

# Ekotoksikološka procjena utjecaja kardiovaskularnih farmaceutika prisutnih u vodenim ekosustavima na embrije ribe zebrice *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

---

Prgić, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:948364>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Gabrijela Prgić

**Ekotoksikološka procjena utjecaja kardiovaskularnih farmaceutika  
prisutnih u vodenim ekosustavima na embrije ribe zebrice  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Gabrijela Prgić

**Ecotoxicological assessment of the impact of cardiovascular  
pharmaceuticals present in aquatic ecosystems on zebrafish embryos  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Master thesis

Zagreb, 2021.

---

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za ekotoksikologiju na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr.sc. Görana Klobučara te u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi, Zavoda za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Sanje Babić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

## ZAHVALE

*Hard work beats talent if talent doesn't work hard.*

~ *Tim Notke*

Najljepša hvala mojim mentorima prof. dr. sc. Göranu Klobučaru i dr. sc. Sanji Babić na fantastičnoj prilici za rad, bezuvjetnom povjerenju te izrazitoj stručnosti i susretljivosti. Hvala na podršci kada je bila najpotrebnija, optimizmu kada je bilo najteže te poticaju da idem dalje i postignem još više. Sve što sam naučila prilikom izrade ovog diplomskog rada, nosim sa sobom dalje u život.

Hvala svim članovima Laboratorija za biotehnologiju u akvakulturi na Zavodu za kemiju materijala pod voditeljstvom dr. sc. Rozelindre Čož-Rakovac na srdačnosti i gostoprimstvu. Izrazita mi je čast što sam imala mogućnost raditi u Vašem laboratoriju i steći brojna znanja i iskustva, za koja sam sigurna da će mi mnogo pomoći u mom daljnjem napredovanju.

Neizmjereno sam zahvalna svojoj obitelji koja nije odustajala od mojih snova te me stalno ohrabivala kroz teška vremena. Posebno hvala mojim roditeljima, braći i sestrama na bezuvjetnoj podršci i potpori koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja, na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju. Bili ste mi veliki izvor nadahnuća i inspiracije.

Veliko hvala mome zaručniku koji je bio sa mnom u svakom trenutku radosti i tuge, frustracije i sreće, vjerovao u mene onda i kada ja nisam, bez čije podrške i ljubavi nijedan moj uspjeh ne bi bio moguć te njegovoj obitelji na toplini i razumijevanju. Bili ste mi u mnogim trenucima odmor od briga.

Hvala svim prijateljima, kolegama i kolegicama koji su posredno ili neposredno pomogli u ostvarivanju ovog rada.

*Hvala Vam!*

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

**Ekotoksikološka procjena utjecaja kardiovaskularnih farmaceutika prisutnih u vodenim ekosustavima na embrije ribe zebrice *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Gabrijela Prgić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Republika Hrvatska

Proces onečišćenja okoliša doživljava eksponencijalan i nezaustavljiv rast te je postao jedan od najvećih problema s kojima se danas čovječanstvo susreće. Napredak znanosti doveo je i novu vrstu onečišćenja, lijekovima, odnosno farmaceutski aktivnim spojevima koji su jedna od glavnih komponenti onečišćenja kopnenih voda i koji su utvrđeni u sedimentu i plazmi riba iz rijeke Save. Na temelju dosadašnjih istraživanja izdvojeni su kardiovaskularni lijekovi: amiodaron, ramipril, simvastatin i verapamil čiji je utjecaj istražen, pojedinačno i u smjesi, na razvoj embrija ribe zebrice *Danio rerio* (Hamilton, 1822) u prvih 96 hpf. Tijekom izlaganja okolišno relevantnim koncentracijama (0.1, 1.0 i 10.0 µg/L) praćene su izazvane promjene kao što su mortalitet i stopa abnormalnosti, dužina ličinki, stopa izvaljivanja, brzina otkucaja srca, spontani pokreti prsnim perajama i oksidativni stres. Povećanjem koncentracije i vremenske izloženosti jedinki testiranim spojevima uočeni su učinci pri izlaganju svim spojevima, no najveća toksičnost zabilježena je na uzorku simvastatina. Integracijom krajnjih bioloških učinaka ispitivanih unutar ovog istraživanja, potvrđena je izvrsna uzročno-posljedična veza između izlaganja farmaceutskim spojevima i zabilježenog učinka na akvatičkom organizmu, čime je pružena podloga za biomonitoring onečišćenja okoliša, posebice slatkovodnih ekosustava.

(58 stranica, 23 slike, 4 tablice, 131 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** organska onečišćenja, kardiovaskularni lijekovi, vodeni ekosustavi, morfološke i fiziološke promjene, kardiotoksičnost, neurotoksičnost, *Danio rerio*

**Voditelj 1:** prof. dr. sc. Göran Klobučar, Prirodoslovno-matematički fakultet

**Voditelj 2:** dr. sc. Sanja Babić, Institut Ruđer Bošković

**Ocjenitelji:** prof. dr. sc. Göran Klobučar, Prirodoslovno-matematički fakultet

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Prirodoslovno-matematički fakultet

izv. prof. dr. sc. Ana Galov, Prirodoslovno-matematički fakultet

izv. prof. dr. sc. Petar Kružić (zamjena), Prirodoslovno-matematički fakultet

Rad prihvaćen: 29. travnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

### **Ecotoxicological assessment of the impact of cardiovascular pharmaceuticals present in aquatic ecosystems on zebrafish embryos *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Gabrijela Prgić

Roosevelt square 6, 10 000 Zagreb, Republic of Croatia

The process of environmental pollution is experiencing exponential and unstoppable growth and has become one of the biggest problems facing humanity today. Progress in science has also brought a new type of pollution, therapeutic drugs, or pharmaceutically active compounds that are one of the main components of inland water pollution and that have been found in the sediment and plasma of fish from the Sava River. Based on previous research, cardiovascular drugs have been chosen: amiodarone, ramipril, simvastatin and verapamil, the effect of which has been investigated, individually and in a mixture, on the development of the zebrafish embryo *Danio rerio* (Hamilton, 1822) in the first 96 hpf. During exposure to environmentally relevant concentrations (0.1, 1.0 and 10.0 µg/L), caused changes such as mortality and abnormality rate, larval length, hatching rate, heart rate, spontaneous movements of the pectoral fins and oxidative stress were monitored. With increasing concentration and time exposure of individuals to the tested compounds, effects on exposure to all compounds were observed, but the highest toxicity was observed on the simvastatin sample. The integration of the ultimate biological effects examined within this study confirmed the excellent cause-and-effect relationship between exposure to pharmaceutical compounds and the observed effect on the aquatic organism, thus providing a basis for biomonitoring of environmental pollution, especially freshwater ecosystems.

(58 pages, 23 figures, 4 tables, 131 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** organic pollution, cardiovascular drugs, aquatic ecosystems, morphological and physiological changes, cardiotoxicity, neurotoxicity, *Danio rerio*

**Supervisor 1:** prof. dr. sc. Göran Klobučar, Faculty of Science

**Supervisor 2:** dr. sc. Sanja Babić, Institute Ruđer Bošković

**Reviewers:** prof. dr. sc. Göran Klobučar, Faculty of Science

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Faculty of Science

izv. prof. dr. sc. Ana Galov, Faculty of Science

izv. prof. dr. sc. Petar Kružić (substitute), Faculty of Science

Thesis accepted: 29 April 2021

## POPIS KRATICA

|         |   |
|---------|---|
| AV      | atrio-ventrikularni čvor  |
| AMID    | amiodaron   |
| ChE     | kolinesteraza, eng. <i>Cholinesterase</i>   |
| DCF     | diklorofluorescein, eng. <i>Dichlorofluorescein</i>   |
| DMSO    | dimetilsulfoksid, eng. <i>Dimethyl sulfoxide</i>  |
| FAS     | farmaceutski aktivni spojevi  |
| HALMED  | Agencija za lijekove i medicinske proizvode   |
| HDL     | lipoprotein velike gustoće, eng. <i>High density lipoprotein</i>  |
| HMG-CoA | 3-hidroksi-3-metilglutarilkoenzim A   |
| hpf     | sati nakon oplodnje, eng. <i>Hours post fertilization</i>   |
| IDL     | lipoprotein srednje gustoće, eng. <i>Intermediate density lipoprotein</i>                               |
| KIT     | Tehnološki institut Karlsruhe, eng. <i>Karlsruhe Institute of Technology</i>                            |
| LC50    | srednja letalna koncentracija   |
| LDL     | lipoprotein male gustoće, eng. <i>Low density lipoprotein</i>   |
| NOAEL   | najviša doza/koncentracija koja ne uzrokuje štetne efekte, eng. <i>No observed adverse effect level</i> |
| SA      | sinus-atrijski čvor   |
| SIM     | simvastatin   |
| SEM     | svjetlosni elektronski mikroskop  |
| RAMI    | ramipril  |
| ROS     | reaktivne vrste kisika, eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>   |
| VER     | verapamil   |
| VLDL    | lipoprotein vrlo male gustoće, eng. <i>Very low density lipoprotein</i>                                 |
| WFD     | Okvirna direktiva o vodama, eng. <i>Water Framework Directive</i>                                       |
| ZET     | test embriotoksičnosti na zebricama, eng. <i>Zebrafish Embryotoxicity Test</i>                          |



## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....   | 3  |
| 3. LITERATURNI PREGLED .....  | 4  |
| 3.1. Izvori farmaceutika u vodenim ekosustavima .....                 | 4  |
| 3.2. Kardiovaskularni lijekovi .....                                  | 7  |
| 3.2.1. Lijekovi za liječenje srčanih aritmija.....                    | 8  |
| 3.2.1.1. Amiodaron .....  | 10 |
| 3.2.1.2. Verapamil.....   | 12 |
| 3.2.2. Lijekovi za liječenje dislipidemija.....                       | 14 |
| 3.2.2.1. Simvastatin.....   | 15 |
| 3.2.3. Lijekovi za liječenje hipertenzije .....                       | 17 |
| 3.2.3.1. Ramipril.....  | 19 |
| 3.3. Zebrica kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima ..... | 21 |
| 3.3.1. Filogenija vrste .....   | 21 |
| 3.3.2. Biologija vrste i upotreba u znanstvenim istraživanjima.....   | 21 |
| 3.3.3. Test embriotoksičnosti na zebričama.....                       | 23 |
| 3.3.4. Zakonodavni okviri i načela 3R-a.....                          | 24 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....  | 25 |
| 4.1. Materijali.....  | 25 |
| 4.1.1. Kemikalije i instrumenti .....                                 | 25 |
| 4.2. Metode .....   | 27 |
| 4.2.1. Uzgoj zebričica i mrijest.....                                 | 27 |
| 4.2.2. Test embriotoksičnosti na zebričama.....                       | 28 |
| 4.2.2. Praćenje uspješnosti izvaljivanja ličinki .....                | 29 |
| 4.2.3. Praćenje stope otkucaja srca .....                             | 29 |
| 4.2.4. Praćenje pokreta prsnih peraja .....                           | 30 |
| 4.2.5. Mjerenje dužine ličinki .....                                  | 30 |
| 4.2.6. Određivanje razine oksidativnog stresa .....                   | 30 |
| 4.2.7. Statistička obrada podataka .....                              | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 5. REZULTATI.....  | 32 |
| 5.1. Mortalitet, stopa abnormalnosti i izvaljivanja .....                  | 32 |
| 5.2. Dužina ličinki <i>D. rerio</i> .....                                  | 35 |
| 5.3. Utvrđivanje kardiotoksičnosti upotrebom embrija <i>D. rerio</i> ..... | 36 |
| 5.4. Utvrđivanje neurotoksičnosti upotrebom embrija <i>D. rerio</i> .....  | 37 |
| 5.5. Utvrđivanje oksidativnog stresa u ličinkama <i>D. rerio</i> .....     | 38 |
| 6. RASPRAVA.....   | 39 |
| 7. ZAKLJUČAK .....   | 48 |
| 8. LITERATURA.....   | 49 |
| ŽIVOTOPIS .....  | 58 |

## 1. UVOD

Čovjek ponekada nije svjestan koliko je važno aktivno sudjelovati u zaštiti i očuvanju okoliša. S razvojem čovječanstva proces onečišćenja okoliša doživljava eksponencijalan i nezaustavljiv rast te je postao jedan od najvećih problema s kojima se danas čovjek susreće (Walker i sur. 2012). Napredak znanosti uzrokovao je i novu vrstu onečišćenja, farmaceuticima (lijekovima), odnosno farmaceutski aktivnim spojevima (FAS) koji su jedna od glavnih komponenti onečišćenja slatkovodnih ekosustava, utvrđeni u ekstraktima sedimenta rijeke Save i plazmi riba koje nastanjuju njen vodotok (Babić i sur. 2018; Malev i sur. 2020). Postavlja se pitanje koji su to FAS koji potencijalno imaju negativan učinak na vodene ekosustave te kojim procesima oni dospijevaju u prirodu, a na kraju i do čovjeka. Za većinu novih onečišćivala (onečišćivala od rastućeg značaja, eng. *Contaminants of emerging concern*) u koje spadaju FAS nema dovoljno ekotoksikoloških istraživanja i podataka pa je teško predvidjeti njihov mogući utjecaj na zdravlje ljudi i vodeni svijet (Kaštelan-Macan i sur. 2013). Nadalje, vrlo je važno saznati izvore i mjesta ispuštanja FAS, kao i način akumulacije takvih spojeva u vodenim ekosustavima. Potrebno je stoga istražiti i postaviti norme kako bi se utvrdilo koja koncentracija predstavlja štetu za okolišne organizme.

U ovom radu praćen je utjecaj prioriternih kardiovaskularnih lijekova amiodarona (AMID), ramiprila (RAMI), simvastatina (SIM), verapamila (VER) te smjese sva četiri spoja koji se koriste za liječenje hipertenzije i regulacije krvnog tlaka, srčanih aritmija te dislipidemija. U okolišu, jedinke će rijetko biti izložene jednom spoju, već smjesi lijekova i drugih onečišćivača, koji mogu imati interaktivne učinke. Oni dolaze putem otpadnih voda u okoliš gdje se akumuliraju u organizmima koji su u kontaktu s vodom. Bioakumulacija općenito predstavlja proces gomilanja određenih toksičnih tvari poput pesticida ili drugih kemikalija u živim organizmima (Rzyski i sur. 2014). Do bioakumulacije dolazi kada organizam gomila više tvari nego što ih gubi te se tvari zadržavaju u organizmu. Shodno tome, najviše koncentracije pronađene su u akvatičkim vrstama, što ukazuje na to da su organizmi u vodenim zajednicama važni „primatelji“ FAS odnosno lijekova.

Modelni organizam riba zebrića *Danio rerio* (Hamilton, 1822) odabrana je zbog višestrukih prednosti, od kojih su najvažnije visoka osjetljivost na onečišćenja u vodenom okolišu, brza izmjena generacija te postojanje standardiziranih protokola, što osigurava pouzdanost i ponovljivost dobivenih rezultata (Lawrence, 2007). Također, jedan od najčešće korištenih testova u toksikološkim istraživanjima je test toksičnosti na embrijima zebrića [eng. *Zebrafish Embryotoxicity Test*; ZET; OECD 236 (2013.)], koji se uspješno provodi za procjenu

toksičnosti pojedinačnih spojeva i okolišnih uzoraka. Dodatna prednost ovog testa je u tome što zebrice do 120 hpf, prema Direktivi o zaštiti životinja koje se koriste u laboratorijske svrhe (2010/63/EU) ne podilaze pod okvire zakonske regulative. Nadalje, slijedom brojnih istraživanja, stvorene su mnogobrojne baze podataka detaljno opisanih razvojnih stadija ribe zebrice te je sekvencioniranjem genoma utvrđeno kako zebrice i ljudi dijele 70% zajedničkog genoma, od čega je čak 84% gena uključenih u genske bolesti prisutno i u zebricama (Howe i sur. 2013). To saznanje postalo je temeljem mnogih biomedicinskih istraživanja, kao i brojnih eksponencijalno rastućih znanstvenih publikacija.

Općeniti cilj znanstvene zajednice je podizanje razine svijesti o FAS-ovima čime se utvrđuje niz mjera s kratkoročnim (istraživanje i međunarodna suradnja), srednjoročnim (metode testiranja) i dugoročnim (regulatornim) koracima koji se trebaju poduzeti. Sve veći broj kemikalija se identificira kao tvari koje izazivaju veliku zabrinutost zbog svojstava neuroloških poremećaja. Pristupanjem u Europsku uniju Republika Hrvatska prihvatila je uredbu zakonodavstva poznatiju pod nazivom REACH (EC 2006). Glavni ciljevi te uredbe su poboljšanje zaštite ljudskog zdravlja i okoliša s obzirom na opasnosti koje mogu predstavljati kemikalije te istodobno povećanje konkurentnosti kemijske industrije unutar Europske unije. REACH znači registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemikalija, a uredba je stupila na snagu 1. lipnja 2007. godine. Ako se rizicima ne može upravljati, vlasti mogu ograničiti uporabu tvari na različite načine. Dugoročno gledano, najopasnije tvari treba zamijeniti manje opasnim.

Životinje u kopnenim vodama mogu biti izložene niskim koncentracijama lijekova tijekom cijelog života i na svakom stupnju razvoja. Stadij života također može odrediti osjetljivost na farmaceutsku izloženost i učinke, budući da se ekološka niša i strategija hranjenja često razlikuju među juvenilnim i odraslim stadijima, kao i metabolički kapacitet za suočavanje s kemijskom ili farmaceutskom izloženosti (Hutchinson i sur. 2014). Iako su još nepoznati izravni i neizravni učinci navedenih spojeva na embrije, sve veći broj istraživanja pokazuje da mnogi FAS ometaju ekološke interakcije i funkcije zajednice (Richmond i sur. 2018). Unatoč brojnim eksperimentima koja ukazuju na to da farmaceutski spojevi mogu biti univerzalni zagađivači, malo je poznato do koje mjere se uzimaju i redistribuiraju među različitim vrstama organizama u prirodnim hranidbenim mrežama. Upravo iz tog razloga ovaj diplomski rad usmjeren je prema interdisciplinarnom pristupu procjene utjecaja kardiovaskularnih farmaceutika sveprisutnih u vodenim ekosustavima.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrđivanje štetnog učinka kardiovaskularnih lijekova (AMID, RAMI, SIM i VER) triju različitih, okolišno relevantnih koncentracija (0.1, 1.0 i 10.0 µg/L) te njihove smjese (0.4, 4.0 i 40.0 µg/L) na embrije ribe zebrice *Danio rerio* tijekom prvih 96 h razvoja. Toksičnost je procijenjena praćenjem sljedećih krajnjih učinaka:

- a) morfoloških promjena (mortalitet, stopa abnormalnosti, rast ličnaka);
- b) fizioloških promjena (stopa izvaljivanja);
- c) kardiotsičnosti (brzina otkucaja srca);
- d) neurotsičnosti (spontani pokreti prsnim perajama i promjena ponašanja);
- e) određivanje razine oksidativnog stresa.

U skladu s glavnim ciljem, dodatan cilj bit će utvrđivanje potrebe za sustavnim monitoringom testiranih kardiovaskularnih farmaceutika u vodenim ekosustavima.

### 3. LITERATURNI PREGLED

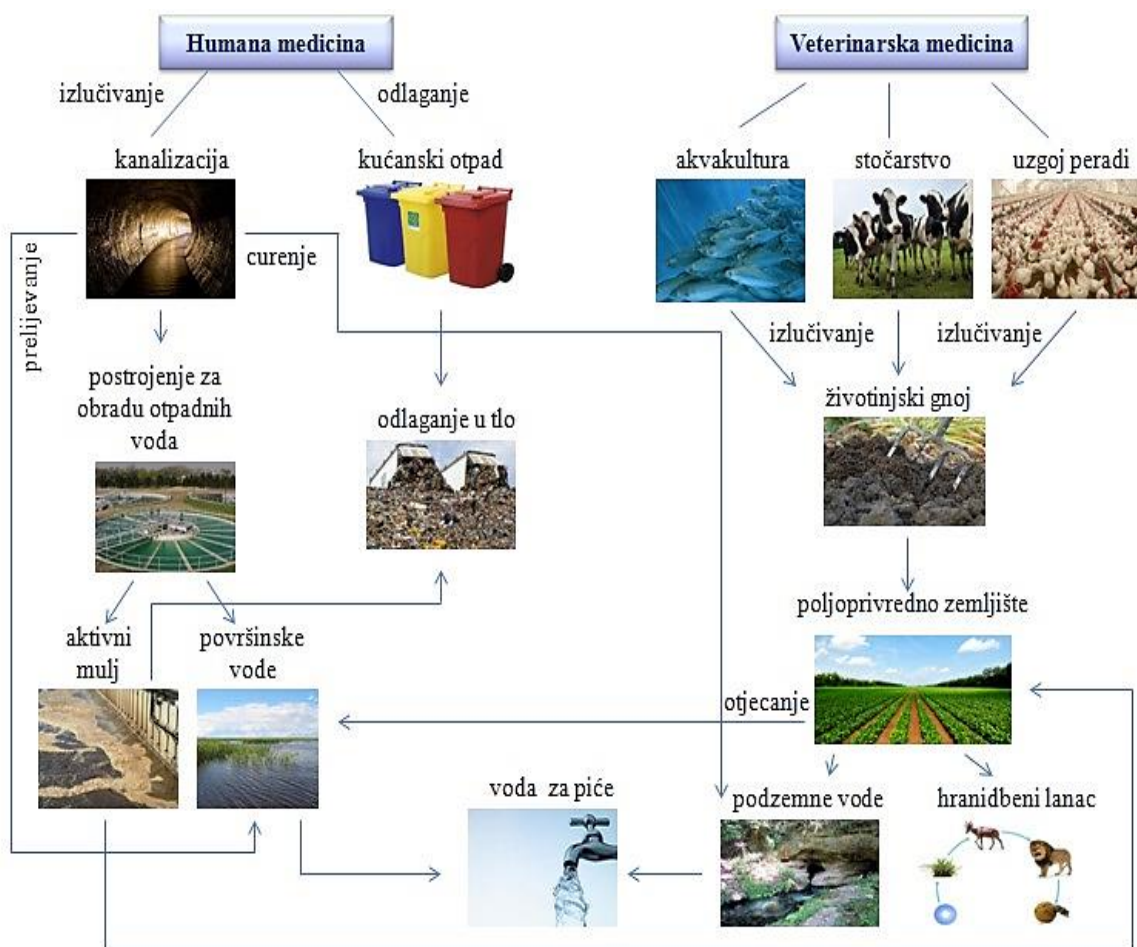
#### 3.1. Izvori farmaceutika u vodenim ekosustavima

Farmaceutski aktivni spojevi (FAS), odnosno farmaceutici su grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove te dodatke prehrani (Paterson i sur. 2008). Diješe se na prirodne, polusintetske i sintetske. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za dijagnosticiranje, liječenje, ublažavanje ili sprječavanje bolesti (Kaštelan-Macan i sur. 2013). Budući da je broj i gustoća ljudi i stoke koji zahtijevaju zdravstvenu skrb u porastu, tako je i globalna uporaba FAS u sustavnom porastu što dovodi do kontaminacije površinskih voda sa ksenobiotičkim spojevima širokog raspona bioaktivnosti (Caban i sur. 2015). Taj se problem dodatno pogoršava, osobito u razvijenijim zemljama, povećanjem broja pretilih i starijih osoba s kroničnim zdravstvenim problemima. Time dolazi do povećanja količine i raznolikosti lijekova koji se konzumiraju i zatim izlučuju. Značajne količine lijekova mogu se emitirati u okoliš iz proizvodnih mjesta, ali isto tako i putem neadekvatno tretiranih otpadnih voda (Slika 1; Ebele i sur. 2017). Različite vrste lijekova također se uobičajeno koriste za povećanje stočarske proizvodnje u zemljama s visokim i niskim prihodima, ponekad bez jakih regulatornih kontrola za uporabu ili ispuštanje (Ellis i sur. 2006). Iako je uporaba lijekova već dugi niz godina na visokoj razini, tek su se u posljednjih 10-15 godina potencijalni rizici po okoliš ovih tvari počeli detaljno razmatrati. Trenutno postoje neke nesigurnosti u vezi s procjenom rizika za okoliš lijekova zbog nedostatka informacija o njihovoj sudbini u okolišu, njihovoj akumulaciji, metabolizmu i izlučivanju (farmakokinetika) te njihovim ciljnim afinitetima i funkcionalnim učincima (farmakodinamika) u neciljnim vrstama (Brodin i sur. 2014).

