

Određivanje toksičnosti kemoterapeutika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*

Halužan, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:750382>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Maja Halužan

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Maja Halužan

**ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI
KEMOTERAPEUTIKA U VODI BAKTERIJAMA
*Vibrio fischeri***

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
Dr. sc. Mirta Čizmić, poslijedoktorand
Doc. dr. sc. Davor Dolar

Zagreb, rujan 2017.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2015./2016., obranjen u akademskoj godini 2016./2017. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger



Od srca se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na predloženoj temi, motivaciji i stručnom vodstvu, korisnim savjetima i potpori, te na pristupačnosti i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem kolegici Josipi Papac na pruženoj pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela, kao i na iznimnoj volji, strpljenju, susretljivosti, mnogobrojnim savjetima i konstantnoj potpori pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju, koje su nam omogućile sterilizaciju materijala, što je bilo neophodno za izradu ovog rada. Hvala i gospođi Mariji Čepo, dipl. inž. koja nam je pokazala u ovom radu korištenu metodu, i savjetovala nas prilikom nejasnoća.

Konačno, najiskrenije se zahvaljujem svojoj obitelji, posebno baki koja nije stigla svjedočiti ovom radu, na neprekidnoj potpori, te strpljenju i razumijevanju tijekom čitavog studija.

SAŽETAK

Određivanje toksičnosti kemoterapeutika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*

U posljednje se vrijeme farmaceutska industrija sve više širi, te je broj farmaceutski aktivnih komponenti (PhAC) na tržištu svakodnevno sve veći. One dospijevaju u okoliš na razne načine, na primjer, putem otpadnih sirovina za proizvodnju istih, putem biološkog otpada izlučenog iz organizma konzumenta, te kao neiskorišteni višak na tržištu. Farmaceutski aktivne komponente i njihovi metaboliti nerijetko štete ekosustavu u kojem se u konačnici nađu. Stoga je bitno provoditi istraživanja koliko su pojedine komponente štetne, te na koji način unaprijediti i provesti što kvalitetnije uklanjanje istih iz onečišćenog sustava. Do danas je razvijeno mnogo metoda određivanja toksičnosti organskih zagađivala (testovi na bakterijama, algama, biljkama, beskralježnjacima i ribama).

U ovom je radu ispitivana akutna toksičnost četiri kemoterapeutika (alendronat, hidroksiklorokin, metoklopramid, memantin) u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*.

Cilj rada bio je odrediti pokazuju li ispitivani kemoterapeutici akutnu toksičnost na temelju mjerenjem izračunatih EC_{50} i EC_{20} vrijednosti, te eventualno dobivene za toksičnost karakteristične S-krivulje koja se dobije kada se grafički u odnos postave koncentracija ispitivanog kemoterapeutika (γ , mg/L) te mjerenjem određeni postotak inhibicije (% inhib.) koji nam govori o potencijalnoj toksičnosti ispitivane tvari.

Mjerenja su provedena standardnom metodom DIN 38 412-L-34 koja se temelji na mjerenju bioluminiscencije. Ona se ubraja u testove kratkog trajanja, te ima veliku prednost u odnosu na ostale „short term“ ili kratkotrajne testove, koji obično traju 48 ili 96 sati. Mjerenja za akutnu toksičnost uključuju svega 30 minuta inhibicije bakterija u pripremljenom uzorku ispitivanog kemoterapeutika.

Provedeni eksperimenti pokazali su da ispitivani kemoterapeutici ne pokazuju gotovo nikakvu toksičnost, odnosno pokazuju zanemarivo malo toksično djelovanje, koje raste s porastom koncentracije. Također, pokazalo se da najvišu razinu toksičnosti na bakterije *Vibrio fischeri* pokazuje metoklopramid, a najnižu alendronat.

Ključne riječi:

toksičnost, Vibrio fischeri, alendronat, hidroksiklorokin, metoklopramid, memantin

ABSTRACT

Toxicity determination of chemotherapeutic agents in the water by *Vibrio fischeri* bacteria

Recently, the pharmaceutical industry is expanding more than ever, and the number of pharmaceutical active compounds (PhAC) on the market is rapidly increasing. They are getting to the environment in various ways, e.g., by waste materials from production, through a biological waste excreted from consumers organisms, and also as unused surplus on the market. The pharmaceutical active compounds and their metabolites often damage the ecosystem where they are finally found. Therefore, it is essential to make some research on how much an individual component is harmful, and how to improve and implement the best possible way of removal from the contaminated system. To date, many methods have been developed for determining the toxicity of organic pollutants (tests on bacteria, algae, plants, invertebrates and fish).

This paper examined the acute toxicity of four chemotherapeutics (alendronate, hydroxychloroquine, metoclopramide, memantine) in water with bacteria *Vibrio fischeri*.

The aim of this study was to determine whether the tested chemotherapeutics shows acute toxicity based on EC_{50} and EC_{20} values, and eventually resulting toxicity characteristic S -curve, which is derived from a graphic in the ratio set concentration of the test chemotherapeutic agents (γ , mg/L) and measured percentage of inhibition, which tells about the potential toxicity of the test substance.

The measurements were made using the standard method DIN 38 412-L-34 based on measuring of bioluminescence of *Vibrio fischeri* bacteria. It is one of the short term tests which have a great advantage over other short term tests, which typically last for 48 or 96 hours. Measurements for determination of the acute toxicity take only 30 minutes of bacteria inhibition in the prepared sample.

The results of experiment showed that all tested chemotherapeutics show no, or negligible toxicity, which increases with concentration. Also, it was shown that the highest level of toxicity to *Vibrio fischeri* shows metoclopramide, and the lowest alendronate.

Key words:

toxicity, Vibrio fischeri, alendronate, hydroxychloroquine, metoclopramide, memantine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. OPĆENITO O FARMACEUTICIMA	2
2.1.1. PODJELA ISPITIVANIH FARMACEUTIKA	5
2.1.1.1. Bisfosfonati	7
2.1.1.2. Kemoterapeutski agensi	9
2.1.1.3. Antiemetici	11
2.1.1.4. Antagonisti NMDA receptora	13
2.2. PRIJENOS I SUDBINA ONEČIŠĆENJA U OKOLIŠU	15
2.2.1. FARMACEUTICI U VODAMA	17
2.4. TOKSIČNOST FARMACEUTIKA U VODAMA	18
2.4.1. VRSTE TESTOVA TOKSIČNOSTI	19
2.4.2. TOKSIČNOST ISPITIVANIH FARMACEUTIKA	19
2.4.2. BIOLUMINISCENTNA METODA - DIN 38412-L-34	20
2.4.3. <i>Vibrio fischeri</i>	20
2.4.4. DEFINICIJE VEZANE ZA TOKSIČNOST	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. MATERIJALI	23
3.1.1. KEMIKALIJE	23
3.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI	24
3.2. INSTRUMENTI ZA PROVEDBU ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI	25
3.3. METODE RADA	26
3.3.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE	26
3.3.2. PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU	27
3.3.3. PRIPREMA OTOPINE REFERENTNIH TVARI (STANDARDNA) I RADNE OTOPINE	27
3.3.4. PRIPREMA TEMELJNE STANDARDNE OTOPINE I RADNE OTOPINE KEMOTERAPEUTIKA	28
3.3.5. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA	28
3.3.6. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE	29
3.4. RADNI POSTUPCI	30

3.4.1. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA RAZRIJEĐENJA	30
3.4.2. OČITAVANJE REZULTATA NA LUMINOMETRU	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	38
7. DODATAK	40
7.1. POPIS SLIKA	40
7.2. POPIS TABLICA	40

1. UVOD

Farmaceutici se intenzivno istražuju i unaprjeđuju što naravno dovodi do širenja farmaceutske industrije, te povećanja proizvodnje iste. Taj trend se razvija u korak s trendom povećanja potrošnje farmaceutika. To uzrokuje sve veće količine farmaceutika koji završavaju u okolišu, i to putem izlučevina životinja i ljudi, ispuštanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda, odlaganjem neupotrijebljenih proizvoda, te kao rezultat samog procesa proizvodnje istih. Zbog njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava, mnoge od tih tvari ili njihovi biološki aktivni metaboliti završavaju u tlima i sedimentima, gdje se mogu akumulirati i uzrokovati različite posljedice na kopnenim i vodenim organizmima. Sve veći problem predstavlja i učestala pojava otpornosti bakterija na postojeće antibiotike, koja je posljedica sve veće upotrebe antibiotika kod životinja i kod uzgoja riba, te zbog dodavanja gnoja iz stočarskih farmi i mulja iz postrojenja za obradu otpadnih voda na poljoprivredna polja.

Potencijalno štetan učinak farmaceutika i njihovih aktivnih metabolita na okoliš, kao niti njihova ekotoksikološka svojstva nisu dovoljno poznati, pa su oni svrstani u skupinu „novih zagađivala“ za koje do sada nije ozakonjena maksimalna dopuštena koncentracija u okolišu. Spoznaja o njihovoj opasnosti rezultirala je njihovim intenzivnim istraživanjem. Da bi se moglo pratiti njihovo potencijalno štetno ponašanje u okolišu neophodan je razvoj bioloških indikatora kao što su različiti testovi toksičnosti.

Toksičnost u ovom radu ispituje se na temelju mjerenja intenziteta bioluminescencije navedenih bakterija nakon akutne izloženosti pojedinom kemoterapeutiku. Promjena mjerenog intenziteta bioluminescencije bakterije u pripremljenoj otopini kemoterapeutika točno određene koncentracije (prije i nakon izloženosti) predstavlja postotak inhibicije bakterija. Ta se veličina dovodi u vezu s toksičnim svojstvima kemoterapeutika, obzirom da one prestaju emitirati svjetlost ukoliko dođe do nepoželjne, odnosno toksične promjene u okolini u kojoj se nalaze.

