DARYA HARSHKOVA, ANNA AKSMANN

*Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
E-mail: anna.aksmann@biol.ug.edu.pl
darya.harshkova@phdstud.ug.edu.pl*

ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA NIESTEROIDOWYMI LEKAMI PRZECIWPALNYMI NA PRZYKŁADZIE DIKLOFENAKU – PRZYCZYNY, SKUTKI, BIOINDYKACJA*

NLPZ W ŚRODOWISKU

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (niesteroidowe leki przeciwzapalne, NLPZ, NSLPZ) to liczna, niejednorodna grupa leków przeciwzapalnych, przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Nazywane są niesteroidowymi ze względu na swoją strukturę chemiczną, odmienną od kortykosteroidów, innych leków mających właściwości przeciwzapalne (BUER 2014). NLPZ należą do najczęściej stosowanych obecnie leków, ze względu na swoje działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne (BACSI i współaut. 2016). Podstawowym mechanizmem działania NLPZ w organizmach zwierzęcych jest hamowanie aktywności cyklooksygenaz (COX), a tym samym zablokowanie konwersji kwasu arachidonowego lub kwasu eikozapentaenowego do prostaglandyn, hormonów tkankowych zaliczanych do mediatorów odczynu zapalnego (GILRON i współaut. 2003, BACSI i współaut. 2016) (Ryc. 1).

Najbardziej popularne NLPZ to: diklofenak, ibuprofen, kwas acetylosalicylowy, piroksydam, ketoprofen lub naproksen, chociaż statystyki ich stosowania w poszczególnych krajach znacznie się różnią (HUDEC i współaut. 2008, 2012; MIJATOVIC i współaut. 2010). Obecnie leki te są tak powszechnie stosowane w medycynie i weterynarii, że stanowią coraz większe zagrożenie dla środowiska naturalnego. NLPZ wykrywane są w środowisku najczęściej w niskich stężeniach

(od $1 \text{ ng} \times \text{dm}^{-3}$ do $1 \text{ mg} \times \text{dm}^{-3}$) (BRAIN i wsp. 2008) (Tabela 1), które jednak mogą mieć istotny wpływ na ekosystemy wodne i lądowe. Substancje te zawierają pierścienie aromatyczne, które są trudno degradowane, co znacząco wpływa na okres półtrwania NLPZ w środowisku (HE i współaut. 2017).

NLPZ mogą dostawać się do środowiska z różnych źródeł, a najczęściej są to ścieki z fabryk produkujących farmaceutyki, ścieki komunalne ze szpitali, przychodni i lecznic weterynaryjnych oraz gospodarstw domowych (BRAIN i współaut. 2008). Oczyszczanie ścieków z reguły obejmuje kombinację metod fizycznych, chemicznych i biologicznych, a wydajność usuwania zanieczyszczeń różni się w zależności od zastosowanego procesu, charakteru zanieczyszczeń i wpływu czynników zewnętrznych (FENG i współaut. 2013). Niestety, nawet oczyszczalnie ścieków wykorzystujące procesy mikrobiologiczne do usuwania związków azotu, fosforu i innych zanieczyszczeń organicznych, z reguły nie radzą sobie z farmaceutykami, dlatego duży odsetek tych substancji przedostaje się do zbiorników wodnych (PAÍGA i współaut. 2013). Na losy NLPZ w środowisku wpływają różne parametry charakteryzujące dany ekosystem, takie jak: temperatura, pH, nasłonecznienie, właściwości jonowymienne gleby, ilość materii organicznej, ilość i skład gatunkowy biomasy i jej potencjał biodegradacyjny (SCHULZE i współaut. 2010). Po przedostaniu się do środowiska, NLPZ mogą

Słowa kluczowe: bioindykacja, *Chlamydomonas reinhardtii*, diklofenak, niesteroidowe leki przeciwzapalne, NLPZ

*Publikacja finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki UMO-2016/23/B/NZ9/00963.

Ryc. 1. Mechanizm działania NLPZ (na podstawie GILRON i współaut. 2003).

COX-1 – cyklooksygenaza 1 (konstytutywna); COX-2 – cyklooksygenaza 2 (indukowalna); PGG2, PGH2, PGE2, PGI2, PGD2, PGF2-alfa – grupy prostaglandyn; TXA2 – tromboksan A2.

być adsorbowane na powierzchni cząstek stałych gleby lub osadów dennych zbiorników wodnych. Z jednej strony zmniejsza to ich biodostępność, co jest korzystne dla organizmów zamieszkujących dany ekosystem, z drugiej jednak prowadzi do akumulacji NLPZ i ich stopniowego uwalniania do otoczenia (ZENKER i współaut. 2014). NLPZ mogą być także przekształcane w różnorodne pochodne w wyniku działania czynników abiotycznych (głównie promieniowania słonecznego) i biotycznych (działalność bakterii i grzybów), prowadzących do izomerizacji/epimeryzacji, hydrolizy i utleniania cząsteczek NLPZ (RADJENOVIC i współaut. 2008, CARR i współaut. 2011, DOMARADZKA i współaut. 2015). W szlakach mikrobiologicznej biotransformacji farmaceutyków najczęściej uczestniczą monoooksygenazy typu cytochromu P450 i dioksygenazy, lakaza, peroksydaza ligninowa i peroksydaza manganowa (GUZIK i współaut. 2013, TRAN i i współaut. 2013) (Ryc. 2), jednak dotychczasowe informacje o biodegradacji NLPZ są wciąż bardzo

ograniczone. Zauważyć należy, że zarówno same leki, jak i produkty ich przemian są znaczącym elementem zanieczyszczeń środowiska wodnego (ZIYLAN i INCE 2011). Wykazano niejednokrotnie, że produkty pośrednie rozkładu NLPZ charakteryzują się większą toksycznością, niż związki macierzyste (GUZIK i współaut. 2013, CARACCILO i współaut. 2015).

