

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
HIDROBIOLOĢIJAS KATEDRA

FARMACEITISKO LĪDZEKĻU POTENCIĀLĀ
IETEKME UZ ŪDENS ORGANISMIEM

Maģistra darbs

Autors: Žanna Gribanova
Stud. apl. Nr. zg15010
Darba vadītājs: asoc. prof., Dr. biol. Maija Balode

RĪGA 2020

Kopsavilkums

Pēdējos gados strauji pieaug vides piesārņojums ar farmaceitiskiem savienojumiem. Tie ir potenciāli bioaktīvi un var būtiski ietekmēt ūdens kvalitāti un ūdens organismus, tomēr par daudziem farmaceitiskiem savienojumiem eko-toksikoloģiskā informācija ir nepilna vai pilnībā iztrūkst.

Pētījums tika veikts ar mērķi noteikt plaši pielietojamu un ekotoksikoloģijā maz pētītu farmaceitisko produktu potenciālo ietekmi uz ūdens organismiem. Darba gaitā ir noskaidrotas preparātu LC₅₀, EC₅₀, LOEC un NOEC vērtības.

Eksperimenta rezultāti parādīja, ka attiecībā uz ūdens organismiem testētiem preparātiem akūtos testos toksiskais efekts ir novērojams koncentrāciju robežās no 10 līdz 100 mg·l⁻¹. Hroniskos testos inhibējošais efekts tika novērots pie ievērojami mazākām koncentrācijām (0,25 – 13 mg·l⁻¹). Ar visaugstāko toksiskumu izceļas preparāti, kas satur sulpirīdu (antidepresants), ipidakrīnu (NS stimulators) un hlorpiramīnu (pretalerģijas līdzeklis). Farmaceutisko līdzekļu pastāvīga nokļūšana ūdenstilpēs var samazināt vēžveidīgo vairošanās spējas vai dzīvotspēju, kā arī inhibēt aļģu augšanu, īpaši farmaceitisko rūpnīcu notekūdeņu izplūdes vietās.

Atslēgas vārdi: farmaceitiskie līdzekļi, potenciālais toksiskums, vēžveidīgo biotesti, aļģu biotesti.

Summary

Environmental pollution with pharmaceuticals has been growing rapidly in recent years. They are potentially bioactive and may have a significant effect on water quality and aquatic organisms, but eco-toxicological information is incomplete or non-existent for many pharmaceuticals.

The study was performed to determine the potential effects of widely used and in ecotoxicology little studied pharmaceutical products on aquatic organisms. In the course of the work, the LC₅₀, EC₅₀, LOEC and NOEC values of the products were determined.

The results of the experiment showed that for aquatic organisms toxic effects were observed in concentrations ranging from 10 to 100 mg·l⁻¹ in acute tests. In chronic tests, the inhibitory effect was observed at significantly lower concentrations (0.25 - 13 mg·l⁻¹). Pharmaceutical products containing sulpiride (antidepressant), ipidacrine (NS stimulant) and chloropyramine (antiallergic) stand out with the highest toxicity. The persistent release of pharmaceuticals into water bodies can reduce the reproductive capacity or viability of crustaceans and inhibit algal growth, especially at the outlets of pharmaceutical plants.

Key words: pharmaceuticals, potential toxicity, crustacean biotests, algal biotests.

Saturs

Ievads	6
1. Literatūras apskats	8
1.1. Aktīvie farmaceitiskie savienojumi	8
1.2. Farmaceutisko vielu nonākšana ūdens vidē.....	8
1.3. Ūdeņos izplatītākās farmaceitiskās vielas	11
1.4. Virszemes ūdeņos esošo farmaceitisko vielu ietekme uz ūdens organismiem.....	12
1.5. Farmaceutisko vielu toksiskuma noteikšanas metodes	16
1.6. Eko-toksicitātes testu būtība un testorganismu apraksts	17
1.6.1. Planktonaļģu izmantošana biotestēšanā. Testorganismu zaļāļģu <i>Desmodesmus communis</i> raksturojums	18
1.6.2. Kladoцерu izmantošana eko-toksicitātes testos. <i>Daphnia magna</i> vispārīgs raksturojums	19
1.6.3. <i>Artemia salina</i> apraksts un izmantošana eko-toksicitātes testos	20
2. Materiāli un metodes	22
2.1. Testētie farmaceitiskie produkti	22
2.2. Izmantotie standarttesti un testa koncentrāciju izvēle	23
2.2. Zaļāļģu augšanas inhibēšanas testa īss apraksts	24
2.2.1. <i>Desmodesmus communis</i> kultivēšana	24
2.2.2. Zaļāļģu augšanas inhibēšanas testa veikšana.....	26
2.3.3. Iegūto datu apstrāde un EC ₅₀ vērtības iegūšana	27
2.4. <i>Daphnia magna</i> Straus kustību inhibēšanas testa īss apraksts	28
2.4.1. <i>D. magna</i> organismu audzēšana	28
2.4.2. <i>Daphnia magna</i> Straus kustību inhibēšanas testa veikšana.....	28
2.4.3. Datu apstrāde un LC ₅₀ vērtības iegūšana.....	30
2.5. <i>A. salina</i> imobilizācijas testu īss apraksts.....	30
2.6. <i>D. magna</i> reprodukcijas testa īss apraksts	31
2.6.1. <i>D. magna</i> reprodukcijas testa veikšana	31
2.6.2. Datu apstrāde un rezultātu iegūšana	33
2.7. Testorganismu jutības pārbaude	33
3. Rezultāti un diskusija.....	34
3.1. Testorganismu jutības pārbaude	34
3.2. Aļģu augšanas inhibēšanas testu rezultāti	35

3.3. <i>Daphnia magna</i> Straus kustību inhibēšanas testu rezultāti	40
3.4. <i>Artemia salina</i> kustību inhibēšanas testu rezultāti	43
3.5. <i>Daphnia magna</i> reprodukcijas testu rezultāti	45
3.6. Iegūto datu kvalitātes izvērtēšana	47
3.7. Testēto farmaceitisko produktu akūtā toksiskuma salīdzinājums	48
3.8. Farmaceutisko preparātu hroniskā toksiskuma salīdzinājums.....	51
3.9. Farmaceutisko vielu izraisītā potenciālā ietekme uz ūdens organismiem	52
5. Pateicības.....	57
6. Literatūras saraksts	58

Pielikumi

Ievads

Pēdējās desmitgadēs ir strauji attīstījusies farmaceitisko līdzekļu rūpniecība, pieaudzis medikamentu patēriņš un līdz ar to palielinājusies potenciāli toksisko vielu noplūde ūdeņos (Agerstrand *et al.* 2015). HELCOM (2017) atskaitē par ekoloģisko kvalitāti Baltijas jūrā īpaši uzsvēta farmaceitisko vielu ietekme uz jūrā esošajiem organismiem. Šīs vielas, nonākot ūdens ekosistēmā, var ietekmēt tajā esošu organismu dzīvotspēju un vairošanos (Santos *et al.* 2010). Slāpekli un fosforu saturošās farmaceitiskās vielas var paātrināt eitrofikācijas procesu, kas savukārt palielinās potenciāli toksisko aļģu masveida savairošanās risku (Pomati *et al.* 2008).

Ekotoksikoloģijā ūdens kvalitātes kontrolei un saglabāšanai ir svarīgi noteikt ne tikai toksisko vielu reālās koncentrācijas ūdenstilpēs vai notekūdeņu izplūdes vietās, bet arī šo vielu tiešo ietekmi uz ūdens organismiem, ko ir iespējams noteikt, izmantojot biotestēšanu. Šī metode paredz dažādu dažādu test-organismu izmantošanu. Visbiežāk izmantotie testobjekti ir mikroskopiskās viensūnas aļģes (piemēram, zaļāļģes *Desmodesmus sp.* un *Chlorella sp.*), kā arī zooplanktona organismi (piemēram, *Daphnia magna*). Viena no galvenajām biotestēšanas priekšrocībām ir tās integrētais raksturs un tiešās ietekmes noteikšana uz konkrētām organismu grupām (Amiard-Triquet 2015).

Darba mērķis: noteikt plaši pielietojamu un ekotoksikoloģijā maz pētītu farmaceitisko produktu potenciālo ietekmi uz ūdens organismiem.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi:**

- veikt plaši pielietojamu un maz pētītu farmaceitisko produktu akūtā toksiskuma pārbaudi, veicot sekojošus akūtos testus: *Daphnia magna* Straus imobilizācijas testu, imobilizācijas testu ar *Artemia salina* un aļģu augšanas inhibēšanas testu ar *Desmodesmus communis*;
- veikt hronisko *Daphnia magna* reprodukcijas testu, lai pārlicinātos par ietekmi uz vēžveidīgo reprodukcijas spējām;
- noteikt testēto preparātu subletālās, efektīvās mediālās koncentrācijas, NOEC un LOEC attiecībā pret minētiem testorganismiem;
- veikt farmaceitisko līdzekļu toksiskuma un testorganismu jutības salīdzināšanu;
- novērtēt farmaceitisko līdzekļu potenciālo ietekmi uz saldūdens un sāļūdens vēžveidīgiem, kā arī iesālā ūdens zaļāļģi.

Darba novitāte: tika noteikta un salīdzināta iepriekš nepētītu sulpirīdu, hlōrpīramīnu un ipīdakrīnu saturošu farmaceitisku līdzekļu potenciālā ietekme uz divu trofisko līmeņu testorganismiem, papildināta eko-toksikoloģiskā informācija par metformīnu, doksiciklīnu,

diklofenaku, paracetamolu, amoksicilīnu un ibuprofēnu saturošiem preparātiem, izmantojot akūtā un hroniskā toksiskuma testus.

Par maģistra darbā iekļautajiem rezultātiem ir ziņots trijās konferencēs, kā arī iesniegts abstrakts dalībai konferencē un pilna raksta publicēšanai 12th Eastern European Young Water Professionals Conference (IWA YWP 2020), kas tika pārcelts no 2020. gada maija uz 2020. gada septembri COVID-19 Ārkārtējās situācijas dēļ.

Konferenču ziņojumi:

Gribanova Ž., Balode M. 2020. Farmaceitisko preparātu akūtā un hroniskā toksiskuma ietekme uz *Daphnia magna* un *Desmodesmus communis*. - Grām.: Latvijas ūdeņu vides pētījumi un aizsardzība. Latvijas Universitātes 78. Zinātniskās konferences Rakstu krājums, 24. janvāris, Rīga, Latvija: 21-23.

Gribanova Ž., Balode M. 2018. Farmakoloģisko līdzekļu izplatība hidroekosistēmās un to potenciālā ietekme uz ūdens organismiem. – Grām.: Latvijas ūdeņu vides pētījumi un aizsardzība. Latvijas Universitātes 76. Zinātniskās konferences Rakstu krājums, 30. janvāris, Rīga, Latvija: 19-21.

Gribanova Z. Balode M. 2019. Potential effects of pharmaceuticals on aquatic organisms. – In: Proceedings of the Seventh International Conference on Environmental management, Engineering, Planning and Economics CEMERE 2019 and SECOTOX Conference, May 19-24, Mykonos island, Greece: 98.

1. Literatūras apskats

1.1. Aktīvie farmaceitiskie savienojumi

Farmaceutisko produktu galvenā sastāvdaļa ir aktīvā farmaceitiskā viela jeb AFV (angl. API, active pharmaceutical ingredient). Pēc Pasaules Veselības organizācijas definīcijas AFV ir viela vai vielu kombinācija, kas paredzēta farmaceitiskai darbībai vai kurām ir tieša iedarbība slimību diagnostikā, ārstēšanā un profilaksē, atjaunojot, koriģējot vai modificējot cilvēka fizioloģiskās funkcijas (World Health Organization 2011). Tas nozīmē, ka aktīvie farmaceitiskie savienojumi ir bioloģiski aktīvi savienojumi, kas ir izstrādāti ar specifisku molekulāro mehānismu, caur kuru tie sasniedz bioloģisko efektu. Šī savienojumu izstrāde balstās uz zināšanām par bioloģiskiem procesiem organismā.

Tiek definēti četri galvenie farmaceitisko savienojumu piesaistes mērķi: receptori, enzīmi, transporteri un jonu kanāli. Ietekmējot regulatorās molekulas, šie savienojumi aktivē vai inhibē noteiktus bioloģiskos procesus, lai sasniegtu nepieciešamo terapeitisko efektu (Rang *et al.* 2015; Katzung 2012). Nonākot cilvēka vai dzīvnieka organismā, aktīvais farmaceitiskais savienojums iziet vairākus būtiskus procesus: absorbciju, izplatīšanos, metabolismu un elimināciju (caur ekskreciju). Šo aktīvo farmaceitisko savienojumu īpašībām (īpaši farmakokinētiskām un farmakodinamiskām), kas ir saistītas ar paša savienojuma ķīmisko dabu, ir būtiska loma savienojumu biopieejamībā gan mērķa organismu ķermenī, gan arī vēlāk vidē, kurā tās nonāk (Agerstrand *et al.* 2015; Kuster and Adler 2014).

1.2. Farmaceutisko vielu nonākšana ūdens vidē

Kaut gan par farmaceitiskām vielām ūdens vidē bija pirmo reizi ziņots vēl pirms 1970-jiem gadiem (Jones *et al.* 2005 cit. pēc Thrupp 2016), līdz 1990-jiem šī tēma par farmaceitiskiem līdzekļiem kā svarīgu vides piesārņotāju saņēma maz uzmanības, neskatoties uz pieaugošu pielietojumu visā pasaulē (Agerstrand *et al.* 2015). Mūsdienās ūdens piesārņojums ar dažādiem organismiem bīstamiem savienojumiem ir viena no ekoloģijas problēmām, kas pievērš daudzus pētnieku uzmanību visā pasaulē. Bez farmaceitiskām vielām piesārņojumu var izraisīt dažādas izšķīdušās gāzes, smagie metāli, organiskie piesārņotāji (Agarwal 2005).

Pēdējās divās desmitgadēs pieauga farmaceitisko preparātu industriālā ražošana, investīcijas, pārdošana un patēriņš Eiropas Savienībā. ES tirgus palielinājās no 48 milj. EUR

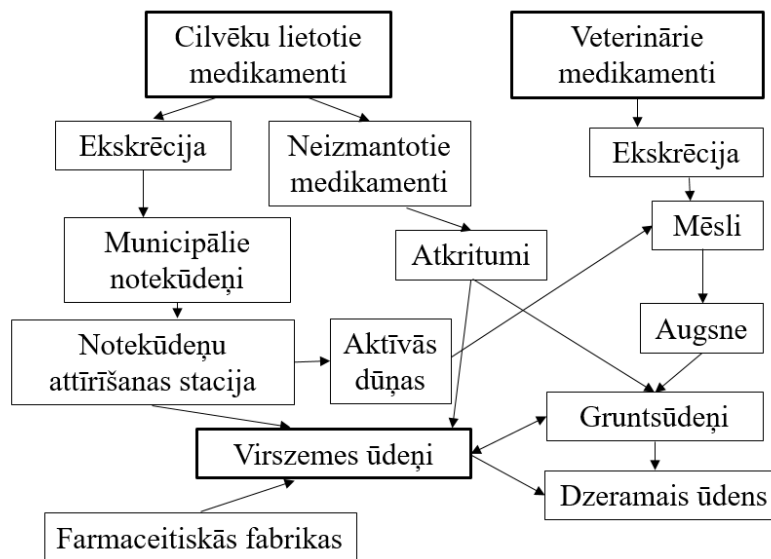
1990. gadā līdz 172 milj. EUR 2007. gadā un uz 2014. gadu sasniedza jau 242 milj. EUR. Eiropas Savienībā reģistrēto farmaceitisko savienojumu skaits sastāda 3000. Cilvēkiem paredzēto farmaceitisko līdzekļu patēriņa kategorijā Eiropas Savienība aizņem otro vietu (24% no pasaules kopējā patēriņa), savukārt pirmo aizņem ASV (BIO Intelligence Service 2013). Ķīnā 2013. gadā kopējais antibiotiku patēriņš sasniedzis 162 tonnas (Luo *et al.* 2010). Vācijā metformīnu, paracetamolu, ibuprofēnu saturošu preparātu patēriņš pārsniedz 80 tonnas gadā un kopā sastāda gandrīz 40% no kopējā (Kuster and Adler 2014).

Farmaceutisko līdzekļu pieaugošs patēriņš ir novedis pie tā, ka būtiski palielinājusies šo vielu koncentrācija NAI (notekūdeņu attīrīšanas iekārtās) ieplūstošajos un izplūstošajos ūdeņos globālā līmenī un tiek prognozēts, ka arī turpinās pieaugt (Pomati *et al.* 2008; Tilgalis 2004). Daļa no šīm vielām tiek degradēta, bet daļa tomēr nonāk upēs un ezeros, jo bioloģiskās attīrīšanas process nenodrošina to eliminēšanu. Tā, piemēram, Itālijā NAI praktiski nenodrošina efektīvu notekūdeņu atbrīvošanu pat no ļoti bīstamām farmaceitiskām vielām. Kā parāda pētījumi, NAI efektivitāte ir mazāka par 40% (augstākā efektivitāte sasniedz 64%) (Pomati *et al.* 2008; Ternes 1998; Stumpf *et al.* 1999; Khan and Ongerth 2005). Attīrīšanas pakāpe daudziem bieži lietotiem farmaceitiskiem savienojumiem ir noteikta un ir atzīta par neefektīvu un nepietiekošu. Piemēram, notekūdeņu attīrīšanas pakāpe no preparāta karbamazepīna un diklofenaka attiecīgi sastāda aptuveni 8% un 17% (Heberer 2002).

Notekūdeņu attīrīšanas efektivitāte ir atkarīga no daudziem faktoriem: katras vielas ķīmiskās dabas, attīrīšanas metodes, aktīvo dūņu vecuma, apkārtējās vides parametriem (piemēram, gadalaika) un no notekūdeņu īpašībām (O'Brien and Dietrich 2004). Dažas no vairs neaktīvām AFV, izejot caur NAI, var tikt pārveidotas atpakaļ aktīvajā formā (Heberer 2002). Ne tikai komunālo saimniecību, bet arī ķīmisko rūpniecību notekūdeņi ir svarīgi lokāli ūdens piesārņojuma avoti ar farmaceitiskām vielām. Tā, piemēram, attīstošās valstīs kā Indija industrija vēl netiek efektīvi un stingri regulēta, tāpēc farmaceitiskās rūpniecības atkritumu nonākšana vidē ir bieža parādība (Fick *et al.* 2009). Uzlabojot šo uzņēmumu lokālo notekūdeņu attīrīšanas iekārtu efektivitāti var ievērojami samazināt šo savienojumu nokļūšanu ūdens ekosistēmās (Zuccato *et al.* 2000; Pomati *et al.* 2008), tomēr pagaidām trūkst informācijas par to, kāda ir efektīvākā metode to degradācijai notekūdeņu attīrīšanas iekārtās.

Notekūdeņi ir atzīti par lielāko šī piesārņojuma avotu, kas rada pastāvīgas kaitīgo vielu noplūdes. Simtiem tonnu AFV var nonākt notekūdeņu attīrīšanas iekārtās (NAI) katru gadu (Khan and Ongerth 2004; Tilgalis 2004), tomēr tas nav vienīgais vides piesārņojuma avots (1. attēls). Aktīvās farmaceitiskās vielas var nokļūt ūdens ekosistēmās dažādos ceļos, piemēram, tieši (ar fēcēm vai urīnu). Nederīgi farmaceitiskie preparāti vai medikamenti ar

izbeigušos derīguma termiņu bieži netiek pareizi utilizēti un nonāk sadzīves atkritumos. Farmaceutisko līdzekļu klātbūtne virszemes ūdeņos, attīrītajos notekūdeņos (Cui *et al.* 2006), virszemes ūdeņos, gruntsūdeņos, piekrastes ūdeņos, augsnē un pat dzeramajā ūdenī ir vairākkārt pierādīta (Fent *et al.* 2006; Beek *et al.* 2016; Fick *et al.* 2010; Petrie *et al.* 2013). ASV, Kanādas, Vācijas un Francijas **dzeramā ūdens avotos** šīs vielas sasniedz **ng/l** koncentrācijas (Ternes and Joss 2006 cit. pēc Pomati *et al.* 2008; Brunstackelchet *et al.* 2005; Zuehlke *et al.* 2004; Stackelberg *et al.* 2004).



1. attēls. Galvenie ūdens vides farmaceutisko vielu un produktu avoti un ceļi (tulkots) (Heberer 2002).

Figure 1. Major sources and pathways of pharmaceuticals and pharmaceutical products to the aquatic environment (translated) (Heberer 2002).

Pastāvīgās slikti attīrīto notekūdeņu noplūdes noved pie tā, ka daudzas bieži izmantojamas farmaceutiskās vielas, kā, piemēram, paracetamols, diklofenaks, kofeīns u.c. ir atrodamas virszemes ūdeņos (upēs, ezeros un jūrās) koncentrācijās no **ng/l** līdz **µg/l** (Calamari *et al.* 2003 cit. pēc Pomati *et al.* 2008; Zuccato 2004; Heberer 2002; Khan and Ongerth 2005). Tādās blīvi apdzīvotās valstīs kā Vācija apkārtnē šo vielu koncentrācijas sasniedz **0,1-10 µg/L** (Bergmann *et al.* 2011 cit. pēc Thrupp 2016; Küster and Adler 2014).

Farmaceutisko līdzekļu klātbūtne Vidusjūrā (Gracia-Lor *et al.* 2012) un Dzeltenajā jūrā noteikta pat 400 m attālumā no krasta (Hester 2016). Farmaceutiskās vielas ir konstatētas 71 valsts ūdeņos, aptverot visus kontinentus. Tā, piemēram, populārākais pretiekaisuma līdzeklis diklofenaks ir konstatēts 50 valstu virszemes ūdeņos (Beek 2016). Ūdenī pastāvīgi konstatējamās farmaceutiskās vielas ir no visdažādākajām terapeitiskām klasēm un šo

savienojumu daudzums pārsniedz 300, pie tam Vācijas Federālās Vides aģentūras (UBA) pārskatā ir norādīts, ka 131 AFV ir konstatēta Vācijas ūdeņos (Pomati *et al.* 2008; Bergmann *et al.* 2011 cit. pēc Thrupp 2016).

Šo līdzekļu klātbūtne konstatēta arī Latvijas ūdeņos, piemēram, SIA "Rīgas ūdens" Bioloģiskās attīrīšanas stacijas "Daugavgrīva" aerācijas baseina aktīvajās dūņās (Muter *et al.* 2017 cit. pēc Dāvids 2017).

Grūti noārdāms vai pārāk augsts piesārņojums ir videi kaitīgs, jo ūdens pašattīršanās spējas ir ierobežotas. Liels piesārņojums izraisa baktēriju savairošanos, īpaši siltajos vasaras mēnešos, un noved pie ātra skābekļa patēriņa. Vairākas upes un ezeri Latvijā ir piesārņoti ar notekūdeņiem, īpaši Daugava pie Rīgas, Gauja pie Valmieras, Lielupe aiz Jelgavas. Piesārņots ir arī Rīgas jūras līcis. Gandrīz puse no visa notekūdeņu daudzuma Latvijā netiek attīrīta atbilstoši prasībām (COHIBA 2012). Latvija ir pievienojusies Starptautiskajai konvencijai par Baltijas jūras pasargāšanu no piesārņošanas. Šī konvencija paredz, ka visi notekūdeņi ir bioloģiski jātīra, ja šie notekūdeņi ieplūst ūdenstecēs vai tieši jūrā (Tilgalis 2004).

1.3. Ūdeņos izplatītākās farmaceitiskās vielas

Galvenie apdraudējumi gaidāmi no tādiem preparātiem, kurus visvairāk patērē. Tie ir hormonālie līdzekļi (piemēram, sintētiskie estradioli), antibiotikas (eritromicīns, amoksicilīns, ciprofloksacīns), pretsāpju un pretiekaisuma līdzekļi (acetaminofēns, naproksēns, diklofenaks, ibuprofēns), beta-blokatori (propranolols, metoprolols, nadolols u.c.), analģētiķi, nomierinošie līdzekļi, antiepileptiķi, asins lipīdu līmeni samazinošie preparāti, kas hidroekosistēmās dažkārt uzrāda augstas koncentrācijas (Muter *et al.* 2017 cit. pēc Dāvids 2017; Manzetti and Ghisi 2014; Maszkowska 2014; Agerstrand *et al.* 2015; Küster and Adler 2014; Fent *et al.* 2006; Santos *et al.* 2010). Piemēram, sintētiskie estradioli salīdzinoši lielos daudzumos ir konstatēti notekūdeņu izplūdes vietās Ķīnā (Cui *et al.* 2006) un ASV (Phillips *et al.* 2010) ne tikai mājstaimniecību, bet arī industriālo notekūdeņu izplūdes dēļ. Jūrās sastopamās izplatītākās farmaceitiskās vielas ir acetaminofēns (paracetamols), ibuprofēns, diklofenaks, eritromicīns, karbamazepīns u.c., kas var sasniegt ng/l un pat µg/l augstas koncentrācijas (Blasco *et al.* 2004).

Pēdējā laikā ir pieaudzis satraukums par pretvēža preparātiem. Vairāk nekā 50 antineoplastiskie savienojumi tiek izmantoti attīstītās pasaules slimnīcās. Šo savienojumu pielietošana arvien pieaug vēža slimību incidences palielināšanās dēļ globālās populācijas mērogā. Tagadējās prognozes liecina, ka pretvēža savienojumu pielietojums pieaugs par 10% katru gadu (Johnson *et al.* 2008).

