

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Kristina Kukrika

**ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI STANDARDNIH OTOPINA
FARMACEUTIKA TE NJIHOVIH BINARNIH, TERNARNIH I
KVARTARNIH SMJESA BAKTERIJOM *Vibrio fischeri***

Zagreb, srpanj 2020.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2019./2020. pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Ašperger i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Ovaj rad je sufinanciran od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom *PharmaPhate* IP-2014-09-2353 i od strane Vlade Republike Hrvatske projektom *ReHOHMem*.



Vlada
Republike
Hrvatske

**Izravna uporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje membranskim tehnologijama
(ReHOHMem)**

Projekt se financira u sklopu Programa Vlade Republike Hrvatske za poticanje istraživačkih i razvojnih aktivnosti u području klimatskih promjena za razdoblje od 2015. do 2016. godine

**Sadržaj ove publikacije isključiva je odgovornost Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije*



REPUBLIKA HRVATSKA
MINISTARSTVO ZAŠTITE
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti
obrazovanja i sporta



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA I
ENERGETSKU UČINKOVITOST



HRZZ
Hrvatska zaklada
za znanost

Popis kratica:

USD - US dollar - američki dolar

ATK - anatomsko-terapeutsko-kemijski sustav klasifikacije

ATP - adenozin trifosfat

ISO - International Organization for Standardization

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development

NOEC - najveća koncentracija ili doza bez učinka

LOEC - najniža koncentracija ili doza ispitivane tvari koja izaziva prvi učinak

LD₅₀ / LC₅₀ - letalna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje smrtnost 50 % testne populacije

ED₂₀ / EC₂₀ - efektivna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 20 % testne populacije

ED₅₀ / EC₅₀ - efektivna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 50 % testne populacije

l_0 - početna luminiscencija bakterija u suspenziji prije dodavanja uzorka

l_t - konačna luminiscencija bakterija u suspenziji nakon inkubacije u vremenu t

f_K - faktor korekcije

l_c - ispravljeni faktor korekcije

I - postotak inhibicije nakon inkubacije u vremenu t

RO - radna otopina

TSO - temeljna standardna otopina

G-I - gentamicin - ivermektin

G-K - gentamicin - klozantel

G-M - gentamicin - mebendazol

I-K - ivermektin - klozantel

I-M - ivermektin - mebendazol

K-M - klozantel - mebendazol

G-I-K - gentamicin - ivermektin - klozantel

G-I- M - gentamicin - ivermektin - mebendazol

G-K-M - gentamicin - klozantel - mebendazol

I-K-M - ivermektin - klozantel - mebendazol

G-I-K-M - gentamicin - ivermektin - klozantel - mebedazol

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. FARMACEUTICI.....	2
2.1.1. ANTIBIOTICI.....	4
2.1.1.1. GENTAMICIN.....	6
2.1.2. ANTIHELMINTICI.....	7
2.1.2.1. IVERMEKTIN.....	8
2.1.2.2. KLOZANTEL.....	9
2.1.2.3. MEBENDAZOL.....	10
2.1.3. FIZIKALNO – KEMIJSKA SVOJSTVA ISPITIVANIH FARMACEUTIKA.....	11
2.2. EKOTOKSIČNOST.....	12
2.2.1. TESTOVI TOKSIČNOSTI.....	13
2.2.1.1. ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI.....	13
2.2.1.2. ISPITIVANJE EKOTOKSIČNOSTI BAKTERIJOM <i>Vibrio fischeri</i>	15
2.2.2. TOKSIČNOST SMJESA TVARI.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE.....	18
3.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI.....	18
3.2. INSTRUMENT ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI.....	19
3.3. STERILNA TEHNIKA RADA.....	20
3.4. MEDIJI I KEMIKALIJE.....	20
3.4.1. ČVRSTA HRANJIVA PODLOGA.....	20
3.4.2. OTOPINA ZA RESUSPENZIJU.....	21
3.4.3. RADNA OTOPINA ZA RESUSPENZIJU.....	22
3.4.4. OTOPINA REFERENTNIH TVARI.....	22
3.4.5. TEMELJNE STANDARDNE OTOPINE I RADNE OTOPINE FARMACEUTIKA.....	22
3.5. POSTUPAK ISPITIVANJA EKOTOKSIČNOSTI.....	24
3.5.1. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA.....	24
3.5.2. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE.....	25
3.5.3. PRIPREMA MJERENJA.....	25
3.5.4. GEOMETRIJSKI NIZ RAZRJEĐENJA.....	25
3.5.5. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA.....	26

4.	REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1.	ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI STANDARDNIH OTOPINA FARMACEUTIKA	29
4.2.	ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI SMJESA FARMACEUTIKA.....	30
4.2.1.	ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI BINARNIH SMJESA FARMACEUTIKA	30
4.2.2.	ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI TERNARNIH SMJESA FARMACEUTIKA	36
4.2.3.	ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI KVARTARNE SMJESE FARMACEUTIKA	39
5.	ZAKLJUČAK	41
6.	ZAHVALA	43
7.	LITERATURA	44
8.	DODACI	49
8.1.	POPIS SLIKA	49
8.2.	POPIS TABLICA.....	50
9.	SAŽETAK.....	51
10.	ABSTRACT	52
11.	ŽIVOTOPIS.....	53

1. UVOD

Industrijalizacija, urbanizacija, intenzivan rast broja stanovništva kao i povećanje udjela starije populacije u istom te ubrzan način života doprinose stalnom rastu broja oboljelih i broja novih bolesti. [1] U prilog tome ide i scenarij dosad viđen samo u apokaliptičnim filmovima – u 2020. godini cijeli je svijet stao zbog pandemije uzrokovane COVID-19 virusom. Posljedica navedenog je stalni rast potrošnje farmaceutika, pa je tako godišnja stopa rasta prodaje lijekova između 2011. i 2018. godine iznosila 1,7 %, a predviđa se da će prodaja lijekova na recept do 2024. godine doseći 1,18 trilijuna USD, s godišnjim rastom od 6,9 %. [2] Većina farmaceutika nakon primjene završava u otpadnim i površinskim vodama te tlu u nepromijenjenom obliku ili u obliku razgradnih produkata. Obzirom da farmaceutski aktivne tvari već u vrlo malim dozama izazivaju određene farmakološke i fiziološke učinke, njihova nepravilna upotreba i odlaganje predstavljaju opasnost za ekosustav. [3] Procjena rizika utjecaja farmaceutski aktivnih tvari na okoliš uglavnom je usmjerena na analizu učinka čistih tvari, a manje na njihove smjese, iako su upravo smjese najčešće prisutne u okolišu. Problem sa smjesama tvari je mogućnost pojave sinergizma odnosno povećanje toksičnosti u odnosu na zasebne komponente. [4]

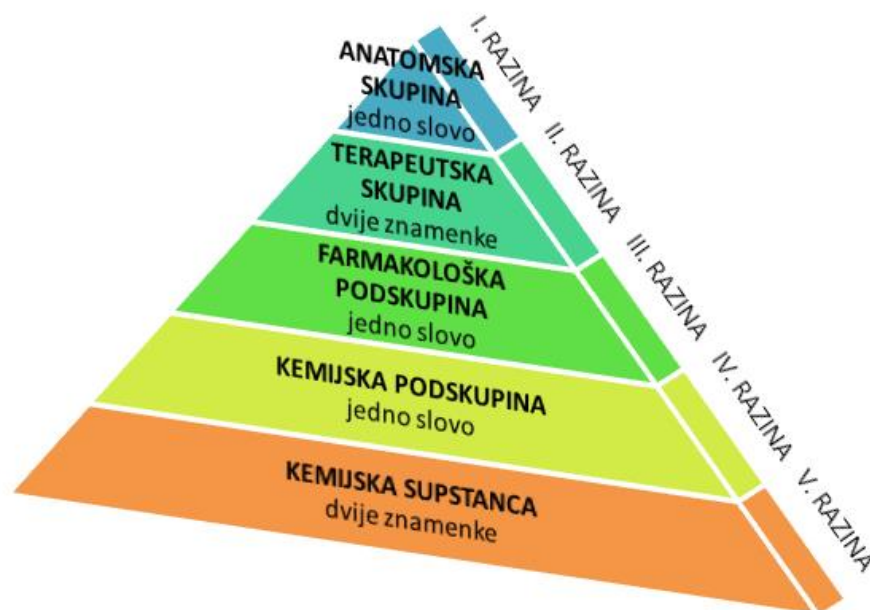
Utjecaj farmaceutika na živi svijet moguće je ispitati testovima toksičnosti. [1] U ovom je radu ispitan utjecaj čistih komponenti te binarnih, ternarnih i kvartarne otopine gentamicina, ivermektina, klozantela i mebendazola na bakteriju *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3:2007) [5] kao brzog pokazatelja toksičnosti. *Vibrio fischeri* je Gram-negativna, štapičasta, luminiscentna bakterija, čija se luminiscencija smanjuje odnosno raste ovisno o tome nalazi li se u toksičnoj ili povoljnoj okolini. Mjereći promjenu luminiscencije i primjenom matematičkih izraza dobiva se inhibicija bakterijske kulture koja se dovodi u vezu s toksičnim djelovanjem ispitivanih tvari. [6,7]

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici obuhvaćaju sve lijekove koji se upotrebljavaju u humanoj i veterinarskoj medicini i dodatke prehrani. Razvijeni su s ciljem postizanja određenih farmakoloških i fizioloških učinaka korištenjem vrlo malih doza istih (mikrogramske ili nanogramske koncentracije). To su uglavnom mali organski spojevi, molekulskih masa od 200 do 500 Da. Umjereno su topljivi u vodi i lipofilni zbog čega su bioraspoloživi i biološki aktivni. [1,3]

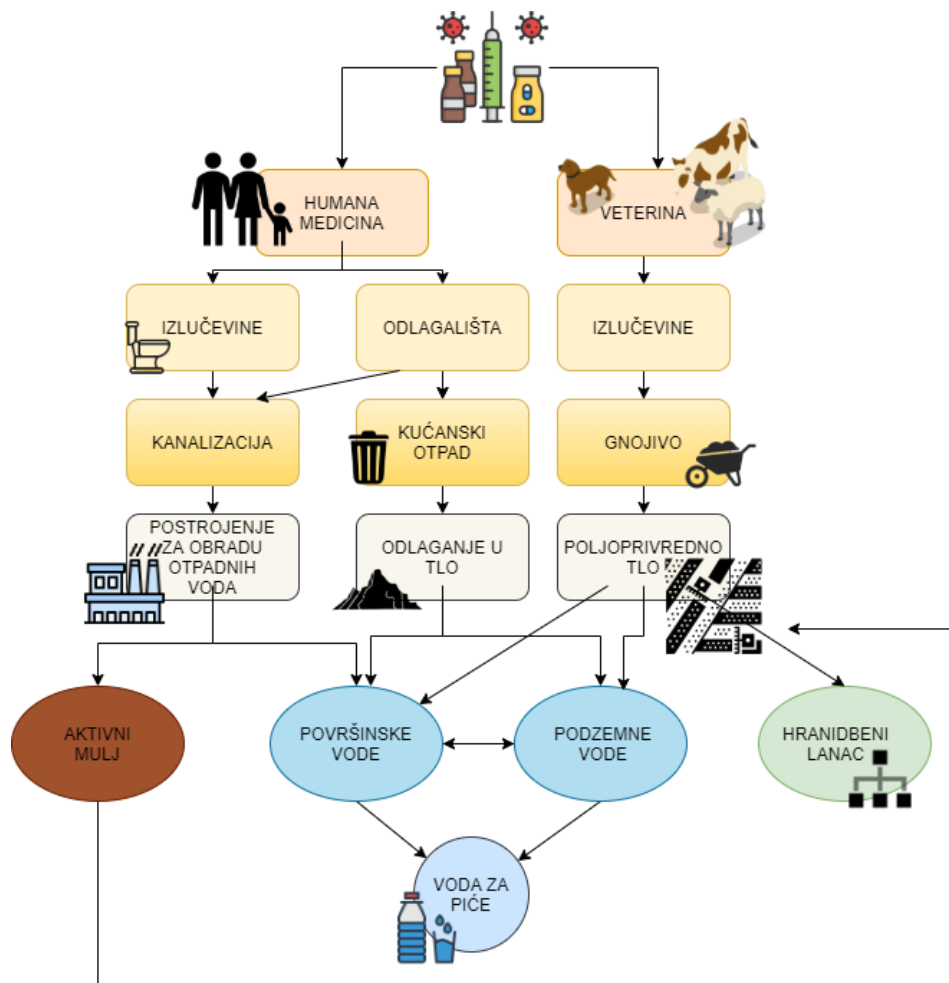
Farmaceutici se mogu svrstati u različite kategorije obzirom na porijeklo, fizikalno-kemijska svojstva farmaceutski aktivne tvari, farmakološko djelovanje, biološki sustav na koji djeluju ili terapijski učinak. Ipak, danas se zbog vrlo dobre razrađenosti najčešće koristi anatomsko-terapijsko-kemijski sustav klasifikacije, ATK (*engl. Anatomical Therapeutic Chemical Classification System, ATC*). Prema ovom sustavu klasifikacije farmaceutski aktivne tvari su hijerarhijski podijeljene u pet razina (**Slika 1.**). Prva se razina sastoji od 14 glavnih anatomskih skupina na koje lijek može djelovati, a označene su jednim slovom. Svaka glavna skupina prve razine je podijeljena na terapijske glavne skupine druge razine označenih dvijema znamenkama. Treća razina ukazuje na farmakološke podskupine označene jednim slovom, dok četvrta razina ukazuje na kemijske podskupine također označene jednim slovom. Posljednja peta razina označava kemijsku supstancu s dvije znamenke. [8,9]



Slika 1. ATK klasifikacija lijekova [8,9]

Farmaceutici pripadaju skupini novih onečišćivala, a posljednjih godina se bilježi stalni porast potrošnje istih. [1,3] Godišnja stopa rasta prodaje lijekova između 2011. i 2018. godine iznosila je 1,7 %, a predviđa se da će prodaja lijekova na recept do 2024. godine doseći 1,18 trilijuna USD, s godišnjom stopom rasta od 6,9 %. [2] U svijetu se koristi više od 4000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva koji imaju različiti učinak i terapijsku primjenu, a godišnje ih se proizvede više od 100 000 t. [1,3]

Slika 2. prikazuje glavne tokove farmaceutika u okolišu. Vidljivo je da farmaceutici prije ili kasnije dospiju u vodeni okoliš i tlo u nepromijenjenom obliku ili u obliku razgradnih produkata. To predstavlja veliki problem za zdravlje ljudi i životinja, ali i za sam okoliš. Takvi se spojevi teško uklanjaju konvencionalnim načinima obrade voda, stoga se istraživanje i razvoj novih, modernih metoda obrade voda nameće kao imperativ. Utjecaj farmaceutski aktivnih tvari na okoliš nije dovoljno istražen te je potrebno razviti sustav kontinuiranog praćenja tih spojeva u okolišu. [1,3]



Slika 2. Glavni tokovi farmaceutika u okolišu [10]

U ovom su radu ispitivani farmaceutici koji se obzirom na način djelovanja u humanoj medicini i veterini svrstavaju u antibiotike i antihelmintike.