SKUTKI ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA NLPZ

Obecne w wodach NLPZ, dzięki swojej tendencji do bioakumulacji, są poważnym zagrożeniem dla wszystkich poziomów troficznych łańcuchów pokarmowych. Jako substancje biologicznie aktywne zaprojektowane do działania w niskich stężeniach, środki farmaceutyczne w środowisku naturalnym mogą mieć niekorzystny wpływ na organizmy „niedocelowe” z powodu ich długotrwałego narażenia na daną substancję. Przykładem skutków toksyczności chronicz-

Tabela 1. Przykłady NLPZ wykrywanych w środowisku wodnym.

Substancja (CAS)	Miejsce poboru prób analitycznych	Zakres notowanych stężeń (ng × dm ⁻³)	Literatura
Kwas acetylosalicylowy (50-78-2)	rzeka Samosz (Rumunia)	30–37,2	SANTOS i współaut. 2010
Diklofenak (15307-79-6)	rzeka Höje (Szwecja)	10-120	SANTOS i współaut. 2010
	rzeka Mersey (Wielka Brytania)	195	THOMAS i HILTON 2004
	rzeka Tamiza (Wielka Brytania)	57-125	THOMAS i HILTON 2004
	rzeki Rhône i Saône (Francja)	290-410	FERRARI i współaut. 2004
	zatoka Guanabara Bay (Brazylia)	Okolo 100	STUMPF i współaut. 1999
	jezioro Greifensee (Szwajcaria)	1-9	BUSER i współaut. 1998
	rzeka Aabach (Szwajcaria)	11-310	BUSER i współaut. 1998
	rzeka Łaba (Czechy)	1080	MARSIK i współaut. 2017
	rzeka Fyris (Szwecja)	25-170	DANESHVAR i współaut. 2010
	rzeka Jen-Wen (Tajwan)	50	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Lao-Jie (Tajwan)	24	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Tour-Chyan (Tajwan)	62	CHEN i CHENG 2009
Ibuprofen (15687-27-1)	rzeka Łaba (Niemcy)	70-87	WINKLER i współaut. 2001
	rzeka Fyris (Szwecja)	13-87	DANESHVAR i współaut. 2010
	rzeka Lao-Jie (Tajwan)	12	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Jen-Wen (Tajwan)	30	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Tour-Chyan (Tajwan)	28	CHEN i CHENG 2009
Ketoprofen (22071-15-4)	rzeka Łaba (Czechy)	929,8	MARSIK i współaut. 2017
	rzeka Tour-Chyan (Tajwan)	400	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Lao-Jie (Tajwan)	110	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Jen-Wen (Tajwan)	620	CHEN i CHENG 2009
	rzeka Fyris (Szwecja)	10-163	DANESHVAR i współaut. 2010
Naproksen (22204-53-1)	18 słodkowodnych źródeł (Brazylia)	20-40	STUMPF i współaut. 1999
	rzeka Łaba (Czechy)	1423,8	MARSIK i współaut. 2017
	rzeka Fyris (Szwecja)	6-130	DANESHVAR i współaut. 2010
	rzeka Ebro (Hiszpania)	20	LÓPEZ-SERNA i współaut. 2013

nej mogą być: anomalie rozwojowe, zaburzenia metaboliczne (w tym endokrynologiczne) czy zaburzenia funkcji rozrodczych organizmów lądowych i wodnych (SANTOS i współaut. 2010). Wysoką bioakumulację NLPZ wykazano na przykładzie wielu gatunków ważnych gospodarczo skorupiaków i ryb, co ma bezpośrednie odniesienie do zdrowia i życia ludzkiego. W badaniach tych duża uwaga skupiona jest na diklofenaku (CRANE i współaut. 2006, SANTOS i współaut. 2010, ZENKER i współaut. 2014), uważanym za jeden z najbardziej toksycznych NLPZ (SANTOS

i współaut. 2010). Ostra toksyczność diklofenaku była badana m.in. metodą szacowania stopnia hamowania mobilności dwóch skorupiaków: *Daphnia magna* i *Ceriodaphnia dubia*. Wyznaczone w tym teście wartości EC_{50/48} (ang. 50% effective concentration estimated after 48h exposure) wynosiły odpowiednio 224,30 i 22,704 µg × dm⁻³ (FERRARI i współaut. 2003). Z kolei badanie śmiertelności zarodków słodkowodnego danio pregowanego (*Danio rerio*, Cyprinidae) traktowanego przez 10 dni diklofenakiem pozwoliło wykazać, że chroniczna toksyczność tego

