

## ASSESSMENT OF SELECTED PHARMACEUTICALS TOXICITY WITH *GAMMARUS VARSOVIENSIS* ASSAY

### OCENA WPŁYWU WYBRANYCH LEKÓW NA SKORUPIAKA *GAMMARUS VARSOVIENSIS*

#### ABSTRACT

The problem of pollution of aquatic environment by pharmaceuticals and their metabolites is not enough known and appreciated in Poland. Presence of drugs in water, even in small concentration, can carry real consequences for aquatic organisms, disturb biological balance in ecosystem and even it can have an impact on a human health. Many active substances contained in pharmaceuticals are degrading very slowly in aquatic environment. Due to their lipophilicity, they can easily accumulate in tissues of aquatic organisms. In the aquatic ecosystems drugs occur in mixtures with other substances, what makes difficulties in proper assessment of their real impact on the environment. Indeed, these compounds may mutually induce or suppress their toxic effects.

During presented research were used occurring in flowing waters crustaceans *Gammarus varsoviensis*. The aim of this study was to comprehensively evaluate the usefulness of scuds as bioindicators of water pollution by drugs. Fluoxetine (antidepressant), propranolol (antiarrhythmic drug) and various mixtures thereof are used in the research.

During the research the acute toxicity of mentioned substances were analyzed – according to Polish Standard. The growing relationship between the mortality of tested organisms and the concentration of tested compounds was established. The increase of toxicity of the tested drugs in its mixture was also observed.

## STRESZCZENIE

Problem zanieczyszczenia środowiska wodnego przez farmaceutyki nie jest wystarczająco znany w Polsce. Tymczasem obecność leków w wodzie, nawet w małym stężeniu, może negatywnie oddziaływać na organizmy wodne, zakłócić równowagę biologiczną w ekosystemie. Wiele substancji czynnych farmaceutyków degradowane bardzo powoli w środowisku wodnym. Ponadto ze względu na ich lipofilowość łatwo gromadzą się w tkankach organizmów wodnych. Leki w środowisku wodnym występują w postaci mieszanin, których efekt działania jest trudny do oceny w badaniach ekotoksykologicznych pojedynczych substancji.

Praca obejmowała swoim zakresem badania toksyczności ostrej fluoksetyny, propranololu i ich mieszanin w różnych stężeniach dla skorupiaka *Gammarus varsoviensis*. Badanie wykonane było na podstawie normy PN-89 C-04610/06 Woda i ścieki – „Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczenie toksyczności ostrej na kielzu *Gammarus varsoviensis* Jażdż.”. Badania wskazały na 10-krotnie większą toksyczność fluoksetyny niż propranololu. Badane mieszaniny zwiększają efekt toksyczny w porównaniu z pojedynczymi związkami.

**KEYWORDS:** *pharmaceuticals in the environment, Gammarus varsoviensis, toxicity of mixtures*

**SŁOWA KLUCZOWE:** *leki w środowisku, Gammarus varsoviensis, toksyczność mieszanin*

## WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich dziesięcioleci obserwuje się gwałtowny wzrost liczby substancji farmaceutycznych dopuszczonych do użytku przez człowieka. Co roku tysiące ton leków stosowanych jest w medycynie i weterynarii na całym świecie. W Polsce, w porównaniu z innymi krajami europejskimi, konsumpcja farmaceutyków jest stosunkowo wysoka i nadal rośnie. Jednakże zagrożenie, jakie one stanowią dla środowiska, nie zostało dotychczas w pełni określone. Problem zanieczyszczenia wód powierzchniowych ww. związkami nadal istnieje. Farmaceutyki wprowadzane są do ekosystemów wodnych różnymi drogami. Dane literaturowe wskazują, że najważniejszym źródłem zanieczyszczenia środowiska lekami i ich metabolitami są ścieki szpitalne i komunalne, zawierające substancje wydalane przez pacjentów. Z uwagi na stosunkowo wysoką hydrofilność związki te nie ulegają eliminacji podczas standardowego procesu oczyszczania ścieków, a w konsekwencji docierają do wód powierzchniowych, w tym wód wykorzystywanych jako źródło wody pitnej (Giebułto-

wicz i Nałęcz-Jawecki, 2014; Dietrich i in., 2002; Heberer, 2002; Zuccato i in., 2001; Zwiener i in., 2001; Kummerer, 2001; Scheytt i in., 2000; Jorgensen i Halling-Sorensen, 2000; Halling-Sorensen i in., 1998; Ternes, 1998; Buser i in., 1999; 1998a; 1998b). W wodach Wisły w okolicach Warszawy maksymalne stężenia farmaceutyków obserwowano na stanowisku w oczyszczonych ściekach z oczyszczalni Czajka, w niektórych przypadkach przekraczały one 1000 ng/l (Drobniewska i in., 2015; Giebułtowicz i Nałęcz-Jawecki, 2014).

Już pierwsze badania pokazały, że niektóre substancje farmaceutyczne wykazują toksyczność ostrą dla organizmów wodnych w stężeniach poniżej 1 mg l<sup>-1</sup>, co klasyfikowało je zgodnie z dyrektywą UE 93/67/EEC (93/67/EEC) do związków bardzo toksycznych dla organizmów wodnych (Kahru i Borchartd, 1994; Canton i in., 1991; Calleya i in., 1994; Ekwall, 1998; 2000).

Konieczne zatem wydaje się rozwinięcie badań służących poznaniu wpływu farmaceutyków na środowisko przyrodnicze i w konsekwencji na człowieka. Jest to tym bardziej istotne, iż Polska jest zobowiązana wdrożyć Ramową Dyrektywę Wodną (Dyrektywa 2000/60/WE) i tym samym osiągnąć dobry stan ekologiczny wód powierzchniowych, co możliwe jest tylko przy właściwym rozpoznaniu skali wpływu jak największej ilości zanieczyszczeń na środowisko i wypracowaniu właściwych metod badawczych. Narastające zagrożenie związane z przedostawaniem się substancji farmakologicznych do środowiska zostało zauważone także przez prawodawców unijnych. Z dniem 20 marca 2015 r. na mocy Decyzji Wykonawczej Komisji, ustanawiającej listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania, obejmującego całą Unię, w zakresie polityki wodnej na podstawie Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE, kraje UE zobowiązane są do monitorowania obecności w wodach wskazanych w załączniku farmaceutyków (Decyzja Wykonawcza Komisji, 2015).