Prioritāro vielu direktīva (2013/39/EU) iekļauj sarakstu ar augstas prioritātes savienojumiem monitoringam, uzraudzībai un regulēšanai. Direktīva darbojas kā Ūdeņu direktīvas jeb Water Framework Directive (2000/60/EC) un Vides kvalitātes standartu direktīvas jeb Directive on Environmental Quality Standards (2008/105/EC) grozījumi. Diklofenaks un 17-alfa-etinilestradiols ir iekļauti uzraudzības sarakstā, kas paredz pastāvīgu šo vielu koncentrāciju monitoringu (EU Directive 2013). Pastāvīgai farmaceitisko vielu noteikšanai ūdeņos ir būtiska nozīme, lai izvērtētu riskus un izstrādātu rīcības plānus. Piemēram, tiklīdz Vācijā tika uzsākta pirmspārdošanas priekšizpēte atbilstoši normatīvajām ssprasiņām, aptuveni 10% no farmaceitiskiem produktiem tika novērtēti kā potenciāli bīstami videi un tiem ir pievērsta daudz lielāka uzmanība (Kuster and Adler 2014).

1.4. Virszemes ūdeņos esošo farmaceitisko vielu ietekme uz ūdens organismiem

Bieži lietotie bezrecepšu preparāti gan ārstēšanai, gan slimību profilaksei var būt ļoti toksiski ūdens organismiem. Būtiska loma ir tieši aktīvās vielas farmakoloģiskai iedarbībai. Tā, piemēram, prethelminu preparāti ar fenbenzadolu un flubenzadolu, kas, saistoties ar β -tubulīnu un kavējot mikrocaurulīšu veidošanos parazītu intestinālajās šūnās, izraisa parazītu bojāeju, izceļas ar ļoti augstu toksiskumu. Fenbenzadola koncentrācija $19 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ izraisa 50%-īgu *D. magna* imobilizāciju akūtos testos (Wagil *et al.* 2015).

Daudzi cilvēkiem piemītoši receptori un enzīmi, kā arī metaboliskie ceļi pastāv arī ūdens organismiem, īpaši mugurkaulniekiem kā, piemēram, zivīm. Pastāv iespēja, ka farmaceitiskās vielas, kas paredzētas cilvēkiem, lielākā vai mazākā mērā nelabvēlīgi ietekmēs ūdens organismu sugas ar saglabājušos molekulārajām mērķstruktūrām. Gunnarsson *et al.* (2008) savā pētījumā ir atklājuši, ka *Danio rerio* zivīm, kas ir bieži izmantots testorganisms, atrasti 86% no 1318 cilvēka farmaceitisko preparātu mērķstruktūrām, kamēr *D. magna* tas ir 61% un viensūnas aļģēm *Chlamydomonas reinhardtii* – 35%. Organismi bieži vien ir pakļauti zemām farmaceitisko vielu koncentrācijām, tāpēc šo vielu toksiskums ar daudz mazāku iespējamību izpaudīsies terapeitiskās iedarbības dēļ.

Toksikums ūdens organismiem visbiežāk tiek noteikts ar standarttestu palīdzību un populārākām farmaceitiskām vielām kā paracetamols, diklofenaks, ibuprofēns ciprofloksacīns, amoksicilīns un eritromicīns un tml. (Clevers 2003; Yasser and Nabila 2015; Yasser and Adli 2015; Du *et al.* 2016; Pascoe 2003).

Anestētiķu (preparātu, kas tiek izmantoti anestēzijai) klātbūtne ūdenī var izraisīt cianobaktēriju „ziedēšanas” jeb savairošanās intensitātes pieaugumu vasaras sezonā (Pomati *et al.* 2006 cit. pēc Pomati *et al.* 2008). Ūdens bezmugurkaulniekiem farmaceitiskās vielas var

būt kaitīgas pat pie tādām koncentrācijām, kādas pašlaik novērojamas virszemes ūdeņos (Fent *et al.* 2006; Crane *et al.* 2006). Augstākie ūdens augi, kā, piemēram, ūdensziedi, izceļas ar lielāku jutīgumu pret ūdenī esošām farmaceitiskām vielām nekā aļģes un cianobaktērijas (Pomati *et al.* 2004 cit. pēc Pomati *et al.* 2008; Crane *et al.* 2006). Ir pamats domāt, ka ūdenī esošās farmaceitiskās vielas negatīvi ietekmē arī ūdens mugurkaulniekus – zivis, abiniekus, zīdītājus (Crane *et al.* 2006). Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu klāstā toksiskākais ir diklofenaks. Pēc akūto testu rezultātiem tā toksiskums ir mazāks par 100 mg/L, bet hronisko testu (28 dienas) rezultāti liecina, ka pie koncentrācijas 1 µg/L varavīksnes forelei ir novērotas aknu parenhīmas un žaunu izmaiņas. Tieši šādu koncentrāciju šis līdzeklis sasniedz Šveices un Beļģijas ūdeņos (Schwaiger *et al.* 2004 cit. pēc Santos *et al.* 2010).

Pētījumi *in vitro* ar AFV parāda, ka *Danio rerio* zivju aknu šūnām un cilvēka cilmes šūnām AFV maisījums ietekmē minēto šūnu fizioloģiju, morfoloģiju un attīstību. (Pomati *et al.* 2006, 2007 cit. pēc Pomati *et al.* 2008). Pretvēža preparātu patēriņa un ražošanas pieaugums ir atsevišķa problēma – daudzi antineoplastiskie preparāti kā blakusefektu demonstrē augstu toksiskumu. (Colvin 2003).

Īpaši apdraud ūdens organismus hormonālie preparāti, jo tie ietekmē ūdens bezmugurkaulnieku dzimumspējas. Tā, piemēram, 17α-etinilestradiols (EE2), kas ir kontraceptīvo medikamentu sastāvdaļa, sānpeldēm *Hyalella azteca* ietekmē androgēno dziedzeri, kas nosaka tēviņu dzimumpažīmes. Šī hormona ietekmē samazinās arī gnatopodu garums (Vandenbergh *et al.* 2002). Pētījumā par gūpiju *Poecilia reticulata* tēviņu konkurētspēju riesta laikā, 17α-etinilestradiola ietekmē, secināts, ka šis hormons ne tikai samazina mātīšu auglību un tēviņu konkurentsipēju, bet arī veicina feminizāciju (Kristensen *et al.* 2005). Negatīvais efekts ir konstatēts pat zemās koncentrācijās (ng/L) (Fick *et al.* 2010).

Vienas terapeitiskās klases farmaceitiskiem preparātiem toksiskums ūdens organismiem var atšķirties pat līdz 100 reizēm. Tā, piemēram, veterinārijā pielietojamās antibiotikas oksilīnskābes koncentrācija nogalina pusi no kladocerām *Daphnia magna* pie koncentrācijas 4,6 mg/L, bet, lai sasniegtu to pašu efektu, ir nepieciešama vismaz 480 mg/L streptomicīna un tilozīna koncentrācija. Pie vidēji 10 reizes zemākas koncentrācijas, bet hroniskas iedarbības šīs antibiotikas uz pusi samazināja dafniju vairošanās spējas (Wollenberger *et al.* 2000).

Eko-toksicitātes testi ar *Daphnia magna*, *Artemia salina* un *Scenedesmus quadricauda* parāda arī Latvijas municipālo un industriālo notekūdeņu toksiskumu. Pie kam industriāliem notekūdeņiem ir augstāks toksiskums, maksimālās vērtības sasniedzot rudens un ziemas sezonā. (Putna 2010).

Ir pierādīts, ka AFV klātbūtne virszemes, pazemes un dzeramajā ūdenī var negatīvi ietekmēt cilvēka veselību (Pomati *et al.* 2008). Tās var ietekmēt cilvēka šūnu fizioloģiju pat ļoti nelielās koncentrācijās (Pomati *et al.* 2006 cit. pēc Pomati *et al.* 2008), tāpēc farmaceitisko vielu klātbūtne dzeramajā ūdenī ir liela problēma. Pie tam, gandrīz nav informācijas par to, kāda ir farmaceitisko vielu maisījumu ietekme gan uz ūdens organismiem, gan uz cilvēka veselību, ja to koncentrācijas ir neliela, bet iedarbība - ilgstoša. (Khetan and Collins 2007 cit. pēc Pomati *et al.* 2008). Ilglaicīgo monitoringa programmu realizēšana ir apgrūtināta plaša farmaceitisko vielu spektra un vielu ķīmiskās dažādības dēļ. Sakarā ar to daudzās valstīs ir izveidoti bīstamāko vai visvairāk sastopamo, prioritāro, farmaceitisko vielu saraksti to pastāvīgai koncentrāciju kontrolei virszemes ūdeņos. Visbiežāk šīs vielas ir paracetamols, ciprofloksacīns, diklofenaks, ibuprofēns u.c. (Calamari *et al.* 2003 cit. pēc Pomati *et al.* 2008; Zuccato *et al.* 2000; Rabiet *et al.* 2006). Vācijā nepieciešamās analīzes veic tām vielām, kuras tiek saražotas lielos daudzumos: vismaz 10 tonnas gadā (Erickson 2002).

Farmaceutisko produktu rūpniecībā cenšas izgatavot tādus savienojumus, kuriem būtu lielāks ārstnieciskais efekts, biopieejamība un lielāka izturība pret degradāciju (Pomati *et al.* 2008). Ja runa ir par ūdenī nonākušiem savienojumiem, tad šīs īpašības tikai pastiprina negatīvo ietekmi uz organismiem. Daudzi farmaceitiskie savienojumi ir lipofili (taukos šķīstoši), jo izstrādāti, lai tie brīvi šķērsotu šūnu membrānas fosfolipīdu dubultslāni. Šiem savienojumiem raksturīgs augsts oktānola-ūdens sadalījuma koeficients (Octanol-Water Partition Coefficient). Savienojumiem, kuriem ir būtiski izšķīst asins plazmā šis koeficients ir zems (<10). Tas nozīmē, ka šie savienojumi paliek izšķīduši šķīdrajā fāzē, kamēr savienojumi ar augstu oktānola-ūdens sadalījuma koeficientu viegli saistās ar dūņām un viegli akumulējas ūdens organismos. Savienojuma hidrofilā daba ļauj tam ne tikai brīvi izšķīst ūdenī, bet arī kļūt pieejamam ūdenī esošiem organismiem (Halling-Sorenson *et al.* 1998; Yamamoto 2011). Daudzi farmaceitiskie savienojumi organismā tiek konjugēti glikuronidācijas un sulfonācijas procesā, kas palielina šo savienojumu šķīdību ūdenī un rezultātā izvadīšanas efektivitāti. Notekūdeņu attīrīšanas procesā konjugāti tiek veiksmīgi atdalīti no šīm molekulām, kas palielina aktīvās farmaceitiskās vielas atbrīvošanu un nonākšanu virszemes ūdeņos ar attīrītiem notekūdeņiem (Heberer 2002). Piemēram, ir pierādīts, ka organiskie steroīdie hormoni tiek veiksmīgi dekonjugēti jeb atbrīvoti notekūdeņu attīrīšanas ciklā, pateicoties enzīmam β -glikuridāzei, kas nokļūst ūdenī baktēriju darbības rezultātā (Jones *et al.* 2005 citēts pēc Thrupp 2016). Šī atšķirība farmaceitisko vielu ķīmiskajās īpašībās un terapeitiskajā

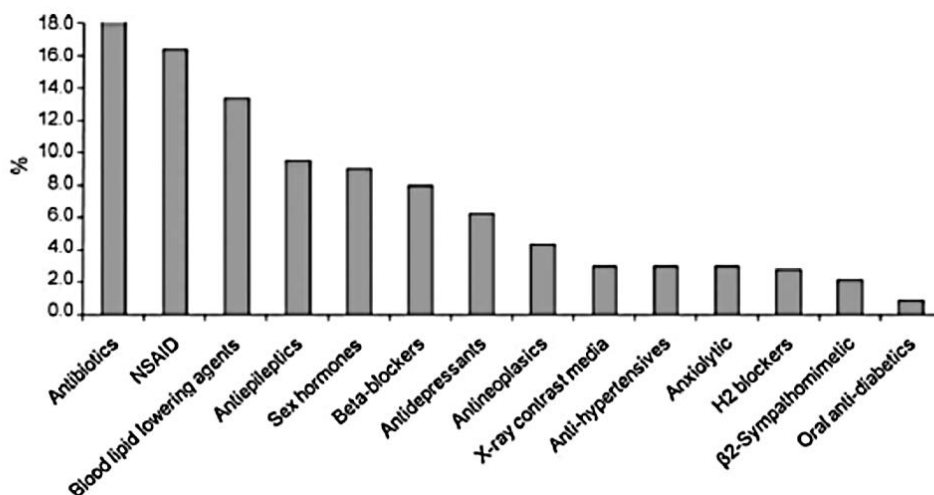
iedarbībā ir vieni no galveniem iemesliem, kāpēc svarīgi ir veikt eko-toksicitātes testus katram preparātam.

Neskatoties uz to, ka farmaceitisko vielu koncentrācijas virszemes ūdeņos ir nesalīdzināmi mazākas par to terapeitiskām dozām preparātos (daži mikrogrami uz litru ūdens), AFV kā jebkuras citas vielas var akumulēties dažādu trofisko līmeņu ūdens organismos. Jebkura AFV, kas ir izturīga pret degradāciju, var uzkrāties un sasniegt jau bioloģiski aktīvo koncentrāciju. Tādu bieži izmantojamo farmaceitisko līdzekļu kā eritromicīns, ciklofosfamīds, naproksēns, sulfametoksazols vai sulfasalazīns klātbūtne konstatēta vēl gadu pēc nokļūšanas ūdens vidē (Zuccato *et al.* 2004). Potenciālo risku novērtējums uz ekosistēmām no farmaceitisko vielu klātbūtnes ir tikai sākuma stadijā (Pomati *et al.* 2008).

Svarīgi, ka liela daļa no ūdens organismiem ilgstoši uzturas ar farmaceitiskām vielām piesārņotos ūdeņos, bet ir ļoti ierobežota informācija par šo vielu ilgtermiņa efektiem (Pomati *et al.* 2008; Quadra *et al.* 2017). Dziļākas izpētes laikā daudziem toksiskiem savienojumiem tiek atklāti organismu attīstību ietekmējošie efekti arī pie tādām koncentrācijām, kādas ir vidē un kuras līdz šim tika uzskatītas par nekaitīgām. Ir pārāk maz informācijas par AFV ilgstošo jeb hronisko ietekmi pie mazām koncentrācijām, īpaši ja tie atrodas ūdens vidē vairāku sintētisku piesārņotāju maisījumā (Khetan and Collins 2007). Pie tam, dažādiem preparātiem, kas ilgstoši jeb hroniski iedarbojas uz organismiem, ir arī izteikts mutagēnais efekts (Anway *et al.* 2005). Atsevišķi jāuzsver antibiotiku ietekme uz ūdens mikroorganismiem, jo tās var izraisīt rezistenci vairākām mikroorganismu grupām, arī NAI aktīvajās dūņās esošām baktērijām (Kummerer 2004; Dāvids 2017; Liu *et al.* 2019).

Eiropas Savienības Direktīva 2000/60/EC (EU Directive 2000) un tās papildinājumi 2006/11/EC (EU Directive 2006) un 2008/32/EC (EU Directive 2008) norāda uz visu ūdenstilpju aizsardzības nepieciešamību. Katru gadu tiek sintezēts simtiem jaunu terapeitisko savienojumu. Liela daļa no tiem tuvākajā laikā var pilnīgi aizvietot šobrīd plaši lietojamās farmaceitiskās vielas (Pomati *et al.* 2008). Likumdošana paredz, ka jebkuram jaunizveidotajam preparātam ir jāveic ietekmes uz vidi novērtējums (ES Direktīva 2001/83/EC). Neskatoties uz to, farmaceitiskiem līdzekļiem, kas jau tiek izmantoti vai ir zināmi jau diezgan ilgu laiku, šāds novērtējums nav veikts. Plaša informācija ir tikai par populārākām farmaceitisko vielu terapeitiskām klasēm (piemēram, antibiotikas, nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi) (2. attēls). Informācija par pārējo grupu eko-toksicitāti ir stipri ierobežota un dažkārt arī pilnībā iztrūkst - informācija par ietekmi uz vidi ir pieejama mazāk kā par 10%-iem no mūsdienās zināmām farmaceitiskām vielām (Brausch *et al.* 2012 cit. pēc

Amiard-Triquet *et al.* 2015). Pie preparātiem, par kuriem pilnībā iztrūkst ietekmes uz vidi novērtējums, pieder, piemēram, 1980-os rādītais ipidakrīna hidrohlorīds (*ipidacrini hydrochloridum*; stimulē neuro-muskuļu pārraidi, un ko lieto centrālās nervu sistēmas saslimšanas gadījumā) un 1990-os gados rādītais sulpirīds (*sulpiridum*; antipsihotisks līdzeklis). Lai uzlabotu ūdens kvalitāti un garantētu visu ūdens organismu izdzīvotību un sugu daudzveidības saglabāšanu, nepieciešams veikt ūdens kvalitātes eko-toksikoloģisko novērtējumu (Silva *et al.* 2009).



2. attēls. Publicēto pētījumu procentuālais sadalījums par dažādu terapeitisko klašu preparātiem, kas pieminēti 183 rakstos un publicēti no 1996. līdz 2009. gadam (Santos *et al.* 2010).

Picture 2. Percentage of published studies on different therapeutic classes, expressed in relative percentage, described on 183 articles published between 1996 and 2009 (Santos *et al.* 2010)

1.5. Farmaceitisko vielu toksiskuma noteikšanas metodes

Risku novērtēšanai uz ūdens organismiem ir izstrādātas un tiek izmantotas vienotas standartizētas metodes toksiskuma noteikšanai gan atsevišķiem savienojumiem, gan to maisījumiem. Vienkāršie ūdens organismi kā, piemēram, bezmugurkaulnieki, būdami vieni no jutīgākajiem ūdens ekosistēmās, ir labi toksikoloģisko pētījumu modeļi (Pomati *et al.* 2008). Toksikuma testi var būt akūti vai hroniski. Hroniskos testos visbiežāk tiek noteikta vielu ietekme uz organismu vairošanos un attīstību. Akūtai un hroniskai iedarbībai ir dažādi toksikodinamiskie mehānismi (Lange and Dietrich 2002). Akūtā toksiskuma testi atsevišķām AFV bieži neļauj noteikt to toksiskumu pie tādām koncentrācijām, kādas parasti ir virszemes

ūdeņos. AFV maisījumos savienojumi var mijiedarboties, reaģēt savā starpā un pastiprināt viens otra efektu, līdz ar to arī krasi palielinās toksiskums (Anway *et al.* 2005).

Daudziem potenciāli toksiskiem savienojumiem ir veikti vairāki eko-toksicitātes testi. Daļai no tiem tie ir veikti, izmantojot vienu un to pašu testorganismu sugu. Agerstrand (2015) labākai riska noteikšanai iesaka izmantot vairākus testus un savākt informāciju no dažādām laboratorijām. Gadījumā, kad rezultāti ir pretrunīgi un būtiski atšķirsies, tas palīdzēs precīzāk veikt riska novērtēšanu. Piemērs tam, kad riska novērtētāji nonāca pie dažādiem secinājumiem: FASS sistēmā (Zviedrijas farmaceutisko vielu klasifikācijas sistēma) attiecībā uz dzimumhormonu estradiolu. Šo savienojumu pētīja astoņas farmaceutiskās kompānijas un nonāca pie četriem dažādiem secinājumiem par to potenciālo ietekmi uz ūdens vidi (Agerstrand and Ruden 2010; Agerstrand *et al.* 2015).

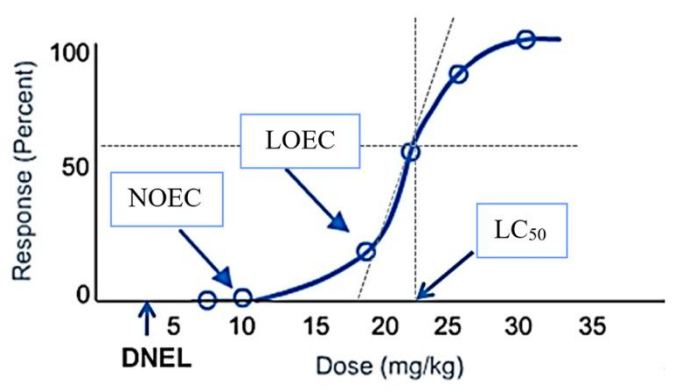
1.6. Eko-toksicitātes testu būtība un testorganismu apraksts

Hidroekosistēmu ekoloģiskā stāvokļa novērtējumam akūtos eko-toksicitātes testus visbiežāk veic ar mikroskopiskām aļģēm, kladocerām, zivju mazuļiem un ūdenī dzīvojošiem kukaiņu kāpuriem (Yasser and Nabila 2015). Visbiežāk izmanto tādus saldūdens organismus kā kladoceras *Daphnia magna* Straus (ISO 6341 2012) un mikroskopiskās zaļalģes, piemēram, *Desmodesmus subspicatus* (EN ISO 8692 2012).

Lai reprezentētu ūdens ekosistēmu, ekotoksicitātes testus ieteicams veikt ar dažādu trofisko līmeņu ūdens organismiem, kas pārstāvētu gan pirmproducentus (augu valsts pārstāvji), gan to primāros (piemēram, zooplanktona organismi) un sekundāros (piemēram, zivis) patērētājus (Silva *et al.* 2009).

Akūtos testos inhibējošās ietekmes novērtējumam kā testkritērijus visbiežāk izmanto LC₅₀ vai EC₅₀. LC₅₀ jeb subletālā koncentrācija - ir tāda vielas vai vielu maisījuma (piemēram, notekūdeņu) koncentrācija, kas izraisa 50%-īgu organismu bojāeju. Šo vērtību visbiežāk izsaka mg/l, notekūdeņu gadījumā – procentos, kas parāda to atšķaidījumu. EC₅₀ jeb vidējā efektīvā koncentrācija ir vielas koncentrācija, kas izraisa 50%-īgu efektu no maksimāli iespējamā, piemēram, kas 50%-īgu aļģu augšanas inhibēšanu (Newman 1994).

Dažkārt kā testkritērijus izmanto, piemēram, NOEC (no observed effect concentration) – lielākā koncentrācija, pie kuras nenovēro nekādu būtisku efektu; LOEC (lowest observed effect level) – zemākais iedarbības līmenis, pie kura novēro būtisku nelabvēlīgā efekta parādīšanos u.c. (3. attēls) (Anonymous 2018).



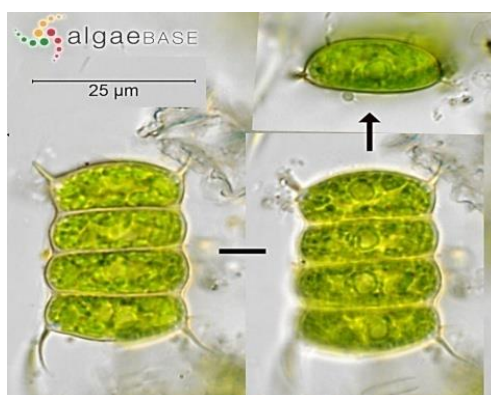
3. attēls. Attiecība starp LC_{50} , LOEC un NOEC uz tipiskās devas-atbildes līknes (Anonymous 2018).

Figure 3. The relationship between LC_{50} , LOEC and NOEC on a typical dose-response curve (Anonymous 2018).

1.6.1. Planktonaļģu izmantošana biotestēšanā. Testorganismu zaļāļģu *Desmodesmus communis* raksturojums

Aļģes ūdens ekosistēmās ir primārie producenti un to biomasa dažādu faktoru ietekmē var strauji mainīties īsā laikā. Aļģes ir svarīgs ekosistēmas stāvokļa, ūdens kvalitātes indikators, jo ir bāzes elements gandrīz visās barības ķēdēs ūdens ekosistēmās, un to blīvums un sugu sastāvs atkarīgs no ūdens kvalitātes, pH un ūdenī izšķīdušām vielām (Gokce 2016).

Desmodesmus communis (E. Hegewald) E.Hegewald (sin. *Scenedesmus communis* E. Hegewald) ir mikroskopiskās zaļāļģes (Chlorophyta), kas pieder *Scenedesmaceae* dzimtai, *Sphaeropleales* kārtai un *Chlorophyceae* klasei. Parasti veido cenobijus no četrām šūnām (4. attēls). Šūnu izmēri sasniedz 10-25 μm , katrai šūnai ir elipsveida vai iegarena forma, ir adatveida izaugumi. Raksturīga bezdzimumvairošanās ar autosporām (Guiry 2002).



4. attēls. *Desmodesmus communis* cenobiji gaismas mikroskopā (Carter 2012).

Figure 4. *Desmodesmus communis* coenobia under a microscope (Carter 2012).

Saldūdens ūdenstilpēs *Desmodesmus spp.* ir bieži sastopami un ir tipiski planktonaļģu sabiedrības pārstāvji (Huynh and Serediak 2006; Hallfors 2004). *D. communis* ir konstatēta arī Baltijas jūras mazāk sāļajos reģionos, kā, piemēram, Botnijas līcī, Somu līcī, kā arī Rīgas līcī (Hallfors 2004). *Desmodesmus* un *Scenedesmus* ģints aļģes bieži izmanto biotestēšanā.

Eko-toksicitātes testus veic arī ar cianobaktērijām kā, piemēram, *Microcystis sp.*, zaļajām *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricorutum*, kramajām *Skeletonema costatum* un daudzām citām planktonaļģu sugām (Pavlic *et al.* 2005; Silva *et al.* 2009). Standarttestos nav noteikts, kāda mikroskopisko aļģu suga ir jāizmanto, bet Latvijas standartā LVS EN ISO 8692:2012 iesaka *Desmodesmus subspicatus* vai *Chlorella vulgaris* (ISO 8692 2012).