Ryc. 2 Mikrobiologiczna transformacja NLPZ na przykładzie diklofenaku (na podstawie DOMARADZKA i współaut. 2015).

leku nie jest tak wysoka; LOEC (ang. lowest observed effect concentration) dla tych ryb wynosił $8000 \mu\text{g} \times \text{dm}^{-3}$ (FERRARI i współaut. 2003). Pamiętać jednak należy, że diklofenak, tak jak inne NLPZ, ma zdolność do bioakumulacji, co wykazano m.in. w przypadku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) (ZENKER i współaut. 2014). Obecność diklofenaku wykryto u tego organizmu w nerkach, wątrobie, mięśniach i skrzelach, przy czym BCF (ang. bioconcentration factor) różnił się znacznie w zależności od badanego organu, dawki leku i czasu ekspozycji. Co ciekawe, choć największe ilości diklofenaku akumulowały się w wątrobie, zmiany histopatologiczne obserwowano przede wszystkim w nerkach i skrzelach (SCHWAIGER i współaut. 2004). U zwierząt mających długotrwały kontakt ze środowiskiem wodnym, jak np. wydra rzeczna (*Lutra sp.*), diklofenak w formie niezmienionej wykrywany jest często w sierści (RICHARDS i współaut. 2011), jednak u większości zwierząt, które pobierają diklofenak głównie drogą pokarmową, wykrywane są przede wszystkim jego pochodne (LONNAPAN i współaut. 2016).

Spektakularnym przykładem toksycznego działania diklofenaku pobieranego wraz z pożywieniem są badania dotyczące drastycznego spadku liczebności populacji kilku gatunków sępów (*Gyps*) występujących w Indiach, Pakistanie i Nepalu (PAIN i współaut. 2008). Stopniowe zmniejszanie się liczebności populacji tych ptaków, które rozpoczęło się w latach 90. XX w., okazało się być skutkiem powszechnego stosowania diklofenaku w medycynie weterynaryjnej. Szczegółowe

badania wykazały, że stężenie tego leku w tkankach padłego bydła, stanowiącego podstawę pożywienia sępów, jest wystarczające, aby wywołać efekty nefrotoksyczne prowadzące do śmierci ptaków (PAIN i współaut. 2008). Efektem tych badań było wprowadzenie przez rządy Indii, Nepalu i Pakistanu (w latach 2005-2008), a następnie Bangladeszu (2010 r.) regulacji prawnych dotyczących ograniczenia produkcji i użycia diklofenaku w celach weterynaryjnych (PAIN i współaut. 2008, LONNAPAN i współaut. 2016). Wyniki tych badań przyczyniły się również do narastania obaw dotyczących zagrożenia zdrowia człowieka przez niekontrolowane przedostawanie się diklofenaku i innych NLPZ do organizmu wraz ze spożywanym pokarmem (rybami i mięsem zwierząt hodowlanych) oraz wodą pitną. W latach 90. ubiegłego wieku przeprowadzono serię badań, obejmujących wskaźniki toksykologiczne i farmakologiczne, a dotyczących ryzyka zachorowania na nowotwory i choroby nienowotworowe wskutek ekspozycji na NLPZ (SCHULMAN i współaut. 2002). Analiza danych wskazywała, że nie występuje ryzyko zagrożenia dla ludzi, gdyż wykryte stężenia leków były znacznie niższe od wartości niebezpiecznych. Biorąc jednakże pod uwagę rosnącą produkcję i konsumpcję NLPZ, ich ciągły dopływ do ekosystemów, istniejące dane o zanieczyszczeniu wód gruntowych i powierzchniowych tymi związkami oraz ich potencjał bioakumulacyjny, nie sposób dziwić się powracającym obawom dotyczącym zdrowia publicznego i zaleceniom monitorowania środowiska pod kątem obecności NLPZ i skutków ich

działania (HE i współaut. 2017). Szczególną wagę przykładu się do substancji, które ze względu na niską podatność na degradację nie są wydajnie usuwane przez oczyszczalnie ścieków. Do substancji takich należy diklofenak, którego obecność stwierdzana jest w wodzie oraz osadach dennych zbiorników śródlądowych (LONAPPAN i współaut. 2016). Wykrycie tego leku w wielu ujęciach wody pitnej (GROS i współaut. 2010) spowodowało, że w 2013 r. został on umieszczony przez Komisję Europejską na liście substancji objętych koniecznością monitorowania (ang. EU Water Framework Directive) (LONAPPAN i współaut. 2016). Zgodnie z założeniami EQS (ang. Environmental Quality Standards of Europe), dopuszczalne stężenie tej substancji w wodach słodkich wynosi obecnie $0,1 \mu\text{g} \times \text{dm}^{-3}$, natomiast w wodach słonych $0,01 \mu\text{g} \times \text{dm}^{-3}$ (LONAPPAN i współaut. 2016). Niezależnie od ustaleń Komisji Europejskiej, niektóre kraje Europy wprowadziły lokalne regulacje uwzględniające niebezpieczeństwo zanieczyszczenia środowiska NLPZ; np. w Wielkiej Brytanii diklofenak znajduje się na „liście substancji priorytetowych”, zobowiązującej przemysł do opracowania technologii usuwania tego typu zanieczyszczeń ze ścieków. Jednak poza lokalnymi ustaleniami, w skali globalnej nie ma jednoznacznych przepisów regulujących produkcję, konsumpcję i kontrolę uwalniania NLPZ do środowiska (LONAPPAN i współaut. 2016).

