosti je također potvrđeno da je EMT najekotoksičniji jer pri koncentraciji od  $c = 1,01 \cdot 10^{-8}$  mmol/L uzrokuje ekotoksični efekt na 20 % populacije testnog organizma, dok je za isti efekt potrebna koncentracija NIR antivirusika od 0,1337 mmol/L (Tablica 4.2). Redoslijed ekotoksičnosti (koji je slikovito prikazan na Slici 4.2.) ispitivanih antivirusika na testnom organizmu bakteriji *Pseudomonas putida* je sljedeći:

$$EMT > ATA > SOF > RIB > NIR > OSE$$



**Slika 4.1.** Doza odgovor krivulje dobivene nakon 16 h provedbe testa toksičnosti za antivirusne: a) RIB, b) SOF, c) OSE d) EMT, e) NIR, f) ATA primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.



**Slika 4.2.** Zbirni prikaz inhibicija rasta *Pseudomonas putida* nakon 16 h izlaganja ispitivanim koncentracijama šest antivirusa.

Ovakav redoslijed ekotoksičnosti ne čudi s obzirom da je EMT struktura najjednostavnija od ostalih antivirusa, najviše je topljiv u vodi te prema tome ima najveći utjecaj na izložene organizme. NIR ima najkompliciraniju strukturu te je prema tome nedostupan te tako i najmanje ekotoksičan za vodene organizme. Niska topljivost NIR antivirusa može ograničiti izloženost vodenih organizama tim tvarima, čime se smanjuju njihovi toksični učinci. Međutim, prema dostupnoj literaturi, do sada nisu provedena istraživanja u svrhu ispitivanja ekotoksičnosti antivirusa primjenom bakterije *Pseudomonas putida*, što ukazuje na potrebu provedbe ovakvih istraživanja.

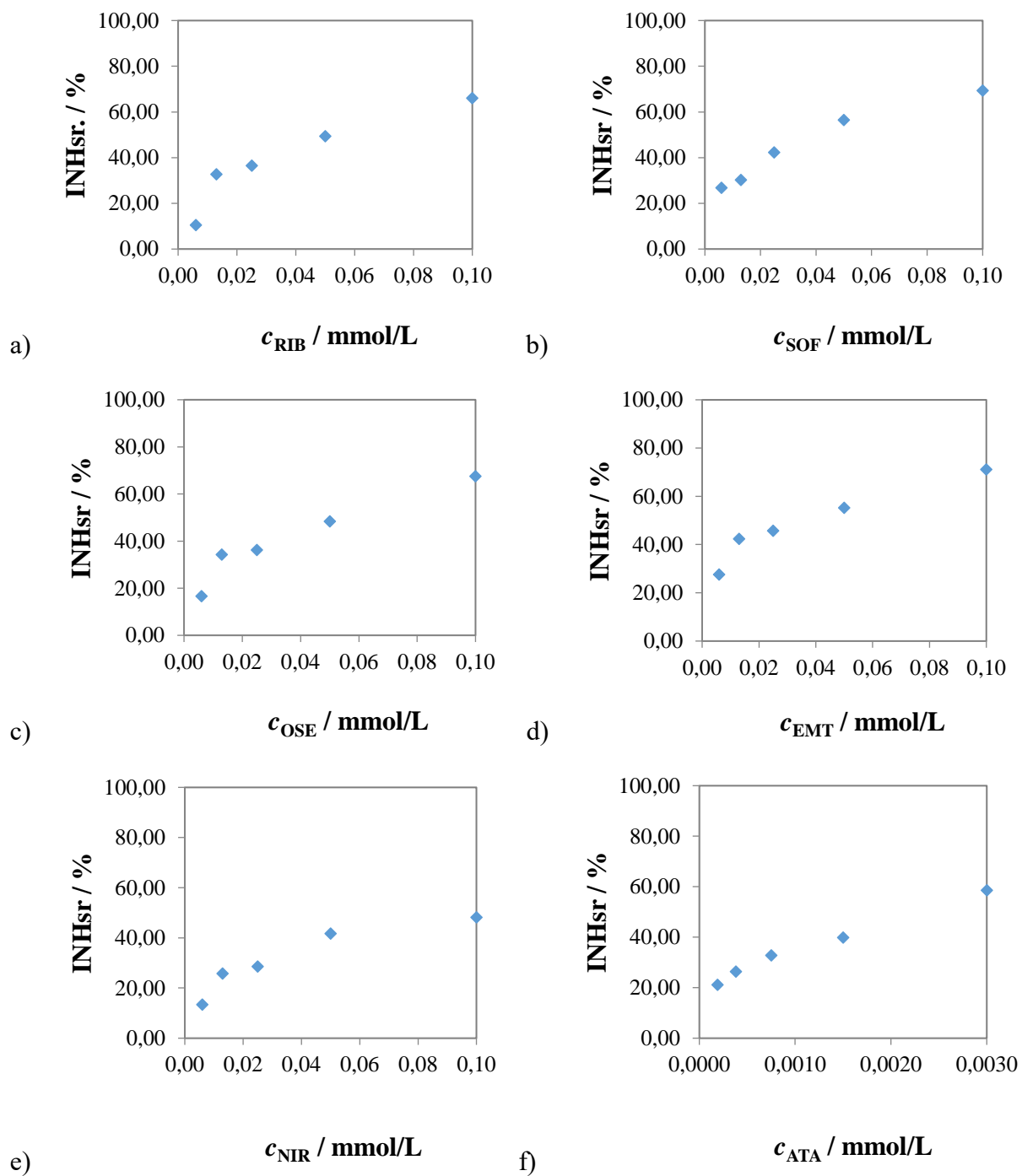
#### 4.2. Test ekotoksičnosti antivirusa primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Test ekotoksičnosti mikroalge *Chlorella* sp. se provodio 72 h. U svrhu veće preciznosti rezultata, u obzir su uzete srednje vrijednosti inhibicija za sva tri dana, koje su prikazane u Tablici 4.3.

