



šin in povečevanje zelenih površin v mestih, vključno s parki in zelenimi strehami. Vsi ti ukrepi bi hkrati ugodno vplivali tudi na kroženje ogljika in blažili učinek tople grede.

LITERATURA IN VIRI

1. Anav, A., Mariotti, A., Sensitivity of natural vegetation to climate change in the Euro-Mediterranean area. *Climate Research*, 2011, 46, 3, 277–292.
2. Buckley, T. N., The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, 2005, 168, 2, 275–291.
3. Duran, Z. H. V., Pleguezuelo, C. R. R., Soil-erosion and runoff prevention by plant covers. A review. *Agronomic Sustainable Development*, 2008, 28, 65–86.
4. Gorshkov, V. G., Makarieva, A. M., Gorshkov, V. V., Revising the fundamentals of ecological knowledge: the biota-environment interaction. *Ecological Complexity*, 2004, 1, 17–36.
5. Gurevitch, J., Scheiner, S. M., Fox, G., 2002. *The Ecology of Plants*. Sinauer Associates.
6. Haslam, S. M., 1991. *The Historic River. Rivers and culture down the ages* Cobden of Cambridge Press, Cambridge, England.
7. Kravčík, M., Pokorný, J., Kohutiar, J., Kováč, M., Tóth, E., 2008. *Water for the Recovery of the Climate - A New Water Paradigm*. Krupa Print, Žilina.
8. Larcher, W., 2001. *Physiological Plant Ecology*, 4th edition. Springer Verlag, pp 232–295.
9. Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington, DC.
10. Raval, A., Ramanathan, V., Observational determination of the greenhouse-effect. *Nature*, 1989, 342, 6251, 758–761.
11. Schlesinger, W. H., Reynolds, J. G., Cuninghame, G. L., Huenneke, W. M., Jarrell, W. M., Virginia, R. A., Withford, W. G., Biological feedbacks in global desertification. *Science*, 1990, 247, 1043–1048.
12. Schulze, E. D., Beck, E., Müller-Hohenstein, K., 2005. *Plant Ecology*. Springer, Heidelberg.
13. Takahashi, M., Giambelluca, T. W., Mudd, R. G., Delay, J. K., Nullet, M. A., Asner, G. P., Rainfall partitioning and cloud water interception in native forest and invaded forest in Hawai'i Volcanoes National Park. *Hydrological processes*, 2011, 25, 3, 448–464.

POJAVNOST, KROŽENJE IN UČINKI PROTIRAKAVIH ZDRAVIL V VODNEM OKOLJU

**dr. MARJETA ČESEN¹, doc. dr. TINA KOSJEK², prof. dr. BORIS KOMPARE³,
doc. dr. TINA ELERŠEK⁴, MATJAŽ NOVAK⁵, doc. dr. BOJANA ŽEGURA⁶,
prof. dr. METKA FILIPIČ⁷, doc. dr. FRANCESCO BUSETTI⁸,
prof. dr. ESTER HEATH⁹**

Povzetek

Preverjali smo pojavnost citostatikov ciklofosfamida (CP), ifosfamida (IF) in transformacijskih produktov (TP) ketociklofosfamida (keto-CP), N-dekloroetilciklofosfamida (N-decl-CP) in karboksiciklofosfamida (karboksi-CP) v slovenskih odpadnih vodah (OV). CP smo zaznali v bolnišnični OV (14–22000 ng/L), v vtoku v čistilno napravo (ČN; 19–27 ng/L) in iztoku iz ČN (17 ng/L), medtem ko smo IF določili samo v bolnišnični OV (48–6800 ng/L). Koncentracije karboksi-CP, N-decl-CP in keto-CP so znašale 213–13202 ng/L, 60–2099 ng/L in <LOD–178 ng/L v bolnišnični OV. Na ČN so bile koncentracije TP-jev <LOD. Proučevali smo tudi biološko in abiotsko odstranitev CP-jev in IF-ja. Najvišja odstranitev (99 % za CP-je in 94 % za IF) je bila dosežena z UV/O₃/H₂O₂. Med UV-obsevanjem smo identificirali TP-je (CP: N-decl-CP, keto-CP, imino-fosamid, CP-TP138a, CP-138b; IF: N-dechloroethyl-ifosamid, keto-ifosamid, imino-ifosamid, IF-TP138). Karboksi-CP je izkazal inhibicijo rasti *Synecococcus leopoliensis* (EC₅₀ = 17,1 mg/L). Genotoksičnost smo potrdili za CP, karboksi-CP in zmes (z metabolno aktivacijo +S9) in za karboksi-CP (brez -S9).