1.6.2. Kladoцерu izmantošana eko-toksicitātes testos. *Daphnia magna* vispārīgs raksturojums

Dafnijas, īpaši *Daphnia magna*, ir eko-toksicitātes testos visplašāk izmantotie zooplanktona organismi. Mēdz izmantot arī citas dafniju sugas, piemēram, *Daphnia pulex* un *Ceriodaphnia dubia* (Taylor 1993; Theegala *et al.* 2007). Kladoцерu garajai vēsturei ūdens toksikoloģijas testos ir vairāki iemesli: šie organismi visu dzīves ciklu pavada ūdenī, tie ir ātri augoši, viegli pavairojami laboratorijas apstākļos un tiem ir salīdzinoši īss dzīves cikls. Dafnijas ir pazīstamas ar savu jutību pret daudziem ķīmiskiem savienojumiem un smagiem metāliem (Tatarazako and Oda 2007).

Daphnia magna Straus ir zemākie vēži (5. attēls), kas pieder žaunkājvēžu klasei (Branchiopoda), kladoцерu kārtai (Cladocera) (ITIS 2020a; Ebert 2005). Kladoceras ir sīki organismi, kuru ķermeni apņem hitinizēta čaula. Planktoniski dzīvnieki, bet spēj peldēt ar lēcieniem, kustinot antenas (otras taustekļus). Kladoceras ir svarīga zivju mazuļu barība (Spuris 1974), tās barojas ar mikroskopiskām aļģēm, baktērijām un organisko detritu (Smirnov 2013).

Daphnia spp. ir siltummīļi, apdzīvo pārsvarā seklākas ūdenstilpes vai jūras piekrastu virsējo ūdens slāni. Eitrofos (aizaugušos, ar barības vielām bagātākos) ezeros tās sastopamas lielākā daudzumā nekā mezotrofos (vidēji aizaugušos) (Spuris 1974). Visām kladoцерām ir raksturīga cikliskā partenogēnēze – bezdzimumvairošanās gada siltajā periodā, kas mijās ar dzimumvairošanos pirms ziemas perioda. Partenogēnēzē vairošanās notiek no neapaugļotām olām, kuras ražo amiktiskās mātītes. Partenogēnētisko olu skaits, kas tiek saražots, ir ļoti atkarīgs no kladoцерām pieejamās barības daudzuma. Pēc nenoteiktā skaita partenogēnētisko



6. attēls. *Artemia salina* mātīte ar olām (Bohdal 2010).

Picture 6. Female *Artemia salina* with eggs (Bohdal 2010).

izšķilšanās līdz rezultātu iegūšanai); izmaksu efektivitāte; naupliju pieejamība no viegli uzglabājamām cistām, kas nodrošina populācijas homogenitāti un pieejamību jebkurā laikā bez nepieciešamības pastāvīgi tās kultivēt; labi izpētīta šo organismu bioloģija un ekoloģija; vieglas manipulācijas laboratorijas apstākļos; neliels organisma izmērs, kas ļauj izmantot mazus traukus; augsta adaptēšanās testa apstākļiem (Nunes *et al.* 2006; Manfra *et al.* 2012).

Neskatoties uz biežu pielietošanu eko-toksicitātes testos, vairāki pētījumi parāda, ka *Artemia spp.* ir salīdzinoši mazjutīgi, salīdzinājumā ar citām testorganismu grupām pie tiem pašiem testa apstākļiem. Guerra (2001) paziņoja par zemāku uz artēmijām balstītu testu jutību salīdzinājumā ar komerciāli pieejamiem testiem (Microtox un Rotoxkit M), kā arī ar standartizēto *D. magna* testu. Samazināta artēmiju jutība ir ne tikai salīdzinājumā ar *D. magna*, bet arī ar *Daphnia pulex* un *Thamnocephalus platyurus* (Okamura *et al.* 2000).

2. Materiāli un metodes

2.1. Testētie farmaceitiskie produkti

Toksiskuma noteikšanai tika izvēlēti dažādi produkti, kas satur farmaceitiskās vielas no dažādām terapeitiskām klasēm: gan pretsāpju preparātus, gan antibiotikas, gan pretalerģijas preparātus, antidepresantus un NS stimulatorus. Daļa no preparātiem satur tādas bieži izmantojamas un populāras farmaceitiskās vielas kā paracetamols, daļa – tādas vielas, par kurām iztrūkst jebkāda informācija par ietekmi uz vidi un ūdens organismiem (1. tabula).

1. tabula

Testētie farmaceitiskie produkti un to pielietojuma mērķi.

Table 1.

Tested pharmaceutical products and their applications.

Farmaceutiskais produkts	AFV	Latīniskais nosaukums	Terapeitiskā klase
“Ospamox”	Amoksicilīns	<i>Amoxicillinum</i>	Antibiotika
“Doxy-M-ratiopharm”	Doksiciklīns	<i>Doxycyclinum</i>	Antibiotika
“Paracetamol”	Paracetamols	<i>Paracetamolum</i>	Analģētiķis, antipirētiķis
“Ibuprofen - Grindeks”	Ibuprofēns	<i>Ibuprofenum</i>	Nesteroīdais pretiekaisuma līdzeklis
“Olfen”	Diklofenaks (nātrija sāls)	<i>Diclofenacum natrium</i>	Pretiekaisuma līdzeklis, analģētiķis
“Suprastin”	Hlorpiramīna hidrohlorīds	<i>Chloropyramini hydrochloridum</i>	Pretalerģijas līdzeklis: histamīna H1 receptoru blokators
“Betamaks”	Sulpirīds	<i>Sulpiridum</i>	Antidepresants, neiroleptiskais līdzeklis
“Neiromidin”	Ipidakrīna hidrohlorīds	<i>Ipidacrini hydrochloridum</i>	NS stimulators (holīnesterāzes inhibitors)
“Metforal”	Metformīna hidrohlorīds	<i>Metformini hydrochloridum</i>	Biguanīds (2. tipa diabēta ārstēšanai)

Visi testētie līdzekļi ir fasēti tabletēs un pieejami Latvijas aptiekās. No tiem “Doxy-M-ratiopharm”, “Metforal”, „Ospamox”, „Neiromidin” un „Betamaks” ir recepšu medikamenti, bet pārējie - bezrecepšu.

2.2. Izmantotie standarttesti un testa koncentrāciju izvēle

Farmaceutisko produktu toksiskums tika noteikts, veicot sekojošus standarttestus: aļģu augšanas inhibēšanas testu (standarts ISO 8692: 2012), *Daphnia magna* Straus kustību inhibēšanas testu (standarts ISO 6341: 2012), to papildus pielāgojot testorganismam *Artemia salina*, kā arī *D. magna* reprodukcijas testu (OECD 211: 2012).

Testi tika veikti divos etapos: sākuma un nobeiguma tests. **Sākuma** testi tika veikti ar lielu koncentrāciju amplitūdu: 0,1 mg·l⁻¹, 1 mg·l⁻¹, 10 mg·l⁻¹, 100 mg·l⁻¹, un 1000 mg·l⁻¹. Pēc sākuma testa rezultātiem tika noteiktas koncentrāciju robežas, kurās novērots 10% - 90%-īgs efekts, salīdzinājumā ar kontroli, lai veiktu nobeiguma testus precīzākai EC₅₀ vērtības noteikšanai. **Nobeiguma testiem** izvēlētas vismaz četras koncentrācijas, kas veido ģeometrisku progresiju (2. tabula). Toksikanta koncentrācija tika noteikta pēc aktīvās farmaceutiskās vielas masas konkrētā medikamenta tabletē.

2. tabula

Farmaceutisko produktu nobeiguma testos izmantotās koncentrācijas. Visas koncentrācijas norādītas mg·l⁻¹.

Table 2.

Concentrations used in the final tests of pharmaceutical products. All concentrations are shown in mg·l⁻¹

Farmaceutiskā produkta nosaukums	<i>D. magna</i> kustību inhibēšanas tests	<i>D. communis</i> augšanas inhibēšanas tests	<i>Artemia salina</i> kustību inhibēšanas tests	<i>D. magna</i> reprodukcijas tests
“Doxy-M-ratiofarm”	16, 32, 64, 128	20, 40, 80, 160	20, 40, 80, 160, 320	0,5, 1, 2, 4, 8
„Suprastin”	1, 2, 4, 8	5, 10, 20, 40	5, 10, 20, 40	0,125, 0,250, 0,5, 1
“Metforal”	8, 16, 32, 64	20, 40, 80, 160	20, 40, 80, 160, 320	1, 2, 4, 8, 16
„Olfen”	5, 10, 20, 40, 80	10, 20, 40, 160	20, 40, 80, 160, 320	-
„Betamaks”	5, 10, 20, 40	5, 10, 20, 40	10, 20, 40, 80, 160	-
„Paracetamol”	20, 40, 80, 160	40, 80, 160, 320	-	2, 4, 8, 16
„Neiromidin”	5, 10, 20, 40	5, 10, 20, 40	10, 20, 40, 80, 160	-
„Ibuprofen-Grindeks”	20, 40, 80, 120, 240	100, 200, 400, 800	-	-
„Ospamox”	250, 500, 1000, 2000	250, 500, 1000, 2000	-	-

Ja pēc sākuma testa rezultātiem testējamā viela bija ļoti toksiska vai pretēji gandrīz netoksiska, nobeiguma testam tika izvēlētas koncentrācijas arī ārpus sākuma testa diapazona.

A. salina kustību inhibēšanas testi tika veikti sešiem toksiskākiem preparātiem pēc *D. magna* kustību inhibēšanas un aļģu augšanas inhibēšanas testu rezultātiem. Reprodukcijas testi ir ļoti laukietilpīgi, tāpēc tie tika veikti četriem salīdzinoši toksiskiem preparātiem, kuru pielietojums ir biežāks un kuru stabilitāte ūdens šķīdumā ir optimāla (1. pielikums).

2.2. Zaļāļģu augšanas inhibēšanas testa īss apraksts

Testa gaitā tiek noteikta toksikanta ietekme uz aļģu augšanas ātrumu. Aļģu augšanas ātrumu var noteikt tieši (sekojot šūnu skaita izmaiņām testa gaitā) vai netieši (piemēram, pēc fotosintētiskās aktivitātes izmaiņām; hlorofila *a* fluorescences mērījumiem). Testa ilgums ir 72 stundas. Rezultātā tiek iegūta efektīvā mediālā koncentrācija jeb EC_{50} , kas atbilst tādai toksikanta koncentrācijai, kas izraisa 50%-īgu aļģu augšanas inhibēšanu salīdzinājumā ar kontroli (ISO 8692 2012).

2.2.1. *Desmodesmus communis* kultivēšana

Testu veikšanai tika izmantota *Desmodesmus communis* monokultūra no Latvijas Hidroekoloģijas institūta aļģu tīrkultūru kolekcijas. Inokulātam tika izmantots celms DCDA-30, kas 2008. gada augustā izolēts no saldūdens parauga (Daugavas estuārijs, Rīga, Latvija).

Kultūras atšķaidīšanai un aļģu barošanai tika izmantota BG-11 barotne, kas gatavota uz destilētā ūdens bāzes un paredzēta mikroskopisko zaļāļģu kultūru audzēšanai pēc Richmond (2016) ieteiktās receptes (3. tabula). Vielu sveršanai izmantoti laboratorijas analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 g. Barotne pēc pagatavošanas 1 L stikla pudelē tika tika autoklavēta 121°C temperatūrā un zem 1 atm spiediena (autoklāvs Sanyo MLS-3781L). Pēc atdzezēšanas tika pielāgots barotnes pH līdz $7,4 \pm 0,1$ ar HCl vai NaOH.

Aļģu kultūra tika audzēta sterilās apaļkolbās ar tilpumu 500 ml un katru nedēļu atšķaidīta par aptuveni 50% ar svaigi pagatavotu BG-11 barotni, lai nodrošinātu pastāvīgi ātru aļģu augšanu (kultūra būtu augšanas eksponenciālajā jeb lag fāzē), kas ir viens no nosacījumiem šīs monokultūras izmantošanai testam (ISO 8692 2012). Mēnesi pirms un visu eksperimentu veikšanas laikā kultūra tika inkubēta pie $23 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūras, to uzturot 16:8 gaismas un tumsas režīmā. Reizi nedēļā tika ņemts kultūras paraugs kultūras kvalitātes, šūnu blīvuma un aļģu augšanas ātruma noteikšanai.

BG-11 augšanas vides recepte aļģu kultivēšanai. Visas koncentrācijas, ja nav norādīts citādi, norādītas $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ un daudzumi norādīti 1 L šķīduma pagatavošanai (Richmond 2016).

Table 3.

Recipes of a growth media BG-11 used for cultivating algae. All concentrations are in $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, unless indicated otherwise and the quantities are for 1 litre of solution (Richmond 2016).

Izejviela	Daudzums
NaNO_3	1,500
$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,040
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,075
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,036
Citronskābe ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	0,006
Dzelzs-amonija citrāts ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$)	0,006
EDTA di-nātrija sāls ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)	0,001
Na_2CO_3	0,020
H_3BO_4 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,860
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,810
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,391
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,0494

Šūnu blīvuma noteikšana ar Gorajeva kameru:

1. ar plastmasas pipeti tika paņemts paraugs un pārņemts tīrā Gorajeva kamerā ar segstikliņu un skatīts zem mikroskopa 200x palielinājumā;
2. tika skaitītas visas dzīvās aļģu šūnas mazajos kameras režģa kvadrātos pa diagonālēm;
3. tika aprēķināts kultūras tilpums, ko norobežo Gorajeva kameras režģa mazā kvadrāta malas pēc formulas:

$$v = l^3 \cdot 0,001 = 4 \cdot 10^{-6} \text{ ml, kur}$$

l – Gorajeva kameras mazākā kvadrāta malas garums, konkrētajā gadījumā – 0,16 mm;

0,001 – koeficients mm^3 pārveidošanai ml.

4. tika aprēķināts šūnu blīvums (šūn./ml), izmantojot formulu:

$$B = \sum_{i=1}^n S \cdot \frac{1}{n \cdot v}, \text{ kur}$$

S – šūnu skaits vienā mazajā kvadrātā;

n – skatīto kvadrātu skaits;

v - tilpums, ko norobežo Gorajeva kameras viena mazā kvadrāta mala ($4 \cdot 10^{-6}$ ml).

2.3.2. Zaļajūgu augšanas inhibēšanas testa veikšana

Pirms testa veikšanas zem mikroskopa tika pārbaudīta aļģu kultūras kvalitāte un noteikts aļģu augšanas ātrums, kas aprēķināts pēc šūnu blīvuma pieauguma konkrētajā kolbā kopš pēdējās uzskaites reizes. Ja kultūras kvalitāte neatbilda standarta prasībām vai novērota šūnu agregācija, tad kultūra tika atšķaidīta ar BG-11 un atstāta uz vairākām dienām līdz nākamai kontrolei. Par kultūras atbilstību nepieciešamajam jutības līmenim tika spriests pēc jutības pārbaudes testa, to veicot ar kālija dihromātu (ISO 8692 2012).

Ar piestas un miezera palīdzību tika pagatavoti farmaceitisko produktu pulveri un izšķīdināti BG-11 barotnē 500 ml koniskajās kolbās. Katrai koncentrācijai tika pagatavoti paraugi NALGENE centrifugēšanas stobros ar 30 ml tilpumu trīs atkārtojumos, pārnesot tajos nepieciešamo farmaceitiskā produkta šķīduma daudzumu ar 200-1000 μ l pipeti un atšķaidot ar BG-11. Atsevišķi tika pagatavoti trīs kontroles paraugi ar tīru BG-11 barotni. Uz katra stobra vāciņa tika atzīmēta koncentrācija un atkārtojuma numurs. Katram paraugam ar pipetes palīdzību tika pievienots vienāds aļģu monokultūras tilpums, lai katrā no 30 ml stobriem šūnu blīvums nepārsniegtu 10^4 šūn./ml.

Nepieciešamais aļģu kultūras daudzums (ml) tika noteikts pēc formulas:

$$V = \frac{c \cdot 10^4}{B}, \text{ kur}$$

c – viena parauga apjoms (ml), konkrētajā pētījumā šī vērtība ir 30 ml;

B – šūnu blīvums kultūrā, ko nosaka ar Gorajeva kameras palīdzību;

10^4 – nepieciešamais šūnu blīvums paraugā (šūn./ml).

Aļģu šūnu augšana tika noteikta netieši pēc hlorofila *a* fluorescences, izmantojot Turner AU-10 fluorometru (gaismas viļņa garums – 640 nm). Testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji ir parādīti 4. tabulā.

Aļģu augšanas inhibēšanas testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji.

Table 4.

Algae growth inhibition test procedure, conditions and validity criteria.

Testa apstākļi un procedūra	
Testa ilgums	72 stundas
Testa temperatūra	21-25 °C
pH testa šķīdumam	7,2-8
Testa fotoperiods	16:8 st. gaismas-tumsas režīms, 1000 lx
Mērījumu veikšana	Katru dienu
Validitātes kritēriji kontroles grupai	
Vid. augšanas intensitāte kontroles grupā	Vismaz 1,4 d ⁻¹
Variācijas koef. kontroles grupā	<5%
pH izmaiņas	Ne vairāk kā par 1,5 no sākuma vērtības

2.3.3. Iegūto datu apstrāde un EC₅₀ vērtības iegūšana

Iegūtie dati tika apkopoti tabulā un apstrādāti ar MS Excel programmas palīdzību. Sākumā tika noteikta aļģu īpatnējā augšanas intensitāte pēc formulas (ISO 8692 2012):

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0}, \text{ kur}$$

n_0 – fluorescences rādītājs testa sākumā;

n_L – fluorescences rādītājs testa beigās;

t_0 – testa sākuma laiks;

t_L – testa beigu laiks.

Atsevišķi tika aprēķināts aļģu augšanas intensitātes variācijas koeficients kontroles paraugiem, jo tas nedrīkst būt vairāk par 5 (ISO 8692 2012). Aļģu šūnu augšana kontroles paraugos tika pieņemta par 100%-īgu un pārējiem paraugiem tika noteikta aļģu augšanas inhibēšana procentos, izmantojot sekojošu formulu (ISO 8692 2012):

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_C - \mu_i}{\mu_C} \cdot 100\%, \text{ kur}$$

$I_{\mu i}$ – aļģu augšanas inhibēšana paraugam i ;

μ_i – īpatnējā augšanas intensitāte paraugam i ;

μ_C – īpatnējā augšanas intensitāte kontroles paraugos.

Iegūtie rezultāti par aļģu augšanas inhibēšanu katrā no 3 atkārtojumiem pēc 72 stundu ekspozīcijas tika attēloti grafiski, izmantojot polinoma funkciju. Katram atkārtojumam noteikta koncentrācija, pie kuras bija 50%-īga aļģu augšanas inhibēšana un no šīm vērtībām aprēķināta vidējā EC₅₀ vērtība un standartnovirze.

2.4. *Daphnia magna* Straus kustību inhibēšanas testa īss apraksts

D. magna kustību inhibēšanas testa gaitā nosaka imobilizēto jeb nekustīgo dafniju skaitu pie dažādām vielas vai notekūdeņu koncentrācijām pēc 24 un 48 stundām no testa sākuma. Veicot Probit analīzi, izmantojot binominālās metodes vai grafiski pēc Gausa logaritmiskās diagrammas, nosaka koncentrāciju, kas izraisa 50%-īgu *D. magna* īpatņu bojāeju jeb LC₅₀ (ISO 6341 2012).

2.4.1. *D. magna* organismu audzēšana

D. magna testorganismi iegūti no Latvijas Hidroekoloģijas institūta uzturētās kultūras (sākotnējs ieguves avots - Beļģijas komercuzņēmums). Akūtie testi ar “Metforal” un “Doxy-M-ratiofarm” tika veikti ar Pētniecības centra “RECETOX” laboratorijas kultūru (Čehijas Republika).

Dafnijas tika audzētas 15 L lielos stikla akvārijos, kas piepildīti ar nostādinātu krāna ūdeni istabas temperatūrā (vidēji 21°C). Ūdens tika pastāvīgi aerēts un mainīts reizi nedēļā. Kontrolei un skaitīšanai dafnijas no ūdens tika izņemtas ar ļoti smalku akvāriju zivtiņu tīklu un pārvietotas dziļā bļodā ar ūdeni. *D. magna* organismi tika regulāri baroti ar *D. communis* no kultūras vai ar *Spirulina sp.* aļģu pulveri, lai ūdenim vienmēr būtu viegli zaļš tonis. Uz akvārija dibena nosēdušies karapaksi, mirušās dafnijas un aļģu pārpalikumi tika aizvākti, izmantojot plastmasas pipeti, pirms katras barošanas, lai nepieļautu to pūšanu, kā arī novērstu dafniju aizķeršanos ar antenulām un kustību traucēšanu. Ja akvārijā bija parādījušās *D. magna* mātītes ar ilgolām, tās tika izolētas un neviena no dafnijām no šī konkrētā akvārija netika atlasīta testam līdz mātītēm atkal sāka veidoties partenogēnētiskās olas. Tas tika darīts tāpēc, lai nepieļautu jauno tēviņu un 1. un 2. paaudzes mātīšu izmantošanu testam, jo pēc LVS EN ISO 6341:2013 standarta testam izmanto tikai 0-24 h vecās mātītes no 3. paaudzes partenogēnētiskām olām.

2.4.2. *Daphnia magna* Straus kustību inhibēšanas testa veikšana

Sākumā tika pagatavoti testējamo farmaceitisko produktu šķīdumi (līdzīgi kā aļģu augšanas inhibēšanas testā). Toksikantu atšķaidīšanai tika pagatavots šķīdums pēc standartā norādītās receptes (5. tabula), izmantojot destilēto ūdeni. Katras vielas šķīdums tika pagatavots atsevišķi, pēc tam 25 ml no visiem četriem šķīdumiem tika samaisīti un ar

destilēto ūdeni atšķaidīti līdz viena litra tilpumam. Tas nodrošināja precīzāku nepieciešamo vielu koncentrāciju gala šķīdumā. Pēc pagatavošanas pH tika pielāgots līdz $7,8 \pm 0,2$.

5. tabula

Atšķaidīšanas ūdens pagatavošanai nepieciešamās vielas (ISO 6341 2012).

Table 5.

Substances necessary for the preparation of dilution water (ISO 6341 2012).

Viela	Daudzums, g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,76
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,93
NaHCO ₃	2,59
KCl	0,23

Dienu pirms testa veikšanas atsevišķā akvārijā tika atlasītas mātītes ar partenogēnētiskajām olām, lai testa uzsākšanas brīdī viegli, ātri un nekļūdīgi atlasītu *D. magna*, kas jaunāki par 24 stundām. Testi tika veikti sešu-iedobju mikroplatēs (iedobes tilpums 15 ml). Ar pipetes palīdzību nepieciešamais toksikanta šķīduma daudzums tika pārnestis mikroplates iedobē un tam pievienots atšķaidīšanas ūdens. Kontrolei tika izmantots tīrs atšķaidīšanas ūdens (trīs atkārtojumi). Mikroplates tika turētas noslēgtas ar vāku. Par imobilizētām dafnijām tika uzskaitītas tās, kas, mikroplati viegli kustinot 15 sekunžu laikā, nevarēja papildēt, pat ja tās bija spējīgas kustināt antenuļas (ISO 6341 2012). Testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji ir norādīti 6. tabulā. Līdzīgi kā aļģu augšanas inhibēšanas testā, šis tests tika veikts divos etapos: sākuma un nobeiguma tests.

6. tabula

D. magna kustību inhibēšanas testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji.

Table 6.

D. magna immobilization test procedure, conditions and validity criteria.

Testa apstākļi un procedūra	
Testa ilgums	48 stundas
Testa temperatūra	18-22 °C
pH testa šķīdumam	7,2-8
Testa fotoperiods	16:8 st. gaismas-tumsas režīms, 1000 lx
Barošana	Nav paredzēta
Aerācija	Nav paredzēta
Testorganismu skaits atkārtojumos	7 īpatņi
Datu ievākšana	Ik pēc 24 stundām
Validitātes kritēriji kontroles grupai	
Izšķīdušā skābekļa koncentrācija	Vismaz 2 mg·L ⁻¹
Imobilizācija kontroles grupā	<10%
Testorganismu jutība	24 h LC ₅₀ : 0,6-2,1 mg·L ⁻¹ (K ₂ Cr ₂ O ₇)

2.4.3. Datu apstrāde un LC₅₀ vērtības iegūšana

Iegūtie dati par imobilizēto dafniju skaitu pie dažādām farmaceitisko produktu koncentrācijām tika apkopoti tabulā un apstrādāti ar MS Excel programmas palīdzību. Imobilizēto dafniju skaits tika izteikts procentos no kopējā dafniju skaita mikroplatē. LVS EN ISO 6341:2013 ir norādītas vairākas statistiskās metodes LC₅₀ vērtības noteikšanai, piemēram, Probit analīze, binominālās metodes, grafiski pēc Gausa logaritmiskās diagrammas (ISO 6341 2012). Konkrētajā darbā LC₅₀ tika noteikta, veicot Probit analīzi ar MS Excel programmas palīdzību. Šīs analīzes veikšanai imobilizēto dafniju skaits procentos tika pārvērstas probit vērtībās, izmantojot Probitu tabulu (2. pielikums), un koncentrācijas vērtības tika logaritmētas. Pēc tam datiem par koncentrāciju vērtībām un atbilstošām probit vērtībām tika veikta regresijas analīze (būtiskuma līmenis 0,05), lai iegūtu regresijas vienādojumu. Vienas analīzes rezultātā tika iegūts grafiks, kas parāda *D. magna* mirstību (izteikts probit vērtībās) atkarībā no vielas koncentrācijas. Pie probit vērtības 5, kas precīzi atbilst 50%-īgai *D. magna* mirstībai, tika nolasīta log₁₀LC₅₀ vērtība un aprēķināta LC₅₀ vērtība. Standartnovirze arī tika iegūta probit analīzes gaitā.

