

DIPLOMADOLGOZAT

Deme Gergő

Mezőgazdasági biotechnológus MSc

Gödöllő

2022



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus**

Mezőgazdasági biotechnológus MSc Szak

**Ismeretlen ökotoxicitású gyógyszerhatóanyagok biológiai
hatásainak vizsgálata eltérő trofitási szinteken**

Belső konzulens: Dr. Háhn Judit,
tudományos főmunkatárs,
Göbölös Balázs,
kutatási asszisztens
Bock Illés,
kutatási asszisztens

Készítette: Deme Gergő,
TF4FVZ
Mezőgazdasági biotechnológus MSc
Nappali tagozat
Intézet/Tanszék:
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági Tanszék

**Gödöllő
2022**

Tartalom

1	Bevezetés.....	3
2	Szakirodalmi áttekintés	5
	2.1. Gyógyszerek felhasználása, környezetbe jutása	5
	2.2. Gyógyszerhatóanyagok környezeti előfordulása, ökotoxikológiai vizsgálata.....	7
	2.3. A vizsgálatba vont gyógyszerhatóanyagok bemutatása.....	11
3	Anyag és módszer	21
	3.1. Gyógyszerhatóanyagok és törzsoldatok.....	21
	3.2. <i>Aliivibrio fischeri</i> akut biolumineszcencia gátlási teszt.....	22
	3.3. Krónikus <i>Aliivibrio fischeri</i> teszt.....	23
	3.4. Zebradánió embrió ZETA teszt.....	23
4	Eredmények.....	25
	4.1. <i>Aliivibrio fischeri</i> akut biolumineszcencia gátlási teszt.....	25
	4.2. A krónikus <i>Aliivibrio fischeri</i> teszt.....	26
	4.3. ZETA teszt eredményei	29
5	Következtetések, javaslatok	34
6	Összefoglalás.....	37
7	Irodalomjegyzék.....	39
	Internetes hivatkozások	41
8	Köszönetnyilvánítás	44
9	Mellékletek.....	45

1 Bevezetés

A xenobiotikum kifejezés olyan vegyi anyagok leírására szolgál, amelyek idegenek az élőlények természetes életétől, környezeti élőhelyüktől, és így nem természetes anyagokat foglal magába, mint pl. a növényi összetevők, gyógyszerek, peszticidek, kozmetikumok, ízesítők, illatanyagok, élelmiszer-adalékanyagok, ipari vegyszerek és környezetszennyező anyagok. A xenobiotikumokat a tudósok olyan vegyi anyagokként határozzák meg, amelyeknek egy adott szervezet ki van téve, és amelyek az adott szervezet metabolizmusából nem származnak. Metabolizmus nélkül sok xenobiotikum mérgező koncentrációt érne el a szervezetben. A legtöbb sejten belüli metabolikus tevékenységhez energiára, kofaktorokra, valamint enzimekre van szükség (http1.)

Az elmúlt évtizedekben az orvostudomány fejlődésével a gyógyszeripari termékek gyártása és fogyasztása rohamosan nőtt. Körülbelül 3000 vegyületet használnak gyógyszerként, és az éves termelési mennyiség meghaladja a több száz tonnát (Grenni et al. 2018). Ugyanakkor ennek a hatalmas mennyiségű gyógyszernek nagy része különböző módokon visszakerül az ökoszisztémába, ott változásokat idézve elő. 2019-ig globálisan 771, az EU-ban pedig 591 gyógyszer hatóanyagot vagy metabolitot lehetett környezeti elemekből és ivóvízből detektálni (http32, Dusi et al. 2019)

Figyelmet érdemel, hogy az elmúlt néhány évben a környezetanalitika fejlődési irányának középpontjában a szerves mikroszennyezők kimutatása állt, melyek közé tartoznak a gyógyszerhatóanyagok is (http2).

A *Proceedings of the National Academy of Sciences* folyóiratban megjelent tanulmány messze az eddigi legnagyobb, 470 millió ember folyószennyezésére gyakorolt hatását mutatja be. A kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a gyógyszeripari szennyezés globális veszélyt jelent a környezetre és az emberi egészségre (Wilkinson et al. 2022).

Így kulcsfontosságú a toxicitás különböző jeleinek minél korábbi felismerése, ezért is választottam e témát dolgozatomban tárgyául. Diplomamunkámban a környezetben, különös tekintettel a hazai természetes vizekben előforduló **xenobiotikumokat**, azon belül is megkülönböztetett figyelemmel a Maász és munkatársai által 2019-ben felszíni vízből (Balaton) először kimutatott öt gyógyszerhatóanyag (*atracurium*, *lacosamide*, *propafenone*, *trimetazidine*

és *trazodone*¹), *in vitro* ökotoxikológiai vizsgálatát végeztem két trofitási szinten. Ennek során az *Aliivibrio fischeri* (továbbiakban *AVF*) baktériumtörzzsel, valamint a zebradánió (*Danio rerio*) embrió toxicitási ZETA (*zebrafish embryo toxicity assay*) teszttel dolgoztam. Ezekről a vegyületekről nem áll rendelkezésre experimentális ökotoxikológiai adat, csupán a *propafenone*, *trazodone* és *trimetazidine* esetében lehet mennyiségi szerkezet-aktivitási összefüggés (QSAR) modellel meghatározott effektív koncentráció értékeket találnia a szakirodalomban (Sanderson et.al. 2004)

Erre az öt gyógyszerhatóanyagra tehát nem található mért ökotoxicitási értékeken alapuló PNEC (*Predicted no-effect concentration*), azaz becsült ökológiailag hatástalan koncentráció érték. Ez egy vegyi anyag azon koncentrációját jelöli, amely koncentrációnál és az alatt nem jelennek meg az ökoszisztéma expozíciójának káros hatásai.

Elsőként *AVF* tesztszervezettel vizsgáltam a vegyületeket önmagukban. Ezt követően ZETA tesztet alkalmaztam mind az öt gyógyszerhatóanyagnál, melyhez *Danio rerio* (zebradánió) alternatív gerinces tesztszervezetet használtam.

A dolgozatomban a vizsgálatba bevont gyógyszerhatóanyagokat jellemzem, bemutatom a célszervezetre, valamint a tesztszervezetekre gyakorolt hatását, illetve lehetséges ökotoxikológiai kockázatukat, környezeti sorsukat.

¹ A dolgozatban a gyógyszerhatóanyagok neveit angol nemzetközi szabadnévvel (*INN-név, International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances*) fogom feltüntetni azok globális ismertsége és használata miatt.

2 Szakirodalmi áttekintés

2.1. Gyógyszerek felhasználása, környezetbe jutása

Napjainkban igen elterjedt a szintetikus vegyületek, ezen belül is a gyógyszer hatóanyagok nagy mennyiségű felhasználása, melynek következtében becslések alapján hazánkban évente körülbelül 600-800 tonna gyógyszerhulladék keletkezik (http3).

Murray és munkatársai 2021-ben publikált tanulmányukban írják, hogy az emberiség világszerte 2182 milliárd dózis gyógyszerhatóanyagot használt fel 2020-ban (IQVIA 2021).

A Recyclomed Kft. a gyógyszertárakban kihelyezett gyűjtőládák segítségével évi szinten 160-180 tonna **gyógyszerhulladékot gyűjt be**, melyeket veszélyes hulladék égetőkben semmisítenek meg. Így könnyen kiszámítható, hogy a visszavitelre kerülő gyógyszerhulladék a teljes keletkezett mennyiség 25-30%-a lehet (http3).

A farmakológiailag aktív gyógyszerhatóanyagok (*pharmaceutically active compounds* - PhACs) teljes eltávolítására sajnálatosan a jelenlegi technológiai fejlettség mellett az általános szennyvíztisztítási eljárások nem alkalmasak, így jelentős részük a környezetbe jut. Kümmerer tanulmányában kifejti, hogy nincs olyan szennyvízkezelési technológia, amely minden vegyület esetében jó hatásfokkal működhet, és nagy az energiafogyasztása. Így hosszú távon jobb biológiai lebomlású gyógyszerhatóanyagok alkalmazására lenne szükség (Kümmerer 2010).

A víztesteket, felszíni és felszín alatti vizeket (adott esetben ivóvizet is) egyaránt elérő gyógyszerészeti vegyületek számos különböző forrásból származtak.

A gyógyszerek szennyezhetik a környezetet a **gyógyszergyárakból származó kibocsátásokkal**, valamint a szennyvízzel, illetve nem megfelelő hulladékkezelés révén. Joakim Larsson professzor, a Göteborgi Egyetemről azt találta, hogy a szennyvízben lévő gyógyszerhatóanyag szintek akár meg is haladhatják a gyógyszert szedők vérében talált értékeket, mennyiségeket (Larsson 2014).

A **települési szennyvíz** nagy mennyiségű gyógyszert tartalmaz az emberi salakanyagokból, de a problémát fokozta - a kezelésük szűkös ellenőrzése miatt - a **lejárt vagy fel nem használt gyógyszerek nem megfelelő ártalmatlanítása** is. Sui és munkatársa tanulmányukban kifejtik, hogy lenyelés után a gyógyszerek a vizelettel és a széklettel ürülnek ki változatlan formában vagy metabolitként (Sui et al.2015). Ezt erősítik meg Zainab és munkatársai is, mely szerint a

gyógyszerek mind a szennyvíztisztító telepekre befolyó nyers-, mind az onnan elfolyó tisztított szennyvízben jelen vannak, de megtalálhatók a felszíni víztestekben is, beleértve az édesvízi ökoszisztémákat és a tengeri környezetet, valamint a felszín alatti vizekben a feltöltődési körülmények között keletkező csurgalékvizek miatt (Zainab et al. 2020).

A környezeti elemekben megjelenő gyógyszer hatóanyagok további jelentős forrása a **mezőgazdasági és állattenyésztési hulladék**. Különösen az utóbbi, mivel az intenzív állattartást végző nagygazdaságokban az állatokat gyakran gyógyszer tartalmú takarmány-kiegészítővel etetik, az ürüléket pedig a mezőgazdaságban talajjavítóként hasznosítják, melyekből kimosódás útján bejuthatnak a talajvízbe (Ortúzar et al. 2022)

De igen jelentős környezeti terhelést jelent a **fel nem használt, valamint a lejárt szavatossági idővel rendelkező gyógyszerek kidobása**, melyek a környezetben akkumulálódnak, valamint kijutnak a hazai édesvizekbe is. Több tanulmány is rendelkezésre áll arról, hogy a lejárt gyógyszereket sokan egyszerűen lehúzzák a WC-n (Kümmerer 2010). Ruhoy és Daughton 2007-es becslése alapján az Amerikai Egyesült Államokban évente 19,7 tonna PhAC jut a közcatornákba azáltal, hogy a hozzátartozók az elhunyt rokonaik már nem használandó gyógyszereitől így szabadulnak meg.

Mivel gyógyszerhatóanyagok számtalan helyen előfordulnak, valamint folyamatosan jelen vannak a környezetben, így pseudo-perzisztens szennyezőknek nevezhetjük őket. Több vegyület genotoxikus, citotoxikus, illetve az endokrin diszruptorok hatással lehetnek a hormonrendszerre, hormonháztartásra is. Azonban átfogó ökotoxikológiai tanulmány minden gyógyszerhatóanyaghoz nem áll rendelkezésünkre (Kümmerer et al. 2010). A nem célszervezetekre gyakorolt hatásaik veszélyt jelenthetnek élőlényekre, akár kihathatnak egész populációkra is (http5).

A környezetbe nagy mennyiségben kerülnek ki természetes, valamint különböző **rekreációs emberi tevékenységből eredő, vagy** ahhoz kapcsolódó szennyező anyagok, melyek körébe tartoznak a gyógyszerhatóanyagok is (Ortúzar et al. 2022).

Így pl. a fürdőzés, egyéb vízhez kapcsolódó szabadidős tevékenységek, valamint az egyre növekedő turizmus során a megnövekedett PhAC-k és testápolási termékek miatti nagy mennyiségű makrotápanyag (nitrogén, foszfor) bevitel is potenciálisan negatív hatással lehet a felszíni vizek minőségére (Gonzalez-Alonso et al., 2017; Mandaric et al., 2017)

Bár az antropogén tevékenységek miatt a PhAC-k a vízi környezetet fokozott nyomás alá helyezik, fontos megjegyezni, hogy általánosságban gyógyszerhatóanyagok nagyon alacsony koncentrációban (ng/L-től µg/L-ig) találhatók a környezetben. Ennek ellenére azonban a PhAC-k a biológiai felhalmozódásuk, valamint a hosszú távú hatásaik miatt valódi veszélyt jelentenek a vízi ökoszisztémák egészére (Gheorghe et al. 2016).

2.2. Gyógyszerhatóanyagok környezeti előfordulása, ökotoxikológiai vizsgálata

A gyógyszerészetileg aktív vegyületek (PhAC) első kimutatása vízi ökoszisztémákban és ivóvízben az 1980-as évekre datálható (Staszny et al. 2021).

A felszíni vizek egyre inkább szennyezettek gyógyszerészetileg aktív vegyületekkel, amely a hiányos folyóparti szűrés miatt potenciális kockázati tényező az ivóvíz minőségére nézve (Kondor et al. 2020). Mivel a föld vízkészleteinek nagysága állandónak tekinthető, és mivel a mikroszennyezők csak nehezen lebomló vegyületek, és folyamatos növekedést mutat a velük történő szennyezés, így kijelenthető, hogy a mikroszennyezők koncentrációja a jövőben növekedni fog (http6).

A PhAC-k egyre gyakrabban detektálhatók felszíni-, felszínalatti vizekből, nyers- és tisztított szennyvizekből és ivóvízből is (Gu et al. 2018, Mezzelani et al. 2018).

Wilkinson és munkatársai 104 ország 1052 különböző helyéről vettek mintát, melyeket 61 hatóanyagra elemeztek. A gyógyszerhatóanyagok a vizsgált 258 folyó több mint egynegyedében az élővilágot veszélyeztető koncentrációt érték el. A mintavételi helyek 25,7%-án legalább egy hatóanyag koncentrációja nagyobb volt, mint a vízi élőlények számára biztonságosnak tartott koncentrációk (Wilkinson et al. 2022).

Kondor és munkatársai a 2020-as tanulmányukban a Duna egy erősen urbanizált szakaszán a folyópart szűrési hatékonyságát vizsgálták, és összesen 52 PhAC hatóanyagot detektáltak, melyek közül 32 hatóanyag volt jelen az ivóvízben. Megállapították továbbá, hogy a szűrés hatékonysága nem befolyásolta a gyógyszer koncentrációt. A gyakori PhAC-ok koncentrációja véletlenszerűen fordul elő a működő kutakban (Kondor et al 2020).

Gurke és munkatársai szerint probléma lehet, hogy a szennyvíztisztító telepeket alacsony és változó eliminációs hatékonyság jellemzi. Továbbá megjegyzik, hogy például az antiepileptikumként alkalmazott *lamotrigine* gyógyszerhatóanyag nem eliminálódik, hanem

koncentrálódik a vizsgált szennyvíztisztítóban, ezért koncentrációja a kiáramlásában megnövekedett értéket mutat (Gurke et. al 2015) Ugyancsak a szennyvíztisztító telepek hatékonyságának hiányosságaira mutat rá egy 2017-es tanulmány is, mely szerint a *tramadol* nevű analgetikum egyes európai országok felszíni vizeiben is kimutatható, például Észtországban és Finnországban, és a legmagasabb *tramadol* koncentrációt (256 ng/L) a folyóvízben mérték (UNESCO & HELCOM, 2017). Németországban a felszíni vizekben talált *tramadol* koncentrációja bLOQ²-tól 381 ng/L -ig terjedt (Rua-Gomez and Puttmann, 2012). Ezeket a szennyezettségi szinteket feltehetően a tartós szennyeződések és a szennyvíztisztító telepek alacsony eltávolítási aránya váltotta ki, ami például a *tramadol* esetében körülbelül 3% (UNESCO & HELCOM, 2017).

Mivel világszerte egyre gyakrabban mutatnak ki gyógyszerészetileg aktív hatóanyagokat a nyers és tisztított szennyvízben, felszíni vizekben és ivóvízben, és ezen gyógyszerhatóanyagok már alacsony koncentrációban is káros hatásokat okozhatnak az ökoszisztémában, e hatások értékeléséhez ökotoxicitási tesztek elvégzése szükséges. Az ökotoxicitási adatok azonban sok PhAC-ra szűkösek, és ha rendelkezésre is állnak, az irodalomban szétszórva találhatók.