Ključne besede: abiotsko čiščenje, biološko čiščenje, citostatik, ekotoksičnost, genotoksičnost, metaboliti, odpadne vode, pojavnost, transformacijski produkt

- 1 Dr. Marjeta Česen, asistent z doktoratom, Odsek za znanosti o okolju, Institut Jožef Stefan, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
- 2 Doc. dr. Tina Kosjek, znanstvena sodelavka, Odsek za znanosti o okolju, Institut Jožef Stefan, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
- 3 Prof. dr. Boris Kompare, profesor, Oddelek za okoljsko gradbeništvo, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Univerza v Ljubljani
- 4 Doc. dr. Tina Eleršek, znanstvena sodelavka, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologija raka, Nacionalni inštitut za biologijo
- 5 Matjaž Novak, doktorski študent, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologija raka, Nacionalni inštitut za biologijo
- 6 Doc. dr. Bojana Žegura, znanstvena sodelavka, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologija raka, Nacionalni inštitut za biologijo
- 7 Prof. dr. Metka Filipič, profesor, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologija raka, Nacionalni inštitut za biologijo
- 8 Doc. dr. Francesco Buseti, znanstveni sodelavec, Curtin University, Curtin Water Quality Research Centre (CWQRC)
- 9 Prof. dr. Ester Heath, profesor, Odsek za znanosti o okolju, Institut Jožef Stefan, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana



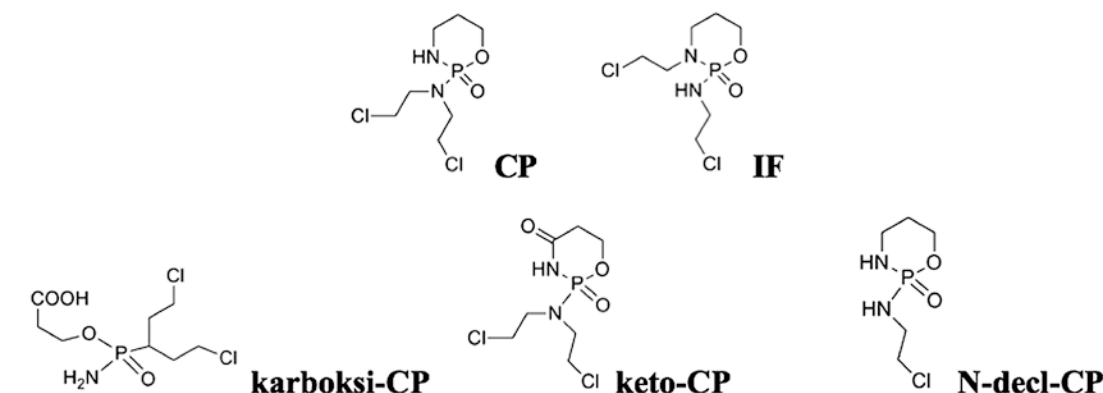
Abstract

The occurrence of cytostatics cyclophosphamide (CP), ifosfamide (IF) and transformation products (TPs) ketocyclophosphamide (keto-CP), N-dechloroethylcyclophosphamide (N-decl-CP) and carboxy-cyclophosphamide (carboxy-CP) in Slovene wastewaters (WWs) was studied. CP was detected in hospital WWs (14-22,000 ng/L), wastewater treatment plant (WWTP) influent (19-27 ng/L) and effluent (17 ng/L). IF was detected in hospital WW (48-6,800 ng/L). Carboxy-CP, N-decl-CP and keto-CP concentrations were 213-13,202 ng/L, 60-2,099 ng/L and <LOD-178 ng/L in hospital WW, respectively. At WWTPs they were <LODs. The biological and abiotic removal of CP and IF was also studied. The highest removal (99 % for CP and 94 % for IF) was achieved by UV/O₃/H₂O₂. The formation of TPs (CP: N-decl-CP, keto-CP, imino-phosphamide, CP-TP138a, CP-138b; IF: N-dechloroethyl-ifosfamide, keto-ifosfamide, imino-ifosfamide, IF-TP138) was confirmed during UV-irradiation. Growth inhibition of *Synecococcus leopoliensis* was observed for carboxy-CP (EC₅₀=17.1 mg/L). CP, carboxy-CP and mixture were genotoxic (with metabolic activation +S9) and carboxy-CP was genotoxic also without -S9.

1. UVOD

Povečanje incidence raka je povezano z naraščajočo porabo zdravilnih učinkovin (ZU) za zdravljenje raka, ki se izločajo iz telesa predvsem z urinom kot zmesi starševskih spojin in njihovih metabolitov. Tovrstne mešanice se odplaknejo v kanalizacijsko omrežje in preko iztokov iz čistilne naprave (ČN) lahko pridejo v površinske vode. Med številnimi registriranimi zdravilnimi učinkovinami za zdravljenje raka sta dva izmed najstarejših predstavnikov ciklofosfamid (CP) in ifosfamid (IF) še vedno pogosto predpisana, kljub poznanim neželenim učinkom. Koncentracije CP in IF v bolnišničnih odpadnih vodah (OV), OV iz ČN ter površinskih vodah se gibljejo v območju ng/L do µg/L, njihovi aktivni metaboliti in transformacijski produkti (TP) pa ostajajo v veliki meri neproučeni, predvsem zaradi zahtevnosti problematike in nizkih koncentracij (Kosjek in Heath, 2011). Za zniževanje prisotnosti ostankov CP-jev in IF-ja v OV in posledično površinskih vodah je pomemben razvoj novih tehnologij čiščenja OV. Poleg tega je tudi poznavanje njihovih razgradnih poti izrednega pomena, saj so lahko TP-ji, ki se tvorijo v času določenega čiščenja OV, še bolj strupeni za vodne organizme kot starševske spojine.

