

Farmaceutyki używane są na całym świecie w ogromnych ilościach nie tylko w celach leczniczych i profilaktycznych ale także jako np. stymulatory wzrostu. W organizmach ludzi i zwierząt leki mogą w różnym stopniu podlegać przemianom strukturalnym; podczas gdy niektóre są słabo lub tylko umiarkowanie metabolizowane, część z nich jest usuwana w zmienionej formie. Zasadniczo uwalnianie i metabolizm natywnych form farmaceutyków prowadzi do obniżenia toksyczności. W niektórych przypadkach może on prowadzić do powstania związków bardziej aktywnych lub o zbliżonej aktywności do substancji macierzystej. Po wydaleniu z organizmu substancja macierzysta lub jej metabolity mogą być stabilne lub ulegać dalszym przemianom zachodzącym w środowisku (w wodach powierzchniowych, w glebie, w osadach) lub w infrastrukturze technologicznej (w oczyszczalniach ścieków, w zakładach uzdatniania wody) prowadząc do wytworzenia stabilnych produktów transformacji. Transformacja zachodzi w procesach abiotycznych lub biotycznych takich jak: fotoliza, hydroliza, reakcje redoks i biodegradacja. Wszystkie związki powstające w efekcie przemian farmaceutyków (metabolity i produkty degradacji) obecne w środowisku określa się jako produkty transformacji. Z powodu obecności produktów transformacji farmaceutyków problem oceny ryzyka ekotoksykologicznego staje się jeszcze bardziej złożony. Wpływ produktów transformacji na środowisko może być bardziej szkodliwy niż w przypadku substancji macierzystej gdy: (i) powstają w znacznej ilości, (ii) są bardziej trwałe i/lub mobilne lub (iii) są wysoce aktywne (toksyczne). Pomimo, że niektóre z produktów transformacji występują w środowisku chociaż substancja macierzysta w końcu z nich nie została do tej pory zidentyfikowana. Tak więc ludzie i środowisko są narażeni na mieszanin związków aktywnych o zmiennym i nieznanym składzie.

Zazwyczaj leki są tak projektowane aby oddziaływały w specyficzny sposób na określone grupy organizmów docelowych (np. antybiotyki służą do zwalczania bakterii). Okazuje się jednak, że przedostając się do środowiska mogą one oddziaływać w sposób specyficzny lub niespecyficzny na istotne dla środowiska organizmy niedocelowe tj. glony, rośliny wodne, bezkręgowce i ryby. Przykładem może być etynyloestradiol, syntetyczny estrogen, związek o udokumentowanym działaniu zakłócającym funkcjonowanie układu hormonalnego; zaburzenia w rozwoju embrionalnym danio przegowanego (*Danio rerio*) obserwowano przy narażeniu na stężenie 5 ng L⁻¹. Do innych szkodliwych zmian wywołanych przez ten związek u ryb można zaliczyć, m.in.: obniżenie płodności, niedorozwój gonad, zmiany w stosunku samców do samic w populacjach i pojawienie się osobników interseksualnych. Poczwszy od 1990 roku liczebność populacji śpawy bengalskiej (*Gyps bengalensis*) spadła o ponad 95%. Stwierdzono, że przyczyną śmierci są uszkodzenia układu pokarmowego i nerek spowodowane użyciem siadlanu zwierzęcego, którym wcześniej podawano diklofenak. Niektóre leki przeciwnowotworowe mogą stanowić szczególnie zagrożenie dla organizmów niedocelowych jako, że działają nieselektywnie na wszystkie komórki. Mimo, że ich użycie, w porównaniu do innych farmaceutyków, jest niskie ich mechanizm działania sprawia, że wszystkie organizmy (zarówno prokariotycznie jak i eukariotycznie) są podatne na ich szkodliwe działanie.

Poza paroma przykładami wiedza o negatywnym oddziaływaniu farmaceutyków na organizmy niedocelowe w środowisku jest bardzo ograniczona. W ostatnich latach sformuowano wytyczne dotyczące oceny zagrożenia środowiskowego dla farmaceutyków [Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 2006; Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP, 2000, 2004); European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC, 2008); World Health Organization (WHO, 2011)]. Zgodnie z rozporządzeniami zawartymi w tych dokumentach najpierw przeprowadzana jest wstępna ocena narażenia (Faza I), która opiera się na wyznaczeniu przewidywanego (obliczonego zgodnie z procedurą EMEA lub zmierzonego stężenia leku i/lub jego istotnych metabolitów w środowisku (PEC lub MEC, odpowiednio). Jeżeli otrzymana wartość PEC (MEC) jest wyższa niż ustalone limity (powyżej których szacuje się, że badana substancja lecznicza może wywierać znaczny wpływ na środowisko i zdrowie człowieka) przeprowadzana jest ocena ryzyka ekotoksykologicznego (Faza II). Ocenę ryzyka przeprowadza się na podstawie wartości współczynnika ryzyka (RQ) obliczanego jako stosunek PEC (lub MEC) do PNEC (przewidywane stężenie niewywołujące negatywnych skutków) dla organizmów niedocelowych. Gdy $RQ < 1$ ryzyko jest małe i nie ma wskazań do przeprowadzania dalszych testów. Dla przykładu, wprowadzone ostatnio europejskie wytyczne oceny zagrożenia spowodowanego przez leki ludzkie wyłączyły konieczność testowania związków dla których PEC woda powierzchniowa jest poniżej 0.01 µg L⁻¹. Głównym problemem związanym z tym podejściem jest to, że przy ocenie ryzyka nie są dostępne aktualne dane o wielkości sprzedanej i zmierzonych stężeniach środowiskowych. Stąd wartość wyznaczanego współczynnika PEC mają jedynie charakter orientacyjny. Ponadto testy ekotoksykologiczne przeprowadzane w Fazie II dotyczą toksyczności ostrej pojedynczych związków.