2.5. *A. salina* imobilizācijas testu īss apraksts

Artemia salina imobilizācijas testi tika veikti, pielāgojot standartizēto *D. magna* imobilizācijas testa metodiku sāļūdens vēžveidīgajam *Artemia salina*. Testorganismu kultivēšana tika veikta no ilgolām vienu diennakti 27±2°C temperatūrā 3% vāramā sāls šķīdumā, to pagatavojot uz nostādinātā un filtrētā ūdens bāzes, vadoties pēc literatūrā norādītajiem ieteikumiem par kultivēšanu (Vanhaecke and Sorgeloos 1989).

Izšķīlušos artēmiņu attīstības stadijai ir būtiska nozīme, jo atkarībā no tās būtiski mainās šo organismu jutība (Ocaranza-Roya *et al.* 2019; Barahona and Sanchez-Fortun 1996). Pirmās stadijas naupliji, kas parādās pirmajā kultivēšanas diennaktī, ir salīdzinoši mazjutīgi (3. pielikums). Nauplija II un metanauplija stadijas īpatņi ir būtiski jutīgāki nekā nauplijs I stadijas īpatņi un kultūrā parādās otrajā un trešajā inkubēšanas diennaktī. Kultivēšana notika 24 st., tad izšķīlušies īpatņi tika pārvietoti jaunajā šķīdumā un kultivētas vēl 24 stundas. Kultivēšanai tika izmantotas 2 L pudeles, ūdens tika pastāvīgi aerēts, kā arī nodrošināts vienmērīgs 24 h apgaismojums. Pēc 48 stundu kultivēšanas aerācija tika apstādināta un aktīvās artēmiņas savāktas testiem.

Tālākā testa procedūra ir līdzīga *D. magna* imobilizācijas testu procedūrai ar vienu izņēmumu – vides temperatūra testu laikā bija 27±2°C, jo *A. salina* ir siltummīlošāka suga.

Kā pamatšķīdums kontroles grupai un toksikanta šķīdināšanai tika izmantots svaigi pagatavots 3% vārāmā sāls šķīdums. Testi tika veikti sešu iedobju mikroplatēs. Kustību inhibēšana tika novērtēta un datu apstrāde tika veikta kā *D. magna* testos.

2.6. *D. magna* reprodukcijas testa īss apraksts

D. magna reprodukcijas testa gaitā tiek noteikta toksikanta ietekme uz kladoceru vairošanās spēju pēc jauno organismu daudzuma uz katru mātīti pie dažādām koncentrācijām. Šis tests ir pieskaitāms pie hroniskiem testiem, jo tā ilgums sastāda 21 dienu. Rezultātā tiek iegūta EC₅₀ vērtība, kas atbilst tādai toksikanta koncentrācijai, kas izraisa 50%-īgu vairošanās spēju samazināšanos (OECD 211 2012).

2.6.1. *D. magna* reprodukcijas testa veikšana

Reprodukcijas testi tika veikti Vidē esošu toksisko savienojumu pētniecības centrā "RECETOX", Brno, Čehijas Republika. Testiem tika kultivētas un atlasītas 0-24 h vecas *Daphnia magna* mātītes. Kultivēšana, jutības pārbaude un atlasīšana notika pēc tā paša principa kā akūtajos testos. Testa šķīdumu pagatavošanai tika izmantots Aechener Daphien Medium jeb AdaM (7. tabula), jo to izmantoja testorganismu kultivēšanai (Klüttgen *et al.* 1994). Vienam testam tika atlasīti 60 īpatņi, kas sadalīti grupās pa desmit (kontroles grupai un piecām testa koncentrācijām). Testa laikā organismi tika turēti individuāli 50 ml stikla vārglāzēs.

Pirms testu uzsākšanas visas testam nepieciešamās vārglāzes tika attīrītas, izmantojot Deconex® pulveri, skalotas ar destilētu ūdeni un karsētas 1,5 h pie 180°C temperatūras. Testa apstākļi tika nodrošināti atbilstoši OECD 211:2012 prasībām (6. tabula). Barošanai tika izmantotas aļģes *Desmodesmus subspicatus*, kas tika kultivētas sterilā BG-11 barotnē. Lai noteiktu aļģu daudzumu, kas satur nepieciešamo standartā norādīto oglekļa daudzumu *D. magna* mātītei dienā, aļģu kultūrai tika veikta kopējā organiskā oglekļa (TOC) analīze un izveidota nomogramma (4. pielikums). Analīzes veikšanai tika paņemti 100 ml aļģu kultūras paraugi ar dažādu atšķaidījuma pakāpi un centrifugēti tam paredzētajos stobros. Pēc tam aļģu masa tika atdalīda no barotnes, izžāvēta un nodota laboratorijā tālākai analīzei.

Nomogrammas konstruēšanai iegūtie rezultātiem tika veikta regresijas analīze (būtiskuma līmenis 0,05). Lai noteiktu aļģu daudzumu, kas satur 0,1 mg C, tika izmantota iegūtā nomogramma un informācija par šūnu blīvumu kultūrā paraugu ņemšanas brīdī, kas noteikts ar automatizētā šūnu skaitītāja Nexcelom Biocience™ Cellometer Auto 4 palīdzību.

ADaM šķiduma pagatavošanai nepieciešamās vielas (Kluttgen *et al.* 1994).

Table 7.

Substances necessary for preparation of ADaM solution (Kluttgen *et al.* 1994).

Izejvielas	Vielu koncentrācijas sākotnējā šķiduma pagatavošanai	Daudzums 1 L šķiduma pagatavošanai	Vielu koncentrācijas ADaM šķīdumā
Sintētiskā jūras sāls	-	0,333 g·L ⁻¹	0,333 g·L ⁻¹
CaCl ₂ · 2H ₂ O	117,6 g·L ⁻¹	2,3 ml·L ⁻¹	0,2705 g·L ⁻¹
NaHCO ₃	25,2 g·L ⁻¹ NaHCO ₃	2,2 ml·L ⁻¹	55,44 mg·L ⁻¹
SeO ₂	1,4 g·L ⁻¹ SeO ₂	0,1 ml·L ⁻¹	0,14 mg·L ⁻¹

Testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji ir norādīti 8. tabulā. Testa veikšanas laikā katru dienu tika uzskaitīti un ar plastmasas pipeti izņemti visi izšķīlušies un kustīgi jaunie organismi no katras dafniju mātītes. Ja vecāku organisms gāja bojā, tas tika atzīmēts, lai vēlāk ar korelācijas analīzes palīdzību noteiktu, vai mirušu mātīšu skaits korelē ar toksikanta koncentrāciju.

8. tabula

D. magna reprodukcijas testa procedūra, apstākļi un validitātes kritēriji.

Table 8.

D. magna reproduction test procedure, conditions and validity criteria.

Testa apstākļi un procedūra	
Testa ilgums	21 diena
Testa temperatūra	18-22 °C
Izšķīdušais skābeklis	Vismaz 3 mg·L ⁻¹
pH testa šķīdumam	6,5-8
Testa fotoperiods	16:8 st. gaismas-tumsas režīms, 1000 lx
Organismu uzturēšana	Individuāli 50 ml stikla vārglāzēs
Testorganismu skaits atkārtojumos	10 īpatņi katrā atkārtojumā un kontroles grupā
Šķīduma nomaiņa	Katru otro dienu
Aerācija	Nav nepieciešama
Barošana	Katru dienu ar <i>Desmodesmus subspicatus</i> alģēm, nodrošinot 0,1-0,2 mg C/ <i>Daphnia</i> /dienā
Validitātes kritēriji kontroles grupai	
Vecāku organisma mirstība	<20% testa nobeigumā
Vidējais izšķīlušos organismu skaits	≥60 īpatņi uz katru mātīti testa nobeigumā

2.6.2. Datu apstrāde un rezultātu iegūšana

Datu analīze ir veikta ar programmu R (versija 3.6.1.), R Studio (versija 1.2.1335) un MS Excel palīdzību. Pirms pamatanalīzes tika pārbaudīts, vai *D. magna* reprodukcijas spējas korelē ar toksikanta koncentrāciju, izmantojot Spīrmena korelācijas analīzi (pie būtiskuma līmeņa 0,05). EC₅₀ vērtības noteikšanai tika izmantota Probitu metode. Tālākā datu analīze ir veikta kā *D. magna* imobilizācijas testu gadījumā. Visos testos NOEC un LOEC tika noteiktas programmā R ar Vilkoksona testu (nesaistītās paraugkopas, $\alpha = 0,05$), lai noteiktu, vai pastāv korelācija starp toksikanta koncentrāciju un *Daphnia magna* mātīšu bojāeju testa laikā, tika veikta Spīrmena korelācijas analīze ($\alpha = 0,05$). Neparametriskās metodes tika izvēlētas sakarā ar pārāk mazām paraugkopām ($n < 10$), lai pierādītu to normalitāti, jo pie augstākām toksikanta koncentrācijām bija novērota vecāku organismu bojāeja.

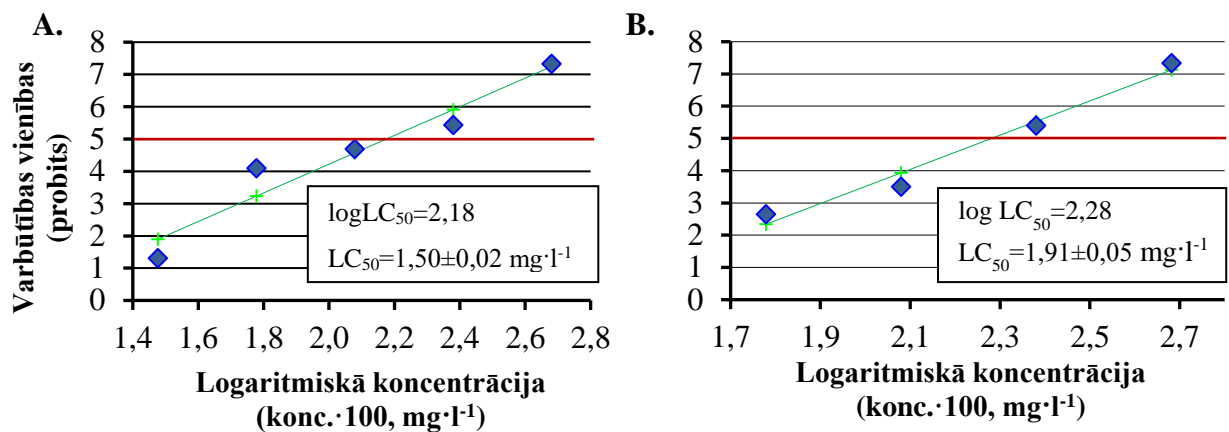
2.7. Testorganismu jutības pārbaude

D. magna, *A. salina* un *D. communis* jutība tika pārbaudīta ar kālija dihromātu ($K_2Cr_2O_7$), veicot abus standarttestus pēc tā paša principa, pēc kāda tika testēti farmaceitiskie produkti. Aļģu augšanas inhibēšanas tests ar kālija dihromātu tika veikts ar sekojošām koncentrācijām: 0,1 mg·l⁻¹, 0,5 mg·l⁻¹, 1 mg·l⁻¹ un 2 mg·l⁻¹, *D. magna* kustību inhibēšanas testu – ar 0,3 mg·l⁻¹, 0,6 mg·l⁻¹, 1,2 mg·l⁻¹, 2,4 mg·l⁻¹ un 4,8 mg·l⁻¹ koncentrācijām, testus veicot gan Latvijas, gan RECETOX kultūrām. *A. salina* testi tika veikti ar 2 mg·l⁻¹, 4 mg·l⁻¹, 8 mg·l⁻¹, 16 mg·l⁻¹ koncentrācijām. Pēc standarta *D. magna* LC₅₀ pēc 24 st. eksponēšanas jābūt robežās no 0,6 līdz 2,1 mg·l⁻¹ (ISO 6341 2012). Standartā nav norādītas *D. communis* EC₅₀ robežas kālija dihromātam, tomēr pēc eksperimentu rezultātiem līdzīgai sugai *Desmodesmus subspicatus* vidējā EC₅₀ vērtība ir 0,84 ± 0,12 mg·l⁻¹ (ISO 8692 2012) un citai līdzīgai sugai *Scenedesmus quadricauda* – 2,70 ± 0,08 mg·l⁻¹ (Putna 2010). *Artemia salina* kustību imobilizācijas tests nav standartizēts, tāpēc testorganismu jutības robežas nav precīzi noteiktas. Pēc citu pētījumu rezultātiem LC₅₀ pēc 24 st. eksponēšanas ar kālija dihromātu sastāda no 32 līdz 130 mg·l⁻¹ (Svensson *et al.* 2005; Jeyaratnama *et al.* 2016; Togulga 1998).

3. Rezultāti un diskusija

3.1. Testorganismu jutības pārbaude

Testorganismu jutība tika pārbaudīta ar kālija dihromātu ($K_2Cr_2O_7$), veicot abus standarttestus pēc tā paša principa, pēc kāda tika testēti farmaceitiskie produkti. Latvijā veiktajiem akūtiem testiem izmantotajai *D. magna* kultūrai LC_{50} ir $1,50 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, bet hroniskiem testiem izmantotās RECETOX *D. magna* kultūras LC_{50} ir $1,91 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Abos gadījumos kultūru jutība atbilst standartā norādītajām robežām ($0,6 - 2,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

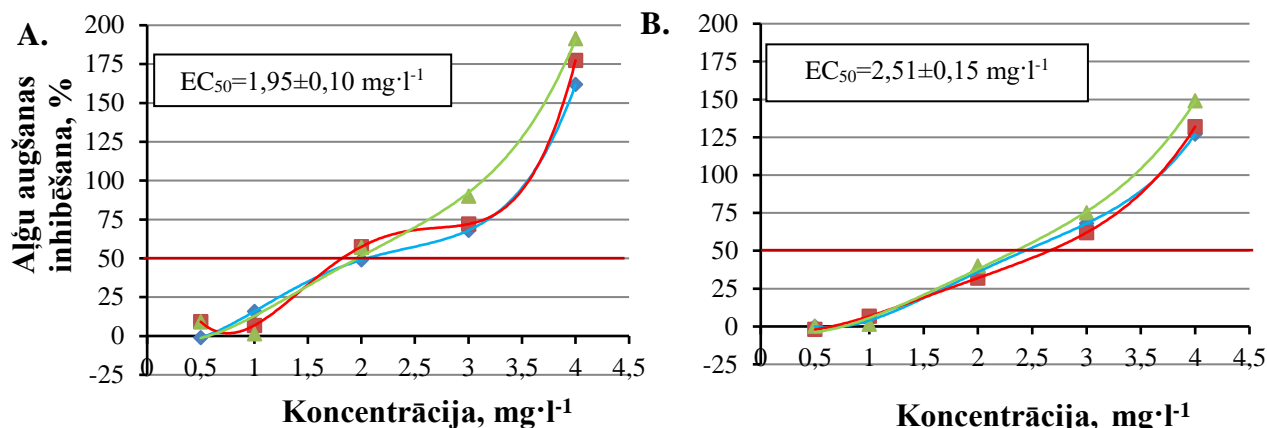


7. attēls. *Daphnia magna* kustību inhibēšana pēc 24 stundu eksponēšanas ar $K_2Cr_2O_7$ (kālija dihromātu) Latvijā esošai kultūrai (A) un RECETOX kultūrai (B).

Figure 7. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* after 24 h exposition at the presence of $K_2Cr_2O_7$ (potassium dichromate) of Latvian culture (A) and culture of RECETOX (B).

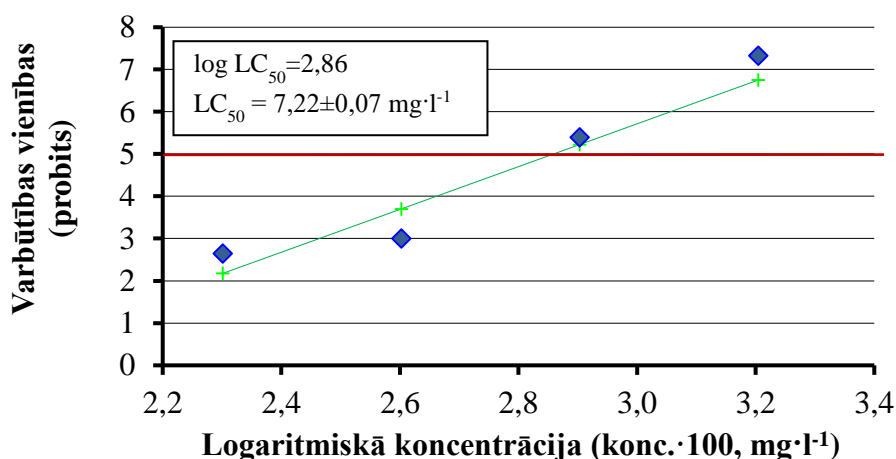
D. communis jutības pārbaudes testi tika veikti divas reizes, jo testi ar jaunizvēlētiem preparātiem “Metforal” un “Doxy-M-ratiofarm” tika veikti gandrīz gadu pēc visiem pārējiem. Noteiktās EC_{50} koncentrācijas $K_2Cr_2O_7$ ir $1,95 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ un $2,51 \pm 0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (8. attēls). Standartā nav norādītas *D. communis* EC_{50} robežas kālija dihromātam, tomēr pēc eksperimentu rezultātiem līdzīgai sugai *D. subspicatus* EC_{50} vērtība ir $0,84 \pm 0,12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (ISO 8692 2012) un citai līdzīgai sugai *Scenedesmus quadricauda* – $2,70 \pm 0,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Putna 2010).

Artemia salina kālija dihromāta subletālā koncentrācija pēc 48 stundu eksponēšanas ir $7,22 \pm 0,07 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (9. attēls). Jutības robežas nav definētas, jo metode nav standartizēta, bet pēc citu pētījumu rezultātiem LC_{50} pēc 24 st. eksponēšanas ar kālija dihromātu sastāda no 32 līdz $130 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, bet pēc 72 st. eksponēšanas – $3,8 \pm 0,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Swensson *et al.* 2005; Jeyaratnama *et al.* 2016; Togulga 1998; Putna 2010). Līdzīgai sugai *A. franciscana* LC_{50} ir no 9 līdz $17,07 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ocaranza-Roya *et al.* 2019).



8. attēls. Zaļāļģu *Desmodesmus communis* augšanas inhibēšana pēc 72 stundu ekspozīcijas ar $K_2Cr_2O_7$ 2018. gada augustā (A) un 2019. gada aprīlī (B). Katra līkne atbilst vienam atkārtojumam.

Figure 8. Growth inhibition of green alga *Desmodesmus communis* after 72 h exposition to $K_2Cr_2O_7$ in August 2018 (A) and May 2019 (B). Each curve represents one replication.



9. attēls. *Artemia salina* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar $K_2Cr_2O_7$ (kālija dihromātu).

Figure 9. Inhibition of mobility of *Artemia salina* after 48 h exposition at the presence of $K_2Cr_2O_7$ (potassium dichromate).

3.2. Aļģu augšanas inhibēšanas testu rezultāti

Aļģu augšanas inhibēšanas testos noteiktās NOEC, LOEC un EC_{100} , koncentrācijas ir parādītas 9. tabulā. NOEC parāda testorganismiem netoksisku testa koncentrāciju (nav statistiski būtiskas atšķirības no kontroles grupas). Lielākai daļai no testētiem preparātiem pie koncentrācijas zem $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ netika novērota aļģu augšanas inhibēšana, izņemot trīs

preparātus: “Suprastin”, “Neiromidin” un “Betamaks”, kuru netoksiskā koncentrācija pēc aktīvās vielas ir zem 5 mg·l⁻¹. Paracetamolu saturošam preparātam pie mazākās testa koncentrācijas jau tika novērota būtiska aļģu augšanas samazināšanās, bet pēc paraugkopu salīdzināšanas iegūtā p-vērtība ir 0,0586, kas ir ļoti tuvu būtiskuma līmenim 0,05, tādā atšķirība no kontroles grupas ir niecīga un NOEC koncentrācija ir nedaudz zemāka par 20 mg·l⁻¹. Pie augstākām testa koncentrācijām (divas reizes lielāka) jau bija novērota aļģu augšanas samazināšanās. NOEC un LOEC vērtības tika noteiktas pēc nominālajām testa koncentrācijām, tāpēc standartnovirzes nav norādītas. Precīzākai šo vērtību noteikšanai būtu nepieciešams veikt atsevišķus testus ar daudz šaurāku koncentrāciju spektru.

Pie koncentrācijas 30-40 mg·l⁻¹ tika pilnībā inhibēta aļģu augšana preparātu “Suprastin”, “Betamaks” un “Neiromidin” kļātbūtnē, bet pārējiem preparātiem tikai pie koncentrācijas virs 100 mg·l⁻¹. Pie koncentrācijām, kas pārsniedz EC₁₀₀, tika novērota augšanas inhibēšana, kas sasniedz pat 150%. Tas nozīmē, ka aļģes kultūra ne tikai pārstājušas augt, bet tās arī atmirst.

9. tabula

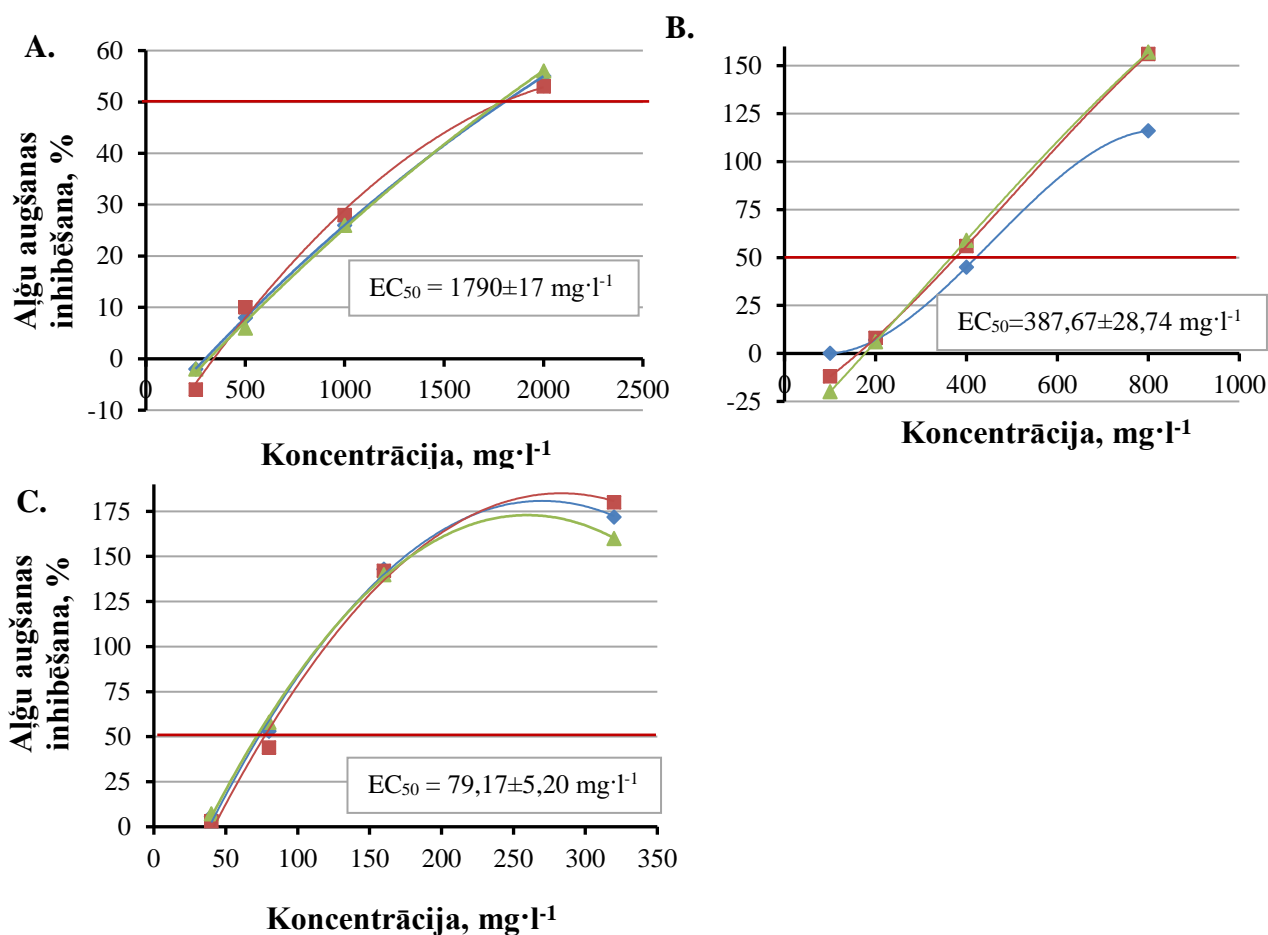
Testēto farmaceitisko produktu NOEC, LOEC un EC₁₀₀ pēc aļģu augšanas inhibēšanas testu rezultātiem.

Table 9.