A gyógyszerkészítmények környezeti koncentrációjának értékei és az ökotoxikológiai adatok elengedhetetlenek a környezeti kockázataik méréséhez, becsléséhez. Dos Santos és munkatársai 2021-es összefoglaló tanulmánya alapján nyers- és tisztított szennyvízben, illetve a felszíni vizekben a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatóanyagok, míg ivóvízben a gombaellenes vegyület és hormonok mutathatók ki a legnagyobb koncentrációban. A vizekből detektálható vegyületek ökotoxikológiai adatai segítségével környezeti kockázatbecslést is végeztek. Ez alapján a *diclofenac*, *naproxene*, *erythromycin*, *roxithromycin* és *17 β -estradiol* magas környezeti kockázatot jelentett. Ez rámutat arra, hogy ezek a gyógyszerek káros hatásokat okozhatnak az ökoszisztémára, és megerősíti, hogy a fejlett technológiák segítségével el kell távolítani őket (Dos Santos et al. 2021).

Az egyik 2014-ben publikált tanulmányban Bean és munkatársai (York-i Egyetem) kimutatták, hogy a szelektív szerotonin visszavétel (SSRI) csoportba tartozó antidepresszáns, *fluoxetine* nevű hatóanyag (mely nem az egyetlen, környezetben jelen lévő antidepresszáns) arra készítette a seregélyeket, hogy ritkábban táplálkozzanak a számukra kulcsfontosságú napkelte és

² below limit of quantification – a kimutathatósági határ alatti koncentráció

napnyugta táplálkozási időben. Továbbá feltételezték, hogy a gyógyszerek különböző keverékei potenciálisan erősebb biológiai hatást gyakorolhatnak, mint külön-külön (Bean et al. 2014)

Az emberi fehérjéket célzó gyógyszerek, valamint gyógyszerhatóanyagok 88%-a nem rendelkezik teljes körű átfogó környezeti toxicitási adatokkal. A jelen gyógyszerek, valamint gyógyszerhatóanyagok a környezetben egyre nagyobb globális aggodalomra adnak okot, és bár Európában és az USA-ban új gyógyszerek jóváhagyásához környezeti kockázatértékelés szükséges, a jelenlegi kiváltó okok és a hatásokon alapuló értékelések megfelelősége igencsak megkérdőjelezhető. Gunnarson és munkatársai rávilágítottak, hogy azoknál a gyógyszereknél, amelyeknél a lehetséges aggodalomra okot adó hatásokat (pl. populációs viselkedés) nem rögzítik a tesztek, további vizsgálatokra lehet szükség a káros környezeti hatások elkerülése érdekében. Ezért további ökotoxikológiai tesztek elvégzése javasolt. Azonban kutatásuk szerint a standardizált végpontok alapján a legtöbb gyógyszerrel azt jósolták, hogy alacsony környezeti kockázatot jelentenek (Gunnarson et al. 2019).

A felszín alatti vizek tekintetében komoly minőségi kihívásokkal kell szembenézni mind a hagyományos szennyezőanyagok, mind az új, aggodalomra okot adó szennyezőanyagok (Contaminants of Emerging Concern - CECs), például a PhAC-k, vagy éppen a testápolási termékek (Personal Care Products - PCPs) és a peszticidek miatt is. Jelentős tudáshiány van a CEC-k felszín alatti vizekben való előfordulásával kapcsolatban, különösen Afrikában. K'oreje és munkatársai 2022-ben megjelent tanulmánya egyedülálló adatokat mutat be tizennégy PhAC, öt PCP és kilenc peszticid koncentrációjáról a kenyai Nzoia folyó medencéjében található talajvízkutakban. Azt találták, hogy 28 CEC volt kimutatható kenyai felszín alatti vizekben, melyek közül a parabének koncentrációja elérte a 10 µg/L-t is. Azt találták továbbá, hogy a *paracetamol*, az antibiotikumok és az antivirális szerek sokkal nagyobb arányban vannak jelen, mint a peszticidek (K'oreje et al. 2022).

A svéd Umea Egyetem szakemberei Tomas Brodin vezetésével az *oxazepam* hatásait kutatták természetes élővizekben. A Svédország legsűrűbben lakott részén áthaladó Fyris folyóban, Uppsalánál mérték az *oxazepam* koncentrációját. Kimutatták, hogy a sügér (*Perca fluviatilis*) hatszor nagyobb koncentrációban halmozza fel izmaiban a szert, mint amekkora mennyiséget a folyóvízben mértek. A sügér alaptermészetét tekintve félénk állat, mely nagymértékben kötődik az ismerős, számára megszokott környezethez. A kísérlet során az

oxazepam hatóanyagú nyugtatóval kezelt hal viselkedését tekintve "felbátorodott", elindult a számára ismeretlen környezet felfedezésére. Miközben a nem kezelt, a kísérlet során kontrollként használt sügér saját fajtársaival "barátkozott", ezzel szemben a gyógyszerrel kezelt elfordult tőlük. Táplálkozása is megváltozott, falánkabban kezdte el felfalni az akváriumban jelenlévő planktonokat. Ha bebizonyosodik, hogy ezen benzodiazepin hatóanyagot tartalmazó szernek a laboratóriumi kísérletben megfigyeltékhez hasonló hatása van természetes körülmények között is, akkor az megváltoztathatja az ökoszisztémát, így pl. a fiatal sügér több algával táplálkozó planktonot fogyaszt el, az az alga elszaporodásához, virágzásához vezethet ([http7](http://7)).

Az ökotoxikológiai vizsgálatokban alkalmazott tesztorganizmusok közül az *Aliivibrio fischeri* és a zebrahal (*Danio rerio*) az adottságaik, tulajdonságaik alapján megfelelő tesztorganizmusok a hatóanyagok vizsgálatához.

Az *Aliivibrio fischeri* által a lumineszcencia gátlása 30 perc elteltével, fotométerrel (luminométerrel) mérhető. A mért fényintenzitás csökkenés közvetlen korrelációt mutat a minta toxicitásának mértékével, a kontroll mintához képest. Ennek az úgynevezett bioszenzor tesztorganizmusnak a használata gyors, érzékeny, megbízható, könnyen reprodukálható tehát megismételhető, valamint felhasználóbarát ([http9](http://9)). Összességében a lumineszcens *AVF* baktériumok alkalmazása hasznos eszköznek bizonyul a toxicitás felmérésében, és nyomon követésében.

A zebrahal (*Danio rerio*) egy kisméretű édesvízi hal, Dél-Ázsiában őshonos halfaj, amely az elmúlt évtizedekben a különböző környezeti kockázatbecslések tanulmányozásának modelljeként szolgál. Továbbá a zebrahalat egyre gyakrabban használják modellként a gerincesek fejlődésére gyakorolt, toxicitási valamint genetikai hatások tanulmányozására (Tremblay. 2010).

A zebrahalak körülbelül 1700 Mb DNS-sel rendelkeznek 25 kromoszómán. A zebrahal genomot mostanra teljesen szekvenálták, ami egy újabb kulcsfontosságú elemet kínál a tudósoknak a szervezet tanulmányozásához (Clark et al. 2019). A zebrahal genomja körülbelül 1 595 582 000 bázispárt és több mint 26 000 fehérjét kódoló gént tartalmaz. Humán fehérjét kódoló gének 70%-ának van ortológja a zebrahalban (Bradford et al. 2017)

A zebrahalat (*Danio rerio*) már régóta használják a környezeti toxicitás értékelésére, és a vízi toxicitás vizsgálatának jóváhagyott modellje. A zebrahal embrió kis mérete, kémiai áteresztő képessége és optikai átlátszósága miatt kis molekulák toxikológiai vizsgálatára is alkalmas.

A ZETA (Zebrafish Embryo Toxicity Assay - zebradánió embrió toxikológiai teszt) a zebradánió fejlődésének korai szakaszaira összpontosít, és a felnőtt zebrahalak vizsgálatához képest humánusabb, idő- és költséghatékony módon kivitelezhető modellnek tekinthető. Olcsó tenyésztése és tartása, gyors szaporodása, egyedfejlődése miatt széles körben alkalmazzák a zebradániót laboratóriumokban (Van Wijk et al. 2016). A zebrahal embrió modell széles körben elismert, mint a vegyi anyagok vizsgálatának potenciális új megközelítési módszere, amely hidat képezhet a sejt- és fehérjealapú vizsgálatok és az emlősökön végzett vizsgálatok között, ezáltal egyfajta aranystandardként szolgál a különféle toxicitásvizsgálatok teszt-szervezetként való használatához (Achenbach et al. 2020).

2.3. A vizsgálatba vont gyógyszerhatóanyagok bemutatása

Mint már bevezetőmben jeleztem, kutatásom motivációját, továbbá az ökotoxikológiai méréseken vizsgálandó gyógyszerek kiválasztásának alapját a Maász és munkatársai 2019-ben megjelent tanulmánya adta. Munkájuk során a gyógyszerészetileg aktív hatóanyagok detektálására 2017 júniusa valamint 2018 áprilisa között került sor a Balatonon. Ebben a nagyszabású vizsgálatban részletesen elemzik a mintákban előforduló gyógyszerhatóanyagokat. A kutatók ebben az időintervallumban összesen 134 gyógyszer hatóanyagát vizsgálták a Balaton vizében. Ezzel a kutatással átfogó képet szerettek volna kapni a Balatonban előforduló különféle szennyeződések mértékéről, típusairól. A felmérés során 69 különböző molekulát azonosítottak be legalább egy minta esetében, melyek közül tizenöt hatóanyagot (***atracurium***, ***atropine***, ***bupivacaine***, ***buspirone***, ***cinolazepam***, ***dibutylon***, ***ethylmorphine***, ***lacosamide***, ***metoclopramid***, ***practolol***, ***procyclidine***, ***propafenone***, ***tetracaine***, ***trimetazidine***, ***3-Cl-ephedrine***) elsőként mutattak ki felszíni vizekben. Ezen vegyületek közül kilenc anyag (félkövérrel kiemelve) esetében, illetve további hat kimutatott anyag nem áll rendelkezésre empirikus ökotoxikológiai adat (Maasz et al 2019).

Maász és munkatársainak eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált vízrendszerekben a szennyvíztelepek lehetnek a PhAC szennyezés legfontosabb forrásai. Ugyanakkor azt is, hogy az időszakosan megnövekedett közvetlen PhAC-terhelésen keresztül a turizmusnak jelentős kimutatható hatása lehet a felszíni vizek minőségére. A Balaton népszerű turisztikai, ill. fesztiválcélpont, így a többnyire rekreációs célú anyagok (pl. koffein, nikotin és tiltott drogok)

megnövekedett száma és koncentrációja figyelhető meg, különösen a nyári időszakban, és ott is a partvonalnál. Sőt, úgy tűnik, hogy PhAC koncentrációja különösen a sekély tavakat veszélyezteti a korlátozott pufferkapacitás (amit alacsony térfogatuk és a viszonylagos hosszú partvonaluk okoz) miatt.

A detektált PhAC-knak nem csak a térbeli, hanem az időbeli eloszlása is nagyfokú variációt mutatott. A kimutatott gyógyszerek száma mintavételi periódusonként 43 és 55 között ingadozott ($48,75 \pm 4,9$). Az észlelt PhAC-ok átlagos száma helyenként szignifikáns volt, alacsonyabb 2018 áprilisában, mint 2017 augusztusában. Az állandó és sűrű populációval jellemezhető helyeken a humán gyógyászatban használt PhAC-ok (antiepileptikumok, ill. kardiovaszkuláris gyógyszerek) uralták a mintákat, míg a tömegturizmusnak kitett helyek átlagosan alacsonyabbak, de változékonnyabbak PhAC-szennyeződés tekintetében. A rekreációs anyagok (pl. koffein és tiltott kábítószer) néhány jelentős szezonális kiugró értékét jelezték ezek a helyszínek, feltehetően közvetlen terhelésük (pl. vizelet) miatt a nyári turisztikai időszakban. Maász és munkatársai célul tűzték ki az eltérések okának feltárása (Maász et. al 2019).

A detektált vegyületek közül 15 esetében nem áll rendelkezésre kísérletes ökotoxikológiai adat, melyek közül 11 tartozik a felszíni vizekből először detektáltak közé. Kutatómunkánk során az először detektált és ismeretlen ökotoxicitású vegyületek közül egyelőre öt vegyületet szereztünk be, melyekkel kísérleteimet végeztem. Munkánkat az *atracurium*-mal, *lacosamide*-dal, *propafenon*-nal és *trimetazidine*-nel végeztük, illetve a vizsgálatba vontuk a szintén ismeretlen ökotoxicitású *trazodone* antidepresszánt is. A következő fejezetekben ezen vegyületeket fogom bemutatni.

A tanulmányban Maász és munkatársai táblázatos formában összegezik a 2017 júniusa és 2018 áprilisa közötti időszakban a mintahelyeken észlelt PhAC-okat. Az előfordulási oszlopok a felmérésekenkénti előfordulási gyakoriságot mutatják vegyületenként 10 mintahelyen. A vizsgálatom tárgyát képező öt gyógyszerhatóanyagra vonatkozó adataikat ebből a kimutatásból kivonatoltam az 1. táblázatban.

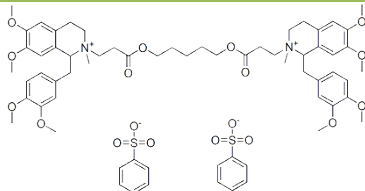
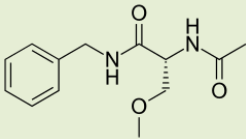
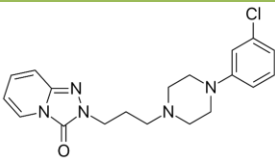
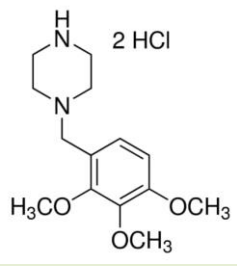
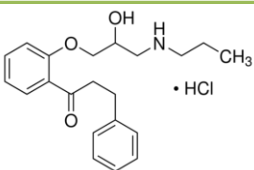
1. táblázat: Az általam vizsgált gyógyszerhatóanyagok Balatonban iqdetektált koncentrációi Maász és munkatársai által végzett felmérésben (Maász et al. 2019)

Kémiai osztály	Átlagos koncentráció [ng/L]				Előfordulási gyakoriság [%]				MIN [ng/L]			MAX [ng/L]			LOQ [ng/L]	
PhAC-ok	jún., aug., nov., ápr.				jún., aug., nov., ápr.				jún.,aug.,nov.,ápr.			jún., aug., nov., ápr				
<i>Atracurium</i> (Egyéb)	-	-	0,3	-	0	0	10	0	-	-	0,3	-	-	0,3	-	0,10
<i>Lacosamide</i> (antiepileptikum)	-	-	9,3	-	0	0	10	0	-	-	9,3	-	-	9,3	-	0,50
<i>Trazodone</i> (antidepresszáns)	0,1	0,4	0,4	-	10	20	10	0	0,1	0,1	0,4	-	0,1	0,7	0,4	0,05
<i>Propafenone</i> (szív-és érrend-szeri gyógyszer)	8,6	34,1	23,3	13,7	30	40	40	20	0,8	0,7	0,6	5,4	18,2	116,3	86,9	22,0
<i>Trimetazidine</i> (szív- és érrend-szeri gyógyszer)	-	-	-	122,2	0	0	0	10	-	-	-	122,2	-	-	-	20,0

Az általam vizsgált gyógyszerhatóanyagok fizikai tulajdonságait, szerkezeti képleteiket, elnevezéseiket az 2. táblázatban összegzem.

2. táblázat: a vizsgált gyógyszerhatóanyagok neve, CAS száma, IUPAC neve, általános fizikai tulajdonságaik, vízdékonyságuk és szerkezeti képletük.