V okviru te študije smo proučevali pojavnost, kroženje in učinke citostatikov CP-jev, IF-ja in njihovih izbranih metabolitov/TP-jev: 4-ketociklofosfamid (keto-CP), N-dekloroetilciklofosfamid ali 3-dekloroetilifosfamid (N-decl-CP) in karboksi-ciklofosfamid (karboksi-CP, slika 1). V ta namen smo razvili analize metode za njihovo določitev v različnih vrstah OV. Validirane metode smo nato uporabili za analizo različnih bolnišničnih OV ter vtokov in iztokov iz pripadajočih ČN. Raziskovali smo tudi odstranjevanje in transformacije starševskih spojin med različnimi biološkimi in abiotskimi postopki čiščenja ter preverili ekotoksičnost in genotoksičnost vseh preiskovanih spojin in njihovih mešanic.



Slika 1: Kemijska struktura preiskovanih spojin

2. MATERIALI IN METODE

2.1. Standardi, reagenti in kemikalije

CP, IF in derivatizacijsko sredstvo za TP-je, N-(terc-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamid z 1-% terc-butildimetilklorosilanom (MTBSTFA z 1-% TBDMCS) smo kupili pri Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Derivatizacijsko sredstvo za CP in IF, trifluoroocetni anhidrid (TFAA) smo kupili pri Fluki (Buchs, Švica). Karboksi-CP, 4-keto-CP, N-decl-CP in devteriran ciklofosfamid-d₆ (interni standard za CP in IF analizo) smo kupili pri podjetju Niomech-IIT GmbH (Bielefeld, Nemčija), devteriran ibuprofen-d₃ (interni standard za TPje) pa pri CDN Isotopes (Quebec, Kanada). Vsa uporabljena topila so imela analitsko čistost.

2.2. Priprava vzorcev

Za analizo na osnovi plinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo smo 100 mL vzorca OV, ki je vseboval CP, IF in keto-CP, koncentrirali s postopkom ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) s kartušami Oasis™ HLB (60 mg, 3 mL). Kartuše smo kondicionirali s 3 mL etil acetata (EtAc), 3 mL metanola (MeOH) in 3 mL vode. Po nanosu vzorca in sušenju sorbenta smo analite eluirali s 3 mL EtAc (Česen idr., 2015). SPE za karboksi-CP in N-decl-CP smo izvedli s kartušami Isolute ENV + (100 mg, 3 mL). Kondicioniranje, nanos vzorca in sušenje sorbenta smo izvedli na enak način kot za CP, IF in keto-CP. V tem primeru smo analite eluirali s 6 mL 5-% ocetne kisline v EtAc (Česen idr., 2016). Derivatizacijo CP-ja in IF-ja smo izvedli s 100 µL TFAA v 100 µL EtAc. Vzorce smo derivatizirali 1 uro pri 60 °C. Metabolite/TP-je smo derivatizirali s 30 µL MTBSTFA z 1 % TBDMCS v 220 µL ACN, kjer smo ekstrakte segrevali 20 ur pri 90 °C (Česen idr., 2016).

Za identifikacijo TP-jev, ki so se tvorili med obsevanjem z UV in UV/H₂O₂, smo vzorce direktno injicirali na tekočinski kromatograf, sklopljen z masnim spektrometrom visoke ločljivosti (LC-HRMS).



2.3. Kemijska analiza

2.3.1. GC/MS

Za kemijsko analizo realnih vzorcev OV in vzorcev OV iz laboratorijskih eksperimentov (biološko in abiotsko čiščenje) smo uporabili plinski kromatograf serije HP 6890 s kvadrupolnim masnim spektrometrom (Hewlett-Packard, Waldbron, Nemčija). Kromatografsko ločbo smo izvedli na kapilarni koloni DB-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent, ZDA) in s He kot nosilnim plinom. Za optimalno kromatografsko ločbo smo uporabili dva različna temperaturna programa (Česen idr., 2015; Česen idr., 2016). Identifikacijo analitov smo opravili v načinu selektivnega ionskega spremljanja (SIM mode) s primerjavo retencijskega časa standardov in vzorcev ter s spremljanjem izbranih ionov derivatiziranih analitov (Česen idr., 2016; Česen idr., 2015).