Glavni izvori FAS u okolišu uključuju farmaceutsku proizvodnju, stočarstvo, akvakulturu, kućne ljubimce te zdravstvo (Slika 1; Ebele i sur. 2017). FAS se mogu širiti izravno u okoliš ili putem postrojenja za obradu otpadnih voda i odlagališta. Nadalje, potrebno je naglasiti kako postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ne uklanjaju lijekove u potpunosti pa se različiti FAS mogu naći u malim količinama u površinskim vodama (Chen i sur. 2013). Kontaminacija slatkovodnog okoliša lijekovima može se pojaviti na različite načine, a neizbježan put od strane čovjeka je izlučivanje lijekova nakon terapijske primjene, nakon čega slijedi ispuštanje u kanalizacijski sustav ili septičku jamu. Nakon obrade otpadnih voda, otpadne se vode mogu koristiti za navodnjavanje s biokrutinama (tretiranim muljem) koje se potencijalno mogu koristiti kao gnojivo za poljoprivredno zemljište (Yang, 2015). Drugi izvor farmaceutskih spojeva za okoliš je njihova proizvodnja jer otpadne vode iz proizvodnog pogona izravno ulaze

u postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (Fick, 2009). Nakon obrade, mulj se može u strogo kontroliranim i specifičnim uvjetima koristiti kao gnojivo u poljoprivredi, a tekući otpad se ispušta izravno u rijeke. Osim toga, FAS mogu doći do podzemnih voda putem ispiranja iz tla, što također može predstavljati prijetnju pitkoj vodi. Veterinarski lijekovi se ispuštaju u okoliš kada se životinjski otpad u čvrstom ili tekućem stanju dodaje na poljoprivredno tlo kao gnojivo. Posljedično, otjecanje iz poljoprivrednih površina može ući u slatkovodne sustave i ispirati se u podzemne vode. Učestalost pojave relativno niskih koncentracija FAS u mnogim ekosustavima navele su istraživače da se počnu baviti procjenom njihovog rizika za ljude i životinje u tako onečišćenom okolišu (Boxall i sur. 2012). Treba naglasiti da postoji veliki broj FAS s malo ili bez podataka o njihovom negativnom utjecaju na okoliš, a zbog njihovog biološkog učinka čak i relativno niske koncentracije nekih lijekova mogu uzrokovati određene štetne učinke. Predloženi su brojni programi određivanja prioriteta koji se temelje na intrinzičnim svojstvima lijekova (opasnost) i njihovom opsegu uporabe (izloženost) s ciljem unaprjeđenja objektivnih znanstvenih kriterija za procjenu sigurnosti lijekova (Schreiber i sur. 2011). Predviđanje izlaganja organizma lijekovima ovisi o brojnim ekološkim i fiziološkim čimbenicima, uključujući put izlaganja (vodeni ili kopneni) i put unosa (izravni ili neizravni).

Nadalje, važno je procijeniti i definirati toksikološke rizike koje predstavlja kontaminirani vodeni sediment čija kompleksna priroda predstavlja izazov za razvoj standarda kakvoće okoliša (Šrut i sur. 2011). Prema istraživanju iz 2018. godine, izrađena je ekotoksikološka analiza s ciljem procjene toksičnosti sedimenta rijeke Save na četiri lokacije (Jesenice, Rugvica, Galdovo i Lukavec) (Babić i sur. 2018). Od kardiovaskularnih lijekova, na 3 postaje rijeke Save (Jesenice, Rugvica i Lukavec) pronađen je amiodaron, dok je na 2 lokacije (Galdovo i Lukavec) pronađen verapamil. Prema PBT (postojanost, bioakumulacija i toksičnost, eng. *persistent, bioaccumulative and toxic substances*) ljestvici, amiodaron se nalazi među prvih 20 organskih onečišćivača što izaziva zabrinutost i potrebu za daljnjim istraživanjima (Babić i sur. 2018). Prema istraživanju iz 2020. godine, istražena je prisutnost 90 farmaceutika u plazmi riba iz rijeke Save koja je od velike važnosti za Europu (Malev i sur. 2020). Što se tiče kardiovaskularnih lijekova, otkriveni su ramipril, simvastatin i verapamil pri čemu simvastatin izaziva najveću zabrinutost zbog visoke vrijednosti omjera učinka pri srednjoj vrijednosti od 23.22 (Malev i sur. 2020). Omjer učinka za verapamil pri srednjoj vrijednosti iznosio je 10.00, dok je za ramipril iznosio 5.33 za što je potreban daljnji monitoring ispuštanja ovih lijekova u okoliš (Malev i sur. 2020). Upravo iz razloga što navedena četiri lijeka izazivaju veliku zabrinutost, ovaj diplomski rad detaljnije objašnjava utjecaj kardiovaskularnih farmaceutika na embrije ribe zebrice.



Slika 1. Lijekovi se mogu širiti u okoliš putem više potencijalno složenih putova od kojih su neki ovdje prikazani (Prilagođeno na temelju Ebele i sur. 2017.).

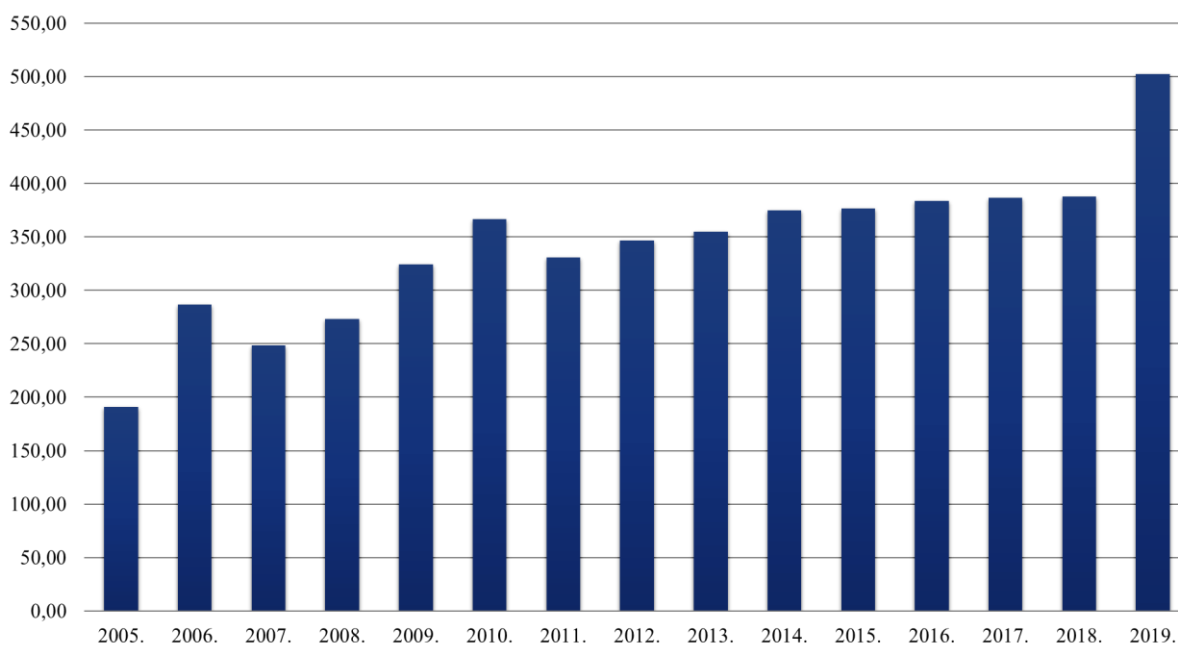


### 3.2. Kardiovaskularni lijekovi

Kardiovaskularni lijekovi su vrsta farmaceutika koji se koriste u liječenju patologije srca i krvožilnog sustava (Katzung i Trevor 2017). Postoje različite klasifikacije kardiovaskularnih lijekova koje obuhvaćaju i lijekove koji primarno ne spadaju u ovu grupu, ali se koriste u prevenciji nastanka bolesti kardiovaskularnog sustava. Lijekovi koji se koriste u ovome radu, dolaze iz tri različite skupine lijekova (Katzung i Trevor 2017):

- 1) Lijekovi za liječenje hipertenzije - ramipril.
- 2) Lijekovi za liječenje dislipidemija - simvastatin.
- 3) Lijekovi za liječenje srčanih aritmija - amiodaron i verapamil.

Prema HALMED-u, ukupna potrošnja lijekova u 2019. godini u Republici Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/1000/dan) svrstava skupinu kardiovaskularnih farmaceutika na prvo mjesto (URL 1). Nadalje, stalni porast potrošnje farmaceutika u Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/1000/dan) u posljednjih 15 godina iznosi gotovo 100% što je vidljivo iz godišnjih izvještaja HALMED-a (Slika 2; URL 2). Prema tome, potreban je stalni monitoring ispuštanja navedenih lijekova u okoliš.



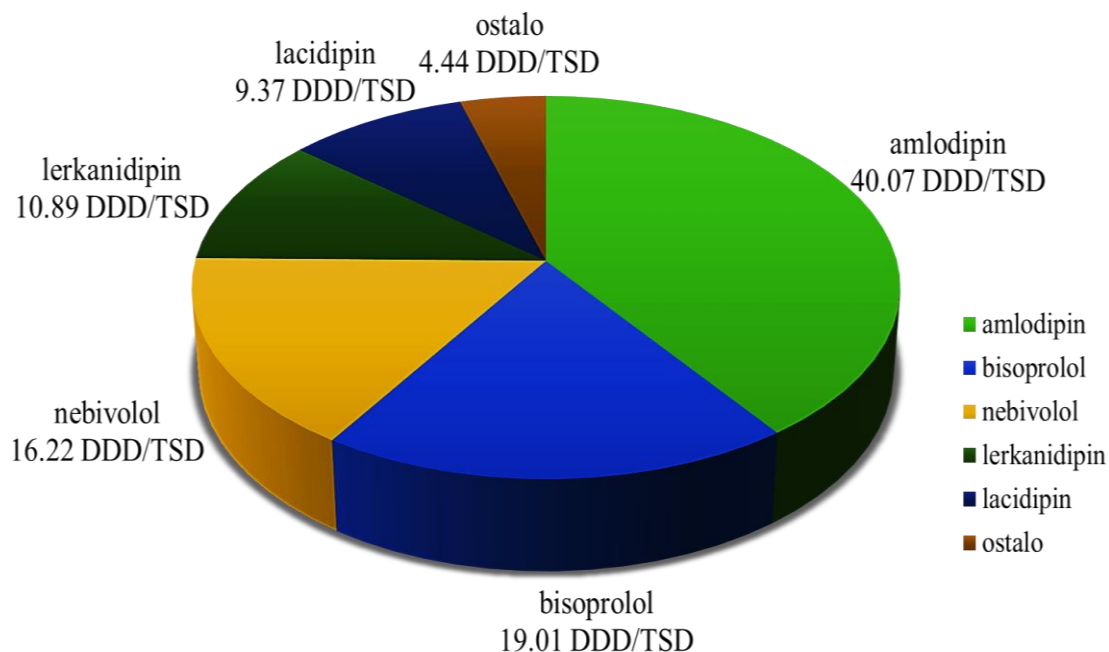
Slika 2. Godišnja potrošnja kardiovaskularnih farmaceutika od 2005. do 2019. godine u Republici Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/1000/dan) (Prilagođeno prema URL 2.).

### 3.2.1. Lijekovi za liječenje srčanih aritmija

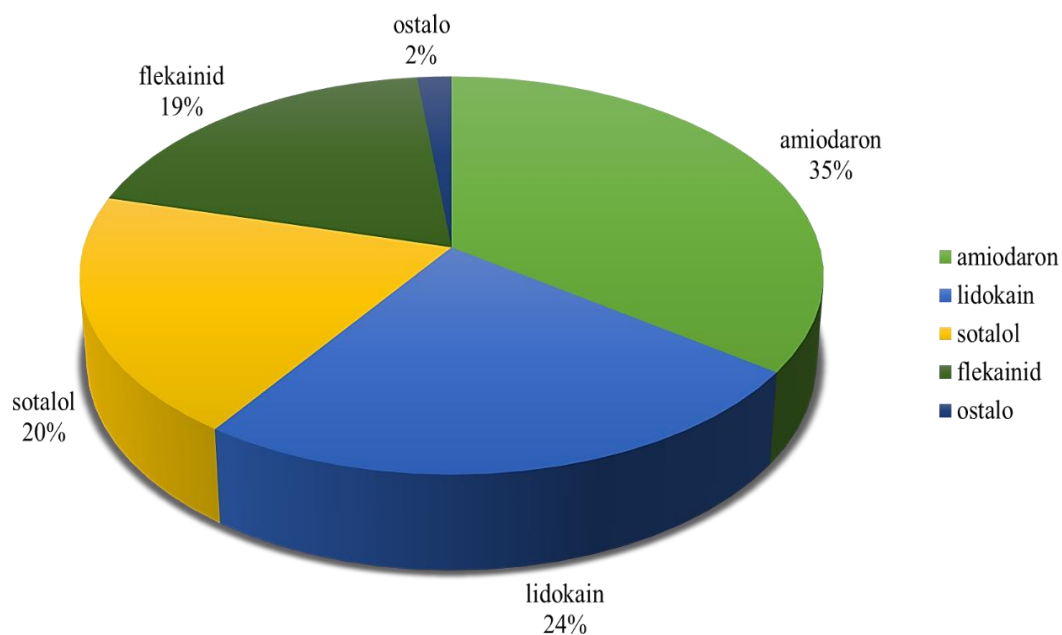
Aritmija je poremećaj srčanog ritma koji nastaje prilikom poremećaja električnih impulsa koji su odgovorni za rad srčanog mišića (Grant, 2003). Najjednostavnija dijagnostička metoda je snimanje električne aktivnosti srca elektrokardiografijom. Bolesti srca, pluća, štitnjače, jetre, različite infekcije (npr. bruceloza, borelioza), promjena tjelesne temperature (povišenje ili sniženje), upale ili trovanja te anemija mogu uzrokovati pojavu aritmije, no uzrok u većini slučajeva ostaje nepoznat (Keating i Sanguinetti 2001). Ponekad su aritmije neželjena pojava tijekom uzimanja nekog lijeka ili su rezultat emocionalnih stanja od čega je stres najčešći. Postoji više različitih podjela aritmija (Katzung i Trevor 2017). Prema mjestu nastanka aritmije mogu biti atrijske (nastale u pretklijetkama) i ventrikulske (nastale u klijetkama). Zatim se mogu podijeliti na smetnje stvaranja i provođenja podražaja te ektopične aritmije koje nastaju izvan sinusnog čvora. S obzirom na brzinu srčanog ritma, govori se o tahiaritmijama (ubrzani ritam) i bradiaritmijama (usporeni srčani ritam). Liječenje aritmije ovisi o njenoj vrsti i uzroku te postoji niz lijekova koji liječe nastalu ili sprječavaju pojavu nove aritmije. Glavni mehanizmi farmakoloških antiaritmika podrazumijevaju blokadu natrijskih kanala, blokadu simpatičkih autonomnih učinaka na srce, produljenje efektivnog refrakternog razdoblja te blokadu kalcijevih kanala. Najraširenija klasifikacija antiaritmika temelji se na mehanizmu djelovanja i razlikuje četiri skupine (Katzung i Trevor 2017):

- 1) Blokatori natrijskih kanala - podskupine se temelje na učinku dužine trajanja akcijskog potencijala i kinetici blokade natrijskih kanala (npr. prokainamid, kinidin, dizopiramid, lidokain, mekisletin, flekainid, propafenon, moricizin). Oni su najstarija skupina antiaritmika i još uvijek su u širokoj upotrebi.
- 2) Blokatori  $\beta$ -adrenergičnih receptora - skupinu čine simpatolici koji smanjuju  $\beta$ -adrenergičnu aktivnost u srcu (npr. bisoprolol, nebivolol, atenolol, esmolol, sotalol).
- 3) Lijekovi koji produžuju efektivno refrakterni razdoblje produžujući akcijski potencijal - većina lijekova s tim djelovanjem blokira brzu komponentu kasne ispravljačke struje kalija (npr. amiodaron, dronedaron, vernakalant, dofetilid, ibutilid).
- 4) Blokatori kalcijevih kanala - skupinu čine lijekovi koji blokiraju struju kalcija u srcu. To usporava provođenje impulsa u područjima gdje je nastanak akcijskog potencijala ovisan o kalciju, primjerice u SA i AV čvoru (npr. verapamil, diltiazem, amlodipin).

Ne postoji univerzalna sudbina FAS koji se ispuštaju u vodeni okoliš. Prilikom dolaska u otpadne vode FAS se mogu razgraditi ili preoblikovati u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. U ovoj fazi, transformacija nekih farmaceutskih proizvoda može rezultirati spojevima koji pokazuju veću toksičnost i visoku postojanost (Celiz i sur. 2009). Scenarij pod kojim su koncentracije matičnog spoja ispod granica detekcije, ali su njegovi proizvodi transformacije često prisutni, također se mora uzeti u obzir (Jakimska i sur. 2014). Uklanjanje FAS i njihova dinamika u vodenom okolišu ovise o nizu ključnih čimbenika, kao što su: inherentne fizikalno-kemijske osobine lijeka, dostupnost sunčeve svjetlosti, temperatura, pH, dostupnost kisika i mikrobne zajednice (Mendoza i sur. 2015). Prema zabilježenim statističkim podacima potrošnje antiaritmika u Republici Hrvatskoj 2019. godine najčešće je korišten lijek po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) amlodipin (40.1), zatim bisoprolol (19.0), nebivolol (16.2), lerkanidipin (10.9) te lacidipin (9.4), dok se amiodaron nalazi na 9. mjestu (3.27), a verapamil na 12. mjestu (1.43) (Slika 3; URL 3). Iz priloženoga, najviše dominiraju lijekovi iz skupine blokatora kalcijevih kanala te  $\beta$ -adrenergičnih receptora. U SAD-u 2018. godine najčešće je korišten lijek amiodaron (35%), zatim lidokain (24%), sotalol (20%), flekainid (19%) te ostali lijekovi koji čine 2% sveukupne populacije (Slika 4; URL 4).



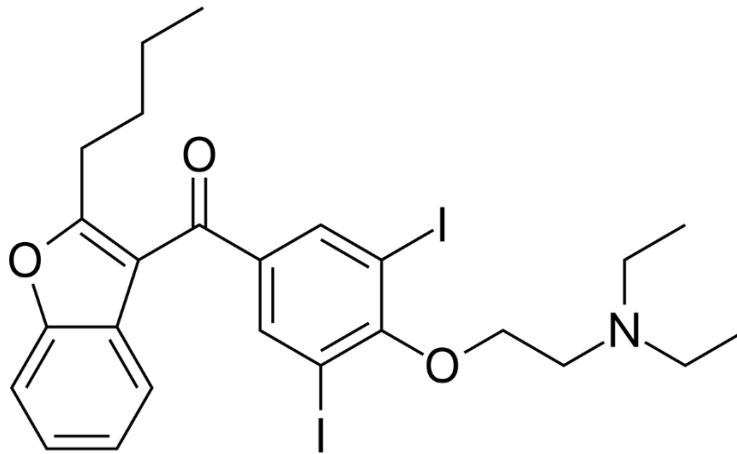
Slika 3. Godišnja potrošnja antiaritmika 2019. godine u Republici Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) (Prilagođeno prema URL 3.).



Slika 4. Godišnja potrošnja antiaritmika 2018. godine u SAD-u  
(Prilagođeno prema URL 4.).

### 3.2.1.1. Amiodaron

Amiodaron je kardiovaskularni lijek koji pripada trećoj skupini antiaritmika (Slika 5; Quaglino i sur. 2004). Odobren je za oralnu i intravensku primjenu u liječenju teških ventrikularnih aritmija, a nalazi se na listi 200 najkorištenijih lijekova u SAD-u. Preporuka za njegovo korištenje temelji se i na činjenici da unutar 2 godine prevenira ventrikularnu tahikardiju ili fibrilaciju ventrikula i smrt s učinkovitošću od 60% (Goldschlager i sur. 2007). Amiodaron produljuje trajanje akcijskog potencijala blokiranjem kalijske struje, što se na elektrokardiogramu vidi kao produljenje QT intervala (Keating i Sanguinetti 2001). Unatoč značajnom produljenju QT intervala uz amiodaron je zabilježena niska pojavnost *torsades de pointes* (specifičan oblik polimorfne ventrikulske tahikardije), što mu daje prednost u odnosu na druge antiaritmike (Connolly, 1999). Unatoč tomu što je prema sadašnjoj klasifikaciji lijek iz treće skupine, amiodaron također značajno blokira inaktivirane natrijske kanale (Katzung i Trevor 2017). Amiodaron ima i blagi adrenergični učinak te blago blokira kalcijske kanale. Posljedice ovih učinaka su usporavanje frekvencije i provođenja električnih impulsa kroz AV čvor (Katzung i Trevor 2017).



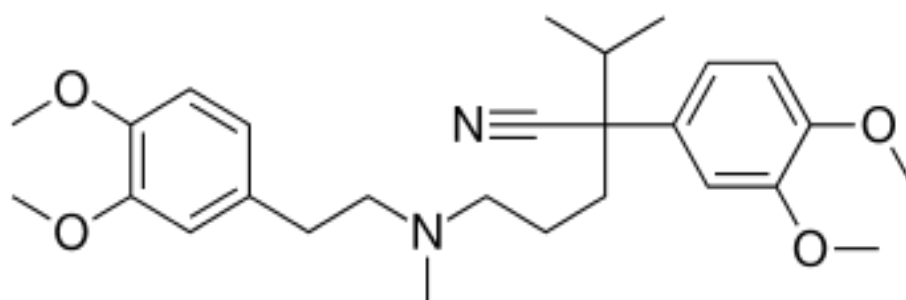
Slika 5. Struktura amiodarona (Quaglino i sur. 2004.).

Prema istraživanju iz 2016. godine, praćen je utjecaj amiodarona u jetri ličinki *D. rerio* kako bi se utvrdila razina neučinkovitosti tvari (NOAEL) i potvrdila metoda za procjenu hepatotoksičnosti (Pandya i sur. 2016). Na 96 hpf, utvrđena je srednja letalna koncentracija (LC50) od 10.0  $\mu\text{M}$  pri kojoj amiodaron inducira smrtnost ličinki pri čemu je NOAEL 3.0  $\mu\text{M}$  što se očitovalo kao smanjenje pigmentacije i nekroza jetre (Pandya i sur. 2016). Obzirom na rezultate istraživanja, amiodaron pokazuje hepatotoksični potencijal na ličinke riba zebrica što je dalo osnovu za daljnja istraživanja pri čemu su dobiveni rezultati u skladu s dokazanim hepatotoksičnim učincima lijeka na ljude.