Hatóanyag neve	CAS	IUPAC név	Fizikai tulajdonság	Oldékonyság vízben	Források
<i>Atracurium besylate</i>	64228-81-5	benzenesulfonate;5-[3-[1-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-6,7-dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-ium-2-yl]propanoyloxy]pentyl 3-[1-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-6,7-dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-ium-2-yl]propanoate	szagtalan, fehér kristályos por	27 mg/ml	http33, htp34, http 35 http50, http51

<i>Lacosamide</i>	175481-36-4	(2R)-N-benzyl-2-acetamido-3-methoxypropanamide	fehér, vagy enyhény sárgás színű por	0,465 mg/ml	http4, http36
<i>Trazodone</i>	25332-39-2	2-[3-[4-(3-Chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-one hydrochloride	fehéres por	0,29 mg/ml	http37, http38, http8.
<i>Propafenone</i>	54063-53-5	1-{2-[2-Hydroxy-3-(propylamino)propoxy]phenyl}-3-phenylpropan-1-one	törtfehér színű por	vízben oldhatatlan, 3mg/mL DMSO-ban	http39, http40, http41
<i>Trimetazidine</i>	13171-25-0	1-(2,3,4-trimetybenzyl)piperazine	fehéres por	67 mg/ml	http42, http43, http44
<i>Atracurium besylate</i>					http45
<i>Lacosamide</i>					http46
<i>Trazodone</i>					http47
<i>Trimetazidine</i>					http48
<i>Propafenone</i>					http49

- ***Atracurium besylate***

Az *atracurium besylate* egy neuromuszkuláris blokkoló gyógyszer, vagy vázizom-relaxáns a nem depolarizáló neuromuszkuláris blokkoló szerek kategóriájában, kiegészítésként anesztéziában az endotracheális intubáció megkönnyítésére és a vázizomzat relaxációjának biztosítására alkalmazzák műtét, vagy gépi lélegeztetés során. Az *atracuriumot* a közepes időtartamú, nem depolarizáló neuromuszkuláris blokkoló szerek közé sorolják ([http11](#)).

Ez a vegyület a benzil-ikinolinok néven ismert szerves gyógyszerhatóanyagok osztályába tartozik. Ezek a szerves izokinolint tartalmazó szerves vegyületek, amelyekhez benzilcsoport kapcsolódik ([http12](#)).

Az *atracurium* egy rövid hatástartamú, neuromuszkuláris blokkoló, amely általános érzéstelenítés vagy intubáció alatt végzett gépi lélegeztetés során az izmok ellazítására szolgál ([http13](#)).

Felezési ideje emberekben 20 perc. Biohasznosulása intravénásan alkalmazva 100 %. Metabolizmusa Hoffmanm elimináció (retro Michael-addíció) és észterhidrolízis specifikus észterázokkal. Hatásmechanizmusát tekintve antagonizálja az acetilkolin neurotransmitter hatását azáltal, hogy kompetitív módon kötődik a motoros véglemez kolinerg receptor helyeihez. Ezt az antagonizmust gátolják és a neuromuszkuláris blokkot visszafordítják az acetilkolin-észteráz inhibitorok, például a neosztigmin, az edrofónium és a piridosztigmin ([http14](#)).

Humán felhasználás során a toxicitását tekintve a túlzott dózisok várhatóan fokozott farmakológiai hatásokat váltanak, vagy válhatnak ki. A szer túladagolása növelheti a hisztamin felszabadulásának és a kardiovaszkuláris hatásoknak, különösen a hipotenzióknak, azaz az alacsony vérnyomás kialakulásának a kockázatát ([http15](#)).

A nem lélegeztetett hím és nőstény albínó egerekben és a hím Wistar patkányokban meghatározott intravénás LD₅₀ értéke 1,9, 2,01 és 1,31 mg/kg volt. A halálesetek 2 percen belül következtek be, és légzésbénulást okoztak. A szubkután LD₅₀ nem lélegeztetett hím Wistar patkányokban meghatározott remegés, szemhéjcsüngés, reflexek elvesztése és légzési elégtelenség előzte meg a halált, amely 45-120 perccel az injekció beadása után következett be ([http16](#)).

- ***Lacosamide***

A felnőttkori epilepszia kezelésére alkalmazott hatóanyag. Hatásmechanizmusáról feltételezik, hogy a nátriumcsatornák gátlása révén felelős a fájdalomcsillapításért. A *lacosamide* inkább a depolarizált neuronok gátlására alkalmas, mint a normál nyugalmi potenciállal rendelkező neuronok gátlására. A fájdalomreceptorok túlingerlése az idegi membrán depolarizációjához kapcsolódik. A *lacosamide* a kollapszin válasz mediátor protein-2-hez (CRMP-2) kötődik, egy foszfoproteinhez, amely elsősorban az idegrendszerben expresszálódik, továbbá részt vesz a neuronok differenciálódásában, és az axonok növekedésének szabályozásában. Azonban a CRMP-2 kötődés szerepe az epilepsziás rohamszabályozásban nem tisztázott ([http17](#)).

Az EMA (European Medicines Agency) jelentése szerint jelentős a környezeti expozíció, és a *lacosamide* hatóanyag valószínűleg nem jelent kockázatot a szárazföldi és vízi környezetre ([http18](#)).

Abszorpcióját tekintve a *lacosamide*-nak elhanyagolható a first pass hatása, körülbelül 100%-os a biohasznosulása. Maximális plazmakoncentrációja körülbelül 1-4 órával az orális beadás után következik be, farmakokinetikája dózisarányos. A táplálék nem befolyásolja a felszívódást. Anyagszere utvonatát tekintve a *lacosamide* a CYP2C19 szubsztátja. Más CYP izoformák vagy nem-CYP enzimek relatív hozzájárulása a *lacosamide* metabolizmusához nem ismert. A metabolizmus során elsődlegesen kiválasztott anyagok a *lacosamide* eredeti formában (a dózis kb. 40%-a), O-dezmetil-metabolitja (körülbelül 30%) és szerkezetileg ismeretlen poláris frakció (~20%). A fő emberi metabolit, az O-dezmetil- *lacosamide*, melynek nincs ismert farmakológiai hatása ([http19](#)).

A *lacosamide* gyakran jelentett mellékhatásai: homályos látás, diplopia, szédülés, fáradtság, fejfájás, hányinger, nystagmus zavar, remegés, hányás és ataxia. Egyéb mellékhatások: rendellenes járás, gyengeség, memóriazavar és szédülés ([http20](#)).

Az orálisan beadott, a letális dózis (LD₅₀) értéke patkányokban 253 mg/kg ([http21](#)).

- **Propafenone**

A *propafenone* szívritmuszavarok kezelésére orálisan, azaz szájon át alkalmazandó antiaritmiás szer, amelyet több évtizede széles körben alkalmaznak. A hosszú távú *propafenone*-terápia szérum-aminotranszferáz-emelkedéssel hozható összefüggésbe, és ritka esetben okozhat kolesztikus májgyulladást. A *propafenone* egy aromás keton, amely 3-(propil-amino)-propán-1,2-diol, amelyben az elsődleges hidroxicsoport hidrogénje 2-(3-fenil-propanoil)-fenil-csoporttal van helyettesítve. Ez egy 1C osztályú antiaritmiás gyógyszer, helyi érzéstelenítő hatással, és hidroklorid sóként használják szupraventrikuláris és kamrai aritmiák kezelésében. Szívritmuszavar elleni gyógyszerként is szerepet játszik ([http22](#)).

Hatásmechanizmusát tekintve a *propafenone* elektrofiziológiai hatása a monofázisos akciós potenciál felfutási sebességének (0. fázis) csökkentésében nyilvánul meg. A Purkinje rostokban, és kisebb mértékben a szívizom rostjaiban a *propafenone* csökkenti a gyors nátriumionok által szállított befelé áramot, amely a gyógyszerek antiaritmiás hatásáért felelős ([http23](#)).

Szájon át történő alkalmazást követően szinte teljesen felszívódik (90%). A szisztémás biohasznosulás 5-50% a jelentős first-pass metabolizmus miatt. Fehérjekötés 97%. Elsősorban a májban metabolizálódik, ahol gyorsan és nagymértékben két aktív metabolittá degradálódik, az 5-hidroxi-*propafenone*-ná és az N-depropil-*propafenone*-ná. Azonnali hatóanyag-leadású tabletták beadását követően a *propafenone* metabolitjainak körülbelül 50%-a ürül a vizelettel. Félleletideje 2-10 óra ([http24](#)).

Toxicitását tekintve a *propafenone* túladagolás tünetei (általában az első 3 órában a legsúlyosabbak) lehetnek görcsrohamok (ritkán), szívritmuszavarok, alacsony vérnyomás és álmoság ([http24](#)).

- **Trazodone**

Felnőtteknél súlyos depressziós zavar esetén alkalmazott orális, azaz szájon át alkalmazandó antidepresszáns hatóanyag. A *trazodone* hatásmechanizmusa nem teljesen ismert. Azonban az tudott, hogy gátolja a szerotonin újrafelvételét, és blokkolja mind a hisztamin, mind az alfa-1-adrenerg receptorokat. Számos jelentés kimutatta, hogy más mechanizmusokra való hatások is előfordulhatnak, beleértve a szerotonin 5-HT_{1a}, 5-HT_{1c} és 5-HT₂ receptor altípusainak antagonizmusát. A *trazodone* legerősebb antagonizmusa a szerotonin 5-HT_{21c}

receptorokon jelentkezik, ami nem zárja ki a szerotonin felvételét. A *trazodone* antidepresszáns hatása a receptorkötődés gátlásából fakad, ami lecsökkenti a keringő neurotranszmitterek mennyiségét, ezáltal depressziót okozva (http25).

FDA az USA-ban 1981-ben engedélyezte először humán felhasználásra, ott 2020-ban a 21. leggyakrabban felírt gyógyszer volt, több mint 26 millió recepttel (http26). Magyarországon is forgalomban van vényköteles gyógyszerként Trittico AC márkanéven 75 mg, valamint 150 mg hatóanyag-tartalommal rendelkező tabletták formájában (http27).

A *trazodone* leggyakrabban fellépő mellékhatásai közé tartozik a fejfájás, a fáradtság, a szédülés, és az álmoság. További kockázatok közé tartoznak az antikolinerg hatások (szájszárazság), az ortosztatikus hipotenzió, a QT-szakasz³ megnyúlása, a merevedési zavar és az öngyilkossági gondolatok számának növekedése. A *trazodone* máj- és vese-metabolizmusa miatt fokozott elővigyázatosság szükséges a súlyos májkárosodásban és súlyos vesekárosodásban szenvedő betegeknél (Haria et al. 1994).

A *trazodone* gyorsan felszívódik, a plazma-csúcskoncentrációját 0,5-2 óra múlva éri el. Biohasznosulása 65%. Nagymértékben metabolizálódik és főként a vesén keresztül választódik ki, felezési ideje 13 óra. A *trazodone* elsősorban a CYP3A4 és CYP2D6 utakon metabolizálódik a májon keresztül. Erősen (85-95%) fehérjéhez kötődik (Jarema et al. 2011).

A szájon át beadott hatóanyag letális dózisának (LD₅₀) értéke patkányokban 690 mg/kg, tehát a vizsgálatba bevont tesztorganizmusok populációjának 50 %-a ennél a *trazodone* dózissal elpusztult (http28).

Egy 2022-ben publikált tanulmány szerint a *trazodone* egyszeri adagja csökkentette a stressz jeleit a kutyáknál az állatgyógyászatban, az állatorvosi látogatások során. Hasznos lehet szorongáscsökkentő gyógyszerként a szorongásban érintett kutyák számára, ami jobb minőségű klinikai vizsgálatokat, és az állatok jólétének javulását eredményezheti (Kim SA et.al 2022) Jelenleg nincs *trazodone* tartalmú állatgyógyászati készítmény, azonban a humán készítmények off-label használata kapcsán a jövőben ebből a forrásból is várható *trazodone*-terhelés.

³ Szívkamra izomzat depolarizációjának és repolarizációjának együttes időtartama.

Ez a gyógyszerhatóanyag különösen mérgező a vízi szervezetekre. Ezt az anyagot és tartályát veszélyes hulladékként kell ártalmatlanítani, továbbá kerülni kell a környezetbe való kibocsátást (http29).

A *trazodone*-t környezeti mintákban elsőként Giebułtowicz és Nałęcz-Jawecki vizsgálta 2014-ben (Giebułtowicz & Nałęcz-Jawecki et al. 2014).

- ***Trimetazidine***

A szív- és érrendszerre ható *trimetazidine* egy piperazin-származék. A stabil angina pectoris tüneti kezelésében kiegészítő terápiaként javasolt alkalmazni olyan betegeknél, akik nem megfelelően kontrollálják az első vonalbeli terápiákat, vagy nem tolerálják azokat. A betegeket tájékoztatni kell a csökkent vese- vagy májfunkcióval, az extrapiramidális tünetek súlyosbodásával vagy egyéb mozgászavarokkal, valamint az elesés kockázatával kapcsolatban (Masmoudi et al. 2012).

A *trimetazidine* hatásmechanizmusa nem teljesen ismert. A *trimetazidine* gátolhatja a mitokondriális 3-ketoacil koenzim A tiolázt, csökkentve a hosszú szénláncú zsírsavak β -oxidációját, de nem a glikolízist a szívízomban. A csökkent hosszú szénláncú zsírsav β -oxidációt a fokozott glükóz-felhasználás kompenzálja, ami megakadályozza a szívízom pH-jának csökkenését és a kontraktilitás további csökkenését. Egy másik tanulmány azonban azt sugallja, hogy a 3-ketoacil-koenzim A tioláz nem feltétlenül a *trimetazidine* célpontja, és ez a mechanizmus hibás lehet. Fehérjekötését tekintve a *trimetazidine* 15%-ban kötődik a plazmafehérjékhez. 79-84%-a eliminálódik a vizelettel, 60%-a változatlan kiindulási anyagként. Felezési ideje egészséges alanyokban 7,81 óra. Az orális LD₅₀ patkányokban 1700 mg/kg, egerekben 1550 mg/kg. A szubkután LD₅₀ patkányokban 1500 mg/kg, egerekben 410 mg/kg (http30)

A kimutatott vegyület nagy száma (54) ellenére a *citalopram*, a *propranolol*, a *codeine* és a *trimetazidine* koncentrációjuk alapján csak a haltest és a pikkely alakját befolyásolja szignifikánsan. Ez a négy PhAC magas (*citalopram*), közepes (*propranolol* és *codein*) és alacsony (*trimetazidine*) kockázati szintet mutatott a környezeti kockázatértékelés során, amely a kockázati hányados számításán alapul (Staszny et al. 2021).

Kot Wasik és munkatársainak 2016-os mérési adatai alapján nyers szennyvízben 826,7 ng/L koncentrációig volt *trimetazidine* kimutatható (Kot-Wasik et. al 2016).

A *trimetazidine* hatóanyag természetes felszíni vizekből való első detektálását Maász és munkatársai érték el. Átlagos koncentrációt tekintve Áprilisban 122,2 ng/L értéket mértek (L. 1. táblázat) (Maasz et al. 2019).

Ez a fentebb felsorolt öt hatóanyag gyógyszerészetileg aktív vegyületnek minősül (PhAC). Az öt hatóanyagra vonatkozóan mindezidáig nincsen széleskörű ökotoxikológiai információ, illetve kísérletes ökotoxicitási hatásos koncentráció érték. Mindössze a *trazodone*, *trimetazidine* és *propafenone* esetében lehet mennyiségi szerkezet-aktivitási összefüggés alapján meghatározott értékeket találni az ECOSAR adatbázisban. Sanderson és munkatársai tűzcselle (*Pimephales promelas*) modellszervezeten a QSAR (modellezett) módszertannal vizsgálták az utóbbi három hatóanyagot.

Az EC₅₀-es érték QSAR (quantitative structure-activity relationship – kvantitatív szerkezet-hatás összefüggés) modell alapján a *trazodone*-nál 0,009 mg/L, *trimetazidine*-nál 552 mg/L, és a *propafenone* esetén 12 mg/L tűzcsellére vonatkozóan, míg 0,25, 6,5 és 1 mg/L algára, ill. 0,125, 34 és 1,1 mg/L *Daphniára* nézve (Sanderson et al. 2004).