NOEC, LOEC and EC₁₀₀ values of tested pharmaceutical products according to algae growth inhibition test results

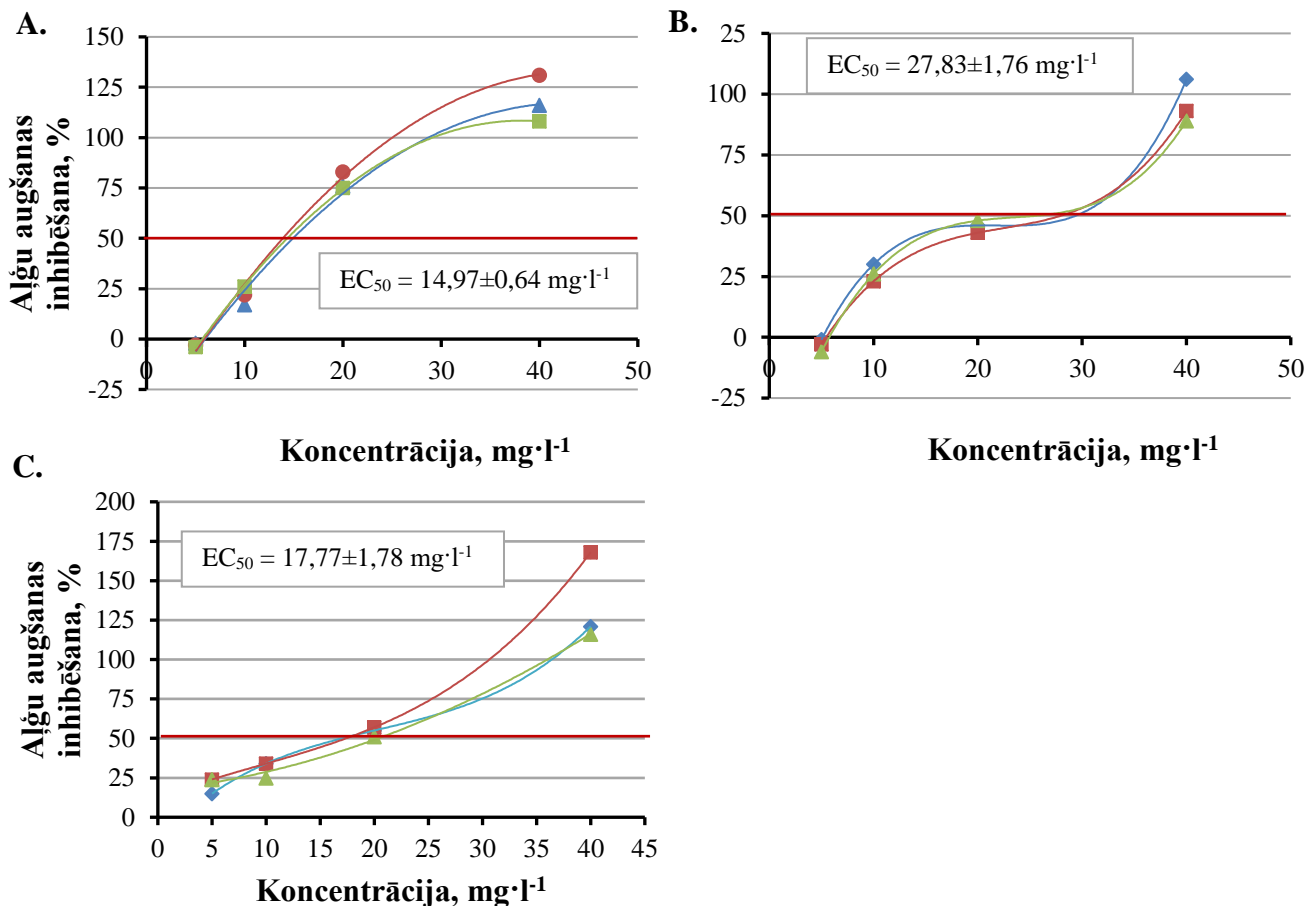
Farmaceutiskais produkts	Aktīvā farmaceutiskā viela	NOEC, mg·l⁻¹	LOEC, mg·l⁻¹	EC₁₀₀, mg·l⁻¹
„Ospamox”	Amoksicilīns	250	500	-
„Ibuprofen-Grindeks”	Ibuprofēns	100	200	600
„Paracetamol”	Paracetamols	10	20	120
„Olfen”	Diklofenaks (nātrija sāls)	10 < NOEC < 20	40	100
„Betamaks”	Sulpirīds	5	10	40
„Neiromidin”	Ipidakrīna hidrohlorīds	5	10	30
„Suprastin”	Hlorpiramīna hidrohlorīds	<5	5	35
“Metforal”	Metformīns	20	40	110
“Doxy-M-ratiofarm”	Doksiciklīns	20	40	130

Aļģu augšanas inhibēšanas grafiki un EC_{50} ir parādīti 10., 11. un 12. attēlā. Preparātam „Ospamox” nevarēja noteikt aļģu augšanas inhibēšanu koncentrācijai virs $2000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, jo suspendētās palīgvielu daļiņas apgrūtināja precīzu hlorofila *a* fluorescences mērīšanu. Lai novērstu šo problēmu, varētu veikt aļģu šūnu augšanas noteikšanu ar tiešo metodi t.i. ar šūnu skaitīšanu, kā arī izmantot organisku šķīdinātāju, vienlaicīgi nosakot paša šķīdinātāja toksiskumu. Preparāti ar **sulpirīdu**, **ipidakrīnu** un **hloropiramīnu** raksturojas ar salīdzinoši **augstu** toksiskumu (EC_{50} no **15 līdz 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$**). Preparātiem ar **metformīnu**, **doksiciklīnu** un **diklofenaku** ir **vidējs** toksiskums (EC_{50} no **50 līdz 70 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$**), kamēr amoksicilīnu, ibuprofēnu un paracetamolu raksturojas ar relatīvi zemu toksiskumu ($EC_{50} > 80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).



10. attēls. Zaļāļģu *Desmodesmus communis* augšanas inhibēšana pēc 72 stundu ekspozīcijas ar preparātu „Ospamox” (AFV: amoksicilīns) (A), „Ibuprofen-Grindeks” (AFV: ibuprofēns) (B), „Paracetamol” (AFV: paracetamols) (C).

Figure 10. Growth inhibition of green alga *Desmodesmus communis* after 72 h of exposition to drug „Ospamox” (API: amoxicillin) (A), „Ibuprofen-Grindeks” (API: ibuprofen) (B), „Paracetamol-Grindeks” (API: paracetamol) (C).



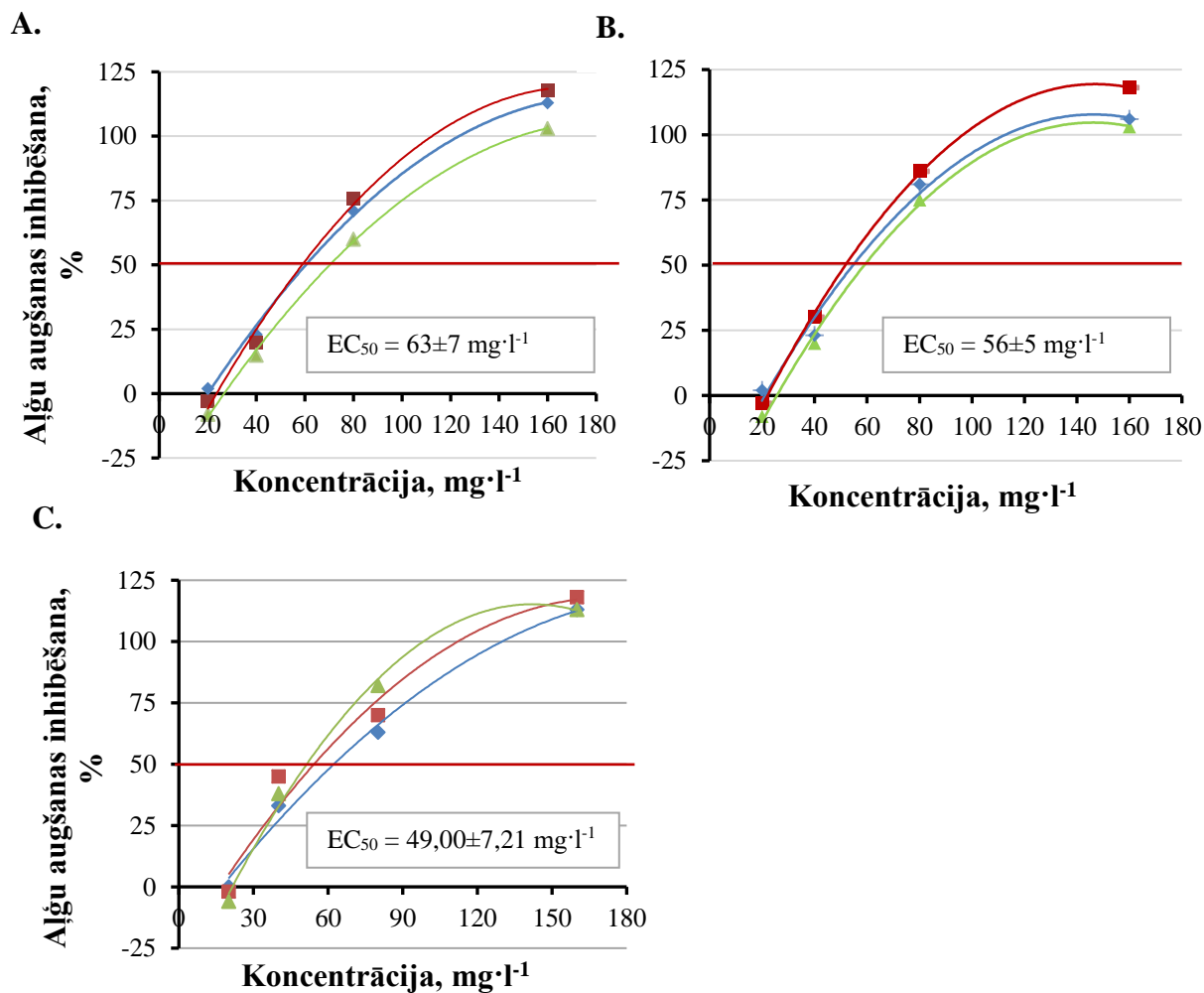
11. attēls. Zaļāļģu *Desmodesmus communis* augšanas inhibēšana pēc 72 stundu ekspozīcijas ar preparātu „Neiromidin” (AFV: ipidakrīna hidrohlorīds) (A), „Betamaks” (AFV: sulpirīds) (B) un „Suprastin” (AFV: hlorpiramīna hidrohlorīds) (C).

Figure 11. Growth inhibition of green alga *Desmodesmus communis* after 72 h of exposition to drug „Neiromidin” (AFV: ipidacrine hydrochloride) (A), „Betamaks” (AFV: sulpiride) (B) un „Suprastin” (AFV: chloropyramine hydrochloride) (C).

Preparāti ar metformīnu un doksiciklīnu uzrādīja līdzīgu toksiskuma pakāpi un abiem preparātiem ir līdzīgs toksiskās iedarbības profils – pie koncentrācijas ap $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tika novērota 25%-īga augšanas inhibīcija, bet pie $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tā sasniedza 70 - 80%, tomēr doksiciklīnu saturošam preparātam novēro nedaudz mazāku toksisku efektu (12. attēls).

Katrs farmaceitiskais produkts dažādi ietekmēja aļģu augšanas ātrumu un to var spriest pēc grafīku līkņu formas. Interesanti, ka divu preparātu - „Ospamox”, „Ibuprofen-Grindeks” – izraisītā aļģu augšanas inhibēšana bija aptuveni proporcionāla šo produktu koncentrācijai (grafīki ir līdzīgi taisnēm) (10. A. un 10. B. attēls). Tātad abi šie produkti izraisa pakāpenisku aļģu augšanas inhibēšanu līdz ar koncentrācijas pieaugumu, kas nav tipiski toksikanta koncentrācijas-atbildes reakcijas līknei.

Preparātiem „Paracetamol-Grindeks”, „Olfen”, „Neiromidin”, „Doxy-M-ratiofarm” un „Metforal” tika novērota inhibēšanas straujuma samazināšanās, koncentrācijai pārsniedzot 100-īgās aļģu inhibēšanas sliekšni (10. C., 12. A, B, C., 11. A. attēls).



12. attēls. Zaļāļģu *Desmodesmus communis* augšanas inhibēšana pēc 72 stundu ekspozīcijas ar preparātu „Doxy-M-ratiofarm” (AFV: doksiciklīns) (A) un „Metforal” (AFV: metformīns) (B) un „Olfen” (AFV: diklofenaks) (C).

Figure 12. Growth inhibition of green alga *Desmodesmus communis* after 72 h of exposition to drug „ Doxy-M-ratiofarm” (AFV: doxyxycline) (A), „Metforal” (AFV: metformin) (B) and „Olfen” (API: diclofenac) (C).

3.3. *Daphnia magna* Straus kustību inhibēšanas testu rezultāti

D. magna kustību inhibēšanas testos noteiktās NOEC, LOEC un EC₁₀₀, koncentrācijas ir parādītas 10. tabulā. Lielākai daļai preparātu netoksiskā koncentrācija ir zem 20 mg·l⁻¹. Preparātiem ar sulpirīdu, hlorpiramīnu un ipidakrīnu NOEC ir būtiski zemāka šo preparātu augstā toksiskuma dēļ. Preparātam “Suprastin” ar hlorpiramīnu pie koncentrācijas 1 mg·l⁻¹ tika novērota dafniju mirstība pat mazāk jutīgai RECETOX kultūrai. Kustību inhibēšana “Betamaks” un “Neiromidin” klātbūtnē tika novērota pie koncentrācijas 10 mg·l⁻¹, bet pārējiem preparātiem sākot ar 40 mg·l⁻¹ sliksni.

10. tabula

Testēto farmaceitisko produktu NOEC, LOEC un EC₁₀₀ pēc *D. magna* kustību inhibēšanas testa.

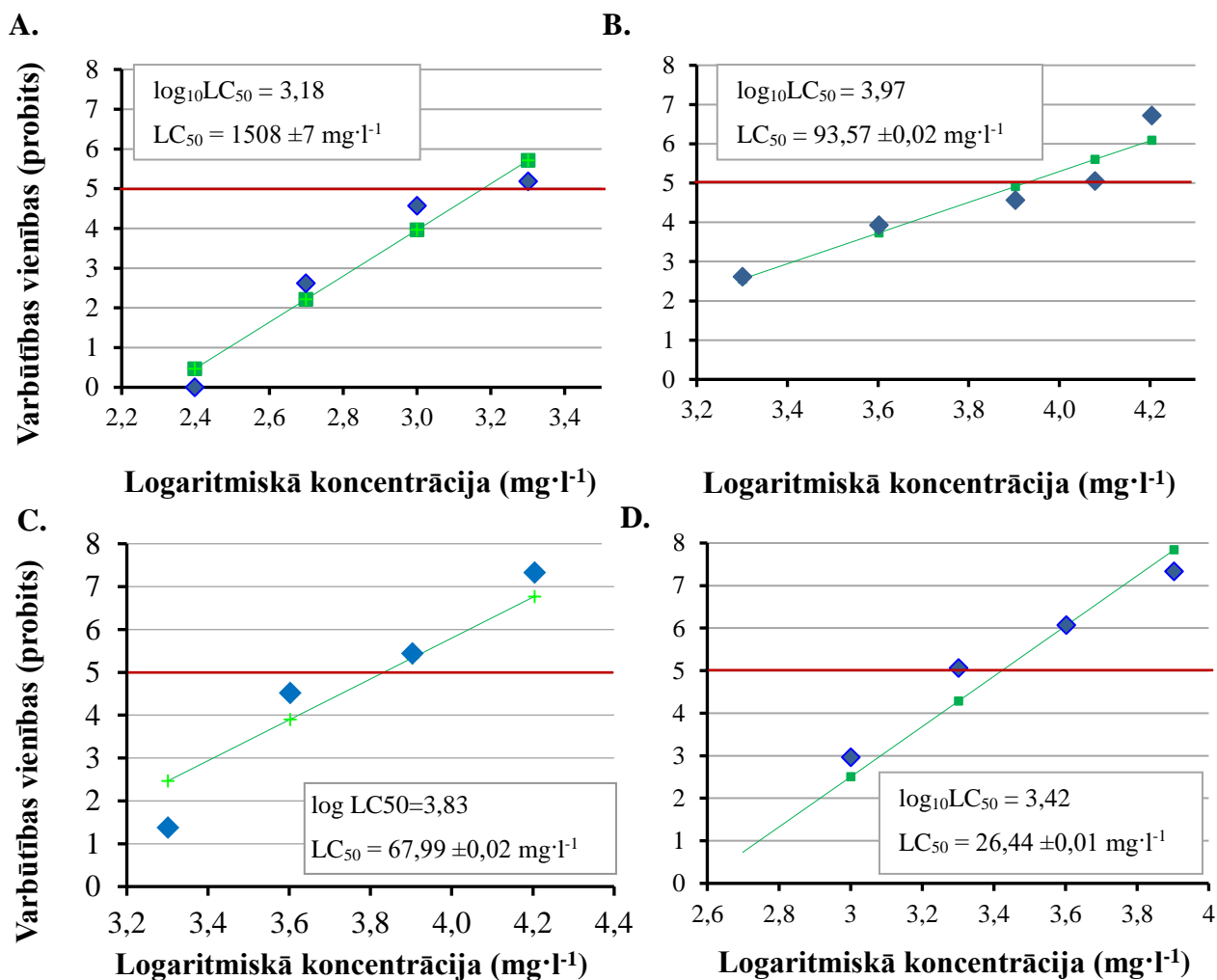
Table 10.

NOEC, LOEC and EC₁₀₀ values of tested pharmaceutical products according to *D. magna* immobilization test.

Farmaceutiskais produkts	Aktīvā farmaceitiskā viela	NOEC, mg·l ⁻¹	LOEC, mg·l ⁻¹	LC ₁₀₀ , mg·l ⁻¹
„Ospamox”	Amoksicilīns	250	500	>2000
„Ibuprofen-Grindeks”	Ibuprofēns	20	40	240
„Paracetamol”	Paracetamols	20	40	160
„Olfen”	Diklofenaks (nātrija sāls)	20	40	100
„Betamaks”	Sulpirīds	5	10	>40
„Neiromidin”	Ipidakrīna hidrochlorīds	5	10	40
„Suprastin”	Hlorpiramīna hidrochlorīds	0,5 < NOEC < 1	1	>8
“Metforal”	Metformīns	20	40	>110
“Doxy-M-ratiofarm”	Doksiciklīns	16	>32	128

Līdzīgi kā aļģu augšanas inhibēšanas testā, pilnīga testorganismu kustību inhibēšana tika novērota pie toksikantu koncentrācijām, kas pārsniedz $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, izņemot trīs toksiskākos preparātus “Suprastin”, “Betamaks” un “Neiromidin”. Ja, piemēram, pie koncentrācijas $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ metformīnu saturoša preparāta gadījumā tika imobilizēta tikai neliela daļa no testorganismiem, tad ipidakrīnu saturoša preparāta gadījumā pie tās pašas koncentrācijas pilnīgi visi testorganismi tika imobilizēti. Preparātam “Suprastin” letālā koncentrācija ir aptuveni četras reizes mazāka.

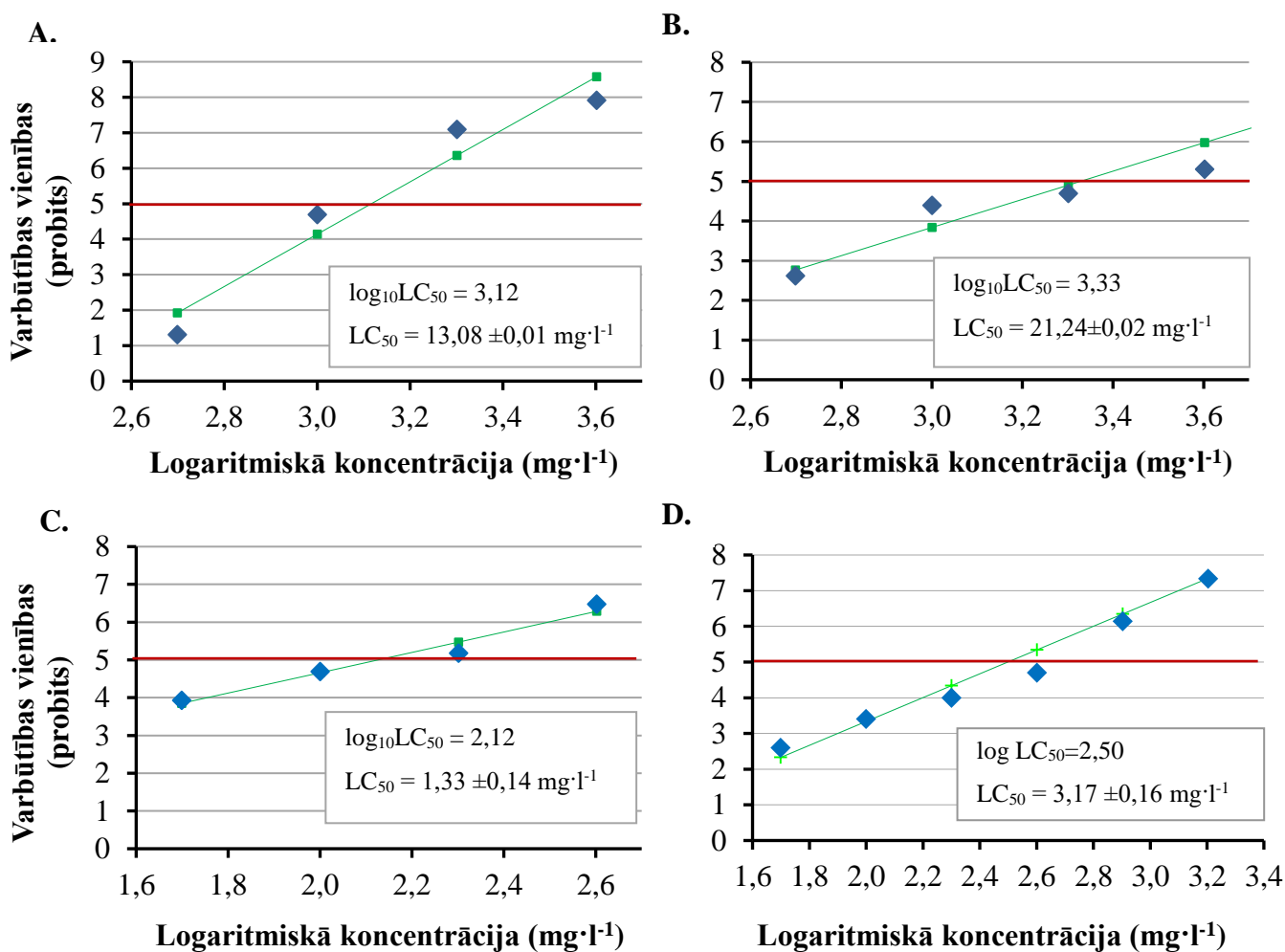
D. magna kustību inhibēšanas testu rezultāti ir parādīti 13, 14. un 15. attēlā.



13. attēls. *Daphnia magna* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar preparātu „Ospamox” (A), „Ibuprofen-Grindeks” (B), „Paracetamol” (C) un „Olfen” (AFV: diklofenaks) (D).

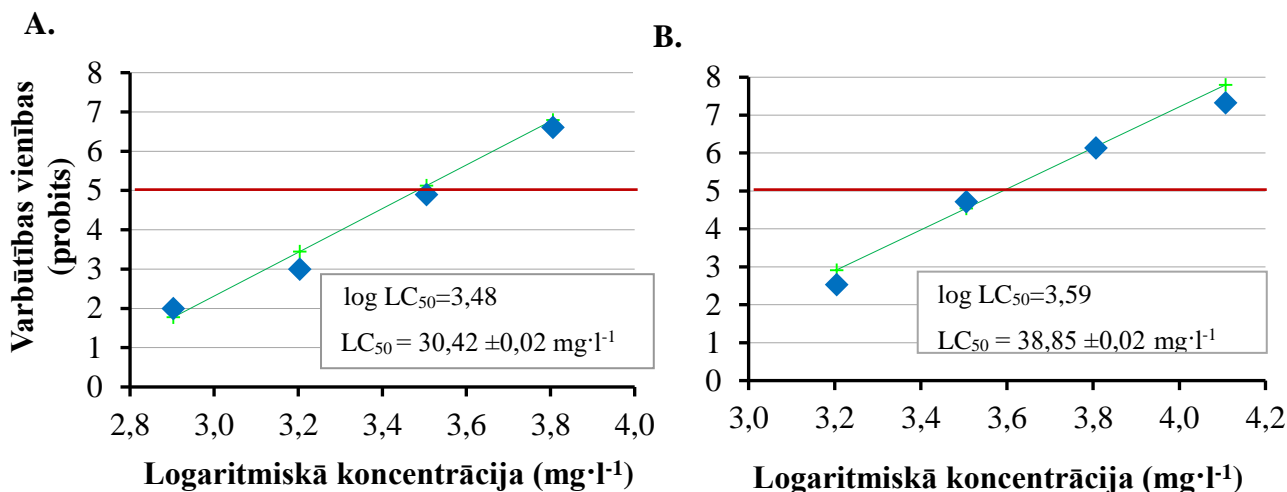
Figure 13. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* after 48 h of exposition to drug „Ospamox” (A), „Ibuprofen-Grindeks” (B), „Paracetamol-Grindeks” (C), „Olfen” (D).

Subletālās koncentrācijas testētiem preparātiem būtiski atšķirās. Daži preparāti, kā, piemēram, “Ospamox”, “Ibuprofen-Grindeks”, uzrādīja zemu salīdzinoši toksiskumu, kamēr subletālās koncentrācijas preparātiem “Betamaks”, “Neiromidin” un “Suprastin” sastāda attiecīgi 13, 21 un 3 mg·l⁻¹. Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu toksiskums ir ļoti atšķirīgs: diklofenaku saturošs farmaceitiskais līdzeklis “Olfen” jau pie koncentrācijas 26 mg·l⁻¹ 50%-īgi imobilizē *Daphnia magna*. “Metforal” un “Doxy-M-ratiofarm” preparāti uzrādīja ļoti līdzīgu toksiskumu, 50%-īgi inhibējot dafniju kustības attiecīgi pie koncentrācijām 30 un 39 mg·l⁻¹. Toksiskais efekts tika novērots pārsvarā otrajā ekspozīcijas dienā.