## **PRZEMIANY I BIOAKUMULACJA LEKÓW W ŚRODOWISKU WODNYM**

Leki w środowisku wodnym ulegają wielu procesom, dzięki którym ich stężenie może się zmniejszać. Proces ten zachodzi w różnym stopniu i czasie w zależności od związku. Rozkład leków może zachodzić całkowicie, prowadząc do powstania dwutlenku węgla, lecz znacznie częściej produktami degradacji

są związki bardziej podobne do macierzystych (Warren i in., 2003). Substancje lecznicze po dostaniu się do wody ulegają sorpcji i desorpcji w osadach dennych, gdzie mogą dodatkowo ulegać biodegradacji pod wpływem organizmów tam bytujących. Leki oprócz biodegradacji mogą również zostać zasocjowane (ulec absorpcji lub adsorpcji) na cząstkach zawieszonych w wodzie i być przenoszone nawet na duże odległości (proces ten dotyczy szczególnie substancji hydrofobowych), a także ulec rozkładowi pod wpływem czynników abiotycznych.

Substancje lecznicze mogą w wodzie występować w różnych formach: jako faza rozpuszczona bądź faza koloidalna oraz jako faza zasocjowana z osadami. Oczywiście związki te mogą przechodzić z fazy do fazy (Warren i in., 2003).

Dużą zdolność do degradacji związków organicznych wykazują osady dennie, z uwagi na występowanie w nich dużej liczby bakterii. Szybkość tego rozkładu zależy od dostępności tlenu i jest wolniejsza w głębszych beztlenowych warstwach osadu (Warren i in., 2003). Leki stanowią zróżnicowaną grupę związków. Ze względu na wysoką polarność, niską lotność bądź dużą lipofilność (Skrzypczak, 2012) łatwo są transportowane w środowisku wodnym oraz mają dużą zdolność do bioakumulacji w tkankach i dalszej biomagnifikacji w kolejnych etapach łańcucha pokarmowego (Santos i in., 2010; Warren i in., 2003). Problem biomagnifikacji może dotyczyć także ludzi, którzy spożywają ryby i inne morskie organizmy, kumulujące leki w swoich tkankach (Touraud i in., 2011).

## KONSEKWENCJE EKOLOGICZNE OBECNOŚCI LEKÓW W WODZIE

Organizmy wodne w znacznie większym stopniu niż człowiek narażone są na zanieczyszczenia wód lekami, gdyż stężenia leków w wodzie powierzchniowej mogą być o kilka rzędów wyższe, niż te mierzone w wodzie pitnej (Sosnowska i in., 2009; Touraud i in., 2011). Często poruszonym problemem jest obecność naturalnych i syntetycznych hormonów płciowych, które mogą powodować feminizację organizmów (Santos i in., 2010), prowadząc w konsekwencji do zmniejszenia liczby osobników, a nawet zmniejszenia różnorodności biologicznej. Oprócz powyżej wspomnianego problemu estrogeny mogą zaburzać komunikację za pomocą feromonów, poprzez formowanie kości czy homeostazę wapniową u ryb (Santos i in., 2010). W mocno zanieczyszczonych

wodach mogą się pojawiać osobniki hermafrodytyczne (Mazurová i in., 2010). Większość leków ma dużą zdolność do dystrybucji do tkanek i akumulacji w tych tkankach, co często powoduje liczne zmiany cytologiczne i histopatologiczne (Santos i in., 2010). Oprócz bioakumulacji duży problem stanowi biomagnifikacja tych związków na kolejnych poziomach łańcucha pokarmowego.

Kolejnym problemem, na który ostatnio zwraca się uwagę, jest możliwość wytworzenia oporności bakterii na antybiotyki dostające się do wód powierzchniowych (Santos i in., 2010). Antybiotyki i chemioterapeutyki mogą stanowić duże zagrożenie dla oczyszczalni ścieków, w których wykorzystuje się metody mikrobiologiczne oczyszczania wody, gdyż powodują zmniejszenie skuteczności tych procesów (Santos i in., 2010). Dla kręgowców związku te wydają się natomiast nieszkodliwe, nawet w wysokich stężeniach (Santos i in., 2010).

Bardzo trudno jest jednak oszacować faktyczną toksyczność farmaceutyków i ich wpływ na środowisko wodne, gdyż na całkowity efekt toksyczny wpływ ma wiele różnych czynników, między innymi współwystępowanie innych substancji toksycznych, działanie mieszanin. Jest to o tyle istotne, iż leki w środowisku wodnym występują w postaci mieszanin, których efekt działania jest trudny do oceny w badaniach ekotoksykologicznych pojedynczych substancji (Calisto i Esteves, 2009; Touraud i in., 2011). Wzajemne oddziaływanie leków można określić jako: 1) synergistyczne, gdy efekt toksyczny mieszaniny jest większy od sumarycznego efektu poszczególnych składników, 2) antagonistyczne, gdy efekt mieszaniny jest niższy, 3) neutralne, gdy notuje się toksyczność tylko jednego składnika, oraz 4) addytywne, gdy efekty poszczególnych składników się sumują (Wiącek-Rosińska, 2008). Badania nad toksycznością mieszanin są nową dziedziną w ekotoksykologii (Touraud i in., 2011) i stanowią istotny element oceny stanu środowiska.