3 Anyag és módszer

Diplomamunkámban eddig részletesen jellemeztem a gyógyszerhatóanyagokat, vegyületeket, bemutattam hatásmechanizmusukat, leggyakoribb felhasználásukat, mellékhatás-profiljukat, környezeti bioakkumulációjukat, nem célszervezetre gyakorolt hatásait, jelen fejezetben rátérek a laboratóriumban elvégzett kísérletek leírására, majd bemutatom ezek eredményeit.

Mindezidáig csak a *propafenone*, *trazodone* valamint a *trimetazidine* esetén határoztak meg akut toxicitási értékek a QSAR modellel (Sanderson et al. 2004). A vizsgált gyógyszerhatóanyagokra nem található kísérletes ökotoxikológiai információ.

A becsült hatásmentes koncentráció (PNEC – predicted no effect concentration) az anyag azon koncentrációja bármely környezetben, amely alatt a káros hatások nagy valószínűséggel nem lépnek fel hosszú vagy rövid távú expozíció során. A PNEC értékek konzervatívnak minősülnek, és megjósolják azt a koncentrációt, amelynél a vegyi anyagnak valószínűleg nincs toxikus hatása. A PNEC értékeket a rendelkezésre álló ökotoxikológiai adatok segítségével lehet meghatározni biztonsági faktorok alkalmazása mellett (http52).

Továbbá a környezeti kockázat értékelés során az ún. PEC (előrejelzett környezeti koncentrációhoz) hasonlítják. Összességében, ha a PEC/PNEC kisebb, mint 1, akkor a kockázat elfogadható. környezeti kockázatértékelés során a PNEC -értékeket a tényleges vagy előre jelzett környezeti koncentrációhoz (PEC) hasonlítják össze annak megállapítása érdekében, hogy az anyag kockázata elfogadható-e vagy sem. Ha a PEC/PNEC <1, a kockázat elfogadható (http31).

3.1. Gyógyszerhatóanyagok és törzsoldatok

A vizsgálatba bevont gyógyszerhatóanyagokat a Merck Kft-től szereztük be a toxicitási kísérletek elvégzéséhez.

1 mg/mL koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk *atracurium* besylate (tisztaság: 99,9%), *lacosamide* (tisztaság: 99,9%), *propafenone* (tisztaság: 99,9%), *trazodone* (tisztaság: *neat*) valamint a *trimetazidine* (tisztaság: 100 %) felhasználásával.

A törzsoldatok elkészítéséhez a *propafenone* hatóanyagokat dimetil szulfoxidban (DMSO, CAS 67-68-5, ≥99.99%-os tisztaságú, Fisher Scientific), az *atracurium*, *lacosamide*, *trazodone* valamint a *trimetazidine* hatóanyagokat pedig desztillált vízben oldottuk fel.

3.2. *Aliivibrio fischeri* akut biolumineszcencia gátlási teszt

A vizsgálatba vont öt gyógyszerhatóanyag toxicitását akut 30 perces Microtox® teszttel (ISO 11348) vizsgáltam Microtox® Model 500 Analyzer (SDI) berendezés segítségével. Tesztszervezetként az *Aliivibrio fischeri*-t (DSM 7151, NRRL B-11177) alkalmaztam.

Az *Aliivibrio fischeri* (régii néven *Vibrio fischeri*, rövidítve *AVF*) egy fakultatív anaerob, Gram-negatív, pálcika alakú nem patogén baktérium, amely világszerte megtalálható mélytengeri környezetben. A baktérium kulcsfontosságú kutatószervezet a mikrobiális biolumineszcencia, a kvórumérzékelés és a baktérium-állat szimbiózis vizsgálatában. Az *AVF* egyike annak a sok baktériumfajnak, amelyek általában szimbiotikus kapcsolatot alakítanak ki a tengeri élőlényekkel, például a *Euprymna scolopes* nevű kurtafarkú tintahallal. Az *AVF* biolumineszcenciáját a *lux* operon transzkripciója okozza, amelyet populációfüggő kvórumérzékelés indukál (Madigan M, Martinko J, szerk (2005).).

Miyashiro és Ruby 2012-ben molekuláris mikrobiológia szaklapban megjelent tanulmányukban írják, hogy a fénytermelésért felelős géneket elsősorban a *LuxR-LuxI* kvórumérzékelő rendszer szabályozza. A *LuxR-LuxI* mellett számos más genetikai elem és környezeti körülmény szabályozza a biolumineszcencia termelést. A *luxCDABEG* gének felelősek a fénykibocsátó képességért, ami kapcsolatban áll a kvórumérzékelő rendszerrel, amely kémiai jeleken alapuló sejtek közötti kommunikációt fed le. Amennyiben az *AVF* mérgező, toxikus anyaggal kerül érintkezésbe, ennek a biolumineszcens baktériumnak az anyagcsere-légzési folyamatai megszakadnak, ami csökkenti a fénykibocsátás intenzitását, valamint annak mértékét (Miyashiro & Ruby 2012).

A vizsgálatomba bevont gyógyszerhatóanyagok toxicitását a fénykibocsátási képességre gyakorolt gátló hatásuk alapján határoztam meg. A kísérletekhez az 1 mg/mL koncentrációjú *atracurium besylate* (izomrelaxáns), *lacosamide* (antiepileptikum), *propafenone* (kardiovaszkuláris szer) *trazodone* (antidepresszáns) valamint a *trimetazidine* (kardiovaszkuláris szer) törzssoldatokból és 2 m/m%-os NaCl oldatból készítettem el a hígítási sorokat két ismétlésben. Az ISO 11348 szabvány alapján a védőközegben fagyasztva (-20 °C) tárolt *AVF* tenyészetet reaktiváló oldatban élesztettem fel 15 percen át 15 °C-on inkubálva. Ezután a reaktivált tesztszervezetnek Microtox® M500 készülékkel megmértem a kezdeti fénykibocsátását, majd minden hígítási taggal exponáltam a tesztszervezetet. 30 perces

kontaktidő után ismét megmértem a fénykibocsátást, melyet a kezdeti értékhez viszonyítva minden egyes hígítási tagra vonatkoztatva nyerhető az ún. gátlási%. A koncentráció-válasz értékek alapján a vegyületek 50%-os fénykibocsátás gátlást okozó effektív koncentrációit (EC) MicrotoxOmni® program segítségével (version 1.1, AZUR Environmental Ltd.) határoztuk meg.

3.3. Krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt

Annak érdekében, hogy az akut sejttoxicitás mellett a vegyületek hosszú távú hatásait is megismerjük az AVF szervezeten, mikrotiter lemezre adaptált, meghosszabbított kontaktidejű (25 óra) tesztet alkalmaztunk.

Ennek során -80 °C-on tárolt AVF tenyészetből 50 µL 50 ml Bacto Marine (Difco 2216) táplevesbe oltottunk, majd overnight rázatva inkubáltuk 20 °C-on 170 rpm fordulaton.

A vizsgálati anyagokból fekete, lapos aljú PS mikrotiter lemezen 12 tagú felező hígítási sorokat készítettünk 3 párhuzamos beállításban 10 µL végtérfogatban. Az overnight AVF tenyészet optikai denzitását 0,1 értékre állítottuk 600 nm-en mérve, majd minden well-be 190 µL inokulumot mértünk. Negatív kontrollként 10 µL steril desztillált vizet használtunk.

A fénykibocsátást 3,5, 10, 15 és 25 óra kontaktidő után mértük Victor™ X Light 2030 Luminescence Reader (Perkin Elmer, USA) segítségével. A 25 órás kontaktidő alatt 20 °C-on 180 rpm-en ráztuk a plate-et.

3.4. Zebradánió embrió ZETA teszt

A zebrahal (*Danio rerio*) embrió a gerincesek fejlődésének fontos modellszervezetévé vált tudományos körökben, beleértve a toxikus anyagok vizsgálatát, amelyek potenciális jelentőséggel bírnak mind az emberi és környezeti egészség, mind a biomedicina szempontjából (Berry et al. 2007).

Ahhoz, hogy minél komplexebb kutatási eredményeket kapjunk, alternatív ökotoxikológiai tesztstruktúráként a zebradániót (*Danio rerio*) is bevontuk a vizsgálatba, 120 órás kontaktidejű ZETA (Zebrafish Embryo Toxicity Assay) módszert alkalmazva.

A kutatási munka során ZETA (zebrafish embryo toxicity assay) módszert alkalmaztunk. A laboratóriumi AB zebradánió vonalat 30 nőstényből és 30 hímiből álló tenyészcsoportokban külön-külön tartjuk. A halakat középhőmérsékleten, 25 °C-on, 14 óra mesterséges fény és 10 óra sötétség ciklikus alkalmazása mellett tartottuk. A zebradánió egyedeket a kísérlet napja előtti délután ívársra

válaszfállal ellátott szaporító medencékbe helyeztük. Ezt követő nap eltávolítottuk a válaszfalakat, összegyűjtöttük az ikrákat, majd 10 cm-es Petri-csészékbe rendszervízbe helyeztük őket. A tesztekhez 24 nyílásos tesztlemezeket használtunk (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd.), ezekbe nyílásonként 5-5 4-32 sejtes (≤ 2 hpf (hours post –fertilization)) állapotú embriót helyeztünk.

Az embriókra 2 ml gyógyszerhatóanyagokat tartalmazó vizes oldatokkal exponáltunk. A tesztet négy ismétlésben végeztük, 5 különböző koncentrációban - töményebbtől a hígabb felé haladva. 5-5 zebradánió embrió tesztsszervezettel dolgoztunk, egy kontroll csoporttal kiegészítve, amibe E3 embriómédiumot tettünk, illetve a *propofenon* esetén DMSO tartalmú E3-at alkalmaztunk.

Az inkubációs idő leteltét követően az embriók fejlődését 72, 96 és 120 óránál fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk, figyeltük meg a mortalitást, továbbá a szubletális tünetek megjelenését.

A tesztekéből származó mortalitási adatokat felhasználva, letális (halálos) koncentrációkat GraphPad Prism szoftver segítségével számoltunk, a koncentráció-válasz görbékre nem-lineáris regressziós modellillesztéssel került kiszámításra.

4 Eredmények

4.1. *Aliivibrio fischeri* akut biolumineszcencia gátlási teszt

A kutatásunkba bevont öt gyógyszerhatóanyag medián effektív koncentrációját kerestem, mely a vizsgálatba bevont gyógyszervegyületek koncentrációjának mérőszáma, és az alapvonal és a maximális hatás között félúton vált ki választ a 30 perces expozíció után.

A gyógyszerhatóanyagok közül a kardiovaszkuláris szerként alkalmazott *propafenone*, valamint az antidepresszáns *trazodone* bizonyult toxikusnak az *Aliivibrio fischeri* tesztstruktúra számára rövid távú kitettség során. A vizsgálatban megállapítottuk, hogy a *propafenone* gátolta legintenzívebb mértékben a biolumineszcenciát: 92,25 mg/L-es koncentráció esetében 50 %-os fénykibocsátás gátlást tudtunk megfigyelni harminc perces expozíció után. A második legtoxikusabb gyógyszerhatóanyagnak a *trazodone* bizonyult, melynek EC₅₀ értéke 107,6 mg/L.

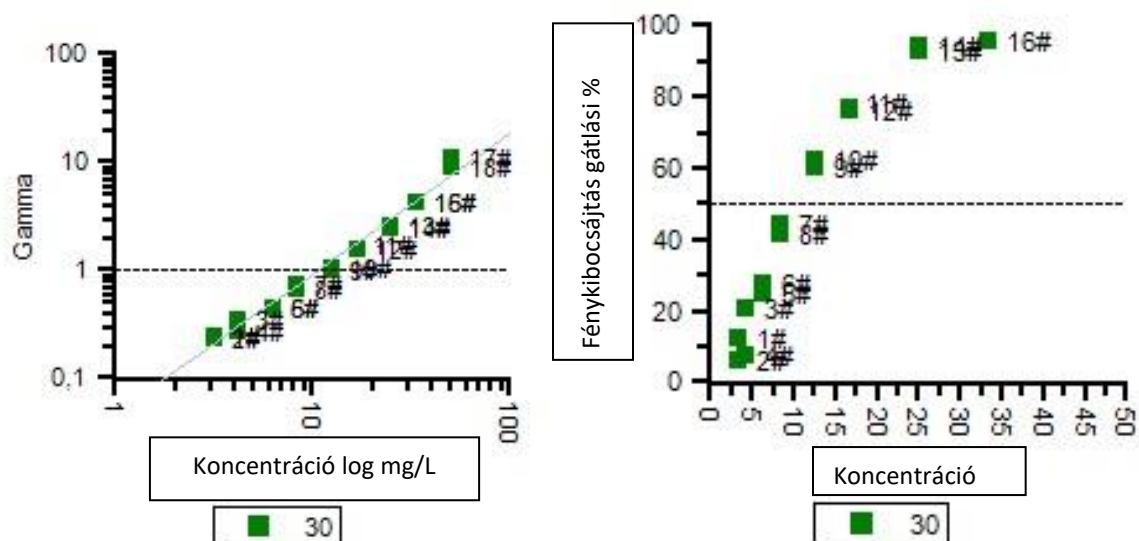
A vizsgált további három hatóanyag, azaz az *atracurium*, a *trimetazidine*, valamint a *lacosamide* esetében a vizsgált koncentráció tartományban nem volt biolumineszcencia gátlás mérhető, emiatt nem vált lehetővé a félhatásos koncentráció meghatározása.

Bár alapvetően a medián effektív koncentráció meghatározása volt a célunk, a vizsgált hatóanyagok teszteredményeit grafikonokba exportáltuk, melyben további biolumineszcencia gátlási (10, 20, 50, 80, 90, 95) százalékokra vonatkozó értékek is leolvashatók. A toxicitást mutató *propafenone* és *trazodone* mért adatait az alábbi 1-2. számú ábrák mutatják (Az öt hatóanyag eredményei az 1-5. mellékletekben tekinthetők meg.)

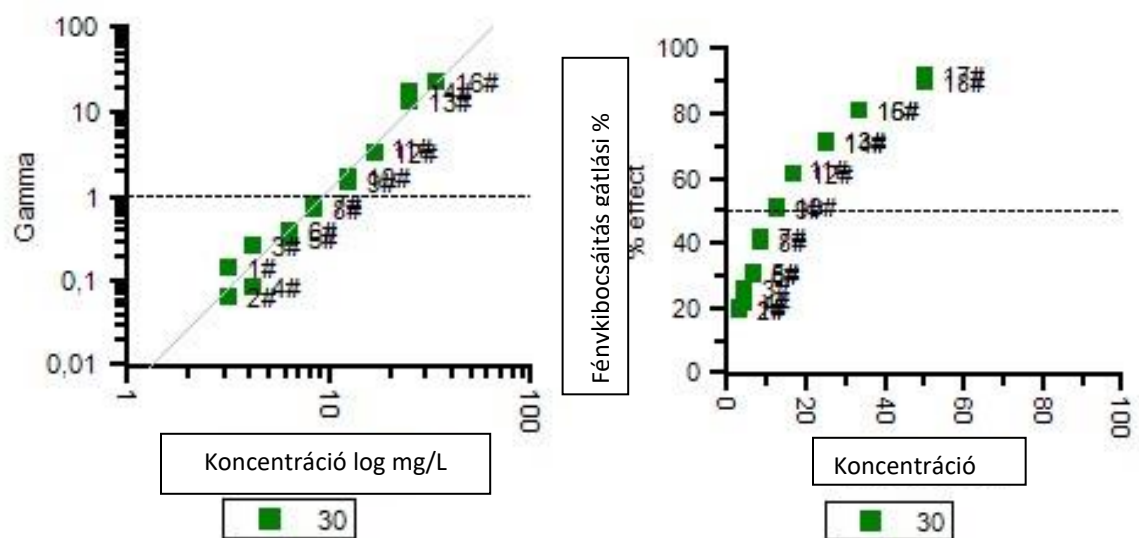
Az első függvények mindkét esetben logaritmikusan skálázottak.

A *propafenone* esetében (1. ábra) a fénykibocsátási gátlási százalék arányosan növekszik a hatóanyag koncentráció mennyiségének emelésével.

Az antidepresszáns *trazodone* esetében az látható, hogy viszonylag magas gátlási biolumineszcencia gátlást okozott a legalacsonyabb, 30 mg/L-es hatóanyag koncentrációban is.