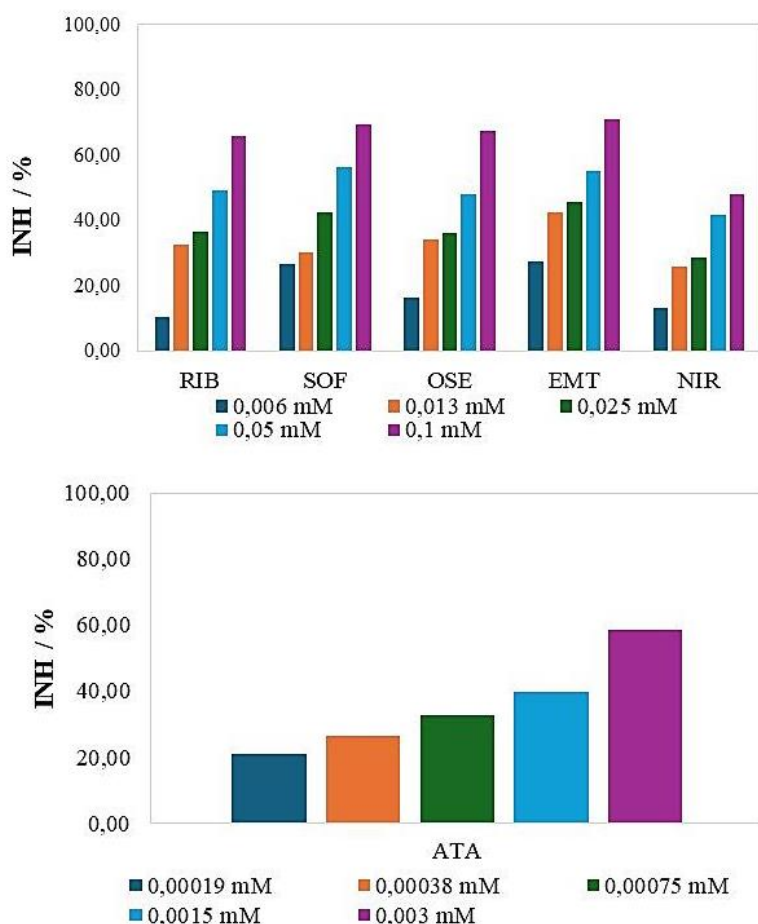
**Tablica 4.3.** Dobivene inhibicije rasta mikroalge *Chlorella* sp. nakon 72 h provedbe testa ekotoksičnosti za ispitivane koncentracije antivirusika ribavirin (RIB), sofosbuvir (SOF), oseltamivir (OSE), emtricitabin (EMT), nirmatrelvir (NIR) i atazanavir (ATA).

antivirusik	INHsr / %				
RIB	10,56	32,79	36,50	49,43	66,07
SOF	26,89	30,23	42,39	56,47	69,40
OSE	16,54	34,23	36,13	48,29	67,49
EMT	27,66	42,39	45,73	55,33	71,20
NIR	13,33	25,74	28,52	41,67	48,15
koncentracija	0,006 mM	0,013 mM	0,025 mM	0,05 mM	0,1 mM
antivirusik	INHsr / %				
ATA	21,11	26,30	32,78	39,81	58,52
koncentracija	0,00019 mM	0,00038 mM	0,00075 mM	0,0015 mM	0,003 mM

Prema prikazanim rezultatima u Tablici 4.3, može se uočiti da RIB, SOF, OSE pokazuju skoro pa podjednaku ekotoksičnost jer su dobivene inhibicije pri njihovim višim koncentracijama vrlo slične. RIB je antivirusik koji je pri najnižoj koncentraciji (0,006 mM) od svih antivirusika pokazao najmanju toksičnost (10,56 %). Najekotoksičniji za rast testnog organizma mikroalge *Chlorella* sp. pokazao se EMT. Inhibicija rasta mikroalge pri koncentraciji EMT od 0,1 mM iznosila je 71,20 %, dok je pri najnižoj koncentraciji od 0,006 mM iznosila 27,66 %. Antivirusik koji je najmanje ekotoksičan je NIR s inhibicijom od 48,15 % pri najvišoj koncentraciji (0,1 mM), a pri najnižoj koncentraciji od 0,0006 mM inhibicija je bila 13,33 %. ATA je također jedan od toksičnijih antivirusika jer je uočena inhibicija rasta *Chlorella* sp. od 58,52 % pri koncentraciji od 0,0030 mM, a ta koncentracija je dvostruko niža od najmanje ispitivane koncentracije svih ostalih antivirusika. Prema dobivenim doza odgovor krivuljama, uočeno je da porastom ispitivanih koncentracija antivirusika, raste i inhibicija rasta mikroalge. Na Slici 4.3 je prikazan grafički odnos srednje vrijednosti inhibicije i koncentracija svakoga antivirusika. Na slici 4.4 je također prikazano koliko svaki od antivirusika i u kojoj koncentraciji inhibira rast stanica mikroalge *Chlorella* sp., te se također uočava porast inhibicija uz povećanje ispitivanih koncentracija antivirusika.



**Slika 4.3.** Doza odgovor krivulje dobivene nakon 72 h provedbe testa toksičnosti za antivirolike: a) RIB, b) SOF, c) OSE, d) EMT, e) NIR, f) ATA primjenom mikroalge *Chlorella* sp.



Slika 4.4. Zbirni prikaz inhibicija rasta *Chlorella* sp. nakon 72 sata izlaganja ispitivanim koncentracijama šest antivirusnika.