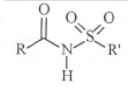
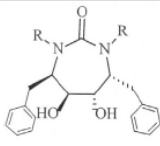
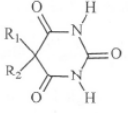
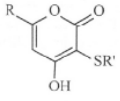
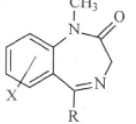
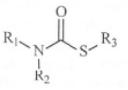
2. OPĆI DIO

2.1. OPĆENITO O FARMACEUTICIMA

Naziv *farmaceutici* obuhvaća sve terapijske farmaceutike namijenjene ljudima, te veterinarske farmaceutike i dodatke prehrani. [1]

Farmaceutski aktivni spojevi su složene molekule sa različitim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima. Oni mogu biti ekstrakti ili lijekovite tvari iz prirodnih izvora – biljaka, životinja, minerala, te polusintetski ili sintetski spojevi. Polusintetski farmaceutici dobivaju se kemijskom modifikacijom, na primjer kao kod prirodnog antibiotika *Penicillium notatum* iz plijesni. Farmaceutici dobiveni kemijskom sintezom su *kemoterapeutici*. Sintezom i kemijskom modifikacijom izbjegava se “slučajnost“, a postiže „sistematičnost“ u otkrivanju, što je pridonijelo razvoju farmaceutске industrije. [2]

Farmakofor (*pharmacos* – grč. farmaceutik, otrov + *foreign* – nositi) je dio molekule o kojem ovise lijekovita svojstva ili šire fiziološka djelovanja farmaceutika. Na primjer, sulfatni ioni uzrokuju laksativno djelovanje, bromidni ioni imaju efekt u sedativima, ciklopropanski prsten u antidepresivima, dietil-eter i kloroform imaju narkotičko djelovanje koje se smanjuje povećanjem njihove topljivosti u vodi, kompleks Pt(II) u *cis*-konfiguraciji prema ligandu pokazuje antitumorsko djelovanje itd. Na **Slici 1** prikazani su važniji farmakofori.

Segment	klasa	djelovanje	Segment	klasa	djelovanje
	acilsulfonamidi	antiaterosklerotici		derivati cikličke uree	inhibitor HIV - proteaze (antivirotik)
	barbiturati	hipnotici, antikonvulzivi, sedativi, antiepileptici		piron-2-oni	inhibitor HIV - proteaze (antiviretik)
	1,4-benzodiazepini	ataraktici, hipnotici		tiokarbamati	fungicidi i herbicidi, ubrzivači vulkanizacije

Slika 1. Primjeri farmakofora. [2]

Okus farmaceutika, pored farmaceutskog djelovanja, kao njegovo funkcionalno svojstvo, također je posljedica strukture. Primarno fiziološko djelovanje farmaceutika proizlazi iz

strukture farmakofora. Sekundarna svojstva, tj. farmakokinetička svojstva farmaceutika ovise o dva temeljna činioca. Lipofilnost ili hidrofobnost ljekovite tvari je fizička karakteristika spoja, dok su metabolički put farmaceutika u organizmu i njegova biotransformacija kemijske karakteristike farmaceutika.

Farmakokinetika farmaceutika je važna s medicinskog, ali i ekonomskog gledišta. Na primjer, farmaceutik koji se slabo apsorbira i brzo eliminira iz organizma treba se uzimati u većim dozama od farmaceutika s povoljnijim farmakokinetičkim svojstvima. To je nepovoljno za pacijenta i liječnika, ali time se povisuju i troškovi liječenja. Farmakokinetika se bavi sudbinom ljekovite tvari u tijelu tj. procesima koji obuhvaćaju skraćeno ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija. Ona podrazumijeva djelovanje farmaceutika na organizam i podrazumijeva istraživanje fiziološkog odgovora na apliciranu dozu farmaceutika.

Funkcionalna svojstva i mehanizmi djelovanja farmaceutskog produkta posljedica su strukture vodećeg spoja koju treba prilagoditi farmakokinetičkim i farmakodinamičkim zahtjevima.

Kod farmaceutika su važni kriteriji funkcionalnih svojstava (identitet produkta, efikasnost djelovanja, čistoća). Kvaliteta farmaceutskog produkta se definira u odnosu na sadržaj aktivne tvari koji mora biti isti u svakoj dozi farmaceutika. Nedeklarirane supstancije ne smiju biti prisutne u farmaceutiku. Efikasnost i terapijska svojstva moraju ostati nepromijenjena do isteka datuma roka valjanosti („*expire date*“). Terapijska efikasnost i terapijski indeks LD_{50}/ED_{50} (letalna doza za 50 % pacijenata podijeljena s efektivnom dozom za 50 % pacijenata) ovisi ne samo o aktivnoj supstanci nego i o načinu uzimanja farmaceutika. Formuliranje farmaceutski aktivne tvari je stoga vrlo važno. U ovisnosti o formulaciji mogu se drastično promijeniti svojstva aktivne tvari i u pogledu skladištenja kao i u primjeni. Bio-uporabljivost predstavlja postotak farmaceutski aktivne tvari koja stiže u krv u odnosu na uzetu dozu farmaceutika. Distribucija, pohrana i eliminacija farmaceutika u tijelu je također bitna kod dizajna farmaceutika.

U dizajnu se određuje oblik doze farmaceutika („*drug dosage forms*“) koji se sastoji od farmaceutski aktivne tvari i pomoćnih tvari. Formulacije farmaceutika mogu biti oblikovane kao prašak, tablete, dizajnirani u obliku čepića („*suppositories*“), koji se umeću u šupljine tijela i rastale se na temperaturi tijela, kao masti-pomada („*ointments*“), kao pripravci („*dressings*“) ili tinkture.

Oblici doza farmaceutika mogu se klasificirati prema konzistenciji na krute, polu-krute i tekuće formulacije farmaceutika. Krute formulacije farmaceutika su prašci, granule, mikrokapsule, kapsule, tablete, dražeje, čepići ili ekstrakti kao formulacije farmaceutika koje su dobivene metodom ekstrakcije otopljenih kemikalija ili trava ili biljaka - („*decoctions*“). Polu-krute formulacije farmaceutika su mast-pomada („*ointments*“), kreme, gelovi i paste. Tekuće formulacije farmaceutika su otopine, emulzije niske viskoznosti i suspenzije.

Farmaceutik može djelovati sistematski ili lokalno, ovisno o načinu administracije tj. uzimanja („*drug administration*“) koja može biti oralna, rektalna, ispod jezika, preko kože, ispod kože, odnosno administriranje farmaceutika probadanjem kože ili kroz sluznicu membrane žila („*parenteral*“). Kod sistematskog djelovanja farmaceutika aktivna tvar dostiže ciljani organ preko krvotoka. Kod lokalnog djelovanja, mjesto uzimanja farmaceutika i njegovog djelovanja je isto, a u tom slučaju nije potreban transport aktivne tvari kroz krvotok. [2]

Za zdravstvenu zaštitu ljudi u Europi je odobreno oko 3000 aktivnih farmaceutskih tvari te se očekuje da će se širom svijeta te količine nastaviti povećavati zbog porasta stanovništva, poboljšanja zdravstvene zaštite i očekivanog duljeg životnog vijeka ljudi. [3]

2.1.1. PODJELA ISPITIVANIH FARMACEUTIKA

Farmaceutici se razvrstavaju u skupine na različite načine. Mogu se klasificirati prema porijeklu, fizikalnim i kemijskim svojstvima farmaceutski aktivne tvari, ili na temelju njihovog farmakološkog djelovanja – prema načinu primjene, biološkom sustavu na koji utječu, ili terapijskim učincima.

Prema porijeklu farmaceutski aktivne tvari, one se dijele na one prirodnog porijekla, te na polusintetske i sintetske tvari. Jedna od osnovnih podjela farmaceutski aktivnih tvari je ona između malih molekula, često dobivenih kemijskom sintezom, te bioloških medicinskih proizvoda (rekombinantni proteini, cjepiva, krvni produkti za terapijsku uporabu, genska terapija i stanična terapija).

Anatomsko-terapeutsko-kemijski sustav klasifikacije (ATC) danas se često koristi radi svoje vrlo dobre razrađenosti. Prema njemu, farmaceutski aktivne tvari dijele se u pet razina prema organu ili sustavu na koji djeluju, te njihovim terapijskim, farmakološkim i kemijskim svojstvima. Prva razina koda označava anatomsku glavnu skupinu, a sastoji se od jednog slova. Postoji 14 glavnih skupina. Druga razina ukazuje na terapijsku glavnu skupinu i sastoji se od dvije znamenke. Treća razina označava terapeutsko farmakološke podgrupe, te se sastoji od jednog slova, dok se na četvrtoj razini farmaceutski aktivne tvari dijele prema kemijsko terapijsko farmakološkim podskupinama, a sastoji se također od jednog slova. Peta razina označava kemijsku tvar, a sastoji se od dvije znamenke. [4]

U **Tablici 1** prikazana je prva razina podjele, te samo neke od činitelja druge razine podjele farmaceutika prema ATC sustavu. [5]

U ovom poglavlju ispitivani kemoterapeutici podijeljeni su grubo prema načinu djelovanja, odnosno uporabe u humanoj medicini: bisfosfonati, kemoterapeutski agensi, antiemetici i anestetici. Opisana su svojstva i podjele skupina. Podjela je formirana prema nekom od njihovog djelovanja, obzirom da se mnogi farmaceutici svrstavaju u različite skupine, i koriste za različite namjene. Za svaki ispitivani kemoterapeutik opisana su osnovna fizikalno-kemijska svojstva, koja ovise o njihovoj molekularnoj strukturi.

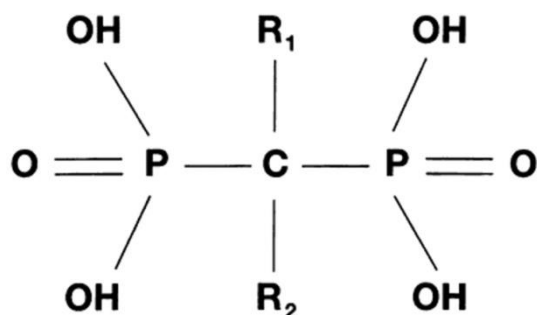
Tablica 1. Klasifikacija farmaceutika prema ATC sustavu. [5]

PRVA RAZINA	DRUGA RAZINA
Probavni sustav i metabolizam (A)	antacidi, propulzivi, antiemetici, intestinalni antiinfektivi, inzulini, vitamini, mineralni pripravci, anabolički steroidi
Krv i krvotvorni organi (B)	antitrombotici, hemostatici, antifibrinolitici, antianemici
Kardiovaskularni sustav (C)	antihipertenzivi, diuretici, periferalni vazodilatori
Koža (D)	antipruriticsi, antipsorijatici, antieptici i dezinficijensi
Mokraćno-spolni sustav i spolni hormoni (G)	ginekološki antiinfektivni i antiseptici, spolni hormoni i modulatori spolnog sustava
Endokrini sustav (H)	hormoni hipofize i hipotalamusa i njihovi analozi, sustavni kortikosteroidi, hormoni gušterače
Sustavni antiinfektivni (J)	sustavni antibiotici, antimiotici, antivirusi, imunoglobulini
Antineoplastične i imunomodelirajuće tvari (L)	alkilirajućci agensi, antimetaboliti, imunostimulatori, imunosupresori
Mišićno-koštani sustav (M)	protuupalni i antireumatski proizvodi, relaksatori mišića, bisfosfonati
Živčani sustav (N)	anestetici, analgetici, antiepileptici, psiholeptici, parasimpatomimetici
Antiparazitici, insekticidi i repelenti (P)	antiprotozoici, antihelmetici, ekto parazitocidi
Dišni sustav (R)	dekongestanti, adrenergici, ekspektoranti
Osjetilni organi (S)	oftalmologici, otologici
Razno (V)	alergeni, nutrijenti, dijagnostički i terapijski radiofarmaceutici

2.1.1.1. Bisfosfonati

Bisfosfonati su farmaceutici koji inhibiraju aktivnost osteoklasta i time blokiraju razgradnju kostiju. Kako je dinamika mineralizacije kostiju karakterizirana ravnotežom aktivnosti osteoblasta i osteoklasta, blokiranjem aktivnosti osteoklasta dominira aktivnost osteoblasta koji izgrađuju kosti, pa se stoga matriks kosti više izgrađuje nego razgrađuje.