2.3.2. LC/HRMS

Neznane strukture TP-jev smo identificirali s pomočjo kemijske analize na LC-HRMS sistemu Thermo Accela 600 LC, ki je sklopljen z masnim spektrometrom LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, ZDA). Sistem je bil opremljen z ionizacijo z elektrosprejem. Kromatografsko ločbo smo dosegli z uporabo kolone Kinetex C18 (100 mm × 2,1 mm, 3 μm, 100 Å, Phenomenex, Sydney, Avstralija). Kot mobilno fazo smo uporabili ultra čisto vodo in metanol z dodatkom 0,1-% mravljinčne kisline. Strukturo TP-jev smo določili v načinu »data dependent mode« na osnovi petih najintenzivnejših ionov v MS spektru (Česen idr., 2016).

2.4. Vzorčenje

V okviru raziskave smo izvedli dve vzorčnji OV. Med prvim vzorčenjem smo zbrali vzorce OV iz petih slovenskih bolnišnic in pripadajoče vtoke in iztoke iz ČN (april, 2013–junij, 2014; tabela 1) in v njih določili koncentracije starševskih spojin (CP in IF). Drugo vzorčenje (15. 12. 2014–21. 12. 2014) smo izvedli v 7 zaporednih dneh v bolnišnici A (tabela 1) in sredi tedna na pripadajoči ČN, kjer smo preverjali prisotnost tako starševskih spojin kot tudi izbranih metabolitov/TP-jev. Vsi vzorci OV iz bolnišnice so bili vzorčeni trenutno, vzorci iz ČN pa so bili časovno povprečni 24-urni. Tehnologija čiščenja OV na ČN, vključenih v to študijo, je temeljila na čiščenju s suspendirano biomaso (ČN, ki prejme OV iz bolnišnic A, B in C) ali na čiščenju z membransko biofiltracijo (ČN, ki prejme vodo iz bolnišnice D).

Tabela 1: Seznam vzorcev OV in določene koncentracije CP-ja in IF-ja

Vzorec	Datum	CP (ng/L)	IF (ng/L)
A: bolnišnična OV	15. 4. 2013	754 ± 28,2	2040 ± 136
	5. 12. 2013	14,6 ± 0,351	<LOD
	16. 1. 2014	1080 ± 200	47,9 ± 10,3
	9. 5. 2014	5320 ± 33,2	6810 ± 0,619
	4. 6. 2014	22100 ± 764	<LOD
B: bolnišnična OV	21. 11. 2013	129 ± 16,3	<LOD
	21. 11. 2013	125	<LOD
A and B: pripadajoči vtoki v ČN	9. 12. 2013	<LOD	<LOD
	29. 1. 2014*	27,4 ± 7,35	<LOD
	2. 6. 2014	19,0 ± 3,44	<LOD
A and B: pripadajoča iztoka iz ČN	10. 12. 2013	<LOD	<LOD
	3. 6. 2014	17,4 ± 5,02	<LOD
C: bolnišnična OV/vtok ČN	28. 11. 2013	<LOD	<LOD
C: pripadajoč iztok iz ČN	28. 11. 2013	<LOD	<LOD
D: bolnišnična OV	14. 11. 2013	<LOD	<LOD
D: pripadajoč vtok na ČN	14. 11. 2013	<LOD	<LOD
D: pripadajoč iztok iz ČN	15. 11. 2013	<LOD	<LOD
E: bolnišnična OV (brez ČN)	7. 11. 2013	<LOD	<LOD

* V tem primeru ni bil vzorčen iztok iz ČN.

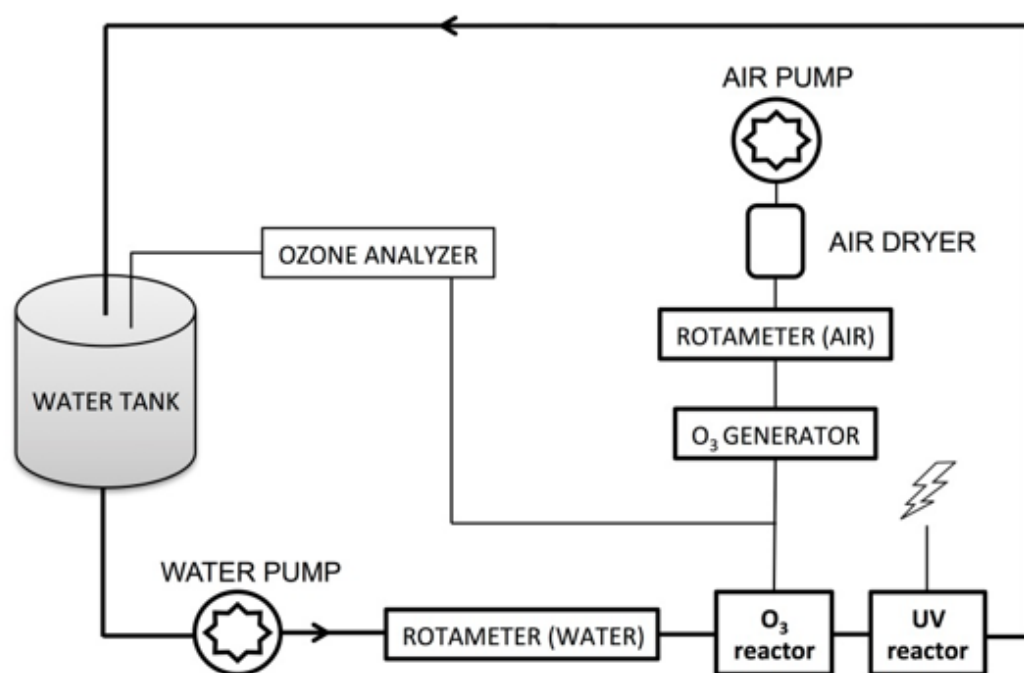
2.5. Čiščenje OV na laboratorijskem nivoju