14. attēls. *Daphnia magna* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar preparātu „Neiromidin” (A), „Betamaks” (B), „Suprastin” ar Latvijas (C) un RECETOX (D) kultūru.

Figure 14. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* after 48 h of exposition to drug „Neiromidin” (A), „Betamaks” (B), „Suprastin” with Latvian (C) and RECETOX culture (D).



15. attēls. *Daphnia magna* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar preparātu „Metforal” (A) un „Doxy-M-ratiofarm” (B).

Figure 15. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* after 48 h of exposition to drug „Metforal” (A) and „Doxy-M-ratiofarm” (B).

Testu veikšanas gaitā ir novērots, ka tādi preparātu, kā „Paracetamol”, „Neiromidin” un „Suprastin”, inhibējošā ietekme parādās dažu stundu laikā un laika posmā no aptuveni 24 līdz 48 stundām pēc testa uzsākšanas inhibēto organismu skaits katrā no mikroplates iedobēm nepalielinājās. Tas var būt skaidrojams ar aktīvo farmaceitisko vielu sabrukšanu šķīdumā. Tika novērots, ka pie ļoti mazām „Suprastin” produkta koncentrācijām (vidēji 0,1 mg·l⁻¹) tiek samazināts *D. magna* kustību ātrums, salīdzinot ar kontroli.

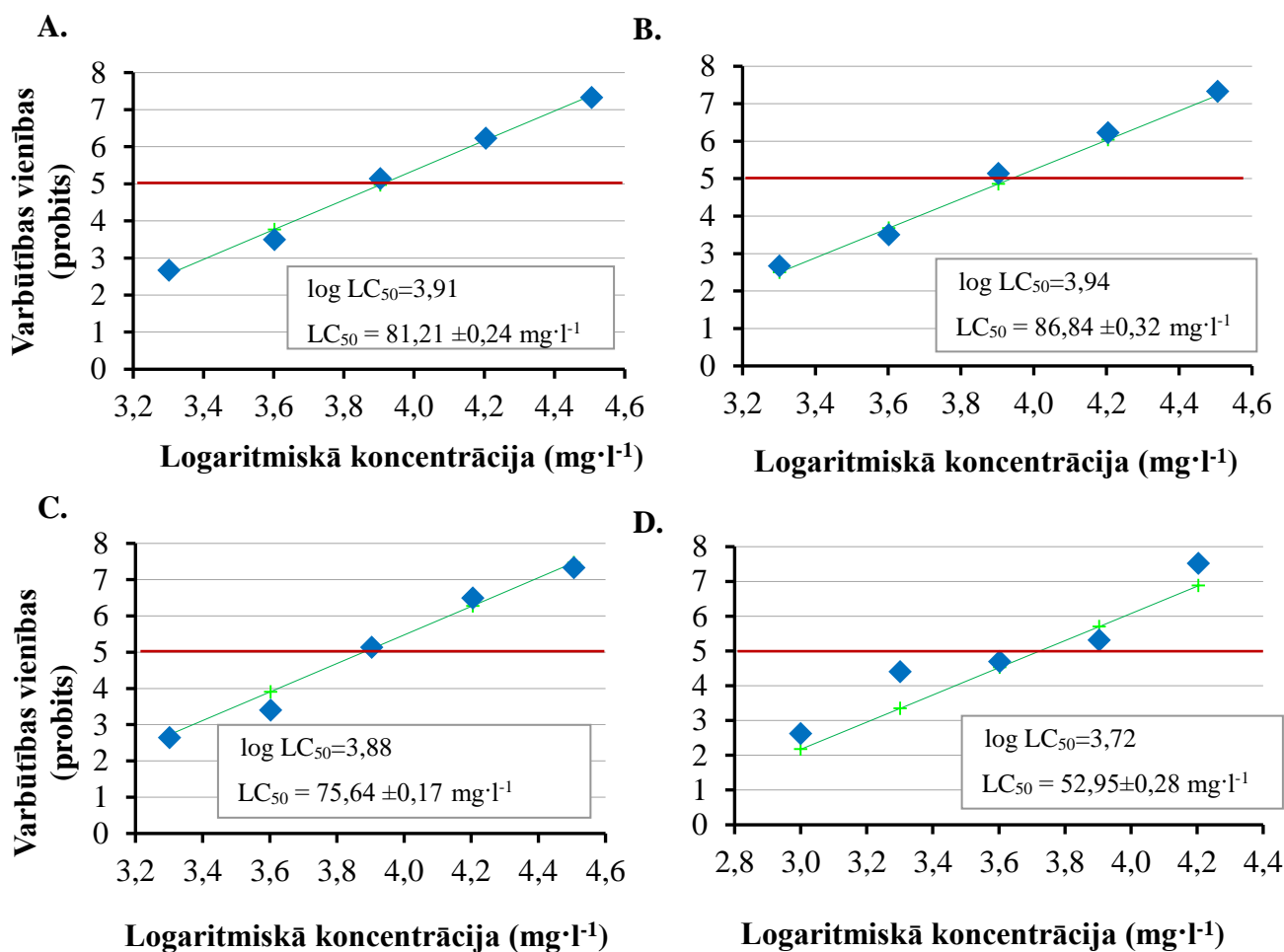
Atkārtotā testā ar “Suprastin”, kas veikts labākai interkalibrācijai starp divām rezultātu grupām no dažādām *D. magna* kultūrām, subletālā koncentrācija ir 3,17 mg·l⁻¹ (14. D. attēls), kas lielā mērā var būt saistīts ar nedaudz zemāku RECETOX dafniju jutību pēc jutības pārbaudes testu rezultātiem.

3.4. *Artemia salina* kustību inhibēšanas testu rezultāti

Pēc divu iepriekšējo akūto testu rezultātiem “Ospamox” un “Ibuprofen-Grindeks” ir atzīti par vismazāk toksiskiem un netika testēti ar *A. salina*. NOEC preparātiem “Metforal”, “Doxy-M-ratiofarm” un “Olfen” ir 20 mg·l⁻¹, “Betamaks” un “Neiromidin” – 10 mg·l⁻¹, bet “Suprastin” – tikai 5 mg·l⁻¹. LOEC koncentrācijas visos gadījumos ir divas reizes lielāks par NOEC vērtību. Preparātu letālās koncentrācijas ir virs 100 mg·l⁻¹, izņemot “Suprastin” gadījumu, kur koncentrācija 40 mg·l⁻¹ ir bijusi letāla visām artēmijām. *A. salina* kustību

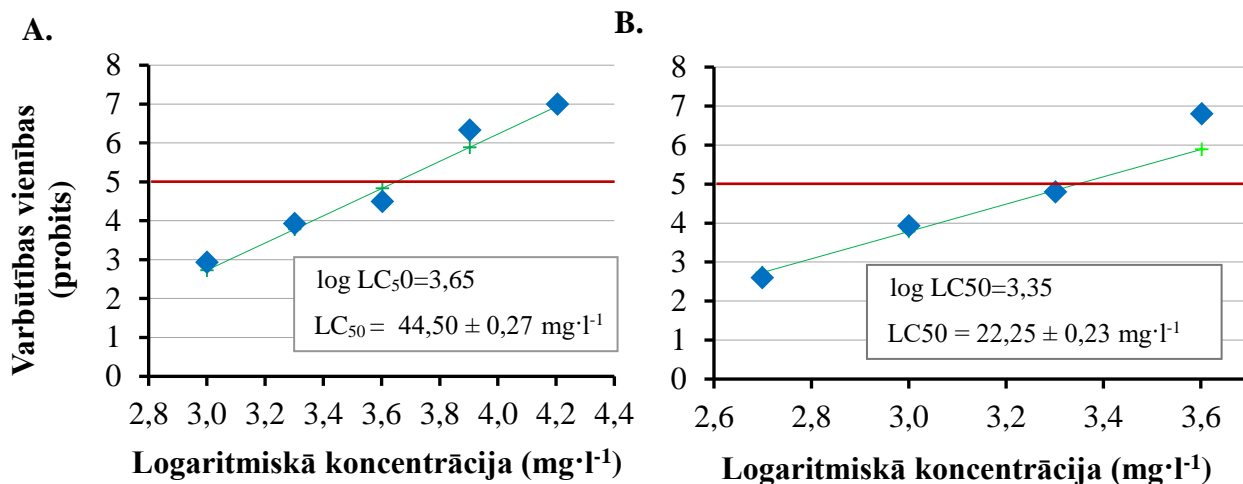
inhibēšanas testu rezultāti ir atspoguļoti 16. un 17. attēlā. Kopumā visi testētie preparāti uzrādīja vidēju toksiskumu, 50%-īgi inhibējot artēmiju kustības pie koncentrācijām **20-85 mg·l⁻¹**.

Testu veikšanas laikā ir novērots, ka gandrīz visos gadījumos toksikantu efekts parādījās tikai otrajā diennaktī pēc testu uzsākšanas. Atšķirībā no *D. magna*, kurām kustību inhibīcija pirmajā testa dienā diezgan bieži izpaudās kā ļoti lēnas un vājas antenu kustības, organismam paliekot uz vietas, artēmijas diezgan veiksmīgi pārvietojās uz priekšu pat ar vājām kustībām. Tas var būt saistīts ar atšķirīgu šo dzīvnieku morfoloģiju: artēmijām ir torpēdveida ķermenis, bet dafniju mazuļiem noapaļots karapakss.



16. attēls. *Artemia salina* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar preparātu „Olfen” (A) un „Doxy-M-ratiofarm” (B), “Metforal” (C) un “Betamax” (D).

Figure 16. Inhibition of mobility of *Artemia salina* after 48 h of exposition to drug „Olfen” (A) and „Doxy-M-ratiofarm” (B).



17. attēls. *Artemia salina* kustību inhibēšana pēc 48 stundu eksponēšanas ar preparātu „Neiromidin” (A) un „Suprastin” (B).

Figure 17. Inhibition of mobility of *Artemia salina* after 48 h of exposition to drug „Neiromidin” (A) and „Suprastin” (B).

3.5. *Daphnia magna* reprodukcijas testu rezultāti

Hroniskos testos noteiktās NOEC, LOEC un EC₁₀₀ koncentrācijas ir parādītas 11. tabulā. Testi ir veikti, izvēloties četrus toksiskākos un biežāk lietojamus preparātus: “Metforal”, “Paracetamol”, “Suprastin” “Doxy-M-ratiofarm”, vadoties no akūto testu rezultātiem, laika ierobežojuma dēļ.

11. tabula

Testēto farmaceitisko preparātu NOEC, LOEC un efektīvā mediālā koncentrācija pēc *D. magna* reprodukcijas testu rezultātiem.

Table 11.

NOEC, LOEC and effective median concentration of tested pharmaceutical products according to *D. magna* reproduction test results.

Farmaceutiskais produkts	NOEC, mg·l ⁻¹	LOEC, mg·l ⁻¹	EC ₅₀ , mg·l ⁻¹	EC ₁₀₀ , mg·l ⁻¹
“Paracetamol”	4	8	13,17±0,18	>16
“Metforal”	4	8	13,42 ±0,26	>16
“Doxy-M-ratiopharm”	1	2	3,08 ±0,07	8
“Suprastin”	0,125	0,25	0,25±0,1	1

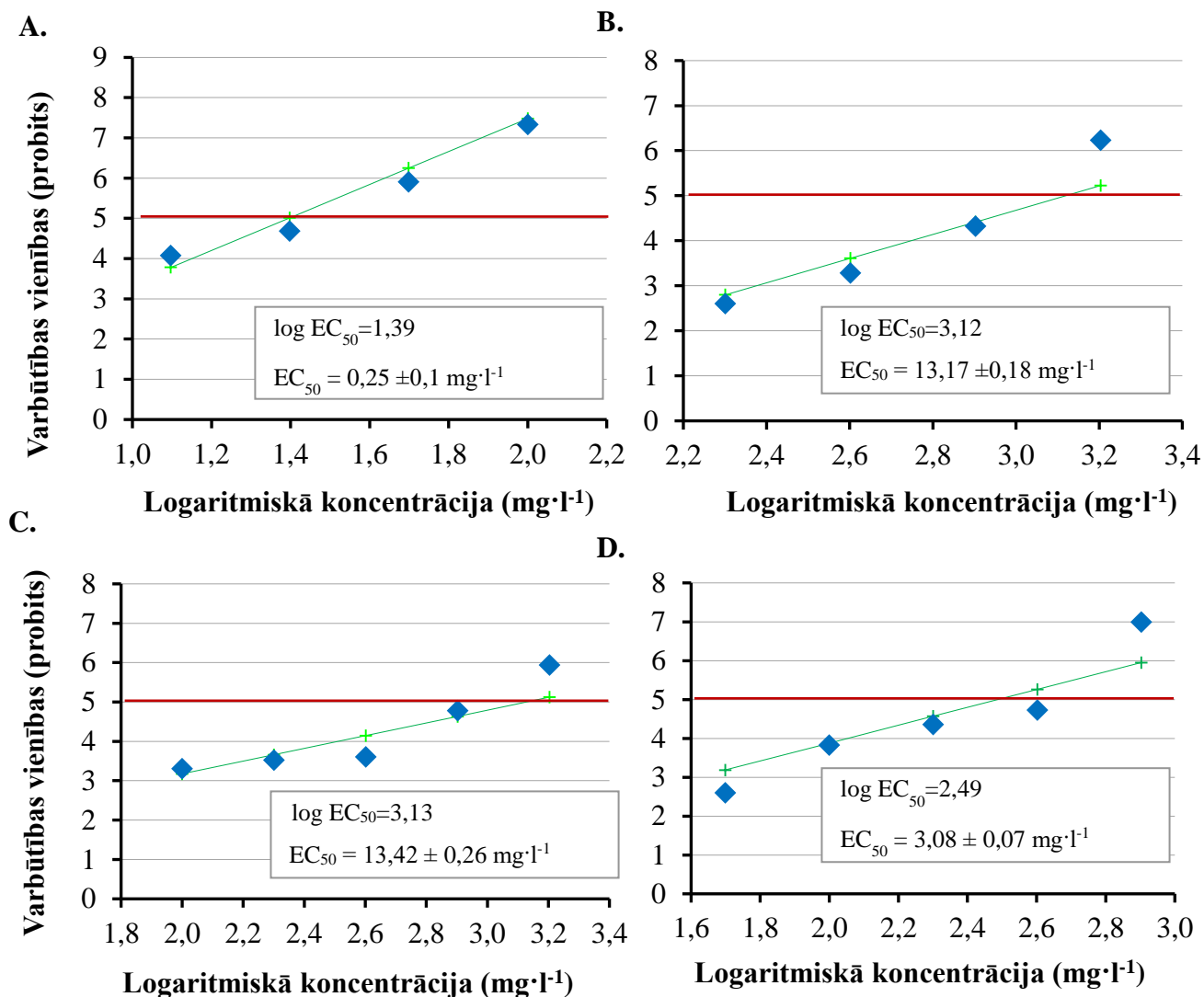
Reprodukcijas testu rezultāti ir parādījuši, ka, hroniski iedarbojoties uz *D. magna*, NOEC vērtības ir daudz mazākas nekā akūto testu gadījumā un sastāda no **0,125** līdz **4 mg·l⁻¹**. Ietekme uz vēžveidīgo reprodukcijas spējām novērota jau pie koncentrācijām līdz **8 mg·l⁻¹**. Arī šajā testā “**Suprastin**” uzrādīja **visaugstāko** toksiskumu, pie koncentrācijas **1 mg·l⁻¹** pilnībā inhibējot dafniju vairošanās spējas.

Līdz ar preparātu koncentrācijas pieaugumu tika novērota arī mātīšu mirstība, un tika pierādīta pozitīva korelācija starp toksikanta koncentrāciju un dafniju mirstību. Piemēram, “Doxy-M-ratiofarm” un “Suprastin” gadījumā ir novērota *D. magna* mātīšu mirstība pie koncentrācijām, kas vismaz par 20-30% samazina to reprodukcijas spējas. Tādējādi, preparātu klātbūtne ne tikai ietekmē *D. magna* vairošanās spējas, bet arī izraisa **vecāku organismu bojāeju**. Vērts atzīmēt, ka doksiciklīnu un hlorpiramīnu saturoša preparāta testā pie augstākām koncentrācijām (attiecīgi 1 mg·l⁻¹ un 8 mg·l⁻¹) tika pilnībā nomākta dafniju vairošanās. Vērts atzīmēt, ka RECETOX kultūra ir mazāk jutīga un, veicot tādus pašus testus ar Latvijas kultūru, iegūtās vērtības varētu būt vēl zemākas.

Pēc hronisko testu rezultātiem četru preparātu toksiskums ir ļoti atšķirīgs. Testu veikšanas laikā izrādījās, ka līdz ar koncentrācijas pieaugumu samazinājās ne tikai jauno organismu skaits katrai mātītei, bet arī samazinājās to kopējā aktivitāte: pie augstām koncentrācijām *D. magna* mātītes bieži atradās uz vārglāzes dibena un gandrīz nepeldēja uz augšu vai uz priekšu. Šķidumu mainīšanas laikā, kad tās tika kairinātas, aktivitāte atjaunojās tikai uz neilgu laiku.

Testēto preparātu efektīvās mediālās koncentrācijas ir parādītas 18. attēlā. “Paracetamol” un “Metforal” preparātiem nav būtiskas atšķirības rezultātos, tiem sakrīt arī 5. tabulā norādītie parametri. Šajā testā “**Doxy-M-ratiofarm**” uzrādīja ļoti **augstu** toksiskumu, kas ir tuvs preparāta “**Suprastin**” toksiskumam. Tas var būt saistīts ar specifisku aktīvās vielas iedarbību: šajā gadījumā tiek noteikta toksikanta ietekme nevis uz vispārīgu izdzīvotību, bet uz konkrēto organisma funkciju – partenogēnētisku vairošanos.

“Suprastin” preparātam LOEC un EC₅₀ vērtības sakrīt. Tas ir saistīts ar to, ka NOEC un LOEC netiek iegūtas ar regresijas modeļa palīdzību - tās ir nominālās koncentrācijas, tāpēc, pirmkārt, to vērtības var būt ļoti atkarīgas ar pašu izvēlēto testa koncentrāciju izvēli un, otrkārt, ar iegūto regresijas modeli. Dotajā gadījumā EC₅₀ bija sasniegta pie otrās zemākās koncentrācijas, tāpēc precīzākai LOEC un NOEC noteikšanai būtu nepieciešams atkārtoti veikt testu ar koncentrācijām zem 0,125 mg·l⁻¹ un ar reizinājumu 1,2 nevis 2, kā tas tika darīts šajos eksperimentos. NOEC un LOEC noteikšanas trūkumi norādīti OECD 211:2012 standartā un šīm vērtībām nevar noteikt kļūdu, jo tās ir tikai nominālas koncentrācijas.



18. attēls. *Daphnia magna* reprodukcijas samazināšanās pēc 21 dienas eksponēšanas ar preparātu „Suprastin” (A), „Paracetamol” (B), “Metforal” (C) un “Doxy-M-ratiofarm” (D).

Figure 18. Reproductive output of *Daphnia magna* after 21 d of exposition to drug „Suprastin” (A), „Paracetamol” (B), “Metforal” (C) and “Doxy-M-ratiofarm” (D).

3.6. Iegūto datu kvalitātes izvērtēšana

D. magna Straus un *A. salina* kustību inhibēšanas testu rezultātu apstrādes laikā izveidotie regresijas modeļi bija būtiski (p -vērtības $<0,05$ pie būtiskuma līmeņa $\alpha_1=0,05$) un gan izejas datu, gan iegūto LC_{50} vērtību standartnovirzes visos gadījumos bija ļoti mazas. Aļģu augšanas inhibēšanas testu rezultāti bija mazāk precīzi, jo EC_{50} vērtības tika noteiktas ar grafisku metodi. *D. magna* un aļģu testu gadījumos ir ievēroti tiem norādītie validitātes kritēriji, ieskaitot kontroles grupu parametrus, nebija izlecošu vērtību, tāpēc visi veiktie eko-

toksicitātes rezultāti tika atzīti par derīgiem. *A. salina* testos izdzīvotība kontroles grupā arī bija augsta, tāpēc izvēlētie testa apstākļi ir bijuši optimāli to veikšanai. Aļģu augšanas inhibēšanas testos dažos gadījumos pie zemākām un netoksiskām testa koncentrācijām tika novērota labāka zaļāļģu augšana nekā kontrolē (negatīva augšanas inhibēšana), piemēram, “Olfen” un “Paracetamol” gadījumos pie koncentrācijām attiecīgi 20 mg·l⁻¹ un 100 mg·l⁻¹. To var izskaidrot ar normālu datu variāciju vai nedaudz nevienlīdzīgu aļģu šūnu blīvumu sākuma šķīdumos. Cits skaidrojums - medikamentos pievienotie cukuri (bieži tā ir laktoze) un citas vielas var labvēlīgi ietekmēt aļģu augšanu.

3.7. Testēto farmaceitisko produktu akūtā toksiskuma salīdzinājums

Pētījuma gaitā noteiktās EC₅₀ un LC₅₀ vērtības visiem testētiem farmaceitiskiem preparātiem ir norādītas 12. tabulā un 19. attēlā.

12. tabula

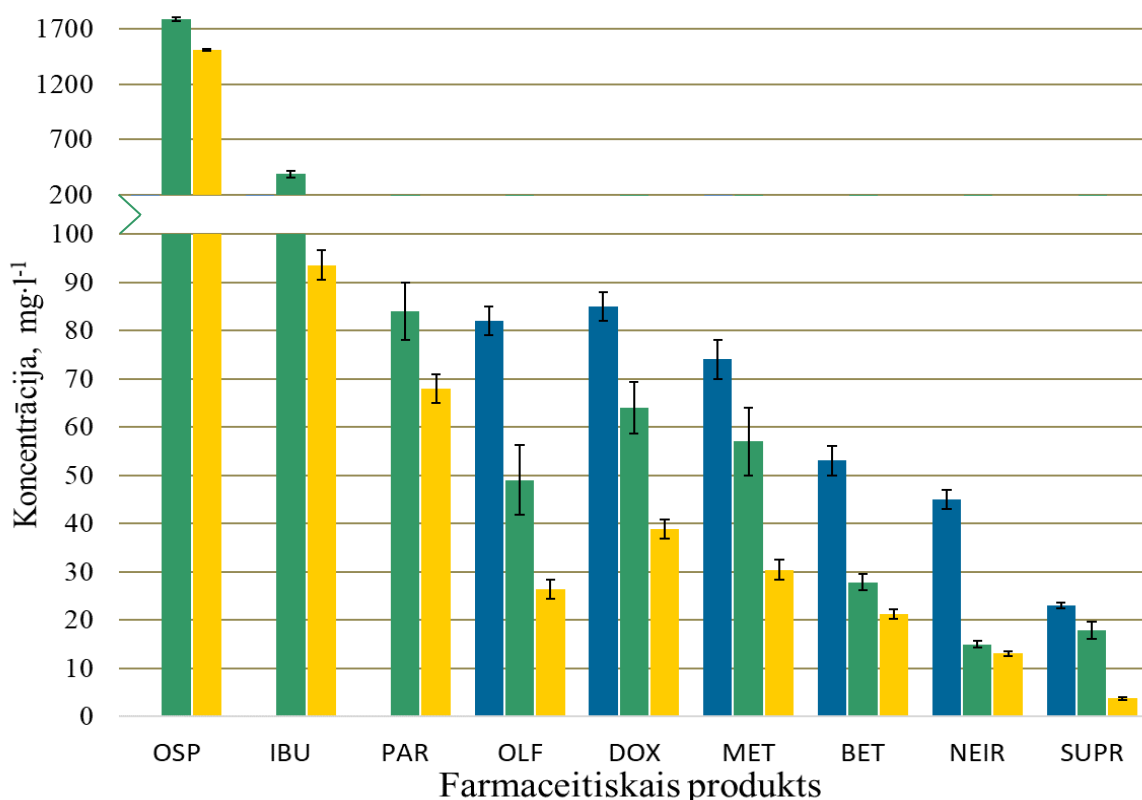
Aļģu augšanas inhibēšanas testa un *Daphnia magna* Straus kustību inhibēšanas testa rezultāti dažādiem farmaceitiskiem produktiem.

Table 12.

Results of algae growth inhibition test and *Daphnia magna* Straus movement immobilization test for different pharmaceutical products.

Farmaceutiskais produkts	Aktīvā farmaceitiskā viela	EC ₅₀ <i>Desmodesmus communis</i> , mg·l ⁻¹ ±s	LC ₅₀ <i>Daphnia magna</i> , mg·l ⁻¹ ±s	LC ₅₀ <i>Artemia salina</i> , mg·l ⁻¹ ±s
„Ospamox”	Amoksicilīns	1790±17	1508±7	-
„Ibuprofen-Grindeks”	Ibuprofēns	387,67±28,74	93,57±0,02	-
„Paracetamol”	Paracetamols	79,17±5,20	67,99±0,02	-
„Olfen”	Diklofenaks (nātrija sāls)	49,00±7,21	26,44±0,01	81,21 ±0,24
„Betamaks”	Sulpirīds	27,83±1,76	21,24±0,02	52,95±0,28
„Neiromidin”	Ipidakrīna hidrochlorīds	14,97±0,64	13,08±0,01	44,50 ± 0,27
„Suprastin”	Hlorpiramīna hidrochlorīds	17,77±1,78	1,33±0,14 3,17±0,16	22,25 ± 0,23
“Metforal”	Metformīns	56±5	30,42 ±0,02	75,64 ±0,17
“Doxy-M-ratiofarm”	Doksiciklīns	63±7	38,85 ±0,02	86,84 ±0,32

Visu testēto produktu toksiskums ir salīdzināts 19. attēlā. Katram no farmaceitiskiem produktiem būtiski atšķirās EC_{50} *D. communis*, LC_{50} *D. magna* un LC_{50} *Artemia salina* vērtības (standartnoviržu intervāli nepārklājās). Preparātu toksiskums variē no dažiem miligramiem uz litru līdz vairāk kā $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Visu testu rezultāti parādīja, ka toksiskākais preparāts ir **pretalerģijas līdzeklis „Suprastin”**, otrajā vietā ir **NS stimulators „Neiromidin”**, trešais toksiskākais preparāts ir **antidepresants „Betamaks”**. Tas ir aptuveni divas reizes mazāk toksisks nekā „Neiromidin”, bet „Betamaks” ir novērota izteikti straujāka inhibējošā iedarbība uz zaļajģēm līdz ar koncentrācijas palielināšanos nekā „Neiromidin”. Visiem minētiem produktiem literatūras datos iztrūkst eko-toksikoloģiskā informācija.