Bisfosfonati sadrže dvije fosfonatne ($-\text{PO}(\text{OH})_2$) skupine vezane za jedan ugljikov atom. Na isti ugljikov atom vezane su i dvije različite organske skupine R_1 i R_2 (**Slika 2.**). Skupina R_2 je obično duža i određuje kemijska svojstva, način djelovanja i jačinu bisfosfonata kao lijeka. Grupa R_1 nešto je manja i određuje farmakokinetiku lijeka (promet u organizmu). Zbog takve kemijske strukture, bisfosfonati se nakupljaju u koštanom tkivu, obzirom da fosfonatne skupine koordiniraju s kalcijevim ionima kojih je u kostima najviše. Koriste se za liječenje i prevenciju osteoporoze, Pagetove bolesti kostiju, protiv metastaza raka kostiju, multiplog mijeloma, te za postizanje bržeg zarastanja kostiju nakon prijeloma.



Slika 2. Opća struktura bisfosfonata.

Pretežno se apliciraju oralnim putem (tablete), a nakon apsorpcije, koja je vrlo niska, 50 % bisfosfonata se izlučuje iz organizma nepromijenjen, dok 50 % završava u koštanom tkivu. Razlikujemo dvije vrste bisfosfonata – neaminobisfosfonate (alkilbisfosfonati), koji u svojoj strukturi ne sadrže amino skupinu, te aminobisfosfonate. U alkilbisfosfonate ubrajaju se etidronat, klodronat i tiludronat, a u aminobisfosfonate pamidronat, neridronat, olpadronat, alendronat, ibandronat, risedronat i najnoviji zoledronat.

Temeljnim bisfosfonatom smatra se etidronat čija se jačina smatra jediničnom jačinom blokiranja aktivnosti osteoklasta bisfosfonatom. Na primjer, aktivnost klodronata ima jačinu 10, pamidronat 100, najčešće upotrebljavani alendronat ima jačinu 500, noviji risedronat 2000, a najnoviji zoledronat čak 10 000, što znači da zoledronat 10 000 puta jače blokira

aktivnost osteoklasta nego temeljni etidronat. Aminobisfosfonati i alkilbisfosfonati se osim po strukturi razlikuju i po mehanizmu djelovanja na osteoklaste.

Kada molekula dospije u koštano tkivo osteoklasti „progutaju“ molekule bisfosfonata. Alkilbisfosfonati se u osteoklastima metaboliziraju do toksičnih ATP analoga i time utječu na stanični metabolizam sve do apoptoze osteoklasta. S druge strane, aminobisfosfonati imaju puno složeniji mehanizam djelovanja. Oni se vežu na enzim farnezil difosfat sintetazu u putu HMG-CoA reduktaze, i blokiraju ga. To sprječava formiranje metabolita koji su neophodni za povezivanje grupe malih proteina za staničnu membranu koji utječu na dinamiku citoskeleta. Citoskelet je od vitalne važnosti za održavanje „naborane granice“ koja je nužna za kontakt osteoklasta i površine kosti. Konačni efekt je prevladavanje aktivnosti osteoblasta nad oslabjelom funkcijom osteoklasta i pojačana izgradnja koštane mase. [6, 7]

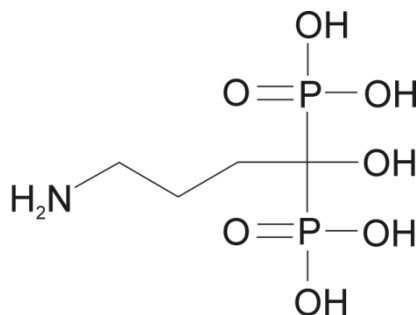
U ovom radu je iz ove grupe farmaceutika ispitivan alendronat, čija je struktura prikazana na **Slici 3**. Alendronska kiselina ili alendronat je mala molekula, bisfosfonat druge generacije, te prvi član skupine lijekova koji jačaju kosti. Koristi se za ublažavanje maligne hiperkalcemije, za liječenje kortikosteroidno inducirane osteoporoze, Pagetove bolesti, te za sprječavanje pojave osteoporoze kod žena u postmenopauzi.

Djelovanje alendronata na koštano tkivo, odnosno inhibicija aktivnosti osteoklasta, analogno je gore opisanom djelovanju aminobisfosfonata. Kod žena u menopauzi smanjuje povišenu razinu razgradnje kostiju što, u pravilu, dovodi do povećanja koštane mase.

Gotovi lijek na tržištu je obično dostupan u obliku tablete za oralnu primjenu, i to u raznim koncentracijama (od 5 do 70 mg po tableti), sa farmaceutski aktivnom tvari najčešće u obliku soli natrij alendronata. Obzirom da konzumacija lijeka oralno nerijetko dovodi do oštećenja ili iritacije jednjaka i želuca, uvedene su doze s većim koncentracijama alendronata kako bi se mogla smanjiti učestalost uzimanja lijeka s dnevne na tjednu bazu.

Kao i kod drugih bisfosfonata, frakcija lijeka koja stiže na krvožilni sustav netaknut (sistemska biorasploživost) nakon oralnog doziranja je niska, u prosjeku samo 0,6 - 0,7 % kod žena kao i kod muškaraca natašte. Unos zajedno s obrokom dodatno smanjuje biorasploživost. Apsorbirani lijek brzo se razdvaja na približno 50 % onih molekula koje se vežu na izloženu površinu kosti, a ostatak se izlučuje nepromijenjen putem bubrega. Za razliku od većine lijekova, snažan negativan naboj na dvije fosfonatne skupine ograničava oralnu biorasploživost, ali s druge strane, izloženost drugih tkiva je vrlo niska. Nakon

apsorpcije u kosti, procjenjuje se da je standardno vrijeme polueliminacije dulje od 10 godina. Također, ne postoje dokazi koji upućuju da se alendronat metabolizira u ljudima ili u životinjama. [8]



Slika 3. Molekulska struktura alendronata.

2.1.1.2. Kemoterapeutski agensi

Kemoterapija je pojam koji se odnosi na primjenu bilo koje kemijski proizvedene farmaceutski aktivne tvari u liječenju raznih bolesti. Unatoč tome, redovito se poistovjećuje s terapijom korištenom pri liječenju raka. Stoga su kemoterapeutski agensi odnosno preparati, također poznati pod imenom *citotoksični* agensi, farmaceutski aktivne tvari koje se koriste za liječenje raka.

Kemoterapeutski agensi mogu se podijeliti u nekoliko grupa baziranim na faktorima kao što su način djelovanja ili kemijska struktura. Neki djeluju na više načina, pa se svrstavaju u onu skupinu kojoj najviše odgovaraju.

Alkilirajući agensi su tvari koje direktno oštećuju DNK i na taj način blokiraju reprodukciju stanice. Aktivni su u bilo kojem dijelu ciklusa stanice, a koriste se za liječenje mnogih vrsta raka, uključujući leukemiju, limfom, Hodgkinovu bolest, plazmocitom, sarkom, kao i rak pluća, dojke i jajnika. Obzirom da oštećuju DNK, mogu uzrokovati oštećenje koštane srži, a rizik ovisi o dugotrajnosti i koncentraciji primjenjivanog lijeka. Alkilirajući agensi se dijele na monofunkcionalne i bifunkcionalne alkilatore, te prema djelovanju na elektrofilne, nukleofilne i karbenske alkilirajuće agense. Platinski lijekovi se ponekad također pribrajaju alkilirajućim agensima obzirom da djeluju na stanice na sličnom principu, no kod njih je mnogo manja vjerojatnost pojave leukemije kao posljedice terapije.

Antimetaboliti su tvari koje interferiraju sintezu DNK i RNK tako što se umeću između njihovih normalnih parova baza. Djeluju u fazi u kojoj se kromosomi stanice umnožavaju, a koriste se u liječenju leukemije, raka dojke, jajnika, probavnog trakta, kao i drugih vrsta raka.

Antitumorski antibiotici su tvari koje mijenjaju DNK unutar stanica raka i onemogućuju njihov daljnji rast i razmnožavanje. Oni mogu trajno oštetiti srce, pa se za njih često propisuju limiti o količini koja se smije unijeti u organizam tijekom čitavog života.

Inhibitori topoizomeraze su tvari koje interferiraju s istoimenim enzimima koji odvajaju lance DNK kako bi ona mogla biti umnožena.

Inhibitori mitoze su često derivati biljnih alkaloida i drugih tvari prirodnog porijekla. Oni zaustavljaju mitozu, koja je konačna faza u ciklusu razmnožavanja stanice, ali mogu oštetiti stanicu i u bilo kojoj drugoj fazi obzirom da onemogućuju enzimima proizvodnju proteina potrebnih za razmnožavanje.

Osim navedenih, u kemoterapeutske agense se još ubrajaju i kortikosteroidi, koji su ili prirodni hormoni, ili lijekovi slični hormonima, te ostali kemoterapeutske agensi, koji djeluju na malo drugačiji način od opisanih, te se ne uklapaju u niti jednu od navedenih kategorija. [9]

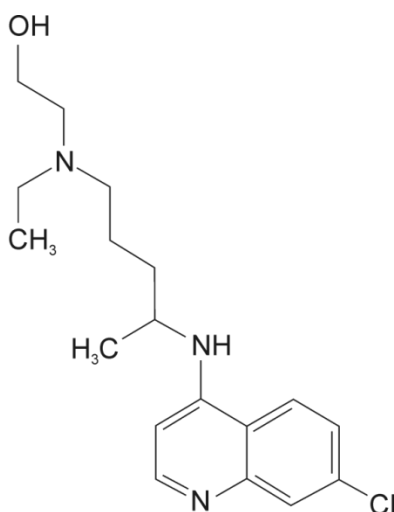
Farmaceutski aktivne tvari koje se ubrajaju u kemoterapeutske agense ne koriste se nužno samo u liječenju raka. Ovisno o fizikalnim, kemijskim, odnosno biokemijskim svojstvima, oni se mogu koristiti u liječenju različitih bolesti.