Također, rađena je toksikološka procjena utjecaja amiodarona na ličinke vodozemca *Xenopus tropicalis* prilikom čega je utvrđeno smanjenje biomase i rasta životinja, a razvojne faze su bile značajno odgođene (Shi i sur. 2012). Daljnja istraživanja su upućivala na značajan pad stope preživljavanja, nepotpunu metamorfozu, izostanak razvoja repa te inhibiciju produženja stražnjih udova punoglavaca vrste *X. tropicalis* i *X. laevis* koji su pod kontrolom hormona štitnjače, što ukazuje da je amiodaron antagonist tiroidne žlijezde (Sanoh i sur. 2020). Pri izlaganju koncentracijama amiodarona od 64.5 i 6.5  $\mu\text{g/L}$  na punoglavcima *X. laevis*, uočene su smetnje u razvoju, dok su punoglavci *X. tropicalis* uz to pokazali i gubitak apetita u usporedbi s kontrolnim grupama (Sanoh i sur. 2020). Ovi rezultati sugeriraju da amiodaron predstavlja potencijalni rizik za vodene životinje narušavajući hormonsku homeostazu, uz daljnju mogućnost bioakumulacije u organizmima smještenim na višim trofičkim razinama hranidbenog lanca.

### 3.2.1.2. Verapamil

Verapamil je kardiovaskularni lijek koji pripada skupini blokatora kalcijevih kanala (Slika 6; Meier i sur. 2006). Primjenjuje se oralno i intravenski pri čemu blokira aktivirani i inaktivirani L-tip kalcijevih kanala, a prema HALMED-u, uvršten je na listu 50 najkorištenijih kardiovaskularnih lijekova u Republici Hrvatskoj 2009. godine (URL 5). Njegovi učinci izraženi su u oštećenim tkivima miokarda koja su ektopični predvodnici učestalog okidanja električnih impulsa, zatim u onima nepotpuno repolariziranim u mirovanju te u onima u kojima aktivacija ovisi isključivo o kalcijevoj struji, kao što su SA i AV čvorovi (Katzung i Trevor 2017). Pri terapijskim se koncentracijama vrijeme provođenja kroz AV čvor i efektivno refrakternost produžuju. Verapamil obično izravnim djelovanjem usporava SA čvor, ali njegov hipotenzivski učinak može katkad rezultirati malim refleksnim povećanjem frekvencije SA čvora. Verapamil može prekinuti rane i kasne naknadne depolarizacije i može antagonizirati spore odgovore nastale u ozbiljno depolariziranom tkivu (Katzung i Trevor 2017).

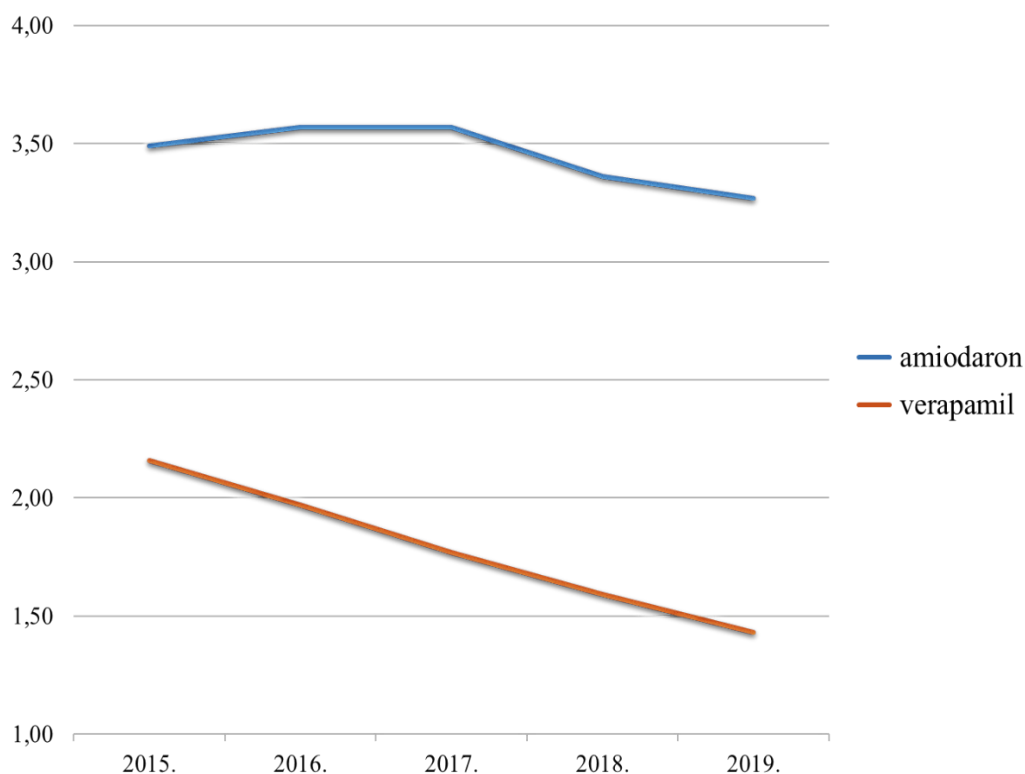


Slika 6. Struktura verapamila (Meier i sur. 2006.).

Prema istraživanju iz 2010. godine izloženost juvenilnih kalifornijskih pastrva *Oncorhynchus mykiss* različitim koncentracijama verapamila (1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/L) rezultiralo je promjenama u ponašanju (Li i sur. 2010). Obzirom na kontrolnu skupinu, uočeni su bihevioralni poremećaji poput skupljanja riba na površini, poremećaji vertikalnog i silaznog obrasca ponašanja, poteškoće s disanjem i hiperaktivnošću, prevrtanja u vodi te gubitka ravnoteže. Oksidativni stres primijećen u ribljim tkivima značajno je rastao s povećanjem koncentracije verapamila te je u usporedbi s kontrolom, najviša razina oksidativnog stresa zabilježena u područjima mozga, škrge i mišića (Li i sur. 2010). Slabija cirkulacija krvi, perikardijalni edemi i bradikardija uočeni su i na embrijima riba zebrića nakon mikroinjektiranja 300.0 μM verapamila (Zhu i sur. 2018). Višestruki odgovori riba ukazali su da verapamil izaziva fiziološki stres koji se može koristiti kao potencijalni biomarker za

praćenje zaostalog verapamila u vodenom okolišu (Li i sur. 2011). Iako bihevioralno-ekotoksikološki podaci nisu bili često korišteni prilikom procjene rizika od okolišnih zagađivača, procjene ponašanja riba vrlo su korisne informacije u praćenju fiziološkog statusa populacije i služe kao pokazatelji zdravstvenog stanja vodenog ekosustava (Robinson, 2009).

Što se tiče izdavanja receptata za amiodaron u razdoblju od 2015. do 2019. godine, Republika Hrvatska bilježi blage skokove 2016. i 2017. godine nakon čega slijedi pad potrošnje u posljednjih nekoliko godina (Slika 7; URL 6.) Potrošnja verapamila je u konstantnom padu u navedenom petogodišnjem razdoblju. Nadalje, vidljiva je dvostruko veća potrošnja amiodarona u odnosu na verapamil. Potrebna su daljnja istraživanja i statistički podatci za korištenje lijekova kako bi se mogla utvrditi količina ispuštanja kemikalija u okoliš te sveukupni utjecaj na organizme.



Slika 7. Definirana dnevna doza/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) za amiodaron i verapamil u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2015. do 2019. godine (Prilagođeno prema URL 6.).

### 3.2.2. Lijekovi za liječenje dislipidemija

Lipidi se u plazmi prenose u lipoproteinima, odnosno biokemijskim spojevima koji se sastoje od proteina i lipida. Prema različitim udjelima pojedinih kemijskih spojeva koje se nalaze u određenom lipoproteinu, razlikujemo pet klasa (Tablica 1; Katzung i Trevor 2017).

Tablica 1. Prikaz različitih vrsta lipoproteina. (Izvor: Katzung i Trevor 2017.)

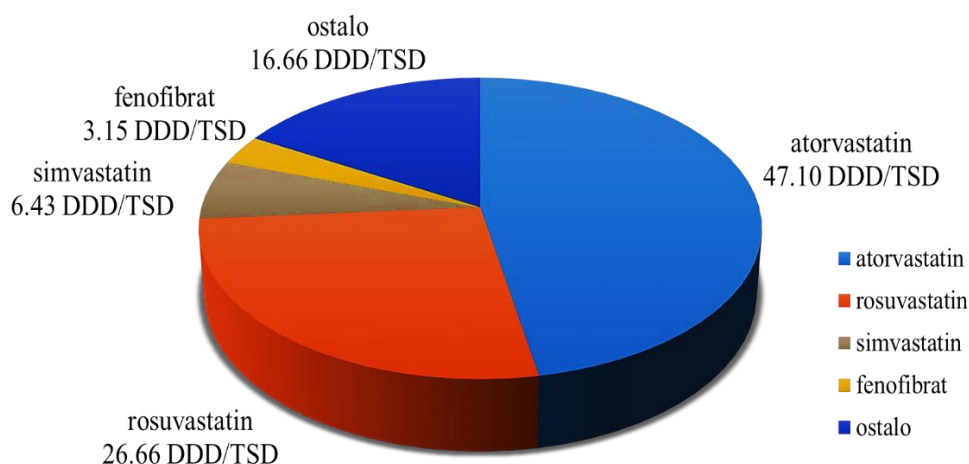
| NAZIV                                  | FUNKCIJA  |
|--|---|
| Hilomikroni                            | Prenose trigliceride (masti) od crijeva do jetre, mišićnog tkiva i masnog tkiva.    |
| Lipoproteini vrlo niske gustoće (VLDL) | Prenose novosintetizirani triacilglicerol od jetre prema masnom tkivu.              |
| Lipoprotein niske gustoće (LDL)        | Prenosi kolesterol od jetre prema stanicama u tijelu tzv. "loš kolesterol".         |
| Lipoprotein srednje gustoće (IDL)      | Endocitozom ulaze u jetru.  |
| Lipoprotein visoke gustoće (HDL)       | Prikuplja kolesterol iz tkiva u tijelu i odnosi ga u jetru tzv. "dobar kolesterol". |

Metabolički poremećaji u kojima postoji porast bilo koje vrste lipoproteina zovu se hiperlipoproteinemije ili hiperlipidemije (Katzung i Trevor 2017). Hiperlipemija označava povišenu razinu triglicerida. Dvije najvažnije kliničke posljedice hiperlipidemija jesu akutna upala gušterače i ateroskleroza. Najraširenija klasifikacija lijekova za liječenje dislipidemija temelji se na mehanizmu djelovanja i razlikuje pet glavnih skupina (Katzung i Trevor 2017):

- 1) Statini - inhibiraju HMG-CoA reduktaze, što rezultira smanjenjem sinteze kolesterola i prilagodbom receptora za LDL na hepatocitima te blagim sniženjem triglicerida (npr. simvastatin, artrovastatin, rosuvastatin).
- 2) Fibrati - agonisti receptora za aktivator proliferacije peroksisoma alfa, što rezultira smanjenjem lučenja VLDL-a, porastom aktivnosti lipoproteina lipaze te porastom HDL (npr. fenofibrat, gemfibrozil, bezafibrat).
- 3) Vezivači žučnih kiselina - vežu žučne kiseline u crijevima, povećavaju katabolizam kolesterola te prilagođuju receptore za LDL što rezultira smanjenjem LDL-a (npr. kolestipol).
- 4) Inhibitori apsorpcije sterola - blokiraju prijenosnike za sterole u četkastim membranama crijevnog epitela, što rezultira inhibiranjem reapsorpcije kolesterola izlučenog u žuči te smanjenjem LDL-a i fitosterola (npr. ezetimib).
- 5) Niacin - smanjuje lučenje VLDL-a iz jetre, što rezultira povećanjem HDL-a te smanjenjem lipoproteina i triglicerida.



Prema zabilježenim statističkim podacima potrošnje hipolipemika u Republici Hrvatskoj 2019. godine najčešće korišten lijek po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) je atorvastatin (47.10), zatim rosuvastatin (37.42), na 3. mjestu je simvastatin (6.43) te fenofibrat (3.15). Iz priloženoga, najviše dominiraju lijekovi iz skupine statina (Slika 8; URL 7).

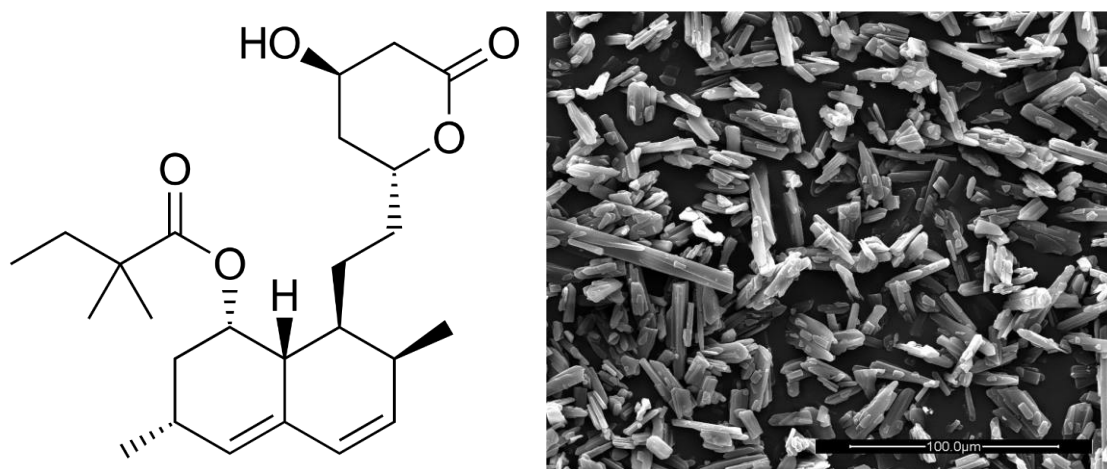


Slika 8. Godišnja potrošnja hipolipemika 2019. godine u Republici Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) (Prilagođeno prema URL 7.).

### 3.2.2.1. Simvastatin

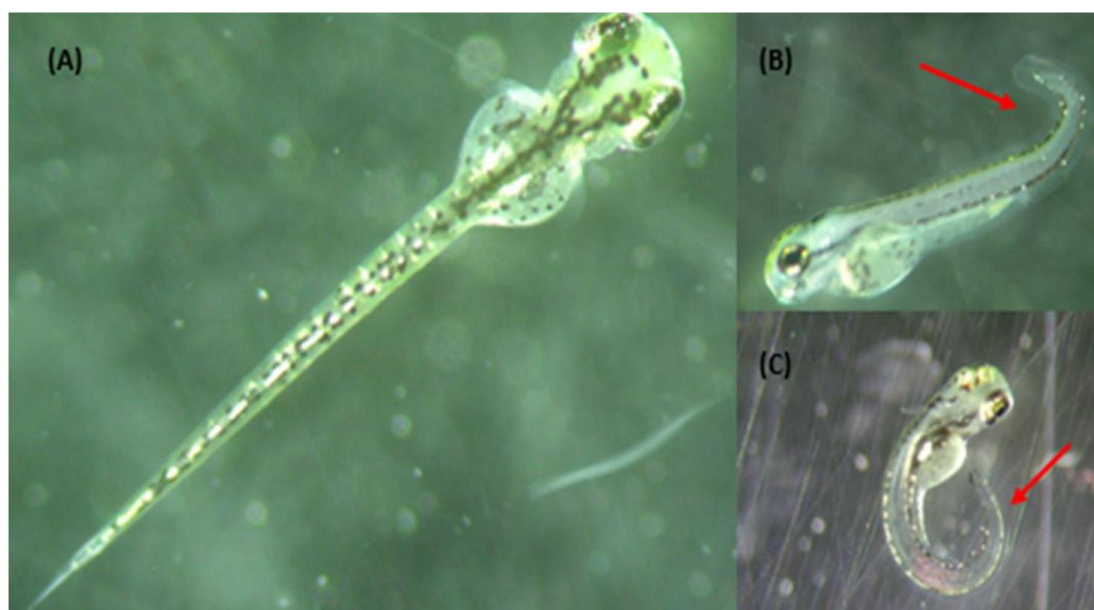
Simvastatin pripada skupini statina, odnosno kompetitivnim inhibitorima HMG-CoA reduktaze, a jedan je od najkorištenijih lijekova za prevenciju kardiovaskularnih bolesti u svijetu (Slika 9; Simões i sur. 2013). Prema HALMED-u, uvršten je na listu 50 najkorištenijih kardiovaskularnih lijekova u Republici Hrvatskoj 2019. godine (URL 8). Glavno djelovanje simvastatina uključuje snižavanje LDL-a te sniženje razine oksidacijskog stresa i upale krvnih žila, što povećava stabilnost aterosklerotske lezije (Katzung i Trevor 2017). Simvastatin značajno smanjuje učestalost novih koronarnih događaja i aterotrombotskih (proces pojave ugrušaka u promijenjenim krvnim žilama) moždanih udara. Nakon peroralne primjene, simvastatin, koji je inaktivni lakton (ciklički karboksilni ester), se u jetri hidrolizira u odgovarajući aktivni oblik  $\beta$ -hidroksi kiselinu, koja je potentni inhibitor HMG-CoA reduktaze neophodne za *de novo* sintezu kolesterola u stanicama sisavaca kroz mevalonatni put (Katzung i Trevor 2017). Statini su najkorišteniji lijekovi farmaceutske proizvodnje u zapadnim zemljama (Kaufman i sur. 2002). Zbog nedostatka mehanizama koji osiguravaju potpuno

uklanjanje statina u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda, značajne količine ovih lijekova se ispuštaju u vodene ekosustave i stvaraju prijetnju organizmima koji tamo obitavaju (Fent i sur. 2006).



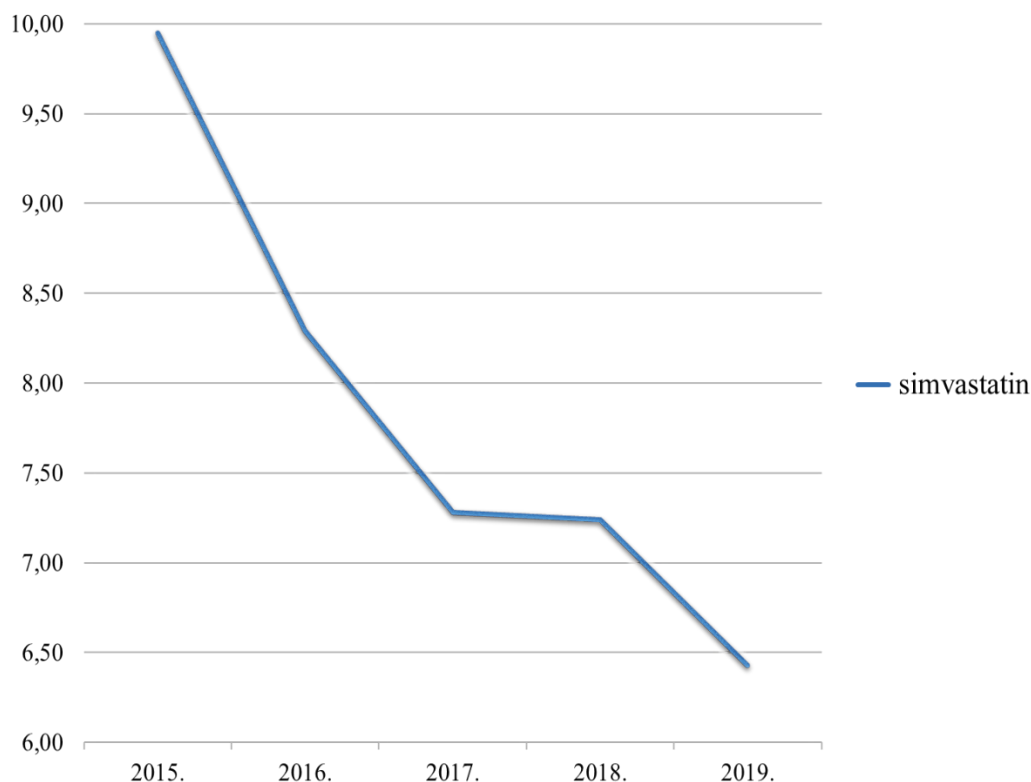
Slika 9. Lijevo - struktura simvastatina, desno - SEM mikrofotografija uzorka simvastatina (Simões i sur. 2013.).

Na embrijima zebrica čiji su roditelji izlagani 90 dana simvastatinu opažena je povećana učestalost abnormalnosti (anomalije repa i očiju, edem žumanjčane vreće te perikardijalni edem). Uvijanje ili skraćivanje repa embrija zabilježeno je kao najčešća anomalija prisutna nakon izlaganja roditeljskih organizama svim pokusnim koncentracijama (8.0, 40.0 i 200.0 ng/L) (Slika 10; Barros i sur. 2018). Simvastatin je značajno smanjio razinu kolesterola i triglicerida u jetri odraslih ženki nakon 90 dana izlaganja (Barros i sur. 2018).



Slika 10. A – normalan rep; B, C – savijanje repa pri konc. 8.0 ng/L i 40.0 ng/L simvastatina (strelice) (Barros i sur. 2018.).

Prateći ukupne količine statina koje su se u periodu od 2015. do 2019. izdale na recept, može se primijetiti kako Republika Hrvatska bilježi konstantni pad potrošnje (Slika 11; URL 8). Iako se nekoliko studija odnosi na učinke simvastatina na vodene životinje, gotovo da nema dostupnih podataka za rane životne faze.



Slika 11. Definirana dnevna doza/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) za simvastatin u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2015. do 2019. godine (Prilagođeno prema URL 8.).