BIOINDYKACJA W OCENIE RYZYKA ZWIĄZANEGO Z TOKSYCZNOŚCIĄ NLPZ

Konieczność monitorowania ilości i skutków działania NLPZ dostających się do ekosystemów związana jest z dwoma aspektami badań środowiskowych. Oznaczanie stężeń farmaceutyków w glebie, wodzie, osadach i tkankach organizmów żywych bazuje na zaawansowanych metodach analitycznych, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC) i spektrometria mas (MS) (CALDERÓN-PRECIADO i współaut. 2009). Nieodzownym uzupełnieniem takich badań jest bioindykacja, metoda badań ekotoksykologicznych, pozwalająca określić jakościowo podstawowe własności środowiska na podstawie reakcji bioindykatorów (KOMAROV 1983). Mianem bioindykatorów określa się zazwyczaj ściśle zdefiniowane gatunki roślin, zwierząt czy mikroorganizmów, jednak bioindykatorami mogą być także całe populacje lub ekosystemy. Aby ujednolicić badania bioindykacyjne i umożliwić porównanie wyników uzyskiwanych przez różne grupy badawcze, międzynarodowe organizacje związane z ochroną środowiska (ang. Organisation for Economic

Co-operation and Development, OECD; International Organization for Standardization, ISO; European Food Safety Authority, EFSA) opracowały szereg standardów toksykologicznych, wśród których ważną rolę odgrywają testy oparte na organizmach wskaźnikowych należących do jednokomórkowych glonów planktonowych lub makrofity, takich jak *Lemna minor* (OECD 2002, ISO 2004, EFSA 2005). Testy te rekomendowane są między innymi do monitorowania dostających się do środowiska substancji określanych jako „contaminants of emerging concern” (CECs) (EPA 2008a, b). CECs to substancje potencjalnie niebezpieczne, wykrywane w środowisku od stosunkowo niedawna, a w związku z tym nie posiadające jeszcze norm dopuszczalnych stężeń ani dokładnie opisanego mechanizmu działania toksycznego. Do substancji takich zaliczono również farmaceutyki i ich metabolity (EPA 2008a, b).

Dzięki wspomnianym standardowym testom toksykologicznym wykazano, że NLPZ stanowią rzeczywiste zagrożenie dla organizmów wodnych (BRAIN i współaut. 2008, SANTOS i współaut. 2010). Zauważono jednak, że poszczególne organizmy wskaźnikowe różnią się istotnie wrażliwością na działanie badanych substancji (Tabela 2).

Porównanie wrażliwości różnych grup systematycznych pozwoliło wykazać, że zielenice planktonowe i cyjanobakterie są bardziej wrażliwe na działanie NLPZ niż bakterie (BACSI i współaut. 2016). I tak np. znaczną toksyczność diklofenaku i ibuprofenu wykazano stwierdzając hamowanie tempa wzrostu populacji zielenic *Desmodesmus communis*, *Haematococcus pluvialis* i *Cryptomonas ovata*, natomiast cyjanobakterie *Synechococcus elongatus* i *Cylindrospermopsis raciborskii* były na te substancje mniej wrażliwe (BACSI i współaut. 2016). Wykazano także, że diklofenak i ibuprofen hamują silnie wzrost populacji innego organizmu wskaźnikowego, rzęsy drobnej *Lemna minor* (SANTOS i współaut. 2010). Standardowe testy toksykologiczne z wykorzystaniem bakterii (*Vibrio fischeri*), glonów (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Selenastrum capricornutum*), bezkręgowców (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*) i ryb (*Danio rerio*) wykazały, że diklofenak należy do najbardziej niebezpiecznych związków farmaceutycznych dostających się do środowiska wodnego (FERRARI i współaut. 2003). Co ciekawe, mimo iż w testach glonowych pobieranie farmaceutyków przez komórki wydaje się być ograniczone ze względu na krótki czas ekspozycji i adsorpcję części substancji na powierzchni ścian komórkowych, wyniki wskazują na największą toksyczność ostrą diklofenaku właśnie w odniesieniu do glo-

Tabela 2. Przykłady wartości parametrów toksykologicznych uzyskanych podczas badań wpływu diklofenaku na organizmy wodne.