1. ábra: Propafenone által kiváltott akut biolumineszcencia gátlás *Aliivibrio fischeri* testszervezetben



2. ábra: Trazodone által kiváltott akut biolumineszcencia gátlás *Aliivibrio fischeri* testszervezetben

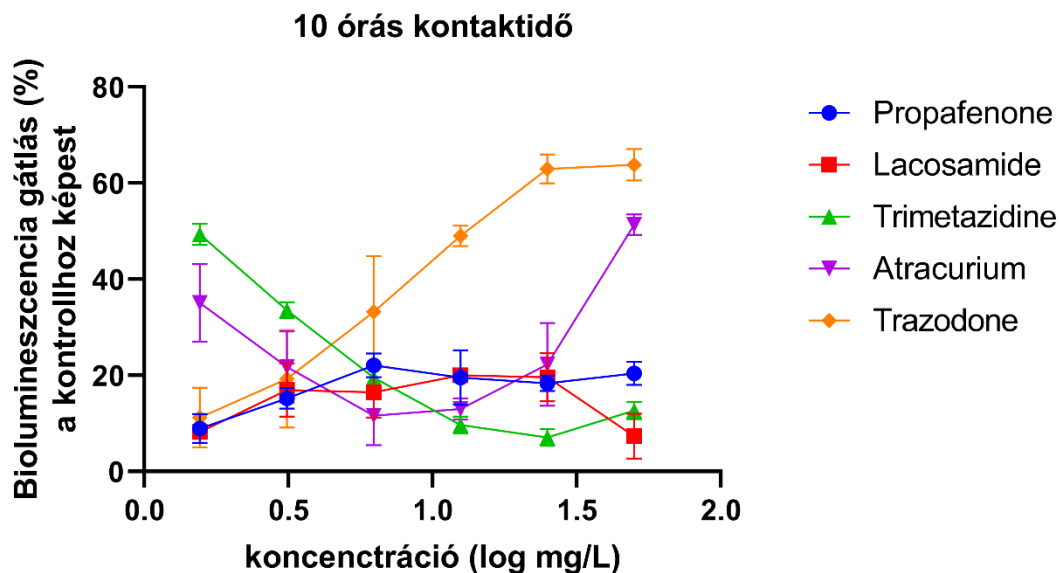
4.2.A krónikus *Aliivibrio fischeri* teszt

Meghosszabbított kontaktidejű (25 órás) krónikus AVF tesztet végeztünk mind az öt hatóanyag alkalmazásával. A tesztben az *Aliivibrio fischeri* a 10 és 15 órás expozíciós időnél bizonyult a legérzékenyebbnek és a legmegbízhatóbbnak. Ez a két idő a statisztikailag releváns.

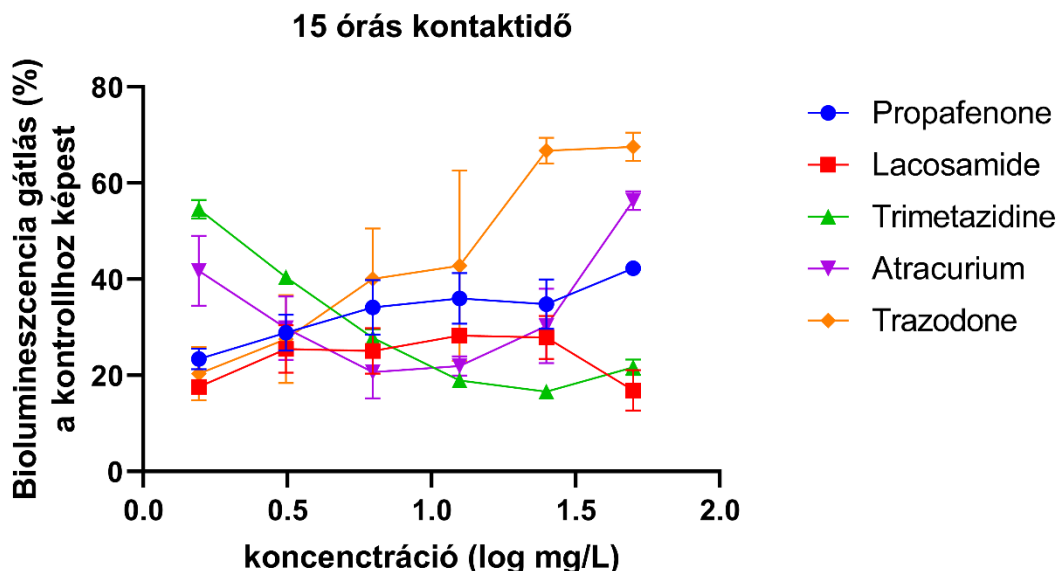
Az akut teszt során a *lacosamide*, az *atracurium* és a *trimetazidine* nem mutatott toxicitást, és a *lacosamide* esetében a krónikus AVF tesztben sem történt inhibíció. Ezzel szemben az *atracurium* hatóanyagánál a krónikus AVF tesztben az EC₅₀ értéke bár viszonylag magas, a 608, ill. 601,7 mg/L koncentrációnál 50%-os fénykibocsátási gátlást okozott a 10 és 15 órás kontaktidőnél. Figyelmet érdemel viszont, hogy az összes vizsgált hatóanyag közül - az akut tesztben hatástalannak bizonyult - *trimetazidine* esetén az inhibíció nagyságrendekkel volt a legmagasabb az 1,439 (10h) és 1,63 (15h) mg/L EC₅₀ értékekkel.

A 10 és 15 órás eredményeket a 3. táblázat tartalmazza, továbbá a jobb áttekinthetőség érdekében az 3-4. számú grafikonokba exportáltam.

A krónikus tesztnél tehát relatíve magas toxicitást két gyógyszerhatóanyag - a *trimetazidine* és a *trazodone* - mutatott. A grafikonok alapján a *trazodone* biolumineszcencia gátló hatása mind a 10, mind pedig a 15 órás kontaminációs idő esetén emelkedett a hatóanyag koncentráció növelésével. Viszont a *trimetazidine* esetében inverzitás (a koncentráció növekedésével csökken a hatás), az *atracurium* esetében pedig U-alakú görbe látható (azaz az alacsonyabb, illetve a magasabb koncentrációk esetében volt csak gátlás tapasztalható), mely jelenségek lehetséges okainak felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.



3. ábra: Fénykibocsátás gátlás az *Aliivibrio fischeri* testszervezetben 10 órás kontaktidő után a krónikus AVF tesztben



4. ábra: Fénykibocsátás gátlás az *Aliivibrio fischeri* testszervezetben 10 órás kontaktidő után a krónikus AVF testben

Az akut és krónikus AVF testben mért effektív koncentráció eredményeket a 3. táblázatban összegeztem (Jelmagyarázat: „n.t.”- a hatóanyag nem volt toxikus a testszervezetre a vizsgált koncentráció tartományban.). Több hatóanyag esetében megfigyelhető, hogy a krónikus test során érzékenyebbnek bizonyult a testszervezet. A *trazodone* esetében a krónikus testben jóval alacsonyabbnak bizonyult az EC_{50} érték. A különbség a *trimetazidine* esetében a legmarkánsabb: míg a hatóanyag a legnagyobb alkalmazott végkoncentrációban (500 mg/L) sem okozott gátlást 30 perces expozíció után, addig a krónikus testben 10 és 15 órás kontaktidő után is igen alacsony, 1,4 és 1,6 mg/L volt az 50%-os biolumineszcencia gátlást okozó koncentráció.

3. táblázat: Az akut és krónikus *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási test eredményei (n.t. – nem volt toxikus a hatóanyag a testszervezetre a vizsgált koncentráció tartományban)

Gyógyszer-hatóanyagok	Akut AVF EC_{50}		Krónikus AVF EC_{50} (mg/L)	
	%	mg/L	10 h	15 h
<i>Propafenone</i>	9,225	92,25	n.t.	251,7
<i>Trazodone</i>	10,76	107,6	16,36	13,33
<i>Atracurium</i>	n.t.	n.t.	608	601,7
<i>Trimetazidine</i>	n.t.	n.t.	1,439	1,63
<i>Lacosamide</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

4.3. ZETA teszt eredményei

Mindegyik vizsgált hatóanyag gyakorolt valamilyen hatást a teszt szervezetre.

Az *atracurium* bizonyult a legtoxikusabbnak a vizsgálatba vont gyógyszerhatóanyagok közül a zebradánióban, letális koncentráció értéke $LC_{50}=18,4$ mg/L.

A második legtoxikusabbnak a *propafenone* bizonyult $LC_{50}=113,7$ mg/L-t értékkel. Ezt követte az antidepresszáns *trazodon* ($LC_{50}=255$ mg/L), a *trimetazidine* ($LC_{50}=582,8$ mg/L) értékekkel. A legkevésbé toxikusnak a *lacosamide* ($LC_{50}=1408$ mg/L) eredményezett a 120 órás ZETA teszt végén.

Összességében megállapítható tehát, hogy az *atracurium* egy nagyságrenddel kisebb koncentrációban gyakorolt azonos hatást a teszt szervezetre a többi vizsgált hatóanyaghoz képest.

A ZETA tesztben vizsgált gyógyszerhatóanyagok mért félhatásos, effektív medián koncentrációt a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A ZETA teszt során vizsgált gyógyszerhatóanyagok (*Propafenone*, *Trazodone*, *Atracurium*, *Trimetazidine*, *Lacosamide*) LC_{50} értékei

Gyógyszerhatóanyagok	LC_{50} mg/L
<i>Propafenone</i>	113,7
<i>Trazodone</i>	255
<i>Atracurium</i>	18,4
<i>Trimetazidine</i>	582,8
<i>Lacosamide</i>	1408

A teszt során a mortalitás mellett szubletális tüneteket is megfigyeltünk. A teszt eredményeit – a tüneteket, azok megjelenési koncentrációit és a megjelenés intenzitását - az 5. táblázatban foglaltam össze.

A hatóanyagoknak a *Danio rerio* teszt szervezetre gyakorolt hatását fénymikroszkóppal vizsgálatuk. A 120 órás zebradánió teszténél változatos (nem halálos) szubletális tünetek is jelentkeztek. Azokban az esetekben, melyeknél a különböző szubletális tüneteket, már nem tudtuk elkülöníteni egymástól, teljes testtorzulást állapítottunk meg.

5. táblázat: A ZETA teszt során vizsgált gyógyszerhatóanyagok hatására fellépő szubletális tünetek az egyes hatóanyag-koncentrációkban. Perikardiális ödéma (PÖ), szik ödéma (SZÖ), szik elszíneződés (SZIK), gerinctorzulás (GT), teljes testtorzulás (TTT), úszóhólyag hiánya (ÚH). Tünetek megjelenésének intenzitását a + jelek mutatják (+: legalább egy egyednél megjelent, +++++: minden egyednél megjelent).

Hatóanyag: Propafenone					
	1000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L	62,5 mg/L
PÖ					
SZÖ				++	++++
SZIK				++	++++
GT					+
TTT					
ÚH				++	+
Hatóanyag: Trazodone					
	100 mg/L	50 mg/L	25 mg/L	12,5 mg/L	6,25 mg/L
PÖ		++	++		
SZÖ		+++	++++	++++	+++
SZIK		+++	++++	++++	++
GT		++	+++		
TTT				+	
ÚH		+++	++++		+
Hatóanyag: Atracurium					
	100 mg/L	50 mg/L	25 mg/L	12,5 mg/L	6,25 mg/L
PÖ				++	
SZÖ			+	++++	++++
SZIK			+	++++	++++
GT				++	
TTT					
ÚH				++++	
Hatóanyag: Trimetazidine					
	1000 mg/L	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L	62,5 mg/L
PÖ					+
SZÖ		++++	++++	++++	++++
SZIK		++++	++++	++++	+++
GT					
TTT					
ÚH		++++	++		+
Hatóanyag: Lacosamide					
	500 mg/L	250 mg/L	125 mg/L	62,5 mg/L	31,25 mg/L
PÖ			+		
SZÖ	+++	++++	+++	++++	++++
SZIK	+++	++++	++++	++++	++++
GT					
TTT					
ÚH	+++	++++	++++	++	

A szik ödéma (SZÖ) és a szik elszíneződés (SZIK), továbbá az úszóhólyag hiánya (ÚH) minden hatóanyagnál megjelent valamelyik vizsgált koncentrációnál. A 6,25 mg/L-es koncentrációnál a *trazodone* esetében szik elszíneződést, szik ödémát és ki nem fejlődött úszóhólyagot figyelhattunk meg, míg az *atracurium*-nál ugyan ezen koncentrációban csak a perikardiális ödéma (PÖ) és a szik elszíneződés (SZIK) mutatkozott, az úszóhólyag hiánya a 12,5 mg/L koncentrációnál jelent meg utóbbi hatóanyagnál. A *lacosamide*-nál a szik ödéma és a szik elszíneződés csak 31,25 mg/L-es koncentrációnál, míg az úszóhólyag hiánya 62,5 mg/L-es koncentrációnál volt megfigyelhető. Szintén ennél a koncentrációnál (62,5 mg/L) figyelhattuk meg a *propafenone* esetében szik ödémát, szik elszíneződést és az úszó hólyag hiányát, míg *trimetazidine* hatóanyagnál perikardiális ödémát, szik ödémát, szik elszíneződést és fejletlen úszóhólyag tüneteket.

A perikardiális ödémát az *atracurium*, *trazodone*, *trimetazidine*, *lacosamide* esetében azonosítottunk, *atracurium* esetében jelent meg a legalacsonyabb koncentrációban (12,5 mg/L) a többi gyógyszerhatóanyaghoz viszonyítva.

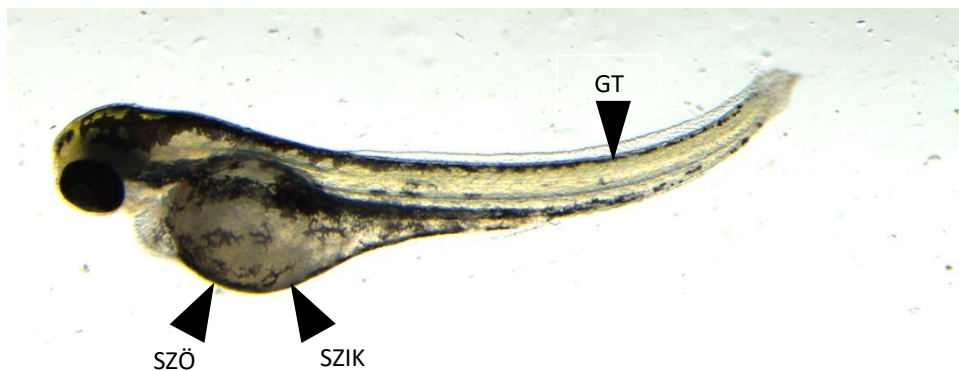
A gerinctorzulást (GT) három hatóanyag, a *propafenone*, *trazodone* és az *atracurium* esetében detektáltunk, az utóbbinál már 12,5 mg/L koncentrációnál.

Teljes testtorzulás (TTT) csak a *trazodone*-nál volt tapasztalható a 12,5 mg/L koncentrációnál.

A hatóanyagoknak a *Danio rerio* tesztorganizmre gyakorolt hatását, az egyes egyedeken megjelenő szubletális tüneteket az 5-10. ábrákon mutatom be.