### 3.2.3. Lijekovi za liječenje hipertenzije

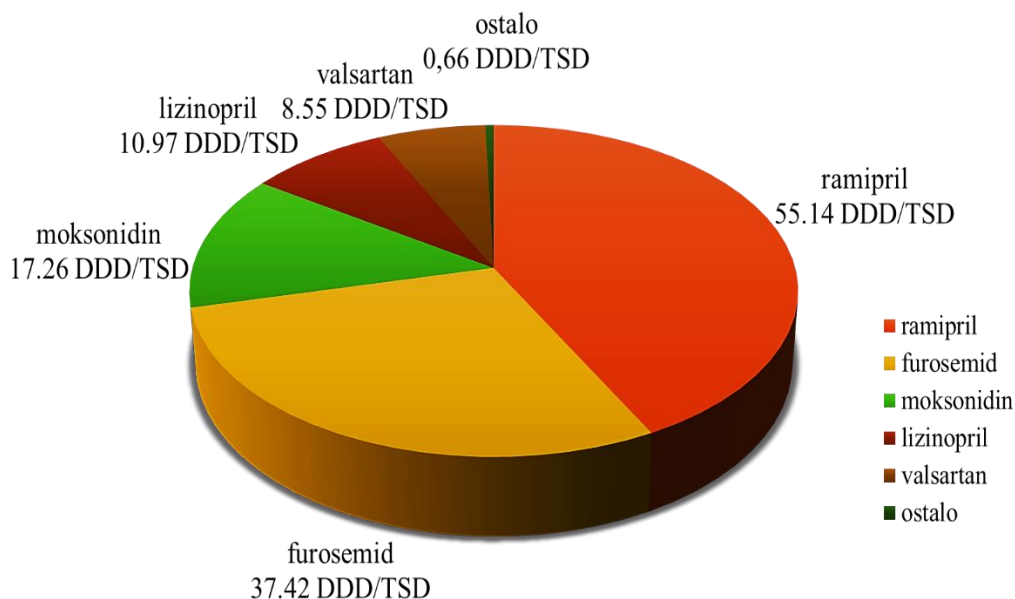
Hipertenzija je najčešća bolest kardiovaskularnog sustava, a definira se kao stanje trajno povišenog sistoličkog i/ili dijastoličkog krvnog tlaka. Aktualne smjernice propisane od Europskog kardiološkog društva i Europskog društva za hipertenziju definiraju tlak veći od 140/90 mmHg kao hipertenziju (August, 2003). U istraživanju provedenom 2000. godine 28% odraslih stanovnika SAD-a bolovalo je od hipertenzije, dok je u Republici Hrvatskoj prema posljednje dostupnim podacima za 2017. godinu umrlo 44% ljudi od komplikacija kardiovaskularnih bolesti čiji se trend i dalje nastavlja. U skladu s time, svaki treći odrasli

stanovnik ima povišene vrijednosti krvnog tlaka koje zahtijevaju poduzimanje terapijskih mjera (Wang i Ramachandran 2005). Kod oko 95% oboljelih ne može se utvrditi uzrok povišenom krvnom tlaku (primarna ili esencijalna hipertenzija), dok je kod samo manjeg broja oboljelih moguće utvrditi uzrok (sekundarna hipertenzija) te se ona najčešće povezuje s bolestima bubrega i nadbubrežne žlijezde, štitnjače, prirođenim malformacijama krvnih žila ili kao nuspojava pojedinih lijekova. Prevalencija ovisi o dobi, rasi, obrazovanju i mnogim drugim čimbenicima (Katzung i Trevor 2017). Dugotrajna arterijska hipertenzija oštećuje krvne žile u bubrezima, srcu i mozgu i povećava incidenciju bubrežnog zatajenja, koronarne bolesti, zatajivanja srca i moždanog udara (Calhoun i sur. 2008). Učinkovito snižavanje krvnog tlaka lijekovima sprječava oštećenje krvnih žila i značajno smanjuje smrtnost (Katzung i Trevor 2017). Posljedično, racionalna primjena tih lijekova, pojedinačno ili u kombinacijama, omogućuje sniženje krvnog tlaka s tek minimalnim rizikom od ozbiljnih neželjenih učinaka. Dijagnoza hipertenzije temelji se na ponovljenim, konzistentnim nalazima povišenog krvnog tlaka (Katzung i Trevor 2017). Ostali poznati rizični čimbenici uključuju pušenje, metabolički sindrom, pretilost, dislipidemiju i dijabetes, no dijagnoza hipertenzije temelji se isključivo na mjerenjima krvnog tlaka, a ne na simptomima koje ima bolesnik (Garg i sur. 2002). Najčešće, hipertenzija je tipično asimptomatska sve do pojave ili neposredno pred pojavu oštećenja ciljnih organa. Najraširenija klasifikacija antihipertenziva temelji se na mehanizmu djelovanja i razlikuje četiri skupine (Katzung i Trevor 2017):

- 1) Diuretici - snižavaju krvni tlak smanjujući razinu natrija i volumen krvi (npr. furosemid, hidroklorotiazid, spironolakton, eplerenon).
- 2) Simpatolitici - snižavaju krvni tlak smanjujući periferni otpor, inhibirajući srčanu akciju i povećavajući volumen kapacitativnih žila (npr. moksonidin, klonidin, metildopa).
- 3) Inhibitori renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava - smanjuju periferni otpor i volumen krvi (npr. ramipril, kaptopril, enalapril, lizinopril, valsartan).
- 4) Izravni vazodilatatori - snižavaju krvni tlak relaksirajući glatke mišiće stijenki krvnih žila tako šireći otporničke krvne žile i u različitom opsegu povećavajući volumen kapacitativnih žila (npr. diltiazem, nifedipin, amlodipin, hidralazin, minoksidil).

Prema zabilježenim statističkim podacima potrošnje antihipertenziva u Republici Hrvatskoj 2019. godine najčešće je korišten lijek po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) ramipril (55.14), zatim furosemid (37.42), moksonidin (17.26),

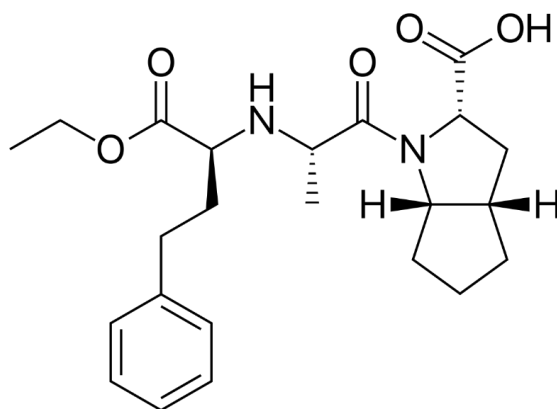
lizinopril (10.97) te valsartan (8.55). Iz priloženoga, najviše dominiraju lijekovi iz skupine inhibitora renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava. (Slika 12; URL 9).



Slika 12. Godišnja potrošnja antihipertenziva 2019. godine u Republici Hrvatskoj po definiranoj dnevnoj dozi/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) (Prilagođeno prema URL 9.).

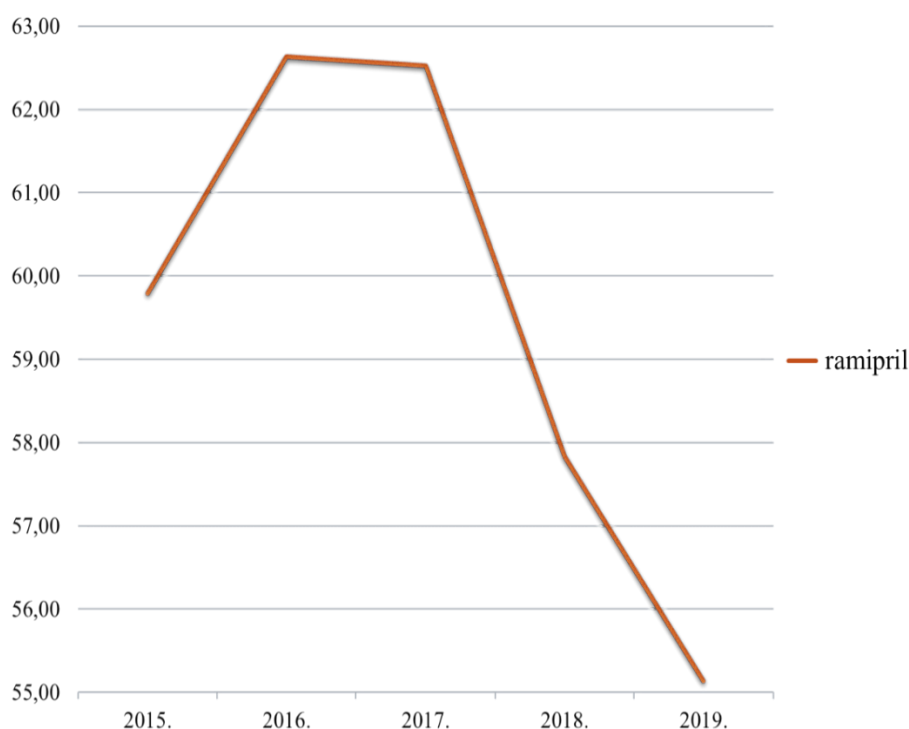
### 3.2.2.1. Ramipril

Ramipril pripada skupini antihipertenziva, tj. inhibitorima renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava, a uvršten je na listu 200 najkorištenijih lijekova u SAD-u (Slika 13; Shi i sur. 2016). Prema HALMED-u, ramipril zauzima 1. mjesto na listi 50 najkorištenijih kardiovaskularnih lijekova u Republici Hrvatskoj 2019. godine (URL 10). Ramiprilat, aktivni metabolit ramiprila, inhibira enzim dipeptidil karboksipeptidazu I, također poznat kao angiotenzin konvertirajući enzim ili kininaza II (Katzung i Trevor 2017). Ovaj enzim u plazmi i tkivima katalizira konverziju angiotenzina I u vazokonstriktornu tvar angiotenzin II te razgradnju vazodilatatora bradikininina. Smanjeno stvaranje angiotenzina II i inhibicija razgradnje bradikininina rezultiraju vazodilatacijom (Heran i sur. 2008). S obzirom na to da angiotenzin II stimulira oslobađanje aldosterona, ramiprilat također indirektno uzrokuje smanjenje izlučivanja aldosterona (Verdecchia i sur. 2005). Pored uobičajenog liječenja diureticima i mogućnosti liječenja srčanim glikozidima, ramipril ima dokazani učinak u bolesnika sa zatajenjem srca (Katzung i Trevor 2017). Djelatna tvar ima pozitivni učinak na hemodinamiku srca (smanjenje tlaka punjenja lijevog i desnog ventrikula, smanjenje ukupnog otpora perifernih žila, povećanje istisnog minutnog volumena srca i poboljšanje srčanog indeksa). Ramipril također smanjuje neuroendokrinološku aktivaciju (Katzung i Trevor 2017).



Slika 13. Struktura ramiprila (Shi i sur. 2016.).

Prema provedenim istraživanjima utjecaja ramiprila na ličinke ribe zebrice *D. rerio* (72 hpf), utvrđena je efektivna koncentracija od 0.3 nM pri kojoj je uočen vazodilacijski učinak, (promjer žile značajno se povećao zajedno s promjenom parametara protoka krvi) pogodan za život svih tretiranih ličinki (Vishnolia i sur. 2020). Što se tiče izdavanja recepata za ramipril u razdoblju od 2015. do 2019. Republika Hrvatska bilježi nagli skok 2016. godine s tendencijom pada u posljednjih nekoliko godina (Slika 14; URL 10). Samo nekoliko studija odnosi se na učinke ramiprila na vodene životinje, gotovo da nema podataka dostupno za rane životne faze te su potrebna daljnja istraživanja.



Slika 14. Definirana dnevna doza/1000 stanovnika/dan (DDD/TSD) za ramipril u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2015. do 2019. godine (Prilagođeno prema URL 10.).



### 3.3. Zebrica kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima

#### 3.3.1. Filogenija vrste

Znanstvena klasifikacija:

Carstvo: Animalia

Koljeno: Chordata

Potkoljeno: Vertebrata

Razred: Actinopterygii

Red: Cypriniformes

Porodica: Cyprinidae

Rod: *Danio*

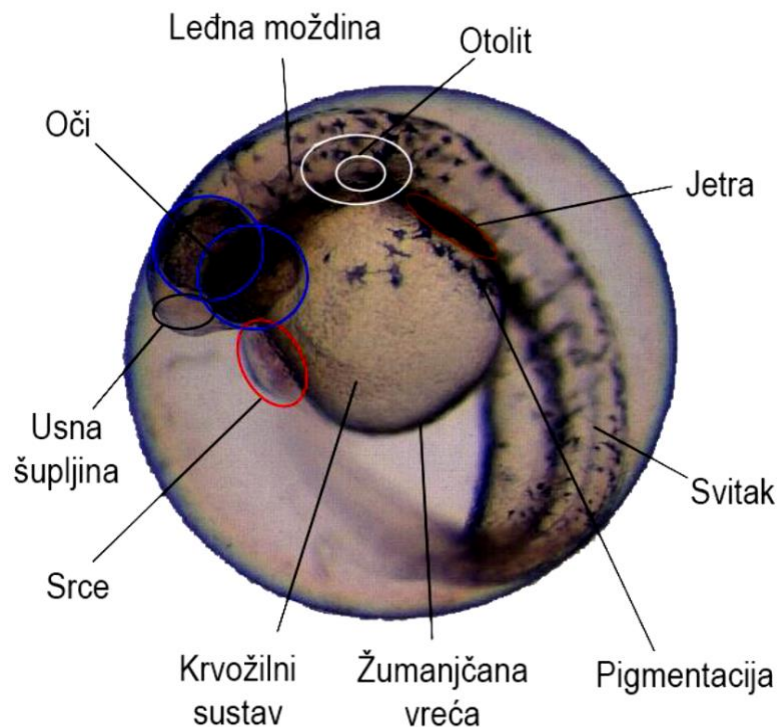
Vrsta: *Danio rerio*



Slika 15. *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (URL 11.)

#### 3.3.2. Biologija vrste i upotreba u znanstvenim istraživanjima

Riba zebrica *Danio rerio* (Hamilton, 1822) je slatkovodna, bentopelagička tropska riba iz porodice šaranki (Slika 15; URL 11). Budući da ju se često može vidjeti uz rubove rižinih polja Indije, ime je dobila po indijskoj riječi *dhani* (u prijevodu „od rižinih polja“). Osim u Indiji, rasprostranjena je još u području Himalaje i porječju Gangesa te Šri Lanci i slivu Arapskog mora (Mayden i sur. 2007). Paul Matte, njemački tropski ihtiolog, unosi zebricu u Europu 1905. godine kao akvarijsku ribu (Creaser, 1934). Specifična obilježja ove vrste su nepotpuna bočna pruga koja seže do baze trbušne peraje, dva para mirisnih vrećica te svijetlo sivo obojenje tijela prosječne dužine 5 cm s četiri horizontalne tamne pruge koje se protežu od repa pa sve do škržnih poklopaca (Kinth i sur. 2013). Tijekom odrasle faze spolni dimorfizam se odlikuje kroz različitu veličinu i oblik tijela te pigmentaciju. Mužjaci su često manji od ženki te imaju izduženije i žućkasto tijelo, dok se ženke odlikuju većim tijelom sa zaobljenim bjelkastim trbuhom. Prosječni životni vijek zebrice u zatočeništvu je 5 godina, a spolnu zrelost dosežu, ovisno o tipu ishrane, oko petog mjeseca života. Par zebrica može po mrijestu dati između 100 do 200 embrija (Lawrence 2007). Zebrice imaju brzu izmjenu generacija s velikim brojem potomaka i kratkim *ex utero* embrionalnim razvojem od svega 72 sata (Ribas i Piferrer 2014). Tijekom cijelog embrionalnog razvoja tijela su im prozirna, organi su dobro razvijeni i time pogodni za neinvazivno promatranje učinaka različitih spojeva prisutnih u vodi (Slika 16; Lilicrap 2010). Zbog navedenih povoljnih karakteristika, nezahtjevnog uzgoja i hranjenja te relativno jeftinog održavanja, zebrica je ubrzo prepoznata kao iznimno pogodan model u toksikološkim i biomedicinskim istraživanjima (Lawrence, 2007).



Slika 16. Embrij zebrice star 48 h s razvijenim organima i krvožilnim sustavom (Prilagođeno prema Lillicrap, 2010.).

Prvi istraživački rad u kojem su zebrice upotrijebljene kao modelni organizam proveo je 1981. godine George Streisinger na Sveučilištu u Oregonu (Li i sur. 2013). U narednim desetljećima stvorene su baze podataka s detaljno opisanim razvojnim stadijima, nakon čega je uslijedilo sekvenciranje genoma na Institutu Sanger (Kimmel i sur. 1995). Također, razvijeni su brojni mutantni sojevi s već predodređenim poremećajima u svrhu boljeg razumijevanja i liječenja bolesti u ljudi (Kari i sur. 2007). Između zebrica i ostalih kralježnjaka postoji izuzetna sličnost u staničnoj strukturi, signalnim putovima, anatomiji i fiziologiji, posebno tijekom ranog razvoja (Aparicio i sur. 2002). Takva sličnost olakšava razotkrivanje interakcija za koje se smatra da su konzervirane među vrstama. Unatoč 450 milijuna godina filogenetske udaljenosti (kad se dogodila divergencija zajedničkog pretka) sekvenciranjem se utvrdilo da ljudi i zebrice dijele 70% genoma, unutar kojeg je 84% gena povezano s istim genetskim bolestima u čovjeka i zebrica (Ribas i Piferrer 2014). Zbog velike sposobnosti regeneracije tkiva poput srca, bubrega, mozga i leđne moždine, kao i fizioloških sličnosti zebrica i čovjeka, zebrica je postala standardnim modelnim organizmom u mnogim suvremenim biomedicinskim istraživanjima (Haffter i sur. 1996). Najveći dio istraživanja bavi se proučavanjem neuroloških, hematopoetskih, kardiovaskularnih i etoloških poremećaja te karcinogeneze (McGrath, 2012).



### 3.3.3. Test embriotoksičnosti na zebricama

Test embriotoksičnosti (eng. *Zebrafish Embryotoxicity Test*, ZET) proveden je na 4 kardiovaskularna lijeka (amiodaron, verapamil, simvastatin i ramipril) te njihove smjese upotrebom embrija ribe zebrice *D. rerio* u skladu sa standardiziranim OECD protokolom (236, 2013). Premda su ribe važan modelni organizam u biomonitoringu onečišćenja vodenih ekosustava, u zadnjih nekoliko godina žarište znanstvenih istraživanja pomaknulo se s odraslih jedinki na najranije razvojne stadije. Laboratorijskim istraživanjima utvrđena je izvrsna korelacija akutnog izlaganja embrija s kroničnim izlaganjem odraslih jedinki, što je, uzevši u obzir i prethodno navedene povoljne karakteristike zebrice, rezultiralo standardizacijom testa embriotoksičnosti na zebricama (McKim 1997). ZET je trenutno jedan od najkorištenijih testova u toksikološkim istraživanjima, kako pojedinačnih kemijskih spojeva, tako i okolišnih uzoraka. Princip ZET-a je praćenje letalnih i subletalnih učinaka testiranog spoja u najranijim razvojnim stadijima do 96 sati nakon oplodnje (eng. *Hours Post Fertilization*, hpf). Letalnim učinkom smatra se prestanak rada srca, odsustvo formiranja somita, koagulacija embrija i neodvajanje repa od žumanjčane vreće, dok se subletalni učinci mogu manifestirati kroz niz promjena poput skolioze, nastanka perikardijalnog edema ili edema u području žumanjčane vrećice, usporenost razvoja, nedostatka otolita i dr. Uz to, moguće je pratiti i fiziološke promjene (stopu izvaljivanja), kardiotoksičnost (brzina otkucaja srca) i neurotoksičnost (promjena ponašanja), što u konačnici može imati utjecaj na preživljavanje u vodenim ekosustavima zbog povećanog rizika od predacije (Zhu i sur. 2018). Unatoč mnogim prednostima, ZET ima nekoliko ograničenja (Braunbeck i sur. 2014):

- 1) Spojevi s vrlo velikom molekulskom masom (većom od 3 kDa), poput polimera, ne mogu proći korion, zbog čega je prethodno izlaganju potrebno mehanički ukloniti korion.
- 2) Dokazano je da su određene neurotoksične tvari manje toksične za zebrice tijekom njihovog embrionalnog razvoja, nego adultnog stadija.
- 3) Postoje ograničenja kada je u pitanju sposobnost biotransformacije spojeva u ranim embrionalnim fazama.

Usprkos tome, ZET se do sada pokazao kao izvrstan i pouzdan alat za određivanje toksičnosti, kako novosintetiziranih farmaceutskih spojeva tako i okolišnih uzoraka, što u konačnici može pridonijeti smanjenju korištenja životinja u toksikološkim i biomedicinskim istraživanjima (Braunbeck i sur. 2014).

### 3.3.4. Zakonodavni okviri i načela 3R-a

Ribe su korištene kao modelni organizmi u biomonitoringu otpadnih voda u svrhu poboljšavanja procjene kvalitete Europskih voda unutar programa Okvirna direktiva o vodama [eng. *Water Framework Directive*, WFD (Directive 2000/60/EC)]. Navedenom Direktivom Europska unija nastoji zaštititi površinske, podzemne, kopnene i prijelazne vode, obnoviti ekosustave te smanjiti onečišćenje od otpadnih voda iz kućanstava i industrijskih postrojenja koje se ispuštaju u vodeni okoliš te tako spriječiti daljnju degradaciju vodenih tijela (Braunbeck, 2014). Europska unija nastavila je pojačano implementirati direktive poput *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*, REACH (Regulation 1907/2006) i Europske direktive za kozmetiku (Regulation 1223/2009) kako bi potaknula razvoj alternativnih metoda u istraživanjima koje su bazirane na 3R principu: *Replacement* (zamjena životinja), *Reduction* (smanjenje broja jedinki) i *Refinement* (poboljšanje metoda u svrhu dobrobiti životinja) (Russell i Burch 1959).

Embriji zebrica u potpunosti zadovoljavaju 3R načela, gdje se stavlja naglasak na etičke principe pri testiranju životinja. Tako se provodi racionalizacija i smanjenje broja korištenih jedinki, što dovodi do smanjenog korištenja odraslih sisavaca kao modelnih organizama. Prema Direktivi o zaštiti životinja koje se koriste u laboratorijske svrhe (Directive, 2010/63/EU) zebrice do 120 hpf ne podliježu zakonskoj regulativi. Time se smanjuje patnja velikog broja sisavaca. Nadalje, s obzirom na transparentnost embrija tijekom cijelog embrionalnog razvoja, na gotovo neinvazivan način omogućena je primjena sličnih procedura kao na sisavcima. ZET test je osmišljen kao alternativa akutnom testu toksičnosti na ribama jer omogućava konkretniju primjenu 3R načela. Iz navedenih razloga, ZET je postao jednim od najčešće korištenih testova u (eko)toksikološkim istraživanjima, dok je zebrica postala drugim najčešće korištenim modelnim organizmom u znanstvenim istraživanjima (Lawrence, 2007).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Kemikalije i instrumenti

Popis korištenih kemikalija s navedenim kemijskim formulama, proizvođačem i CAS registarskim brojem te popis instrumenata za vrijeme izvođenja pokusa navedeni su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija.

| NAZIV SPOJA                                  | KEMIJSKA FORMULA                       | PROIZVOĐAČ  |
|--|--|---|
| Magnezijev sulfat heptahidrat                | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$                   | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No.10034-99-8)  |
| Natrijev hidrogenkarbonat                    | $NaHCO_3$                              | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 144-55-8)   |
| Kalcijev klorid dihidrat                     | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$                   | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 10035-04-8) |
| Kalijev klorid                               | $KCl$                                  | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 7447-40-7)  |
| Amiodaron                                    | $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$        | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 19774-82-4) |
| Verapamil                                    | $C_{27}H_{38}N_2O_4HCl$                | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 152-11-4)   |
| Simvastatin                                  | $C_{25}H_{38}O_5$                      | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 79902-63-9) |
| Ramipril                                     | $C_{23}H_{39}N_2O_3$                   | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 87333-19-5) |
| Dimetilsulfoksid (DMSO)                      | $C_2H_6OS$                             | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 67-68-5)    |
| Diklorodihidrofluorescein diacetat (DCF)     | $C_{24}H_{16}Cl_2O_7$                  | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 4091-99-0)  |
| Etil 3-aminobenzoat metansulfonat (MS - 222) | $H_2NC_6H_4CO_2C_2H_5 \cdot CH_3SO_3H$ | Sigma Aldrich, Deisenhofen, Njemačka (CAS No. 886-86-2)   |

Tablica 3. Popis korištenih instrumenata.

| NAZIV INSTRUMENTA  | NAMJENA UREĐAJA   | PROIZVOĐAČ                 |
|--|---|----------------------------|
| Invertni mikroskop EC3 s pripadajućom kamerom i LAS EZ 3.2.0. softverom za analizu slike | Daje uvećane slike bliskih predmeta s objektivima od 4, 10, 20, 40 i 100 x.                 | Leica, Njemačka            |
| Inkubator Haerus BK 160  | Očuvanje uzoraka na stalnoj temperaturi.  | Kendro Lab. Products, SAD  |
| Analitička vaga ABS-N/ABJ-NM   | Precizno vaganje.   | Kern, Njemačka             |
| Spektrofotofluorimetar Infinite 200 PRO  | Čitač mikrotitar ploča s mogućnošću mjerenja apsorbancije, fluorescencije i luminiscencije. | Tecan, Austrija            |
| Stereomikroskop S6E  | Povećanje slike predmeta 6.3 - 40 puta, radne udaljenosti minimalno 110 mm.                 | Leica, Njemačka            |
| Ultrazvučna kupelj   | Tretiranje uzoraka ultrazvukom, što neposredno omogućuje otapanje i raspršivanje uzorka.    | Sonorex Super, Njemačka    |
| Autoklav AL02-06   | Uređaj za sterilizaciju laboratorijskog pribora.  | Adventage Lab, Njemačka    |
| ZebTEC samoregulirajući sustav s Active Blue tehnologijom                                | Uređaj za održavanje riba, sustav akvarija.   | Tecniplast S.p.A., Italija |
| Mrijestilica iSpawn-S Benchtop Size Breeding System                                      | Jedinica za mrijest riba.   | Tecniplast S.p.A., Italija |

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Uzgoj zebrica i mrijest

Uzgoj, održavanje i mrijest riba zebrica *D. rerio* odvijao se unutar akvarijskog prostora odobrenog od strane Ministarstva Poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-023), sukladno Direktivi 2010/63/EU. Adulti zebriće (divlji WIK tip nabavljen je iz European Zebrafish Resource Center u Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Njemačka) uzgajani su i održavani unutar ZebTEC samostojećeg samoregulirajućeg sustava s Active Blue tehnologijom (Slika 17.), u kontroliranim uvjetima svjetla i tame (14:10 h), temperature ( $27.00 \pm 0.09^\circ\text{C}$ ), konduktiviteta ( $494.80 \pm 2.61 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), pH ( $7.60 \pm 0.08$ ), zasićenosti vode kisikom ( $\geq 95\%$ ). Adulti su hranjeni tri puta dnevno smrznutom *Athemia* sp. (PETRA-AQUA veleprodaja tropskih riba, Republika Češka).