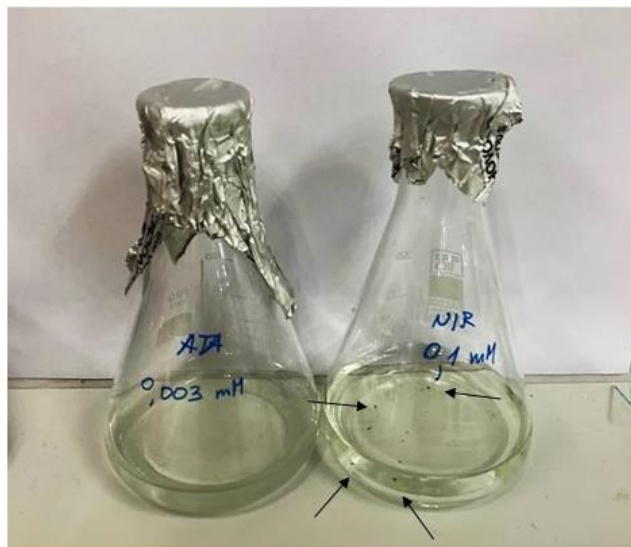
Tablica 4.4. Procijenjene EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene provedbom testa ekotoksičnosti za ispitivane antivirusnike primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

antivirusnik	EC <sub>20</sub> / mmol/L	EC <sub>50</sub> / mmol/L
RIB	0,0100	0,0459
SOF	0,0041	0,0343
OSE	0,0072	0,0443
EMT	0,0029	0,0277
NIR	0,0106	0,0984
<b>ATA</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0023</b>

Na temelju izračunatih inhibicija i ispitivanih koncentracija antivirusnika, procijenjene su EC vrijednosti (Tablica 4.4). Može se zaključiti da je ATA najekotoksičniji antivirusnik za mikroalgu jer pri koncentraciji od 0,0002 mmol/L pokazuje ekotoksični efekt na 20 % populacije testnog organizma, a pri koncentraciji od 0,0023 mmol/L na 50 %. NIR se pokazao kao najmanje



ekotoksičan jer pri koncentraciji od 0,0106 mmol/L uzrokuje ekotoksični efekt na 20 % populacije, a pri koncentraciji od 0,09835 mmol/L na 50 % populacije.



**Slika 4.5.** Prikaz rasta mikroalge *Chlorella* sp. za dva različita antivirusna ATA i NIR pri najvišim koncentracijama.

Iz Slike 4.5 je vidljivo da u suspenziji u kojoj se ispitala najviša koncentracija NIR antivirusa je došlo do brojne pojave stanica mikroalge (zelene naslage pri dnu tikvice označene strelicama), što ne čudi da je upravo ovaj antivirus imao najmanji ekotoksičan utjecaj na rast mikroalge. Za tikvicu označenu s ATA antivirusom, za kojeg je ustanovljeno da je najekotoksičniji za rast mikroalge, nije uočena ista pojava (Slika 4.5).

Redoslijed ekotoksičnosti ispitivanih antivirusa na testnom organizmu mikroalgi *Chlorella* sp. je sljedeći:

$$ATA > EMT > SOF > OSE > RIB > NIR$$

Postoje mnoga istraživanja u kojima su dokazani ekotoksični efekti antivirusa na određene vrste mikroalgi. Istraživani su učinci različitih lijekova, uključujući antivirusnih, na slatkovodnu mikroalgu *Chlamydomonas reinhardtii*. Otkriveno je da je izloženost tim lijekovima rezultirala inhibicijom rasta i smanjenjem fotosintetske aktivnosti [61, 62]. Također je dokazano da bi antivirusni lijekovi mogli dovesti do smanjene biomase mikroalgi i udjela klorofila, što ukazuje na oslabljenu sposobnost obavljanja fotosinteze kod mikroalgi [63]. Nadalje, visoka ekotoksičnost antivirusa EMT i OSE je već potvrđena za neke vrste mikroalgi, kao što su *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* i *Pseudokirchneriella subcapitata* [64]. Za mnoge antivirusne je ispitan njihov ekotoksični efekt na različite testne organizme. Tako je dokazano da RIB uzrokuje oštećenje jetre u riba, ATA se pokazao kao štetan za zelene

mikroalge, rakove i dijatomeje, SOF je kancerogen za miševе, dok je OSE ekotoksičan za mikroalge, bakterije, ribe i planktonske ljuskare [65].

U Tablici 4.5 je vidljivo da se za testni organizam *Pseudokirchneriella subcapitata* kao ekotoksičniji antivirusik pokazao ATA, u odnosu na RIB, što je isto kao i u ovome radu. Prema literaturi [66], dobivena EC<sub>50</sub> vrijednost za antivirusik ATA je iznosila 0,0058 mmol/L. Tijekom istog vremena izlaganja od 72 h i za isti antivirusik, u ovome radu je dobivena EC<sub>50</sub> vrijednost od 0,0023 mmol/L. Dakle, EC<sub>50</sub> vrijednosti za ATA su u skladu s literaturom. Što se tiče usporedbe EC<sub>50</sub> vrijednosti za RIB, dobivena je približna vrijednost u ovome radu (EC<sub>50</sub> = 0,0459 mmol/L) u odnosu na literaturu (EC<sub>50</sub> = 0,0283 mmol/L). razlika u vrijednosti se može objasniti različitim vremenima provedbe testova ekotoksičnosti (u ovome radu je bilo 72 h, dok je prema literaturi [66] bilo 96 h).

**Tablica 4.5.** Prikaz EC<sub>50</sub> vrijednosti za testni organizam *Pseudokirchneriella subcapitata* za antivirusike ATA i RIB [66, 67]

antivirusik	EC <sub>50</sub> / mmol/L	t / h
ATA	0,0058	72
RIB	0,0283	96

Nadalje, da je NIR ispao najmanje ekotoksičan za rast mikroalge i bakterije je u skladu s literaturom. Naime, prema literaturi [68] glavni je cilj bio procijeniti ekotoksičnost lijekova u vodi, koji se nekontrolirano koriste u cijelom svijetu za borbu protiv COVID-19, za mikroalge, rakove i ribe, Navedeno se provodilo primjenom rezultata dobivenih u programima ECOSAR i QSAR Toolbox-u. Procijenjene LC<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub> vrijednosti za svaki od ispitivanih antivirusika su navedene u Tablici 4.6 [68].