19. attēls. Testēto farmaceitisko produktu EC_{50} *D. communis* (zaļā krāsā) un LC_{50} *D. magna* (dzeltenā krāsā) un LC_{50} *A. salina* (zilā krāsā). (Apzīmējumi: OSP – „Ospamox”, IBU – „Ibuprofen-Grindeks”, PAR – „Paracetamol”, OLF – „Olfen”, MET – „Metforal”, DOX – „Doxy-M-ratiofarm”, BET – „Betamaks”, NEI – „Neiromidin”, SUPR – „Suprastin”).

Figure 19. EC_{50} *Desmodesmus communis* (blue columns) and LC_{50} *Daphnia magna* (red columns) of tested pharmaceutical products (Keys: OSP – „Ospamox”, IBU – „Ibuprofen-Grindeks”, PAR – „Paracetamol”, OLF – „Olfen”, MET – „Metforal”, DOX – „Doxy-M-ratiofarm”, BET – „Betamaks”, NEI – „Neiromidin”, SUPR – „Suprastin”).

Ļoti bieži lietojamiem preparātiem „Olfen”, „Paracetamol”, „Metforal” un “Doxy-M-ratiofarm” ir vidējs toksiskums, salīdzinājumā ar pārējiem. Tie izraisa organismu inhibēšanu koncentrāciju robežās no 30 līdz 90 mg·l⁻¹. Zemākais toksiskums ir preparātiem, kas satur ibuprofēnu un amoksicilīnu.

Akūto *D. magna* testu rezultāti parādīja, ka dafnijas ir būtiski jutīgākas par mikroskopiskām aļģēm *D. communis*. Pretalerģijas preparāts „Suprastin”, kas satur hlorspiramīna hidrohlorīdu, pie koncentrācijas tikai 1,33 - 3 mg·l⁻¹ izraisīja 50%-īgu *D. magna* mirstību. Clevers (2004) pētījuma rezultātos par farmaceitisko vielu toksiskumu LC₅₀ vērtības *D. magna* arī bija mazākas nekā EC₅₀ *Desmodesmus sp.*, tāpēc varētu izteikt pieņēmumu, ka *D. magna* ir jutīgāki testorganismi nekā zaļāļģes. Tomēr vadoties tikai pēc veikto testu rezultātiem grūti salīdzināt abu organismu jutību, jo *D. magna* Straus akūtā toksiskuma testos novērtēja imobilizēto īpatņu skaitu, bet aļģu testos – to augšanas inhibēšanu.

Artemia salina pēc visiem testu rezultātiem ir vismazāk jutīgie testorganismi no šajā pētījumā izmantotajiem. Ņemot vērā testu rezultātus, testa veikšanas metodiku un citu pētījumu rezultātus, var droši apgalvot, ka artēmijas kā testorganismi ir mazjutīgi, salīdzinot ar dafnijām. Līdzīgi kā pārējos testos, vistoksiskākie šiem organismiem ir preparāti ar hlorspiramīnu, ipidakrīnu un sulpirīdu. Nav būtiskas atšķirības starp “Olfen” un “Doxy-M-ratiofarm” toksiskumu šai testorganismu sugai, kaut gan pārējos testos ir skaidri redzams augstāks doksiciklīnu saturoša preparāta toksiskums. *A. salina* testiem ir savas priekšrocības kā viegla un ātra organismu kultivēšana, bet to jutības atšķirības dažādās naupliju un metanaupliju stadijās, kā arī vienota standartizēta protokola neesamība apgrūtina rezultātu salīdzināšanu starp dažādiem pētījumiem. Jāņem vērā arī tas, ka bāzes šķīdums artēmiju testiem satur 3% sāls, kas var ietekmēt testējamā toksikanta īpašības. Precīzāku rezultātu iegūšanai būtu nepieciešams obligāti veikt toksikanta koncentrācijas noteikšanu, bet vielu maisījumu var notekūdeņu paraugu gadījumā tas ir sarežģīts process.

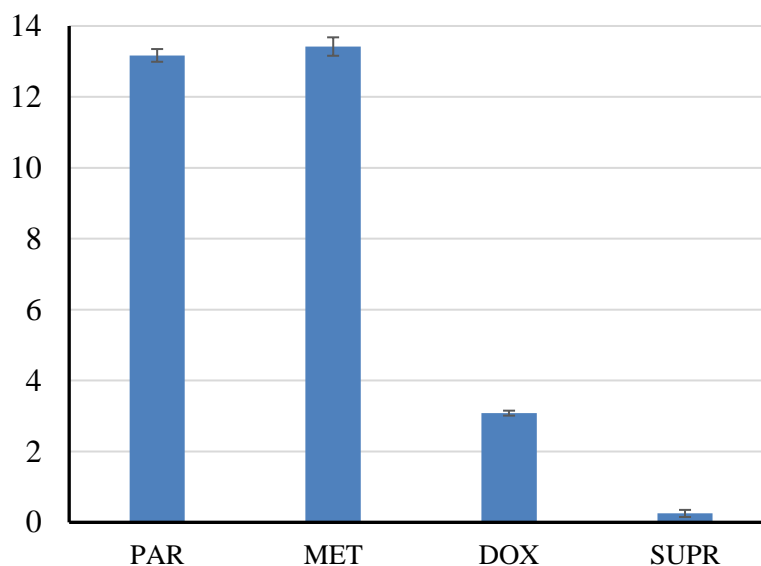
Kopumā pēc akūto testu rezultātiem ekotoksikoloģijā maz pētītas farmaceitiskās vielas saturošie preparāti „Neiromidin” (AFV: ipidakrīna hidrohlorīds), „Suprastin” (AFV: hlorspiramīna hidrohlorīds) un „Betamaks” (AFV: sulpirīds) ir ļoti toksiski attiecībā pret aļģēm, dafnijām un artēmijām.

Salīdzinot divus populārus nesteroīdos pretiekaisuma līdzekļus - diklofenaku un ibuprofēnu saturošus preparātus - diklofenaku saturošs preparāts ir būtiski toksiskāks gan attiecībā pret zaļāļģēm, gan dafnijām. Tā akūtais toksiskums ir salīdzināms ar antidiabetiķi metformīnu un antibiotiku doksiciklīnu saturošiem preparātiem. Ņemot vērā pieaugošu

pretidiabēta un antibiotiku pielietošanu blīvi apdzīvotajās vietās, šo savienojumu koncentrācijām virszemes ūdeņos būtu jāpievērš lielāka vērība pirms tie sasniedz kritiskas koncentrācijas. Salīdzinot antibiotiku amoksicilīnu un doksiciklīnu saturošus preparātus, būtiski doksiskāks ir tieši preparāts ar doksiciklīnu (vismaz 30 reizes).

3.8. Farmaceitisko preparātu hroniskā toksiskuma salīdzinājums

Hronisko testu rezultāti ir atspoguļoti 20. attēlā. Līdzīgi kā akūto testu rezultātos, arī šajā gadījumā **vistoksiskākais** ir preparāts **“Suprastin”** – koncentrācija tikai $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bija pietiekoša, lai uz pusi samazinātu *D. magna* reprodukcijas spējas



20. attēls. Testēto farmaceitisko produktu EC₅₀ *D. magna* (Apzīmējumi: PAR – „Paracetamol”, MET – “Metforal”, DOX – “Doxy-M-ratiofarm, SUPR – „Suprastin”).

Figure 20. EC₅₀ *Daphnia magna* of tested pharmaceutical products (Keys: PAR – „Paracetamol”, MET – “Metforal”, DOX – “Doxy-M-ratiofarm, SUPR – „Suprastin”).

Neskatoties uz līdzīgu akūtos testos uzrādīto toksiskumu, preparāti ar **metformīnu** un **doksiciklīnu** uzrādīja izteikti atšķirīgus rezultātus: **doksiciklīnu** saturoša preparāta koncentrācija $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ izraisīja 50%-īgu vairošanās samazināšanos, kamēr preparātam ar metformīnu šis efekts tika novērots pie $13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrācijas. Preparāts ar paracetamolu hroniskos testos uzrādīju aptuveni sešas reizes augstāku toksiskumu nekā akūtajos testos, pielīdzinoties “Metforal” toksiskumam. Iegūtie rezultāti apstiprina nepieciešamību veikt

hroniskos testus labākai ietekmes uz ūdens vidi noteikšanai, jo dažu diennakšu ekspozīcija ir pārāk īsa un akūto testu vienkāršota metodika ir pārāk vienkāršota, lai noteiktu daudzpusīgu toksikanta efektu uz ūdens organismiem. Farmaceitiskiem savienojumiem kā ļoti daudzveidīgiem pēc savas ķīmiskās dabas un ar savu specifisku efektu var dažādi ietekmēt ūdens organismu dzīvotspēju un vairošanos. Turpretim, akūtie testi nav tik laikietilpīgi un tie ir pietiekoši, lai savā starpā salīdzinātu toksikantu ietekmi tieši uz organismu dzīvotspēju un izvēlētos potenciāli bīstamākos.

3.9. Farmaceitisko vielu izraisītā potenciālā ietekme uz ūdens organismiem

Iegūtie rezultāti parādīja ne tikai dažādu preparātu subletālās vai efektīvās koncentrācijas ūdens organismiem, bet arī to, ka vienas terapeitiskās klases farmaceitiskiem līdzekļiem (piemēram, antibiotikām doksiciklīnam un amoksicilīnam) var būt ļoti atšķirīgs toksiskums un inhibējošās iedarbības ātrums. Kaut arī līdz šim nebija informācijas par „Suprastin”, „Betamaks” un „Neiromidin” toksiskumu attiecībā pret ūdens organismiem, tie izrādījās ļoti toksiski gan aļģēm, gan vēžveidīgiem. Populārs, bet maz pētīts preparāts ar metformīnu uzrādīja relatīvi augstu toksiskumu, kas norāda uz tā tālākās izpētes nepieciešamību.

Prognozējot farmaceitisko vielu ietekmi uz ūdens organismiem, jānosaka gan atsevišķu savienojumu toksiskums, gan to iespējamās koncentrācijas pie piesārņojuma avotiem. Šajā gadījumā tie ir notekūdeņi, kas pastāvīgi ievada ūdenstilpēs lielu daudzumu dažādu farmaceitisko vielu (Khan and Ongerth 2004; Tilgalis 2004). COHIBA (2012) projekta atskaitē, kas tika izstrādāts sadarbībā ar HELCOM, par bīstamo savienojumu kontroli Baltijas jūra īpaši uzsver rūpnieciskos un municipālos notekūdeņus kā lielākos un prioritāros ūdens piesārņotājus (COHIBA 2012). Tieši notekūdeņu izplūdes vietās visbiežāk lietotie preparāti, kuru sastāvā ir populāras farmaceitiskās vielas var sasniegt augstākas koncentrācijas un izraisīt aļģu augšanas inhibēšanu vai zooplanktona organismu bojāeju. Diklofenaku, paracetamolu un ibuprofēnu saturošie preparāti tiek ļoti plaši izmantoti un notekūdeņu izplūdes rajonos var sasniegt salīdzinoši lielas koncentrācijas, īpaši gripas sezonā, jo tos izmanto, piemēram, saaukstēšanās simptomu mazināšanai un iekaisumu gadījumā. Latvijā notekūdeņu attīrīšanas stacijā (NAS) ienākošos neattīrītos ūdeņos paracetamola jeb acetaminofēna koncentrācija sasniedz $4,67 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ibuprofēna koncentrācija – $2,23 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ un diklofenaka koncentrācija – $1,27 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Muter u.c. 2017 cit. pēc Dāvids 2017). Dienvidāfrikā NAS ienākošos ūdeņos šo vielu koncentrācija ir krietni lielāka: ibuprofēna koncentrācijas sasniedz $55 - 69 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ un diklofenaka koncentrācijas – $6,4 - 16 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pat pēc attīrīšanas

notekūdeņos konstatē 2,1 - 4,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ un 1,4 – 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ lielu ibuprofēna un diklofenaka daudzumu (Mzukisi and Chimuka 2017). Analģētiķi ir konstatēti virszemes ūdeņos lielos daudzumos. Paracetamols, diklofenaks, ibuprofēns, ciprofloksacīns un acetilsalicilskābe ir bieži konstatēti jūrās un atrodami gan Eiropas, gan Dienvidu un Ziemeļu Amerikas, gan Afrikas gan Āzijas reģionu ūdeņos. Ibuprofēna koncentrācijas virszemes ūdeņos vidēji sastāda 22 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, bet Austrumeiropas valstu ūdeņos tā koncentrācija sasniedz pat vairāk kā 300 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Bez minētām farmaceitiskām vielām ir konstatētas augstas antibiotiku koncentrācijas Āzijas valstu virszemes ūdeņos un liels sintētisko estrogēnu daudzums Āfrikas valstīs (Blasco *et al.* 2004; Beek 2016). Cukura diabēts ir ļoti liela problēma visā pasaulē un tāda ļoti populāra pretdiabēta farmaceitiskā savienojuma kā metformīns lietojums tikai pieaug (Fent *et. al* 2006). Jau tagad šī savienojuma koncentrācija sasniedz 40 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ notekūdeņu izplūdes vietās un negatīvi ietekmē zivju uzvedību jau pie šādas koncentrācijas (MacLaren *et al.* 2018).

Urbanizācija un lielas kaitīgo savienojumu noplūdes ir novedušas pie tā, ka Baltijas jūras Dienvidu daļa un Somu līcis ir pastāvīgi piesārņoti. Atsevišķa problēma ir saistīta ar nederīgo farmaceitisko preparātu utilizēšanu. Bieži produkti ar izbeigušos derīguma termiņu netiek nodoti utilizācijai, bet tiek izmesti (Doerr-MacEwen 2007 cit. pēc. Bāliņa 2014). Tā kā liela daļa no ārstniecības preparātiem ir šķīstoši, farmaceitiskie savienojumi nonāk augsnē un vēlāk – ūdenī, taču lielākā daļa no farmaceitiskām vielām nav biodegradējamās. Hidrofobas farmaceitiskās vielas kā, piemēram, remantadīns, var izraisīt humānvielu agregāciju notekūdeņos, kas var traucēt notekūdeņu attīrīšanu NAI (Klavins *et al.* 2011). Efektīvākais veids, kā samazināt bīstamo savienojumu nonākšanu ūdens vidē pēc Interreg projekta COHIBA (2012) secinājumiem ir palielināt notekūdeņu attīrīšanas efektivitāti, sekot, lai aktīvajās dūņās neuzkrātos pārāk liels videi kaitīgo savienojumu daudzums, kā arī noteikt pieļaujamās robežas ūdenī visbiežāk sastopamiem savienojumiem (COHIBA 2012). Kā viens no palīg līdzekļiem notekūdeņu attīrīšanai var kalpot fotooksidācija, kuras procesā farmaceitiskie preparāti var tikt pārvērsti maztoksiskos metabolītos (Czechn *et al.* 2014).

Latvijā arī pastāv paaugstinātā piesārņojuma risks, jo valstī ir vairākas farmaceitiskās rūpnīcas. Tiek ražoti dažādi farmaceitiskie līdzekļi, kas var negatīvi ietekmēt ūdens organismu attīstību, kā, piemēram, „Betamaks”, „Neiromidin”, „Paracetamol-Grindeks” un „Ibuprofen-Grindeks” u.c. Šajā pētījumā veiktie eko-toksikoloģiskie testi ir pierādījuši, ka maz pētītiem preparātiem kā “Betamaks” vai “Neiromidin” var būt ļoti augsts toksiskums, salīdzinot ar labi izpētītiem. Ja pagaidām mazāk populāro preparātu koncentrācijas ūdeņos ir niecīgas, tomēr ir jāpievērš lielāka uzmanība tām farmaceitiskām rūpnīcām, kas šos preparātus ražo, lai novērstu šo izteikti toksisko vielu nokļūšanu vidē ar notekūdeņiem.

Neskatoties uz to, ka virszemes ūdeņos farmaceitiskās vielas nepārsniedz $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ līdz $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ lielas koncentrācijas, bet toksiskās koncentrācijas akūtos testos ir $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, tas nenozīmē, ka testēto farmaceitisko produktu klātbūtne ūdeņos tādās koncentrācijās, kādās tās ir šobrīd, nav kaitīgas ūdens organismiem. Kā liecina citu pētījumu rezultāti, pat ja kāda no minētajām farmaceitiskām vielām ūdenstilpē nesasniedz organismu dzīvībai bīstamu koncentrāciju, tā var negatīvi ietekmēt ūdens organismu attīstību, vairošanos un uzvedību. Tā, piemēram, diklofenaks, pretalerģijas un psihoaktīvie līdzekļi izmaina dzīvnieku barošanās uzvedību un palielina aktivitāti (Brodin *et al.* 2013; Brodin *et al.* 2014; Huerta *et al.* 2016). Sintētiskie estradioli savukārt var izraisīt reproduktīvās sistēmas traucējumus ūdens bezmugurkaulniekiem (Kristensen *et al.* 2005). Pētījumos ar mākslīgiem dīķiem-mikrokosmiem ir pierādīts, ka starpsugu mijiedarbība pastiprina toksikanta negatīvo ietekmi (Knillmann *et al.* 2012). Farmaceitisko vielu klātbūtne notekūdeņos var negatīvi ietekmēt NAI aktīvajās dūņās esošos mikroorganismus (Dāvids 2017; Davids *et al.* 2016), bet, nonākot ūdenstilpē, šie potenciāli kaitīgie savienojumi var uzkrāties organismu iekšējās un ārējās struktūrās bioakumulācijas dēļ, ka arī var nonākt augstāk esošo trofisko līmeņu organismos, pateicoties trofiskām mijiedarbībām. Veiktā eko-toksikoloģiskā pētījuma rezultāti pārliecinoši parāda visu testēto farmaceitisko līdzekļu vairāk vai mazāk izteiktu toksiskumu attiecībā pret hidroekosistēmu pirmproducentiem un primāriem konsumentiem – planktonaļģēm un vēžveidīgiem. Šī pētījuma rezultāti ir parādījuši, ka toksiskie savienojumi var ietekmēt organismu specifiskās fizioloģiskās funkcijas arī pie tādām koncentrācijām, kādas pēc akūto testu rezultātiem šos organismus neietekmē. Vairošanās spēju samazināšanās apdraud ūdens organismu populācijas un to dinamiku.

Ņemot vērā to, ka ūdens ekosistēmās katrs barības tīkla elements cieši saistīts ar pārējiem un stabilā ekosistēmā pastāv zināms līdzsvars starp visiem producentiem, konsumentiem un destruktoriem, kādas noteiktas organismu grupas pārstāvju skaita izmaiņas var negatīvi ietekmēt citu trofisko līmeņu organismus vai izmainīt ekosistēmu kopumā. Zinot, ka dafniju barības bāzi pamatā veido mikroskopiskās aļģes un daļa zivju pārtiek tieši no zooplanktona, kurā ietilpst arī dafnijas, pietiek ar tādu farmaceitiskā produkta koncentrāciju, kas vēl nav sasniegusi zaļāļģu EC_{50} robežu, bet ir tuva dafniju LC_{50} koncentrācijai, lai būtu novērojama negatīvā ietekme. Samazinoties zooplanktona organismu skaitam, var samazināties planktonēdājzivju skaits un palielināties fitoplanktona organismu skaits.

Visgrūtāk ir prognozēt, kāda varētu būt farmaceitisko līdzekļu ietekme uz veselu ekosistēmu, jo jāņem vērā arī ūdenstilpes morfoloģija un dažādi fiziskie procesi kā, piemēram, sedimentācija, absorbcija, fotolīze, ūdens masu kustības u.c. (Newman 1994).

Lai labāk prognozētu ūdenī esošu toksikantu ietekmi, ir būtiski zināt šo savienojumu ķīmiskās īpašības, piemēram, oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu, kas norāda uz savienojuma hidrofilo vai hidrofobo dabu un var netieši norādīt uz tā ietekmi uz biotu. Visu testēto preparātu aktīvie farmaceitiskie savienojumi ir izteikti hidrofilī, izņemot diklofenaku ($\log P > 10$) (1. pielikums). Hidrofilie savienojumi paliek šķidrā fāzē, tāpēc ir lielāka to potenciālā ietekme uz brīvi peldošiem ūdens organismiem. Pastāv diezgan daudz dažādu farmaceitisko vielu, kuri akumulējas sedimentos, tāpēc būtu vērtīgi pārbaudīt to toksiskumu bentiskiem organismiem, piemēram, sānpeldēm, kurus jau tagad aktīvi izmanto biotestēšanā (Strode 2017). Jāņem vērā arī tas, ka notekūdeņos esošie savienojumi veido sarežģītu maisījumu un vairāki pētījumi liecina par to, ka organismiem bīstamo vielu maisījumiem ir vairākas reizes lielāks toksiskums nekā katram savienojumam atsevišķi (Cleuvers 2003; Backhaus *et al.* 2008). Gan hroniskās, gan akūtās iedarbības gadījumā var būt novērojams sinerģisms (toksiskā efekta palielināšanās) (Pavlaki *et al.* 2011).

Farmaceutisko preparātu spektrs turpina ātri paplašināties, tāpēc pētījumu noteikti vajag turpināt, testējot jaunus preparātus no darbā nepārstāvētām terapeitiskām klasēm, par kuriem pietrūkst eko-toksikoloģiskā informācija (piemēram, beta-blokatoriem), un testējot Latvijā ražotus farmaceitiskos produktus (piemēram, „Remantadīns” (AFV: remandanīns), „Fenkarol” (AFV: hifenadīns), „Mildronāts” (AFV: meldonijs) u.c.). Atsevišķi jāveic Latvijas farmaceitisko rūpnīcu „Olainfarm” un „Grindeks” notekūdeņu biotesti, lai noteiktu tiešo ietekmi uz ūdens organismiem to izplūdes vietās. Lai prognozētu farmaceitisko vielu potenciālo ietekmi uz jūras ekosistēmām, testorganismu klāsts jāpapildina ar iesāļu ūdeņu un sāļūdens organismiem. Precīzākai preparātu toksiskuma noteikšanai var veikt farmaceitisko vielu koncentrāciju mērīšanu, ar kurām pēc testa nobeiguma aizvietot nominālās koncentrācijas.

Dabā organismi tiek pakļauti toksikanta ietekmei daudz ilgāk, nekā testu gaitā. Uz tiem darbojas daudz vairāk citu faktoru, tāpēc toksiskās koncentrācijas var būt daudz mainīgas, atkarībā no apstākļiem, bet to precīza noteikšana – sarežģīta. Ņemot vērā arī farmaceitisko savienojumu iedarbības veida un farmakokinētisko īpašību dažādību, ir vērts attīstīt modernākās ekotoksikoloģijas pētījumu metodes, piemēram, eko-toksikogenomiku un pielietot matemātisko modelēšanu (Dorne *et al.* 2007).

4. Secinājumi

1. Farmaceitisko līdzekļu iedarbības spektrs uz ūdens organismiem ir atšķirīgs.
2. Ar īpaši augstu toksiskumu izceļas hlorporamīna hidrochlorīdu saturošs pretalerģijas preparāts „Suprastin”, izraisot 50%-īgu ūdens organismu inhibēšanu koncentrāciju robežās no 3 (dafnijām) līdz $18 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (aļģēm) un $22 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (artēmijām).
3. Augstu toksiskumu gan aļģēm, gan vēžveidīgiem uzrādīja arī preparāti NS stimulators “Neiromidin” un antidepresants „Betamaks”, par kuriem līdz šim iztrūka ekotoksikoloģiskā informācija.
4. Ar samērā augstu toksiskumu attiecībā pret dafnijām raksturojas nesteroīdo pretiekaisuma līdzekli diklofenaku saturošs preparāts “Olfen”, antidiabēta preparātu metformīnu saturošs “Metforal” un antibiotiku doksiciklīnu saturošs “Doxy-M-ratiofarm”.
5. Salīdzinoši zemāku toksiskumu uzrāda preparāts “Ibuprofen-Grindeks” ar ibuprofēnu un “Ospamox” ar antibiotiku amoksicilīnu.
6. Saldūdens vēžveidīgajam *A. salina* un mikroskopiskai aļģei *D. communis* ir būtiski zemāka jutība nekā saldūdens standarta testorganismam *D. magna*.
7. Hroniskie testi kopumā uzrādīja augstāku toksiskuma pakāpi nekā akūtie testi.
8. Pretalerģijas preparāts “Suprastin”, kas izcēlās ar visaugstāko toksiskumu akūtos testos, uzrādīja visaugstāko toksiskumu arī hroniskos testos, samazinot *D. magna* vairošanās spējas par 50%-iem jau pie koncentrācijas $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.
9. Hroniskos testos preparāts ar antibiotiku doksiciklīnu samazina *D. magna* vairošanās spējas pie daudz zemākas koncentrācijas, nekā preparāti ar paracetamolu un metformīnu.
10. Pētījuma rezultāti parādīja, ka, pastāvīgi atrodoties ūdens ekosistēmās, daudzi preparāti var būtiski ietekmēt fitoplanktona un zooplanktona organismu dzīvotspēju un vairošanos, īpaši apdraudot reģionus farmaceitisko rūpnīcu notekūdeņu izplūdes vietās.
11. Ņemot vērā farmaceitisko vielu toksicitāti, farmaceitiskiem uzņēmumiem būtu jānodrošina efektīvāka notekūdeņu lokālā attīrīšana pirms to nonākšanas NAI, kā arī lielāka vērība jāpievērš ar izbeigušos derīguma termiņu un izlietoto preparātu nonākšanai vidē.