Dan prije mrijesta mužjaci (N=10) i ženke (N=8) prebačeni su u iSpawn-S mrijestilicu (Slika 17.) te su odvojeni separatorom. Sljedeći dan ujutro, unutar 15 min od paljenja svjetla unutar akvarijske jedinice, separator je uklonjen te je platforma podignuta kako bi imitirala prirodne uvjete u okolišu i time omogućila optimalne uvjete prilikom mrijesta. Na dnu platforme nalazi se mrežica koja je omogućila padanje oplođenih jajašaca odnosno embrija na dno posude tijekom mrijesta i time spriječila konzumaciju embrija od strane roditeljskih zebrića.

Embriji su u periodu 30 minuta od mrijesta prikupljeni sitom (promjer oka  $800 \mu\text{m}$ ) te isprani umjetnom vodom kako bi se odstranile nečistoće. Umjetna voda je pripravljena otapanjem  $294.0 \text{ mg/L CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $123.3 \text{ mg/L MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $63.0 \text{ mg/L NaHCO}_3$  i  $5.5 \text{ mg/L KCl}$  u deioniziranoj vodi (OECD 236, 2013).



Slika 17. Lijevo - ZebTEC samoregulirajući sustav (Tecniplast S.p.A.),  
desno - mrijestilica iSpawn-S (Tecniplast S.p.A.).

#### 4.2.2. Test embriotoksičnosti na zebricama

Svi eksperimenti navedeni u ovom istraživanju provedeni su na nezaštićenom embrionalnom stadiju zebriće (do 96 hpf), koji ne podliježe okvirima zakonske regulative (Directive, 2010/63/EU; Lammer i sur. 2009).

Kako bi se utvrdio konkretan utjecaj pojedinih kardiovaskularnih lijekova na organizme vodenih ekosustava, embriji ribe zebriće *Danio rerio* su bili izloženi seriji decimalnih razrjeđenja (0.1, 1.0 i 10.0 µg/L) amiodarona, verapamila, simvastatina, ramiprila i njihove smjese (0.4, 4.0 i 40.0 µg/L). Primarna otopina standarda (0.1 mg/mL) pripravljena je otapanjem amiodarona, verapamila i ramiprila u destiliranoj vodi, dok je kao otapalo za simvastatin korišten DMSO (p.a.). Nadalje, koncentracije od interesa (0.1, 1.0 i 10.0 µg/L) pripravljene su razrjeđivanjem s umjetnom vodom (OECD 236, 2013), pritom pazeći da u slučaju simvastatina koncentracija DMSO-a ne prelazi 1%.

Izlaganje embrija je provedeno prema standardiziranom testu embriotoksičnosti na zebricama (OECD 236, 2013). Oplođena jajašca zebriće (4 - 64 blastomere) odvojeni su od neoplođenih i/ili oštećenih jajašaca koristeći stereomikroskop (Leica). S ciljem što ranijeg izlaganja embrija testiranim uzorcima, ali i smanjivanja mogućnosti razrjeđivanja uzorka, embriji su prebačeni u plastične Petrijeve zdjelice s prethodno pripremljenim razrjeđenjima kardiovaskularnih farmaceutika. Nakon toga, embriji su raspoređeni u prozirne polietilenske pločice s 24 jažice (NEST Scientific, SAD). Svaka jažica sadržavala je po 2 embrija u 2 mL uzorka. Prethodno izlaganju embrija, uzorci su aerirani i temperirani na  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (OECD 236, 2013). Unutar eksperimenta upotrijebljeno je 10 embrija u 4 replike, što iznosi 40 embrija po testnom uzorku i kontrolama. Umjetna voda korištena je kao negativna kontrola, dok je 1% DMSO korišten kao kontrola otapala. Pločice su prekrivene parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje te inkubirane na  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (Kendro Lab. Products) s reguliranim fotoperiodom svijetlo/tama: 14/10 h u periodu od 96 h (Slika 18). Svakog dana tijekom trajanja pokusa u svakoj jažici 50% volumena zamijenjeno je s iznova pripremljenim, aeriranim i temperiranim uzorkom.



Slika 18. Inkubirani uzorci.

Letalni (koagulacija embrija/ličinaka, neodvajanje repa od žumanjčane vreće, ne-formacija somita, odsustvo otkucaja srca) i subletalni učinci (perikardijalni edem, edem u području žumanjčane vreće, skolioza, akumulacija krvi, itd.) promatrani su nakon 24, 48, 72 i 96 h od izlaganja koristeći Leica DMIL LED invertni mikroskop. Test se smatrao valjanim ukoliko mortalitet unutar kontrolnih grupa nije prelazio 10%. Uzorci koji su pokazali mortalitet veći od 10% su smatrani embriotoksičnima (ISO, 2007). Uz stopu mortaliteta i razvojne abnormalnosti praćeni su i subletalni krajnji učinci detaljno opisani u nastavku teksta.

#### **4.2.3. Praćenje uspješnosti izvaljivanja ličinki**

Promatrana fiziološka karakteristika uključivala je praćenje izvaljivanja ličinki ribe zebrice *Danio rerio* u periodu od 48 do 96 h nakon oplodnje. Stopa izvaljivanja zabilježena je na svim promatranim uzorcima upotrebom Olympus® BX51 svjetlosnog mikroskopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

#### **4.2.4. Praćenje stope otkucaja srca**

Uz morfološke i fiziološke promjene, praćeni su i kardiotoksični učinci testiranih uzoraka na embrije ribe zebrice. U periodu od 48 do 96 h nakon oplodnje kod 20 nasumično odabranih jedinki pratila se broj otkucaja srca unutar 15 sekundi. Jedinke s razvojnim abnormalnostima bile su izuzete od prebrojavanja. Rezultati su izraženi kao broj zabilježenih otkucaja unutar 15 sekundi.

#### **4.2.5. Praćenje pokreta prsnih peraja**

S ciljem određivanja neurotoksičnog učinka kardiovaskularnih lijekova na ribe zebrice nakon 96 hpf nasumično je odabrano 20 jedinki, kojima je unutar 20 sekundi izbrojan broj pokreta prsnim perajama. Jedinke s razvojnim abnormalnostima bile su izuzete od prebrojavanja. Rezultati su izraženi kao broj zabilježenih pokreta prsnom perajom unutar 20 sekundi.

#### **4.2.6. Mjerenje dužine ličinki**

Promatrana morfološka karakteristika uključivala je mjerenje dužine ličinki ribe zebrice nakon 96 h izlaganja ispitivanim spojevima upotrebom Olympus® BX51 svjetlosnog mikroskopa opremljenog Olympus DP70 kamerom. 20 ličinki po koncentraciji anestetizirano je upotrebom 0.015% MS-222. Ličinke su pojedinačno slikane te im je izmjerena dužina koristeći Microsoft® AnalySIS Soft Imaging System program za analizu slika. Rezultati su prikazani u jedinici dužine ( $\mu\text{m}$ ).

#### **4.2.7. Određivanje razine oksidativnog stresa**

U svrhu određivanja razine oksidativnog stresa uslijed povećane proizvodnje ROS-ova, na kraju eksperimenta (96 hpf) 20 nasumično izabranih jedinki izloženo je 10.0  $\mu\text{M}$  koncentraciji fluorescentne boje DCF. Nakon 1h inkubacije u mraku, ličinke su 3 puta isprane umjetnom vodom s ciljem uklanjanja fluorescentne boje s površine tijela jedinki, nakon čega su anestetizirane s 0.03% MS-222 i pojedinačno raspoređene u crne mikroploče (NUN95fb\_LumiNunc FluoroNunc - Nunclon96FlatBlack) s 96 jažica. Razina oksidativnog stresa određena je mjerenjem razine fluorescencije koristeći Infinite M200 spektrofotofluorimetar pri sljedećim uvjetima: ekscitacija 498 nm, emisija 522 nm, *multiple reads per well - circle filled*, 4x4, border 750 nm, gain - 101 (*optimal*). Rezultati su izraženi na način da su fluorescentne jedinice dobivene mjerenjem tretiranih jedinki normirane na kontrolnu vrijednost od 100%.

#### **4.2.8. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada i grafički prikaz dobivenih rezultata napravljen je korištenjem statističkog programa GraphPad Prism 6.01. Rezultati su izraženi u obliku srednje vrijednosti svih testnih replika uz pridruženu vrijednost standardne devijacije  $\pm$  SD, a p-vrijednost manja ili jednaka od 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) korištena je kao granična vrijednost statističke značajnosti. Razlike između eksperimentalnih grupa i kontrolne skupine testirane su jednosmjernom analizom varijance *one way ANOVA* i *post hoc* testom višestrukih usporedbi (Dunnett test ili



Tukey test). Normalnost raspodjele podataka provjerena je D'Agostino-Pearson testom normalnosti. Ukoliko je raspodjela podataka odstupala od normalne (neparametrijske metode), za usporedbu više skupina korišten je Kruskal-Wallis test (uz Dunn's *post hoc* test). Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) te  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Mortalitet, stopa abnormalnosti i izvaljivanja

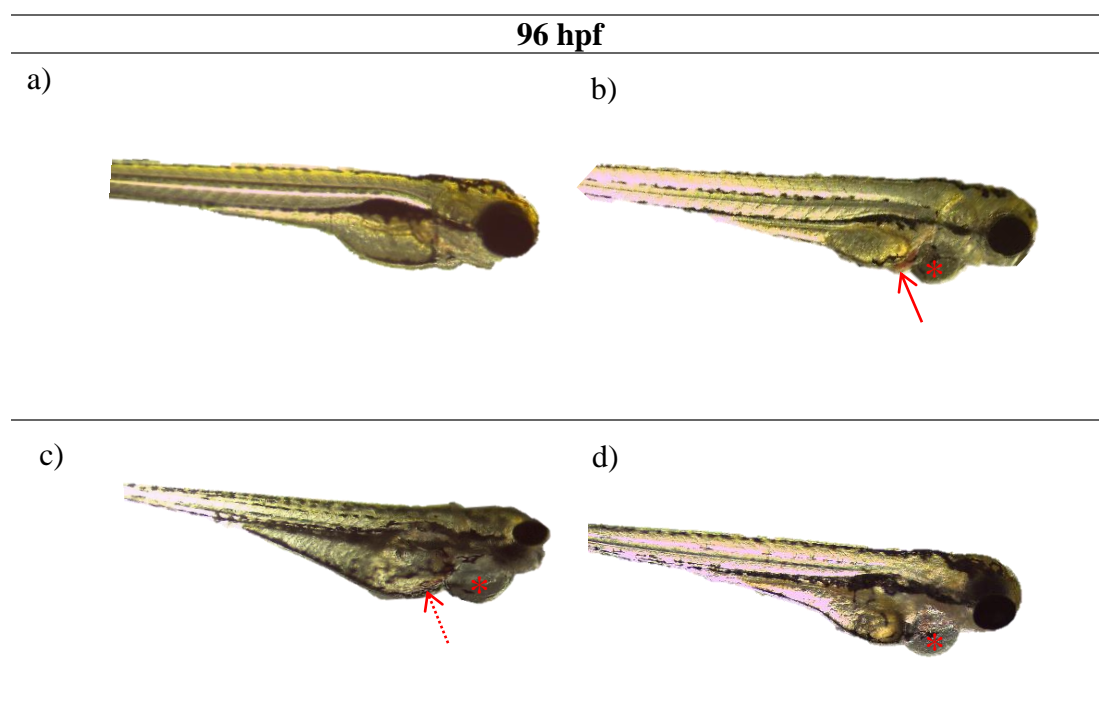
Nakon 96 h izlaganja embrija zebrice *Danio rerio* okolišno relevantnim koncentracijama kardiovaskularnih lijekova: amiodaronu, ramiprilu i verapamilu nisu zamijećene statistički značajne razlike u mortalitetu u odnosu na kontrolnu skupinu i korišteno otapalo (Tablica 4). Suprotno tome, tijekom izlaganja simvastatinu pri koncentraciji od 1.0 µg/L zabilježen je 80%-tni mortalitet, dok niti jedna jedinka nije preživjela izlaganje koncentraciji od 10.0 µg/L. Sličan trend zabilježen je prilikom izlaganja smjesi sva četiri kardiovaskularna farmaceutika gdje je, pri koncentracijama od 4.0 i 40.0 µg/L zabilježena smrtnost od 100%. Pri izlaganju simvastatinu i smjesi navedenih kardiovaskularnih lijekova najučestaliji razlozi smrtnosti bili su koagulacija embrija i neodvajanje repa od žumanjčane vreće. Smrtnost jedinki u negativnoj kontrolnoj skupini nije zabilježena.

Tablica 4. Mortalitet, stopa abnormalnosti i izvaljivanja (%) zebrice *D. rerio* nakon 96 h izlaganja kardiovaskularnim farmaceuticima i njihovoj smjesi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu označena je zvjezdicom (\*p < 0.05) i dodatno naglašena sivom bojom.

| Tretman                               | µg/mL | 96 hpf         |                         |                        |
|---------------------------------------|-------|----------------|-------------------------|------------------------|
|                                       |       | Mortalitet (%) | Stopa abnormalnosti (%) | Stopa izvaljivanja (%) |
| Umjetna voda                          | 0.0   | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
| DMSO                                  | 0.0   | 0.00±0.00      | 2.50±5.00               | 100.00±0.00            |
|                                       | 0.1   | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
| Amiodaron                             | 1.0   | 0.00±0.00      | 2.50±5.00               | 100.00±0.00            |
|                                       | 10.0  | 2.50±5.00      | 5.00±10.00              | 100.00±0.00            |
|                                       | 0.1   | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
| Ramipril                              | 1.0   | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
|                                       | 10.0  | 2.50±5.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
|                                       | 0.1   | 0.00±0.00      | 10.00±0.00              | 100.00±0.00            |
| Simvastatin                           | 1.0   | 80.00±8.16*    | 100.00±0.00*            | 100.00±0.00            |
|                                       | 10.0  | 100.00±0.00*   | n.o.                    | n.o.                   |
|                                       | 0.1   | 0.00±0.00      | 2.50±5.00               | 95.00±5.77             |
| Verapamil                             | 1.0   | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
|                                       | 10.0  | 0.00±0.00      | 0.00±0.00               | 100.00±0.00            |
| Smjesa spojeva (AMID, RAMI, SIM, VER) | 0.4   | 2.50±5.00      | 5.00±5.77               | 97.50±5.00             |
|                                       | 4.0   | 100.00±0.00*   | n.o.                    | n.o.                   |
|                                       | 40.0  | 100.00±0.00*   | n.o.                    | n.o.                   |

n.o. = nije određeno

Izlaganje embrija zebrice uzorcima amiodarona, verapamila i smjesi testiranih spojeva nije rezultiralo statistički značajnim porastom stope razvojnih abnormalnosti iako je zabilježeno manje povećanje ( $p=0.5$ ) prilikom izlaganja najvišoj koncentraciji amiodarona (Tablica 4). 100%-tna stopa abnormalnosti zabilježena je prilikom izlaganja zebrica simvastatinu koncentraciji od  $1.0 \mu\text{g/L}$ , dok je u 10x manjoj koncentraciji ( $0.1 \mu\text{g/L}$ ) zabilježeno i 10x manje abnormalnosti (10%) ( $p=0.1$ ). Također u najnižoj koncentraciji smjese kardiovaskularnih spojeva ( $0.4 \mu\text{g/L}$ ) primijećena je povećana incidencija abnormalnosti koja nije bila statistički značajna ( $p=0.9$ ). Najčešći subletalni učinci uočeni u embrijima zebrica zabilježeni nakon 96 h izlaganja simvastatinu bili su perikardijalni edem i nakupljanje krvi u području žumanjčane vreće (Slika 19, c). Izlaganje smjesi kardiovaskularnih farmaceutika rezultiralo je pojavom perikardijalnog edema (Slika 19, d). Učestalost razvojnih abnormalnosti kod zebrica izloženih kontrolnoj grupi iznosila je manje od 3%.

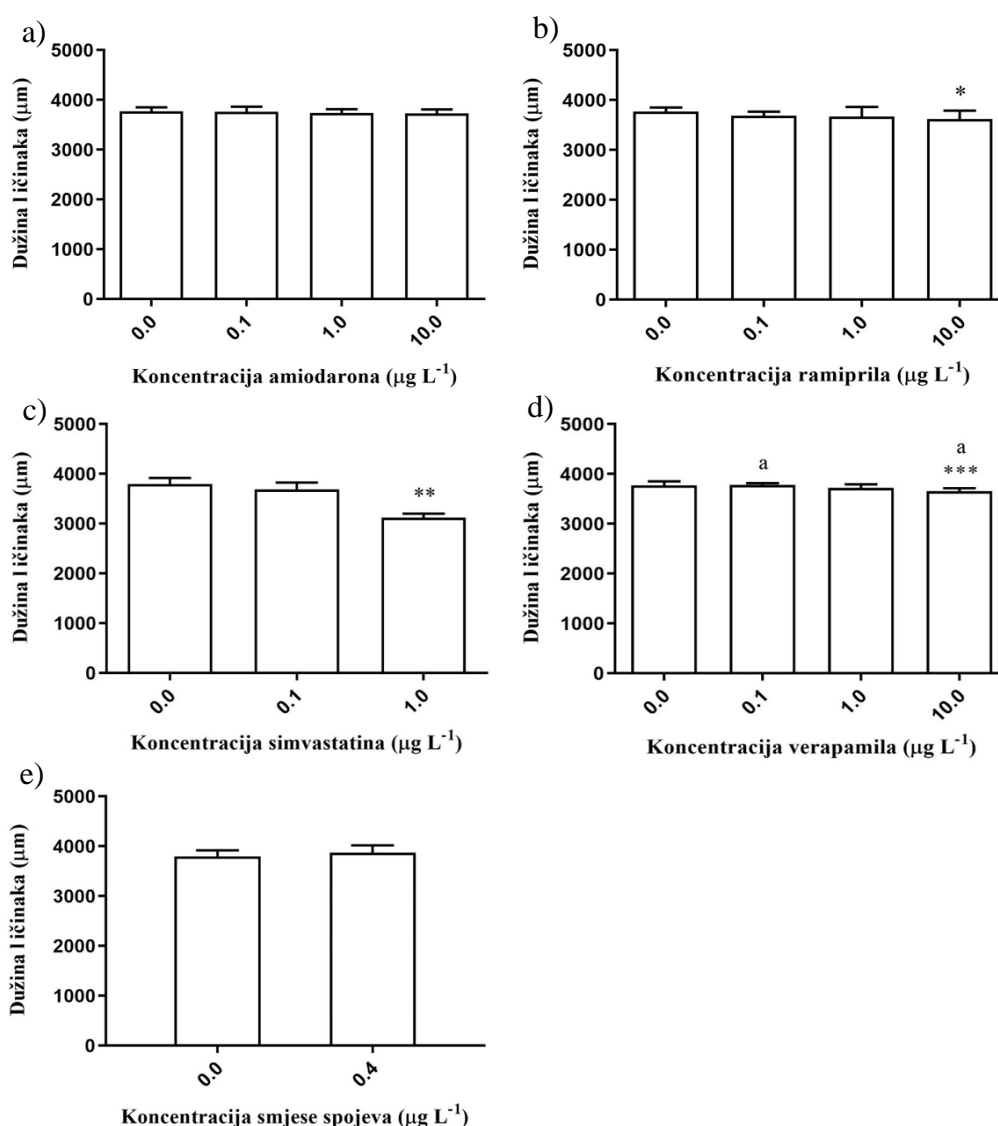


Slika 19. Prikaz razvojnih abnormalnosti zebrice *D. rerio* 96 h izlaganja SIM-u i smjesi kardiovaskularnih farmaceutika: a) normalno razvijena ličinka u kontrolnoj skupini, b) perikardijalni edem (zvjezdica) i krvarenje u području srca (strelica) tijekom izlaganja  $0.1 \mu\text{g/L}$  SIM-a, c) perikardijalni edem (zvjezdica) i krvarenje u području žumanjčane vreće (točkasta strelica) pri  $1.0 \mu\text{g/L}$  SIM-a, d) perikardijalni edem (zvjezdica) tijekom izlaganja smjesi spojeva u koncentraciji  $4.0 \mu\text{g/L}$ .

Izvaljivanje ličinaka (napuštanje koriona) praćeno je 96 h nakon oplodnje. Nisu zabilježene razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4). Nadalje, tijekom izlaganja testiranim uzrocima nije primijećena odgoda/inhibicija stvaranja pigmentacije (podaci nisu prikazani).