Grupa organizmów	Gatunek	Parametr	Wartość	Literatura
Bakterie	<i>Vibrio fischeri</i>	EC _{50/30min} (inhibicja oddychania)	13,5 mg × dm ⁻³	BACSI i współaut. 2016
Głony	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EC _{50/1h} (inhibicja fotosyntezy)	1776 mg × dm ⁻³	PINO i współaut. 2016
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	EC _{50/53h} (reprodukcja)	0,48 mg × dm ⁻³	SCHMITT-JANSEN i współaut. 2007
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	EC ₅₀ (inhibicja wzrostu)	71,9 mg × dm ⁻³	CLEUVERS 2004
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC _{50/96h} (inhibicja wzrostu)	185 mg × dm ⁻³	DELORENZO i FLEMING 2008
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	LOEC _{96h} (inhibicja wzrostu)	0,02 mg × cm ⁻³	FERRARI i współaut. 2003
Rośliny wyższe	<i>Lemna minor</i>	EC _{50/7d} (inhibicja wzrostu)	7,5 mg × dm ⁻³	SANTOS i współaut. 2010
	<i>Lactuca sativa</i>	EC ₅₀ (inhibicja kiełkowania)	>1000 mg × dm ⁻³	PINO i współaut. 2016
		EC ₅₀ (inhibicja wzrostu pędu)	562 mg × dm ⁻³	PINO i współaut. 2016
		EC ₅₀ (inhibicja wzrostu korzenia)	877 mg × dm ⁻³	PINO i współaut. 2016
Bezkęgowce	<i>Daphnia magna</i>	EC _{50/48h} (immobilizacja)	68 mg × dm ⁻³	CLEUVERS 2004
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	NOEC _{48h} (reprodukcja)	12,5 mg × dm ⁻³	FERRARI i współaut. 2003
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	EC _{50/48h} (immobilizacja)	22 mg × dm ⁻³	FERRARI i współaut. 2003
Ryby	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LOEC _{28d} (histopatologiczna analiza wątroby)	5 mg × dm ⁻³	TRIEBSKORN i współaut. 2004
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LOEC _{28d} (histopatologiczna analiza nerek)	5 mg × dm ⁻³	TRIEBSKORN i współaut. 2004
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LOEC _{28d} (histopatologiczna analiza przewodu pokarmowego)	5 mg × dm ⁻³	SCHWAIGER i współaut. 2004
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LOEC _{28d} (histopatologiczna analiza budowy skrzelii)	5 mg × dm ⁻³	SCHWAIGER i współaut. 2004
	<i>Oryzias latipes</i>	LOEC _{9d} (zachowania żywieniowe)	1 mg × dm ⁻³	NASSEF i współaut. 2010
	<i>Danio rerio</i>	NOEC _{10d} (reprodukcja)	4 mg × dm ⁻³	FERRARI i współaut. 2003

EC₅₀ – stężenie substancji wywołujące 50%-owe obniżenie wartości badanego parametru. LOEC – najniższe stężenie substancji wywołujące widoczne obniżenie wartości badanego parametru. NOEC – najwyższe stężenie substancji nie wywołujące widocznego obniżenia wartości badanego parametru.

nów (FERRARI i współaut. 2003, BRAUSCH i współaut. 2012).

Opisane rozbieżności we wrażliwości bioindykatorów na działanie farmaceutyków skłaniają badaczy do poszukiwania przyczyn toksyczności tych substancji na poziomie subkomórkowym. Niestety, większość roślinnych organizmów bioindykatorowych jest słabo opisana na poziomie biochemicznym i molekularnym. Obiecującym organizmem jest tutaj *Chlamydomonas reinhardtii*, który może być organizmem modelowym w analizie toksykologicznej na poziomie populacyjnym, komórkowym, biochemicznym i molekularnym. *C. reinhardtii* to organizm jednokomórkowy, kształtem zbliżony do kuli (Ryc. 3). Posiada jeden duży, centralnie położony chloroplast, plamkę oczną oraz dwie wici służące do poruszania się i rozpoznawania gamet. Jest to organizm często spotykany w powierzchniowych wodach słodkich i glebie. *C. reinhardtii* od dawna jest wykorzystywany jako modelowy organizm do badania podstawowych zagadnień biologii komórki i biologii molekularnej, takich jak poruszanie się organizmów wiciowych, reakcja na światło, rozpoznawanie się gamet, reakcja komórki na zmiany stężenia podstawowych pierwiastków biogennych (węgiel, azot, siarka), szlaki metaboliczne komórek roślinnych, rytmy okołodobowe czy przebieg cyklu komórkowego i chloroplastowego (HARRIS 2009, MATUSIAK-MIKULIN i współaut. 2006). Zsekwencjonowanie genomu *C. reinhardtii* pozwoliło wykazać, że struktura genomu jądrowego i chloroplastowego wykazuje więcej cech wspólnych z genomami roślin wyższych niż prostych eukariontów (MERCHANT i współaut. 2007, MATUSIAK-MIKULIN i współaut. 2006) i umożliwiło przeniesienie badań na poziom molekularny. *C. reinhardtii* jest obecnie wykorzystywany również w badaniach toksykologicznych (AKSMANN i współaut. 2014), gdyż oprócz zalet klasyfikujących go jako organizm modelowy w badaniach podstawowych, organizm ten ma cechy organizmu wskaźnikowego, do których należą: powszechność występowania w środowisku, łatwość hodowli w laboratorium, możliwość synchronizacji wzrostu populacji poprzez zastosowanie prostych zabiegów hodowlanych (np. odpowiednio dobrany cykl światło/ciemność), wrażliwość na czynniki stresowe. Wykazano wielokrotnie, że *C. reinhardtii* spełnia powyższe wymagania i jest dobrym obiektem badań nad skutkami stresu (HEMA i współaut. 2006).