5. Pateicības

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam assoc. prof. Maijai Balodei par palīdzību maģistra darba izstrādē, vērtīgiem padomiem un atbalstu konferenču ziņojumu gatavošanas laikā, kā arī par piedāvāto iespēju veikt eksperimentus ārzemju laboratorijās. Atsevišķa pateicība Vidē esošu toksisku savienojumu pētniecības centra RECETOX darbiniekiem Mgr. Jana Vašíčková un Michal Bittner, Ph.D. par palīdzību un padomiem eksperimentu veikšanā prakses laikā Čehijas Republikā.

6. Literatūras saraksts

- Agarwal S. K. 2005. Water pollution. New Dehli: APH publishing, 384 pp.
- Agerstrand M., Berg, C., Björlenius B., Breitholtz M., Brunström B., Fick J., Gunnarsson L., Larsson D. G., Sumpter J. P., Tysklind M., Rudén C. 2015. Improving environmental risk assessment of human pharmaceuticals. - *Environmental science & technology*, 49(9): 5336–5345.
- Agerstrand, M. Ruden, C. 2010. Evaluation of the accuracy and consistency of the Swedish Environmental Classification and Information System for pharmaceuticals. - *Science of the Total Environment*, 408: 2327–2339.
- Alemón-Medina R., Chávez-Pacheco J. L., Ramírez-Mendiola B. Rivera-Espinosa L., García-Álvarez R. 2014. Physicochemical stability of three generic brands of metformin in solution - *Acta Pediátrica de México*, 35: 94-99.
- Amiard-Triquet C., Amiard J. C., Mouneyrac C. 2015. *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. London: Academic press, 503 pp.
- Anonymous 2018. Definition of Toxicological Dose Descriptors. Key: http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html
- Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M., Skinner M K. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. - *Science*, 308: 1466-1469.
- ASTM 2012. E1193–97. Standard guide for conducting *Daphnia magna* lifecycle toxicity tests. American Society for Testing and Materials, 19 pp.
- Backhaus T., Sumpter J., Blanck H. 2008. On the Ecotoxicology of Pharmaceutical Mixtures. - In: Kummerer K. (ed.) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Berlin, Springer-Verlag: 257-276.
- Barahona M. V., Sanchez-Fortun S. 1996. Comparative Sensitivity of Three Age Classes of *Artemia salina* to Several Phenolic Compounds. – *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 271-278.
- Beek T., Weber F., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A. 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. - *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35 (4): 823–835.
- BIO Intelligence Service. 2013. Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers, 308 pp.
- Blasco J., Chapman P. M., Campana O., Hampel M. 2004. *Marine ecotoxicology. Current knowledge and future issues*. UK: Blackwell Science Ltd., 321 pp.

- Boeren M., Michiels D., Verhoeve P., Van Aken K., De Keijser H. 2006. Amoxicillin, stability and solubility. - *Animal Health, Handelsweg*, 25: 5531.
- Bohdal J. 2010. Photo of Brine shrimp *Artemia salina*. Key: <https://www.naturephoto.cz.com/brine-shrimp-photo-14578.html>
- Brodin T., Fick J., Jonnson M., Klaminder J. 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. – *Science*, 339(6121): 814-815.
- Brodin T., Piovano S., Jerker F., Klaminder J., Heynen M., Jonsson M. 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. - *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369: 20130580.
- Brunchet A., Hochereau C., Picard C., Decottignies V., Rodrigues J. M., Janex-Habibi M. L. 2005. Analysis of Drugs and Personal Care Products in French Source and Drinking Waters: The Analytical Challenge and Examples of application. – *Water Science and Technologies*, 52: 53-61.
- Bāliņa K. 2014. Sintētiskā hormona 17 α -etinilestradiola ietekme uz dažādu trofisko līmeņu ūdens organismiem. Maģistra darbs. Rīga: LU, 58 lpp.
- Carter C. F. 2012. *Desmodesmus communis* E.Hegewald. Key: <http://img.algaebase.org/images/5F94D5B6140c034B88Rnl3F6C775/aopV8vfhLfEx.jpg>
- ChemBook 2020. CAS Database list. Diclofenac. Key: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5474464.htm
- ChemIDplus 2020. Chloropyramine. U.S. National library of medicine. Key: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/59-32-5>
- Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. - *Toxicology Letters*; 142 (3): 185-194.
- Cleuvers M. 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 309–315.
- COHIBA 2012. Final summary report of the COHIBA project. HELCOM, 57 pp. Key: https://www.lung.mv-regierung.de/dateien/a3_cohiba_final_summary_report_2012.pdf
- Colvin M. 2003. Alkylating Agents – In: Kufe D., Pollock R., Weichselbaum R. (Ed.), *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th ed.). BC Decker, Ontario, 2900 pp.
- Crane M., Watts C., Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. – *Science of the Total Environment*, 367: 23-41.

- Cui C. W., Ji S. L., Ren H. Y. 2006. Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. - *Environmental Monitoring and Assessment*, 121: 409–419.
- Czechn B., Joško I., Oleszczuk P. 2014. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. - *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 247-253.
- Davids M., Bartkevics V., Muter O., Selga T. 2016. Study on bacterial physiological response towards different classes of pharmaceuticals. - *Journal of Biotechnology*, 239: 1-2.
- Dorne J., Skinner L., Frampton G. K., Spurgeon D. J., Ragas A., M., J. 2007. Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4): 1259-1268.
- Drugbank 2020. Doxycycline. Key: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00254>
- Drugbank 2020a. Ipidacrine. Key: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13668>
- Du J., Mei C. F., Ying G. G., Xu M. Y. 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. - *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97: 84–90.
- Dāvids M. 2017. Farmaceutisko vielu ekotoksiskuma riska novērtējums uz mikroorganismiem notekūdeņos. Maģistra darbs. Rīga: Latvijas Universitāte, 53 lpp.
- Ebert D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 98 pp.
- Erickson B. E. 2002. Analyzing the ignored environmental contaminants. – *Environmental Science and Technology*, 36: 140-145.
- EU Directive 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. – *Official Journal of the European Union*, 43: 1-73.
- EU Directive 2001. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use - *Official Journal of the European Union* 311: 67 – 128.
- EU Directive 2006. Directive 2006/11/EC of the European Parliament and Council on pollution caused by certain dangerous substances discharged into aquatic environment of the Community. – *Official Journal of the European Union*, 49: 52-59.
- EU Directive 2008. Directive 2008/32/EC of the European Parliament and the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the

- field of water policy, as regards the implementing powers conferred on the Commission
- Official Journal of the European Union, 51:60-61.
- EU Directive 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of
12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority
substances in the field of water policy. – Official Journal of the European Union, 56: 1-
12.
- Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. –
Aquatic Toxicology, 40: 825-839.
- Fick J., Lindberg R. H., Tysklind M., Larsson D. G. J. 2010. Predicted critical environmental
concentrations for 500 pharmaceuticals. - Regulatory Toxicology and Pharmacology,
58(3): 516-523.
- Fick J., Söderström H., Lindberg R. H., Phan C., Tysklind M., Larsson, D. G. 2009.
Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production.
- Environmental toxicology and chemistry, 28(12): 2522–2527.
- Gokce D. 2016. Algae as an Indicator of Water Quality, Algae - Organisms for Imminent
Biotechnology. Key: [https://www.intechopen.com/books/algae-organisms-for-
imminent-biotechnology/algae-as-an-indicator-of-water-quality](https://www.intechopen.com/books/algae-organisms-for-imminent-biotechnology/algae-as-an-indicator-of-water-quality)
- Golonka I., Kawacki A., Musial W. 2015. Stability Studies of a Mixture of Paracetamol and
Ascorbic Acid, Prepared Extempore, at Elevated Temperature and Humidity
Conditions. - Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14(8): 1315–1321.
- Gracia-Lor E., Sancho J., Serrano R., Hernández F. 2012. Occurrence and removal of
pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of
Valencia. - Chemosphere. 87 (5): 453-462.
- Granberg R. A., Rasmuson, A. C. 1999. Solubility of paracetamol in pure solvents. - Journal
of Chemical and Engineering Data, 44(6): 1391–1395.
- Guerra R. 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in
industrial effluents. - Chemosphere 44: 1737-1747.
- Guiry M. D. 2002. Algae Base. World-wide electronic publication, National University of
Ireland, Galway. Key: <http://www.algaebase.org>
- Gunnarsson L., Jauhiainen A., Kristiansson E., Nerman O., Larsson D. G. 2008. Evolutionary
conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk
assessments. - Environmental science & technology, 42(15): 5807–5813.
- Hallfors G. 2004. Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species. - Baltic Sea Environment
Proceedings, 95. Key: <http://www.helcom.fi/Lists/Publications/BSEP95.pdf>

- Halling-Sorensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Ingerslev F., Liitzhofl H. C. H., Jorgensen, S. E. 1998. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. - Pergamon Chemosphere, 36(2): 357–393.
- Heberer T. 2002. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. – Toxicology Letters, 131: 5-17.
- HELCOM 2017. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region. A status report. – Baltic sea environment proceedings No. 149, 119 pp.
- Hester R. E., Harrison R. M. 2016. Pharmaceuticals in the Environment: Volume 41. Royal Society of Chemistry, 294 pp.
- Huerta B., Margiotta-Casaluci L., Rodriguez-Mozaz S., Scholze M., Winter M. J., Barcelo D., Sumpter J. P. 2016. Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. – Environmental Toxicology and Chemistry, 35(11): 2782-2790.
- Huynh M., Serediak N. 2006. Algae identification field guide. Agriculture and Agri-food in Canada, 40 pp.
- ISO 6341 2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO 6341:2013. The International Organization for Standardization, 8 pp.
- ISO 8692 2012. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2012. The International Organization for Standardization, 21 pp.
- ITIS. 2020a. *Daphnia magna* S. Taxonomic Hierarchy. Key: https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=83884#null
- ITIS. 2020b. *Artemia salina* L. Taxonomic Hierarchy. Key: https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=83691#null
- Jeyaratnama N., Nour A. H., Kanthasamy R., Nour A. H., Yuvaraj A. R., Akindoyo J. O. 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. - Industrial crops and products, 92: 57-66.
- Johnson A. C., Jürgens M. D., Williams R. J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J. P. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. - Journal of Hydrology, 348: 167–175.

- Katzung, B. 2012. Basic and Clinical Pharmacology. McGraw-Hill Companies, New York, 1229 pp.
- Khan S. J., Ongerth J. E. 2004. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. – *Chemosphere*, 54: 355-367.
- Khan S. J., Ongerth J. E. 2005. Occurrence and removal of pharmaceuticals at an Australian sewage treatment plant. – *Journal of the Australian Water Association*, 32 (4): 80-85.
- Khetan S. K., Collins T. J. 2007. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. - *Chemical Reviews*, 107: 2319–2364.
- Klavins M., Anson L., Purmalis O., Zicmanis A. 2011. Characterization of interaction between tricyclic structures containing pharmaceuticals, their models and humic substances. – *Water Science Technology*, 63(5): 845-852.
- Kluttgen B., Dülmer U., Engels M., Ratte H. 1994. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. - *Water Research*, 28(3): 743–746.
- Knillmann S., Stampfli N. C., Beketov M. A., Liess M. 2012. Intraspecific competition increases toxicant effects in outdoor pond microcosms. – *Ecotoxicology*, 21: 1857-1866.
- Kostik V., Gjorgeska B., Petkovska S. 2015. Development and validation of GC-MS method for analysis of chloropyramine hydrochloride in ointments. - *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5: 55-59
- Kristensen T., Baatrup E., Bayley M. 2005. 17-Ethinylestradiol Reduces the Competitive Reproductive Fitness of the Male Guppy (*Poecilia reticulata*). - *Biology of reproduction*, 72: 150-156.
- Kummerer K. 2004. Resistance in the environment. – In: Kummerer K. (ed.) *Pharmaceuticals in the Environment*. Berlin, Springer-Verlag: 223-231.
- Kuster A., Adler N. 2014. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. - *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369 (1656): 1-8.
- Lange R., Dietrich D. 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances - conceptual considerations. – *Toxicology Letters*, 131: 97-104.
- Libralato G., Prato E., Migliore L., Cicer, A. M. Manfra, L. 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. - *Ecological indicators*, 69: 35-49.
- Liu H., Zhou X., Huang H., Zhang J. 2019. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Their Association with Antibiotics in a Wastewater Treatment Plant: Process Distribution and Analysis. - *Water*, 11: 24-95

- Luo Y., Mao D., Rysz M., Zhou Q., Zhang H., Xu L., Alvarez P. J. J. 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River. - *Environmental Science and Technology*, 44: 7220–7225.
- MacLaren R. D., Wisniewski K., MacLaren C. 2018. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. - *PloS one*, 13(5): 197-259.
- Manfra L., Savorelli F., Pisapia M., Magaletti E., Cicero A.M. 2012. Long-term lethal toxicity test with the crustacean *Artemia franciscana*. - *Journal of Visualized Experiments*. 62: 2182–2185.
- Manzetti S., Ghisi R. 2014. The environmental release and fate of antibiotics. – *Marine Pollution Bulletin*, 79: 7-15.
- Maszkowska, J., Stolte S., Kumirska, J., Lukaszewicz P., Mioduszewska K. Puckowski A, Caban M, Wagil M, Stepnowski P, Bialk-Bielinska A. 2014. Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis study. – *Science of the Total Environment*, 493 (11):12-21.
- Mzukisi M. L., Chimuka L. 2017. Simultaneous determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. - *Water SA*, 43 (2): 264-274.
- Naceur H., Jenhani A. Romdhane M. 2011. Influence of environmental factors on the life cycle and morphology of *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) in Sabkhet El Adhibet (SE Tunisia). - *Biological Letters*, 48(1): 67- 83.
- Newman M. C. 1994. *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*. CRC press, 448 pp.
- Nunes B. S., Carvalho F. D., Guilhermino L. M., Van Stappen G. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. - *Environmental Pollution*, 144: 453–462.
- Ocaranza-Joya V. S., Manjarrez-Alcivar I., Ruizgonzález L. E., Guerrero-Galván S. R., Vega-Villasante F. 2019. Sensitivity of different stages of *Artemia franciscana* to potassium dichromate. - *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 14(1): 8-12.
- OECD 21 2012. OECD guideline for the testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test. OECD, Paris, 24 pp.
- Okamura H., Aoyama I., Liu D., Maguire R. J., Pacepavicius G. J., Lau Y. L. 2000. Fate and Ecotoxicity of the New Antifouling Compound Irgarol 1051 in the Aquatic Environment. - *Water Research*, 34: 3523-3530

- O'Brien E., Dietrich D. R. 2004. Hindsight rather than foresight: reality versus the EU draft guideline on pharmaceuticals in the environment. – *Trends in Biotechnology*, 22: 326-330.
- Pascoe D., Karntanut W., Muller T. M. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. – *Chemosphere*, 51: 521–528.
- Pavlaki M. D., Pereira R., Loureiro S., Soares A. M. V. M. 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. - *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 99–110
- Pavlic Z., Vidakovic-Cifrek Z., Puntaric D. 2005. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. – *Chemosphere*, 61(8): 1061-1068.
- Petrie B., McAdam E. J., Scrimshaw M. D., Lester J. N., Cartmell E. 2013. Fate of drugs during wastewater treatment. - *Trends in Analytical Chemistry*. 49: 145-159.
- Phillips, P. J., Smith, S. G., Kolpin, D. W., Zaugg, S. D., Buxton, H. T., Furlong, E. T., Esposito, K., Stinson, B. 2010. Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents. - *Environmental science & technology*, 44(13): 4910–4916.
- Pomati F., Burns B. P., Zuccato E., Neilan B. A., Khan S. J. 2008. Pharmaceuticals in Water and Their Potential Impact on Reuse. – In: Svensson E. P. (ed.) *Aquatic toxicology research focus*. New York, Nova Science Publishers: 31-49.
- PubChem 2019. Amoxicillin. Key: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin>
- PubChem 2019a. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Doxycycline <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxycycline#section=Other-Experimental-Properties>
- PubChem 2020. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sulpiride. Key: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulpiride>
- PubChem 2020a. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Metformin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>
- PubChem 2020b. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Paracetamol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983>
- PubChem 2020c. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Amoxicillin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33613>

- PubChem 2020d. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ibuprofen. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>
- Putna I. 2010. Municipālo un industriālo notekūdeņu toksicitātes novērtējums pēc to bioloģiskās attīrīšanas notekūdeņu bioloģiskajās attīrīšanas iekārtās. Maģistra darbs. Rīga: Latvijas Universitāte, 91 lpp.
- Quadra G. R., Souza H. O., Santos R., Santos Fernandez C. M. A. 2017. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. - *Environment Science and Pollution Research*, 24: 1200–1218–.
- Rabiet M., Togola A., Brissaud F., Seidel J. L., Budzinski H., Elbaz-Poulichet F. 2006. Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment. - *Environmental Science and Technology*, 40: 5282-5288.
- Rang H., Ritter J., Flower R., Henderson G. 2015. Rang and Dale's Pharmacology (8th ed.). Elsevier, New-York, 776 pp.
- Redelsperger I. M., Taldone T., Riedel E. R., Lephherd M. L., Lipman N. S., Wolf F. R. 2016. Stability of Doxycycline in Feed and Water and Minimal Effective Doses in Tetracycline-Inducible Systems. - *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 55(4): 467–474.
- Richmond A. 2016. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. UK: Elsevier Inc., 566 pp.
- Santos L. H. M. L. M., Araujo A. N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M. C. B. S. M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. – *Journal of hazardous materials*, 175: 45-95.
- Silva A., Figueiredo A., Sales G., Delerue-Matos C. 2009. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* — A useful tool in hazardous effluents management. – *Journal of hazardous materials*, 167(1-3): 179-185.
- Smirnov N. 2013. Physiology of the Cladocera. New-York: Academic Press, 352 pp. species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. – *Ecotoxicology*, 16: 197–203.
- Spuris Z. 1974. Latvijas dzīvnieku pasaule. Rīga: Liesma, 250 lpp.
- Stackelberg P. E., Furlong E. T., Zaugg S. D., Henderson A. K., Reissman D. B. 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-watertreatment plant. – *Science of the Total Environment*, 329: 99-113.

- Stappen G. 2014. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. – FAO fisheries technical paper, 361: 79-106.
- Strode E. 2017. Baltijas jūras sedimentu ekoloģiskā kvalitāte un topotenciālā ietekme uz sāņpelžu attīstību. Promocijas darbs. Rīga, 111 lpp.
- Stumpf M., Ternes T., 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. – Science of the Total Environment, 225: 135-141.
- Svensson B. M., Mathiasson L., Martensson L., Bergstrom S. 2005. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. Environmental monitoring and assessment, 102: 309–321.
- Tatarazako N., Oda S. 2007. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test
- Taylor P. A. 1993. An evaluation of the toxicity of various forms of chlorine to *Ceriodaphnia dubia*. – Environmental Toxicology and Chemistry, 12: 925-930.
- Ternes T. A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. – Water Research, 32 (11): 3245-3260.
- Theegala C. S., Suleiman A. A., Carriere P. A. 2007. Toxicity and biouptake of lead and arsenic by *Daphnia pulex*. - Journal of Environmental Science and Health, 47: 27-31.
- Thrupp T. J. 2016. Effects of pharmaceutical pollutants and their mixtures on aquatic organisms – with particular focus on reproduction and endocrine function in a fish model species. A Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. Department of Life Sciences, Brunel University, London: 388 pp.
- Tilgalis Ē. 2004. Notekūdeņu savākšana un attīrīšana. Jelgava: LLU, 238 lpp.
- Togulga M. 1998. The Short-Term Toxicity of Two Toxicants to *Artemia Nauplii*. – Journal of Zoology, 22: 259-266.
- Toxnet 2019. Metformin. Key: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+1115-70-4>
- USEPA 2002. EPA-821-R-02-013. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 5th ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, 266 pp.
- Vandenbergh G.F., Adriaens D., Verslycke T., Janssen C. R. 2002. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. - Ecotoxicology and Environmental Safety, 54 (2): 216-222.
- Vanhaecke P., Sorgeloos P. 1989. International study on *Artemia*. XLVII. The effect of temperature on cyst hatching: larval survival and biomass production for different

- geographical strains of brine shrimp *Artemia spp.* - *Annales de la Société Royale Zoologique*, 119: 7–23.
- Wagil M., Bialk-Bielinska A., Puckowski A., Wychodnik K., Maszkowska J., Mulkiewicz E., Kumirska J., Stepnowski P., Stolte S. 2015. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. - *Environmental science and pollution research*, 22 (4): 2566-2573.
- Walker S. E. 2011. Stability of Ibuprofen Solutions in Normal Saline or 5% Dextrose in Water. – *Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 64(5): 354–361.
- Wollenberger I., Halling-Sorensen B., Kusk S. O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. – *Chemosphere*, 40: 723-730.
- World Health Organization. 2011. Definition of active pharmaceutical ingredient. Key: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/DefinitionAPI-QAS11-426Rev1-08082011.pdf
- Yamamoto H. 2011. Properties Estimation: logP, logKow: Octanol-water partition coefficient. Key: <http://www.pirika.com/ENG/TCPE/logP-Theory.html>
- Yasser E. N., Adli A. 2015. Toxicity of Single and Mixtures of Antibiotics to Cyanobacteria. – *Environmental and Analytical Toxicology*, 5: 274-285.
- Yasser E. N., Nabila D. 2015. Toxicity of Amoxicillin and Erythromycin to Fish and Mosquitoes. - *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 10: 13-21.
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. – *Lancet*, 355: 1789-1790.
- Zuccato E., Castiglioni D., Fanelli R., Bagnati R., Calamari D. 2004. Pharmaceuticals in the Environment: Changes in the Presence and Concentrations of Pharmaceuticals for Human Use in Italy. – In: Kummerer K. (ed.) *Pharmaceuticals in the Environment*. Second edition. Berlin, Springer-Verlag: 45-53.
- Zuehlke S., Duennbier U., Heberer T. 2004. Determination of Polar Drug Residues in Sewage and Surface Water Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. – *Analytical Chemistry*, 76: 6548-6554.
- Žilnik F. L. Jazbinšek, A., Hvala A., Vrečer F., Klamt A. 2007. Solubility of sodium diclofenac in different solvents. - *Fluid Phase Equilibria*. 261(1):140-145 ·
- Янцев А. В. 2012. Выбор статистических критериев. Симферополь: Таврический национальный университет, 138 с.

Pielikumi

1. pielikums

Farmaceutisko produktu šķīdība un stabilitāte ūdens šķīdumā un oktānola-ūdens sadalījuma koeficienti.

Solubility, stability of pharmaceutical products in water solutions and their octanol/water partition coefficient.

AFV	Šķīdība ūdenī	Stabilitāte ūdens šķīdumā	Oktānola-ūdens sadalījuma koeficients
Metformīns	50 mg/ml (Toxnet 2019).	Stabils līdz 30 dienām (Alemón-Medina <i>et al.</i> 2014)	-2,6 (PubChem 2020a)
Doksiciklīns	0,63 mg/ml (Drugbank 2020)	7 dienas (Redelsperger <i>et al.</i> 2016)	0,63 (PubChem 2019a)
Hloropiramīns	0,44 mg/ml (Kostik <i>et al.</i> 2015).	Nav datu	3,37 (ChemIDplus 2020)
Paracetamols	17 mg/ml (Granberg and Rasmuson 1999).	11 dienas (Golonka <i>et al.</i> 2015)	0,91 (PubChem 2020b)
Amoxicillīns	4 mg/ml (PubChem 2019).	Pēc 24 h virs 90% saglabājas (Boeren <i>et al.</i> 2006)	0,87 (PubChem 2020c)
Ibuprofēns	25 mg/l	Stabils (Walker 2011)	3,97 (PubChem 2020d)
Diklofenaks (Na sāls)	50 mg/ml (ChemBook 2019)	Stabils (ChemBook 2019)	13,4 (Žilnik <i>et al.</i> 2007)
Ipidakrīns	1,58 mg/ml (Drugbank 2020a)	Nav datu	Nav datu
Sulpirīds	2,28 mg/ml (PubChem 2020)	Nav datu	0,57 (PubChem 2020)

Probitu tabula (Янцев 2012).

Table of probits (Янцев 2012).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

3. pielikums.

Kālija dihromāta subletālās (24 h) koncentrācijas dažādām *Artemia franciscana* attīstības stadijām (Ocaranza-Roya et al. 2019).

Sublethal concentrations (24 h) of potassium dichromate on the stages of *Artemia franciscana* (Ocaranza-Roya et al. 2019).

Dienas	LC₅₀, μg·mL⁻¹	SE (standartklūda)	Attīstības stadija
1	21	0,4	Nauplijs I
2	9,12	0,2	Nauplijs II
3	15	0,3	Metanauplijs
4	14	0,2	Metanauplijs
5	15	0,2	Metanauplijs
6	21	0,4	Juvenīlais

Kopējā organiskā oglekļa nomogramma.

Total organic carbon nomogram.