Powszechnie wiadomo, że farmaceutyki występują w naturalnym środowisku nie jako pojedyncze leki lecz w mieszaninach. Dostępne dane literaturowe pokazują, że toksyczność mieszanin wobec organizmów niedocelowych może być wyższa niż przewidywana na podstawie wyników uzyskanych w testach dla pojedynczych substancji. W przypadku oceny toksyczności mieszanin efekt addytywny lub efekty synergistyczne - antagonistyczne powinny być brane pod uwagę. W ostatnich 10 latach farmaceutyki są regularnie wykrywane nie tylko w środowisku wodnym ale także w lądowym. Pomimo, że stężenia w większości z nich próbkach środowiskowych są na stosunkowo niskim poziomie (µg L⁻¹, ng L⁻¹) są one wprowadzane do ekosystemów w sposób ciągły. Długotrwała ekspozycja na mieszaniny tych związków może prowadzić do wywołania negatywnych, odległych efektów toksycznych u niedocelowych organizmów wodnych i lądowych. Dlatego też przy ocenie ryzyka środowiskowego tych substancji powinno się uwzględnić testy toksyczności chronicznej.

Celem zaplanowanych w ramach projektu badań jest dokonanie oceny potencjalnych skutków wynikających z obecności powszechnie stosowanych farmaceutyków, produktów ich transformacji i ich mieszanin wobec ekosystemów i zdrowia człowieka. Przeprowadzone badania mają zweryfikować następujące hipotezy badawcze:

- (i) niektóre grupy farmaceutyków i ich metabolity wykazują potencjalnie wysoką bioaktywność (toksyczność i ekotoksyczność), gdy są wprowadzane a następnie podlegają transformacji w środowisku
- (ii) produkty transformacji mogą stanowić nawet większe zagrożenie niż produkty macierzyste.

Do badań wybrano leki powszechnie stosowane w medycynie i weterynarii, o potwierdzonym występowaniu w abiotycznych elementach ekosystemów, stanowiące potencjalne zagrożenie ekotoksykologiczne. Wybrane farmaceutyki należą do różnych grup terapeutycznych tj.: niesterydowe leki przeciwbólowe, antybiotyki, leki przeciwnowotworowe hormony sterydowe, leki

przeciwpasożytnicze. W celu szczegółowego oszacowania ryzyka środowiskowego zostanie zastosowana bateria testów ekotoksykologicznych wykorzystująca organizmy reprezentujące różne poziomy organizacji biologicznej oraz różne poziomy troficzne ekosystemów wodnych i lądowych co zapewni kompleksowe podejście do badanego problemu. Spośród organizmów wodnych wybrano bakterie luminescencyjne (*Vibrio fischerii*), glony zielone (np. *Scenedesmus vacuolatus*), rzęś wodna (*Lemna minor*) oraz rozwielitki (*Daphnia magna*). Jako przedstawiciele organizmów glebowych wytypowano bakterie glebowe (*Arthrobacter globiformis*) oraz skoczogonki (*Flosomia candida*). Ponadto dla wybranych produktów transformacji i mieszanin zostaną wykonane testy cytotoksyczności z wykorzystaniem linii komórek pstręgi czarnego (*Oncorhynchus mykiss*) w celu oceny potencjalnej toksyczności dla ryb. Zastosowanie testów hamowania wzrostu glonów, wzrostu rzęsi wodnej i hamowania reprodukcji skoczogonki pozwoli na ocenę toksyczności chronicznej. Analiza próbek środowiskowych z wykorzystaniem metod analitycznych takich jak GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, lub UHPLC-MS umożliwi identyfikację farmaceutyków i produktów ich transformacji oraz uzyskanie danych dotyczących ich stężeń środowiskowych (MEC). Szczególna uwaga zostanie poświęcona poznaniu losów środowiskowych badanych substancji i ich mieszanin.

Tak zaplanowane badania umożliwią zgromadzenie wiarygodnych danych dotyczących poziomów ekspozycji, losów środowiskowych i ekotoksyczności wybranych do badań farmaceutyków i ich produktów transformacji. Zaproponowana bateria testów umożliwi lepsze poznanie i zrozumienie oddziaływania badanych substancji na poszczególnych poziomach troficznych ekosystemów wodnych i lądowych. Realizacja zaplanowanych badań umożliwi także ocenę długotrwałych skutków narażenia badanych organizmów na działania ładowych ilości tych aktywnych związków w środowisku. Następnym tego będzie dogłębne poznanie zjawisk wynikających ze współdziałania farmaceutyków i ich produktów transformacji w mieszaninach w środowisku w kontekście potencjalnych efektów synergistycznych i/lub antagonistycznych. Wyniki przeprowadzonych badań zostaną opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych w postaci oryginalnych prac, jak i w formie komunikatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.