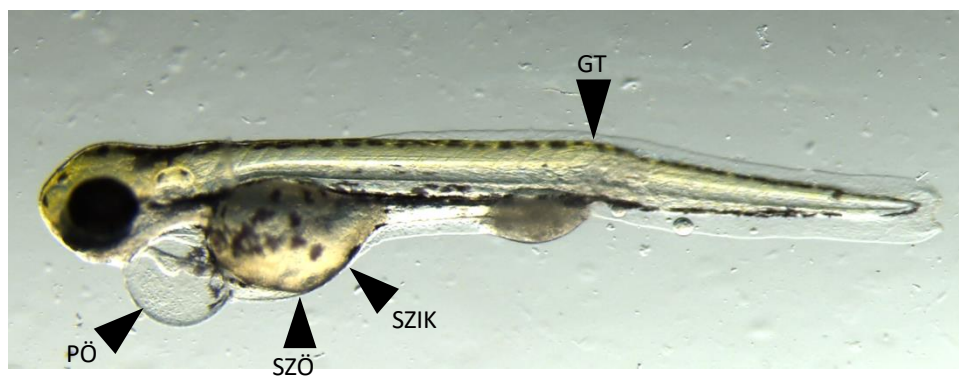
5. ábra: Kontroll *Danio rerio* (Bock Illés 2022)



6. ábra: A *propafenone* expozíció utáni felvételen látható szubletális hatása a *Danio rerio* tesztszervezetre (szik ödéma - SZÖ, szik elszíneződés - SZIK, gerinctorzulás - GT) (Göbölös Balázs 2022)



7. ábra: A *trazodone* expozíció utáni felvételen látható szubletális hatása a *Danio rerio* tesztszervezetre (teljes testtorzulás - TTT) (Göbölös Balázs 2022)



8. ábra: Az *atracurium* expozíció utáni felvételen látható szubletális hatása a *Danio rerio* tesztszervezetre (perikardiális ödéma - PÖ, szik ödéma - SZÖ, szik elszíneződés - SZIK, gerinc torzulás - GT) (Göbölös Balázs 2022)



9. *ábra: A trimetazidine expozíció utáni felvételen látható szubletális hatása a Danio rerio tesztszervezetre (szik ödéma - SZÖ, szik elszíneződés - SZIK,) (Göbölös Balázs 2022)*



10. *ábra: A lacosamide expozíció utáni szubletális hatása a Danio rerio tesztszervezetre (szik ödéma - SZÖ, szik elszíneződés - SZIK) (Göbölös Balázs 2022)*

Dolgozatom céljaként olyan, a felszíni vizekben eddig elsőként kimutatott gyógyszerhatóanyagok vizsgálatát tűztem ki, amelyekre nincs ökotoxicitási értékeken alapuló PNEC, azaz becsült ökológiailag hatástalan koncentráció érték meghatározva, nem áll rendelkezésre experimentális ökotoxicitási adat.

5 Következtetések, javaslatok

A gyógyszerhatóanyagoknak a célszervezetekre gyakorolt toxikológiai hatásait ismertnek tekinthetjük, azonban az ökotoxikológiai hatásaikról nem minden esetben állnak rendelkezésre megfelelő mennyiségű és teljes egészében megbízható adatok. Sőt, az általam vizsgált 5 PhAC-t Maász és munkatársai detektálták először felszíni élő vizekben, így azok hatása mindezidáig nem volt ismeretes. Bevezetőmben írtam, hogy az általam vizsgált hatóanyagokra nem áll rendelkezésre PNEC érték.

Az 1. táblázatból látható, hogy az *atracurium*-ot és a *lacosamide*-t a novemberi, a *trimetazidine*-t pedig a decemberi hónapban detektálták. Ezzel szemben a szív- és érrendszeri gyógyszerhatóanyagot, a *propafenone*-t (átlagos koncentráció: 6, 34,1, 23,3, 13,7 ng/L) mindegyik hónapban kimutatták. Az antidepresszáns *trazodone* jelenlétét – bár minimális koncentrációban (0,1, 0,4, 0,4 ng/L) –, áprilisi hónapot kivételével többi vizsgált hónapban mutatták ki.

Meg kell jegyezni, hogy munkánk során a hatóanyagokat nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban vizsgáltuk.

Az teljesen egyértelműsíthetővé vált, hogy nem elégséges a hatóanyagok *Aliivibrio fischeri* akut biolumineszcencia gátlási teszttel történő vizsgálata, ugyanis csupán ezzel nem állapítható meg minden kétséget kizáróan egy-egy gyógyszerhatóanyag toxicitása. Sőt, vizsgálatunk a *propafenone* esetén azt támasztotta alá, hogy míg a 30 perces akut teszt során a vizsgált hatóanyagok közül a legmagasabb gátlást ($EC_{50}=92,25$ mg/L) mutatta, addig a krónikus AVF tesztnél a 10 órás kontaktidőnél inhibíció egyáltalán nem mutatkozott, és a 15 óránál is relatíve magas 251,7 mg/L koncentrációnál váltott ki 50%-os fénykibocsátás gátlást.

Ugyanakkor viszont figyelemre méltó, hogy az összes vizsgált hatóanyag közül – az akut tesztben egyébként hatástalannal bizonyult - *trimetazidine* gyógyszerhatóanyag EC_{50} értéke a krónikus tesztben 10 óra elteltével 1,439 mg/L, 15 óra elteltével pedig 1,63 mg/L, tehát nagyságrendekkel a legmagasabb toxicitást mutatta. Ez esetben azonban megfigyelhető volt a toxicitás csökkenése a koncentráció növekedésével, mely jelenség hátterének felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Egyes toxikus vegyületek ún. hormézis kiváltására képesek, azaz kis koncentrációban serkentőleg hathatnak, jelen esetben azonban nem erről van szó.

A toxicitás expozíciós idővel való növekedése a *trazodone* estében is megfigyelhető volt, ugyanis a 10 és 15 órás kontaktidőnél mért EC_{50} értékek kb. tizedannyinak bizonyultak, mint az akut tesztben.

Fentiek tükrében kiemelt figyelmet kell fordítani arra, hogy az akut *AVF* teszt mellett krónikus tesztek végzése is szükséges a tesztszervezeteken, mivel az akut teszt során a hatóanyag hosszú távú hatása nem állapítható meg. Márpedig ezek a mikroszennyezők krónikusan, perzisztens módon jelen vannak a környezeti elemekben, és folyamatos kitettséget jelentenek a vízi élőlények számára.

Vizsgálatunkba alternatív ökotoxikológiai tesztszervezetként a zebradániót is bevontuk, melyre mindegyik vizsgált hatóanyag hatást gyakorolt. Bár más-más koncentrációnál és jelentősen eltérő mértékben, de a tesztszervezetek egyedeinél mindegyik hatóanyag esetében tapasztalható volt letalitás, és különféle szubletális tünetek megjelenése is (ld. 4-5. táblázat).

A ZETA tesztek alapján félmaximális letális koncentrációt (LC_{50}) határoztuk meg a gyógyszerhatóanyagokra. Ennek során az akut *AVF* tesztben egyáltalán nem, a krónikus *AVF* tesztben pedig relatíve alacsony ($EC_{50}=608$ mg/L) toxicitást mutató *atracurium* mutatkozott a legtoxikusabbnak a zebradánió tesztszervezetekre ($LC_{50}=18,4$ mg/L). Ugyanakkor az akut *AVF* tesztben a legtoxikusabb *propafenone* (92,25 mg/L) és *trazodone* (107,6 mg/L) a zebradánió tesztszervezetre gyakorolt toxicitása két nagyságrenddel hasonló volt ($LC_{50}=113,7$ mg/L és $LC_{50}=255$ mg/L). Továbbá a krónikus *AVF* tesztben szintén a legerőteljesebb toxicitást mutató *trimetazidine* (*AVF* 10 h $EC_{50}=1,439$ mg/L, 15 h $EC_{50}=1,63$ mg/L), míg ugyanezen anyag lényegesen kevésbé bizonyult toxikusnak (LC_{50} 582,8 mg/L) a ZETA teszt során.

Megjegyzendő, hogy az antiepileptikus hatású *lacosamide* az *AVF* tesztek egyikében sem bizonyult toxikusnak, és a 120 órás ZETA tesztben is a legmagasabb LC_{50} értéket mutatta, mely 1408 mg/L volt.

Sanderson és munkatársai a tűzcsille esetén a *trazodone* hatóanyagnál és a *propafenonnál* relatíve alacsony EC_{50} -es értéket (0,009 mg/L, 12 mg/L) határoztak meg a QSAR módszerrel a ZETA teszt eredményéhez képest. Ebből feltételezhető, hogy az ezen a trofitási szinten lévő tesztszervezetek érzékenysége igen eltérő. Tekintettel arra, hogy a QSAR adatok ugyanis prediktív jellegűek, valószínűsítő, matematikai statisztikai módszerekkel generálódnak, elengedhetetlenül fontos, hogy a környezetben előforduló gyógyszerhatóanyagoknak az ökoszisztémára gyakorolt hatására vonatkozó, experimentális vizsgálatokkal alátámasztott adatok

álljanak rendelkezésre a valós kockázat alul-, ill. túlbecslésének megelőzéséhez.

Vizsgálatunk hiánypótló információkkal szolgál a Maász és munkatársai által felszíni élővizekben 2019-ben először detektált, és ismeretlen ökotoxicitású PhAC-kra vonatkozóan, azonban a dolgozatomban ismertetett eredmények nem elégségesek a gyógyszerhatóanyagok PNEC értékének meghatározására. Ezért a hatóanyagok komplex ökotoxikológiai vizsgálatának elvégzése, a tesztszervek (pl. vízibolha, algatesztek, magasabb rendű növények stb.) körének bővítése javasolt.

6 Összefoglalás

Az orvostudomány fejlődésével a gyógyszeripari termékek gyártása és fogyasztása egyre rohamosabban nő. Azonban problémát jelent, hogy a hatóanyagok jelentős része akár változatlan formában is visszakerül az ökoszisztémába, ott változásokat idézve elő. Ugyanakkor sok esetben ezen vegyületek teljes körű ökotoxikológiai hatása vagy korlátozott mértékben, vagy pedig egyáltalán nem ismert. Ezért is vontunk be vizsgálatunkba öt olyan gyógyszerhatóanyagot (*atracurium*, *lacosamide*, *propafenone*, *trimetazidine* és *trazodone*), melyeket Maász és munkatársai 2019-ben detektáltak először felszíni vizekben és a környezeti hatásukra vonatkozó, ISO szabvány alapján elvégzett laboratóriumi vizsgálatok által nyert szakirodalmi adat egyáltalán nem áll rendelkezésre.

A hazai és külföldi szakirodalom áttekintését követően bemutattam a vizsgálatom tárgyát képező gyógyszerek felhasználását, környezetbe jutását, detektálását, ökotoxikológiai vizsgálatát. A PhAC-k célszervezetre, valamint a vizsgálatainkba bevont tesztorganizmokra gyakorolt hatását, illetve lehetséges ökotoxikológiai kockázatukat is bemutattam.

Munkánk során a gyógyszerhatóanyagokat *Aliivibrio fischeri*-n (AVF) alapuló 30 perces akut (ISO 11348), ill. 25 órás kontaktidejű krónikus biolumineszcencia gátlási teszttel, valamint zebradánió embrió (*Danio rerio*) alapuló 120 órás kontaktidejű ZETA teszttel (*Zebrafish Embryo Toxicity Assay*) vizsgáltuk. A komplexebb vizsgálati eredmények elérése érdekében az ökotoxikológiai tesztek kiválasztása során eltérő trofítási szinteket képviselő tesztorganizmokkal dolgoztunk.

Az akut AVF tesztekben a *propafenone* és a *trazodone* EC₅₀-es értéke 92,25 és 107,6 mg/L volt, a többi vizsgált PhAC nem mutatott toxicitást. A krónikus AVF tesztben a *trazodon* 16,36, ill. 13,33 mg/L koncentrációnál okozott 50 %-os fénykibocsátási gátlást a 10 és 15 órás kontaktidőnél. A legtoxikusabbnak az akut tesztben hatástalannak bizonyuló *trimetazidine* mutatkozott 10 óránál az 1,439 mg/L, valamint 15 óránál az 1,63 mg/L EC₅₀-es értékekkel. A vizsgálatba alternatív ökotoxikológiai tesztorganizmként bevont zebradánióra mindegyik vizsgált hatóanyag hatást gyakorolt. Ebben a tesztben az egyébként az akut AVF tesztben egyáltalán nem, a krónikus AVF tesztben pedig relatíve alacsony toxicitást jelző *atracurium* hatásos értéket mutatott (C₅₀=18,4 mg/L), míg a többi hatóanyag legalább egy nagyságrenddel nagyobb hatásos

koncentráció értéket jelzett. A ZETA tesztekben 120 órás expozíciót követően a mortalitás mellett szubletális tünetek is jelentkeztek.

A vizsgálat eredményei is mutatják, hogy a tesztszervezeteken az akut AVF teszt mellett krónikus tesztek végzése is szükséges, ugyanis a különböző kontaktidejű vizsgálatok eltérő eredményeket hoztak, továbbá a gyógyszerhatóanyagok hosszú távú toxicitása csak így állapítható meg. Ez pedig kiemelten fontos, mivel az ökoszisztémába kikerült és ott krónikusan jelen lévő mikroszennyezők hosszú ideig perzisztálhatnak. Vizsgálatunk adatai alapján megállapítható továbbá, hogy az egyes trofitási szinteket képviselő tesztszervezetek jelentősen eltérő érzékenységet mutatnak a hatóanyagokkal szemben. A megbízhatóbb, árnyaltabb környezeti (vizi) kockázatbecslések rendelkezésre állása érdekében komplex ökotoxikológiai vizsgálatok, a tesztszervezetek körének bővítése javasolt. Ezek hiányában ugyanis a dolgozatomban ismertetett laboratóriumi vizsgálati adatok csupán hiánypótló információkkal szolgálnak a környezeti elemekben újonnan detektált, de eddig ismeretlen ökotoxicitású PhAC-k hatásai vonatkozásában.

7 Irodalomjegyzék

- A.Cs. Kondor, G. Jakab, A. Vancsik, T. Filep, J. Szeberényi, L. Szabó, G. Maász, Á. Ferincz, P. Dobosy, Z. Szalai, (2020). Occurrence of pharmaceuticals in the Danube and drinking water wells: Efficiency of riverbank filtration, *Env. Poll.* 265, 114,893, doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114893
- Achenbach JC, Leggiadro C, Sperker SA, Woodland C, Ellis LD (2020) Comparison of the Zebrafish Embryo Toxicity Assay and the General and Behavioral Embryo Toxicity Assay as New Approach Methods for Chemical Screening. *Toxics*. 2020 Dec 21;8(4):126. doi: 10.3390/toxics8040126 PMID: 33371320; PMCID: PMC7767334.
- Berry JP, Gantar M, Gibbs PD, Schmale MC (2007) The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007 Feb;145(1):61-72. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.07.011
- Bradford YM, Toro S, Ramachandran S, Ruzicka L, Howe DG, Eagle A, Kalita P, Martin R, Taylor Moxon SA, Schaper K, Westerfield M (2017) Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. *ILAR J*. 2017 Jul 1;58(1):4-16. doi: 10.1093/ilar/ilw040
- Caroline Rodrigue dos Santos, G.S. Arcanjo, L.V. de Souza Santos, K. Koch, M.C.S. Amaral (2021) Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment. *Environ. Pollut.*, 290 (2021), Article 118049. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118049
- David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, Michelle R. McGehee (2019) Chapter 1 - Cells and Organisms, Editor(s): David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, Michelle R. McGehee, *Molecular Biology* (Third Edition), Academic Cell, 2019, Pages 2-37, ISBN 9780128132883. doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00001-X
- Dusi E., Rybicki M., Jungmann D. 2019. The database "Pharmaceuticals in the Environment" - Update and new analysis. Final report. German Environmental Agency. Umweltbundesamt, GWT-TUD GmbH. Dresden, Germany. <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen>
- Gheorghe, Stefania ; Petre, Jana ; Lucaciu, Irina ; Stoica, Catalina ; Nita-Lazar, Mihai (2016). Risk screening of pharmaceutical compounds in Romanian aquatic environment. *Environmental monitoring and assessment*, 2016, Vol.188 (6), p.379. DOI: 10.1007/s10661-016-5375-3
- Giebułtowicz J, Nałęcz-Jawecki G. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014 Jun;104:103-9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.02.020.
- Gonzalez-Alonso, S., Merino, L.M., Esteban, S., Lopez de Alda, M., Barcelo, D., Jose Duran, J., et al., (2017). Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environ. Pollut.* 229, 241–254. doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060
- Grenni, P., Ancona, V., and Barra Caracciolo, A (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem. J.* 136, 25–39. doi: 10.1016/j.microc.2017.02.006
- Gunnarsson L, Snape JR, Verbruggen B, Owen SF, Kristiansson E, Margiotta-Casaluci L, Österlund T, Hutchinson K, Leverett D, Marks B, Tyler CR (2019) Pharmacology beyond the patient - The environmental risks of human drugs. *Environ Int*. 2019 Aug;129:320-332. doi: 10.1016/j.envint.2019.04.075
- Gu, Y., Huang, J., Zeng, G., Shi, L., Shi, Y., Yi, K., (2018). Fate of pharmaceuticals during membrane bioreactor treatment: status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 268,733–748.
- Gurke, R., Rossler, M., Marx, C., Diamond, S., Schubert, S., Oertel, R., et al., (2015). Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 532, 762–770. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.067
- Hans Sanderson, David J Johnson, Tamara Reitsma, Richard A Brain, Christian J Wilson, Keith R Solomon (2004) Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 39, Issue 2. 2004. Pages 158-183,ISSN 0273-2300 doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.12.006

- Haria M, Fitton A, McTavish D (1994). Trazodone. A review of its pharmacology, therapeutic use in depression and therapeutic potential in other disorders. *Drugs Aging*. 1994 Apr;4(4):331-55
- IQVIA Institute for Human Data Science (2021). Global Medicine Spending and Usage Trends. Outlook to 2025. <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/global-medicine-spending-and-usage-trends-outlook-to-2025>
- Jarema M, Dudek D, Landowski J, Heitzman J, Rabe-Jabłońska J, Rybakowski J (2011). [Trazodone--the antidepressant: mechanism of action and its position in the treatment of depression]. *Psychiatr Pol*. 2011 Jul-Aug;45(4):611-25.
- Kim SA, Borchardt MR, Lee K, Stelow EA, Bain MJ. Effects of trazodone on behavioral and physiological signs of stress in dogs during veterinary visits: a randomized double-blind placebo-controlled crossover clinical trial. *J Am Vet Med Assoc*. 2022 Mar 24;260(8):876-883. doi: 10.2460/javma.20.10.0547
- Kimberly D. Tremblay (2010) Chapter 1 - Formation of the Murine Endoderm: Lessons from the Mouse, Frog, Fish, and Chick, Editor(s): Klaus H. Kaestner, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press, Volume 96, 2010, Pages 1-34, ISSN 1877-1173, ISBN 9780123812803. doi.org/10.1016/B978-0-12-381280-3.00001-4
- K'oreje Kenneth, Maurice Okoth, Herman Van Langenhove, Kristof Demeestere (2022). Occurrence and point-of-use treatment of contaminants of emerging concern in groundwater of the Nzoia River basin, Kenya, *Environmental Pollution*, Volume 297, 2022, 118725, ISSN 0269-7491. doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118725
- Kot-Wasik, A.; Jakimska, A.; Sliwka-Kaszyńska, M (2016). Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. *Environ. Monit. Assess*. 2016, 188, 661
- Kümmerer, K (2010). Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35(1), 57–75. doi:10.1146/annurev-environ-052809-161223
- Larsson D. G. Joakim (2014). Pollution from drug manufacturing: review and perspectives *Phil. Trans. R. Soc. B* 369:20130571-20130571. doi.org/10.1098/rstb.2013.0571
- Maasz Gabor, Matyas Mayer, Zita Zrinyi, Eva Molnar, Monika Kuzma, Istvan Fodor, Zsolt Pirger, Péter Takács (2019) Spatiotemporal variations of pharmacologically active compounds in surface waters of a summer holiday destination, *Science of The Total Environment*, Volume 677, 2019, Pages 545-555, ISSN 0048-9697. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.286
- Madigan M, Martinko J, szerk (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11. kiadás). Prentice Hall. ISBN 978-0-13-144329-7.
- Masmoudi K, Masson H, Gras V, Andréjak M. Extrapyramidal adverse drug reactions associated with trimetazidine: a series of 21 cases. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 Apr;26(2):198-203. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.01008.x
- Mandarić, L., Diamantini, E., Stella, E., Cano-Paoli, K., Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., et al., (2017). Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism. *Sci. Total Environ*. 590, 484–494. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.185
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F., (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res*. 140, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>
- Miyashiro T, Ruby EG (2012). Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*. 2012 Jun;84(5):795-806. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x
- Ortúzar M., Esterhuizen M., Olicón-Hernández D.R., González-López J. and Aranda E (2022). Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Front. Microbiol*. 13:869332. doi: 10.3389/fmicb.2022.869332

- Rua-Gomez, P.C., Puttmann, W., (2012). Impact of wastewater treatment plant discharge of lidocaine, tramadol, venlafaxine and their metabolites on the quality of surface waters and groundwater. *J. Environ. Monit.* 14, 1391–1399. <https://doi.org/10.1039/c2em10950f>
- Ruhoy I.S., Daughton C.G (2007). Types and quantities of leftover drugs entering the environment via disposal to sewage—revealed by coroner records. *Sci. Total Environ.* 388: 137–48. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.013
- Staszny A., Dobosy P., Maasz G., Szalai Z., Jakab G., Pirger Z., Szeberenyi J., Molnar E., Pap LO, Juhasz V., et al. Effects of pharmaceutically active compounds (PhACs) on fish body and scale shape in natural waters. *PeerJ.* 2021;9:e10642. doi: 10.7717/peerj.10642
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., and Yu, G (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: a review. *Emerg. Contam.* 1, 14–24. doi: 10.1016/j.emcon.2015.07.001
- Tom G. Bean, Alistair B. A. Boxall, Julie Lane, Katherine A. Herborn, Stéphane Pietravallo and Kathryn E. Arnold (2014) *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Volume 369, Issue 1656 Published:19 November 2014 doi:10.1098/rstb.2013.0575
- UNESCO, HELCOM, (2017). Pharmaceuticals in the Aquatic Environment of the Baltic Sea Region – A Status Report 2017. UNESCO Emerging Pollutants in Water Series–No. 1, Baltic Sea Environments Proceedings No. 149 UNESCO Publishing, Paris. URL1, d. <http://www.balatonregion.hu/en/lake-balaton-resort-area>.
- Van Wijk, R. C., Krekels, E. H. J., Hankemeier, T., Spaink, H. P., & van der Graaf, P. H (2016). Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 22, 27–34. doi:10.1016/j.ddmod.2017.04.003
- Wilkinson, J. L. , Boxall, A. B. A. , Kolpin, D. W. , Leung, K. M. Y. , Lai, R. W. S. , Galbán-Malagón, C. , Adell, A. D. , Mondon, J. , Metian, M. , Marchant, R. A. , Bouzas-Monroy, A. , Cuni-Sanchez, A. , Coors, A. , Carriquiriborde, P. , Rojo, M. , Gordon, C. , Cara, M. , Moermond, M. , Luarte, T. , & Teta, C (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(8), Article e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
- Zainab, S. M., Junaid, M., Xu, N., and Malik, R. N (2020). Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: a global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Res.* 187:116455. doi: 10.1016/j.watres.2020.116455

Internetes hivatkozások

- http1 <https://gobertpartners.com/what-is-a-xenobiotic> Megtekintés ideje 2022.08.03
- http2 <https://greenfo.hu/hir/gyogyszermaradvanyok-a-balatonban/> Megtekintés ideje 2022.08.03
- http3 <https://stresszdoktor.hu/uploads/kozkins/hulladkkvlgyszerekahztartsokban.pdf> Megtekintés ideje 2021.08.03
- http4 <https://go.drugbank.com/drugs/DB06218> Megtekintés ideje 2021.08.03.
- http5 https://archive.szie.hu/sites/default/files/kovacs_robert_ertekezes.pdf Megtekintés ideje 2022.08.03
- http6 <https://greendex.hu/hogyan-hat-az-ember-a-balaton-okoszisztemajara/> Megtekintés ideje 2022.08.03
- http7 https://stresszdoktor.hu/blog/Agresszivva_teszi_a_halakat_a_benzodiazepinekhez_tartozo_oxazepam.html?fbclid=IwAR3aaoFsND_Q2n_Zt8WQ9ZQhY5OpLgZ3ZSgSu44jkHiXwQA24KKRqhSYe0 Megtekintés ideje 2022.08.03
- http8 <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000344> 2022.08.05
- http9 <https://www.microbiotests.com/aliivibrio-fischeri-luminescent-bacteria-toxicity-test/> Megtekintés ideje 2022.08.05.
- http10 https://hvg.hu/zhvg/20200527_balaton_szennyezés Megtekintés ideje 2022.08.05.

http11 <https://www-chemspider-com.translate.goog/Chemical-Structure.43068.html? x tr sch=http& x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc> Megtekintés ideje 2022.08.06

http12 <https://go-drugbank-com.translate.goog/drugs/DB00732? x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc> Megtekintés ideje 2022.08.06

http13 <https://go.drugbank.com/drugs/DB13295> Megtekintés ideje 2022.08.06

http14 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atracurium-besylate> Megtekintés ideje 2022.08.06

http15 <https://go-drugbank-com.translate.goog/drugs/DB00732? x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc> 2022.08.06

http16 <https://www-rxlist-com.translate.goog/atracurium-besylate-injection-drug.htm? x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc#overdosage> Megtekintés ideje 2022.08.07

http17 <https://go.drugbank.com/drugs/DB06218> Megtekintés ideje 2022.08.07

http18 https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/vimpat-h-c-863-ii-0065-g-epar-assessment-report-variation_en.pdf Megtekintés ideje 2022.08.07

http19 <https://go-drugbank-com.translate.goog/drugs/DB06218? x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc> Megtekintés ideje 2022.08.07

http20 <https://www.drugs.com/sfx/lacosamide-side-effects.html> Megtekintés ideje 2022.08.07

http21 https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/lacosamide-accord-epar-public-assessment-report_en.pdf 2 Megtekintés ideje 021.08.07

http22 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propafenone> Megtekintés ideje 2022.08.07

http23 <https://go.drugbank.com/drugs/DB01182> 2022.08.07 Megtekintés ideje 2022.08.07

http24 <https://go-drugbank-com.translate.goog/drugs/DB01182? x tr sl=en& x tr tl=hu& x tr hl=hu& x tr pto=sc> Megtekintés ideje 2022.08.10

http25 <https://go.drugbank.com/drugs/DB00656> Megtekintés ideje 2022.08.10

http26 <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx> Megtekintés ideje 2022.08.10

http27 https://www.medigen.hu/gyogyszerkereso/87098_trittico-ac-150mg-retard-tabletta-60x Megtekintés ideje 2022.08.10

http28 <https://go.drugbank.com/drugs/DB00656> Megtekintés ideje 2022.08.10

http29 <https://datasheets.scbt.com/sc-213097.pdf> Megtekintés ideje 2022.08.11

http30 <https://go.drugbank.com/drugs/DB09069> Megtekintés ideje 2022.08.11

http31 [http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_\(PNEC\).html](http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_(PNEC).html) Megtekintés ideje 2022.08.11

http32 https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:tX-EB69JneEJ:www.ecotox.hu/ecotox2/download/konf/2020/eposter/MOTT20_Hahn.pdf&cd=1&hl=hu&ct=clnk&gl=hu Megtekintés ideje 2022.08.11

http33 <https://www.lgcstandards.com/DE/en/Atracurium-Besilate/p/MM0858.00> Megtekintés ideje 2022.08.12

http34 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atracurium-besylate> Megtekintés ideje 2022.08.12

http35 <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/atracuriumbesylate12434864228815> Megtekintés ideje 2022.08.12

http36 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vimpat> Megtekintés ideje 2022.08.13

http37 <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5332.html> Megtekintés ideje 2022.08.13

http38 <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/substance/trazodonehydrochloride4083225332392> Megtekintés ideje 2022.08.13

http39 <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/sigma/p9708> Megtekintés ideje 2022.08.17

http40 <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4763.html> Megtekintés ideje 2022.08.17

http41 <https://go.drugbank.com/drugs/DB01182> Megtekintés ideje 2022.08.17

http42 <https://www.selleckchem.com/products/trimetazidine.html> Megtekintés ideje 2022.08.17

http43 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimetazidine> Megtekintés ideje 2022.08.18

http44 [https://www.caymanchem.com/product/18165/trimetazidine-\(hydrochloride\)](https://www.caymanchem.com/product/18165/trimetazidine-(hydrochloride)) Megtekintés ideje 2022.08.18

http45 <https://www.selleckchem.com/products/atracurium-besylate.html> Megtekintés ideje 2022.08.18

http46 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lacosamide> Megtekintés ideje 2022.08.20

http47 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trazodone> Megtekintés ideje 2022.08.20

http48 <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/aldrich/653322> Megtekintés ideje 2022.08.20

http49 <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/sigma/p4670> Megtekintés ideje 2022.08.20

http50 <https://www.idexlab.com/openisme/topic-atracurium-besilate/> Megtekintés ideje 2022.08.22

http51 <https://dea.lib.unideb.hu/server/api/core/bitstreams/be077932-5053-4f60-8f0b-2ae096a34e87/content> Megtekintés ideje 2022.08.22

http52 [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_\(PNEC\).html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_(PNEC).html) Megtekintés ideje 2022.11.07.

8 Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni különösen témavezetőmnek, Dr. Háhn Juditnak, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Környezetbiztonsági Tanszéke tudományos főmunkatársának. Idejét, energiáját nem kímélve, támogatóan, odaadóan segítette munkámat az adatgyűjtéstől kezdve egészen a közös munka lezárásáig.

Köszönettel tartozom továbbá Göbölös Balázsnak, aki tudásával, tapasztalatával támogatott munkámban, valamint az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársainak is a vizsgálatokban és kísérletekben nyújtott segítségükért, türelmükért.

Továbbá köszönöm Bock Illésnek – különösen a zebradánió teszt kivitelezése során - a részemre nyújtott segítségét.

9 Mellékletek

1. melléklet: MicrotoxOmni Sample Results Report - *atracurium*

Result Name: Atracurium 1 mg-1ml

Test Date/Time: 2022. 09. 02. 10:17:45

Sample Name: Atracurium 1 mg-1ml

Test Name: International Standard ISO 11348-3

Description:

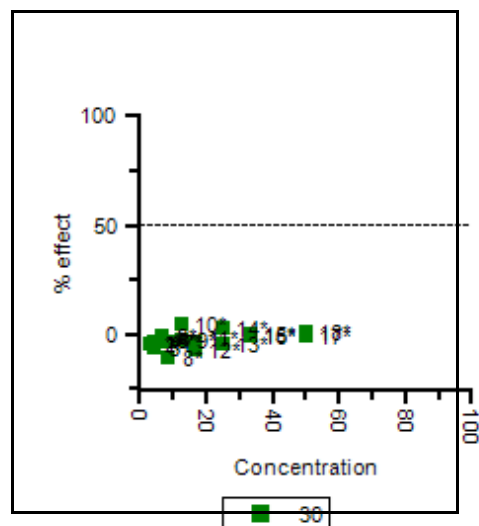
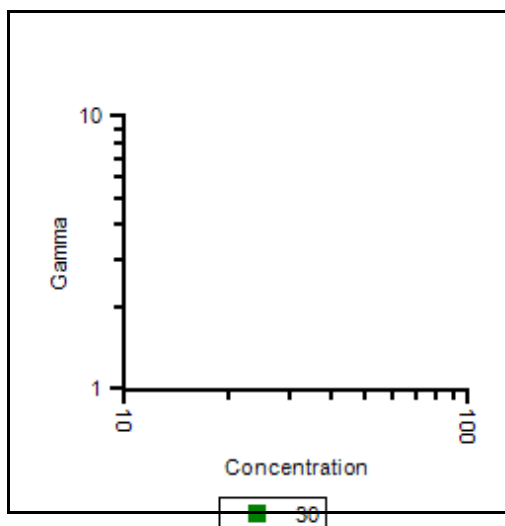
Instrument ID: _MASTER

Toxicant:

Reagent Lot #:

Test Location:

User ID: MANAGER



Time	Conc	G	I0	IC30	I30	H30	Mean H30
30 Mins							
	3,13	32	90	97,03	101	-4,23	
	3,13	32	85	92,18	96	-3,87	-4,05+/-0,18
	4,17	24	88	95,15	101	-6,24	
	4,17	24	85	91,78	95	-3,38	-4,81+/-1,43
	6,25	16	78	84,66	86	-1,99	
	6,25	16	82	88,78	89	-0,61	-1,30+/-0,69

8,33	12	84	90,66	94	-3,16	
8,33	12	83	89,55	99	-10,09	-6,63+/-3,47
12,50	8	91	97,90	100	-2,53	
12,50	8	94	101,22	97	4,66	1,07+/-3,60

16,67	6	86	92,70	96	-3,67	
16,67	6	92	98,88	106	-7,09	-5,38+/-1,71
25,00	4	91	97,78	102	-4,35	
25,00	4	93	100,64	98	2,82	-0,77+/-3,58
33,33	3	87	93,37	93	0,01	
33,33	3	93	100,24	101	-0,96	-0,47+/-0,49
50,00	2	86	92,46	93	-0,82	
50,00	2	96	103,63	102	1,50	0,34+/-1,16

- included, * -
invalid

Statistics:

Data: 30 Mins

Detected hormesis.