Ispitivani hidroksiklorokin (HCQ) je kemoterapeutske agens koji se koristi za liječenje i sprječavanje eritrocitnog oblika parazita malarije, za smanjenje upale u liječenju reumatoidnog artritisa i sistemskog eritemskog lupusa, te Sjogrenovog sindroma. Pripada klasi organskih spojeva koji su poznati kao aminokinolini i derivati. To su organski spojevi koji sadrže amino skupinu vezanu na sustav kinolinskog prstena (**Slika 4.**).

Iako točan mehanizam djelovanja nije poznat, pretpostavlja se da se temelji na sposobnosti da veže i mijenja DNK. Antimalarici su lipofilne slabe baze i lako prolaze kroz staničnu membranu. Utvrđeno je da se HCQ u obliku slobodne baze akumulira u kiselim lizosomima, a zatim protonira. To povećava pH lizosoma sa 4 na 6. Visok pH u lizosomima uzrokuje smanjenje unutarstanične obrade, glikozilaciju, te izlučivanje proteina s mnogim imunološkim i neimunološkim posljedicama. Vjeruje se da ovi učinci uzrokuju smanjenje imunoloških funkcija stanice. Moguće je da je sposobnost HCQ da se koncentrirana parazitiranom

eritrocitu odgovorna za selektivnu toksičnost na eritrocitne faze parazitske infekcije. Kao antireumatik, smatra se da djeluje kao blagi imunosupresor, inhibirajući proizvodnju reumatoidnog faktora i reaktanata akutne faze. Također skuplja bijele krvne stanice, stabilizira membranu lizozima i inhibira aktivnost mnogih enzima, uključujući kolagenazu i proteazu koji uzrokuju razgradnju hrskavice.

Hidroksiklorokin se na tržištu pojavljuje u obliku tableta za oralnu uporabu, s koncentracijom soli hidroksiklorokin sulfata od 200 mg po tableti. Vrlo brzo se i potpuno apsorbira nakon oralne primjene. Metabolizira se pretežno u jetri do aktivnih deetiliranih metabolita. Vrijeme polueliminacije iz krvi iznosi otprilike 50, a iz plazme 32 dana. [10, 11]



Slika 4. Molekulska struktura hidroksiklorokina.

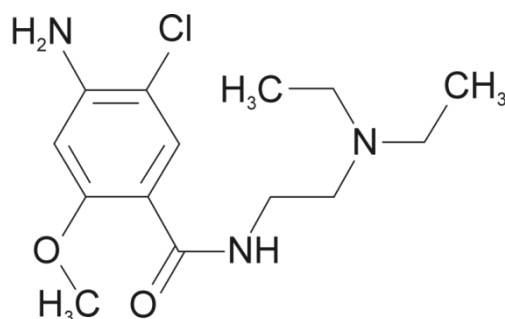
2.1.1.3. Antiemetici

Antiemetici su farmaceutski aktivne tvari koje se koriste za suzbijanje i sprječavanje mučnine i povraćanja. Djeluju na centar za povraćanje u mozgu, na njegove živčane veze s periferijom i izravno na probavni sustav. Rabe se kod kinetoza (morske bolesti), Ménièreove bolesti, povraćanja u trudnoći, metaboličkih povraćanja, te za liječenje nuspojava uzrokovanih pojedinim opioidnim analgeticima, anestheticima i kemoterapijom za liječenje raka. Djeluju i protiv vrtoglavice.

Antiemetici uključuju 5-HT₃ antagoniste (blokatore pojedinih serotoninskih receptora), antagoniste dopamina, antagoniste NK-1 (neurokinin-1) receptora, antagoniste H1 histaminskih receptora (antihistimatike), kanabinoide, benzodiazepine, antikolinergike (blokatore neurotransmitera acetilkolina), steroide i druge. [12, 13]

Iz ove skupine farmaceutika ispitivao se metoklopramid (**Slika 5.**). Metoklopramid je farmaceutski aktivna tvar koja djeluje kao antagonist dopamina D2, a koristi se kao antiemetik i propulziv. Kemijski pripada u organsku skupinu aminobenzojevih kiselina i derivata.

Iskazuje parasimpatomimetsku aktivnost, a također je i dopaminski antagonist u središnjem živčanom sustavu s izravnim učinkom na kemoreceptorsku okidačku zonu. Povećava prag osjetljivosti dopaminskih receptora i smanjuje prijenos podražaja iz gastrointestinalnog sustava do centra za povraćanje u mozgu, te tako sprječava povraćanje. Posjeduje i antagonističke učinke na serotoninskim receptorima. Rezultat kombinacije navedenih učinaka očituje se u povećanju praga za povraćanje i ubrzanju pražnjenja želuca, što mu daje jedinstvene antiemetske odlike. Stimulira motilitet gornjeg gastrointestinalnog sustava, te ubrzava peristaltiku želuca i dvanaesnika. Učinci metoklopramida nastupaju 30 – 60 minuta nakon oralne primjene, 10 – 15 minuta nakon intramuskularne i 1 – 3 minute nakon intravenske primjene. Količine metoklopramida u dozama su 1, 5 ili 10 mg za oralnu, te 5 ili 10 mg za intramuskularnu i intravenoznu primjenu. Obično se pojavljuje u obliku metoklopramid hidroklorida. Bioraspoloživost metoklopramida iznosi 80±15 % ako je lijek unesen oralno, metabolizira se u jetri, a vrijeme polueliminacije iz organizma iznosi 5 do 6 sati, uz 75–85 %-tnu eliminaciju putem urina i 2 % putem fecesa. [14, 15]



Slika 5. Molekulska struktura metoklopramida.

2.1.1.4. Antagonisti NMDA receptora

Antagonisti NMDA receptora pripadaju klasi anestetika koji djeluju kao inhibitori receptora *N*-metil-D-aspartata. Stanje anestezije koje induciraju naziva se disocijativna anestezija, koju obilježava ukočenost, amnezija i analgezija. Budući da je prevelika aktivnost NMDA receptora povezana sa ekscitotoksičnošću, antagonisti NMDA receptora pokazuju obećavajuće rezultate u liječenju stanja koja uključuju ekscitotoksičnost, kao što su traumatske ozljede mozga, moždani udar, te neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti.

Antagonisti NMDA receptora dijele se na kompetitivne antagoniste, nekompetitivne antagoniste, antagoniste glicina, te na nekompetitivne blokatore ionskog kanala receptora. [16]

U ovom radu je iz ove skupine kemoterapeutika ispitivan memantin (**Slika 6.**). Memantin je derivat amantadina s niskim do umjerenim afinitetom za NMDA receptore. Ubraja se među nekompetitivne antagoniste koji blokiraju ionske kanale receptora. Koristi se za ublažavanje simptoma kod umjerene do jake Alzheimerove bolesti, ali ne i za sprječavanje, usporavanje napredovanja, kao niti liječenje bolesti.

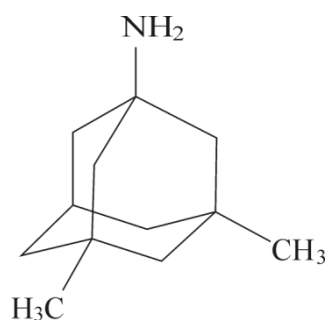
Memantin pripada skupini organskih spojeva koji su poznati kao cikloheksilamini, obzirom da sadrže cikloheksilamino skupinu koja se sastoji od cikloheksanskog prstena vezanog na amino skupinu. [17]

On blokira efekte suvišne količine glutamata koji mogu dovesti do disfunkcije neurona. Glutamat u normalnim uvjetima potpomaže procese učenja i pamćenja, ali u slučaju kada je njihova razina previsoka, dolazi do pretjerane stimulacije živčanih stanica, što konačno dovodi do ekscitotoksičnosti i njihove smrti.

Također, pokazuje dobre rezultate u kliničkim ispitivanjima za liječenje opsesivno-kompulzivnog poremećaja, poremećaja opće anksioznosti, ADHD-a, kao i za postizanje usporenog razvoja, pa čak i unazađenja, tolerancije na opioide. [18]

Lijek se u obliku tablete, kapsule ili otopine uzima oralno, s koncentracijom od 5 do 28 mg po dozi. Odlično se apsorbira oralnom primjernom, s bioraspoloživošću oko 100 %. Vršne koncentracije u plazmi postižu se u 3 do 7 sati nakon unosa. Hrana ne utječe na apsorpciju. Prolazi metabolizam u jetri, nakon kojeg se oko 48 % farmaceutski aktivne tvari unesene

lijekom nepromijenjeno izlučuje urinom. Ostatak se ponajprije prevede u tri polarna metabolita koji posjeduju minimalnu aktivnost antagonista NMDA receptora. To su *N*-glukurnoid konjugat, 6-hidroksi memantin i 1-nitrozo-deaminirani memantin, a koji se nepromijenjeni izlučuju pretežno urinom. Oko 20 % metabolizira se u 1-amino-3-hidroksimetil-5-metil-adamantan i u 3-amino-1-hidroksi-5,7-dimetil-adamantan. Vrijeme polueliminacije iz organizma iznosi 60 do 100 sati. [17]



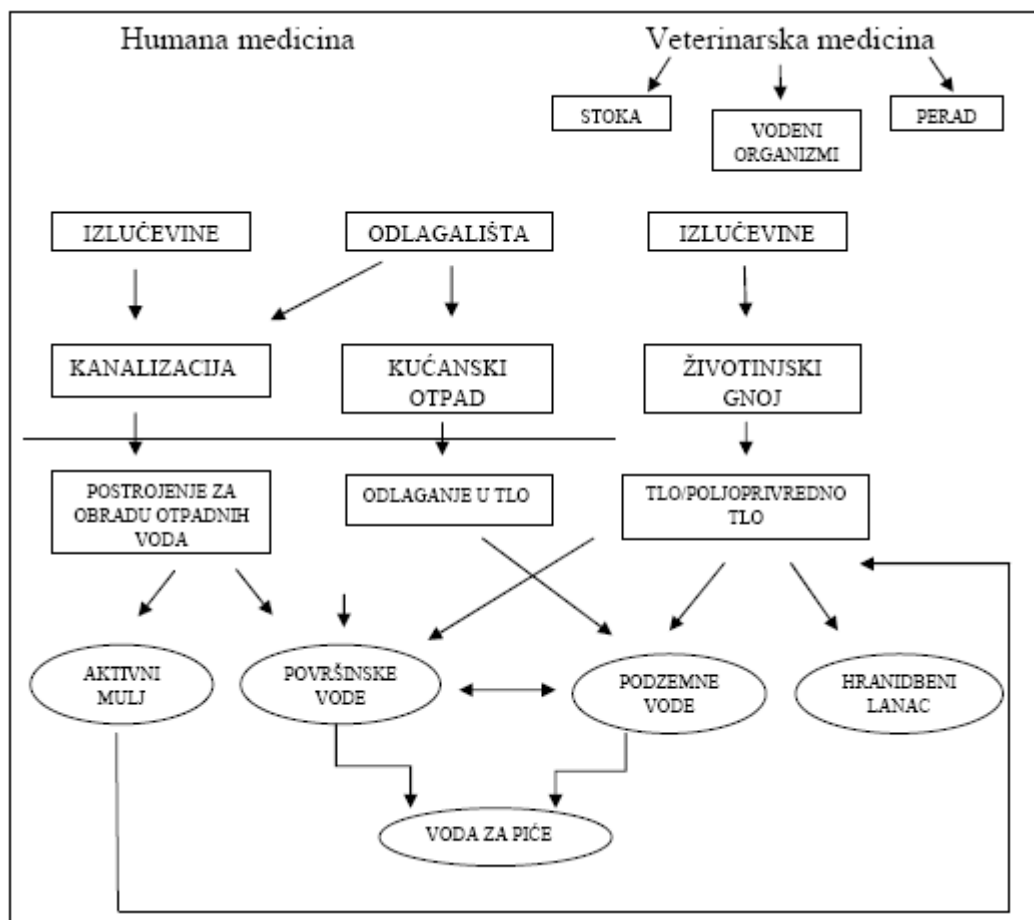
Slika 6. Molekulska struktura memantina.

2. 2. PRIJENOS I SUDBINA ONEČIŠĆENJA U OKOLIŠU

U vrijeme kada je održivi razvitak sve važniji, pitanja sigurnosti i zaštite okoliša ugrađena su u gotovo svaku industrijsku aktivnost. [1] Tona farmakološki aktivnih supstanci se godišnje upotrijebi u humanoj medicini za dijagnozu, liječenje i prevenciju bolesti. Farmaceutici su tzv. nova zagađivala i predmet su istraživanja velikog broja znanstvenika. Za veliki broj tih zagađivala nisu poznati ekotoksikološki podaci te opasnosti koje mogu uzrokovati. Uzrok nedostatka podataka o pojavljivanju ovih tvari u okolišu leži, između ostalog, u nedostatku normiranih metoda. Intenziviranje analitičkih i ekotoksikoloških ispitivanja ubrzat će normizaciju određivanja aktivnih farmaceutskih tvari i donošenje zakonskih propisa o njihovoj maksimalnoj dopuštenoj koncentraciji u okolišu. Farmaceutici u okoliš dospjevaju zbog sve veće upotrebe u humanoj i veterinarskoj medicini. **Slika 7** prikazuje glavne putove transporta farmaceutika u okolišu.

Najveće količine se u okoliš unose otpadnim vodama iz proizvodnih procesa, životinjskim izlučevinama, nepropisnim odlaganjem lijekova kojima je prošao rok upotrebe, te aktivnim muljem kao produktom obrade otpadnih voda zagađenih spomenutim tvarima. Životinjske izlučevine su najveći izvor zagađivanja ovim supstancama. Izlučevine se koriste kao gnojivo na poljoprivrednim površinama. Na taj način farmaceutici i njihovi metaboliti mogu zagaditi podzemne vode ili ući u hranidbeni lanac, ovisno o njihovoj topljivosti i tendenciji sorpcije na čvrstu maticu. Farmaceutici mogu dospjeti u tlo i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem koji je produkt obrade komunalnih otpadnih voda.

U toku obrade farmaceutici se ili sorbiraju na aktivni mulj ili ostaju u otpadnoj vodi kojom dospjevaju u površinske vode. Važan izvor farmaceutika su ribogojilišta, pogotovo zadnjih godina zbog upotrebe antibiotika čija se količina izjednačila s količinom potrošnje farmaceutika u humanoj medicini. Farmaceutici se koriste kao dodatak hrani i dodaju se direktno u vodu, a također veliku primjenu nalaze i u agrikulturi te tako direktno dospjevaju u vodu i sediment. [1, 19]



Slika 7. Glavni tokovi humanih i veterinarskih lijekova u okolišu. [19]

2.2.1. FARMACEUTICI U VODAMA

Potrošnja farmaceutika se povećala posljednjih godina, a i taj će se trend nastaviti zbog porasta stanovništva i njegovog starenja, rasta potrošnje, širenja potencijalnih tržišta, istjecanja patenata, novih dobnih skupina, te brojnih drugih razloga. Nakon primjene, farmaceutski aktivne tvari se izlučuju kroz jetru ili bubrege kao smjesa osnovnog spoja i metabolita koji su redovito polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Nakon izlučivanja, velik se dio ovih tvari ispušta u otpadne vode nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata koji se teško mogu ukloniti konvencionalnim postupcima obrade otpadnih voda, nakon čega, ovisno o učinkovitosti obrade i kemijskom sastavu spoja, farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske i podzemne vode.

Antibiotici i estrogene su samo dvije od brojnih vrsta farmaceutika za koje se sumnja da opstaju u okolišu, bilo zato što se ne mogu prirodno biološki razgraditi ili zbog njihova trajnoga ispuštanja. U okolišu su najčešće prisutni diklofenak, paracetamol, ibuprofen, acetilsalicilna kiselina, atorvastatin i etinilestradiol.

Nekoliko biotičkih i abiotičkih procesa pridonosi razgradnji i transformaciji kemijskih spojeva u okolišu. To su prvenstveno abiotička razgradnja pod utjecajem svjetlosti (fotoliza) i vode (hidroliza), te biotička razgradnja i bioakumulacija. Biotička razgradnja podrazumijeva proces u kojem mikroorganizmi metabolički ili enzimski mijenjaju strukturu spojeva u okolišu, a čiji produkti mogu biti štetniji od razgrađene tvari. Bioakumulacija je proces nakupljanja određenih spojeva u organizmima unesenih iz abiotičkog okoliša pasivnom difuzijom ili iz izvora hrane.

Iako je njihova količina u vodenim ekosustavima vrlo niska, znatno ispod preporučene dnevne doze, kontinuirano izlaganje može dovesti do dugoročnog potencijalnog rizika za vodene organizme. [1]

Stoga je bitno odrediti koliko je određeni farmaceutik toksičan, što je u ovom radu ispitano pomoću standardne metode inhibicije rasta bakterije *Vibrio fischeri* u vodi.

2.4. TOKSIČNOST FARMACEUTIKA U VODAMA

Jedan od najvažnijih zadataka zdravstvene ekologije je razvoj specifičnih preventivnih mjera kojima će se izloženost opasnim okolišnim čimbenicima svesti na prihvatljivu mjeru. U opasne okolišne čimbenike najčešće ubrajamo nusprodukte industrije ili poljoprivredne djelatnosti koje donose ekonomsku dobrobit zajednici. Nekontrolirano ispuštanje toksičnih tvari iz industrije može imati nesagledive posljedice na stanje okoliša. Uklanjanje tih nusprodukata je skupo, ali onečišćenje okoliša ugrožava i ljudsko zdravlje i proizvodnju. Zadatak epidemioloških studija i zdravstvene ekologije jest pronaći prihvatljivu ravnotežu između rizika za zdravlje i troškova prevencije izloženosti.

Toksičnost otpadnih voda ili ekotoksičnost se provodi kako bi se utvrdila eventualna štetnost dotoka otpadnih industrijskih voda u prirodne tokove voda. Može biti uzrokovana kemijskim, fizikalnim, biološkim parametrima ili njihovom kombinacijom. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda, kao što su testovi na bakterijama, algama, biljkama, beskraljivcima i ribama.

Test organizmi su biološki modeli (bioindikatori) na kojima se provodi praćenje djelovanja različitih toksičnih tvari, a najčešći oblik ispitivanja je mortalitet. Izbor bioindikatora ovisi o svrsi testa, specifičnostima ekosustava, karakteristikama otpadne vode i recipijenta, ali i mogućnostima laboratorija.

Biotestovi su eksperimentalne ekološke metode za određivanje granične vrijednosti tolerancije pri izlaganju test organizma utjecaju različitih toksičnih tvari. Osnova biotesta je praćenje utjecaja koncentracijskog gradijenta otpadne vode u kontroliranim uvjetima među kojima je koncentracija otpadne vode jedina promjenjiva veličina.

Mnogo je faktora koji utječu na varijabilnost testova ekotoksičnosti:

- priroda ispitivanog uzorka,
- fizikalni i kemijski uvjeti ispitivanja (salinitet, pH, provodnost itd.),
- procedura provođenja (protokol i uvježbanost),
- fizičko stanje organizma (dob, spol, uhranjenost). [20, 21, 22]

2.4.1. VRSTE TESTOVA TOKSIČNOSTI

Postoje dvije vrste testova toksičnosti: akutni i kronični.

Akutnim testom se određuje preživljavanje testiranih organizama unutar 24 do 96 sati, dok se kroničnim testom određuje preživljavanje organizma koji je kontaminiran ispitivanim uzorkom, ali i utjecaj tog uzorka, kao na primjer smetnje rasta, ponašanja, reprodukcije i slično, a traje minimalno 7 dana.

2.4.2. TOKSIČNOST ISPITIVANIH FARMACEUTIKA

Utjecaj farmaceutski aktivnih tvari na organizme u okolišu, za koje nisu direktno namijenjeni, do danas je slabo ispitivan. Kao što je već navedeno, briga za ekosustav radi ispuštanja tih tvari postaje sve veća, no iznimno velik broj tvari koje se trebaju ispitati i organizama koji su potencijalno ugroženi, onemogućuje brze i pouzdane rezultate kojima bi se došlo do zaključaka koje lijekove treba izbaciti iz uporabe, smanjiti njihovu uporabu ili za ekosustav pogodno izmijeniti. Postoje brojni radovi u kojima se raznim metodama ispituje ta problematika, no i dalje ne postoje podaci za sve tvari, odnosno njihovo djelovanje na sve ugrožene organizme. U nastavku su navedeni podaci nađeni u literaturi o prethodno provedenim ispitivanjima ekotoksičnog učinka ispitivanih farmaceutika u ovom radu.

U tu svrhu pretraživana je literatura na mrežnoj stranici: <http://www.sciencedirect.com>. Nađeni su brojni podaci o ispitivanju toksičnosti istih na razne vrste ljudskih i životinjskih stanica, a isto tako i direktno ispitivanje na organizmima, kao što su razne vrste laboratorijskih miševa, štakora, hrčaka, zečeva i pasa, a sve s ciljem utvrđivanja eventualnih nuspojava farmaceutika na pacijenta. Zanimljiva je činjenica da se za u ovom radu ispitivane kemoterapeutike nisu mogli naći podaci o ispitivanju njihovih ekotoksičnih učinaka niti jednom metodom u zadnjih dvadeset godina, s iznimkom za alendronat. Također, pretraživanjem literature na navedenoj mrežnoj stranici unatrag dvadeset godina uočeno je da niti jedan od ispitivanih farmaceutika nije testiran na bakteriji *Vibrio fischeri*.