**Tablica 4.6.** Dobivene EC<sub>50</sub> i LC<sub>50</sub> vrijednosti za pet različitih testnih organizama izloženih antivirusicima: ribavirin (RIB), sofosbuvir (SOF), oseltamivir (OSE), emtricitabin (EMT) i nirmatrelvir (NIR) u ECOSAR i QSAR Toolbox-u [68].

antivirusik	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (EC <sub>50</sub> /mol/L)	<i>Daphnia magna</i> (EC <sub>50</sub> /mol/L)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (LC <sub>50</sub> /mol/L)	<i>Pimephales promelas</i> (LC <sub>50</sub> /mol/L)	<i>Danio rerio</i> (EC <sub>50</sub> /mol/L)
RIB	5,37	2,69	4,68	3,45	4,52
SOF	8,65	6,97	5,91	6,46	6,76
OSE	7,16	2,81	5,1	5,77	4,48
EMT	6,18	4,26	4,48	4,16	4,52
NIR	8,02	3,58	4,44	5,96	10,01

Iz dobivenih vrijednosti se može utvrditi da se kao najmanje ekotoksičan pokazao NIR, što se poklapa s rezultatima ovoga istraživanja. Iz Tablice 4.6 je vidljivo da se kao najosjetljiviji organizam na ispitivane antivirusne lijekove pokazala slatkovodna riba *Pimephales promelas*. Mikroalga *Pseudokirchneriella subcapitata* je organizam koji je pokazao najveću otpornost na navedene antivirusne lijekove jer su EC<sub>50</sub> vrijednosti najviše. Nadalje, (Tablica 4.6) kao najviše ekotoksičan antivirusni lijek se pokazao RIB za sve ispitivane organizme, osim za planktonskog raka *Daphnia magna*. Navedeni rezultati ukazuju da ekotoksičan utjecaj antivirusnih lijekova na različite organizme ovisi o mnogo čimbenika poput vrsti testnog organizma, ispitivanoj koncentraciji antivirusnih lijekova, vrsti antivirusnih lijekova, vremenu izlaganja, ali svakako i o strukturi antivirusnih lijekova i njegovim fizikalno – kemijskim svojstvima.

U Tablici 4.7 su izlistana fizikalno – kemijska svojstva ispitivanih antivirusnih lijekova kako bi se što bolje objasnila njihova ekotoksičnost na rast *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp.

**Tablica 4.7.** Podaci o fizikalno – kemijskim svojstvima za svaki od ispitivanih antivirusnih lijekova [69].

antivirusni lijek	topljivost u vodi / mg/mL	pKa
EMT	112	2,65
ATA	4 - 5	3,36
SOF	11	9,3
OSE	82	7,7
RIB	142	11,8
NIR	2	7,1

EMT i ATA imaju najnižu vrijednost pKa od svih antivirusnih lijekova, što znači da su i najjače kiseline, a *Pseudomonas putida* je bakterija čiji je optimalni pH za rast 7, kao i mikroalga *Chlorella* sp. kojoj odgovara neutralno do blago lužnato pH područje za rast. To također objašnjava zašto su se ATA i EMT pokazali kao najekotoksičniji. Prema topljivosti antivirusnih lijekova u vodi, vidljivo je da je EMT najtopljiviji, dok je NIR najmanje topljiv, što znači da će se EMT najteže adsorbirati i samim time teže ukloniti iz vodenog okoliša. Budući da su ATA i EMT antivirusni lijekovi koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih HIV virusom, samim time je i očekivano da će ta dva antivirusna lijeka pokazati najveću ekotoksičnost. Toksičnost ispitivanih antivirusnih lijekova se može objasniti i njihovom strukturom [41]. ATA ima nekoliko funkcionalnih skupina, uključujući karbamat, hidroksietil i tercijarne amino skupine, koje utječu na njegovu reaktivnost i interakciju s biološkim molekulama. ATA se smatra kiselim zbog prisutnosti sulfonamidne skupine u njegovoj kemijskoj strukturi, koja može donirati proton (H<sup>+</sup>) u vodenom okruženju, pridonoseći njegovoj kiselosti. Ova sulfonamidna skupina ima relativno nisku pKa vrijednost, što znači da ima tendenciju lakog gubitka protona, što je karakteristično za kisele