Odstranitev CP-jev in IF-ja smo proučevali v prezračevanih pretočnih bioreaktorjih s pritrjeno biomaso na nosilcih Mutag Biochip™. CP in IF smo dodajali v umetno pripravljeno OV s končno koncentracijo 10 μg/L, ki smo jo uvajali v dva bioreaktorja med 3-mesečnim eksperimentom (pretok: 4 L/dan). Tretji bioreaktor je služil kot kontrolni bioreaktor (slika 2).



Slika 2: Pretočni bioreaktorji s pritrjeno biomaso

Uspešnost odstranjevanja CP-ja in IF-ja smo poleg biološkega čiščenja proučevali tudi pri naslednjih abiotičnih postopkih čiščenja OV: UV-obsevanje, ozonacija (O_3) ter napredni oksidacijski postopki (AOP), kot so UV/O_3 , UV/H_2O_2 , O_3/H_2O_2 in $UV/O_3/H_2O_2$. Vzorec OV (4,8 L) s koncentracijo 10 $\mu g/L$ CP ali IF smo izpostavili posameznemu postopku čiščenja, pri čemer je vzorec krožil po sistemu s pretokom 60 L/uro (slika 3). Vzorce smo izpostavili posameznemu postopku za 0–120 min in eksperimente izvedli pri različnih začetnih koncentracijah H_2O_2 (0–5 g/L). Generator ozona je proizvajal O_3 v končni koncentraciji 10 mg/L. Za UV-obsevanje vzorca smo uporabili nizkotlačno bakreno UV sijalko (12 W, UV-doza: 44 mJ/cm^2). Da bi povečali uspešnost odstranitve izbranih spojin, smo najučinkovitejši AOP ($UV/O_3/H_2O_2$) zaporedno vezali z biološkim čiščenjem.



Slika 3: Shema naprave abiotičnega postopka čiščenja OV

Tvorbo TP-jev smo proučevali med postopkoma čiščenja UV in UV/H_2O_2 (koncentracija H_2O_2 8,5 mg/L) v steklenem reaktorju pri koncentraciji 26,1 mg/L CP oziroma IF ($V = 500$ mL deionizirane vode). Vsebino reaktorja smo mešali z magnetnim mešalom (500 rpm), za obsevanje pa smo uporabili nizkotlačno živosrebrno sijalko (15 W, intenziteta $UV = 4,5 \times 10^{-6}/Ein$). Poskusi so trajali 60 min (UV) oziroma 36 min. (UV/H_2O_2).

2.6. Ocena strupenosti

Ocenili smo ekotoksičnost in genotoksičnost preiskovanih posameznih spojin (CP, IF, karboksi-CP, keto-CP in N-decl-CP) ter njihove mešanice. Za oceno ekotoksičnosti smo kot testne organizme uporabili zelene alge *Pseudokirchneriella subcapitata* SAG 61.81 in cianobakterije *Synechococcus leopoliensis* SAG 1402-1, ki so bile gojene in izpostavljene posamezni spojini ali zmesi, kot je opisano v OECD TG 201. Rast celic smo določili s pretočnim citometrom (BD FACSCalibur, Sparks, MD, USA). Testirane koncentracije posameznih spojin so bile 3,05; 9,77; 31,25; 100 in 320 mg/L, medtem ko smo koncentracije vsake spojine v zmesi določili na podlagi vrednosti EC_{5-90} spojine karboksi-CP (6,0; 7,9; 10,5; 17,1 in 37,2 mg/L, tabela 2).