Badania odpowiedzi komórek *C. reinhardtii* na abiotyczne czynniki stresowe obejmują klasyczne reakcje wzrostowe (redukcja gęstości populacji), reakcje na poziomie fizjologiczno-biochemicznym (przebieg procesu fotosyntezy i oddychania, zawartość barw-

Ryc. 3. Komórka *Chlamydomonas reinhardtii*, szczep dziki cc-1690 (*Chlamydomonas Resource Center*, USA), pochodząca z hodowli prowadzonej w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego (mikroskop świetlny, powiększenie 10 x 100). Zdjęcie wykonała Pani dr Małgorzata Kapusta (Katedra Cytologii i Embriologii Roślin UG).

ników fotosyntetycznych, stężenie malondialdehydu (MDA), aktywność wybranych enzymów) oraz zmiany na poziomie transkrypcji i translacji genów (HEMA i współaut. 2007, AKSMANN i współaut. 2014). Nie jest zatem zaskakujące, że *Chlamydomonas* zyskuje coraz większą popularność w badaniach ekotoksykologicznych (BEAUVAIS-FLÜCK i współaut. 2017). Prace opisujące możliwości wykorzystania *Chlamydomonas* w badaniach toksyczności substancji takich jak diklofenak, cyprofloksacyna, triklosan czy karmazepina (BRAIN i współaut. 2008, PINO i współaut. 2016, XIONG i współaut. 2016) są na razie nieliczne, wskazują jednak wyraźnie na rosnące zainteresowanie wykorzystaniem tego organizmu jako bioindykatora zanieczyszczeń środowiska farmaceutykami.

PODSUMOWANIE

Farmaceutyki i ich metabolity stają się coraz większym zagrożeniem dla środowiska, gdyż są w sposób ciągły odprowadzane ze ściekami przemysłowymi i komunalnymi. Jako substancje biologicznie aktywne zaprojektowane do działania w niskich stężeniach, środki farmaceutyczne, w tym NLPZ, w środowisku naturalnym mogą wywierać niekorzystny wpływ na organizmy „niedocelowe”, a dzięki swojej tendencji do bioakumulacji są poważnym zagrożeniem dla wszystkich poziomów troficznych łańcuchów pokarmowych, w tym potencjalnie dla zdrowia człowieka. Jednym z najniebezpieczniej-

szych NLPZ wykrywanych obecnie w środowisku jest diklofenak. W skali globalnej nie ma w tej chwili jednoznacznych przepisów regulujących produkcję, konsumpcję i kontrolę uwalniania diklofenaku do środowiska, jednak powstaje coraz więcej lokalnych aktów prawnych dotyczących potrzeby monitorowania jego ilości w środowisku i szacowania skutków działania. Nieodzowne są zatem precyzyjne metody bioindykacyjne, obejmujące organizmy różnych taksonów oraz różne poziomy organizacji życia, od ekosystemu do poziomu molekularnego. Oprócz standardowych organizmów wskaźnikowych, coraz więcej uwagi poświęca się jednokomórkowej zielenicy planktonowej *Chlamydomonas reinhardtii*. Wydaje się, że badania z wykorzystaniem tego organizmu mogą dostarczyć wartościowych informacji na temat toksycznego działania diklofenaku i innych NLPZ na komórki glonów i roślin wyższych, a *C. reinhardtii* może stać się powszechnie wykorzystywanym organizmem wskaźnikowym, o nie do końca jeszcze odkrytym potencjale bioindykacyjnym.

PODZIĘKOWANIA

Autorki składają podziękowania Pani dr Małgorzacie Kapuście z Katedry Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego, za wykonanie i udostępnienie zdjęć komórek *C. reinhardtii*.

Streszczenie

Obecne w wodach niesteroidowe leki przeciwbólowe (NLPZ) są zagrożeniem dla wszystkich poziomów troficznych łańcuchów pokarmowych, również dla zdrowia człowieka. Ze względu na ciągły dopływ NLPZ do ekosystemów, istniejące dane o zanieczyszczeniu wód gruntowych i powierzchniowych tymi związkami oraz ich potencjał bioakumulacyjny, istnieje potrzeba monitorowania środowiska pod kątem obecności NLPZ i skutków ich działania. Nieodzownym elementem badań środowiskowych jest bioindykacja, pozwalająca określić podstawowe własności środowiska na podstawie reakcji organizmów wskaźnikowych (bioindykatorów). Jednym z najniebezpieczniejszych NLPZ wykrywanych obecnie w środowisku jest diklofenak. Wykazano toksyczność tego związku w stosunku do zwierząt kregowych (ptaki, ryby) i bezkręgowych, a także roślin i glonów. Rozbieżności we wrażliwości bioindykatorów na działanie diklofenaku wymuszają poszukiwanie przyczyn jego toksyczności na poziomie subkomórkowym. Niestety, większość roślinnych organizmów bioindykatorowych jest słabo opisana na poziomie biochemicznym i molekularnym. Obiecującym organizmem jest tutaj *Chlamydomonas reinhardtii*, który może być organizmem modelowym w analizie toksykologicznej na poziomie populacyjnym, komórkowym, biochemicznym i molekularnym.