funkcionalne skupine. Velika i složena struktura može spriječiti njegovu razgradnju u okolišu, što dovodi do njegove postojanosti u okolišu i do produljenih razdoblja izloženosti neciljanih organizama. Zbog svojih hidrofobnih dijelova, ATA se može akumulirati u masnim tkivima organizama, što dovodi do povećanja koncentracije u tkivima tijekom vremena. EMT se smatra kiselim zbog prisutnosti fluorom supstituirane tiolne skupine u svojoj strukturi. Atom fluora također doprinosi njegovoj kemijskoj stabilnosti zbog čega je manja vjerojatnost da će se razgraditi u okolišu. Zbog svoje stabilnosti, EMT može postojati u vodenom i kopnenom okolišu, što dovodi do produljene izloženosti neciljanih organizama. SOF pokazuje značajnu stabilnost i otpornost na biorazgradnju, što ga čini postojanom onečišćujućom tvari u okolišu. Budući da je SOF dobro topiv u vodi, postoji mala šansa za bioakumulaciju u vodenim organizmima. Ekotoksičnost SOF u okolišu može se pripisati njegovim strukturnim svojstvima, koja uključuju njegovu stabilnost, hidrofobnost i funkciju analoga nukleotida. Ova svojstva mu omogućuju opstanak u okolišu, bioakumulaciju u organizmima i poremećaj bitnih bioloških procesa. [73, 74]. OSE može hidrolizirati u vodenim otopinama gdje dolazi do formiranja oseltamvir karboksilata, njegova aktivnog metabolita. OSE može hidrolizirati, ovisno o pH vrijednosti, gdje pri kiselim i bazičnim vrijednostima dolazi do veće razgradnje. Također je moguća oksidativna razgradnja, koja se ubrzava u prisutnosti svjetla i topline te fotolitička razgradnja. Aktivni oblik, oseltamvir karboksilat, relativno je hidrofilan, što znači da može ostati otopljen u vodi i biti biorasploživiji vodenim organizmima. Iako je OSE hidrofilan i manje je vjerojatno da će se bioakumulirati u masnom tkivu, njegova stalna prisutnost u vodenim tijelima znači da su mu organizmi kronično izloženi. [75, 76]. RIB je stabilan pri neutralnom pH, ali se ubrzano razgrađuje u kiselim ili bazičnim uvjetima. Razgradnja ribavirina je ubrzana pri djelovanju UV svjetla i pri povišenoj temperaturi. [70, 71, 72]. NIR je ispao među najmanje ekotoksičnim, a to je i očevano budući da njegova pKa vrijednost iznosi 7,1, odnosno to je neutralna molekula koja ne disocira na H<sup>+</sup> ione koji bi negativno utjecali na organizme *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp. kojima pogoduje neutralan pH. NIR, kao i mnogi drugi farmaceutici se može razgraditi hidrolizom, oksidacijom ili fotorazgradnjom [77].

Prema navedenom, antivirusici dospijevaju u okoliš i imaju negativan utjecaj na vodene organizme. Iz toga je razloga potrebno proučavati na koji se način antivirusici mogu ukloniti iz okoliša. Naime, u jednom istraživanju je otkriveno nekoliko antivirusnih lijekova, uključujući OSE, u površinskim i otpadnim vodama pomoću LC-MS/MS, pokazujući njihovu postojanost i potencijalni utjecaj na okoliš. Ta se metoda pokazala kao najboljom za otkrivanje sadržaja farmaceutika u vodi. [78]. Antivirusici se mogu ukloniti iz okoliša putem niza procesa. Jedan od postupaka uklanjanja antivirusika iz okoliša je ozonizacija, gdje je ozon snažan oksidans koji

može razgraditi mnoge organska onečišćavala, uključujući antivirusna, kroz reakcije oksidacije [79]. Postoji i razgradnja UV zračenjem gdje ultraljubičasto svjetlo u kombinaciji s vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) stvara hidroksilne radikale ( $\bullet\text{OH}$ ), koji su vrlo reaktivni i mogu razgraditi antivirusne spojeve [80]. Fenton i foto-Fenton procesi su procesi koji koriste soli željeza ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  za proizvodnju  $\bullet\text{OH}$  radikala u kiselim uvjetima, a njihova se učinkovitost može poboljšati UV svjetlom [81].

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih ispitivanja šest različitih antivirusnih lijekova na testnim organizmima bakteriji *Pseudomonas putida* i mikroalgi *Chlorella* sp. se može zaključiti sljedeće:

✓ Najekotoksičniji antivirusni lijek za testni organizam bakteriju *Pseudomonas putida* je emtricitabin (EMT), dok je najmanje toksičan oseltamivir (OSE).

✓ Najekotoksičniji antivirusni lijek za testni organizam mikroalgu *Chlorella* sp. je atazanavir (ATA), a najmanje toksičan nirmatrevir (NIR).

✓ Povećanjem koncentracije svakoga od antivirusnih lijekova dolazi do povećanja inhibicije rasta za oba testna organizma.

✓ Toksičnost antivirusnih lijekova se može opravdati njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući topljivošću u vodi, pKa vrijednostima, a ponajviše njihovoj strukturi. EMT u svojoj strukturi sadrži atom fluora koji doprinosi njegovoj kemijskoj stabilnosti te je manje razgradiv u okolišu, odnosno postojaniji je u vodenom i kopnenom okolišu. ATA sadrži u svojoj strukturi karbamat, hidroksietil i tercijarne amino skupine, te je izrazito velika molekula zbog čega je otežana njegova razgradnja u okolišu. Teško razgradive tvari se mogu akumulirati u tkivima organizama tijekom vremena, te njihove koncentracije rastu, što dovodi do ekotoksičnih učinaka na mikroorganizme te do viših razina toksičnosti kod grabežljivaca, uključujući ribe, ptice i sisavce. Budući da se ove tvari ne razgrađuju lako, ostaju u okolišu dulje vrijeme. Ovo produljeno izlaganje povećava vjerojatnost negativnih učinaka na vodene ekosustave, budući da su organizmi kontinuirano i sve više izloženi otrovnoj tvari. Iz samih pKa vrijednosti je vidljivo da su za antivirusne ATA i EMT najniže, odnosno ti antivirusnici pokazuju izrazito kisela svojstva koja ne pogoduju rastu niti bakterije *Pseudomonas putida* ni mikroalge *Chlorella* sp. Provedeno istraživanje je istaknulo utjecaj SARS-CoV-2 antivirusnih lijekova posebice na ova dva ispitivana testna organizma. Nekontroliranim odlaganjem antivirusnih lijekova može dovesti do ugrožavanja mnogih vodenih vrsta te je bitno ispitati hoće li i u kojoj mjeri utjecati na njihov rast, razvoj i život općenito. Razgradnja svih farmaceutika, uključujući antivirusne lijekove je jedan izrazito složen proces koji može trajati duži vremenski period te samim time duže imati ekotoksičan utjecaj na ekosustav. Potrebno je imati na umu da svaka tvar koliko god bila ljekovita za jedan organizam može imati velike posljedice za drugi i da je savjesnost o pravilnom odlaganju ključan faktor za opstanak kako mikroorganizama, tako i ekosustava u cjelini.

## 6. LITERATURA

- [1] Hao Y., Wang Y., Wang M., Zhou L., Shi J., Cao J., D., The origins of COVID-19 pandemic: A brief overview, *Transboundary and Emerging Diseases*, **69** (2022) 1-17
- [2] Ruiz-Medina B. E., Varela-Ramirez A., Kirken R. A., Robles-Escajeda E., The SARS-CoV-2 origin dilemma: Zoonotic transfer or laboratory leak?, *Wiley Periodicals LLC.*, **44** (2021) 100189
- [3] Aldais E. A., Yegnaswamy S., Albahrani F., Alsowaiket F., Alramadan S., Sequence and structural analysis of COVID-19 E and M proteins with MERS virus E and M proteins—A comparative study, *Biochemistry and Biophysics Reports*, **26** (2021) 101023
- [4] Gudima G., Kofiadi I., Shilovskiy I., Kudlay D. Khaitov M., Antiviral Therapy of COVID-19, *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (2023) 8867
- [5] Shirbhate E., Pandey J., Patel V. K., Kamal M., Jawaid T., Gorain B., Kesharwani P., Rajak H., Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention, *Pharmacological Reports*, **73** (2021) 1539-1550
- [6] Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, *The Lancet*, **395** (2020) 565-574
- [7] Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, **395** (2020) 497–506
- [8] Mizrahi B., Shilo S., Rossmann H., Kalkstein N., Marcus K., Barer Y., Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection, *Nat Commun*, **11** (2020) 6208
- [9] Marciano G., Roberti R., Palleria C., Mirra D., Rania V., Casarella A., De Sarro G., Gallelli L., SARS-CoV-2 Treatment: Current Therapeutic Options and the Pursuit of Tailored Therapy, *Applied Sciences*, **11** (2021) 7457
- [10] Mistry P., Barmania F., Mellet J., Peta K., Strydom A., Viljoen I. M., James W., Gordon S., Pepper M. S., SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity, *Frontiers in Immunology*, **12** (2021)
- [11] Vardanyan R., Hruby V., Antiviral Drugs, *Synthesis of Best-Seller Drugs*, (2016) 687–736
- [12] Phan Thi L., Panchangam S. C., Do H., Nguyen V., Prospects and challenges of photocatalysis for degradation and mineralization of antiviral drugs, *Nanostructured Photocatalysts From Fundamental to Practical Applications*, (2021) 489-517
- [13] Paintsil E., Cheng Y., Antiviral Agents, *Encyclopedia of Microbiology*, (2009) 223–257

- [14] Jochmans D., Laporte M., Neyts J., Antiviral strategies for epidemic and pandemic preparedness, *Cell Host Microbe*, **31** (2023) 856-860
- [15] Inglesby T., Adaljaa A., Broad-Spectrum Antiviral Agents: A Crucial Pandemic Tool, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, **17** (2019) 467-470
- [16] Wikipedia URL: <https://www.wikipedia.org/> (pristupljeno 10.7.2024.)
- [17] Te H. S., Randall G., Donald M. Jensen D. M., Mechanism of Action of Ribavirin in the Treatment of Chronic Hepatitis C, *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, **3** (2007) 218-25
- [18] Myers RP, Shah H, Burak KW, Cooper C, Feld JJ: An update on the management of chronic hepatitis C: 2015 Consensus guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver, *Can J Gastroenterol Hepatol*, **29** (2015) 19-34
- [19] Electronic medicines compendium URL: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/8050/smpc#gref> (pristupljeno 15.7.2024.)
- [20] McQuade B, Blair M. Influenza treatment with oseltamivir outside of labeled recommendations, *Am J Health Syst Pharm*, **72** (2015) 112-6
- [21] Hsu J, Santesso N, Mustafa R, Brozek J, Chen YL, Hopkins JP, Cheung A, Hovhannisyan G, Ivanova L, Flottorp SA, Saeterdal I, Wong AD, Tian J, Uyeki TM, Akl EA, Alonso-Coello P, Smaill F, Schunemann HJ: Antivirals for treatment of influenza: a systematic review and meta-analysis of observational studies, *Ann Intern Med*, **156** (2012) 512-24
- [22] Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., & Lambropoulou, D., Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity *Science of The Total Environment*, **699** (2019)
- [23] American Association for the Study of Liver Diseases; Infectious Diseases Society of America. HCV guidance. URL: <http://hcvguidelines.org> (pristupljeno 16.7.2024.)
- [24] Simmonds P., Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on, *J Gen Virol*, **85** (2004) 3173-3188
- [25] Bagaglio S, Uberti-Foppa C, Morsica G: Resistance Mechanisms in Hepatitis C Virus: implications for Direct-Acting Antiviral Use, *Drugs*, **77** (2017) 1043-1055
- [26] Myers R.P., Shah H., Burak K.W., Cooper C., Feld J. J., An update on the management of chronic hepatitis C: 2015 Consensus guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver *Can J Gastroenterol Hepatol*, **29** (2015) 19-34
- [27] Dusheiko G., Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C, *Hepatology*, **26** (1997) 112-121
- [28] Daniyal M, Akram M., Hamid A., Nawaz A., Usmanghani K., Ahmed S., Hameed L., Comprehensive review on treatment of HIV, *Pak J Pharm Sci*, **29** (2016) 1331-8



- [29] Bang L.M., Scott L.J., Emtricitabine: an antiretroviral agent for HIV infection, *Drugs*, **63** (2003) 2413-24
- [30] Busti A.J., Hall R.G., Margolis D.M., Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection, *Pharmacotherapy*, **24** (2004) 1732-47
- [31] Hashemian S. M. H., Sheida A., Taghizadieh M., Memar M. Y., Hamblin M. R., Baghi H. B., Nahand J. S., Asemi Z., Mirzaei H., Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy?, *Biomed Pharmacother*, **162** (2023) 114367
- [32] Chapman P. M., Integrating toxicology and ecology: Putting the 'eco' into ecotoxicology, *Mar Pollut Bull.*, **44** (2002) 7-15
- [33] Jaya V., Madhula P., Kumar H., Rajadurai D., Estimation of median effective effect-site concentration (EC<sub>50</sub>) during target-controlled infusion of propofol for dilatation and curettage – A prospective observational study, *Indian J Anaesth.*, **66** (2022) 174-179
- [34] Valavanidis A., Vlachogianni T., Ecotoxicity Test Methods and Ecological Risk Assessment. Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations, *Science Advances on Environmental Chemistry, Toxicology and Ecotoxicology Issues*, **1** (2015) 1-29
- [35] Espinosa-Urgel M., Salido A., Ramos J., Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds, *Journal of Bacteriology*, **182** (2000) 2363–2369
- [36] Kowalski H., U.S. – German Research Consortium Sequences Genome of Versatile Soil Microbe, *J.Craig Venter Archive* (2002)
- [37] Marcus A., Versatile soil-dwelling microbe is mapped, *Genome News Network* (2003)
- [38] NCBI URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=Show\\_Detail\\_View&TermToSearch=21068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=Show_Detail_View&TermToSearch=21068) (pristupljeno 20.7.2024.)
- [39] Reaney D., Gowland P., Slater J., Genetic Interactions Among Communities, *Microbes in Their Natural Environments*, **34** (1983) 408
- [40] Microbe canvas, URL: <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/obligate-aerobic-3/oxidase-positive-2/colistin-susceptible-4/pseudomonas-putida.html> (pristupljeno 18.7.2024.)
- [41] Otenio M.H., Lopes da Silva M.T., Marques M., Roseiro J., Bidoia E., Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852, *Brazilian Journal of Microbiology*, **36** (2005) 258–261
- [42] Miller C.D., Kim Y.C., Anderson A.J., Cloning and mutational analysis of the gene for the stationary-phase inducible catalase (catC) from *Pseudomonas putida*, *Journal of Bacteriology*, **179** (1997) 5241–5245

- [43] Härtig C., Loffhagen N., Harms H., Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida*, *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (2005) 1915–1922
- [44] Dervisoglu E., Dundar D.O., Yegenaga I., Willke A., Peritonitis due to *Pseudomonas putida* in a patient receiving automated peritoneal dialysis *Infection*, **36** (2008) 79-80
- [45] Russell A.D., Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Journal of applied microbiology*, **92** (2002) 1-3
- [46] Tattawasart U., Maillard J.Y., Furr J.R. et Russell A.D., Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility *Journal of Hospital Infection*, **42** (1999) 219–29
- [47] Haffaressas Y., Ayad N., Boussayoud R., Mouffok F. Opportunistic bacteria: *Pseudomonas putida*, *V Mire Nauchnykh Otkrytii*, **10** (2018) 132
- [48] Borowitzka, M. A., Biology of Microalgae, *Microalgae in Health and Disease Prevention*, (2018) 23–72
- [49] Bock, C., Krienitz, L., Pröschold, T., Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species, *Fottea*, **11** (2011) 293–312.
- [50] Subramani K., Sengottian M., Venkatachalam C.V., Extraction of algal oil from *Chlorella* sp. using combined osmotic shock and ultra-sonication chemcon (2015)
- [51] Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., Kawano, S., Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Journal of Plant Research*, **117** (2004) 257–264.
- [52] Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D.D., Grigoriev, I.V., Claverie, J.-M., Van Etten, J.L., The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex, *The Plant Cell*, **22** (2010) 2943–2955
- [53] Morita, K., Matsueda, T., Iida, T., Hasegawa, T., *Chlorella* accelerates dioxin excretion in rats, *J. Nutr.*, **129** (1999) 1731-1736
- [54] Shim, J.Y., Shin, H.S., Han, J.G., Park, H.S., Lim, B.L., Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats, *J. Med. Food*, **11** (2008) 479-485
- [55] Shibata, S., Natori, Y., Nishihara, T., Tomisaka, K., Matsumoto, K., Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin induced diabetes, *J. Nutr. Sci.*, **49** (2003) 334-339

- [56] Ibrahim Ibrahim, Zizy Elbially, A review: Importance of chlorella and different applications applications, *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, **65** (2020) 16
- [57] ISO 10712, Water quality—Pseudomonas putida growth inhibition test pseudomonas cell multiplication inhibition test. 1995.
- [58] Hafner, C. *Pseudomonas putida* growth inhibition test. In Ecotoxicological Characterization of Waste; Moser, H., Römbke, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, (2009) 153–159
- [59] OECD (1984), Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, *OECD Publishing*, Paris.
- [60] OECD (2011), Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, *OECD Publishing*, Paris. doi: 10.1787/9789264069923-en
- [61] Guo Z., He H., Liu K., Li Z., Xi Y., Liao Z., Dao G., Huang B., Pan X., Toxic mechanisms of the antiviral drug arbidol on microalgae in algal bloom water at transcriptomic level, *J Hazard Mater*, **15** (2024) 473
- [62] González-Pleiter M., Gonzalo S., Rodea-Palomares I., Leganés F., Rosal R., Boltes K., Marco E., Fernández-Piñas F., Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment, *Water Res*, **47** (2013) 2050-64
- [63] Gatidou G, Arvaniti O., Stasinakis A., Review on the occurrence and fate of microplastics in Sewage Treatment Plants, *Journal of Hazardous Materials*, **367** (2019) 504-512
- [64] Miazek K., Brozek-Pluska B., Effect of PHRs and PCPs on Microalgal Growth, Metabolism and Microalgae-Based Bioremediation Processes: A Review, *Int J Mol Sci.*, **20** (2019) 2492
- [65] Kumar M., Mazumder P., Mohapatra S., Kumar Thakur A., Dhangar K., Taki K., Mukherjee S., Kumar Patel A., Bhattacharya P., Mohapatra P., Rinklebe J., Kitajima M., Hai F.I., Khursheed A., Furumai H., Sonne C., Kuroda K., A chronicle of SARS-CoV-2: Seasonality, environmental fate, transport, inactivation, and antiviral drug resistance, *J Hazard Mater*, **5** (2021) 405
- [66] [https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/hh-sds/Ribavirin%20Solid%20Formulation\\_HH\\_US\\_EN.pdf](https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/hh-sds/Ribavirin%20Solid%20Formulation_HH_US_EN.pdf) (pristupljeno 16.7.2024)
- [67] <https://static.cymitquimica.com/products/41/pdf/sds-Y0002052.pdf> (pristupljeno 16.7.2024)

- [68] Khan K, Kar S, Roy K., Are we ready to combat the ecotoxicity of COVID-19 pharmaceuticals? An in silico aquatic risk assessment, *Aquatic Toxicology*, **256** (2023) 106416
- [69] National Institutes of Health (NIH) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 8.7.2024.)
- [70] Haggag R. S., Belal S. F., Hewala I. I., El Rouby O. A., Stability-Indicating HPLC-DAD Determination of Ribavirin in Capsules and Plasma, *J Chromatogr Sci*, **52** (2014) 493-500
- [71] Wu X., Zhang J., Hu S., Zhang G., Lan H., Peng J., Liu H., Evaluation of degradation performance toward antiviral drug ribavirin using advanced oxidation process and its relations to ecotoxicity evolution *Sci Total Environ*, **850** (2022) 157851
- [72] Vasa D. M., Wildfong P. L. D., Show more Solid-state transformations of ribavirin as a result of high-shear mechanical processing, *Int J Pharm.*, **524** (2017) 339-350
- [73] Fernandes J.P., C. Marisa R. Almeida, Salgado M. A., Carvalho M. F., Mucha A. P., Pharmaceutical Compounds in Aquatic Environments - Occurrence, Fate and Bioremediation Prospective, *Toxics*, **9** (2021) 257
- [74] De Clercq E., Antiviral agents active against influenza A viruses, *Nat Rev Drug Discov* **5** (2006) 1015-25
- [75] Davies B.E., Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations, *J Antimicrob Chemother.*, **65** (2010) 5-10
- [76] Owen D.R., Allerton C.M.N., Anderson A.S., Aschenbrenner L., Avery M., Berritt S., Boras B., Cardin R.D., Carlo A., Coffman K.J., Dantonio A., Di L., Eng H., Ferre R., Gajiwala K.S., Gibson S.A., Greasley S.E., Hurst B.L., Kadar E.P., Kalgutkar A.S., Lee J.C., Lee J., Liu W., Mason S.W., Noell S., Novak J.J., Obach R.S., Ogilvie K., Patel N.C., Pettersson M., Rai D.K., Reese M.R., Sammons M.F., Sathish J.G., Singh R.S.P., Steppan C.M., Stewart A.E., Tuttle J.B., Updyke L., Verhoest P.R., Wei L., Yang Q., Zhu Y., An oral SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19, *Science*, **374** (2021) 1586-1593
- [77] Omotola E.O., Genthe B., Ndlela L., Olatunji O.S., Environmental Risk Characterization of an Antiretroviral (ARV) Lamivudine in Ecosystems, *Int J Environ Res Public Health* **18** (2021) 8358
- [78] Hughes S.R., Kay P., Brown L.E., Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems *Environ Sci Technol.*, **47** (2013) 661-77
- [79] Rivas F. J., Beltrán F.J., Encinas A., Removal of emergent contaminants: integration of ozone and photocatalysis, *J Environ Manage.*, **100** (2012) 10-5

[80] Homem V., Santos L., Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review, Vera Homem, Lúcia Santos, *J Environ Manage.*, **92** (2011) 2304-47

[81] Oturan M. A., Aaron J., Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review, *Critical Reviews In Environmental Science and Technology* **44** (2024)

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

simbol	značenje	jedinica
RIB	ribavirin	
OSE	oseltamivir	
SOF	sofosbuvir	
EMT	emtricitabin	
ATA	atazanavir	
NIR	nirmatrelvir	
CFU	ukupan broj živih stanica	st/mL
ACE2	angiotenzin-konvertirajući enzim 2	
IFN	interferon	
DNK	deoksiribonukleinska kiselina	
RNK	ribonukleinska kiselina	
mRNK	glasnički RNK	
HIV	virus humane imunodeficijencije	
EC	efektivna koncentracija	mmol/L
LC	letalna koncentracija	mmol/L
QSAR	kvantitativni modeli odnosa strukture i aktivnosti	
PHA	polihidroksialkanoati	
HCV	hepatitis C	
SVR	trajni virološki odgovor	
DAA	izravno djelujući antivirusni lijekovi	
NRTI	nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	
Mr	relativna molekulska masa	g/mol
c	molarna koncentracija	mol/L
OG	optička gustoća	
$\lambda$	valna duljina	nm
t	temperatura	° C
pKa	konstanta disocijacije kiseline	

## ŽIVOTOPIS

Tijana Jezerčić, [REDACTED] je započela svoje obrazovanje u Travniku u osnovnoj školi Katolički školski centar "Petar Barbarić", gdje je na županijskom natjecanju u engleskom jeziku osvojila treće mjesto. Nakon završene osnovne škole je upisala Srednju medicinsku školu u Katoličkom školskom centru "Sv. Josip" u Sarajevu. 2020. godine odlučuje upisati studij Primjenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom studiranja je pokazala svoje interesovanje sudjelovanjem na Simpoziju studenata kemije, kao i na Danu karijera. Stručnu praksu na trećoj godini prijediplomskog studija je izvršila na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, gdje je dobila i priliku za studentski posao.