Za alendronat nađeni su podaci o iznosima LC_{50} (koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu smrtnost), MIC (koncentracija koja uzrokuje minimalnu inhibiciju), te $NOEC$ (koncentracija koja ne uzrokuje promatrani učinak) vrijednosti. Pri akutnoj izloženosti organizma

alendonatu, LC_{50} za *Pimephales promelas* (debeloglava gavčica, slatkovodna riba) iznosi 1450 mg/L, za *Oncorhynchus mykiss* (kalifornijska pastrva, slatkovodna riba) više od 1000 mg/L, te za *Daphnia spp.* (slatkovodni planktonski račić) 22 mg/L, a MIC za *Green Algae* (zelene alge) iznosi manje od 0,5 mg/L. Pri kroničnoj izloženosti NOEC za *Green Algae* iznosi 0,5 mg/L. [23]

2.4.2. BIOLUMINISCENTNA METODA - DIN 38412-L-34

Za određivanje toksičnosti u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda po DIN-u (DIN 38412-L-34). To je bioluminiscentna metoda koja se ubraja u testove kratkog trajanja i s obzirom na vrijeme trajanja testa od 30 minuta ima veliku prednost u odnosu na ostale „*short term*“ metode koje obično traju 48 ili 96 sati.

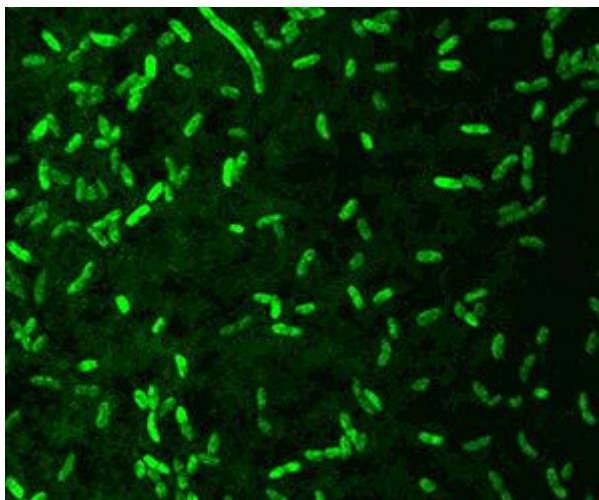
Kao test organizmi su korištene bakterije *Vibrio fischeri* za koje je karakteristično da prirodno emitiraju svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću, kao normalni sastavni dio svog metabolizma. Uzrok tome je enzim luciferaza. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma nastalog kao posljedica djelovanja toksina. [24]

2.4.3. *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri (Slika 8.) su Gram-negativne štapićaste bakterije koje su prisutne u morskom okolišu. Imaju bioluminiscentna svojstva, heterotrofne su i pokreću se uz pomoć bičeva. Pretežno se nalaze u simbiozi s raznim ribama i glavonošcima.

Zanimljiv primjer njihove simbioze pronalazi se u Tihom oceanu gdje bakterije žive unutar dvije različite životinje: noćnoj lignji vrste *Euprymna scolopes* i ribi vrste *Monocentris japonica* koja nastanjuje grebenska staništa. U lignji, koja se noću hrani blizu morske površine, jedan soj ove vrste bakterija sačinjava svjetlosni organ koji oponaša mjesečevu svjetlost i služi joj kao zaštita od gladnih predatora u vodama ispod nje. Kod grebenske ribe,

drugi soj bakterije formira svjetlosni organ unutar čeljusti i pomaže pri osvjetljavanju tamnih dijelova grebena kojima se riba noću kreće u potrazi za hranom. [25]



Slika 8. Mikrograf fluorescentno obojanih bakterija *Vibrio fischeri*. [25]

2.4.4. DEFINICIJE VEZANE ZA TOKSIČNOST

Da bi se odredila toksičnost kemoterapeutika ispitivanih u ovom radu, primarno su se morale definirati određene fizikalno-kemijske veličine koje su dostupne za mjerenje korištenom metodom. Izmjerene su se veličine potom dovele u određeni matematički odnos, a iz tih su se podataka naknadno mogli odrediti parametri potrebni za procjenu toksičnosti.

Rezultate kojima se prikazuje toksičnost određene tvari na neki organizam trebalo je u konačnici prikazati u obliku EC_{50} i EC_{20} vrijednosti. Da bi se one mogle odrediti, potrebno je odrediti kolika je inhibicija rasta bakterija *Vibrio fischeri* u pripremljenim otopinama kemoterapeutika. Otopine su se za svaki kemoterapeutik razrjeđivale kako bi se dobio niz različitih koncentracija istog, te u konačnici trend ovisnosti toksičnosti na bakterije o njegovoj koncentraciji. Inhibicija rasta procijenjena je na temelju razlike u izmjerenoj početnoj luminescenciji suspenzije, te onoj izmjerenoj nakon određenog vremena inkubacije bakterije u uzorku, uz određene korekcije. Dobiveni se podaci o inhibiciji postavljaju u grafičku ovisnost o koncentraciji za svaki kemoterapeutik, a iz te se ovisnosti očitaju vrijednosti koncentracija za EC_{50} pri 50 %-tnoj inhibiciji, te za EC_{20} pri 20 %-tnoj inhibiciji.

Niže su objašnjene pojedine kratice mjerenih i izračunatih fizikalno-kemijskih veličina, te navedeni matematički izrazi kojima su one dovedene u međusobni odnos kako bi se konačno izračunale potrebne vrijednosti.

l_0 – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija)

l_t – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu t (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka)

l_{0K}/l_{tK} – početna i konačna luminiscencija kontrolne otopine (2 % NaCl)

fK – faktor korekcije

$$fK = l_{tK}/l_{0K}$$

l_c – ispravljeni fK

$$l_c = fK \times l_0$$

% inhib.t. – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu t

$$\% \text{ inhib.t.} = (l_c - l_t) \times 100/l_c$$

GL vrijednost – faktor razrjeđenja kojim je postignut % inhib.t. < 20

EC_{50} – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KEMIKALIJE

Podaci o kemikalijama koje su korištene u eksperimentima za određivanje toksičnosti u ovom radu navedeni su u **Tablici 2**.

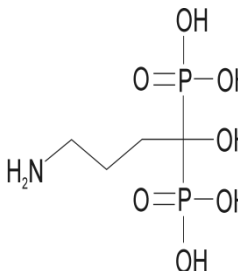
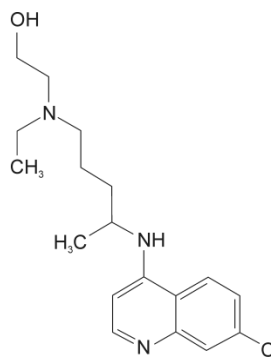
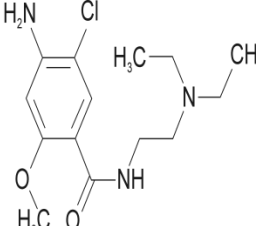
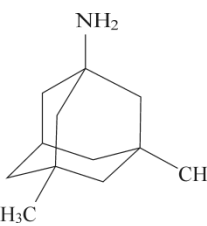
Tablica 2. Kemikalije koje su korištene za određivanje toksičnosti

KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Lach-ner, Češka
glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	p.a.	Lach-ner, Češka
kalij dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcij klorid	CaCl ₂	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcij karbonat	CaCO ₃	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezij sulfat	MgSO ₄	p.a.	T.T.T., Hrvatska
cink sulfat heptahidrat	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	p.a.	Lach-ner, Češka
metanol	CH ₃ OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
D-glukoza	C ₆ H ₁₂ O ₆	p.a.	Lach-ner, Češka
agar	C ₁₄ H ₂₄ O ₉	p.a.	Liofilchem, Italija
kvaščevo ekstrakt	C ₁₉ H ₁₄ O ₂	p.a.	Biolife, Italija
pepton	-	p.a.	Biolife, Italija
D(+)-rafinoza pentahidrat	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	99 %	Alfa Aesar, Njemačka

3.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI

Karakterizacija i osnovna svojstva kemoterapeutika ispitivanih u ovom radu prikazani su u **Tablici 3.**

Tablica 3. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih kemoterapeutika.

Generičko ime	Alendronat	Hidroksiklorokin	Metoklopramid	Memantin
CAS broj	66376-36-1	118-42-3	364-62-5	19982-08-2
Naziv prema IUPAC-u	(4-amino-1-hidroksi-1-fosfonobutil)fosfonska acid	2-[[4-[(7-klorokinolin-4-il)amino]pentil](etil)amino]jetanol	4-amino-5-kloro- <i>N</i> -(2-(dietilamino)etil)-2-metoksibenzamid	3,5-dimetiladamantan-1-amine
Strukturna formula				
Empirijska formula	C ₄ H ₁₃ NO ₇ P ₂	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	C ₁₄ H ₂₂ ClN ₃ O ₂	C ₁₂ H ₂₁ N
Molarna masa, g/mol	249,096	335,872	299,800	179,302
Proizvođač	Sigma Aldrich, ≥ 97,0 %	Sigma Aldrich, ≥ 95,0 %	Sigma Aldrich, > 99,9 %	Sigma Aldrich, 99,4 %

3.2. INSTRUMENTI ZA PROVEDBU ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI

Toksičnost je određivana na mjernom instrumentu LUMIStox 300 s bakterijama koje imaju sposobnost luminiscencije (**Slika 9.**).

LUMIStox 300 objedinjuje računalnu tehnologiju s tehnologijom mjernih instrumenata (u ovom slučaju luminometrom). Baš kao i računala, LUMIStox 300 ima vlastiti operativni sustav s ugrađenom disketom na kojoj su pohranjeni svi podaci i programi potrebni za rad.

LUMIStox 300 ima ugrađen fotometar i ustaljeni rad automatskog mjerenja i razvijanja podataka čime je omogućeno prepoznavanje boje uzorka u testu s luminiscirajućim bakterijama.

Radna temperatura instrumenta je 15 °C (± 1 °C).



Slika 9. LUMIStox 300. [24]

3.3. METODE RADA

3.3.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE

Sve sastojke (**Tablica 4.**) otopiti u hladnoj deioniziranoj vodi u Erlenmeyer tikvici. Ostaviti 15 minuta da agar nabubri i potom zagrijati do vrenja. Budući da većina kalcijevog karbonata ostaje neotopljena, zagrijavanje treba izvoditi u vodenoj kupelji. Kada se sastojci u potpunosti otope zagrijavati suspenziju do vrenja direktno na azbestnoj mrežici nad plamenikom. Čim dođe do vrenja treba odmah maknuti suspenziju kako sadržaj ne bi iskipio. Sterilizirati u autoklavu na 121 °C, 15 minuta.