## **SUBSTANCJE WYBRANE DO BADAŃ, ICH OBECNOŚĆ I LOSY W WODZIE**

Substancje przeciwdepresyjne należą do ośmiu najważniejszych grup leków i jednych z najbardziej niebezpiecznych dla środowiska (Calisto i Esteves, 2009). W niniejszej pracy jako przedstawiciela tej grupy leków wybrano fluoksetynę. Należy ona do grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego

serotoniny i stosowana jest w leczeniu depresji oraz zaburzeń lękowych (Calisto i Esteves, 2009; Paterson i Metcalfe, 2008). Fluoksetyna jest metabolizowana w wątrobie do formy sprzężonej z kwasem glukuronowym, która w wodzie pod wpływem bakterii jest hydrolizowana do pierwotnej postaci, co powoduje zwiększenie stężenia aktywnego związku w ściekach (Calisto i Esteves, 2009). Obecność fluoksetyny notowano w wodzie podziemnej na poziomie 56 ng/l, natomiast w wodzie pitnej jej stężenie wynosiło 0,64 ng/l (Santos i in., 2010). Związek ten ma stosunkowo długi okres półtrwania w porównaniu z innymi lekami. Dzięki dużemu współczynnikowi podziału olej/woda ma także dużą zdolność do bioakumulacji w tkankach (Paterson i Metcalfe, 2008). Stężenie mieszaniny fluoksetyny i jej metabolitu (norfluoksetyny) zostało zmierzone w tkankach ryb na poziomie > 10 µg/kg (Paterson i Metcalfe, 2008). W tkankach ryb z gatunku *Dorosoma cepedianum* stwierdzono obecność fluoksetyny na poziomie 1,02 µg/kg (Calisto i Esteves, 2009). U ryb z gatunku *Orizias latipes* współczynnik biokoncentracji fluoksetyny wynosi 80 (Paterson i Metcalfe, 2008). Badania wskazują, że fluoksetyna jest w znacznym stopniu odporna na rozkład w tkankach, co może prowadzić do długotrwałej toksyczności (Paterson i Metcalfe, 2008). Badania Calisto i Esteves (2009) wykazały, że związek ten może wpływać na cykl reprodukcyjny u makrobezkręgowców, co może doprowadzić nawet do ich śmierci. Jednocześnie Guler i Ford (2010) odnotowali, że fluoksetyna może niekorzystnie wpływać na pobieranie pokarmu, fototaksję, agresywność i aktywność życiową u bezkręgowców.

Drugą badaną substancją był propranolol, nieselektywny β-bloker, niemający aktywności wewnętrznej, stosowany obecnie głównie w arytmiami. Dane literaturowe pokazują, że jego stężenie w oczyszczonych ściekach może wynosić od 30 do 373 ng/l, natomiast w ściekach szpitalnych nawet 6,5 µg/l. Z badań wynika, że jest to najbardziej toksyczny związek dla organizmów wśród inhibitorów receptorów β (Santos i in., 2010). W nawiązaniu do dyrektywy 93/67/EEC propranolol uznać można za toksyczny dla organizmów wodnych. W testach na organizmach wodnych wykazano znaczący spadek aktywności serca u ryb oraz zahamowanie wzrostu i tempa rozmnażania u bezkręgowców (Santos i in., 2010), ale pod wpływem stężeń ponad 100-krotnie wyższych niż występujące w środowisku przyrodniczym.

## **ASPEKTY BIOINDYKACJI I ORGANIZMY WSKAŹNIKOWE**

W badaniach jakości wody przez długi czas badania bioindykacyjne były niedocenione. Obecnie w Ramowej Dyrektywie Wodnej (Dyrektywa 2000/60/WE) znajduje się zapis nakładający obowiązek wykonywania badań bioindykacyjnych w celu oceny stanu wód. Jednocześnie European Medicines Agency wymaga umieszczenia danych ekotoksykologicznych w badaniach rejestracyjnych leków.

Bioindykacja jest metodą wykorzystującą jako wskaźnik organizm żywy, którego reakcja może być podstawą oceny ogólnej aktywności biologicznej badanego układu. Pozwala to na poznanie sumarycznej toksyczności wszystkich szkodliwych substancji, w wielu przypadkach działających synergistycznie (Nałęcz-Jawecki, 2003). Koniecznym elementem właściwej oceny jakości środowiska jest odpowiedni dobór organizmów wskaźnikowych. Idealny organizm wskaźnikowy powinien się charakteryzować wieloma cechami, takimi jak: łatwa dostępność – i to w dużych ilościach przez cały rok, małe zróżnicowanie pod względem genetycznym, łatwa do obserwacji reakcja testowa, duża wrażliwość na szerokie spektrum substancji toksycznych.

### **KIEŁŻE Z RODZAJU *GAMMARUS* ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM GATUNKU *GAMMARUS VARSOVIENSIS***

Jednym z organizmów chętnie wykorzystywanych w analizach bioindykacyjnych są kiełże. Należą one do skorupiaków z rzędu obunogów. Całe swoje życie spędzają w wodach płynących, jako część zoobentosu (Kownacki i Soszka, 2004).

Kiełże spełniają wymagania stawiane dobrym indykatorom. Są szeroko rozpowszechnione na świecie, stanowią znaczną część biomasy środowiska wodnego (Kunz i in., 2010), a także są wysoce wyspecjalizowane oraz wrażliwe na zmiany środowiska. We wskaźnikowych biotycznych metodach bioindykacji kiełżom przypisano 6 punktów w skali od 1 do 10 (najmniej do najbardziej wrażliwych) według Biological Monitoring Working Party (BMWP) (MacNeil i in., 2000).

Kiełże zasiedlają dna zbiorników wodnych, odżywiając się martwą materią organiczną, natomiast same stanowią główny składnik pokarmowy w diecie wielu gatunków ryb (Grabowski i in., 2007). W środowisku mogą pełnić funkcję filtratorów bądź drapieżników. Zależy to między innymi od warunków, w jakich bytują, oraz od czynników stresowych, takich jak obecność innych drapieżników (Ahlgren i in., 2011). Co ważne, zachowanie warunkujące przystosowanie do roli filtratorów może być spowodowane nie tylko przez obecność ryb, ale także przez obecność zanieczyszczeń chemicznych (Kunz i in., 2010).

Jednym z gatunków zasiedlających polskie wody śródlądowe jest *Gammarus varsoviensis* (nazwany tak przez odkrywcę, aby uhonorować stolicę Polski) (Jażdżewski, 1975). Zamieszkuje on głównie wolno płynące rzeki i strumienie, starorzecza oraz kanały (Jażdżewski, 1975).

Większość badań przeprowadzanych na kiełżach dotyczy toksyczności ostrej, aczkolwiek obecnie pojawia się coraz więcej badań dotyczących toksyczności chronicznej, w których punktem końcowym są zmiany zachowania i funkcji fizjologicznych (Kunz i in., 2010). Oprócz badań śmiertelności, zmian zachowania, mierzone są także zmiany struktury populacji, odpowiedzi stresowej, zmiany bioenergetyczne, a nawet przeprowadza się ocenę stanu różnych biomarkerów, tj. białka szoku cieplnego (Hsp70 i Hsp80) (Kunz i in., 2010).

## CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie wrażliwości kiełży z gatunku *Gammarus varsoviensis* na dwa leki: fluoksetynę i propranolol. Metoda badawcza dla pojedynczych związków określona jest w normie PN-89 C-04610/06 Woda i ścieki – „Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczenie toksyczności ostrej na kiełżu *Gammarus varsoviensis* Jażdż.”. Istotnym elementem pracy było także oszacowanie toksyczności mieszanin obydwu związków w różnych stosunkach stężeń. Przeprowadzenie takich badań miało wykazać występowanie interakcji pomiędzy lekami: synergizmu, addycji bądź antagonizmu. Aby określić poziom realnego narażenia kiełży na badane związki w całym okresie trwania testu, wykonano analizy zawartości badanych związków w próbach metodą HPLC. Powinno to umożliwić ocenę stopnia degradacji fluoksetyny i propranololu.



## MATERIAŁY I METODY

### Organizm testowy

Badanie wykonywane było na kielżu *Gammarus varsoviensis* (Jażdżewski, 1975) (skorupiaki, obunogi). Organizmy testowe pobierano ze źródłakowego strumienia w pobliżu miejscowości Ciepelin, gmina Winnica, powiat pułtowski, województwo mazowieckie o współrzędnych geograficznych N: 52o33'50.45" i E: 20o58'52.83" w okresie 10.09–1.10.2012 r.

### POBÓR, TRANSPORT, AKLIMATYZACJA ORGANIZMÓW TESTOWYCH

Kielże zbierane były z dna strumienia, umieszczane w wodzie pobranej w strumieniu w plastikowych, szczelnie zamykanych pojemnikach i transportowane do laboratorium. Na miejscu pobierano także ok. 50 l wody. W laboratorium kielże umieszczano we wcześniej przygotowanych dwóch akwariach o rozmiarach 50 × 40 × 10 cm. W akwariach znajdował się oczyszczony i wyprażony piasek morski, niewielkie kamienie, które zostały wcześniej wyjałowione. Do akwarium wiano przefiltrowaną przez filtry bibułowe wodę pobraną razem z organizmami testowymi. W akwariach umieszczono systemy napowietrzające. Pozostałą część wody odstawiono do sedymentacji piasku i innych cząstek na jeden dzień, a następnie przefiltrowano przez sączki bibułowe i przelano do pojemnika, w którym ją napowietrzano. Dwa dni przed rozpoczęciem właściwych badań wodę poddano kolejnej filtracji przez sączki wyjaławiające o porach 0,22 μm i dalej napowietrzano w szklanych 10-litrowych zlewkach. Kielże karmiono przez cały okres aklimatyzacji wcześniej wysuszonymi liśćmi olszy czarnej (*Alnus glutinosa*). W czasie aklimatyzacji usuwano martwe organizmy, przegniłe liście olchy oraz uzupełniano wodę, łącząc wodę pobraną ze strumienia z odchlorowaną wodą wodociągową w stosunku około 1:1. Aklimatyzacja trwała 6 dni po każdym poborze.

### PRZEBIEG BADAŃ

W każdym tygodniu badania wykonano po cztery rozcieńczenia propranololu oraz fluoksetyny, a także po sześć rozcieńczeń mieszaniny propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny i mieszaniny fluoksetyny ze stałym

stężeniem propranololu. Rozcieńczenia wszystkich wykonanych wariantów zawiera tabela 1. Rozcieńczenia przygotowano w filtrowanej wodzie pobranej w miejscu poboru organizmów testowych. Do każdego krystalizatora wkładano po 7 kielży o podobnej wielkości i po dwie rurki plastikowe, które pełniły funkcję siedliska kielży. Zwierząt nie karmiono przez cały okres badania.

Tabela 1.

**Zastosowane w badaniach rozcieńczenia badanych związków i mieszanin**

Związek badany	Stężenie fluoksetyny [mg/l]	Stężenie propranololu [mg/l]
propranolol	0,00	10,00
	0,00	7,50
	0,00	5,00
	0,00	2,50
fluoksetyna	1,00	0,00
	0,75	0,00
	0,50	0,00
	0,25	0,00
mieszanina propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny	0,30	10,00
	0,30	7,50
	0,30	5,00
	0,30	2,50
	0,30	1,00
	0,30	0,00
mieszanina fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu	1,00	3,00
	0,75	3,00
	0,50	3,00
	0,25	3,00
	0,10	3,00
	0,00	3,00

*Źródło: opracowanie własne*

## ODCZYT REAKCJI TESTOWEJ I ZAKOŃCZENIE TESTU

Badanie wykonane było na podstawie normy PN-89 C-04610/06 Woda i ścieki – „Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczenie toksyczności ostrej na kielżu *Gammarus varsoviensis* Jażdż.”.

Pomiarów śmiertelności dokonywano po 24, 48, 72 i 96 godzinach. Za organizmy martwe uznawano organizmy, które nie reagowały na dotyk igłą preparacyjną. Martwe okazy liczono i usuwano z badanych roztworów. Następnie wszystkie próbki umieszczano ponownie w inkubatorze w odpowiednich warunkach oświetlenia i temperatury do czasu kolejnego pomiaru.

## OBLICZENIA LC50

W pracy wyliczono wartość LC50 oddzielnie dla każdego dnia pomiarowego, korzystając z dwóch metod: 1) metody probitowej opisanej we wspomnianej normie oraz 2) metody graficznej stosowanej wcześniej w Zakładzie Badania Środowiska.