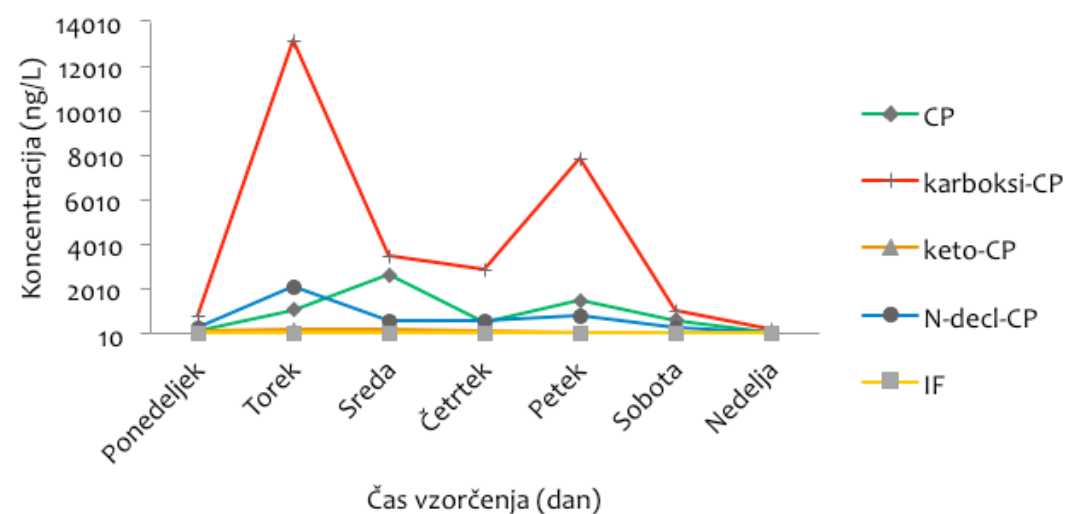
Genotoksičnost preiskovanih spojin in zmesi smo ocenili s testom SOS/*umuC* (Reifferscheid idr., 1991). Testne koncentracije spojin so bile enake kot pri ekotoksikološkem testiranju. Eksperimente smo izvedli na genetsko spremenjenem organizmu *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 v prisotnosti metabolne aktivacije (+S9) in v njeni odsotnosti (–S9). Genotoksično aktivnost smo določili z indukcijskim razmerjem (IR), pri čemer je bil $IR \geq 2$ prag, pri katerem je bila spojina/zmes spoznana kot genotoksična (Reifferscheid idr., 1991). Analize podatkov smo izvedli z uporabo programske opreme Prism 5 (GraphPad Inc., La Jolla, ZDA).

3. REZULTATI

3.1. Kemijska analiza realnih OV

V sklopu prvega vzorčenja sta dva vzorca OV vsebovala CP v koncentracijah med 14,6 in 22100 ng/L, IF pa smo določili le v eni bolnišnični OV (< LOD do 6810 ng/L; tabela 1). CP smo določili tudi v dveh vzorcih vtoka v ČN (19–27 ng/L) in enkrat v pripadajočem iztoku iz ČN (17 ng/L). Koncentracije IF-ja so bile < LOD v vseh vtokih in iztokih iz ČN, ki smo jih vključili v to študijo (tabela 1).

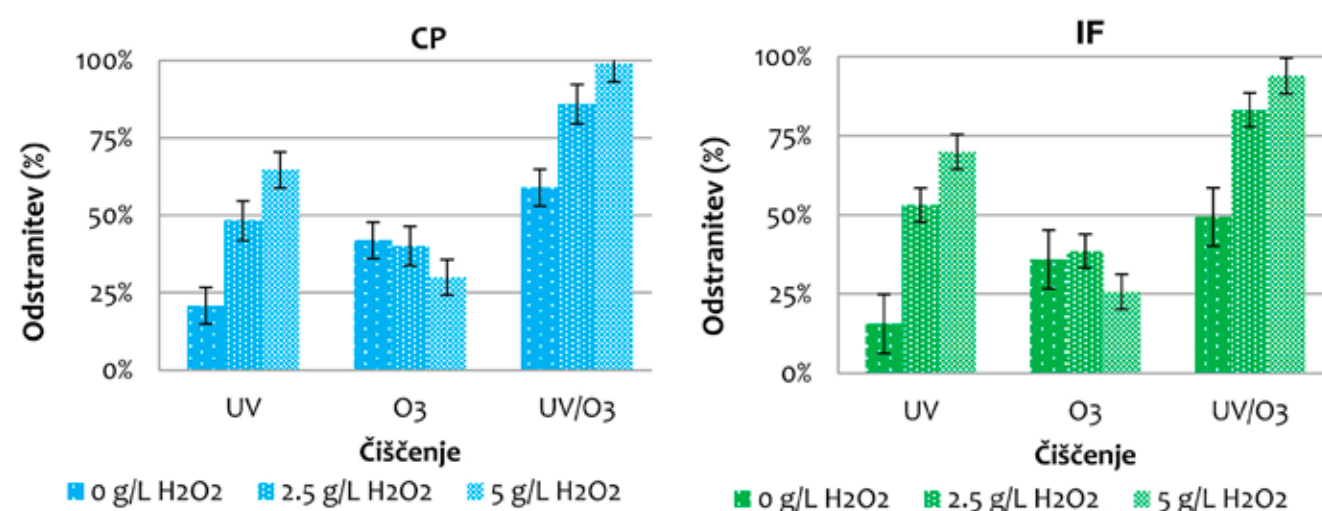
Analiza vzorcev OV iz bolnišnice v okviru drugega vzorčenja je pokazala naslednje najvišje koncentracije: CP = 2690 ng/L, IF = 47,9 ng/L, karboksi-CP = 13200 ng/L, N-decl-CP = 2100 ng/L in keto-CP = 178 ng/L, medtem ko so bile koncentracije v pripadajočem vtoku in iztoku iz ČN < LOD. Karboksi-CP smo zaznali v najvišjih koncentracijah, IF pa v najnižjih (25–47 ng/L, slika 4). Najvišje koncentracije analitov so bile določene v vzorcih, zbranih med torkom in petkom. Koncentracije CP-ja in IF-ja so primerljive z literaturnimi podatki, medtem ko je bila prisotnost preiskovanih metabolitov/TP-jev v OV prvič kvantitativno ovrednotena v naši raziskavi (Kosjek in Heath, 2011; Česen idr., 2016).