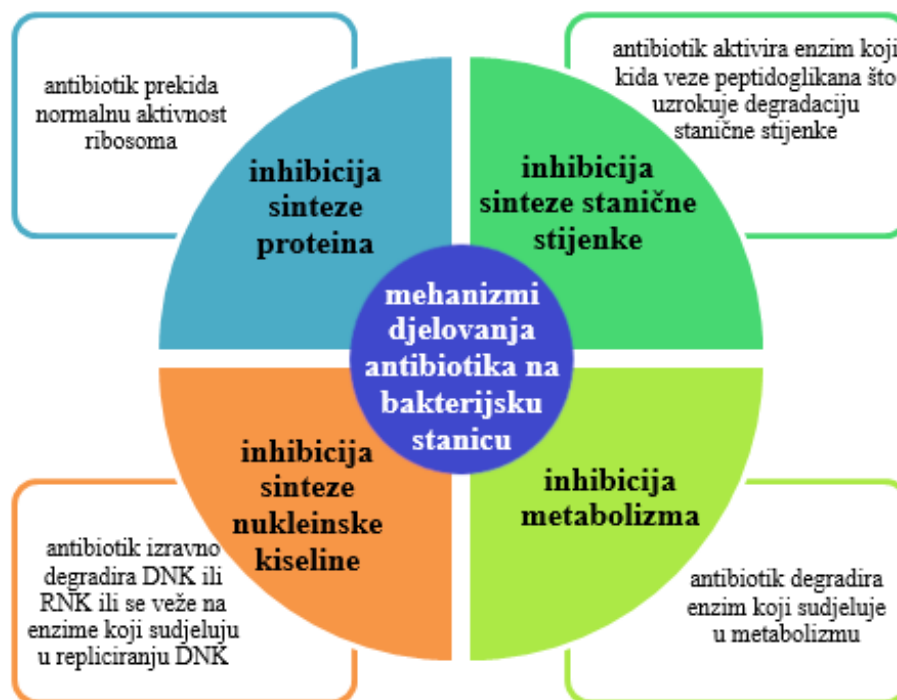
2.1.1. ANTIBIOTICI

Početak upotrebe antibiotika predstavlja veliku prekretnicu u medicini, a njihovo se otkriće (1928. god.) pripisuje škotskom znanstveniku Aleksandru Flemingu. On je uočio da plijesan *Penicillium notatum* uništava bakterijske kolonije te je izolirao aktivnu tvar, danas poznatu pod nazivom penicilin. Primjena penicilina ipak je pričekala 11 godina (1939. god.) kada australski znanstvenik Howard Florey s kolegama s Oxfordskog sveučilišta utvrđuje da je antibiotik dovoljno jak za preživljavanje u ljudskom organizmu uz zadržavanje svog aktivnog djelovanja protiv patogena. U II. svjetskom ratu britanska i američka farmaceutska industrija razvijaju pogodne tehnologije za proizvodnju penicilina čime započinje njegova masovna primjena. Zahvaljujući antibioticima omogućeno je liječenje brojnih bolesti i suzbijanje velikog broja zaraznih epidemija koje su na taj način gotovo iskorijenjene. [11,12]

Antibiotici su najčešće sintetički organski spojevi koji se koriste za tretiranje bakterijskih zaraznih bolesti. Vrlo bitna karakteristika antibiotika je selektivna toksičnost, odnosno sposobnost suzbijanja bakterijske kulture bez ili s vrlo malo štetnog učinka na domaćina. Selektivna toksičnost može biti izražena u obliku terapijske doze (količina lijeka potrebna za liječenje dane infekcije) ili toksične doze (količina lijeka koja premašuje maksimalnu dopuštenu koncentraciju lijeka u krvi i dovodi do toksičnoga djelovanja). [13,14]

Po širini djelovanja razlikujemo antibiotike užeg i šireg spektra djelovanja. Antibiotici užeg spektra djelovanja djeluju samo na određene vrste Gram-pozitivnih ili Gram-negativnih bakterija, dok antibiotici širokog spektra djelovanja djeluju na više vrsta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Prema djelovanju razlikujemo baktericidne i bakteriostatske antibiotike. Baktericidni antibiotici uništavaju bakterijske stanice, za razliku od bakteriostatskih koji samo zaustavljaju njihov rast i razvoj, a organizam svojim obrambenim djelovanjem uklanja preostale bakterijske stanice. [13,14]

Na **Slici 3** prikazani su mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu.



Slika 3. Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu [13,14]

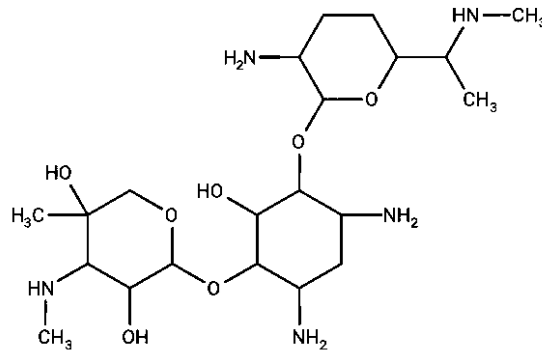
Prilikom upotrebe antibiotika, kao i bilo kojih drugih lijekova, bitno je pridržavati se propisanih uputa za korištenje. Antibiotik se mora uzimati u točno određenim vremenskim intervalima jer je važna njegova stalna koncentracija u organizmu. Također, terapija se ne smije prekidati nakon prvih simptoma boljeg stanja organizma, jer se infekcija samo smanjila, ali je još uvijek prisutna. U slučaju prekida terapije infekcija se vraća i to najčešće u jačem obliku koji je teže liječiti. [15]

Problem vezan uz antibiotike je pojava bakterijske rezistencije na djelovanje istih uslijed stalnog izlaganja bakterija malim koncentracijama antibiotika. Razlog tomu je upotreba antibiotika za tretiranje virusnih infekcija na koje uopće nemaju utjecaj, nepravilno skladištenje antibiotskog otpada, nepravilno uzimanje antibiotika, zlouporaba kućnih zaliha i slično. Bakterijska rezistentnost raste, pa se tako sve veći broj infekcija ne može liječiti postojećima antibioticima. Posebno je zabrinjavajuća činjenica da je više od 70 % bakterijskih sojeva otporno na barem jedan antibiotik, a većina pokazuje otpornost na više njih. To predstavlja veliki problem obzirom da se teško pronalaze novi antibiotici koji će na potpuno nov način uništavati bakterijske stanice. [3,11]

U ovom je radu ispitan antibiotik gentamicin.

2.1.1.1. GENTAMICIN

Gentamicin je baktericidni antibiotik širokog spektra djelovanja, a svoju je primjenu pronašao u humanoj medicini. Spada u skupinu aminoglikozida koje karakterizira glikozidna (šećerna) i aminoskupina. [16-18] Strukturna formula gentamicina je prikazana na **Slici 4**.



Slika 4. Strukturna formula gentamicina [17]

Gentamicin, poput svih aminoglikozida, inhibira sintezu bakterijskih proteina. Naime, on oponaša prirodne biomolekule te se nepovratno veže na 30S podjedinicu bakterijskih ribosoma tako uzrokujući nepravilno čitanje genetskog koda. [16,17]

Koristi se za liječenje teških infekcija mokraćnog sustava, respiratornog trakta, krvi, kostiju i mekih tkiva uzrokovanih Gram negativnim bakterijama poput *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* i Gram pozitivnom bakterijom *Staphylococcus*. Ipak, *Escherichia coli* je počela u mnogim slučajevima pokazivati rezistentnost na gentamicin. Nuspojave vezane uz primjenu gentamicina variraju od blagih, kao što su mučnina i povraćanje, do teških poput alergijskih reakcija, neuromuskularnih problema, neuropatije (oštećenje živaca), nefrotoksičnosti (oštećenje bubrega) i ototoksičnosti (poremećaji uha). Nefrotoksičnost i ototoksičnost povezuju se s uzimanjem većih doza, a mogu imati odgođeno djelovanje pa čak se ne pojaviti sve do završetka liječenja. Gentamicin se može davati intravenozno, tj. ubrizgavanjem u mišić ili lokalno, a dostupan je i u obliku kreme i masti. [16-18]

2.1.2. ANTIHELMINTICI

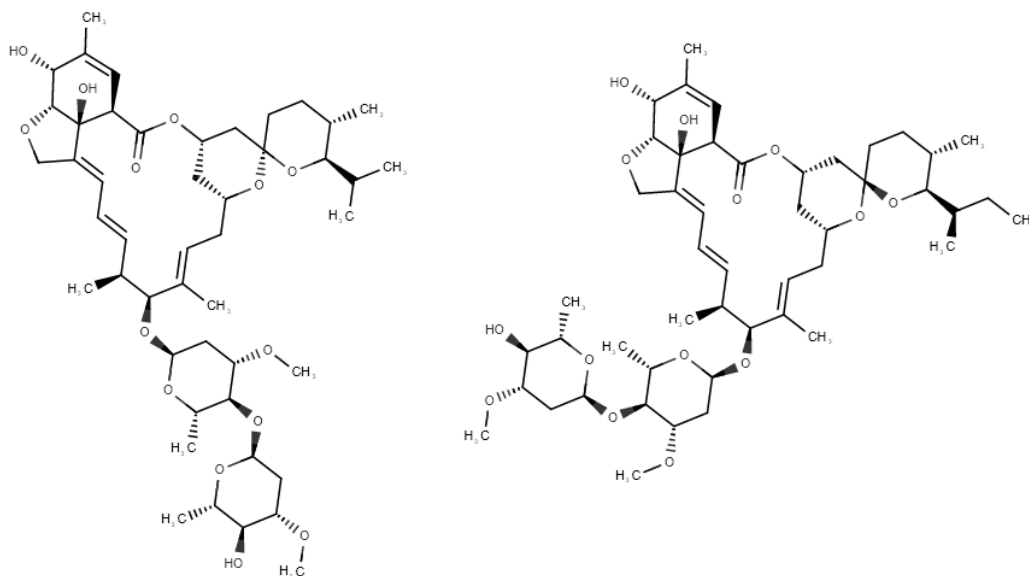
Antihelmintici su lijekovi koji se koriste za liječenje helmintijaza (helmitoza) u humanoj i veterinarskoj medicini. To su bolesti uzrokovane helmintima odnosno crvolikim crijevnim nametnicima (gliste i trakavice). Najčešće se uzimaju u kombinaciji sa sredstvima za čišćenje crijeva. Naime, antihelmintici izazivaju paralizu helminta ili oštećuju njihov sekundarni omotač te ih tako omamljuju ili usmrćuju, dok sredstva za čišćenje crijeva omogućuju crijevnoj peristaltici uklanjanje helminta iz istih. Karakteristike koje odlikuju dobar antihelmintik su: visoka djelotvornost, selektivna toksičnost, širok spektar djelovanja, brzo izlučivanje i jednostavna primjena. [19-21]

Antihelmintici se obzirom na kemijsku strukturu i farmakološko ponašanje mogu svrstati u osam različitih skupina: benzimidazole, difenil-sulfide, imidazotiazole, heksahidropirazine (piperazine), makrocikličke laktone, salicilanilide, tetrahidropirimidine i ostale bez međusobne sličnosti. [19,20]

U ovom su radu ispitani antihelmintici ivermektin, klozantel i mebendazol.

2.1.2.1. IVERMEKTIN

Ivermektin je antihelmintik koji se koristi za tretiranje velikog broja parazitskih infekcija kod ljudi i životinja. Sintetski je derivat abamektina koji spada u makrocikličke laktone nastale fermentacijom *Streptomyces avermitilis*. Ivermektin je zapravo smjesa 22,23-dihidro-avermektina B1a (najmanje 90 %) i 22,23-dihidro-avermektina B1b (manje od 10 %). [22-26] Na **Slici 5** je prikazana njegova strukturna formula.



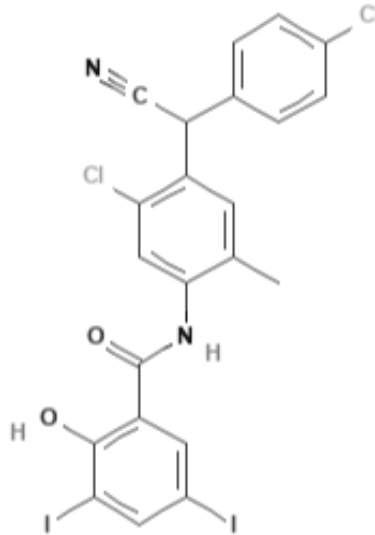
Slika 5. Strukturna formula ivermektina [26]

Ivermektin, kao i ostali makrociklički laktone, ima veliki afinitet prema glutamatnim kloridnim kanalima, koji se nalaze u živčanim i mišićnim stanicama beskičmenjaka. Veže se za njih te tako povećava propusnost stanične membrane za kloridne ione. Posljedica toga je dugotrajna hiperpolarizacija živčanih i mišićnih stanica beskičmenjaka što uzrokuje paralizu i uginuće parazita. Obzirom da sisavci nemaju glutamatne kloridne kanale makrociklički laktone, pa tako i ivermektin, su sigurni za sisavce. [22-26]

Ivermektin ima širok spektar djelovanja, a djeluje na endo- i ectoparazite. Djelotvoran je protiv filarijskih nematoda, brojnih helminta koji se prenose na tlo, mioza i šuga. Ne izaziva teže nuspojave, ali može uzrokovati blaže tegobe kao što su glavobolja, vrtoglavica, bol u mišićima, mučnina, dijareja, iritacija kože – suha i goruća koža. Uzima se oralno (endoparaziti) ili se aplicira na kožu u slučaju vanjske infekcije (ectoparaziti). Oralni ivermektin je dostupan u obliku tableta, kapsula i otopina. [22-26]

2.1.2.2. KLOZANTEL

Klozantel je antihelmintik koji se koristi se za liječenje parazitskih infekcija kod životinja, a pripada grupi derivata salicilanilida. [27,28] Njegova strukturna formula je prikazana na **Slici 6.**



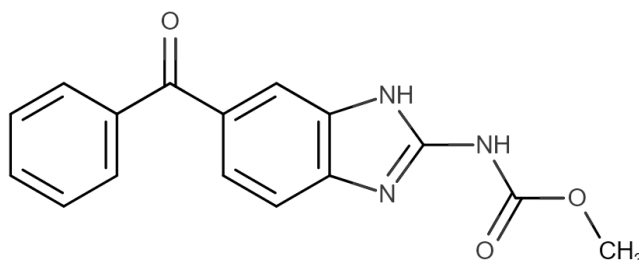
Slika 6. Strukturna formula klozantela [29]

Točan mehanizam djelovanja klozantela nije poznat, ali zna se da razdvaja ione koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji u mitohondrijima. [27,28]

Klozantel je pogodan za liječenje endoparazitskih infekcija, najčešće kod goveda i ovaca, a nerijetko se kombinira s derivatima benzimidazola poput mebendazola. Pokazuje veliku djelotvornost protiv različitih vrsta i razvojnih stadija trematoda, nematoda i člankonožaca. Visoko je učinkovit (95-100 %) protiv nezrelih *Fasciola hepatica* starih 6 tjedana i starijih, ali ne i protiv juvenilnih metilja. Najveća prednost klozantela je to što paraziti ne razvijaju rezistentnost prema njemu. Zasad ne postoje izvješća o otpornosti *Fasciola hepatica* na klozantel, a poznat je samo jedan slučaj rezistencije *Haemonchus contortus* na isti. Nadalje, liječenje klozantelom se pokazalo vrlo uspješnim kod ovaca i goveda inficiranih s *Fasciola hepatica*, a koje su otporne na triklabendazol. [27,28] Triklabendazol je jedina kemikalija koja ubija sve stadije *Fasciola hepatica*, ali je stvorena velika rezistentnost prema njemu. [30,31] Klozantel je dostupan kao bijelo–žuti prah netopljiv u vodi, a primjenjuje se oralno ili injekcijom. [27,28]