## 5.2. Dužina ličinki *D. rerio*

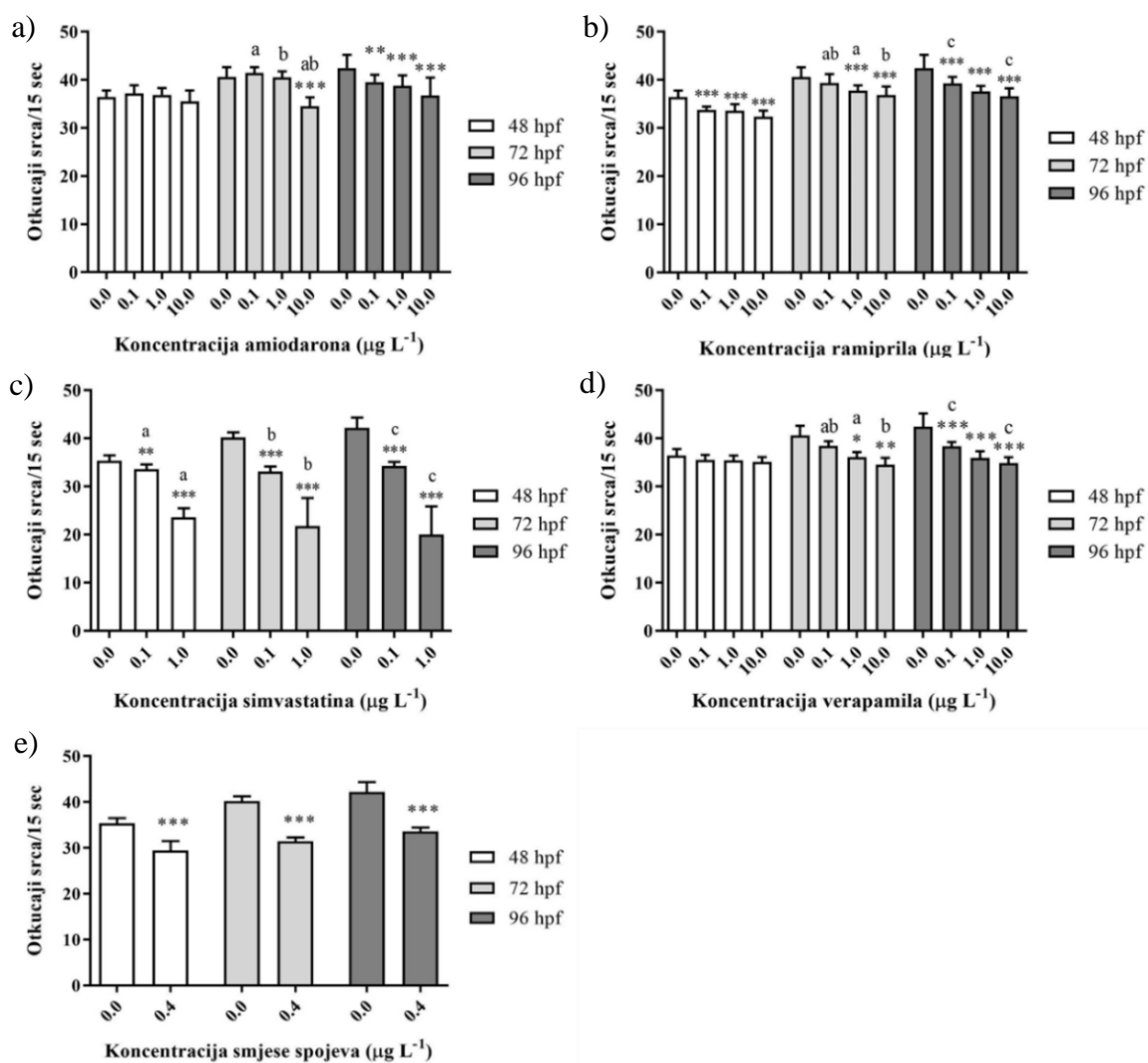
Dužine ličinki *D. rerio* izmjerene su nakon 96 h izlaganja navedenim kardiovaskularnim lijekovima te njihovoj smjesi (Slika 20). Statistički značajno smanjenje dužine ličinaka uočeno je nakon 96 h izlaganja 10.0  $\mu\text{g/L}$  RAMI-u ( $p < 0.05$ ), 1.0  $\mu\text{g/L}$  SIM-u ( $p < 0.01$ ) i 10.0  $\mu\text{g/L}$  VER-u ( $p < 0.001$ ). Najveće smanjenje dužine tijela uočeno je tijekom izlaganja 1.0  $\mu\text{g/L}$  SIM-u (3118.21  $\mu\text{m}$ ) u odnosu na dužinu tijela kontrolne skupine (3792.69  $\mu\text{m}$ ). Također, statistički značajno smanjenje dužine tijela uočeno je u ličinkama izloženim 10.0  $\mu\text{g/L}$  u odnosu na 0.1  $\mu\text{g/L}$  kod VER-a ( $p < 0.001$ ).



Slika 20. Prikaz dužine ličinaka zeblice *D. rerio* 96 hpf u ovisnosti o promatranim farmaceuticima: a) AMID, b) RAMI, c) SIM, d) VER, e) smjesa spojeva (AMID, RAMI, SIM, VER). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu označena je zvjezdicom (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Stupići koji dijele ista slova su statistički značajno različiti.

### 5.3. Utvrđivanje kardiotsičnosti upotrebom embrija *D. rerio*

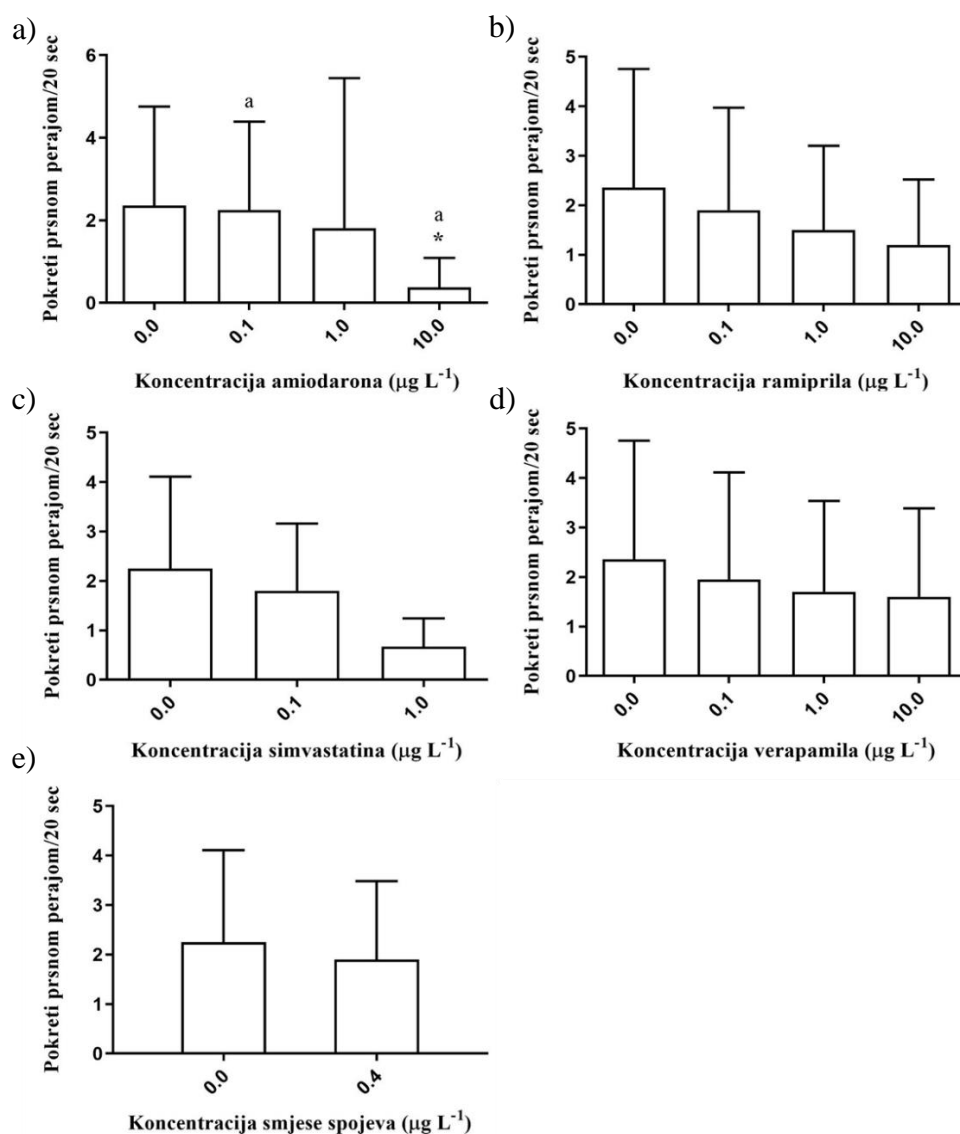
U periodu od 48 do 96 hpf kod 20 nasumično odabranih ličnaka zebriće pratila se brzina otkucaja srca unutar 15 sekundi. Povećanjem koncentracije i vremenskog izlaganja zebriće testiranim lijekovima primijećeno je smanjenje brzine otkucaja srca. Statistički značajno smanjenje otkucaja srca uočeno je na svim uzorcima u odnosu na kontrolu s izuzetkom AMID-a i VER-a 48 hpf. Najveće smanjenje brzine otkucaja srca primijećeno je na 48, 72 i 96 h izlaganja *D. rerio* (33.3, 45.8 i 50.9%-tno smanjenje) pri koncentraciji od 1.0 µg/L SIM-u. Uočen je pad brzine otkucaja srca kod zebrića 72 i 96 h izloženih 1.0 µg/L i 10.0 µg/L RAMI-u i VER-u u odnosu na 0.1 µg/L (Slika 21. b, d). Sličan, ali više naglašen trend zabilježen je i prilikom izlaganja SIM-u, kada je 48, 72 i 96 hpf zabilježen pad brzine otkucaja pri 1.0 µg/L u odnosu na 0.1 µg/L (Slika 21. c).



Slika 21. Prikaz otkucaja srca zebriće *D. rerio* nakon 48, 72 i 96 h izlaganja testiranim farmaceuticima: a) AMID, b) RAMI, c) SIM, d) VER, e) smjesa spojeva (AMID, RAMI, SIM, VER).

#### 5.4. Utvrđivanje neurotoksičnosti upotrebom embrija *D. rerio*

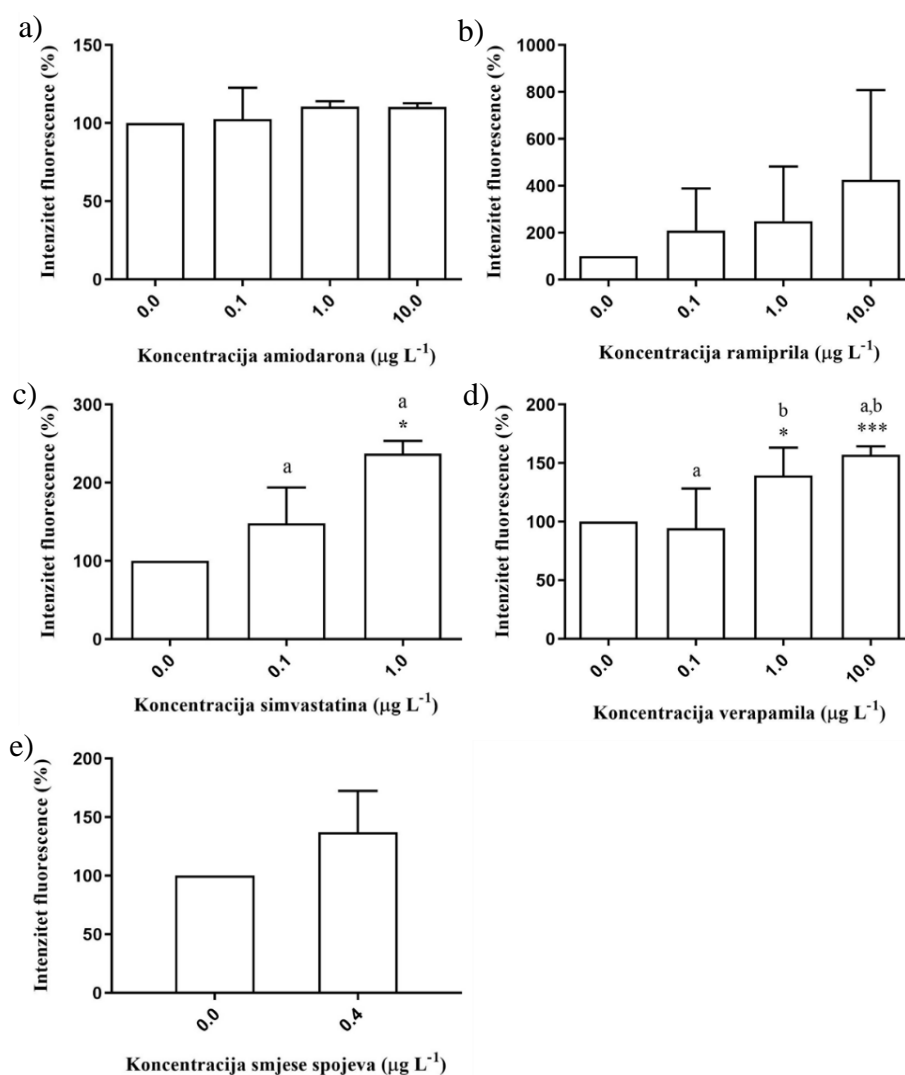
Nakon 96 h izlaganja zebrice *Danio rerio* kardiovaskularnim farmaceuticima, unutar 20 sekundi izbrojan je broj pokreta prsnih peraja na 20 nasumično odabranih jedinki. Povećanjem koncentracije lijekova, primijećeno je smanjenje pokreta prsnih peraja ličinaka. Statistički značajno smanjenje pokreta uočeno je tijekom izlaganja 10.0 µg/L AMID-u (smanjenje od 85.4% u odnosu na kontrolu,  $p < 0.05$ ). Također, statistički značajna razlika uočena je između skupina izloženih 0.1 µg/L i 10.0 µg/L AMID-a ( $p < 0.05$ ). Nadalje, kod svih ostalih farmaceutika primijećeno je smanjenje pokreta u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti (RAMI 10.0 µg/L,  $p=0.1$ ; SIM 1.0 µg/L,  $p=0.2$ ; VER 10.0 µg/L,  $p=0.4$ ; smjesa spojeva 0.4 µg/L,  $p=0.5$ ) (Slika 22).



Slika 22. Prikaz pokreta prsnih peraja zebrice *D. rerio* 96 h nakon izlaganja testiranim farmaceuticima: a) AMID, b) RAMI, c) SIM, d) VER, e) smjesi spojeva (AMID, RAMI, SIM, VER).

## 5.5. Utvrđivanje oksidativnog stresa u ličinkama *D. rerio*

Nakon 96 h izlaganja zebrica kardiovaskularnim farmaceuticima, u DCF obojanim jedinkama (N=20) spektrofotometrijski je izmjerena razina fluorescencije do čijeg porasta dolazi uslijed povećane proizvodnje ROS-ova. Statistički značajan porast oksidativnog stresa unutar organizma ličinke zebrice zabilježen je uslijed izlaganja SIM-u koncentracije 1.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.05$ ) i u uzorku VER-a koncentracije 1.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.05$ ) i 10.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.001$ ). Također, statistički značajna razlika uočena je između 0.1  $\mu\text{g/L}$  i 1.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.01$ ) SIM-a te između 0.1  $\mu\text{g/L}$  i 10.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.001$ ) te 1.0  $\mu\text{g/L}$  i 10.0  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0.001$ ) VER-a. Nadalje, kod svih ostalih farmaceutika primijećeno je povećanje oksidativnog stresa, ali bez statističke značajnosti u usporedbi s kontrolom (AMID 10.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $p=0.3$ ; RAMI 10.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $p=0.1$ ; smjesa spojeva 0.4  $\mu\text{g/L}$ ,  $p=0.07$ ) (Slika 23).



Slika 23. Prikaz razine oksidativnog stresa zebrice *D. rerio* 96 h u ovisnosti o testiranim farmaceuticima: a) AMID, b) RAMI, c) SIM, d) VER, e) smjesa spojeva (AMID, RAMI, SIM, VER).



## 6. RASPRAVA

Pojava lijekova u okolišu prvi je put službeno prijavljena u Kansas Cityju u SAD-u 1976. godine, gdje je klofibrinska kiselina otkrivena u tretiranoj otpadnoj vodi u koncentracijama u rasponu od 0.8 do 2.0 mg/L, što je ujedno bio i okidač za daljnja istraživanja širom svijeta (Fent i sur. 2006). U današnje vrijeme, farmaceutski proizvodi su glavna komponenta zagađenja riječnog sedimenta zbog čega predstavljaju sve veću prijetnju slatkovodnim ekosustavima (Babić i sur. 2018). S obzirom na važnu ulogu porječja rijeke Save u opskrbi pitkom vodom, javlja se nužna potreba za stalnim i temeljitim monitoringom kvalitete vode i riječnog sedimenta koji, zbog izrazite mogućnosti apsorpcije brojnih kemijskih spojeva iz vodenog stupca, može sadržavati široki spektar onečišćavala kao što su pesticidi, industrijski spojevi, spojevi za osobnu higijenu, lijekovi, teški metali i dr. (Källqvist i sur. 2008). Unatoč činjenici da su zabilježene koncentracije većine kemikalija relativno niske, mnoge od njih imaju potencijal da se zadrže u prirodnom okruženju mjesecima pa čak i godinama (Agunbiade i sur. 2014).

Velika potrošnja farmaceutika rezultira relativno visokim koncentracijama lijekova u komunalnim otpadnim i površinskim vodama (Hughes i sur. 2012; Stankiewicz i sur. 2015). Od ukupno 82 promatrana farmaceutika, na razini čitavog SAD-a i Velike Britanije utvrđene su prosječne koncentracije kardiovaskularnih lijekova u rasponu od 0.9 do 1.6 µg/L u ulaznim tokovima te od 0.3 do 0.4 µg/L u izlaznim tokovima postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (Zhang i sur. 2020). Prosječne koncentracije iste količine promatranih farmaceutika u Njemačkoj i Španjolskoj iznosile su 0.8-2.2 µg/L u ulaznim tokovima i 0.4-0.8 µg/L u izlaznim tokovima postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Maksimalne koncentracije kardiovaskularnih lijekova u Njemačkoj dosezale su 2.2 µg/L u ulaznom toku, nakon čega slijedi Austrija s 2.1 µg/L i Saudijska Arabija s 2.0 µg/L (Zhang i sur. 2020). Maksimalne koncentracije kardiovaskularnih lijekova izlaznog toka pronađene su u Saudijskoj Arabiji od 1.3 µg/L, zatim slijede Argentina i Nizozemska s 1.0 µg/L odnosno 0.9 µg/L. Što se tiče površinskih voda, većina studija provedena je u SAD-u gdje je utvrđena srednja koncentracija kardiovaskularnih lijekova od 60.0 ng/L. Zatim slijede Španjolska, Velika Britanija i Kina sa srednjim koncentracijama od 0.3 µg/L, 40.0 ng/L i 20.0 ng/L (Zhang i sur. 2020). U Južnoj Africi rađena je studija na rijeci Umgeni čija je srednja koncentracija kardiovaskularnih farmaceutika iznosila 6.4 µg/L, dok su prosječne koncentracije u Meksiku, Španjolskoj, Indiji i Grčkoj dosezale 0.3, 0.3, 0.2 i 0.2 µg/L (Zhang i sur. 2020). Nadalje, istraživanja pokazuju da se lijekovi koji se konzumiraju u velikim količinama nalaze u sedimentu i kanalizacijskom

mulju, što ovisi o koncentraciji tih spojeva u vodenoj fazi i ukupnom sadržaju organskog ugljika u sedimentu (Martin i sur. 2010). Od 18 promatranih farmaceutika, u sedimentu su pronađene povećane koncentracije 8 "kiselih" lijekova ( $\text{pH} < 7$ ) u rasponu od 0.4 do 8.0 ng/g i njihovih metabolita (Loffler i sur. 2003.), dok su u kanalizacijskom mulju utvrđeni blokatori  $\beta$ -adrenergičnih receptora pri koncentraciji od 3.7  $\mu\text{g/L}$  (Martin i sur. 2010). Na području Republike Hrvatske, prema istraživanju iz 2018. godine, izrađena je ekotoksikološka analiza sedimenta rijeke Save na četiri lokacije (Jesenice, Rugvica, Galdovo i Lukavec) s ukupno 428 mjerenih organskih onečišćivača (Babić i sur. 2018). Rezultati dobiveni kvantitativnom kemijskom analizom na temelju masene spektrometrije visoke rezolucije i tekućinske kromatografije, pokazali su prisutnost od 313 organskih onečišćivača u ekstraktu sedimenta rijeke Save (Babić i sur. 2018). Najveći broj ukupnih otkrivenih organskih onečišćivača sa sve četiri postaje iz skupine lijekova uključivao je analgetike (75%), antidepresive (68%), antibiotike (50%), kardiovaskularne lijekove (43%) te halucinogene (42%) (Babić i sur. 2018). Od kardiovaskularnih lijekova, na 3 postaje rijeke Save (Jesenice, Rugvica i Lukavec) pronađen je amiodaron koji je, svrstan među prvih 20 organskih onečišćivača, ukazao na opasnost zagađenja okoliša i potrebu za daljnjim istraživanjima (Babić i sur. 2018). Prema istraživanju iz 2020. godine, istražena je prisutnost 84 lijeka i 10 droga u plazmi riba iz rijeke Save pri čemu su, iz skupine kardiovaskularnih lijekova, otkriveni ramipril, simvastatin i verapamil čime je istaknuta opasnost unosa navedenih lijekova u vodene organizme (Malev i sur. 2020). Iako rastu podatci o pojavi farmaceutika u površinskim vodama, izazovno je predvidjeti rizike ovih kemikalija u plazmi riba zbog vrlo ograničenog razumijevanja njihove izloženosti i metaboličke pretvorbe unutar organizma. Plazma je poželjno ciljno tkivo za analizu farmaceutika u divljim ribama (Hutchinson i sur. 2014). Omjer dviju koncentracija u plazmi u ravnotežnom stanju (čovjek/riba), tzv. omjer učinka, mogao bi se koristiti za procjenu rizika koju farmaceutici uzrokuju (Huggett i sur. 2003). Do danas, većina podataka o farmaceuticima u ribljoj plazmi potječe od izloženosti u kontroliranim laboratorijskim uvjetima ili su usredotočeni na manji broj kemikalija (Bean i sur. 2018). Kemijska analiza uzoraka plazme divlje ribe iz rijeke Save, otkrila je prisutnost 90 različitih farmaceutskih lijekova i njihovih metabolita (Malev i sur. 2020). Koncentracije nađenih farmaceutika u plazmi bile su 10 do 1000 puta veće od njihovih koncentracija u riječnoj vodi. Antibiotici, antihistaminici i analgetici bili su kategorije s najvišim koncentracijama u plazmi (Malev i sur. 2020). Rezultati ove studije potvrđuju prethodna izvješća o FAS-ovima kao važnoj komponenti sedimenta onečišćenja u rijeci Savi (Babić i sur. 2018.) te slijede svjetski trend u kojem je zabilježeno najviše analgetika i

antibiotika kao glavnih predstavnika FAS-ova u slatkovodnim ekosustavima (Hughes i sur. 2012).

Bioakumulacija lijekova zabilježena je u zajednici obraštaja u raznim tekućicama diljem svijeta (rijeka Lee u Engleskoj, Ebro u Španjolskoj, Haihe u Kini) (Hu i sur. 2010). Uz unos alohtone organske tvari, zajednica obraštaja predstavlja osnovu hranidbenih lanaca u slatkovodnim sustavima te je stoga izuzetno važna za prijenos ovih spojeva kroz hranidbene mreže. Prema studiji iz 2020. godine, u plazmi riba pronađen je diklofenak pri koncentraciji 0.06 µg/L te naproksen u sličnom rasponu od 0.09 do 1.89 µg/L (Malev i sur. 2020) što je važno spomenuti jer su navedeni farmaceutici naznačeni kao kemikalije koje izazivaju zabrinutost i u sedimentu rijeke Save (Babić i sur. 2018). Nadalje, zabilježena je bioakumulacija FAS-ova u različitim slatkovodnim beskralježnjacima (Wilkinson i sur. 2017). U školjkašu *Bithinia tentaculata* pronađene su visoke koncentracije FAS-ova od 3.1 ng/g. Bentički beskralježnjaci mogu akumulirati toksične spojeve iz sedimenta prenoseći ih, nakon što bivaju konzumirani, u kralježnjake, posebice ribe čijom konzumacijom navedeni toksikanti mogu dospjeti i u ljudski organizam (Lagesson i sur. 2016). Prema studiji iz 2013. godine, izmjerena je bioakumulacija amiodarona u ribi *Pimephales promelas* i *Ictalurus punctatus* pri koncentraciji od  $220.00 \pm 18.00$  i  $283.00 \pm 13.00$  µg/L (Martínez i Noé 2013). Prema istraživanju iz 2020. godine, istražena je prisutnost 90 farmaceutika u plazmi riba iz rijeke Save na tri modelna organizma (Malev i sur. 2020). Tako je broj otkrivenih kardiovaskularnih farmaceutika u plazmi ribe *Squalius cephalus* iznosio 7, u plazmi ribe *Barbus barbus* 2 te u plazmi ribe *Alburnoides bipunctatus* 3 (Malev i sur. 2020). Također, prema vrijednosti srednjeg omjera učinka, najveću zabrinutost izazvao je simvastatin (23.22), zatim verapamil (10.00) te ramipril (5.33) (Malev i sur. 2020). Nadalje, prehrana također ima veliku ulogu u bioakumulaciji tvari u organizam. Oponašanje prirodnog unosa hrane u vodene organizme (npr. izbor prehrane i stope potrošnje kao posljedica sezonskih fluktuacija dostupnosti plijena) vrlo je teško u umjetnim laboratorijskim uvjetima. Stoga je u većini testova koji se koriste za procjenu rizika zanemareni umjetni unos hrane. Potrebni su terenski eksperimenti za procjenu stvarne izloženosti i potencijalnih učinaka kardiovaskularnih farmaceutika u prirodnim sustavima.

Za procjenu utjecaja onečišćivala na vodene organizme nije dovoljna samo kemijska analiza proučavanih lijekova, koja daje informaciju o njihovoj prisutnosti i koncentraciji u ekosustavu, već je bitna stvarna izloženost organizama prisutnim toksikantima, a ona ovisi i o bioraspoloživosti, procesima transformacije i razgradnje te međudjelovanjima između različitih kemijskih spojeva (Celiz i sur. 2009). Povezanost između izloženosti onečišćivalima i njihovih bioloških učinaka nije uvijek značajna, a da bi se pružila što točnija procjena ukupnog utjecaja

organskog onečišćenja na vodeni okoliš i živih organizama u njemu, primijenjuju se biološki testovi s različitim vrstama i s većim brojem jedinki. Ekotoksikološka procjena utjecaja korisna je ukoliko želimo dobiti uvid u djelovanje pojedinog lijeka ili pak smjese spojeva na rani stadij razvoja vodenih organizama (Kaštelan-Macan i sur. 2013). U ovom radu korišten je *in vivo* toksikološki test na embrijima zebrice *D. rerio*. Ulazak kemijskih spojeva u embrij odvija se pasivnom difuzijom te je zbog permeabilnosti koriona posebno omogućena u najranijim stadijima razvoja zebrice (Garcia-Käufer i sur. 2015).

Kao što je vidljivo iz rezultata, simvastatin se pokazao kao najtoksičniji promatrani kardiovaskularni farmaceutik na embrije zebrica. Osim što je prema HALMED-u uvršten među 50 najkorištenijih kardiovaskularnih lijekova u Hrvatskoj, prema istraživanju iz 2020. godine, u plazmi riba iz rijeke Save izazvao je najveću zabrinutost zbog visokog omjera učinka pri srednjoj vrijednosti od 23.22 (Malev i sur. 2020). Simvastatin, kao kemikalija koja predstavlja sve veću opasnost po okoliš, potrebno je pratiti daljnjim analizama (Malev i sur. 2020). Što se tiče okolišnih koncentracija simvastatina u komunalnim vodama, u Portugalu i SAD-u utvrđeno je 8.9 µg/L i 1.2 µg/L u ulaznim tokovima te 1.5 µg/L i 90.0 ng/L u izlaznim tokovima postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (Ottmar i sur. 2012; Pereira i sur. 2016). U površinskim vodama Norveške i Portugala utvrđene su koncentracije simvastatina od 0.63 µg/L, odnosno 0.37 µg/L (Grung i sur. 2007; Pereira i sur. 2015). Prethodne studije izvijestile su o višestrukim štetnim učincima simvastatina na vodene organizme na nekoliko razina biološke organizacije. Prema studiji iz 2015. godine, izloženost zebrica koncentraciji od 5.0 mg/L simvastatina bila je smrtonosna za sve jedinice između 32 hpf i 80 hpf (Ribeiro i sur. 2015). Također, na istoj koncentraciji uočene su abnormalnosti embrija već na 32 hpf koje su do 80 hpf uzrokovale smrt pri čemu nije došlo do izvaljivanja embrija. Pri koncentraciji od 500.0 µg/L simvastatina uočene su abnormalnosti na očima, repu, žumanjčanoj vreći kao i pojava perikardijalnog edema (Ribeiro i sur. 2015). Visoke koncentracije simvastatina utjecale su i na embrije hridinskih ježinaca *Paracentrotus lividus*. Izlaganje 5.0 mg/L simvastatina rezultirao je značajnim kašnjenjem u razvoju embrija te je pri 5.0 µg/L zabilježeno značajno smanjenje dužine ličinki. Izloženost embrija koncentraciji jednako ili većoj od 2.0 µg/L također je pokazala značajan porast morfoloških abnormalnosti na tijelu (Ribeiro i sur. 2015). Navedeni rezultati usporedivi su i s rezultatima prikazanim unutar ovog diplomskog rada gdje je stopa mortaliteta iznosila 100% tijekom izlaganja zebrica simvastatinu od 10.0 µg/L. Također, uočene razvojne abnormalnosti se podudaraju i s gore navedenim, ali u ovome pokusu utvrđene su na puno nižoj i okolišno relevantnoj koncentraciji simvastatina (1.0 µg/L). Nadalje, logaritam koeficijenta razdjeljenja u sustavu n-oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ) simvastatina iznosi 4.7,

što može ukazivati na visok potencijal bioakumulacije u vodenim organizmima (Santos i sur. 2016). Budući da simvastatin inhibira HMG-CoA reduktazu što dovodi do smanjenja razine triglicerida i proizvodnje kolesterola, koji inače služi kao svojevrsni pufer fluidnosti stanične membrane, može doći do pojave stresa koji će poremetiti membransku dinamiku, potaknuti upalne procese u stanicama, dugoročno narušiti staničnu homeostazu te ubrzati fiziološki proces starenja jedinke (Los i Murata 2004). Nadalje, povećanjem koncentracije simvastatina i vremenskog izlaganja embrija lijeku, uočen je pad otkucaja srca, pad broja pokreta prsnih peraja te povećanje oksidativnog stresa. Budući da su statini kompetitivni inhibitori koji sudjeluju u  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina te su usko povezani s transportnim lancem elektrona čiji konačni produkt dovodi do stvaranja ROS-a u obliku  $O^{2-}$ ,  $HO^{\cdot}$  i  $H_2O_2$ , moguće je povećanje oksidativnog stresa ličinki *D. rerio* na staničnoj razini (Speijer i sur. 2014).

Središnji živčani sustav je visoko osjetljiv na oštećenja zbog slobodnih radikala, tj. oksidativni stres može utjecati na vid, mišiće i moždanu aktivnost (Nallasamy i sur. 2012). Oksidativni učinci lijekova povezani sa značajnim promjenama enzima uključeni su u regulaciju funkcije središnjeg živčanog sustava, poput kolinesteraza, proučavanih u riba kao što je jegulja *Anguilla anguilla* (Nunes i sur. 2015). Istraživanje učinka oštećenja organizma zbog ROS-a uočeno je i na školjkašu dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Solé i sur. 2010) i slatkovodnim planktonskim račićima *Daphnia magna* (Daniel i sur. 2019). Stoga je moguće predložiti uspostavljanje odnosa između oksidacijskog stresa i neurotoksičnosti, s obzirom da se aktivnost kolinesteraze (ChE) može promijeniti zbog ROS interferencije (Delwing-de Lima i sur. 2010; Oliveira i sur. 2015). Kako bi analize bile još konkretnije i detaljnije, trebalo bi napraviti istraživanja s duljim razdobljima izloženosti embrija zebrica simvastatinu kako bi se dobili relevantniji rezultati za određivanje uloge ovog lijeka u snižavanju lipida u kardiotoksičnim, neurotoksičnim i reproduktivnim poremećajima. Obzirom da su lijekovi za regulaciju lipida jedni od najpropisivanijih lijekova u svijetu, potreban je interdisciplinarni pristup u istraživanjima koja slijede (Davidson, 2002).

Za razliku od simvastatina, ekotoksikološki podatci za amiodaron gotovo da i ne postoje (Escher i sur. 2011). Prema studiji iz 2011. godine, dugotrajna izloženost (28 dana) velikoglavog klena *Pimephales promelas* amiodaronu koncentracije 1020.0  $\mu\text{g/L}$  došlo je do statistički značajnog pada mortaliteta jedinki u usporedbi s kontrolom (Overturf i sur. 2012). Prema studiji procjene rizika iz bolničkih otpadnih voda u Švicarskoj, najviše rangirani koeficijent rizika imao je amiodaron s utvrđenom koncentracijom od 0.8  $\mu\text{g/L}$  (Escher i sur. 2011). Također, prema analizi sedimenta rijeke Save iz 2018. godine, zbog visokih koncentracija amiodarona, postaja Rugvica pokazala se najtoksičnijom (106.5  $\text{ng/L}$ ), koju zatim

sljedeće Jesenice, Lukavec i Galdovo (Babić i sur. 2018). Logaritam koeficijenta razdjeljenja u sustavu n-oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ) amiodarona iznosi 7.8 što može ukazivati na visok potencijal akumulacije i posljedično visokoj toksičnosti u vodenim organizmima ili organizmima koji se hrane sedimentom (Escher i sur. 2011). U okolišu, jedinke će rijetko biti izložene jednom spoju, već koktelu lijekova i drugih onečišćivača, koji mogu imati interaktivne učinke (Zhang i sur. 2009). Unatoč brojnim istraživanjima koja ukazuju na to da farmaceutske tvari mogu biti univerzalni zagađivači, malo je poznato do koje mjere se uzimaju i redistribuiraju među različitim vrstama organizama u prirodnim hranidbenim mrežama. Navedeni rezultati usporedivi su i s rezultatima prikazanim unutar ovog diplomskog rada gdje amiodaron u testiranom rasponu koncentracija (0.1 - 10.0  $\mu\text{g/L}$ ) nije uzrokovao statistički značajan utjecaj na stopu preživljavanja zebriće. Međutim, primijećeno je smanjenje pokreta prsnih peraja ribe zebriće tijekom izlaganja amiodaronu u koncentraciji 10.0  $\mu\text{g/L}$ . Nadalje, amiodaron blokira inaktivirane natrijske i kalcijске kanale, zbog čega dolazi do usporavanja frekvencije i provođenja impulsa kroz AV čvor što je vjerojatno uzrok smanjenja otkucaja srca (Katzung i Trevor 2017). Također, amiodaron je antagonist tiroidne žlijezde koja proizvodi dvije važne vrste hormona - tiroksin i trijodtironin koji sadrže jod i hormon koji regulira metabolizam kalcija - kalcitonin. Navedeni hormoni odgovorni su za optimalan rast, razvoj i funkcioniranje svih tjelesnih tkiva što uključuje apsorpciju kisika u stanicama, poticanje energetske procesa, utjecaj na kardiovaskularni i središnji živčani sustav čiji manjak ili višak dovodi do kongenitalnih malformacija. Manjak joda uzrokuje kretinizam i neurološke poremećaje te učestale pojave edema (Katzung i Trevor 2017). Sve je veća zabrinutost za korištenjem lijekova kao što je amiodaron jer remete hormone štitnjače koja ima važnu ulogu u razvoju živčanog sustava (Zoeller i Crofton 2000; Escobar i sur. 2004). Prema studiji iz 2009. godine, ličinke zebriće bile su izložene amiodaronu u vrlo niskoj koncentraciji od  $6.45 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g/L}$  pri čemu je došlo do smanjenja razine tiroksina u folikularnim stanicama štitnjače (Raldúa i Babin 2009). Budući da amiodaron izaziva sve veću zabrinutost te se pokazao kao veoma bioakumulativan farmaceutik, u daljnjim istraživanjima trebalo bi produljiti izlaganje jedinki amiodaronu.

Akumulacija toksičnih spojeva u organizmu vrlo često može narušiti njegovu homeostazu (Katzung i Trevor 2017). Ramipril, osim što prema HALMED-u, zauzima 1. mjesto na listi 50 najkorištenijih kardiovaskularnih lijekova u Republici Hrvatskoj, prema istraživanju iz 2020. godine, u plazmi riba iz rijeke Save izazvao je zabrinutost zbog omjera učinka pri srednjoj vrijednosti od 5.33 (Malev i sur. 2020). Kemikaliju koja predstavlja sve veću opasnost po okoliš kao što je ramipril, potrebno je pratiti daljnjim analizama (Malev i sur. 2020). Izmjerene koncentracije ramiprila iz otpadnih voda farmaceutske industrije u Indiji variraju u rasponu

10.0-100.0 µg/L (Cardoso i sur. 2014). U gradu Gdanjsku (Poljska) izmjerena je prosječna koncentracija ramiprila 0.09 µg/L u ulaznom toku te 0.06 µg/L u izlaznom toku postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (Kot-Wasik i sur. 2016). Navedeni rezultati usporedivi su i s rezultatima prikazanim unutar ovog diplomskog rada gdje je prilikom izlaganja zebrića 10.0 µg/L ramiprila uočeno statistički značajno smanjenje otkucaja srca i dužine ličnika. Ovaj lijek pripada skupini antihipertenziva, tj. inhibitorima renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava te je zbog toga jedan od najkorištenijih lijekova farmaceutske industrije (Katzung i Trevor 2017). Aldosteron je hormon kojeg luči nadbubrežna žlijezda, a sudjeluje u regulaciji ravnoteže vode i minerala čijom blokadom dolazi do osmotskog disbalansa. Pri tome nastaje manjak natrija i višak kalija koji uzrokuje brojne aritmije, a na poslijetku može doći do acidoze koja narušava homeostazu (Katzung i Trevor 2017). Dakle, srce je podložnije fibrilacijama, što može biti uzrok smanjenja frekvencije otkucaja u jedinkama zebrića. Prema tome, potrebna su daljnja istraživanja koja će se fokusirati na učinak ramiprila na srce u ranim stadijima razvoja organizma.

Posljednji proučavani farmaceutik je kardiovaskularni lijek koji pripada skupini blokatora kalcijjskih kanala - verapamil. Osim što se prema HALMED-u nalazi među najkorištenijim antiaritmikima u Republici Hrvatskoj, prema istraživanju iz 2020. godine, u plazmi riba iz rijeke Save izazvao je zabrinutost zbog omjera učinka pri srednjoj vrijednosti od 10.00 (Malev i sur. 2020). Kemikaliju koja predstavlja sve veću opasnost po okoliš kao što je verapamil, potrebno je pratiti daljnjim analizama (Malev i sur. 2020). Prema studiji iz 2006. godine, utvrđene su maksimalne okolišne koncentracije verapamila od 3.1 µg/L u ulaznom toku te 0.5 µg/L u izlaznom toku postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda na rijeci Rajni (Hummel i sur. 2006). U površinskim vodama u Njemačkoj utvrđena je maksimalna okolišna koncentracija verapamila od 6.0 ng/L (Hummel i sur. 2006). Do danas se malo studija usredotočilo na učinke verapamila na ranu fazu života riba i vodozemaca (Burgess i Vere 1989; Overturf i sur. 2011). Studija Burgess i Vere (1989) utvrdila je da je verapamil u koncentraciji od 72.0 µg/L prouzročio abnormalnosti u razvoju žabe afričke pandžašice *Xenopus laevis* uključujući pojavu edema, hipopigmentaciju te rotaciju crijeva. Nadalje, u studiji Overturfa i sur. (2012), dugotrajna izloženost (28 dana) velikoglavog klena *Pimephales promelas* verapamilu koncentracije 600.0 µg/L uzrokovala je statistički značajno smanjenje dužine ličinki u usporedbi s kontrolom. Također, izlaganje šarana *Cyprinus carpio* verapamilu koncentracije 46.3 i 463.0 µg/L rezultiralo je malformacijama lubanje, peraja, kralježnice (kifoza, lordoza i skolioza), pojavom edema (srčani, visceralni, žumanjčane vreće), kao i smanjenjem otkucaja srca (Steinbach i sur. 2013). Prema studiji iz 2015. godine, utvrđena je okolišna koncentracija

verapamila od 0.02 µg/L u površinskoj vodi u gradu Katrineholm (Švedska). Srednja letalna koncentracija (LC50) pri kojoj verapamil inducira smrtnost ličinki kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss* iznosila je 2.7 mg/L na 72 hpf (Godoy i sur. 2015). I unutar ovog istraživanja, povećanjem koncentracije i vremenskog izlaganja zebrića uzorku verapamila uočeno je smanjenje otkucaja srca zebrića izlaganih testiranim koncentracijama nakon 72 i 96 h, kao i smanjenje dužine ličinki pri koncentraciji 10.0 µg/L te povećanje oksidativnog stresa pri 1.0 µg/L i 10.0 µg/L. Ukratko, učinci uzrokovani djelovanjem verapamila u riba mogu se smatrati sličnima terapijskim učincima i otkrivenim nuspojavama u ljudi (bradikardija, periferni edem i gastrointestinalno krvarenje). Te sličnosti u načinu rada djelovanja se može objasniti velikim strukturnim sličnostima L-tipa kalcijevih kanala u riba i ljudi (Rottbauer i sur. 2001). Potrebna su daljnja bihevioralno-ekotoksikološka istraživanja za procjenu rizika od okolišnih zagađivača, obzirom da je ponašanje riba vrlo korisno za praćenje fiziološkog statusa populacije i zdravstvenog stanja vodenog ekosustava.

Nadalje, Hermens i Leeuwangh (1982) iznijeli su hipotezu da u smjesama s velikim brojem kemikalija s različitim specifičnim načinima djelovanja, čije su pojedinačne koncentracije znatno ispod praga pojedinačnog učinka, osnovna toksičnost može značajno doprinijeti učinku smjese. Sve kemikalije, bez obzira imaju li specifičan način toksičnog djelovanja, također imaju osnovni toksični učinak (Wezel i Opperhuizen 1995). U koncentracijama u kojima se javlja akutna toksičnost, toksičnost pojedinog lijeka uglavnom će biti posljedica specifičnog načina toksičnog djelovanja. Računanjem zbirnog količnika (RQ) rizika, izrađena je ekotoksikološka procjena rizika smjese spojeva iz bolničkih otpadnih voda u Švicarskoj koja se sastojala od 31-og farmaceutika (Escher i sur. 2011). U usporedbi koeficijenata rizika, dominirali su amiodaron, ritonavir, klotrimazol i diklofenak. Na ovaj način navedena analiza smjese spojeva izdvaja prioritete farmaceutike i postavlja temelje za daljnja istraživanja lijekova (Escher i sur. 2011). Unutar ovog istraživanja, izlaganje zebrića smjesi od 4 kardiovaskularna farmaceutika, stopa mortaliteta iznosila je 100% pri koncentraciji od 4.0 i 40.0 µg/L. Za uzrok smrtnosti zebrića u smjesi spojeva najvjerojatnije je zaslužan simvastatin s obzirom na isti trend toksičnosti. Naime, izlaganje zebrića simvastatinu 96 hpf koncentracije 1.0 µg/L stopa mortaliteta iznosila je 80%, dok je pri 10.0 µg/L iznosila 100%. Izuzev smrtnosti, stopa abnormalnosti i izvaljivanja kao i ostali pokazatelji (dužina ličinki, otkucaji srca, pokreti prsnim perajama te oksidativni stres na staničnoj razini) su pokazali značajni učinak istraživanih kardiovaskularnih lijekova.

S obzirom na sličnost genoma i fizioloških karakteristika s ljudima te na sve veću dostupnosti brojnih mutantnih i transgeničnih linija, zebrića je postala sve popularnijim



zamjenskim modelom viših kralježnjaka. Zebrice su naizgled jednostavni organizmi u odnosu na sisavce, ali imaju kompleksniji genom koji sadrži 2 kromosoma više nego ljudi (Chrisman i sur. 1990). Za razliku od sisavaca, u evoluciji riba koštunjača došlo je do duplikacije genoma, iako je samo mali broj dupliciranih gena ostao aktivan do danas (neki imaju nove funkcije, neki se ne eksprimiraju u istim tkivima kao originalni geni, tzv. ortolozi) (Van de Peer i sur. 2002). Mutacija u genima sisavaca može uzrokovati smrtnost embrija, dok mutacija u genima zebrića može uzrokovati fenotipske promjene, ali ne i smrtnost zbog čega je zanimljivo proučavati funkcije gena u mutantnim sojevima zebrića. Prilikom izlaganja ribe *Astyanax mexicanus* verapamilu, konzerviranost gena za ciljani protein CACNA1D iznosi 90.5%, dok prilikom izlaganja ribe *Danio rerio* konzerviranost gena za ciljani protein CACNA1C i CACNA1G iznosi 78.3%, odnosno 69.3%. Nadalje, podudarnost gena organizma *Tetraodon nigroviridis* s ciljanim proteinima KCNH2 i SCN5A iznosi 85.5% prilikom izlaganja amiodaronu. Prilikom izlaganja ribe *Astyanax mexicanus* simvastatinu, konzerviranost gena za ciljani protein HMGCR iznosi 78.8%, dok prilikom izlaganja ribe *Tetraodon nigroviridis* ramiprilu, konzerviranost gena za ciljani protein ACE iznosi 62.9%. Također, u pojedinim tipovima istraživanja (poput apsorpcije, izlučivanja, i sl.) nije moguće precizno ekstrapolirati dobivene rezultate na sisavce. Unatoč tome, zebrića je trenutno jedan od najvažnijih i vodećih istraživačkih modela u biomedicinskim i toksikološkim istraživanjima diljem svijeta, što svakako potvrđuje eksponencijalan broj znanstvenih publikacija.

Procjena rizika onečišćenja vodenog okoliša na živi svijet koji u njemu živi slabo je razvijena te je potrebno uvesti još bioloških pokazatelja koji bi razjasnili interakcije toksikanata te posljedice njihove bioakumulacije u organizme. U okolišu se često puta nalazi više lijekova koji mogu imati aditivne ili sinergističke učinke koje nije jednostavno za pratiti. Svjedočimo sve većoj potrebi za točnom i kvalitetnom procjenom antropogenog utjecaja na okoliš. Danas postoji veliki broj metoda za ekotoksikološke analize, no one katkada daju različite pa čak i kontradiktorne rezultate. Nepostojanje dobro razrađenih standardiziranih smjernica za pristup analizi onečišćenja okoliša velik je problem u očuvanju okoliša kao i zdravlja ljudi. Upravo iz tog razloga je važno koristiti sve veći broj bioloških analiza koji nam mogu s prihvatljivom točnošću ukazati na razmjer i opasnost onečišćenja okoliša. Test embriotoksičnosti na zebrićama pokazao se vrlo dobrim izborom za određivanje toksičnosti kardiovaskularnih lijekova. Ovakav pristup sigurno bi pomogao identificiranju onečišćenih područja te kvalitetnoj procjeni opasnosti za okoliš i ljude.

## 7. ZAKLJUČAK

Tehnološkim razvojem dolazi do nove vrste onečišćenja, tzv. onečišćenje lijekovima koje poprima sve veće razmjere u prirodi ostavljajući velike posljedice na biljni i životinjski svijet, a zatim i na ljude. Farmaceutski aktivni spojevi se ispuštaju putem otpadnih voda u okoliš gdje se bioakumuliraju u organizme koji su u kontaktu s vodom. Shodno tome, ovim istraživanjem procijenili smo i analizirali utjecaj kardiovaskularnih farmaceutika na embrije ribe zebrice *Danio rerio*.

Tijekom prvih 96 sati razvoja, ribe zebrice su bile izložene amiodaronu, ramiprilu, simvastatinu i verapamilu koncentracija 0.1, 1.0, 10.0 µg/L te smjese sva četiri spoja koncentracija 0.4, 4.0, 40.0 µg/L, prilikom čega su se pratili krajnji učinci: stopa mortaliteta i abnormalnosti, dužina ličinka, stopa izvaljivanja, brzina otkucaja srca, spontani pokreti prsnim perajama i oksidativni stres na staničnoj razini. Od četiri ispitivana lijeka i smjese spojeva, najvišu stopu smrtnosti i abnormalnosti uzrokovali su simvastatin i smjesa sva četiri spoja. Najčešće abnormalnosti uključivale su perikardijalni edem, skoliozu, edem žumanjčane vreće i krvarenje. Povećanjem koncentracije i vremenskog izlaganja lijeka smanjili su se otkucaji srca na svim uzorcima. Smanjenje dužine ličinki uočeno je na uzorcima ramiprila, simvastatina i verapamila, dok je smanjenje pokreta prsnih peraja uočeno na uzorku amiodarona. Oksidativni stres povećao se na uzorcima simvastatina i verapamila s povećanjem koncentracije lijekova. Osim što je ovaj rad koristio okolišno relevantne koncentracije proučavanih farmaceutika, za razliku od drugih radova, ističe i pojavu negativnih učinaka istraživanih kardiovaskularnih lijekova na embrije riba. Potrebno je također uzeti u obzir da su navedeni spojevi stalno prisutni u vodenom okolišu te su im vodeni organizmi izloženi u puno duljem vremenskom periodu za razliku od ovog kratkotrajnog (96 h) istraživanja koji prati samo embrionalni razvoj.

Test toksičnosti na embrijima zebrica (OECD 236, 2013) upotrijebljen je u svrhu unaprjeđivanja već postojećih bioloških analiza te bolje procjene onečišćenja vodenog okoliša i kvalitetnije procjene ekotoksikološkog rizika. Također, istaknuta je važnost upotrebe embrija zebrice kao modelnog organizma u znanstvenim istraživanjima, koji u isto vrijeme, zadovoljava 3R načela s naglaskom na etičke principe pri testiranju životinja.

## 8. LITERATURA

- Agunbiade FO, Moodley B, 2014., Pharmaceuticals as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa, *Environ. Monit. Assess.* 186, 7273-7291
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia J, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Sollewijn Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoef F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJK, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S, 2002., Whole-Genome Shotgun Assembly and Analysis of the Genome of *Fugu rubripes*, *Science* 297 (5585), 1301-1310
- August P, 2003., Initial treatment of hypertension, *New England Journal of Med.* 348, 610-7
- Babić S, Barišić J, Stipaničev D, Repec S, Lovrić M, Malev O, Martinović-Weigelt D, Čož-Rakovac R, Klobučar G, 2018., Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with *in silico* toxicity characterization, *Science of the Total Environment* 643, 435-450
- Barros S, Montes R, Quintana JB, Rodil R, Andréa A, Capitão A, Soares J, Santos MM, Neuparth T, 2018., Chronic environmentally relevant levels of simvastatin disrupt embryonic development, biochemical and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology* 201, 47-57
- Bean TG, Rattner BA, Lazarus RS, Day DD, Burket SR, Brooks BW, Haddad SP, Bowerman WW, 2018., Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environ. Pollut.* 232, 533-545
- Boxall A, 2012., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions, *Environ. Health Perspect.* 120, 1221-1229
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R, 2014., The fish embryo test (FET): origin, applications and future, *Environmental Science and Pollution Research* 22 (21), 16247-16261
- Brodin T, Piovano S, Fick J, Klaminder J, Heynen M, Jonsson M, 2014., Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems impacts through behavioural alterations, *Philosophical Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369 (1), 204-211
- Burgess A, Vere DW, 1989., Teratogenic effects of some calcium channel blocking agents in *Xenopus embryos*. *Pharmacol Toxicol* 64, 78-82
- Caban M, Kumirska J, Migowska N, Łukaszewicz P, Stepnowski P, 2015., Simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples, *Sci. Total Environ.* 508, 498-505
- Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM, 2008., Resistant Hypertension: Diagnosis, Evaluation, and Treatment, *Hypertension* 51, 1403-1419
- Cardoso O, Porcher JM, Sanchez W, 2014., Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge, *Chemosphere* 115, 20-30

- Celiz MD, Tso J, Aga DS, 2009., Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks, *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12): 2473-2484
- Chen W, Xu J, Lu S, Jiao W, Wu L, Chang A, 2013., Fates and transport of PPCPs in soil receiving reclaimed water irrigation, *Chemosphere* 93, 2621-2630
- Chrisman CL, Blacklidge KH, Riggs PK, 1990., Chromosomes of Fish, *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, Academic Press, Volume 34, Pages 209-227
- Connolly SJ, 1999., Evidence Based Analysis of Amiodarone Efficacy and Safety, *Circulation*, 100, 2025-2034
- Creaser CW, 1934., The technic of handling the zebra fish (*Brachydanio rerio*) for the production of eggs which are favorable for embryological research and are available at any specified time throughout the year, *Copeia* 1934 (4), 159-161
- Daniel D, Dionísio R, Alkimin GD, Nunes B, 2019., Acute and chronic effects of paracetamol exposure on *Daphnia magna*: how oxidative effects may modulate responses at distinct levels of organization in a model species. *Environmental Science and Pollution Research* 26(4):3320-3329
- Davidson MH, 2002., Combination Therapy for dyslipidemia. *Clinical Lipidology: A Companion to BraunWald's Heart Disease* 352-362
- Delwing-de Lima D, Wollinger LF, Casagrande ACM, Delwing F, da Cruz JGP, Wyse ATS, Magro DD, 2010., Guanidino compounds inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities: effect neuroprotector of vitamins E plus C. *International Journal of Developmental Neuroscience* 28(6):465-473
- Ebele J, Abdallah M, Harrad S, 2017., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 3, 1-16
- Ellis JB, 2006., Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut.* 144 (1), 184-189
- Escher Beate I, Baumgartner R, Koller M, Treyer K, Lienert J, McArdell Christa S, 2011., Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater, *Water Research*, Volume 45, Issue 1, Pages 75-92
- Escobar G, Obregon MJ, Rey F, 2004., Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur. J. Endocrinol.* 151, U25-U37
- European Directive 2000. 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy (EU Water Framework Directive). *Official Journal of the EU* 327, 1-72
- European Directive 2010/63/EU 2010. of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the EU* 276, 33-79
- European Regulation (EC) 2006. No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal of the EU* 396, 1-849
- European Regulation (EC) 2009. No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the EU* 342, 59-209

- Fent K, Weston AA, Caminada D, 2006., Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159
- Fick J, Soderstrom H, Lindberg R, Phan C, Tysklind M, Larsson D, 2009., Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production, *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2522-2527
- Garcia-Käufer M, Gartiser S, Hafner C, Schiwy S, Keiter S, Gründemann C, Hollert H, 2015., Genotoxic and teratogenic effect of freshwater sediment samples from the Rhine and Elbe River (Germany) in zebrafish embryo using a multi-endpoint testing strategy. *Environmental Science and Pollution Research International* 22 (21), 16341-16357
- Garg J, Messerli AW, Bakris GL, 2002., Evaluation and Treatment of Patients With Systemic Hypertension, *Circulation* 105, 2458-2461
- Godoy AA, Kummrow F, Pamplin AP, 2015., Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review, *Chemosphere* 138, 281-291
- Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, Olshansky B, Singh B, Collard HR, 2007., A practical guide for clinicians who treat patients with amiodarone, *Heart Rhythm.* 4 (9), 1250-1259
- Grant AO, 2003., Recent advances in the treatment of arrhythmias, *Circ Journal* 67, 651-655
- Grung M, Heimstad MS, Moe M, Schlabach M, Svenson A, Thomas K, Woldegiorgis A, 2007., Human and veterinary pharmaceuticals, narcotics, and personal care products in the environment. SFT Report. (Oslo)
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C, 1996., The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*, *Development* (Cambridge, England) 123, 1-36
- Hafner C, Gartiser S, Garcia-Käufer M, Schiwy S, Hercher C, Meyer W, Achten C, Larsson M, Engwall M, Keiter S, Hollert H, 2015., Investigations on sediment toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (21), 16358-16370
- Heran BS, Wong M, Heran IK, Wright J, Cochrane Hypertension Group, Blood pressure lowering efficacy of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors for primary hypertension, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD003823
- Hermens J, Leeuwangh P, 1982., Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the 33 guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6, 302-310
- Howe K, Clark MD, Torrojo CF, Yong G, 2013., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature* 496, 498-503
- Hu X, Zhou Q, Luo Y, 2010., Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China, *Environ. Pollut.* 158, 2992-2998
- Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT, 2003., A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9, 1789-1799

- Hughes SR, Kay P, Brown L, 2012., Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 661-677
- Hummel D, Löffler D, Fink G, Ternes TA, 2006., Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7321-8
- Hutchinson TH, Madden JC, Naidoo V, Walker CH, 2014., Comparative metabolism as a key driver of wildlife species sensitivity to human and veterinary pharmaceuticals, *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130583
- ISO, 2007. 15088: Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)
- Jakimska A, Śliwka-Kaszyńska M, Reszczyńska J, Namieśnik J, Kot-Wasik A, 2014., Elucidation of transformation pathway of ketoprofen, ibuprofen, and furosemide in surface water and their occurrence in the aqueous environment using UHPLC-QTOF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406(15), 3667-3680
- Källquist T, Milačič R, Smital T, Thomas KV, Vranes S, Tolefsen K, 2008., Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Water research* 42, 2146-2156
- Kari G, Rodeck U, Dicker AP, 2007., Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 82 (1), 70-80
- Kaštelan-Macan, M., Petrović, M., 2013., *Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 75*
- Katzung B, Trevor A, 2017., *Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill Education, 14 edition, 14, 225-249*
- Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA, 2002., Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States, *Jama* 287, 337
- Keating MT, Sanguinetti MC, 2001., Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias, *Cell, Vol. 104, 569-580*
- Key PB, Hoguet J, Reed LA, Chung KW, Fulton MH, 2008., Effects of the statin antihyperlipidemic agent simvastatin on grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environ. Toxicol.* 23, 153-160
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF, 1995., Stages of embryonic development of the zebrafish, *Developmental Dynamics* 203 (3), 253-310
- Kinth P, Mahesh G, Panwar Y, 2013., Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook, *Zebrafish* 4, 510-517
- Kot-Wasik A, Jakimska A, Śliwka-Kaszyńska M, 2016., Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants, *Environ. Monit. Assess.* 188, 661
- Lagesson A, Fahlman J, Brodin T, Fick J, Jonsson M, Byström P, Klaminder J, 2016., Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - insights from a field experiment. *Sci. Total Environ.* 568, 208-215
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T, 2009., Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the

- fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149 (2), 196-209
- Laurent D, Jacques P, Olivier F, Gilbert P, Patrick G, Dino N, 2000., Hemodynamic and Antiadrenergic Effects of Dronedaron and Amiodarone in Animals with a Healed Myocardial Infarction, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36(3), 376-383
- Lawrence C, 2007., The husbandry of zebrafish *Danio rerio*: A review. *Aquaculture* 269 (1-4), 1-20
- Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D, 2013., A brief histology of zebrafish research – toward biomedicine, *Yi Chuan* 35(4), 410-420
- Li ZH, Li P, Randak T, 2010., Ecotoxicological effects of short-term exposure to a human pharmaceutical Verapamil in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152, 385-391
- Li ZH, Veliseka J, Zlabeka V, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Li P, Randak T, 2011., Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses, *Journal of Hazardous Materials* 185, 870-880
- Lillicrap A, 2010., The use of zebrafish embryos for ecotoxicity testing and its suitability as an alternative approach. *Diplomski rad*. Exeter: University of Exeter
- Loffler D, Ternes TA, 2003., Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1021, 133-144
- Los D, Murata N, 2004., Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 142-157
- Malev O, Lovrić M, Stipaničev D, Repec S, Martinović-Weigelt D, Zanella D, Ivanković T, Li M, Klobučar G, 2020., Toxicity prediction and effect characterization of 90 pharmaceuticals and illicit drugs measured in plasma of fish from a major European river (Sava, Croatia), *Environmental pollution*, 266, 115162
- Martin J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E, 2010., Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination, *J. Sep. Sci.* 33, 1760-1766
- Martínez G, Noé S, 2013., Field and Laboratory Fish Tissue Accumulation of Carbamazepine and Amiodarone, *Dissertation*, Denton, Texas
- Mayden RL, Tang, KL, Conway KW, Freyhof J, Chamberlain S, Haskins M, Schneider L, Sudkamp M, Wood RM, Agnew M, 2007., Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308 (5), 642-654
- McGrath P, 2012., *Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity*, John Wiley & Sons
- McKim JM, 1977., Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity, *Journal of the Fisheries Board of Canada* 34 (8), 1148-1154

- Meier M, Blatter XL, Seelig A, Seelig J, 2006., Interaction of Verapamil with Lipid Membranes and P-Glycoprotein: Connecting Thermodynamics and Membrane Structure with Functional Activity, *Biophysical Journal*, 91(8), 2943-2955
- Mendoza A, Aceña J, Pérez S, López de Alda M, Barceló D, Gil A, Valcárcel Y, 2015., Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard, *Environ. Res.* 140, 225-241
- Nallasamy P, Zhu H, Misra HP, Li Y, Jia Z, 2012. Reactive oxygen species and oxidative stress in spinal cord injury - Updated experimental and clinical evidence. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* 2451-2467. Springer, Berlin, Heidelberg
- Nunes B, Verde MF, Soares AM, 2015., Biochemical Effects of the Pharmaceutical Drug Paracetamol on *Anguilla anguilla*. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (15), 11574-84
- OECD, 2013., Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Organization for Economic Cooperation and Development, OECD, Paris
- Oliveira LLD, Antunes SC, Gonçalves S, Rocha O, Nunes B, 2015., Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119, 123-131
- Overturf MD, Overturf CL, Baxter D, Hala DN, Constantine L, Venables B, 2011., Early life-stage toxicity of eight pharmaceuticals to the Fathead Minnow, *Pimephales promelas*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 455-64
- Ottmar KJ, Colosi LM, Smith JA, 2012., Fate and transport of atorvastatin and simvastatin drugs during conventional wastewater treatment. *Chemosphere* 88, 1184-1189
- Overturf MD, Overturf CL, Overturf D, Baxter D, Hala DN, Constantine L, Venables B, Huggett DB, 2012., Early Life-Stage Toxicity of Eight Pharmaceuticals to the Fathead Minnow, *Pimephales promelas*, *Arch Environ Contam Toxicol* 62, 455-464
- Pamanji R, Methu MS, Yashwanth B, Leelavathi S, Vankateswara RJ, 2015., Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Environmental Science and Pollution Research* 22(10), 7744-7753
- Pandya M, Patel D, Rana J, Patel M, Khan N, 2016., Hepatotoxicity by Acetaminophen and Amiodarone in Zebrafish Embryos, *J Young Pharm*, 8(1), 50-52
- Parker T, Libourel PA, Hetheridge M, Cumming R, Sutcliffe T, Goonesinghe A, Ball J, Owen S, Chomis Y, Winter M, 2014., A multi-endpoint in vivo larval zebrafish (*Danio rerio*) model for the assessment of integrated cardiovascular function, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 69, 30-38
- Paterson G, Metcalfe CD, 2008 Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74, 125-130
- Pereira A, Silva L, Lino CM, Meisel LM, Pena A, 2016., Assessing environmental risk of pharmaceuticals in Portugal: an approach for the selection of the Portuguese monitoring stations in line with Directive 2013/39/EU. *Chemosphere* 144, 2507-2515
- Pereira A, Silva L, Meisel LM, Lino CM, Pena A, 2015., Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environ. Res.* 136, 108-119



- Quaglino D, Riem H, Duner H, Bruttomesso D, Bigler L, Follath F, Realdi G, Pettenazzo A, Baritussio A, 2004., Effects of metabolites and analogs of amiodarone on alveolar macrophages: structure-activity relationship, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L438-L447
- Raldua D, Babin PJ, 2009., Simple, Rapid Zebrafish Larva Bioassay for Assessing the Potential of Chemical Pollutants and Drugs to Disrupt Thyroid Gland Function. *Environmental Science & Technology* 43(17), 6844-6850
- Ribas L, Piferrer F, 2014., The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture* 6, 209-240
- Ribeiro S, Torres T, Martins R, Santos MM, 2015., Toxicity screening of diclofenac, propranolol, sertraline and simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Safe* 114, 67-74
- Richmond EK, Grace MR, Kelly J, Reisinger AJ, Rosi EJ, Walters DM, 2018., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are ecological disrupting compounds (EcoDC). *Elementa Sci. Anthropocene* 5, 66-73
- Robinson PD, 2009., Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 1179-1188
- Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen M-APK, Cantiello HF, Fishman MC, 2001., Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel [alpha]1 subunit. *Dev. Cell.* 1, 265-75
- Russell WMS, Burch RL, 1959., *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London
- Rzymiski P, Niedzielski P, Klimaszyk P, Poniedziałek B, 2014., Bioaccumulation of selected metals in bivalves (*Unionidae*) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir. *Environ. Monit. Assess.* 186(5), 3199-3212
- Sanoh S, Hanada H, Kashiwagi K, Mori T, Goto-Inoue N, Suzuki KT, Mori J, Nakamura N, Yamamoto T, Kitamura S, Kotake Y, Sugihara K, Ohta S, Kashiwagi A, 2020., Amiodarone bioconcentration and suppression of metamorphosis in *Xenopus*, *Aquatic Toxicology* 228, 105623
- Schreiber R, Guendel U, Franz S, Kuester A, Rechenberg B, Altenburger R. 2011., Using the fish plasma model for comparative hazard identification for pharmaceuticals in the environment by extrapolation from human therapeutic data., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 61, 261-275
- Shi H, Suna Z, Liub Z, Xuec Y, 2012., Effects of clotrimazole and amiodarone on early development of amphibian (*Xenopus tropicalis*), *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94 (1), 128-135
- Simões R, Bernardes C, Diogo H, Agapito F, Piedade MM, 2013., Energetics and Structure of Simvastatin, *Mol. Pharmaceutics*, 10 (7), 2713-2722
- Solé M & Sanchez-Hernandez JC, 2015., An *in vitro* screening with emerging contaminants reveals inhibition of carboxylesterase activity in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 169, 215-222
- Speijer D, Manjeri GR, Szklarczyk R, 2014., How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369 (1646)

- Šrut M, Traven L, Štambuk A, Kralj S, Žaja R, Mićović V, Klobučar GI, 2011., Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicol. in Vitro* 25, 308-314
- Stankiewicz A, Giebułtowicz J, Stankiewicz U, Wroczyński P, Nałęcz-Jawecki G, 2015., Determination of selected cardiovascular active compounds in environmental aquatic samples-methods and results, a review of global publications from the last 10 years. *Chemosphere* 138, 642-656
- Steinbach C, Fedorova G, Prokes M, Grabicova K, Machova J, Grabic R, Valentova O, Kroupova HK, 2013., Toxic effects, bioconcentration and depuration of verapamil in the early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Science of the Total Environment* 461-462, 198-206
- Van de Peer Y, Taylor JS, Joseph J, Meyer A, 2002., Wanda: a database of duplicated fish genes, *Nucleic Acids Research*, Volume 30, Issue 1, Pages 109-112
- Verdecchia P, Reboldi G, Angeli F, Gattobigio R, Bentivoglio M, Thijs L, Staessen J, Porcellati C, 2005., Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Calcium Channel Blockers for Coronary Heart Disease and Stroke Prevention, *Hypertension* 46, 386-392
- Vishnolia KK, Hoene C, Tarhbalouti K, Revenstorff J, Aherrahrou Z, Erdmann J, 2020., Studies in Zebrafish Demonstrate That CNNM2 and NT5C2 Are Most Likely the Causal Genes at the Blood Pressure-Associated Locus on Human Chromosome 10q24.32, *Front. Cardiovasc. Med.* 7, 135
- Walker CH, Sibly RM, Hopkin SP, Peakall DB, *Principles of Ecotoxicology*, 2012., Fourth Edition, CRC Press
- Wang TJ, Ramachandran SV, 2005., Epidemiology of uncontrolled hypertension in the United States, *Circulation* 112, 1651-1662
- Wezel AP, Opperhuizen A, 1995., Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Critical Reviews in Toxicology* 25, 255-279
- Wilkinson JL, Hooda PS, Swinden J, Barker J, Barton S, 2017., Extraction Optimisation for Pharmaceuticals, Illicit Drugs, Plasticisers, Perfluorinated Compounds and Metabolites from River Sediment, Biofilm, Plants and Benthic Organisms
- Yang Y, 2015., Contaminants in the Urban Environment. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) Part 2, University of Florida Extension
- Zhang K, Zhao Y, Fent K, 2020., Cardiovascular drugs and lipid regulating agents in surface waters at global scale: Occurrence, ecotoxicity and risk assessment, *Science of the Total Environment* 729, 138770
- Zhang XX, Zhang T, Fang HH, 2009., Antibiotic resistance genes in water environment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(3), 397-414
- Zhu XY, Wu SQ, Guo SY, Yang H, Xia B, Li P, Li CQ, 2018., A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents, *Zebrafish* 15,3
- Zoeller RT, Crofton KM, 2000., Thyroid hormone action in fetal brain development and potential for disruption by environmental chemicals. *Neurotoxicology* 21, 935-945

Mrežni izvori:

URL 1: <https://halmed.hr/kardiovaskularni-lijekovi> (pristupljeno 12.4.2021.)

URL 2: <https://halmed.hr/potrosnja/kardiovaskularni-lijekovi> (pristupljeno 26.4.2021.)

URL 3: <https://halmed.hr/potrosnjaliijekova/antiaritmici> (pristupljeno 14.4.2021.)

URL 4: <https://clincalc.com/DrugStats/EPC/Antiarrhythmic> (pristupljeno 1.2.2021.)

URL 5: <https://halmed.hr/verapamil> (pristupljeno 15.4.2021.)

URL 6: <https://halmed.hr/amiodaron> (pristupljeno 16.4.2021.)

URL 7: <https://halmed.hr/potrosnjaliijekova/hipolipemici> (pristupljeno 16.4.2021.)

URL 8: <https://halmed.hr/simvastatin> (pristupljeno 17.4.2021.)

URL 9: <https://halmed.hr/potrosnjaliijekova/antihipertenzivi> (pristupljeno 18.4.2021.)

URL 10: <https://halmed.hr/ramipril> (pristupljeno 20.4.2021.)

URL 11: <https://www.tfh.com/articles/freshwater/danio-rerio> (pristupljeno 1.3.2021.)

## ŽIVOTOPIS

### Edukacija

2019. – 2021. Diplomski studij Ekologije i zaštite prirode, modul Kopnene vode,  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2016. – 2019. Preddiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu
2012. – 2016. Srednja škola „Ban Josip Jelačić“  
Opća gimnazija, Zaprešić

### Stručno iskustvo

2020. Praktikant u toksikološkom laboratoriju  
Institut Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala  
Laboratorij za biotehnologiju u akvakulturi, Zagreb
2019. Praktikant u mikrobiološkom laboratoriju  
Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“  
Odjel za bakteriologiju, Zagreb
2019. Praktikant u molekularno-dijagnostičkom laboratoriju  
Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“  
Odjel za molekularna ispitivanja, Zagreb
2018. Praktikant u biokemijskom i mikrobiološkom laboratoriju  
Opća bolnica Karlovac, Odjel za kliničku mikrobiologiju, Zagreb