Slika 4: Dnevne koncentracije preiskovanih spojin v bolnišnični OV (15. 12. 2014–21.12.2014; SD < 15,9 % za vse spojine)

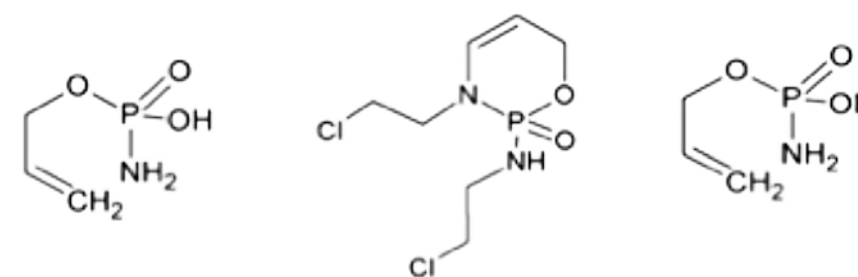
3.2. Čiščenje OV

Povprečni delež odstranitve CP-ja in IF-ja med biološkim čiščenjem je znašal 42 % za CP in 18 % za IF, kar smo pričakovali, saj sta CP in IF iz literarnih podatkov znani kot biološko slabo razgradljivi spojini (Česen idr., 2015). Uspešnost odstranitve CP-ja in IF-ja po 120 min različnih abiotskih čiščenj je prikazana na sliki 5. Višanje koncentracije H_2O_2 je povečalo odstotek odstranitve CP-ja in IF-ja v primeru čiščenja z UV/ H_2O_2 , medtem ko smo opazili obraten pojav pri postopku z O_3 . Kljub temu smo dosegli najvišji odstotek odstranitve, npr. 99 % za CP in 94 % za IF s kombinacijo UV/ O_3 / H_2O_2 pri 5 g/L (slika 5). Z zaporedno vezanim postopkom čiščenja (biološko čiščenje ter UV/ O_3 / H_2O_2 pri 5 g/L) pa smo prvi dosegli zelo visoko odstranitev (> 99 %) CP-ja in IF-ja (Česen idr., 2015).



Slika 5: Delež odstranitve CP-ja in IF-ja med različnimi abiotskimi postopki čiščenja

Med abiotskim čiščenjem (UV in UV/ H_2O_2) smo identificirali več TP-jev. S kemijsko analizo smo potrdili nastanek štirih TP-jev iz CP-ja (N-decl-CP, keto-CP, CP-TP138a in CP-TP138b) in štirih TP-jev iz IF-ja (N-dekloroetil-ifosfamid, keto-ifosfamid, imino-ifosfamid in IF-TP138) med UV-obsevanjem. Med čiščenjem z UV/ H_2O_2 smo poleg vseh TP-jev, ki smo jih zaznali pri UV obsevanju, identificirali še dodatni TP iz CP-ja, imino-fosfamid. Z identifikacijo navedenih TP-jev smo potrdili, da so nekateri TP-ji, ki se tvorijo med abiotskimi postopki čiščenja, lahko strukturni analogi humanih metabolitov (Li idr., 2010). Poleg tega smo kot prvi identificirali tri TP-je (CP-TP138a, imino-ifosfamid in IF-TP138), ki so prikazani na sliki 6 (Česen idr., 2016).



Slika 6: Novi TP-ji (od leve proti desni: CP-TP138a, imino-ifosfamid in IF-TP138)

3.3. Ocena toksičnosti

Ugotovili smo, da sta CP in IF nestrupena za organizma *P. subcapitata* in *S. leopoliensis* pri koncentracijah do 320 mg/L (tabela 2). Dobljeni rezultati so v skladu z literaturo za CP, medtem ko za IF tovrstni podatki niso na voljo (Grung idr., 2008; Zounkova idr., 2007). Kot prvi smo proučevali ekotoksičnost izbranih metabolitov/TP-jev na *S. leopoliensis*, kjer je le spojina karboksi-CP signifikantno inhibirala rast cianobakterij ($EC_{50} = 17,1$ mg/L; tabela 2).