2.1.2.3. MEBENDAZOL

Mebendazol je antihelmintik širokog spektra djelovanja, a svoju je primjenu pronašao u veterini. Pripada skupini benzimidazola što je vidljivo iz njegove strukturne formule prikazane na **Slici 7**. [31-34]



Slika 7. Strukturna formula mebendazola [34]

Mehanizam djelovanja mebendazola temelji se na selektivnoj inhibiciji sinteze mikrotubula vezanjem na kolhicin (osjetljivo mjesto β -tubulina). Na taj se način usporava polimerizacija tubulina (spajanje u mikrotubule) te dolazi do gubitka citoplazmatskih mikrotubula što rezultira smanjenim unosom glukoze u larvalne i odrasle stadije parazita. Time se smanjuju parazitske zalihe glikogena što za posljedicu ima smanjenu proizvodnju adenozin trifosfata (ATP), koji je neophodan za preživljavanje nametnika. Zbog nedostataka energije nametnici bivaju paralizirani te posljedično uginu. Paraliza i smrt nastupaju polako, a potrebno je nekoliko dana kako bi se parazit eliminirao fecesom. [31-34]

Mebendazol je visoko učinkovit protiv većine nematoda s tim da suzbija i larve i odrasle stadije, a u nekim slučajevima i jajašca. Nuspojave vezane uz primjenu mebendazola su rijetke, ali može uzrokovati povraćanje i dijareju kod pasa. Na tržištu je dostupan kao bijeli prah koji se daje isključivo oralno, a koristi se za liječenje parazitskih oboljenja kod konja i pasa. [31-34]

2.1.3. FIZIKALNO – KEMIJSKA SVOJSTVA ISPITIVANIH FARMACEUTIKA

U **Tablici 1** prikazana su fizikalno–kemijska svojstva ispitivanih farmaceutski aktivnih tvari.

Tablica 1. Fizikalno–kemijska svojstva ispitivanih farmaceutika [26,35–37]

GENERIČKO IME	NAZIV PO IUPAC-u	CAS BROJ	MOLARNA MASA, g/mol	KONSTANTE
GENTAMICIN	2-{[4,6-diamino-3-({3-amino-6-[1-(methylamino)ethyl]oxan-2-yl}oxy)-2-hydroxycyclohexyl]oxy}-5-methyl-4-(methylamino)oxane-3,5-diol	1403-66-3	477,596	$\log K_{ow} = -1,88$ $S_w = 100 \text{ mg/mL}$ $t_t = 105 \text{ }^\circ\text{C}$ $t_v = 554,76 \text{ }^\circ\text{C}$
IVERMEKTIN	(1R,4S,5'S,6R,6'R,8R,10E,12S,13S,14E,16E,20R,21R,24S)-6'-[(2S)-butan-2-yl]-21,24-dihydroxy-12-[(2R,4S,5S,6S)-5-[(2S,4S,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-5',11,13,22-tetramethylspiro[3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.14,8.020,24]pentacos-10,14,16,22-tetraene-6,2'-oxane]-2-one	70288-86-7	875,106	$\log K_{ow} = 5,83$ $S_w = \text{netopljiv}$ $t_t = 155 \text{ }^\circ\text{C}$ $t_v = /$
KLOZANTEL	N-(5-chloro-4-((4-chlorophenyl)(cyano)methyl)-2-methylphenyl)-2-hydroxy-3,5-diiodobenzamide	57808-65-8	663,07	$\log K_{ow} = 8,11$ $S_w = 0,00001519 \text{ mg/L}$ $t_t = 217,8 \text{ }^\circ\text{C}$ $t_v = 707,12 \text{ }^\circ\text{C}$
MEBENDAZOL	methyl N-(6-benzoyl-1H-1,3-benzodiazol-2-yl)carbamate	31431-39-7	295,293	$\log K_{ow} = 2,83$ $S_w = 71,3 \text{ mg/L}$ $t_t = 288,5 \text{ }^\circ\text{C}$ $t_v = 523,14 \text{ }^\circ\text{C}$

2.2. EKOTOKSIČNOST

Znanost koja proučava štetne učinke kemijskih, fizikalnih ili bioloških uzročnika na žive organizme i ekosustav naziva se toksikologija. Ekotoksikologija je vrsta toksikologije koja proučava direktni ili indirektni učinak otrovnih tvari na ekosustav u cijelini. Shodno tome, štetan ili rizičan kemijski, biološki ili fizikalni utjecaj na ekosustav naziva se ekotoksičnost. [38]

Veliki broj tvari može uzrokovati toksične reakcije, a razlikujemo otrovne tvari i toksine. Otrovnost tvari su prirodno prisutni ili sintetički ksenobiotici, dok su toksini tvari koje proizvode drugi živi organizmi, a koje izazivaju toksične reakcije. [38] U nastavku je dan pregled glavnih skupina onečišćivala tla, vode i zraka.

Postojana organska zagađivala obuhvaćaju pesticide, farmaceutike i sredstva za osobnu njegu, perfluorirane spojeve, omekšivača, tj. plastifikatore, protukorozijska sredstva, površinski aktivne tvari, organske plinove i organometalne spojeve. Zbog svoje postojanosti predstavljaju opasnost za okoliš i ljude obzirom da se mogu prenositi na velike udaljenosti, akumulirati u životinjskom i ljudskom tkivu, a koncentracija im se može povećavati pri svakom koraku prehrambenoga lanca. [1]

Teški metali su sastavni dio zemljine kore te su kao takvi prisutni u vodi i tlu u niskim koncentracijama. Međutim, njihova se koncentracija može značajno povećati ljudskom djelatnošću što može imati drastične posljedice po žive organizme. [1]

Lebdeće čestice mogu biti u obliku prašine, pepela, čađe, dima, ali i u obliku silikata i minerala. Glavni izvor istih su procesi izgaranja u industrijskim i neindustrijskim ložištima i termoenergetskim postrojenjima, procesi proizvodnje cementa, azbesta, željeza i sličnih proizvoda te cestovni promet. Lebdeće čestice prodiru u pluća narušavajući tako ljudsko, ali i životinjsko zdravlje. [1]

Anorganski plinovi obuhvaćaju plinove nastale izgaranjem - ugljikove okside (CO_2 i CO), dušikove okside (NO i NO_2), didušikov oksid, sumporove okside (SO_2 i SO_3) i amonijak. U ovu skupinu onečišćivala spadaju i sintetički plinovi te plinovi nastali ostalom ljudskom djelatnošću. Povećanje njihove koncentracije, osim štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, ima nepovoljan utjecaj na okoliš (npr. efekt stakleničkih plinova). [1]

2.2.1. TESTOVI TOKSIČNOSTI

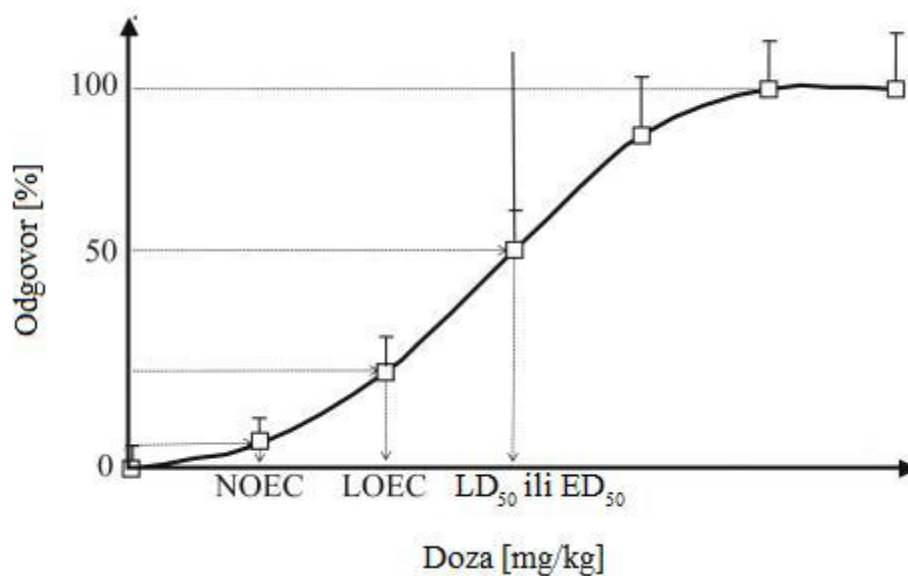
Toksičnost kemikalija ispituje se testovima toksičnosti. Oni se provode za sve potencijalno štetne tvari radi određivanja njihovog potencijalno štetnog učinka na zdravlje ljudi, životinja i okoliš u cjelini. Provode se u ovlaštenim laboratorijima kako bi se odredile i ozakonile maksimalno dopuštene koncentracije ispitivanih kemikalija u proizvodima i okolišu. Dugoročna svrha takvih ispitivanja je zajamčiti najsigurniju moguću upotrebu kemikalija i proizvoda koji ih sadrže. Metode provođenja testova toksičnosti kao i dopušteno vrijeme izlaganja organizama ispitivanim tvarima propisuju organizacije ISO (*International Organization for Standardization*) i OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*). [1,39]

Testove toksičnosti možemo podijeliti na *in vivo* i *in vitro* testove. *In vivo* testovi služe za istraživanje općenitog utjecaja ispitivane tvari na cijeli organizam, odnosno provode se na cijelim živim organizmima. *In vitro* testovi služe za određivanje utjecaja ispitivane tvari na pojedini dio organizma, odnosno provode se na dijelovima tkiva, izoliranim organima ili stanicama, pa čak i na subcelularnim frakcijama poput mitohondrija, mikrosoma i membrana. [39,40] *In vitro* testovi daju brze, ponovljive i pouzdane rezultate te štede vrijeme i novac. Međutim, ovim testovima nije moguće procijeniti potencijalnu opasnost za ljude, stoga se provode *in vivo* testovi na nekim glodavcima anatomije slične ljudskoj. [40] Testovi toksičnosti mogu se još podijeliti prema trajanju izlaganja organizama ispitivanoj kemikaliji (akutni, subkronični, kronični), prema vrstama organizama koji se ispituju (bakterije, protisti, biljke, životinje) i prema vrsti negativnih učinaka koji se mjere. [1]

U ovom je radu proveden *in vitro* test toksičnosti na bakteriji *Vibrio fischeri* prema standardiziranoj normi ISO 11348-3:2007 [5].

2.2.1.1. ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI

Iskazivanje toksičnosti pri procjeni ekološkog rizika temelji se na modeliranju krivulje doza-odgovor. U tu svrhu potrebno je odrediti odnos koncentracije ili doze i učinka na ispitivanu vrstu. [41] Shodno tome, ispitivani se organizam izlaže potencijalno štetnoj tvari te se mjeri određeni parametar (luminiscencija, broj živih stanica ...) u vremenskim razmacima. Isti se parametar mjeri u istim uvjetima i kod neeksponirane vrste te se potom uspoređuju dobiveni podaci. [42] Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka i primjenom odgovarajućih matematičkih izraza formira se krivulja doza-odgovor (**Slika 8.**). [43]



Slika 8. Općenita krivulja doza-odgovor [44]

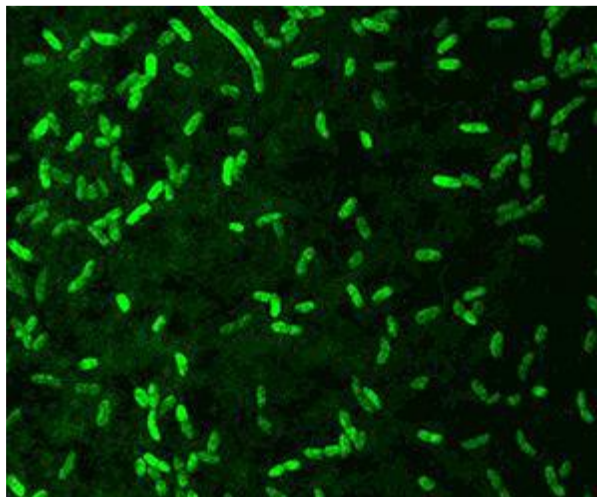
Iz krivulje se određuju najčešće slijedeći parametri:

- NOEC - najveća koncentracija ili doza bez učinka [43]
- LOEC - najniža koncentracija ili doza ispitivane tvari koja izaziva prvi učinak [43]
- LD₅₀ / LC₅₀ - letalna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje smrtnost 50 % testne populacije [43]
- ED₂₀ / EC₂₀ - efektivna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 20 % testne populacije [43]
- ED₅₀ / EC₅₀ - efektivna doza / koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 50 % testne populacije [43]

U ovom su radu određivane EC₂₀ i EC₅₀ - efektivne koncentracije ispitivanih farmaceutika koje uzrokuju 20 %-tnu odnosno 50 %-tnu inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri*.

2.2.1.2. ISPITIVANJE EKOTOKSIČNOSTI BAKTERIJOM *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je bioluminiscentna, Gram-negativna, štapićasta, nepatogena bakterija. Heterotrofna je i pokreće se pomoću polarnih flagela (bičeva). Pronalazimo ju pretežno u morskom okolišu, a često obitava u simbiozi s raznim ribama, lignjama i glavonošcima. Ime je dobila prema njemačkom mikrobiologu Bernhardu Fischeru te je ključna za ispitivanje mikrobiološke bioluminiscencije, kvorskog senzora kao i simbioze bakterija i životinja. [6,7] Na **Slici 9** je prikazana mikrofotografija bakterije *Vibrio fischeri*.