Recommend re-testing at lower initial concentration or with additional dilutions.

Lowest % effect: -10,09%

Cannot calculate regression as there are no valid data points.

GL Value: Sample too toxic to report GL value.

Control (G1) I30/I0:

97/92 = 1,0565

101/92 = 1,1022

fk = 1,0793

The contents of this report are private and confidential.

Printed: 2022. 09. 06. 13:35:00

Signature:

2. melléklet: MicrotoxOmni Sample Results Report - *lacosamide*

Result

Name: Lacosamid 1mg-1ml

Test

Date/Time: 2022. 09. 02. 11:12:01

Sample

Name: Lacosamid 1mg-1ml

Test Name: International Standard ISO 11348-3

Description:

Instrument ID: _MASTER

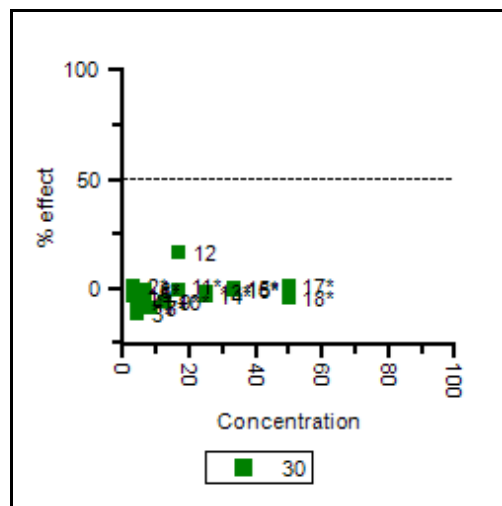
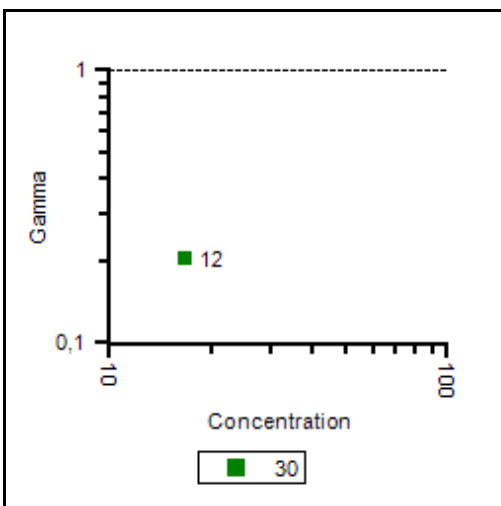
Toxicant:

Reagent Lot #:

Test

Location:

User ID: MANAGER



Time	Conc	G	I0	IC30	I30	H30	Mean H30
30 Mins							
	3,13	32	84	91,57	95	-3,68	
	3,13	32	83	90,67	89	1,44	-1,12+/-2,56
	4,17	24	81	88,10	98	-11,32	
	4,17	24	82	88,84	94	-5,76	-8,54+/-2,78
	6,25	16	77	83,68	86	-2,37	
	6,25	16	80	87,11	88	-0,47	-1,42+/-0,95
	8,33	12	78	84,70	92	-8,86	

8,33	12	81	88,18	96	-8,50	-8,68+/-0,18
12,50	8	80	86,97	92	-5,88	
12,50	8	88	95,20	101	-6,27	-6,08+/-0,19

16,67	6	81	88,42	89	-0,86	
16,67	6	78	85,15	71	17,06	8,10+/-8,96
25,00	4	85	92,21	93	-1,23	
25,00	4	81	88,36	91	-2,95	-2,09+/-0,86
33,33	3	81	87,78	87	0,70	
33,33	3	80	86,45	87	-0,38	0,16+/-0,54
50,00	2	79	86,01	85	1,29	
50,00	2	85	92,22	96	-4,02	-1,37+/-2,65

- included, * - invalid

Statistics:

Data: 30 Mins

Recommend re-testing sample at a higher initial concentration.

Highest % effect: 17,06%

Cannot calculate regression as there are not enough data points.

GL Value: Sample too toxic to report GL value.

Control (G1) I30/I0:

95/92 = 1,0276

96/84 = 1,1456

fk = 1,0866

The contents of this report are private and confidential.

Printed: 2022. 09. 06. 13:36:11

Signature:

3. melléklet: MicrotoxOmni Sample Results Report - *propofenone*

Result Name: Propofenon 1mg-ml ism.

Test Date/Time: 2022. 09. 23. 9:59:31

Sample Name: Propofenon 1mg-ml ism.

Test Name: International Standard ISO 11348-3

Description:

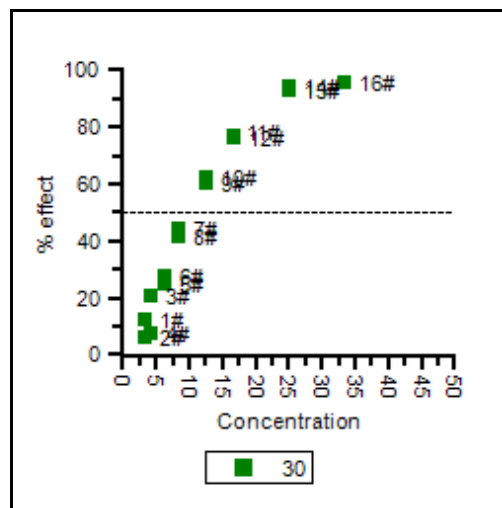
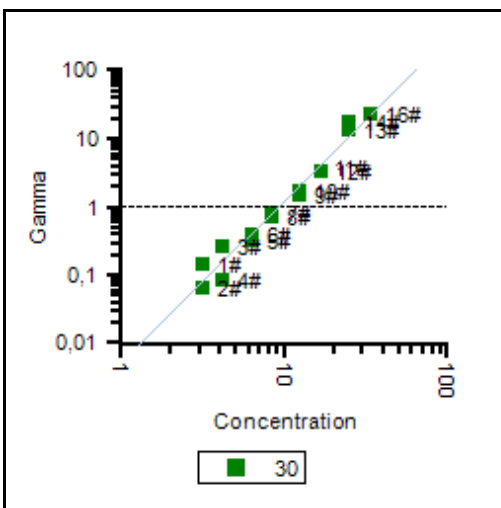
Instrument ID: _MASTER

Toxicant:

Reagent Lot #:

Test Location:

User ID: MANAGER



Time	Conc	G	I0	IC30	I30	H30	Mean H30
30 Mins							
	3,13	32	83	103,19	90	12,38	
	3,13	32	85	106,22	100	6,27	9,33+/-3,05
	4,17	24	90	112,45	89	21,13	
	4,17	24	79	98,79	91	7,98	14,55+/-6,58
	6,25	16	67	83,19	63	24,74	
	6,25	16	83	102,68	74	27,93	26,34+/-1,60
	8,33	12	90	111,49	62	44,27	
	8,33	12	91	113,63	66	41,61	42,94+/-1,33

12,50	8	90	111,71	44	60,23	
12,50	8	92	114,84	43	62,50	61,36+/-1,13

16,67	6	90	112,05	26	76,91	
16,67	6	91	112,65	27	76,37	76,64+/-0,27
25,00	4	97	120,02	8	92,98	
25,00	4	97	120,62	7	94,56	93,77+/-0,79
33,33	3	95	118,05	0	99,85	
33,33	3	96	119,72	5	95,80	97,82+/-2,02
50,00	2	97	121,14	0	99,98	
50,00	2	94	116,83	0	99,96	99,97+/-0,01

- included, * - invalid

Statistics:

Data: 30 Mins

EC50 Concentration: 9,225%
(95% Confidence Range: 8,505 to 10,01)
95% Confidence Factor: 1,085
Estimating Equation:
 $\text{LOG C} = 0,4084 \times \text{LOG G} + 0,9649$
Slope: 2,369
Coeff of Determination (R^2): 0,9673
GL Value: 24
Control (G1) I30/I0:
 $112/92 = 1,2212$
 $107/84 = 1,2647$
 $fk = 1,2430$

The contents of this report are private and confidential.

Printed: 2022. 10. 24. 11:29:22

Signature:

4. melléklet: MicrotoxOmni Sample Results Report - trazodone

Result Name: Trazodon-1mg-ml

Test
Date/Time: 2022. 09. 05. 14:34:12

Sample Name: Trazodon-1mg-ml

Test Name: International Standard ISO 11348-3

Description:

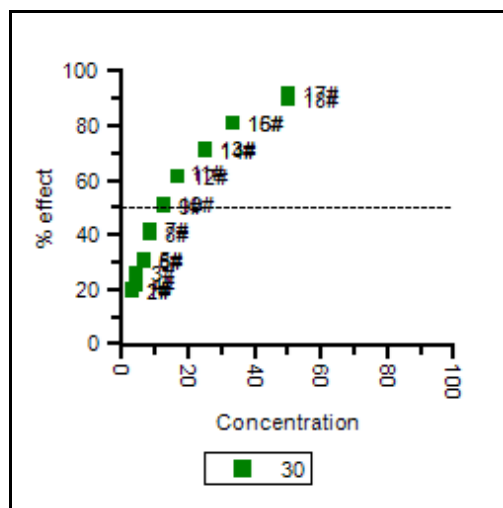
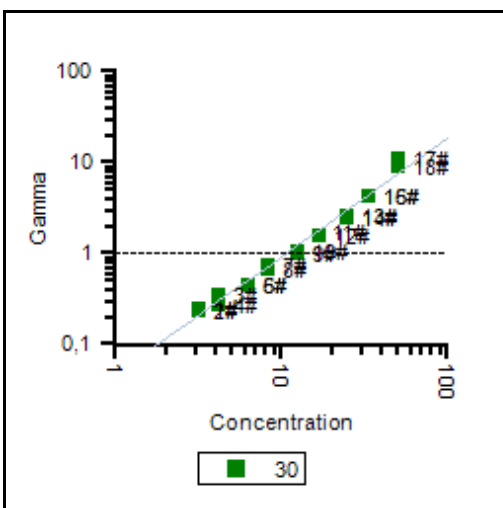
Instrument ID: _MASTER

Toxicant:

Reagent Lot #:

Test Location:

User ID: MANAGER



Time	Conc	G	I0	IC30	I30	H30	Mean H30
30 Mins							
	3,13	32	87	78,55	63	20,12	
	3,13	32	88	79,10	64	19,21	19,67+/-0,46
	4,17	24	85	76,70	57	26,15	
	4,17	24	82	73,44	58	21,60	23,88+/-2,28
	6,25	16	85	76,75	53	31,24	
	6,25	16	81	72,50	50	30,59	30,91+/-0,32
	8,33	12	87	78,07	45	42,37	
	8,33	12	86	77,29	46	40,71	41,54+/-0,83

12,50	8	88	79,04	39	50,60	
12,50	8	91	81,60	39	51,64	51,12+/-0,52

16,67	6	82	73,75	28	61,67	
16,67	6	82	73,40	28	61,43	61,55+/-0,12
25,00	4	82	74,13	21	72,02	
25,00	4	85	76,20	22	71,36	71,69+/-0,33
33,33	3	84	75,76	14	81,14	
33,33	3	85	76,43	14	81,05	81,10+/-0,04
50,00	2	82	73,53	6	91,72	
50,00	2	81	72,73	7	89,85	90,79+/-0,93

- included, * - invalid

Statistics:

Data: 30 Mins

EC50 Concentration: 10,76%
(95% Confidence Range: 10,07 to 11,49)
95% Confidence Factor: 1,068
Estimating Equation:
 $\text{LOG C} = 0,7570 \times \text{LOG G} + 1,032$
Slope: 1,296
Coeff of Determination (R^2): 0,9811
GL Value: 32
Control (G1) I30/I0:
 $77/89 = 0,8697$
 $78/84 = 0,9310$
 $fk = 0,9003$

The contents of this report are private and confidential.

Printed: 2022. 09. 06. 13:37:40

Signature:

5. melléklet: MicrotoxOmni Sample Results Report - trimetazidine

Result

Name: Trimetazidin 1mg-ml

Test

Date/Time: 2022. 09. 02. 11:56:23

Sample

Name: Trimetazidin 1mg-ml

Test Name:

International Standard ISO 11348-3

Description:

Instrument ID: _MASTER

Toxicant:

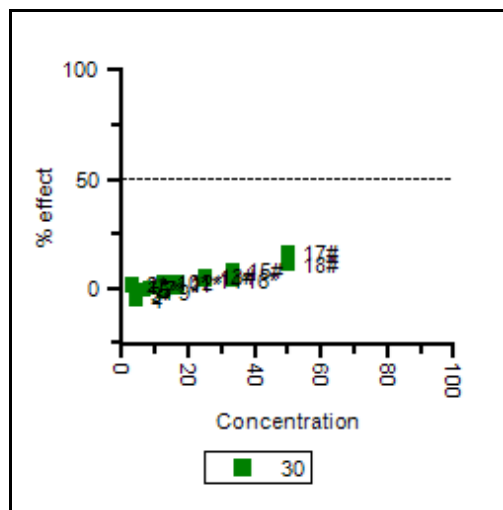
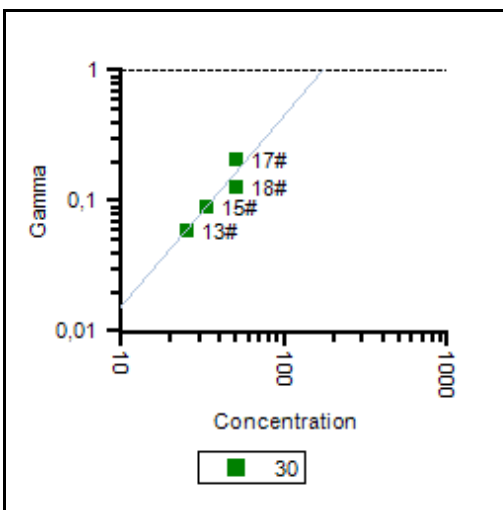
Reagent Lot #:

Test

Location:

User ID:

MANAGER



Time	Conc	G	I0	IC30	I30	H30	Mean H30
30 Mins							
	3,13	32	84	94,48	93	1,46	
	3,13	32	78	87,91	86	2,06	1,76+/-0,30
	4,17	24	80	90,60	93	-2,11	
	4,17	24	77	87,62	92	-4,88	-3,49+/-1,39
	6,25	16	81	91,11	92	-0,72	
	6,25	16	78	88,35	0	99,98	49,63+/-50,35
	8,33	12	82	92,66	92	0,65	

8,33	12	81	91,22	0	99,99	50,32+/-49,67
12,50	8	87	98,25	100	-1,62	
12,50	8	86	97,59	94	3,44	0,91+/-2,53

16,67	6	83	93,88	93	0,63	
16,67	6	87	98,77	96	2,68	1,65+/-1,02
25,00	4	84	94,51	89	5,57	
25,00	4	84	94,46	91	4,05	4,81+/-0,76
33,33	3	83	94,28	86	8,28	
33,33	3	89	100,89	97	4,25	6,27+/-2,01
50,00	2	81	92,12	76	17,06	
50,00	2	88	99,31	88	11,49	14,28+/-2,79

- included, * - invalid

Statistics:

Data: 30 Mins

EC50 Concentration: 142,0%
(95% Confidence Range: 30,12 to 669,8)
EC50 value was calculated from extrapolated data.
95% Confidence Factor: 4,716
Estimating Equation:
 $\text{LOG C} = 0,5955 \times \text{LOG G} + 2,152$
Slope: 1,469
Coeff of Determination (R^2): 0,8747
GL Value: 2
Control (G1) I30/I0:
 $101/93 = 1,0936$
 $93/79 = 1,1680$
 $fk = 1,1308$

The contents of this report are private and confidential.

Printed: 2022. 09. 06. 13:36:56

Signature:

10 Nyilatkozat

NYILATKOZAT

Alulírott Deme Gergő a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szent István Campus Mezőgazdasági biotechnológus MSc Szak nappali tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: Bag, 2022. 11. 08.


Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: Gödöllő, 2022. 11. 08.


Belső konzulens