### Obliczanie LC50 i efektu toksycznego dla mieszanin

W obliczeniach LC50 mieszanin wykorzystano metodę graficzną, jednak wartość tę wyliczano w procentach. W miejscu stężeń wpisywano procentową wartość stężeń branych pod uwagę w wyliczeniach. Dla wykonanych mieszanin wyliczano również TU mierzone, czyli zmierzoną jednostkę toksyczności, która wynosiła:

#### Wzór 1.

$$TU \text{ mierzone} = \frac{100}{x}$$

Gdzie:

x – obliczone procentowe LC50 mieszaniny

W celu porównania efektu wyliczono również TU przewidywane, czyli przewidywaną jednostkę toksyczności, której wartość szacowano po dodaniu efektów toksycznych pojedynczych związków. Jednostkę tę wyliczano ze wzoru:

**Wzór 2.**

$$TU \text{ przewidywane} = \frac{y}{LC50_y} + \frac{z}{LC50_z}$$

Gdzie:

$y$  – najwyższe stężenie propranololu wykorzystane w badanej mieszaninie,

$LC50_y$  – LC50 obliczone dla propranololu,

$z$  – najwyższe stężenie fluoksetyny wykorzystane w badanej mieszaninie,

$LC50_z$  – LC50 obliczone dla fluoksetyny.

LC50 wykorzystane we wzorze dla fluoksetyny i propranololu uśredniane było z dwóch powtórzeń wykonanych w danym tygodniu pomiarowym. TU przewidywane obliczane było z wykorzystaniem LC50 otrzymanym dwoma metodami: metodą probitową i metodą graficzną. Na podstawie otrzymanych wartości jednostki toksyczności zmierzonej i przewidywanej określono efekt toksyczny mieszaniny, którym mogło być: zwiększenie, obniżenie efektu w porównaniu z addycją efektu pojedynczych związków. Efekt ten określano, przyjmując zależność:

TU mierzone > TU przewidywane – zwiększenie efektu,

TU mierzone = TU przewidywane – addycja (sumowanie) efektu,

TU mierzone < TU przewidywane – obniżenie efektu.

Przyjęto, że sumowanie efektów następuje, jeśli różnica pomiędzy wartościami: TU mierzone i TU przewidywane jest mniejsza niż 0,1.

## **BADANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW METODĄ HPLC**

Analizę przeprowadzono za pomocą zestawu HPLC firmy Shimadzu złożonego z: termostatu CTO-10AS, pomp LC-10AT i LC-10ATvp, detektora z matrycą diodową (PDA) SPD-M10Avp oraz integratora. Analizę ilościową propranololu i fluoksetyny prowadzono odpowiednio przy długości fali 214 nm i 227 nm.

## **WYNIKI I DYSKUSJA**

Kielże z uwagi na swoje cechy i powszechne występowanie są często wykorzystywane jako organizmy testowe. W niewielu badaniach brano jednak pod uwagę wpływ toksyczności leków na te organizmy, a prawie w ogóle nie

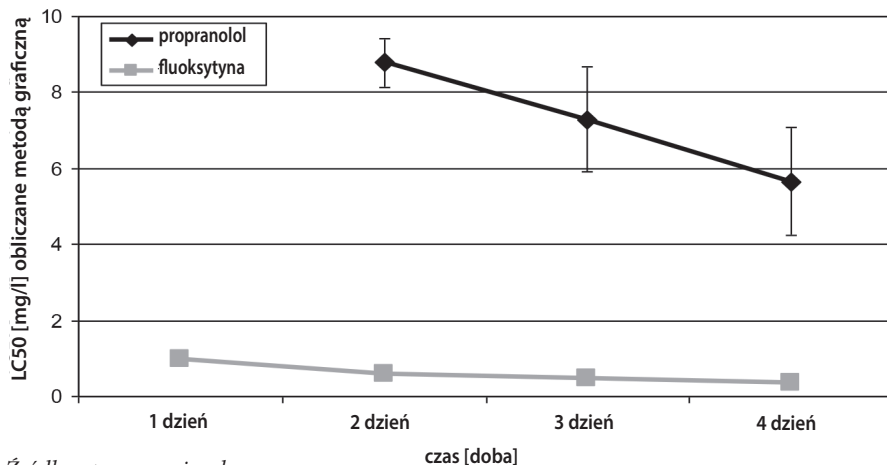
wykonywano badań nad toksycznością mieszanin. W testach śmiertelności żadna z wykorzystanych metod obliczenia LC50 nie wyraża dokładnej wartości toksyczności, natomiast w wykonanych badaniach odpowiednie wydaje się wykorzystanie metody graficznej. Metoda probitowa wymusza wykorzystanie tylko konkretnych wartości zawierających się w przedziale od 7 do 93% śmiertelności i opiera się na obliczeniach pochodzących przynajmniej z dwóch punktów pomiarowych, co przy niewielkiej liczbie rozcieńczeń stwarza pewne problemy. Brak dokładności metody graficznej opiera się na wykorzystaniu jedynie dwóch punktów pochodzących z dwóch kolejnych rozcieńczeń okalających wartość 50% śmiertelności, nie uwzględnia natomiast pozostałych wyników. Metoda probitowa pozwala zaś na oszacowanie wartości LC50 wykraczającej poza badane stężenia (ekstrapolację wyników), gdyż w przeciwieństwie do metody graficznej nie jest wymagane osiągnięcie 50% śmiertelności dla żadnego rozcieńczenia. W niniejszej pracy częściej jednak, z uwagi na uzyskane wyniki, nie było możliwe wyliczenie LC50 przy wykorzystaniu metody probitowej, a uzyskane odchylenia standardowe były w tej metodzie większe, szczególnie w wyliczeniach efektu toksycznego mieszanin. W związku z powyższym w pracy przedstawione zostaną wyniki LC50 otrzymane poprzez wykorzystanie metody graficznej.

Najbardziej wyraźną odpowiedź kielży na badane związki i ich mieszaniny w wykonanym zakresie stężeń uzyskano w drugim i trzecim dniu badania. W pierwszym dniu w większości przypadków nie było żadnej odpowiedzi organizmów na substancje, natomiast wyniki otrzymane po 96 godzinach wydają się wątpliwe z powodu trudności w utrzymaniu odpowiednich warunków testu we wszystkich powtórzeniach, a także wysokiej śmiertelności.

Przeprowadzone badania wykazały, że w fluoksetyna wykazuje ponad 10-krotnie większą toksyczność niż propranolol. Uzyskane wartości LC50 fluoksetyny w przeciągu czterech dni badawczych zawierają się w przedziale:  $0,36 \pm 0,05$  mg/l ÷  $0,97 \pm 0,02$  mg/l, natomiast wartości LC50 propranololu  $5,66 \pm 1,41$  mg/l ÷  $8,78 \pm 0,63$  mg/l.