Slika 9. Mikrofotografija bakterije *Vibrio fischeri* [45]

Bioluminiscencija se definira kao sposobnost nekih živih organizama da proizvode i emitiraju svjetlost, a posljedica je oksidacije molekule luciferina katalizirane enzimom luciferazom. *Vibrio fischeri* emitiraju svjetlost ujednačenog intenziteta danju i noću kao sastavni dio svog metabolizma obzirom da se navedena reakcija odvija prirodno sama od sebe. Sustav luciferin–luciferaza je kodiran skupinom gena nazvanih luks operon. Kod bakterije *Vibrio fischeri* postoji pet takvih gena koji sudjeluju u emitiranju svijetlosti i dva koja upravljaju operonom. [6,7]

Ispitivanje toksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri* (ISO 11348:2007) [5] temelji se na izlaganju tih bakterija potencijalno štetnim tvarima te praćenju inhibicije bioluminiscencije. Promjena kinetičkih svojstava bioluminscentne reakcije povezana je s toksičnošću ispitivanih tvari odnosno inhibicija biolumiscencije proporcionalna je toksičnosti ispitivane tvari. [7] Cilj testa je dobiti krivulju doza-odgovor te iz nje odrediti vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ [46]

U nastavku su navedene i pojašnjene korištene kratice mjerenih i izračunatih veličina te matematički izrazi kojima su dovedene u međusobni odnos [47]:

I_0 - početna luminiscencija bakterija u suspenziji prije dodavanja uzorka,

I_t - konačna luminiscencija bakterija u suspenziji nakon inkubacije u vremenu t ,

f_K - faktor korekcije,

I_c - ispravljeni faktor korekcije:

$$I_c = I_0 * f_K$$

I - postotak inhibicije nakon inkubacije u vremenu t :

$$I = (I_c - I_t) * 100 / I_c$$

Posljednih godina interes za bioluminiscentnim testovima raste obzirom da su brzi, osjetljivi, jednostavni i relativno povoljni. Najveća prednost konkretno ovog testa je kratko vrijeme trajanja (30 min) u odnosu na druge akutne testove toksičnosti. Bioluminiscentni test primjenom bakterije *Vibrio fischeri* pokazao se jednostavnim i ekonomičnim načinom ekotoksikološkog ispitivanja za procjenu širokog spektra potencijalno štetnih tvari poput organskih i anorganskih spojeva, metala, otpadnih voda, kanalizacijskog mulja, efluenta s odlagališta otpada, obrađenih otpadnih voda i sl. [7]

2.2.2. TOKSIČNOST SMJESA TVARI

Iako su u okolišu najčešće prisutne smjese kemijski tvari, a manje čiste komponente, procjena rizika uglavnom je usmjerena na analizu učinka čistih tvari. Smjesa tvari je kombinacija dviju ili više tvari koje se međusobno miješaju, ali nisu kemijski povezane. Problem sa smjesama tvari je mogućnost pojave sinergizma odnosno povećanje toksičnosti u odnosu na zasebne komponente. [4] Tako su mnoga znanstvena istraživanja pokazala da čiste komponente koje ne uzrokuju nikakve štetne učinke (NOEC) mogu uzrokovati toksičnost uslijed sinergističkog i aditivnog efekta kada se nalaze u smjesi tvari. [48-50] Shodno tome, ispitivanja toksičnosti kemijskih smjesa su neophodna i nužna za bolje razumijevanje njihovog utjecaja na ekosustav. Ipak, u praksi su toksikološka ispitivanja za sve moguće smjese neizvediva. Prvotno zbog toga što je broj kemijski tvari koje su prisutne u okolišu i koje se koriste u proizvodima beskonačan. Tako na primjer 20 kemijski supstanci može stvoriti 190 binarnih kombinacija i više od milijun drugih kombinacija (ternarnih, kvartarnih itd.) Drugi razlog je stalna promjenjivost stanja i uvjeta smjesa tvari u okolišu. Naposljetku, testovi toksičnosti su često skupi i dugotrajni. [4]

Radi lakše procjene kemijskog rizika koja bi zadovoljila i znanstveni i regulatorni aspekt, danas se razvijaju modeli predviđanja ponašanja smjesa (engl. *Mixture prediction models*). Najčešće korišteni modeli za opis toksičnosti smjesa su aditivni model (engl. *Concentration addition model*) i model neovisnog djelovanja (engl. *Independent action model*). [51]

U ovom radu je ispitana toksičnost standardnih otopina farmaceutika (gentamicin, ivermektin, klozantel i mebendazol) kao i toksičnost njihovih binarnih, ternarnih i kvartarne smjese kako bi se utvrdilo postoji li sinergistički i aditivni učinak.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

KEMIKALIJE	KEMIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
agar	$C_{14}H_{24}O_9$	p.a.	Liofilchem, Italija
cinkov sulfat heptahidrat	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	p.a.	Lach-Ner, Češka
deionizirana voda	H_2O	p.a.	Mili Q
D-glukoza	$C_6H_{12}O_6$	p.a.	Lach-Ner, Češka
D-rafinozapentahidrat	$C_{18}H_{32}O_{16}$	99%	Lach-Ner, Češka
etanol	C_2H_5OH	HPLC čistoća	J. T. Baker, Nizozemska
glicerol	$C_3H_8O_3$	p.a.	Lach-Ner, Češka
kalcijev karbonat	$CaCO_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid	$CaCl_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	p.a.	Kemika, Hrvatska
kvašičev ekstrakt	$C_{19}H_{14}O_2$	p.a.	Biolife, Italija
magnezijev sulfat	$MgSO_4$	p.a.	T.T.T., Hrvatska
metanol	CH_3OH	HPLC čistoća	J. T. Baker, Nizozemska
natrijev klorid	$NaCl$	p.a.	Lach-Ner, Češka
pepton	-	p.a.	Biolife, Italija

3.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI

Tablica 3. Popis ispitivanih farmaceutika

NAZIV	EMPIRIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Gentamicin	$C_{21}H_{43}N_5O_7$	$\geq 95,0 \%$	Sigma-Aldrich
Ivermetkin	$C_{48}H_{74}O_{14}$	$\geq 95,0 \%$	Sigma-Aldrich
Klozantel	$C_{22}H_{14}Cl_2I_2N_2O_2$	$\geq 95,0 \%$	Sigma-Aldrich
Mebendazol	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	$\geq 95,0 \%$	Sigma-Aldrich

3.2. INSTRUMENT ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI

Za ispitivanje toksičnosti korišten je instrument LUMIStox 300 zajedno s inkubacijskim blokom LUMIStherm (Slika 10.). To je mjerni uređaj kojim se mjeri luminiscencija luminiscentnih bakterija, a zadovoljava tehničke zahtjeve DIN 38412 L34 i L341 te međunarodni standard ISO DIS 11348. Ovaj uređaj predstavlja spoj luminometra i računala, kombinirajući tako tehnologiju mjernog instrumenta za mjerenje luminiscencije i tehnologiju računala za obradu podataka. LUMIStox 300 ima svoj vlastiti operativni sustav, a svi potrebni podaci i programi za rad instrumenta nalaze se na disketi, bez kojeg uređaj ne funkcionira. Ugrađena fotometrijska funkcija i automatsko mjerenje omogućuju prepoznavanje boja u luminiscentnom bakterijskom testu te se u slučaju obojene otopine uvodi korekcija. Fotometrijska funkcija pruža i mogućnost određivanja optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene inhibicije rasta u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost. Automatski referentni upravljački sustav provjerava funkcioniranje cijelog mjernog puta prije svake provedbe testa luminiscentnih bakterija. [47]

Ovaj instrument je pogodan za provedbu luminiscentnih bakterijskih testova Dr. Lange za operacijsku analizu LUMISmini (LCK484) i TOX kivetni test (LCK488), kao i luminiscentnih bakterijskih testova za kroničnu toksičnost LUMIS24-tox (LCK486). [42]



Slika 10. LUMIStox 300 s inkubacijskim blokom LUMIStherm

3.3. STERILNA TEHNIKA RADA

Nužno je primjenjivati sterilnu tehniku rada kako bi se osobe i radna okolina zaštitile od mikroorganizama koji su prisutni u uzorcima koji se ispituju, a koji mogu biti patogeni, te da bi se ispitivani uzorci sačuvali od neželjenog onečišćenja iz zraka i sl. Prvo se pali plamenik, namješta na oksidirajući plamen, podiže (plamenik) jednom rukom u zrak, a drugom rukom je potrebno dezinficirati radnu površinu dezinfekcijskim sredstvom (izosan), pritom polako spuštajući plamenik natrag na istu. Sav pribor i posuđe je potrebno prethodno sterilizirati u autoklavu te neposredno prije prolaskom kroz plamen (eza, grlo bočica, kiveta, tikvica). Isto tako sve se radnje moraju odvijati brzo i u neposrednoj blizini plamenika kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije. Nužan je oprez kako se nešto ne bi zapalilo!

3.4. MEDIJI I KEMIJE

3.4.1. ČVRSTA HRANJIVA PODLOGA

Hranjiva podloga služi za uzgoj i održavanje čiste kulture, a u ovom je radu korišten hranjivi agar za uzgoj bakterije *Vibrio fischeri*. Hranjivi agar se priprema prema metodi ISO 11348-1:2007 [5]. Odgovarajući sastojci (**Tablica 4.**) se otapaju u deioniziranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja, uz stalno miješanje kako neotopljeni kalcijev karbonat nebi zagorio. U trenutku vrenja hranjivu podlogu potrebno je maknuti od izvora topline kako ne bi iskipila. Hranjiva podloga se zatim sterilizira u autoklavu (**Slika 11.**) na 121 °C 15 do 20 min te potom hladi u vodenoj kupelji do 45 °C. Ohlađena hranjiva podloga se izlije sterilnom tehnikom rada u sterilizirane Petrijeve zdjelice u sloj maksimalne debljine 0,5 cm. Tako pripremljeni hranjivi agar se čuva u hladnjaku na 4 °C.

Tablica 4. Abecedni popis sastojaka hranjive podloge [5]

Sastojci	u 1000 mL
agar	15 g
glicerol	10 g
kalcijev karbonat	3 g
kvašćev ekstrakt	5 g
natrijev klorid	30 g
pepton	5 g



Slika 11. Prijenosni autoklav

3.4.2. OTOPINA ZA RESUSPENZIJU

Otopina za resuspenziju bakterijske kulture je hranjiva izoosmotska otopina koja se priprema prema metodi ISO 11348-1:2007 [5] otapanjem odgovarajućih sastojaka (**Tablici 5.**) u redeioniziranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja. Otopina se potom sterilizira u autoklavu (**Slika 11.**) na 121 °C 15 do 20 min. Ohlađena otopina se prelije sterilnom tehnikom rada u manje bočice, u kojima se čuva zamrznuta. Otopina se može držati u hladnjaku na 4 °C do dva tjedna ili do pojave zamućenja. Prije korištenja otopine za resuspenziju potrebno je provjeriti te podesiti pH-vrijednost između 6,8 i 7,2. pH-vrijednost se podešava s natrijevom lužinom (NaOH) ili klorovodičnom kiselinom (HCl) ovisno o tome nalazi li se pH-vrijednost u kiselom ili lužnatom području.

Tablica 5. Abecedni popis sastojaka otopine za resuspenziju [5]

Sastojci	u 1000 mL
D – glukoza	10 g
D – rafinozapentahidrat	10 g
glicerol	0,5 mL
kalcijev klorid	0,5 g
kalijev dihidrogen fosfat	0,2 g
magnezijev sulfat	0,2 g
natrijev klorid	1 g

3.4.3. RADNA OTOPINA ZA RESUSPENZIJU

Radna otopina je 2 %-tna otopina natrijevog klorida (NaCl) i služi za pripremu niza razrjeđenja. Sprema se prema metodi ISO 11348-1:2007 [5] otapanjem 20 g natrijevog klorida (NaCl) u 1 L deionizirane vode. Otopinu je potrebno sterilizirati u autoklavu (**Slika 11.**) na 121°C 15 do 20 min.

3.4.4. OTOPINA REFERENTNIH TVARI

Otapanjem cinkovog sulfata heptahidrata ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) u deioniziranoj vodi (masena konc. 25 mg/L) dobiva se otopina referentnih tvari kojom se provjerava valjanost bakterijske kulture. Priprema se prema metodi ISO 11348-1:2007 [5].

3.4.5. TEMELJNE STANDARDNE OTOPINE I RADNE OTOPINE

FARMACEUTIKA

Zbog njihove netopljivosti u vodi, temeljne standardne otopine (TSO) gentamicina, ivermektina i klozantela, masene koncentracije 10 mg/L, pripremaju se otapanjem 5 mg farmaceutika u 50 mL metanola HPLC čistoće. Temeljna standardna otopina mebendazola priprema se otapanjem 5 mg farmaceutika u 50 mL deionizirane vode.

Binarne radne otopine (RO) pripremaju se tako da je maseni udio oba farmaceutika isti (50:50). Uzme se 0,5 mL alikvota TSO jednog farmaceutika i 0,5 mL TSO drugog farmaceutika, stavi u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Ternarne radne otopine (RO) pripremaju se tako da je maseni udio sva tri farmaceutika isti (33,33:33,33:33,33). Uzme se 0,5 mL alikvota TSO jednog farmaceutika, 0,5 mL TSO drugog farmaceutika i 0,5 mL TSO trećeg farmaceutika, stavi u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Kvartarna radna otopina (RO) priprema se tako da je maseni udio sva četiri farmaceutika isti (25:25:25:25). Uzme se 0,5 mL alikvota TSO svakog farmaceutika, stavi u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

U **Tablici 6** je dan popis ispitivanih smjesa, a u **Tablici 7** su navedene odvage farmaceutika za pripremu temeljnih standardnih otopina.

Tablica 6. Popis ispitivanih smjesa

	NAZIV SMJESE	KRATICA
BINARNE SMJESE	gentamicin – ivermektin	G-I
	gentamicin – klozantel	G-K
	gentamicin – mebendazol	G-M
	ivermektin – klozantel	I-K
	ivermektin – mebendazol	I-M
	klozantel – mebendazol	K-M
TERNARNE SMJESE	gentamicin – ivermektin – klozantel	G-I-K
	gentamicin – ivermektin – mebendazol	G-I-M
	gentamicin – klozantel – mebendazol	G-K-M
	ivermektin – klozantel – mebendazol	I-K-M
KVARTARNA SMJESA	gentamicin – ivermektin – klozantel – mebendazol	G-I-K-M

Tablica 7. Odvage farmaceutika na preciznoj analitičkoj vagi

Farmaceutik	Odvaga/mg
gentamicin	5,06
ivermektin	5,06
klozantel	5,05
mebendazol	5,00

3.5. POSTUPAK ISPITIVANJA EKOTOKSIČNOSTI

Određivanje ekotoksičnosti standardnih otopina farmaceutika i njihovih smjesa provodilo se primjenom bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* prema standardnoj metodi ISO 11348-3:2007 [5].

3.5.1. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA

Obavezna je primjena sterilne tehnike rada. Liofilizirana bakterijska kultura čuva se u ampulici na temperaturi između -18 i -20 °C. U kivetu s liofiliziranim zamrznutim bakterijama ulije se 1 do 2 mL radne otopine za resuspenziju (2 %-tna otopina natrijevog klorida). Adaptacija kulture se provodi termostatiranjem priređene suspenzije na 15 °C u trajanju od 15 min. Potom se provjerava aktivnost kulture mjereći relativnu luminiscenciju programom LU na instrumentu LUMIStox 300, a izmjerena luminiscencija mora biti između 1000 i 10 000. Suspenzija aktivne kulture se izlije na sterilnu hranjivu podlogu i razvuče cik-cak pokretima neposredno steriliziranom ezom. Kultura se čuva i održava u sterilnim Petrijevim zdjelicama s hranjivom podlogom na temperaturi 15 do 22 °C (optimalno 18 °C), a upotrebljiva je dva do devet dana od precjepljivanja (optimalno dva do četiri dana). Na **Slici 12** prikazan je hranjivi agar s luminiscentnim kolonijama bakterije *Vibrio fischeri* starim 56 h.



Slika 12. Hranjivi agar s luminiscentnim kolonijama bakterije *Vibrio fischeri* (uzgojila Kristina Kukrika, fotografirala Ivana Lujić)

3.5.2. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

Obavezna je primjena sterilne tehnike rada. U kiveta se ulije 1 do 2 mL (do 2/3 kivete) otopine za resuspenziju. Ušicom neposredno sterilizirane eze zahvati se čista kultura laganim povlačenjem po hranjivoj podlozi u duljini oko 1 cm. Kultura se potom resuspendira u prethodno pripremljenoj kiveti s otopinom za resuspenziju, a postupak se ponavlja ovisno o tome koliko je bakterijske suspenzije potrebno pripremiti, odnosno o broju mjerenja. Suspenzija se termostatira na 15 °C 15 min radi adaptacije bakterijske kulture.

3.5.3. PRIPREMA MJERENJA

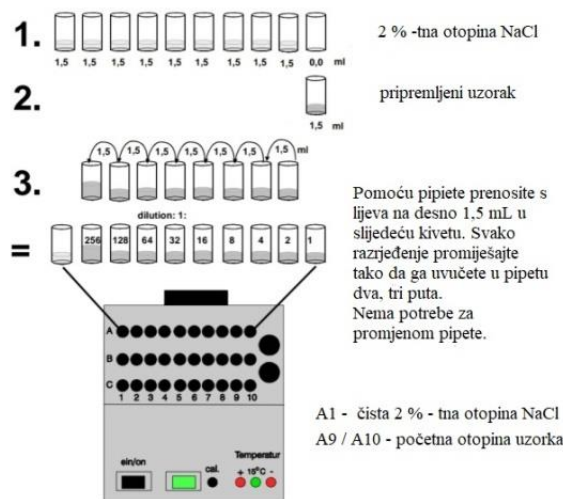
Nakon valjanih rezultata (luminiscencija između 1000 i 10 000) provjere aktivnosti bakterijske kulture, postavlja se test valjanosti bakterijske kulture koji je nužno provesti prije svakog mjerenja. U referentnu kivetu (C10) pipetira se 0,5 mL radne otopine za resuspenziju (2 %-tna otopina natrijevog klorida) i 0,5 mL inokuluma. U test kivetu (B10) pipetira se 0,5 mL otopine referentnih tvari (otopina cinkovog sulfata heptahidrata) i 0,5 mL inokuluma. Takve kivete se termostatiraju na 15 °C 15 min radi adaptacije kulture, nakon čega se pokreće SCRn program. Prvo se mjeri luminiscencija sadržaja referentne kivete (C10), a zatim testne (B10). Očitana vrijednost mora biti između 20 % i 80 % kako bi se moglo nastaviti s daljnim radom.

3.5.4. GEOMETRIJSKI NIZ RAZRJEĐENJA

Geometrijski niz razrjeđenja priprema se u A redu inkubacijskog bloka, od kivete A1 do A9. U A1 kivetu pipetira se 3 mL radne otopine za resuspenziju (2 %-tna otopina natrijevog klorida), a u A9 kivetu 3 mL radne otopine ispitivanog farmaceutika. U sve ostale kivete A reda pipetira se 1,5 mL radne otopine za resuspenziju (2 %-tna otopina natrijevog klorida). Pipetom se izuzme 1,5 mL radne otopine ispitivanog farmaceutika (A9), prebaci u kivetu A8 i homogenizira potiscima pipetora. Zatim se izuzima 1,5 mL tako homogenizirane otopine te prebacuje u slijedeću kivetu (A7). Postupak se ponavlja sve do kivete A1.

U sve preostale kivete B i C niza pipetira se 0,5 mL inokuluma.

Na **Slici 13** se nalazi shematski prikaz pripreme geometrijskog niza razrjeđenja.



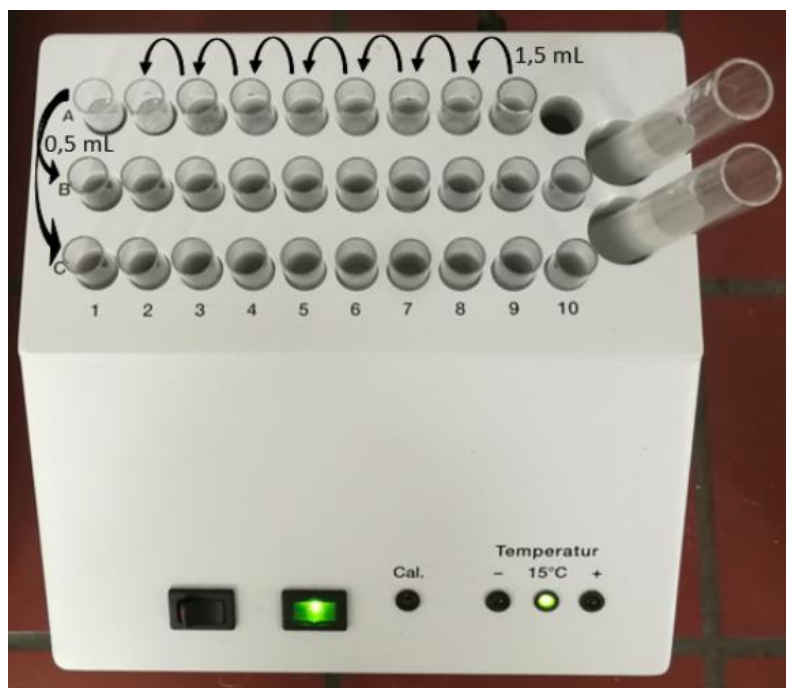
Slika 13. Shema pripreme geometrijskog niza razrjeđenja [47]

3.5.5. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA

Pokreće se program EC za mjerenje luminiscencije i namještaju odgovarajući eksperimentalni uvjeti koji su navedeni u **Tablici 8**. B1 kiveta se prva postavlja na luminometar te se očitava i zapisuje njena vrijednost, zatim se vraća u inkubacijski blok, a na luminometar se postavlja C1 kiveta. Dok uređaj mjeri luminiscenciju uzorka C1 kivete, iz kivete A1 u kivetu B1 pipetira se 0,5 mL otopine. Potom se očitava i zapisuje vrijednost C1 kivete, ona se vraća u inkubacijski blok, a na luminometar se postavlja B2 kiveta. Za to vrijeme se iz kivete A1 u kivetu C1 pipetira 0,5 mL otopine. Postupak se ponavlja sve do kraja niza. Nakon 30 min inkubacije ponovo se mjeri luminiscencija uzoraka, počevši s B1, zatim C1 pa B2 i tako redom do kraja niza. Na **Slici 14** je prikazana shema mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz, dok su u **Tablici 8** navedeni eksperimentalni uvjeti programa EC na LUMISTox 300.

Tablica 8. Eksperimentalni uvjeti programa EC na LUMISTox 300

Λ	480
dilution steps	8
type of dilution	2
unit	%
inic. conc.	100%
time ofinc.	1. 30 min 2. 0 min



Slika 14. Shematski prikaz mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz

4. REZULTATI I RASPRAVA

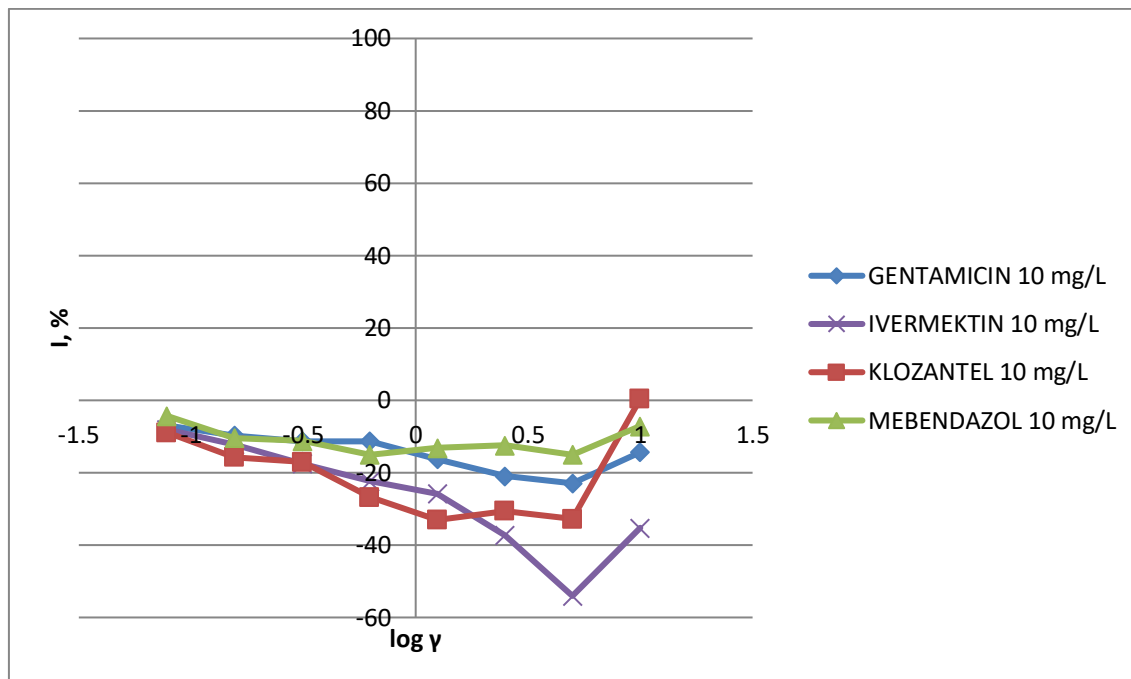
Ispitivane tvari spadaju u različite skupine lijekova široke potrošnje u humanoj i veterinarskoj praksi. U sklopu projekta *PharmaPhate* i *ReHOHMem* željelo se saznati pokazuju li te komponente toksično djelovanje na vrlo osjetljivu bakteriju *Vibrio fischeri*, kao brzog pokazatelja eventualne toksičnosti aktivnih agensa. Tijekom pokusa pratio se intenzitet luminiscencije na početku i na kraju pokusa s ciljem formiranja krivulje doza-odgovor kako bi se odredile vrijednosti EC_{20} i EC_{50} . U nastavku su navedeni ispitivani farmaceutici kao i dostupni podaci o njihovoj toksičnosti.

- Prvi ispitivani farmaceutik je gentamicin koji spada u antibiotike. Pretraživanjem literature [17] pronađeno je da intravenozna letalna doza kod miševa iznosi $LD_{50} = 52$ mg/kg, a kod štakora $LD_{50} = 96$ mg/kg.
- Drugi ispitivani farmaceutik je ivermektin koji spada u skupinu antihelmintika. Pretraživanjem literature [26] nađeno je da oralna letalna doza za miševe iznosi $LD_{50} = 29,5$ mg/kg, a za štakore $LD_{50} = 10$ mg/kg.
- Treći ispitivani farmaceutik je klozantel koji također spada u skupinu antihelmintika, a u literaturi nije pronađena informacija o toksičnosti istoga.
- Posljednji ispitivani farmaceutik je mebendazol, pripadnik grupe antihelmintika. Pretraživanjem literature [34] pronađeno je da oralna smrtonosna doza kod miševa iznosi $LD_{50} = 620$ mg/kg.

Obzirom da su u okolišu najčešće prisutne smjese kemijski tvari, a manje čiste komponente, u ovom radu ispitana je ekotoksičnost čistih komponenti, ali i njihovih smjesa. Naime, mnoga su znanstvena istraživanja pokazala da čiste komponente koje ne uzrokuju nikakve štetne učinke (NOEC) mogu uzrokovati toksičnost kada se nalaze u smjesi tvari. [48-50] Kako bi se utvrdilo postoji li sinergistički i/ili aditivni učinak ispitana je toksičnost svih mogućih smjesa ispitivanih farmaceutika.

U nastavku je dan grafički i tablični prikaz rezultata.

4.1. ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI STANDARDNIH OTOPINA FARMACEUTIKA



Slika 15. Graf toksičnosti standardnih otopina farmaceutika

Slika 15 prikazuje graf toksičnosti standardnih otopina farmaceutika početne koncentracije 10 mg/L. Svi farmaceutici pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Manje koncentracije otopina farmaceutika ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Nadalje, iz grafa je vidljivo da se krivulje toksičnosti za sva četiri farmaceutika nalaze u negativnom području inhibicije bakterijske kulture. Takvi rezultati ukazuju na povećanje luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* nakon izlaganja ispitivanim farmaceuticima. To se može tumačiti na slijedeći način, ugljik je bakterijama neophodan za rast i razvoj [52], a ispitivani farmaceutici kao ugljikovodici predstavljaju izvor istog. Drugim riječima ispitivani farmaceutici služe kao hrana bakterijskoj kulturi te uzrokuju njen rast i razvoj što rezultira porastom intenziteta bioluminiscencije. Shodno tome može se zaključiti da ispitivani farmaceutici ne utječu ekotoksično na vodeni okoliš obzirom na ispitivanja provedena na bakteriji *Vibrio fischeri*, dok obzirom na podatke pronađene u literaturi pokazuju toksičnost za miševe i štakore, ali kod značajno većih koncentracija od ovih ispitivanih za okoliš. Naime, u okolišu, a osobito u vodi očekuju se realno značajno niže koncentracije ispitivanih farmaceutika od onih koje se koriste oralnim putem u živim

organizmima poput miševa, štakora i ljudi što je uvjetovano različitim reakcija u metabolizmu navedenih organizama.

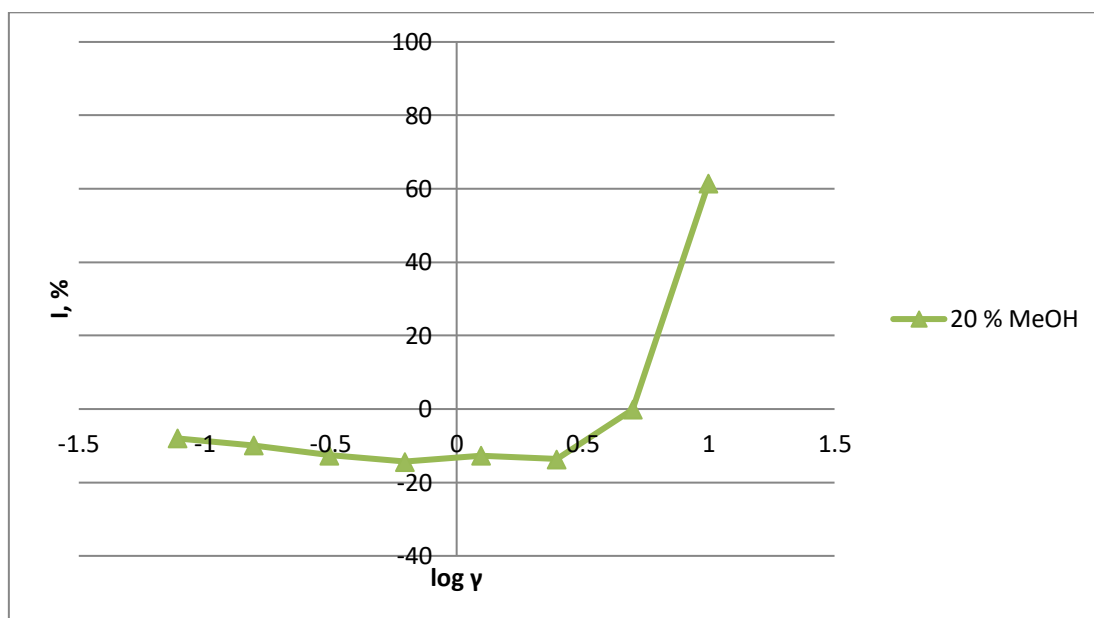
4.2. ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI SMJESA

FARMACEUTIKA

Binarne, ternarne i kvartarna smjesa farmaceutika pripremljene su prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5. Prilikom pripreme smjesa udio metanola u njima raste, stoga su pripremljene i slijepe probe s udjelom metanola 20 i 30 %. Ispitana je njihova toksičnost kako bi se eliminirao učinak metanola, obzirom da je metanol sam po sebi toksičan.

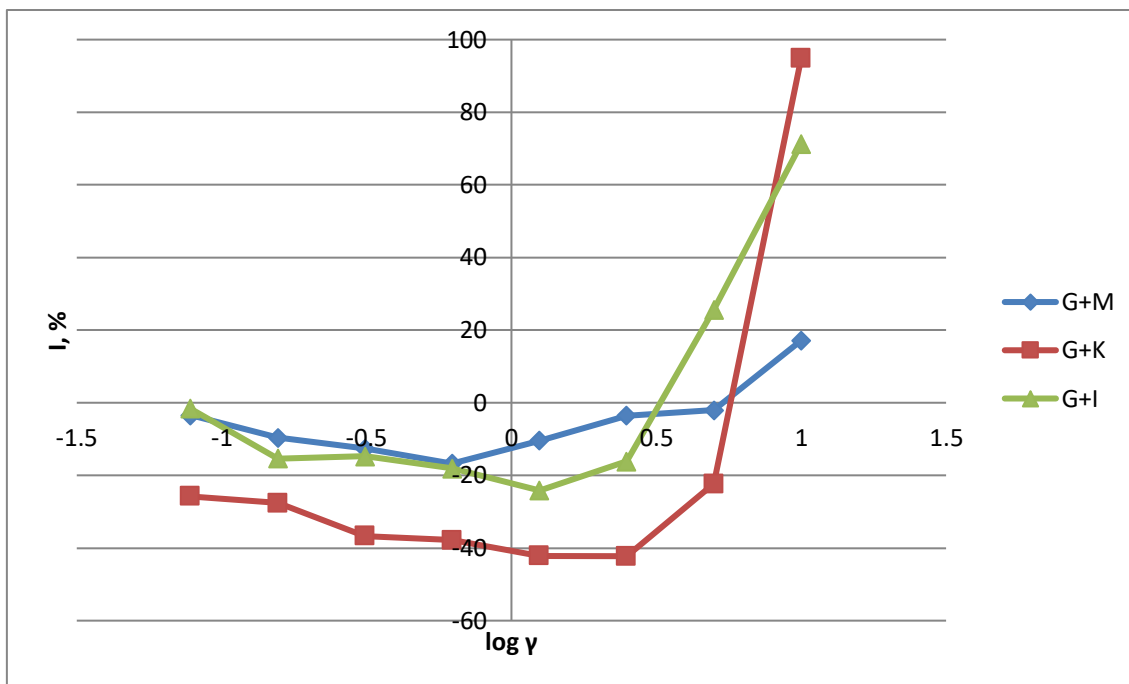
4.2.1. ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI BINARNIH SMJESA

FARMACEUTIKA



Slika 16. Graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 20 %

Slika 16 prikazuje graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 20 %. Manje koncentracije ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopine inhibicija raste. Grafički su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti te iznose $EC_{20} = 6,31$ mg/L i $EC_{50} = 8,91$ mg/L. Najveću inhibiciju bakterijske kulture izazvala je najkoncentriranija otopina i iznosila je 61,54 %.



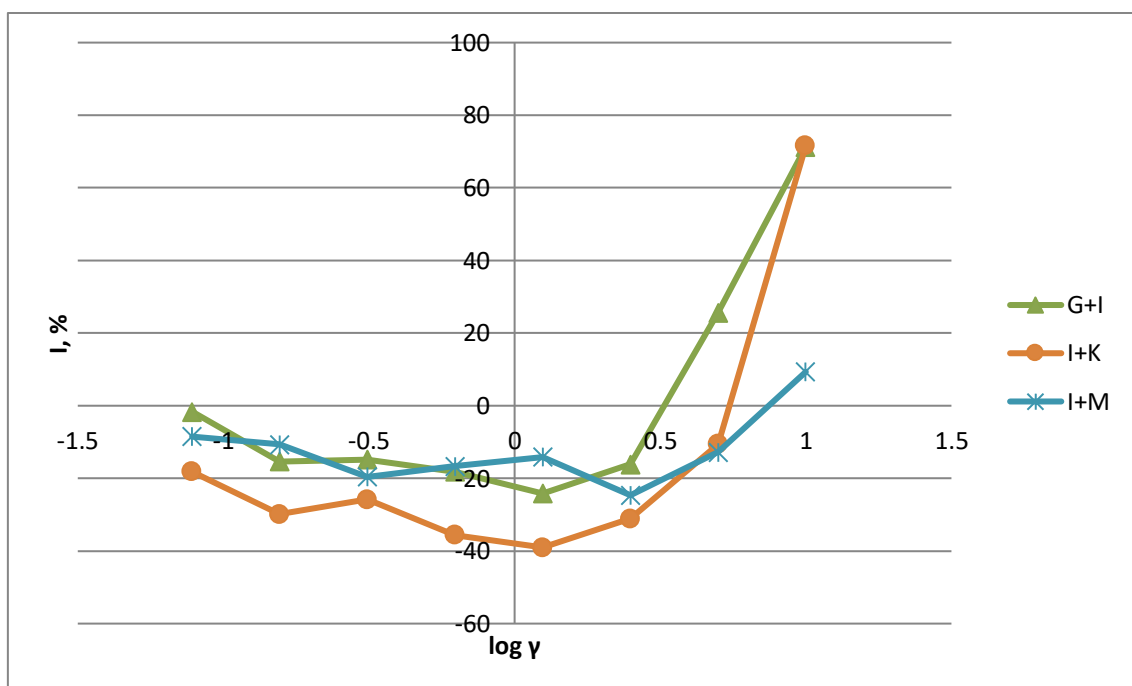
Slika 17. Graf toksičnosti binarnih smjesa gentamicina

Slika 17 prikazuje graf toksičnosti binarnih smjesa gentamicina početne koncentracije 10 mg/L. Sve smjese pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Manje koncentracije otopina ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Grafički su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti kao i maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture te su navedene u **Tablici 9**. U istoj tablici je navedena i maksimalna inhibicija bakterijske kulture nakon eliminacije učinka metanola.

Tablica 9. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese gentamicina

NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %	MAX. INHIBICIJA (NAKON ELIMINACIJE UČINKA METANOLA), %
SLIJEPA PROBA (MeOH 20 %)	6,31	8,91	61,54	-
G-I *w(MeOH)=20 %	4,57	7,08	71,32	9,78
G-K *w(MeOH)=20 %	6,31	7,59	94,86	33,32
G-M *w(MeOH)=10 %	-	-	17,15	17,15

Iz **Tablice 9** vidljivo je da je najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala smjesa gentamicina i klozantela (33,32 %), zatim smjesa gentamicina i mebendazola (17,15 %), a najmanju smjesa gentamicina i ivermektina (9,78 %). Obzirom da čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture, može se zaključiti da postoji sinergistički efekt između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi. Sinergizam je najizraženiji kod otopine gentamicina i klozantela.



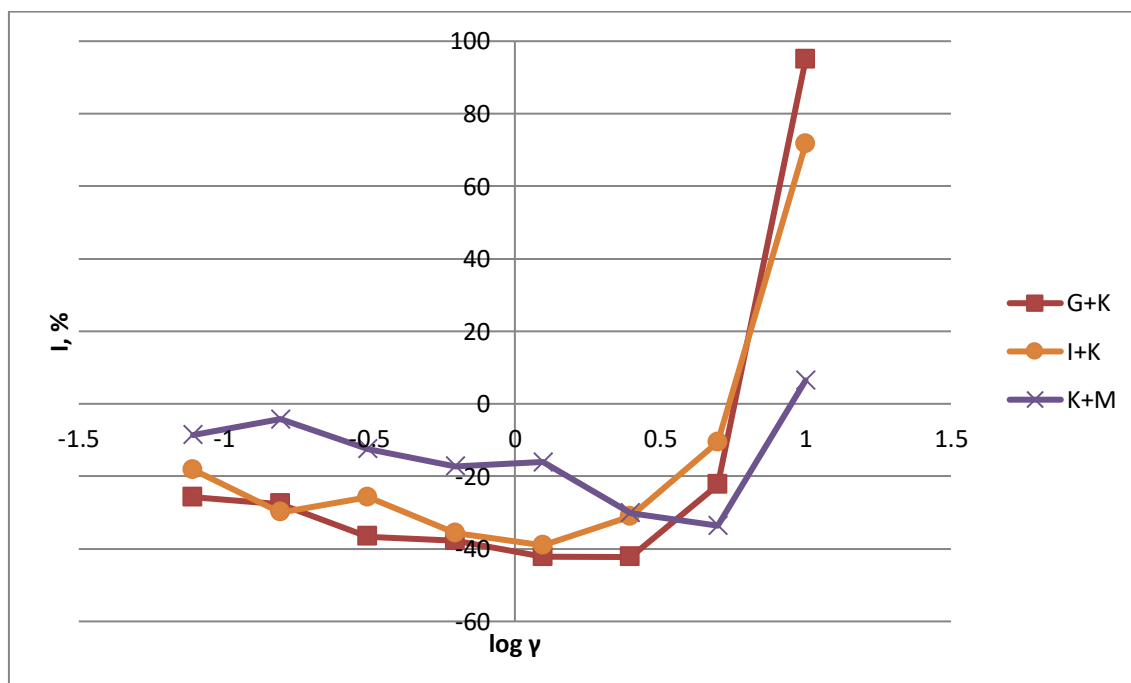
Slika 18. Graf toksičnosti binarnih smjesa ivermektina

Slika 18 prikazuje graf toksičnosti binarnih smjesa ivermektina početne koncentracije 10 mg/L. Sve smjese pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Veća razrjeđenja ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. U **Tablici 10** navedene su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture te maksimalna inhibicija bakterijske kulture nakon eliminacije učinka metanola.

Tablica 10. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese ivermektina

NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %	MAX. INHIBICIJA (NAKON ELIMINACIJE UČINKA METANOLA), %
SLIJEPA PROBA (MeOH 20 %)	6,31	8,91	61,54	-
G-I *w(MeOH)=20 %	4,57	7,08	71,36	9,82
I-K *w(MeOH)=20 %	6,31	8,51	71,61	10,07
I-M *w(MeOH)=10 %	-	-	9,33	9,33

Iz **Tablice 10** vidljivo je da je najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala smjesa ivermektina i klozantela (10,07 %), zatim smjesa gentamicina i ivermektina (9,82 %), a najmanju smjesa ivermektina i mebendazola (9,33 %). Kako čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture, rezultati ukazuju da postoji sinergija između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi, a ona je najizraženija kod smjese ivermektina i klozantela.



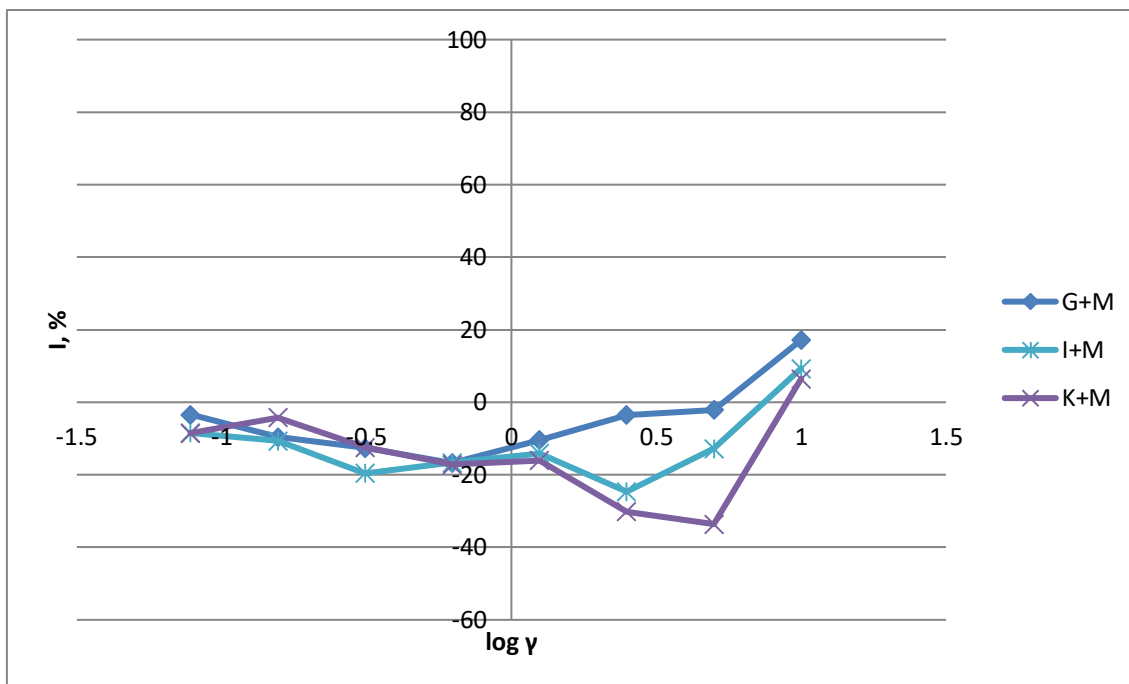
Slika 19. Graf toksičnosti binarnih smjesa klozantela

Na **Slici 19** prikazan je graf toksičnosti binarnih smjesa klozantela početne koncentracije 10 mg/L. Vidljivo je da sve smjese pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Manje koncentracije ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. U **Tablica 11** navedene su EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture te maksimalna inhibicija bakterijske kulture nakon eliminacije učinka metanola.

Tablica 11. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese klozantela

NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %	MAX. INHIBICIJA (NAKON ELIMINACIJE UČINKA METANOLA), %
SLIJEPA PROBA (MeOH 20 %)	6,31	8,91	61,54	-
G-K *w(MeOH)=20 %	6,31	7,59	94,86	33,32
I-K *w(MeOH)=20 %	6,31	8,51	71,61	10,07
K-M *w(MeOH)=10 %	-	-	6,47	6,47

Iz **Tablice 11** vidljivo je da je najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala smjesa gentamicina i klozantela (33,32 %), zatim smjesa ivermektina i klozantela (10,07 %), a najmanju smjesa klozantela i mebendazola (6,47 %). Dobiveni rezultati ukazuju na sinergistički efekt između komponenti kada se nalaze u smjesi, obzirom da čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture. Sinergija je najizraženija između gentamicina i klozantela.



Slika 20. Graf toksičnosti binarnih smjesa mebendazola

Slika 20 prikazuje graf toksičnosti binarnih smjesa mebendazola početne koncentracije 10 mg/L. Sve smjese pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Veća razrjeđenja ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Grafički su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture (**Tablica 12.**).