LITERATURA

- AKSMANN A., POKORA W., BAŚCIK-REMISIEWICZ A., DETTLAFF-POKORA A., WIELGOMAS B., DZIA-
DZIUSZKO M., TUKAJ Z., 2014. *Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of Chlamydomonas reinhardtii cells under acute exposure to cadmium and anthracene*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 110, 31-40.
- BACSI I., B-BERES V., KOKAI ZS., SANDOR G., NOVAK Z., SANDOR A. N., VASAS G., 2016. *Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages*. *Environ. Pollut.* 212, 508-518.
- BEAUVAIS-FLÜCK R., SLAVEYKOVA V. I., COSIO C., 2017. *Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 7, 1-12.
- BRAIN R. A., HANSON M. L., SOLOMON K. R., BROOKS B. W., 2008. *Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks*. [W:] *Reviews of environmental contamination and toxicology*. PIM de V. (red.). Springer, New York, 67-115.
- BRÄUSCH J. M., CONNORS K.A., BROOKS B.W., RAND G.M., 2012. *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing*. *Rev. Environ. Contaminat. Toxicol.* 218, 1-99.
- BUER J. K., 2014. *Origins and impact of the term 'NSAID'*. *Inflammopharmacology* 22, 263-267.
- BUSER H. R., POIGER T., MÜLLER M. D., 1998. *Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake*. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3449-3456.
- CALDERÓN-PRECIADO D., JIMÉNEZ-CARTAGENA C., PEÑUELA G., BAYONA J. M., 2009. *Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination*. *Analyt. Bioanal. Chem.* 394, 1319-1327.
- CARACCILO A. B., TOPP E., GRENNI P., 2015. *Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review*. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 106, 25-36.
- CARR D. L., MORSE A. N., ZAK J. C., ANDERSON T. A., 2011. *Microbially mediated degradation of common pharmaceuticals and personal care products in soil under aerobic and reduced oxygen conditions*. *Water Air Soil Pollut.* 216, 633-642.
- CHEN L. S., CHENG L., 2009. *Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (Malus domestica Borkh.) leaves than in fruit peel*. *Photosynthetica* 47, 112-120.
- CLEUVERS M., 2004. *Mixture toxicity of anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309-315.
- CRANE M., WATTS C., BOUCARD T., 2006. *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*. *Sci. Total Environ.* 367, 23-41.
- DANESHVAR A., SVANFELT J., KRONBERG L., WEYHENMEYER G. A., 2010. *Winter accumulation of acidic pharmaceuticals in a Swedish river*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 908-916.
- DELORENZO M. E., FLEMING J., 2008. *Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 203-210.
- DOMARADZKA D., GUZIK U., WOJCISZYŃSKA D., 2015. *Biodegradation/biotransformation of po-*

- lycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. Rev. Environ. Sci. Biotechnol 14, 229-239.
- EFSA, 2018. EFSA. Scientific panel on plant protection products and their residues. Question N° EFSA-Q-2012-00960. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5377.
- EPA, 2008a. Advisory on Aquatic Life Water Quality Criteria for Contaminants of Emerging Concern. EPA-SAB-09-007. U.S. EPA, Washington, D.C.
- EPA, 2008b. White paper: aquatic life criteria for contaminants of emerging concern. US EPA, Washington, D.C.
- FENG L., HULLEBUSCH E. D., RODRIGO M. A., ESPOSITO G., OTURAN M. A., 2013. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. Chem. Eng. J. 228, 944-964.
- FERRARI B., PAXEUS N., LO GIUDICE R., POLLIO A., GARRIC J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotoxicol. Environ. Safety 55, 359-370.
- GILRON I., MILNE B., HONG M., 2003. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Postoperative Pain Management. Curr. Evidence Future Direc. Anesthesiol. 11, 1198-1208.
- GROS M., PETROVIC M., GINEBRED A., BARCELO D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. Environ. Int. 36, 15-26.
- GUZIK U., HUPERT-KOCUREK K., MAZUR A., WOJCISZYŃSKA D., 2013. Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna 1, 105-112.
- HARRIS E. N., 2009. The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. Academic Press, Vol. 1, Oxford, UK.
- HE B., WANG J., LIU J., HU X., 2017. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. Chemosphere 181, 178-189.
- HEMA R., SENTHIL-KUMAR M., SHIVAKUMAR S., CHANDRASEKHARA REDDY P., UDAYAKUMAR M., 2007. Chlamydomonas reinhardtii, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. Planta 226, 655-670.
- HUDEC R., KRISKA M., BOZEKOVA L., FOLTAN V., 2008. Comparison of NSAID consumption in Slovakia, Finland and Norway. Bratisl. Lekarske Listy 109, 370.
- ISO, 2004. Water quality - Fresh algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2004.
- HUDEC R., BOZEKOVA L., TISOVA J., 2012. Consumption of three most widely used analgesics in six European countries. J. Clin. Pharm. Ther. 37, 78-80.
- KOMAROV I., 1983. Bioindication method of assessing environmental quality. Feldsher Akush. 48, 43-46 (po rosyjsku).
- LONAPPAN L., BRAR S. K., DAS R. K., VERMA M., SURAMPALLI R. Y., 2016. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity-A review. Environ. Int. 96, 127-138.
- LÓPEZ-SERNA R., JURADO A., VÁZQUEZ-SUÑÉ E., CARRERA J., PETROVIĆ M., BARCELÓ D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. Environ. Pollut. 174, 305-315.
- MARSIK P., REZEK J., ZIDKOVA M., KRAMULOVA B., TAUCHEN J., VANEK T., 2017. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic. Chemosphere 171, 97-105.
- MATUSIAK-MIKULIN K., TUKAJ C., TUKAJ Z., 2006. Relationships between growth, development and photosynthetic activity during the cell cycle of *Desmodesmus armatus* (Chlorophyta) in synchronous cultures. Europ. J. Phycol. 41, 29-38.
- MERCHANT S. S., PROCHNIK S. E., VALLON O., HARRIS E. H., KARPOWICZ S.J., WITMAN G.B. i współaut., 2007. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science 318, 245-250.
- MIJATOVIĆ V., CALASAN J., HORVAT O., SABO A., TOMIC Z., RADULOVIC V., 2010. Consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Serbia: a comparison with Croatia and Denmark during 2005-2008. Eur. J. Clin. Pharmacol., 1-5.
- NASSEF M., MATSUMOTO S., SEKI M., KHALIL F., KANG I. J., SHIMASAKI Y., OSHIMA Y., HONJO T., 2010. Acute effects of ticlozan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). Chemosphere 80, 1095-1100.
- OECD, 2002. Revised proposal for a new guideline 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the testing of chemicals. Washington, DC.
- PAIGA P., 2013. Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 2410-2420.
- PAIN D., BOWDEN C., CUNNINGHAM A., CUTHBERT R., DAS D., GILBERT M., GREEN R., 2008. The race to prevent the extinction of South Asian vultures. Bird Conserv. Int. 18, 30-48.
- PINO M. R., MUÑIZ S., VAL J., NAVARRO E., 2016. Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 22530-22541.
- RADJENOVIĆ J., PETROVIĆ M., VENTURA F., BARCELÓ D., 2008. Rejection of pharmaceuticals in nanofiltration and reverse osmosis membrane drinking water treatment. Water Res. 42, 3601-3610.
- RICHARDS N. L., 2011. First detection of an NSAID, flunixin, in sheep's wool using GC-MS. Environ. Pollut. 159, 1446-1450.
- SANTOS L., ARAÚJO A. N., FACHINI A., PENNA A., DELERUE-MATOS C., MONTENEGRO M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. J. Hazard. Mater. 175, 45-95.
- SCHMITT-JANSEN M., BARTELS P., ADLER N., ALTENBURGER R., 2007. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1389-1396.
- SCHULMAN L. J., SARGENT E. V., NAUMANN B. D., FARIA E. C., DOLAN D. G., WARGO J. P., 2002. A human health risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic environment. Human Ecol. Risk Assess. 8, 657-680.
- SCHULZE T., WEISS S., SCHYMANSKI E., CARSTEN VON DER OHE P., SCHMITT-JANSEN M., ALTENBURGER R., STRECK G., BRACK W., 2010. Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. Environ. Pollut. 158, 1461-1466.
- SCHWABERGER J., FERLING H., MALLOW U., WINTERMAYR H., NEGELE R. D., 2004. Toxic effects of