Wykres 1.

LC50 [mg/l] propranololu i fluoksetyny wyliczone dla poszczególnych dni testu



Źródło: opracowanie własne

Zgodnie z Dyrektywą Komisji 93/67/EWG fluoksetynę można zaklasyfikować jako związek bardzo toksyczny dla organizmów wodnych, natomiast propranolol uznać za toksyczny.

Jak dotąd nie przeprowadzono żadnych badań toksyczności ostrej fluoksetyny i propranololu dla żadnego z gatunków kielży, w których punktem końcowym byłaby śmierć osobników. Wiele takich badań wykonano natomiast na innych rodzinach skorupiaków. Dla gatunku *Ceriodaphnia dubia* LC50 po 48 godzinach dla fluoksetyny wynosiło 234 µg/l (Enick i Moore, 2007), natomiast dla *Daphnia magna* wynosiło 820 µg/l (Santos i in., 2010). W przeprowadzonych badaniach średnia toksyczność fluoksetyny po 48 godzinach dla *G. varsoviensis* wynosi 580±80 µg/l. Dla propranololu stwierdzono dla dwóch innych skorupiaków LC50 po 48 godzinach wynoszące 10,31 mg/l dla *Thamnocephalus platyurus* oraz 29,8 mg/l dla *Hyaella azteca* (Santos i in., 2010), natomiast w wykonanych testach LC50 wynosiło 8,78 ± 0,63 mg/l. Otrzymane wyniki wskazują, że *G. varsoviensis* jest bardziej wrażliwy na propranolol i średnio wrażliwy na działanie fluoksetyny w porównaniu z innymi gatunkami skorupiaków. Oczywiście wrażliwość organizmów spośród całej rodziny *Gammaridae* na te związki może być bardzo zróżnicowana. Należy

się jednak spodziewać, że stosunek toksyczności fluoksetyny i propranololu będzie podobny dla wszystkich gatunków kielży. Drobne różnice w toksyczności związków w obrębie nawet tego samego gatunku mogą być również związane z miejscem, w którym osobniki te bytują, i stopniem zanieczyszczenia ich środowiska życia, dlatego właściwe wydaje się prowadzenie hodowli organizmów w ściśle kontrolowanych warunkach. Utrzymanie hodowli wiąże się jednak nie tylko ze zwiększonymi kosztami, ale także z możliwością powstania chowu wsobnego o wąskiej puli genetycznej, co z kolei powoduje zwiększenie wrażliwości osobników na toksyczne działanie związków. Lawrence i Poulter (1996) stwierdzili, że wzrost zasolenia wody zmniejsza wrażliwość *Gammarus duebeni* (gatunek morski) na toksyczne działanie miedzi.

W badaniach nad zmianami lokomocji osobników z gatunku *Gammarus pulex* pod wpływem niskich stężeń fluoksetyny stwierdzono, że w niższych stężeniach 10-100 ng/l następuje znaczące obniżenie lokomocji, natomiast w wyższych stężeniach takich zmian nie zaobserwowano (de Lange i in., 2006). W niniejszej pracy wraz ze wzrostem stężenia związku zwiększał się natomiast stopień śmiertelności. W badaniu nad wpływem fluoksetyny na foto- i geotaksję *Echinogammarus marinus* stwierdzono, podobnie do badań zespołu de Lange (2006), największy wzrost wartości obydwu parametrów w stężeniu 100 ng/l (Guler i Ford, 2010). Oskarsson i in. (2012) mierzyli natomiast poziom respiracji u kielży poddanych działaniu propranololu i stwierdzili obniżenie wartości tego parametru o 40% w stosunku do kontroli. Na podstawie przedstawionych prac można zauważyć, że także w tych przypadkach uwzględniających znacznie niższe stężenia toksyczność fluoksetyny jest większa niż toksyczność propranololu. Ze względu na możliwość zastosowania niższych stężeń, zbliżonych do występujących w środowisku, korzystne wydaje się wykonywanie badań chronicznych, obejmujących nawet kilka pokoleń osobników. W badaniach takich można kontrolować kilka wskaźników toksyczności substancji dla danego organizmu.

## MIESZANINY

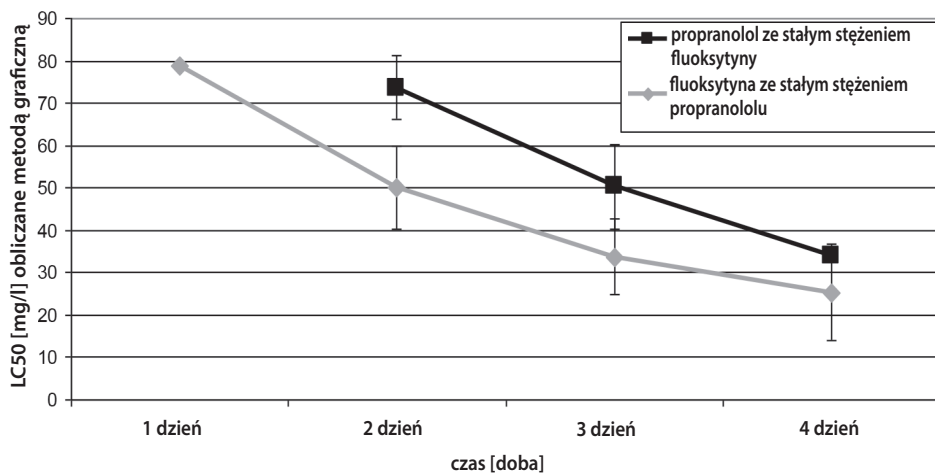
Pomimo występowania w środowisku mieszanin leków, a nie pojedynczych związków, nie wykonuje się powszechnie badań nad toksycznością mieszanin i ich wpływem na zmianę toksyczności poszczególnych substancji

lecznicych. Do określenia toksyczności mieszanin substancji chemicznych wykorzystuje się model graficzny opierający się na diagramie Welcha (Wiącek-Rosińska, 2008), a także modele matematyczne, m.in. model Ribo i Rogersa (Wiącek-Rosińska, 2010).

Otrzymane wyniki sugerują, iż fluoksetyna ma większy wpływ na efekt toksyczny niż propranolol. LC50 dla mieszaniny fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu jest niższe niż dla mieszaniny propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny, co wskazuje na większą toksyczność pierwszej mieszaniny, w której dodawane było coraz wyższe stężenie fluoksetyny. Także odczytana śmiertelność dla odpowiadających sobie stężeń obydwu mieszanin jest wyższa w przypadku mieszaniny fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu.

Wykres 2.

Średnie LC50 [%] mieszaniny fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu i mieszaniny propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny



Źródło: opracowanie własne

W mieszaninie propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny i mieszaninie fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu stwierdzono w większości przypadków działanie addytywne leków na kielże. Tabela 2 prezentuje procentowe zmiany efektu toksycznego spowodowane przez badane mieszaniny w ciągu wszystkich dni badania.



Tabela 2.

Zbiorcze zmiany efektu (%) dla dwóch mieszanin w ciągu czterech dni

Mieszanina/efekt	Zwiększenie	Obniżenie	Brak różnic
mieszanina propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny	56	19	25
mieszanina fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu	77,(7)	16,(6)	5,(5)

Źródło: opracowanie własne

Badaniami nad toksycznością mieszanin leków dla różnych organizmów wodnych zajmował się Cleuvers (2003). Stwierdził on, że efekty mieszanin leków mogą być różne dla poszczególnych grup organizmów. Z jego badań wynika, iż mieszanina kwasu klofibrowego i karbamazepiny powoduje znaczne zwiększenie toksyczności w porównaniu z pojedynczymi związkami dla *D. magna*, natomiast nie zwiększa toksyczności poszczególnych związków dla *Lemna minor*.

Badania dotyczące degradacji związków w środowisku, prowadzone równolegle do badań toksyczności, przedstawione w niniejszej pracy, wskazały na znikomy rozkład pojedynczych substancji: fluoksetyny i propranololu. W zastosowanych mieszaninach obydwie związki nie wpływają na zwiększenie bądź zmniejszenie rozkładu. Mały rozkład substancji przez cały okres trwania badania na kielżach pozwala oszacować toksyczność pod wpływem niezmiennego stężenia tych substancji.

## PODSUMOWANIE

1. Toksyczność fluoksetyny dla kielży jest większa niż toksyczność propranololu. Także jej dodatek do mieszaniny ma większy wpływ na zwiększenie efektu toksycznego.
2. Na zmianę efektu toksycznego badanych związków ma wpływ zastosowany stosunek stężeń fluoksetyny i propranololu. W mieszaninie fluoksetyny ze stałym stężeniem propranololu i mieszaninie propranololu ze stałym stężeniem fluoksetyny stwierdzono działanie synergistyczne obydwu związków.

3. Kiełże z gatunku *Gammarus varsoviensis* mogą zostać wykorzystane do oceny toksyczności fluoksetyny i propranololu, aczkolwiek testy toksyczności ostrej muszą być wykonywane dla stężeń wyższych niż te występujące w środowisku wodnym.
4. W celu oceny toksyczności tych związków w stężeniach niższych należy przeprowadzić testy toksyczności chronicznej i znaleźć inne punkty końcowe pomiaru reakcji testowej.

### **Podziękowania**

*Dla Pani Małgorzaty Ozimińskiej z Zakładu Wodociągu Północnego MPWiK w Wieliszewie za pomoc w pozyskaniu kiełży do badań.*

### **Bibliografia**

- Ahlgren, J., Åbjörnsson, K., Brönmark, Ch. (2011). *The influence of predator regime on the behavior and mortality of a freshwater amphipod, Gammarus pulex*, „Hydrobiologia”, 671, s. 39–49.
- Buser, H.R., Muller, M.D., Theobald, N. (1998a). *Occurrence and fate of the pharmaceuticals drug clofibrinic acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea*, „Environ Sci Technol”, 32(1), s. 188–192.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. (1999). *Occurrence and fate of the chiral pharmaceuticals drug ibuprofen in surface waters and in wastewater*, „Environ Sci Technol”, 32(15), s. 2529–2535.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. (1998b). *Occurrence and fate of the pharmaceuticals drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake*, „Environ Sci Technol”, 32(22), s. 3449–3456.
- Calisto, V., Esteves, V.I. (2009). *Psychiatric pharmaceuticals in the environment*, „Chemosphere”, 77, s. 1257–1274.
- Calleja, M.C., Persoone, G., Geladi, P. (1994). *Human acute prediction of the first 50 MEIC chemicals by a battery of ecotoxicological tests and physicochemical properties*, „Fd Chem. Toxic”, 32, s. 173–187.
- Canton, J.H., Linders, J.B., Luttik, R. (1991). *Catch-up operation on old pesticides: integration. Report 678801002*. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven. The Netherlands.

- Cleuvers, M. (2003). *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*, „Toxicology Letters”, 142, s. 185–194.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murkc, A.J., L’urling, M., Peeters, E.T.H.M. (2006). *Behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals*, „Aquatic Toxicology”, 78, s. 209–216.
- Decyzja Wykonawcza Komisji (2015). Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 20.03.2015 r. ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów obejmującego całą Unię monitorowania w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE. Bruksela, 20.03.2015 r. C(2015) 1756 final.
- Dietrich, D.R., Webb, S.F. i Petry, T. (2002). *Hot spot pollutants: Pharmaceuticals in the environment*, „Toxicol Lett”, 131, s. 1–3.
- Drobniewska, A., Sikorska, K., Giebułtowicz, J., Nałęcz-Jawecki, G. (2015). *Ocena zanieczyszczenia substancjami czynnymi leków Wisły w rejonie Warszawy*. Materiały konferencyjne XXIII Zjazdu Hydrobiologów Polskich, Koszalin 8–12 września 2015 r. ISBN 978-83-7365-388-7.
- Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej.
- Dyrektywa Komisji 93/67/EWG z dnia 20 lipca 1993 r. ustanawiająca zasady oceny ryzyka dla człowieka i środowiska naturalnego ze strony substancji notyfikowanych zgodnie z dyrektywą Rady 67/548/EWG.
- Ekwall, B. (1998). *MEIC evaluation of acute systemic toxicity*. Part V, ATLA 26, s. 571–616.
- Ekwall, B. (2000). *MEIC evaluation of acute systemic toxicity*. Part VIII, ATLA 28, s. 201–234.
- Enick, O.V., Moore, M.M. (2007). *Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment*, „Environmental Impact Assessment Review”, 27, s. 707–729.
- Giebułtowicz, J., Nałęcz-Jawecki, G. (2014). *Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland)*, „Ecotoxicology and Environmental Safety”, 104, s. 103–109.
- Grabowski, M., Bacela, K., Konopacka, A. (2007). *How to be an invasive gammarid (Amphipoda: Gammaroidea) – comparison of life history traits* „Hydrobiologia”, 590, s. 75–84.
- Guler, Y., Ford, A.T. (2010). *Anti-depressants make amphipods see the light*, „Aquatic Toxicology”, 99, s. 397–404.

- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lutzhoft, H.C., Jorgensen, S.E. (1998). *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review*, „Chemosphere”, 36, s. 357–393.
- Heberer, T. (2002). *Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data*. „Toxicol Lett”, 131, s. 5–17.
- Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Krengel, D., Kayser, A. (2004). *Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations*, „Environ Toxicol”, 19(3), s. 226–240.
- Jażdźewski, K. (1975). *Remarks on Gammarus lacustris G.O. Sars 1863 with description of Gammarus varsoviensis n.sp. (Crustacea, Amphipoda)*, „Budragen tot de Dierkunde”, 45(1), s. 71–86.
- Jorgensen, S.E., Halling-Sorensen, B. (2000). *Drugs in the environment*, „Chemosphere”, 40, s. 691–699.
- Kahru, A., Borhardt, B. (1994). *Toxicity of 39 MEIC chemicals to bioluminescent photobacteria (the Biotox™ test): correlation with other test system*. ATLA 22, s. 147–160.
- Kownacki, A., Soszka, H. (2004). *Wytyczne do oceny stanu rzek na podstawie makrobezkręgowców oraz do pobierania prób makrobezkręgowców w jeziorach*. Warszawa.
- Kummerer, K. (2001). *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review*, „Chemosphere”, 45, s. 957–969.
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A. (2010). *Gammarus spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests*, „Reviews of Environmental Contamination and Toxicology”, 205, s. 1–76.
- Lawrence, A., Poulter, C. (1996). *The potential role estuarine amphipod Gammarus duebeni in sub-lethal ecotoxicology testing*, „Water Science and Technology”, 34, s. 93–100.
- MacNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W. (2000). *Differential physico-chemical tolerances of amphipod species revealed by field transplantations*, „Oecologia”, 124, s. 1–7.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Šídlová-Štěpánková, T., Köhler, H.R., Triebkorn, R., Jungmann, D., Giesy, J.P., Bláha, L. (2010). *Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean Gammarus fossarum and relationship with the chemical contamination and in vitro effects*, „Journal of Soils and Sediments”, 10, s. 423–433.
- Nałęcz-Jawecki, G. (2003). *Badanie toksyczności środowiska wodnego metodą bioindykacji*, „Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego”, 2, s. 11–17.

- Norma PN-89 C-04610/06 Woda i ścieki – „Badania toksyczności zanieczyszczeń dla organizmów wodnych. Oznaczenie toksyczności ostrej na kielżu *Gammarus varsoviensis* Jażdż.”
- Oskarsson, H., Eriksson Wiklund, A.-K., Lindh, K., Kumblad, L. (2012). *Effect studies of human pharmaceuticals of Fucus vesiculosus and Gammarus spp.*, „Marine Environmental Research”, 74, s. 1–8.
- Paterson, G., Metcalfe, Ch.D. (2008). *Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (Oryzias latipes)*, „Chemosphere”, 74, s. 125–130.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*, „Journal of Hazardous Materials”, 175, s. 45–95.
- Scheytt, T., Heberer, T., Stan, H.J. (2000). *Vorkommen und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen im Grundwasser. Schriftenreihe Wasserforschung*. W: B. Weigert, C. Steinberg, R. Bruggemann (red.), Schriftenreihe Wasserforschung e.V., vol. 6. Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, Berlin, s. 13–22.
- Skrzypczak, A. (2012). *Ocena genotoksyczności produktów fotorozkładu substancji czynnych wybranych leków i kosmetyków przy użyciu krótkoterminowych testów bakteryjnych*. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Badania Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Sosnowska, K., Styszko-Grochowiak, K., Golaś, J. (2009). *Leki w środowisku – źródła, przemiany, zagrożenia*. Krakowska Konferencja Młodych Uczonych.
- Stan, H.J., Heberer, T. (1997). *Pharmaceuticals in the aquatic environment*, „Water Analysis”, 25, s. 20–23.
- Ternes, T.A. (1998). *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, „Water Res”, 32, s. 3245–3260.
- Touraud, E., Roig, B., Sumpter, J.P., Coetsier, C. (2011). *Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans?*, „International J. of Hygiene and Environ. Health”, 214, s. 437–441.
- Warren, N., Allan, I.J., Carter, J.E., House, W.A., Parker, A. (2003). *Pesticides and other microorganic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review*, „Applied Geochemistry”, 18, s. 159–194.
- Wiącek-Rosińska, A. (2010). *Badanie interakcji wybranych dwuskładnikowych mieszanin substancji organicznych z wykorzystaniem modelu matematycznego oraz bio-testu Microtox*. V Krakowska Konferencja Młodych Uczonych.

- Wiącek-Rosińska, A. (2008). *Badanie interakcji wybranych dwuskładnikowych mieszanin z wykorzystaniem biotestu Microtox*. Krakowska Konferencja Młodych Uczonych.
- Zuccato, E., Bagnati, R., Fioretti, F., Natangelo, M., Calmari, D., Fanelli, R. (2001). *Environmental loads and detection of pharmaceuticals in Italy*. W: K. Kummerer (red.), *Pharmaceuticals in the environment*, Springer-Verlag, Berlin, s. 19–28.
- Zwiener, C., Gremm, T.J., Frimmel, F.H. (2001). *Pharmaceuticals residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production*. W: K. Kummerer (red.), *Pharmaceuticals in the environment*, Springer-Verlag, Berlin, s. 81–90.