Sterilnu podlogu ohlađenu na 45 °C izliti u Petrijeve zdjelice ili se može neizlivena čuvati u hladnjaku na 4 °C. Prije izlivanja podlogu lagano homogenizirati kako bi se kalcijev karbonat koji je na dnu ravnomjerno rasporedio u podlozi (ako se jako miješa podloga se može zapjeniti). Podlogu koja se naknadno otapa najbolje je otapati u vodenoj kupelji (tikvicu staviti u posudu s vodom na plamenik i povremeno protresti).

Tablica 4. Sastav hranjive podloge

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	30 g
Agar	15 g
Glicerol	10 g
CaCO ₃	5 g
Pepton	5 g
Kvašćev ekstrakt	3 g

3.3.2. PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U destiliranoj vodi se otope sastojci (**Tablica 5.**). Otopina se prokuha, ohladi i profiltrira. Sterilizira se u autoklavu.

Tako pripremljena otopina za resuspenziju čuva se u hladnjaku na temperaturi do 4 °C do 2 tjedna ili do pojave zamucenja, a može se i zamrznuti u manjim bočicama (100 mL) i duže očuvati. Unaprijed priređena i sterilizirana otopina mineralnih sastojaka i glicerola (bez šećera) može se čuvati neograničeno dugo, a šećeri se u njoj otope prije uporabe.

Tablica 5. Sastav otopine za resuspenziju.

Sastojci	u 1000mL
NaCl	36 g
KHPO	0,2 g
CaCl	0,5 g
MgSO	0,2 g
Glicerol	0,5 mL

3.3.3. PRIPREMA OTOPINE REFERENTNIH TVARI (STANDARDA) I RADNE OTOPINE

Otopina standarda za provjeru valjanosti bakterijske suspenzije priprema se kao otopina referentne tvari $ZnSO_4 \times 7H_2O$ koncentracije 25 mg/L. Točna se odvaga $ZnSO_4 \times 7H_2O$ otapa u 100 mL vode.

Radna otopina (2 % NaCl) se priprema tako da se 20 g NaCl otopi u 1000 mL deionizirane vode te se sterilizira u autoklavu, a koristi se za pripremu niza razrjeđenja.

Kivete za provjeru toksičnosti moraju biti u termostatiranom bloku na 15 °C barem 15 minuta prije početka izvođenja testa. Termostatirani blok postiže temperaturu od 15 °C za otprilike 10 minuta. pH-vrijednost uzorka mora biti između 6,0 i 8,5, a podešava se s NaOH ili HCl.

3.3.4. PRIPREMA TEMELJNE STANDARDNE OTOPINE I RADNE OTOPINE KEMOTERAPEUTIKA

Temeljna standardna otopina – TSO (200 mg/L) kemoterapeutika priprema se otapanjem točno poznate mase svakog farmaceutika u otapalu metanolu HPLC čistoće (10 mL). Razrjeđenja, tj. radne otopine – RO (100 mg/L) se pripremaju u MiliQ (redeioniziranoj) vodi.

Odvage svakog kemoterapeutika na analitičkoj vagi:

$$m(\text{alendronat}) = 0,0022 \text{ g}$$

$$m(\text{hidroksiklorokin}) = 0,0022 \text{ g}$$

$$m(\text{metoklopramid}) = 0,0021 \text{ g}$$

$$m(\text{memantin}) = 0,0023 \text{ g}$$

3.3.5. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA

Bakterijska suspenzija se priprema sterilnom tehnikom rada. Upali se plamenik (oksidirajući plamen), a radna se površina pobriše etanolom. To se izvodi jako pažljivo da se nešto ne bi zapalilo budući da se radi u blizini plamenika. Pripremi se sav potreban pribor. Prema propisu, priprava suspenzije se mora odvijati brzo. U kivetu koja je netom izvađena iz zamrzivača pipetira se netom izvađena otopina za resuspenziju (na temperaturi najviše do 8 °C) te se pripravljena suspenzija dobro homogenizira na vorteksu (stolnoj mućkalici) i stavi na 15 minuta na termostatirani blok koji je prethodno namješten na radnu temperaturu od 15 °C. Nakon 15 minuta odmah se kreće sa radom i mjerenjem da kultura predugo ne stoji jer s vremenom gubi sposobnost luminiscencije i postaje nestabilna za rad.

Budući da takve test kivete volumno ne zadovoljavaju korištene metode analize, pripremljena suspenzija se koristi za uzgoj svježije bakterijske kulture.

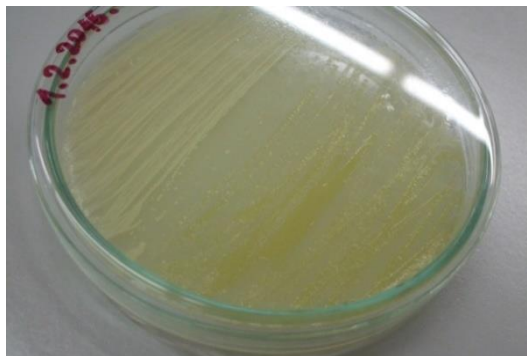
Sterilnom tehnikom rada se pažljivo sadržaj kivete izlije na svježju, sterilnu čvrstu hranjivu podlogu na Petrijevoj zdjelici. Također se može i sterilnom mikrobiološkom ezom uzeti malo suspenzije i *cik-cak* potezima nacijepiti na podlogu.

Kultura se održava u Petrijevim zdjelicama na temperaturi od 15 °C do 22 °C uz temperaturni optimum od 18 °C. Petrijeva posuda se postavi poklopcem prema dolje kako bi se spriječilo kapanje vode na bakterije zbog kondenzacije. Pri navedenim uvjetima, kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja. Optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije opaža se od drugog do četvrtog dana.

pH–vrijednost otopine za resuspenziju, radne otopine i otopine referentnih tvari mora iznositi između 6,8 i 7,2.

3.3.6. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

Sterilnom tehnikom rada (podrazumijeva upaljeni plamenik s oksidirajućim plamenom te radna površina očišćena etanolom) se sterilnom mikrobiološkom ezom pokupi malo kulture izrasle na hranjivoj podlozi (**Slika 10.**), stavi se u 5 mL sterilne otopine za resuspenziju u kivetu, dobro se homogenizira te se postavi na termostatirani blok na 15 minuta na temperaturu od 15 °C. Pripremljena suspenzija mora biti optički gusta (zamućena). Nakon toga se kreće s radom i mjerenjima.



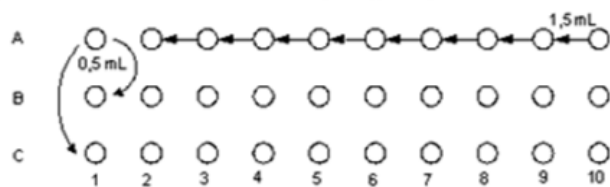
Slika 10. Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura stara 2 dana).

3.4. RADNI POSTUPCI

3.4.1. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA RAZRIJEĐENJA

U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2 % NaCl, a u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta koliko se utvrdi preliminarnim ispitivanjima (najveća koncentracija). U sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2 % NaCl. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja počevši od najmanjeg do najvećeg, tako da se po 1,5 mL dobro homogeniziranog uzorka prebacuje iz kivete u kivetu (iz smjera kivete broj 10 prema 1). U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma (**Slika 11.**).

Nakon što se očita prva kiveta B1 vraća se na termostatirani blok, na luminometar se stavlja iduća po redu C1, a istovremeno se iz kivete A1 u kivetu B1 pipetira po 0,5 mL otopine. C1 se vraća na termostarirani blok, B2 se stavlja na luminometar, a iz A1 se također pipetira 0,5 mL otopine u kivetu C1. I tako sve do kraja mjerenja početnih vrijednosti.



Slika 11. Geometrijski niz razrjeđenja uzoraka. [24]

3.4.2. OČITAVANJE REZULTATA NA LUMINOMETRU

SCRN funkcija: Test valjanosti bakterijske kulture izvodi se svaki put prije postavljanja testa. U referentnu kivetu stavi se 0,5 mL otopine 2 % NaCl i 0,5 mL inokuluma (suspenzije). U test kivetu stavi se 0,5 mL otopine $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,5 mL inokuluma.

Ostavi se na termostatiranom bloku 15 minuta te se na LUMIStox-u pokrene SCRn program. Očita se vrijednost. Sadržaj test kivete u odnosu na sadržaj referentne kivete mora imati između 20 % i 80 % luminiscencije.

Na glavnom izborniku LUMIStox uređaja odabere se program LU za mjerenje relativne luminiscencije, te se na taj način provjeri aktivnost bakterijske kulture. Luminiscencija mora biti najmanje 1 000, a najviše do 10 000 da se može započeti test.

Na luminometru se odabere funkcija EC, podese se uvjeti rada i započne se sa mjerenjem. Rezultati se očitavaju i odmah zapisuju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je ispitivana toksičnost čistih farmaceutski aktivnih tvari, kemoterapeutika alendronata, hidroksiklorokina, metoklopramida, te memantina. Toksičnost farmaceutika je određivana uz pomoć bakterije *Vibrio fischeri* koja je uzgajana na prethodno pripremljenim hranjivim podlogama. Za rad su se većinom koristile kulture starosti dva dana nakon precjepljivanja budući da u tom periodu bakterijska suspenzija pokazuje optimalnu bioluminiscenciju.

Nakon što je provjerena aktivnost uzgojene kulture, pripravljene su temeljne i radne standardne otopine ispitivanih kemoterapeutika, a gusta bakterijska suspenzija je postavljena na termostatirani blok, na temperaturu od 15 °C na 15 minuta. Odrađen je test valjanosti, te uz pogodan postotak luminescencije test kivete u odnosu na referentnu, pripremljeno je razrjeđenje prema geometrijskom nizu iz termostatirane radne otopine kemoterapeutika.

Kako bi se dobio postotak inhibicije, najprije je mjerena i bilježena početna luminescencija bakterija u svakoj kiveti, te nakon dodavanja odgovarajućeg uzorka i inhibicije od 30 minuta, očitane su i zabilježene konačne vrijednosti luminescencije.

Na temelju rezultata su se crtali grafovi toksičnosti (ovisnost postotka inhibicije o logaritmu koncentracije) za otopine pojedinačnih kemoterapeutika.

Uz grafičke prikaze, određene su i vrijednosti EC_{20} i EC_{50} , odnosno koncentracije kemoterapeutika u testu koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije prisutnih bakterija *Vibrio fischeri*, a prikazane se u **Tablici 7**.