Tablica 12. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese mebendazola

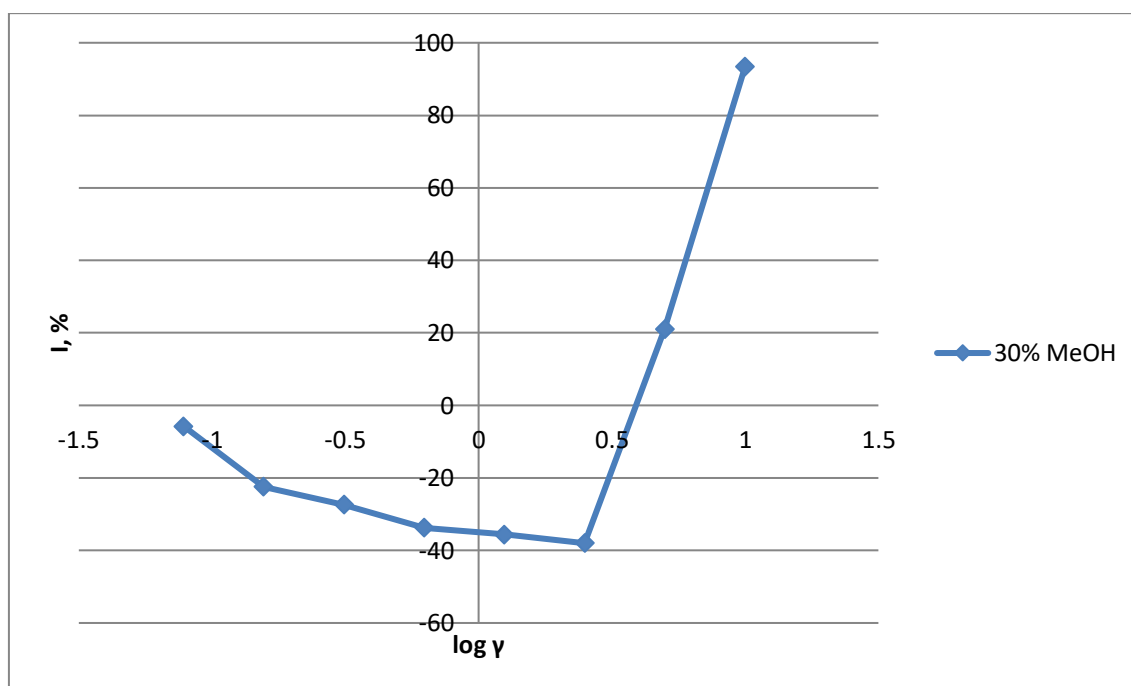
NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %
G-M *w(MeOH)=10 %	-	-	17,15
I-M *w(MeOH)=10 %	-	-	9,33
K-M *w(MeOH)=10 %	-	-	6,47

Iz **Tablice 12** vidljivo je da je najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala smjesa gentamicina i mebendazola (17,15 %), zatim smjesa ivermektina i mebendazola (9,33 %), a najmanju smjesa klozantela i mebendazola (6,47 %). Čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture stoga dobiveni rezultati ukazuju

na sinergistički efekt između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi. Sinergizam je najizraženiji kod otopine gentamicina i mebendazola.

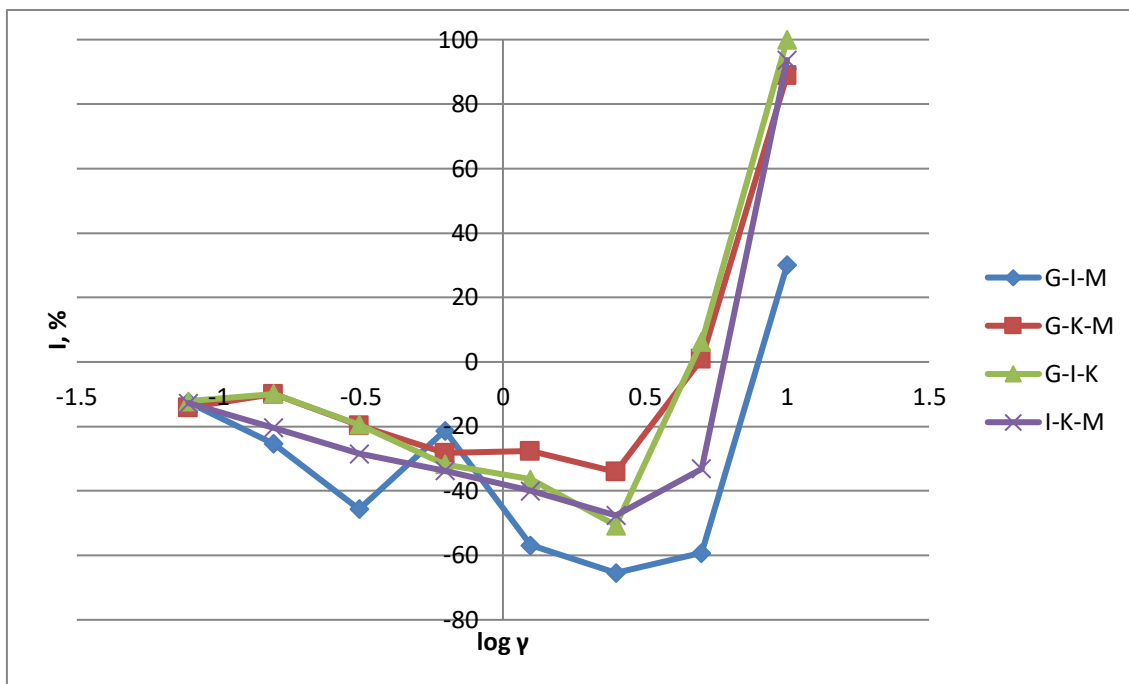
Iz dobivenih rezultata za sve binarne smjese može se zaključiti da je sinergistički efekt najizraženiji kod smjesa gentamicina, potom kod smjesa klozantela i smjesa ivermektina, a najmanje kod smjesa mebendazola.

4.2.2. ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI TERNARNIH SMJESA FARMACEUTIKA



Slika 21. Graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 30 %

Slika 21 prikazuje graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 30 %. Manje koncentracije ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopine inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Grafički su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti te iznose $EC_{20} = 5,01$ mg/L i $EC_{50} = 6,61$ mg/L. Najveću inhibiciju bakterijske kulture izazvala je najkoncentriranija otopina i iznosila je 93,44 %.



Slika 22. Graf toksičnosti ternarnih smjesa farmaceutika

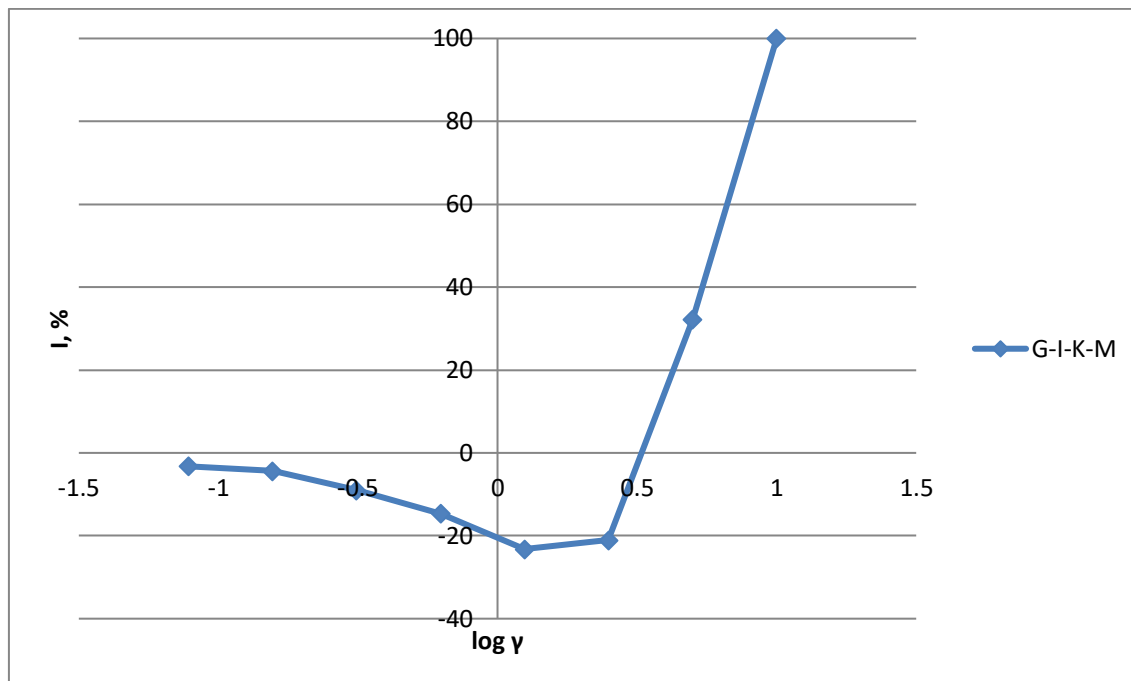
Slika 22 prikazuje graf toksičnosti ternarnih smjesa početne koncentracije 10 mg/L. Vidljivo je da sve smjese pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti s tim da kod smjese G-I-M jedna točka znatno odstupa. Manje koncentracije otopina ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. U **Tablici 13** navedene su grafički određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture te maksimalna inhibicija bakterijske kulture nakon eliminacije učinka metanola.

Tablica 13. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za ternarne smjese farmaceutika

NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %	MAX. INHIBICIJA (NAKON ELIMINACIJE UČINKA METANOLA), %
SLIJEPA PROBA (MeOH 20 %)	6,31	8,91	61,54	-
SLIJEPA PROBA (MeOH 30 %)	5,01	6,61	93,44	-
G-I-M *w(MeOH)=20 %	9,12	-	30,03	-31,51
G-K-M *w(MeOH)=20 %	5,75	7,41	88,95	27,41
G-I-K *w(MeOH)=30 %	5,50	6,92	99,94	6,50
I-K-M *w(MeOH)=20 %	6,61	7,94	93,67	32,13

Iz **Tablice 13** vidljivo je da je najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala smjesa ivermektina, klozantela i mebendazola (32,13 %), zatim smjesa gentamicina, klozantela i mebendazola (27,41 %), a najmanju smjesa gentamicina, ivermektina i klozantela (6,50 %). Kako čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture, rezultati ukazuju da postoji sinergija između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi, a ona je najizraženija kod smjese ivermektina, klozantela i mebendazola. Nakon eliminacije učinka metanola, smjesa gentamicina, ivermektina i mebendazola pokazuje negativnu vrijednost inhibicije bakterijske kulture (-31,51 %) što se može pripisati antagonističkom efektu među komponentama.

4.2.3. ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI KVARTARNE SMJESE FARMACEUTIKA



Slika 23. Graf toksičnosti kvartrane smjese farmaceutika

Na **Slici 23** prikazan je graf toksičnosti kvartrane smjese farmaceutika početne koncentracije 10 mg/L. Veća razrjeđenja ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture no kako koncentracija otopine raste inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Grafički su određene EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture te maksimalna inhibicija bakterijske kulture nakon eliminacije učinka metanola (**Tablica 14.**).

Tablica 14. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za kvartarnu smjesu farmaceutika

NAZIV SMJESE	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	MAX. INHIBICIJA, %	MAX. INHIBICIJA (NAKON ELIMINACIJE UČINKA METANOLA), %
SLIJEPA PROBA (MeOH 30 %)	5,01	6,61	93,44	-
G-I-K-M * _w (MeOH)=30 %	4,17	5,89	99,98	6,54

Iz **Tablice 14** vidljivo je da kvartarna smjesa farmaceutika izaziva inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* te ona nakon eliminacije učinka metanola iznosi 6,54 %. Čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture stoga dobiveni rezultati ukazuju na sinergistički efekt između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je određivana ekotoksičnost standardnih otopina farmaceutika (gentamicin, ivermektin, klozantel, mebendazol) te njihovih binarnih i ternarnih smjesa kao i kvartarne smjese luminiscentnom bakterijom *Vibrio fischeri*. Mjerila se promjena luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* na luminometru LUMIStox 300 u kombinaciji s inkubacijskim blokom LUMIStherm. Ispitivani se farmaceutici obzirom na način djelovanja u humanoj medicini i veterini mogu svrstati u dvije skupine, pa tako gentamicin pripada skupini antibiotika, dok ivermektin, klozantel i mebendazol pripadaju skupini antihelmintika.

1. Početna masena koncentracija standardnih otopina farmaceutika iznosila je 10 mg/L. Niti jedan farmaceutik nije izazvao inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, već suprotno – došlo je do porasta intenziteta bioluminiscencije. Shodno tome ispitivani farmaceutici ne utječu ekotoksično na vodeni okoliš nego predstavljaju izvor hrane (ugljika) bakterijskoj kulturi te uzrokuju njen rast i razvoj.
2. Binarne smjese farmaceutika, masene koncentracije 10 mg/L, pripremljene su tako da je maseni udio oba farmaceutika isti. Sve binarne smjese farmaceutika pokazuju isti trend rasta krivulje toksičnosti. Manje koncentracije otopina ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala je smjesa gentamicina i klozantela (33,32 %), a najmanju smjesa klozantela i mebendazola (6,47 %). Obzirom da čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture, može se zaključiti da postoji sinergistički učinak među ispitivanim komponentama kada se nalaze u smjesi. Sinergistički efekt je najizraženiji kod smjesa gentamicina, potom kod smjesa klozantela i smjesa ivermektina, a najmanje kod smjesa mebendazola.
3. Ternarne smjese farmaceutika, masene koncentracije 10 mg/L, pripremljene su tako da je maseni udio sva tri farmaceutika isti. Zamijećen je isti trend rasta krivulje toksičnosti kod svih ternarnih smjesa farmaceutika. Veća razrjeđenja ne uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture, a kako koncentracija otopina raste inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* izazvala je smjesa ivermektina, klozantela i mebendazola (32,13 %), a najmanju smjesa gentamicina, ivermektina i klozantela (6,50 %). Kako čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture, rezultati ukazuju da postoji sinergija

između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi. Jedino smjesa gentamicina, ivermektina i mebendazola pokazuje antagonistički efekt među komponentama.

4. Kwartarna smjesa farmaceutika, masene koncentracije 10 mg/L, pripravljena je tako da je maseni udio sva četiri farmaceutika isti. Manje koncentracije otopine farmaceutika ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, no kako koncentracija otopine raste inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Kwartarna smjesa farmaceutika izazvala je inhibiciju 6,54 % bakterijske kulture *Vibrio fischeri* što ukazuje na sinergiju među ispitivanim komponentama obzirom da čiste komponente nisu izazvale inhibiciju iste.

Na kraju, važno je naglasiti da su u okolišu najčešće prisutne smjese tvari te su neophodna daljnja istraživanja sinergističkog učinka istih radi bolje procjene njihovog utjecaja na ekosustav.

"She believed she could, so she did!"

6. ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ponuđenoj temi, stručnom vodstvu, trudu i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem kolegici Bruni Babić na prenesenom znanju, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem mojim roditeljima i obitelji na odgoju, trudu, podršci, bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju i pomoći koju mi pružaju.

Za kraj, veliko hvala mojoj prijateljici Kristini koja mi je bila velika podrška tijekom cjelokupnog dosadašnjeg studiranja i pisanja ovog rada.