Tabela 2: **ECx in NOEC (no observed effect concentration) vrednosti za vsako spojino na organizmu *S. leopoliensis*; n.c. = not converged (program Prism 5)**

Spojina	EC5-90 in 95 % CI (mg/L)	NOEC (mg/L)
CP	n.c.	> 320
IF	n.c.	> 320
karboksi-CP	EC ₅ : 6,0 (4,4 – 8,3) EC ₁₀ : 7,9 (6,0 – 10,2) EC ₂₀ : 10,5 (8,5 – 12,9) EC ₅₀ : 17,1 (14,4 – 20,3) EC ₉₀ : 37,2 (27,8 – 49,7)	9,8
Keto-CP	n.c.	> 320
N-decl-CP	n.c.	> 320



Eksperimentalno določeno toksičnost zmesi smo primerjali z modelom »concentration addition« (CA). Ugotovili smo, da je toksičnost, napovedana po modelu CA ($EC_{50} = 21,1$ mg/L) nižja od eksperimentalno določene ($EC_{50} = 11,5$ mg/L). S tem smo dokazali potencirajoči učinek preiskovane mešanice. Test SOS/*umuC* je pokazal genotoksično aktivnost spojin CP-ja, karboksi-CP pri 320 mg/L in zmesi pri posameznih koncentracijah 37,2 mg/L v prisotnosti +S9, medtem ko je bila spojina karboksi-CP (320 mg/L) genotoksična tudi v odsotnosti –S9.

4. ZAKLJUČEK

V okviru študije smo potrdili prisotnost CP-ja in IF-ja v dveh od petih preiskovanih slovenskih bolnišničnih OV. CP smo zaznali tudi v vtokih in iztoku iz ene ČN, medtem ko so bile koncentracije IF-ja v vseh OV iz ČN < LOD. Analiza bolnišnične OV iz enotedenskega vzorčenja je pokazala prisotnost spojine karboksi-CP v najvišjih koncentracijah (predvsem med torkom in petkom). Z biološkim čiščenjem smo le delno odstranili CP in IF iz OV, najvišjo učinkovitost odstranjevanja pa smo dosegli z UV/O₃/H₂O₂ (pri 5 g/L; > 94 % za CP in IF). Ko smo izbrani AOP zaporedno povezali z biološkim čiščenjem, smo dosegli še višji odstotek odstranitve (> 99 %) za obe spojini. Med postopkoma UV in UV/H₂O₂ smo identificirali 3 nove TP-je iz CP-ja oziroma IF-ja: CP-TP138a, imino-ifosfamid in IF-TP138. Ocena ekotoksičnosti je pokazala, da je karboksi-CP škodljiv za testne organizme pri izbranem delovnem koncentracijskem območju. Prav tako je bila mešanica ekotoksična in genotoksična z opaženim potencirajočim učinkom.

ZAHVALA

Raziskovalno nalogo je delno financirala Evropska unija v okviru Evropskega projekta EU FP7 CytoThreat. Finančna podpora raziskave je tekla tudi v okviru programske skupine P1-0143, projektov L1-5457, J1-6744 in L1-7544, štipendije AdFutura za izobraževanje doktorskih študentov v tujini ter usposabljanja in financiranja M. Česen preko ARRS. Vsem sodelujočim ČN in bolnišnicam se zahvaljujemo za sodelovanje in podporo pri vzorčenju.

LITERATURA IN VIRI

1. Česen, M., Kosjek, T., Buseti, F., Kompare, B., Heath, E., 2016. Human metabolites and transformation products of cyclophosphamide and ifosfamide: analysis, occurrence and formation during abiotic treatments. Environmental Science and Pollution Research electronic version.
2. Česen, M., Kosjek, T., Laimou-Geraniou, M., Kompare, B., Širok, B., Lambropoulou, D., Heath, E., 2015. Occurrence of cyclophosphamide and ifosfamide in aqueous environment and their removal by biological and abiotic wastewater treatment processes. Science of The Total Environment 527–528, 465–473.
3. Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K. V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. Ecotoxicology and Environmental Safety 71, 328–340.
4. Kosjek, T., Heath, E., 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry 30, 1065–1087.
5. Li, F., Patterson, A. D., Höfer, C. C., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J., Idle, J. R., 2010. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC–ESI–QTOFMS-based metabolomics. Biochemical Pharmacology 80, 1063–1074.

6. OECD TG 201, 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test: OECD Publishing.
7. Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R. K., 1991. A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 253, 215–222.
8. Zounkova, R., Odraska, P., Dolezalova, L., Hilscherova, K., Marsalek, B., Blaha, L., 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. Environmental Toxicology and Chemistry 26, 2208–2214.