Mjerenja su ponovljena dva ili tri puta za pojedini kemoterapeutik, obzirom na visoki faktor korekcije (idealno bi trebao biti između 0,8 i 1,2), pa su stoga rezultati prikazani usporedno – sva mjerenja za pojedini kemoterapeutik postavljena su na jedan grafički prikaz uz prikazan faktor korekcije fK za svako mjerenje (**Tablica 6**).

Tablica 6. Usporedni grafovi toksičnosti za pojedine ispitivane kemoterapeutike.

ISPITIVANI KEMOTERAPEUTIK	USPOREDNI GRAFIČKI PRIKAZ REZULTATA, uz prikazani faktor korekcije, fK , za pojedino mjerenje
Alendronat, 100 mg/L RO	
Hidroksiklorokin, 100 mg/L RO	
Metoklopramid, 100 mg/L RO	
Memantin, 100 mg/L RO	

Tablica 7. Vrijednosti EC_{50} i EC_{20} za svako pojedino mjerenje ispitivanih kemoterapeutika, te srednje vrijednosti istih.

KEMOTERAPEUTIK	fK	$EC_{50}/(\text{mg/L})$	$EC_{20}/(\text{mg/L})$	srednja vrijednost $EC_{50}, \text{mg/L}$	srednja vrijednost $EC_{20}, \text{mg/L}$
Alendronat	1,173	70,79	57,15	46,86	34,99
	1,912	40,27	28,97		
	1,088	29,51	18,84		
Hidroksiklorokin	1,675	19,05	14,12	28,20	18,72
	2,556	44,16	33,88		
	1,455	21,38	8,17		
Metoklopramid	1,993	19,50	10,47	21,21	15,45
	0,610	22,91	20,42		
Memantin	1,573	34,36	23,44	35,76	22,00
	1,611	33,11	20,89		
	1,227	39,81	21,68		

Budući da rezultati prikazani u **Tablici 7** dosta variraju, da bi se mogla komentirati kvaliteta i preciznost dobivenih rezultata, izračunata je standardna devijacija i relativno standardno odstupanje za EC_{50} i EC_{20} za svaki pojedini kemoterapeutik.

Konačno dobiveni rezultati za određivanu toksičnost na bakterijama *Vibrio fischeri* ispitivanih kemoterapeutika u vodi:

Alendronat pokazuje EC_{50} pri koncentraciji od $21,41 \text{ mg/L} \pm 45,70 \%$, te EC_{20} pri koncentraciji od $19,85 \text{ mg/L} \pm 56,74 \%$.

Hidroksiklorokin pokazuje EC_{50} pri koncentraciji od 13,87 mg/L \pm 49,20 %, te EC_{20} pri koncentraciji od 13,46 mg/L \pm 71,88 %.

Metoklopramid pokazuje EC_{50} pri koncentraciji od 2,41 mg/L \pm 11,37 %, te EC_{20} pri koncentraciji od 7,04 mg/L \pm 45,55 %.

Memantin pokazuje EC_{50} pri koncentraciji od 3,56 mg/L \pm 9,96 %, te EC_{20} pri koncentraciji od 1,30 mg/L \pm 5,93 %.

5. ZAKLJUČAK

Provedena su eksperimentalna ispitivanja toksičnosti pojedinih kemoterapeutika na bakterijama *Vibrio fischeri* u vodi. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Od ispitivanih kemoterapeutika, na bakteriji *Vibrio fischeri* najveću toksičnost pokazuje metoklopramid, jer 20 % inhibiciju rasta bakterije uzrokuje koncentracija od svega 15,45 mg/L, a 50 %-tnu inhibiciju uzrokuje koncentracija od 21,21 mg/L.
2. Najnižu toksičnost na bakteriju *Vibrio fischeri* pokazuje alendronat, jer tek koncentracija od 34,99 mg/L uzrokuje 20 %-tnu inhibiciju bakterija, a koncentracija od 48,86 mg/L uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju, pri čemu treba istaknuti da se niti jedna od tih koncentracija ispitivanog spoja ne može naći u realnom okolišu, pa niti u otpadnim vodama.
3. Najniže relativno standardno odstupanje pokazuje memantin, i za EC_{50} gdje ono iznosi 9,96 % i za EC_{20} gdje iznosi 5,93 %. Osim toga, to je jedini od ispitivanih farmaceutika koji pokazuje bolju ponovljivost EC_{20} vrijednosti od EC_{50} vrijednosti.
4. Najviše relativno standardno odstupanje pokazuje hidroksiklorokin, s vrijednostima od 45,70 % za EC_{50} i 56,74 % za EC_{20} . Uz taj se podatak može povezati pretpostavka da je toksičnost hidroksiklorokina određena uz najveća odstupanja i da bi trebalo ponoviti mjerenja.
5. Svi ispitivani kemoterapeutici pri visokom stupnju razrjeđenja pokazuju minimalnu ili nikakvu toksičnost na bakterijama *Vibrio fischeri*. Isto tako, kod svih toksičnost raste povećanjem koncentracije, samo ne jednakim intenzitetom. Također, svi ispitivani kemoterapeutici pri maksimalnoj koncentraciji koja je ispitivana (100 mg/L) pokazuju toksičnost. Pri tome se treba uzeti u obzir da su kemoterapeutici otopljeni u metanolu prilikom pripravljanja temeljne standardne otopine (TSO, masene koncentracije 200 mg/L), koji također pokazuje toksičnost, a koja nije uzeta u obzir prilikom prikaza ovih rezultata. Stoga bi se za točnije rezultate trebala posebno ispitati toksičnost metanola, čija bi se vrijednost tada dovela u odgovarajući odnos s rezultatima ispitivanja u ovom radu.

6. Konačno, da bi se shvatilo kako pojedini organizmi reagiraju na određene farmaceutike koji dolaze u kontakt s njima u okolišu, neophodno je provoditi ovakva i slična eksperimentalna ispitivanja toksičnosti farmaceutski aktivnih tvari. Unatoč razvoju raznih softvera za procjenu ekotoksičnosti pojedinih farmaceutika na pojedine organizme, stvarni utjecaj teško može biti predviđen bez eksperimentalnih ispitivanja, koja su, obzirom na prikupljene podatke prikazane u poglavlju 2.4.2., vrlo rijetka ili ne postoje. Podaci o njihovom djelovanju u okolišu nužni su za konstruiranje zakonskih regulativa sa svrhom zaštite čovjeka i njegovog okruženja.

6. LITERATURA

- [1] **Kaštelan-Macan, M., Petrović, M.**, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str. 75, 239
- [2] **Kovačević, V., Vrsaljko, D.**, Nastavni materijali kolegija 'Formulacijsko inženjerstvo', Poglavlje V. *FUNKCIONALNA SVOJSTVA PRODUKTA*, 2012., web FKIT: https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/2012_-_13_Nastavni_materijali_poglavlja_FUNKCIONALNA_SVOJSTVA_PRODUKTA_kolegija_Formulacijsko_inzenjerstvo_.pdf, (preuzeto: lipanj 2016.)
- [3] **Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E.**, Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode; *Kemija u industriji*, 64(2015)229-236
- [4] **Pharmaceutical** na: https://en.wikipedia.org/wiki/Pharmaceutical_drug, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [5] WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013; 16th edition, Oslo, 2012.
- [6] **Bisfosfonati** na : <http://farmaceuti.com/tekstovi/farmakologija-2/preparati-za-lecenje-bolesti-kostiju/>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [7] **Bisphosphonate** na: https://en.wikipedia.org/wiki/Bisphosphonate#Chemistry_and_classes, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [8] **Alendronate** na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00630>, (preuzeto: lipanj 2016.)
- [9] **Alkylating agents** na: https://en.wikipedia.org/wiki/Alkylation#Alkylating_agents, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [10] **Hydroxychloroquine** na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01611>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [11] **Hydroxychloroquine** na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxychloroquine>, (pristupljeno: lipanj 2016.)

- [12] **Antiemetik** na: http://ro.termwiki.com/HR/antiemetik_%E2%82%80%E2%82%81, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [13] **NK1 receptor antagonist** na : https://en.wikipedia.org/wiki/NK1_receptor_antagonist, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [14] **Metoclopramide** na: <https://www.drugs.com/metoclopramide.html>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [15] **Metoklopramid** na: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Metoklopramid>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [16] **NDMA receptor antagonist** na: https://en.wikipedia.org/wiki/NMDA_receptor_antagonist, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [17] **Memantine** na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01043>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [18] **Memantine** na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Memantine>, (pristupljeno: lipanj 2016.)
- [19] **Kaselj, I.**, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, rujan 2012.
- [20] **Diaz-Cruz, M. S., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D.**, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge; Trends in Analytical Chemistry, 22 (6)(2003)340-351
- [21] **Košćina, S., Mioč, M., Bobić, V.**, Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, Goriva i maziva 42(2003)153-176
- [22] **A. Cafuta**, Fotokatalitička razgradnja nitrofurantoina, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, rujan 2015.
- [23] **Kümmerer, K.**, Pharmaceuticals in the Enviroment: Sources, Fate, Effects and Risk, Universitätsklinikum Freiburg Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene, Germany, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2001., str. 176, 194
- [24] **I. Đurić**, Uklanjanje farmaceutika naprednim oksidacijskim procesima, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, srpanj 2010.
- [25] **Vibrio fischeri** na: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri, (pristupljeno: lipanj 2016.)

7. DODATAK

7.1. POPIS SLIKA

- Slika 1.** Primjeri farmakofora. [2]
Slika 2. Opća struktura bisfosfonata.
Slika 3. Molekulska struktura alendronata.
Slika 4. Molekulska struktura hidroksiklorokina.
Slika 5. Molekulska struktura metoklopramida.
Slika 6. Molekulska struktura memantina.
Slika 7. Glavni tokovi humanih i veterinarskih lijekova u okolišu. [20]
Slika 8. Mikrograf fluorescentno obojanih bakterija *Vibrio fischeri*. [23]
Slika 9. LUMIStox 300. [22]
Slika 10. Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura stara 2 dana).
Slika 11. Geometrijski niz razrjeđenja uzoraka. [22]

7.2. POPIS TABLICA

- Tablica 1.** Klasifikacija farmaceutika prema ATC sustavu. [5]
Tablica 2. Kemikalije koje su korištene za određivanje toksičnosti
Tablica 3. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih kemoterapeutika.
Tablica 4. Sastav hranjive podloge
Tablica 5. Sastav otopine za resuspenziju.
Tablica 6. Usporedni grafovi toksičnosti za pojedine ispitivane kemoterapeutike.
Tablica 7. Vrijednosti EC_{50} i EC_{20} za svako pojedino mjerenje ispitivanih kemoterapeutika, te prosječne vrijednosti istih.
Tablica 8. Standardna devijacija i relativna standardna odstupanja rezultata za ispitivane kemoterapeutike.