7. LITERATURA

- [1] **Kaštelan-Macan, M., Petrović, M.**, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str. 51-103, 346, 418
- [2] **EvaluatePharma**, World Preview 2019, Outlook to 2024, 12th Edition, lipanj 2019, str. 3-5
- [3] **Zrnčević, S.**, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode, Vol. 24, No. 96, 2016., str. 119-130
- [4] **Kim, J., Kim, S., & Schaumann, G. E.**, Reliable predictive computational toxicology methods for mixture toxicity: toward the development of innovative integrated models for environmental risk assessment, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2012., 12(3), str. 235-256
- [5] **International-Standard (ISO 11348-1)**, Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria, 2007.
- [6] **Farré, M., Ašperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrović, M., Barceló, D.**, Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in waste water based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 390, 2008., str. 1999-2073
- [7] **Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M.**, *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, Science of The Total Environment, 626, 2018., str. 1295-1309.
- [8] **ATC classification system**, https://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [9] **WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology**, Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013; 16th edition, Oslo, 2012.
- [10] **Silvia Diaz-Cruz, M., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D.**, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, TrAC-Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, 2003., str. 342

- [11] **Straand, J., Gradmann, C., Lindbæk, M., Simonsen, G. S.**, Antibiotic Development and Resistance, International Encyclopedia of Public Health, 2017., str. 129-139
- [12] **Bury-Moné, S.**, Antibacterial Therapeutic Agents, Reference Module in Biomedical Sciences, 2014., str. 1-13
- [13] **Kalenić, S., Bedenić, B.**, Antibakterijski lijekovi, Medicinska mikrobiologija, Zagreb: Medicinska naklada, 2013. str. 97-116
- [14] **Bedenić, B.**, Antibakterijski lijekovi, Medicinska mikrobiologija, S. Uzunović-Kamberović, Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o, 2009. str. 221-252
- [15] **Grebenar, D., Sve o antibioticima**, <https://www.farmacia.hr/farmacia-preporucuje/clanci/57/sve-o-antibioticima/>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [16] **Scholar, E.**, Gentamicin, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007., str. 1-6
- [17] **Gentamicin**, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [18] **Baxter Corporation**, Gentamicin(e) Product Monograph, str. 1-39, [https://web.archive.org/web/20160304124731/http://www.baxter.ca/en/downloads/product_information/GENTAMICIN\(E\)_PM_AUG282012_EN.pdf](https://web.archive.org/web/20160304124731/http://www.baxter.ca/en/downloads/product_information/GENTAMICIN(E)_PM_AUG282012_EN.pdf), (pristupljeno srpanj 2020.)
- [19] **Crosby, N. T.**, Determination of veterinary residues in food, Woodhead Publishing Limited, 20057, str. 240-245
- [20] **Horvat, A. J .M., Babić, S., Pavlović, D. M., Ašperger, D., Pelko, S., Kaštelan – Macan, M., Petrović, M., Mance, A. D.**, Analysis, occurrence and fate of antihelmintics and their transformation products in the environment, TrAC-Trends in Analytical Chemistry, Vol. 31, 2012, str. 61-63
- [21] **Antihelmitnici**, Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2954>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [22] **Ashour, D. S.**, Ivermectin: from theory to clinical application., International Journal of Antimicrobial Agents, Vol.54, 2019., str. 134-142
- [23] **Howard, B.**, Ivermectin, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007., str. 1-5

- [24] **Ivermectin**, Meyler's Side Effects of Drugs, 2016., str. 379–390
- [25] **Ivermektin**, <http://www.vetzavod.com/proizvodni-portfolio/proizvodi/ivermektin-s>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [26] **Ivermectin**, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00602>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [27] **Novobilský, A., Höglund, J.**, First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle, International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, Vol. 5, Issue 3, 2015, str.172-173
- [28] **Closantel**, <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/CLOSANTEL.htm>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [29] **Closantel**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Closantel#section=2D-Structure>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [30] **Triclabendazole**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049013>, (pristupljeno srpanj 2020.)
- [31] **Kuhlmann, F. M., Fleckenstein, J. M.**, Antiparasitic agents, Infectious Diseases, Elsevier, 4th Edition, 2017., str. 1371
- [32] **Al-Badr, A. A., Tariq, M.**, Mebendazole, Analytical Profiles of Drug Substances, 16, 1987., str. 291-326
- [33] **Mebendazole and flubendazole**, Meyler's Side Effects of Drugs, 2016., 776–778.
- [34] **Mebendazole**, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00643>, (pristupljeno lipanj 2019.)
- [35] **Svojstva gentamicina**: EPI Suite™ - Estimation Program Interfacev4.11
- [36] **Svojstva closantela**: EPI Suite™ - Estimation Program Interfacev4.11
- [37] **Svojstva mebendazola**: EPI Suite™ - Estimation Program Interfacev4.11
- [38] **Pope, C. N., Schlenk, D., Baud, F. J.**, History and basic concepts of toxicology; Belden, J., Introduction to ecotoxicology; Scott, J., Minghetti, M., Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology, u: Pope, C. N., Liu, J., An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, 2020., str. 3-15, 381-393, 477-486

- [39] **Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J.**, Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials, 2017., str. 51-82
- [40] **Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B.**, Development of In Vitro Toxicology, In Vitro Toxicology, 2018., str. 1-19
- [41] **Fahd, F., Khan, F., Veitch, B., Yang, M.**, Aquatic ecotoxicological models and their applicability in Arctic regions, Marine Pollution Bulletin, 120, 2017., str. 428-437
- [42] **McCarty, L. S., Borgert, C. J., Posthuma, L.**, The regulatory challenge of chemicals in the environment: Toxicity testing, risk assessment, and decision-making models, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 99, 2018., str. 289-295
- [43] **Eaton, D. L., Gilbert, S. G.**, Principles of Toxicology i Faustman, E. M., Omenn, G. S., Risk Assessmentu, u: Klaassen, C. D., Toxicology, 8th, 2013., str. 13-49, 133
- [44] **Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C.**, Predictive Ecotoxicology and Environmental Assessment. Aquatic Ecotoxicology, 2015., str. 463-496
- [45] **Mann, E. L., Kroutil, E.**, Determining Bacterial Growth Rates Using Flow Cytometry: An Educational Exercise, 2015., str. 1
- [46] **Gagné, F.**, Toxicity and disruption of quorum sensing in *Aliivibrio fisheri* by environmental chemicals: Impacts of selected contaminants and microplastics, Journal of Xenobiotics, 7, 2017., str. 15-20
- [47] **Dr. Bruno LangeGmbH**, LUMISTox 300 Operating Manual, Germany, 1999., str. 4,36
- [48] **Altenburger, R., Nendza, M., Schüürmann, G.**, Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships, Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 2003., str. 1900-1915
- [49] **Vighi, M., Altenburger, R., Arrhenius, A., Backhaus, T., Bödeker W., Blanck H., Consolaro, F., Faust, M., Finizio, A., Froehner, K., Gramatica, P., Grimme, L. H., Grönvall, F., Hamer, V., Scholze, M., Walter, H.**, Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives, Environmental Toxicology and Chemistry, 2003., 54:139-150

[50] **Breitholtz, M., Nyholm, J. R., Karlsson, J., Andersson, P. L.**, Are individual NOEC levels safe for mixtures? - A study on mixture toxicity of brominated flame-retardants in the copepod *Nitocra spinipes*, *Chemosphere*, 2008., 72:1242–1249

[51] **Puckowski, A., Stolte, S., Wagil, M., Markiewicz, M., Łukaszewicz, P., Stepnowski, P., Białk-Bielińska, A.**, Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(3), 2017., str. 575-582

[52] **Duraković, S.**, Opća mikrobiologija, VII. Mikrobni rast, uzgoj i metabolizam, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996., str. 299-373

8. DODACI

8.1. POPIS SLIKA

Slika 1. ATK klasifikacija lijekova

Slika 2. Glavni tokovi farmaceutika u okolišu

Slika 3. Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu

Slika 4. Strukturna formula gentamicina

Slika 5. Strukturna formula ivermektina

Slika 6. Strukturna formula klozantela

Slika 7. Strukturna formula mebendazola

Slika 8. Općenita krivulja doza-odgovor

Slika 9. Mikrofotografija bakterije *Vibrio fischeri*

Slika 10. LUMIStox 300 s inkubacijskim blokom LUMIStherm

Slika 11. Prijenosni autoklav

Slika 12. Hranjivi agar s luminiscentnim kolonijama bakterije *Vibrio fischeri*
(uzgojila Kristina Kukrika, fotografirala Ivana Lujić)

Slika 13. Shema pripreme geometrijskog niza razrjeđenja

Slika 14. Shematski prikaz mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz

Slika 15. Graf toksičnosti standardnih otopina farmaceutika

Slika 16. Graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 20 %

Slika 17. Graf toksičnosti binarnih smjesa gentamicina

Slika 18. Graf toksičnosti binarnih smjesa ivermektina

Slika 19. Graf toksičnosti binarnih smjesa klozantela

Slika 20. Graf toksičnosti binarnih smjesa mebendazola

Slika 21. Graf toksičnosti slijepe probe s udjelom metanola 30 %

Slika 22. Graf toksičnosti ternarnih smjesa farmaceutika

Slika 23. Graf toksičnosti kvartrane smjese farmaceutika

8.2. POPIS TABLICA

Tablica 1. Fizikalno–kemijska svojstva ispitivanih farmaceutika

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Tablica 3. Popis ispitivanih farmaceutika

Tablica 4. Abecedni popis sastojaka hranjive podloge

Tablica 5. Abecedni popis sastojaka otopine za resuspenziju

Tablica 6. Popis ispitivanih smjesa

Tablica 7. Odvage farmaceutika na preciznoj analitičkoj vagi

Tablica 8. Eksperimentalni uvjeti programa EC na LUMIStox 300

Tablica 9. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese gentamicina

Tablica 10. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese ivermektina

Tablica 11. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese klozantela

Tablica 12. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za binarne smjese mebendazola

Tablica 13. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za ternarne smjese farmaceutika

Tablica 14. Očitane vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te maksimalna vrijednost inhibicije bakterijske kulture za kvartarnu smjesu farmaceutika

9. SAŽETAK

ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI STANDARDNIH OTOPINA FARMACEUTIKA TE NJIHOVIH BINARNIH, TERNARNIH I KVARTARNIH SMJESA BAKTERIJOM

Vibrio fischeri

Posljednjih godina bilježi se stalni rast broja oboljelih i broja novih bolesti, što za posljedicu ima sve veću potrošnju farmaceutika. Procjena rizika utjecaja farmaceutski aktivnih tvari na okoliš uglavnom je usmjerena na analizu učinka čistih tvari, a manje na njihove smjese, iako su upravo smjese najčešće prisutne u okolišu. Problem sa smjesama tvari je mogućnost pojave sinergizma odnosno povećanja toksičnosti u odnosu na zasebne komponente.

U ovom je radu ispitivana ekotoksičnost standardnih otopina gentamicina, ivermektina, klozantela i mebendazola te njihovih binarnih, ternarnih i kvartarne smjese. Ekotoksičnost je ispitivana prema standardnoj metodi ISO 11348-3:2007 primjenom luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* koja je osjetljiva na organske onečišćujuće tvari.

Zamijećen je isti trend rasta krivulje toksičnosti kod svih ispitivanih farmaceutika i njihovih smjesa. Manje koncentracije otopina ne izazivaju inhibiciju bakterijske kulture, a povećanjem koncentracije otopina inhibicija prvo počinje padati, a zatim rasti. Standardne otopine farmaceutika nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, već su se pokazale pogodnim za rast i razvoj bakterijske kulture. Sve binarne smjese su izazvale inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, a najveću je izazvala smjesa gentamicina i klozantela (33,32 %). Od ternarnih smjesa farmaceutika, smjesa ivermektina, klozantela i mebendazola je uzrokovala najveću inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* te je iznosila 32,13 %. Kvartarna smjesa farmaceutika izazvala je inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri* u visini 6,54 %. Obzirom da čiste komponente nisu izazvale inhibiciju bakterijske kulture dobiveni rezultati ukazuju na sinergistički učinak između ispitivanih komponenti kada se nalaze u smjesi. Jedino je smjesa gentamicina, ivermektina i mebendazola pokazala antagonistički učinak među komponentama.

Važno je naglasiti da su neophodna daljnja istraživanja sinergističkog učinka smjesa tvari radi bolje procjene njihovog utjecaja na ekosustav.

Ključne riječi: *farmaceutici, ekotoksičnost, Vibrio fischeri, sinergistički učinak*

10. ABSTRACT

ECOTOXICITY DETERMINATION FOR STANDARD SOLUTIONS OF PHARMACEUTICALS AND THEIR BINARY, TERNARY AND QUARTAR MIXTURES BY BACTERIA *Vibrio fischeri*

In recent years, there has been a steady increase in the number of patients and the number of new diseases, which has resulted in an increasing consumption of pharmaceuticals. The risk assessment of the impact of pharmaceutically active substances on the environment is mainly focused on the analysis of the effect of pure substances, and less on their mixtures, although mixtures are most often present in the environment. The problem with mixtures is the possibility of synergism - increase of toxicity in regard to individual components.

In this paper, the ecotoxicity of standard solutions of gentamicin, ivermectin, closantel and mebendazole and their binary, ternary and quaternary mixtures was tested. Ecotoxicity was tested according to the standard method ISO 11348-3:2007 using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* which is sensitive to organic pollutants.

The same growth trend of the toxicity curve was observed in all tested pharmaceuticals and their mixtures. Lower concentrations of solutions do not cause inhibition of bacterial culture, and with increasing concentration of solutions inhibition first begins to fall and then to rise. Pharmaceutical standard solutions did not inhibit the bacterial culture of *Vibrio fischeri*, but proved to be suitable for the growth and development of bacterial culture. All binary mixtures caused inhibition of the bacterial culture *Vibrio fischeri*, and the largest was caused by a mixture of gentamicin and closantel (33.32 %). From ternary mixtures of pharmaceuticals, the mixture of ivermectin, closantel and mebendazole caused the greatest inhibition of the bacterial culture of *Vibrio fischeri* and it amounted to 32.13 %. The quaternary mixture of pharmaceuticals caused an inhibition of the bacterial culture of *Vibrio fischeri* in the amount of 6.54 %. Since the pure components did not cause bacterial culture inhibition, the results indicate a synergistic effect between the tested components when they are present in the mixture. Only a mixture of gentamicin, ivermectin and mebendazole showed an antagonistic effect among the components.

It is important to emphasize that further research on the synergistic effect of mixtures is necessary in order to better assess their impact on the ecosystem.

Keywords: *pharmaceuticals, ecotoxicity, Vibrio fischeri, synergistic effect*

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Kukrika rođena je 15. listopada 1995. godine u Zagrebu, gdje završava Osnovnu školu Vrbani i V. gimnaziju s odličnim uspjehom. Pohađala je školu stranih jezika Nova Varšavska te 2013. godine stječe certifikat TEEN 5 – CEF – level B2.2 za engleski jezik. Godinu dana kasnije, upisuje se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije kao redovita studentica sveučilišnog preddiplomskog studija Ekoinženjerstva, a 2016. godine mijenja studij te upisuje sveučilišni preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva. Stručnu praksu odradila je u Plivi, na odjelu Kontrole kvalitete. U travnju 2019. godine sudjeluje na Festivalu znanosti asistirajući na radionici "Čokolada = valovi užitka". Iste godine je dobila dekanovu nagradu za znanstveno istraživački rad "Određivanje biogenih elemenata u hrvatskim čokoladama ultrazvučnim raščinjavanjem i ICP-OES analizom". U veljači 2020. predstavlja svoj završni rad posterskim izlaganjem na XIII. Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu. Trenutno je studentica I. godine sveučilišnog diplomskog studija Kemijsko inženjerstvo – modul Kemijske tehnologije i proizvodi. Tečno govori engleski jezik te se dobro služi njemačkim jezikom.