- the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141-150.
- STUMPF M., TERNES T.A., WILKEN R.D., RODRIGUES S.V. BAUMANN W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 135-141.
- THOMAS K. V., HILTON M. J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollut. Bull.* 49, 436-444.
- TRAN N. H., URASE T., NGO H. H., HU J., ONG S. L., 2013. Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresour. Technol.* 146, 721-731.
- TRIEBSKORN R., CASPER H., HEYDA A., EIKEMPER R., KOHLER H.-R., SCHWAIGER J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills, and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68, 176-183.
- WINKLER M., LAWRENCE J. R., THOMAS R., 2001. Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. *Wat. Res.* 35, 3197-3205.
- XIONG J. Q., KURADE M. B., ABOU-SHANAB R. A., JI M. K., CHOI J., KIM J. O., JEON B. H., 2016. Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresour. Technol.* 205, 183-190.
- ZENKER A., CICERO M. R., PRESTINACI F., BOTTONI P., CARERE M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 133, 378-387.
- ZIYLAN A., INCE N. H., 2011. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. *J. Hazard. Mat.* 187, 24-36.

KOSMOS Vol. 68, 1, 185–194, 2019

DARYA HARSHKOVA, ANNA AKSMANN

Department of Plant Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Gdansk, 59 Wita Stwosza Str., 80-308 Gdańsk,
E-mail: anna.aksman@biol.ug.edu.pl, darya.harshkova@phdstud.ug.edu.pl

ENVIRONMENTAL POLLUTION BY NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS – DICLOFENAC AS AN EXAMPLE

Summary

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) present in water environment can be dangerous to all levels of trophic food chains, including human health. Due to the continuous inflow of NSAIDs to ecosystems, existing data on contamination of environment with these compounds and their bioaccumulation potential, there is a need to monitor the environment for the presence of NSAIDs and their toxicity. An indispensable element of environmental research is bioindication, which allows to determine basic properties of an environment on the basis of responses of model bioindicators. One of the most toxic NSAIDs in the environment is diclofenac. Discrepancies in the sensitivity of bioindicators to diclofenac enforce a search for the causes of its toxicity at the subcellular level. The promising model indicator organism is *Chlamydomonas reinhardtii*, which can be used for toxicological analysis at the population, cellular, biochemical and molecular level. Studies of this organism can provide valuable information on the diclofenac toxicity towards algae and plants.

Key words: bioindication, *Chlamydomonas reinhardtii*, diclofenac, non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs