**תכנית עבודת גמר המוגשת לאישור**

**16.01.2017**

**301842266**

**Rotem Marom רותם מרום**

**החוג לאגרואקולוגיה ובריאות הצמח**

**שם המדריכים: פרופ' יצחק הדר ופרופ' בני חפץ**

**פירוק החומר הרפואי Lamotrigine על ידי פטריית הריקבון הלבן *Pleurotus ostreatus***

**Degradation of the pharmaceutical Lamotrigine by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus***

**אישור התוכנית:**

**תאריך:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**חתימת הסטודנט:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**חתימת המנחה:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**חתימת ראש החוג:**  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**הצגת הבעיה**

בשנים האחרונות גברה המודעות הסביבתית להגעתם ותנועתם של חומרים רפואיים בסביבה. לאחר הצריכה, חומרים רפואיים מופרשים מהגוף ללא שינו, כמטבוליטים או כקוניוגטים. לאחר הפרשתם מהגוף מגיעים החומרים אל מי השפכים. מי השפכים עוברים תהליך טיפול במפעלי טיהור שפכים, מכיוון שחלק גדול מהחומרים הרפואיים אינם מסולקים כראוי בתהליך טיפול השפכים, שאריות שלהם נמצאו בקולחים ומשם קצרה הדרך לסביבה (Gurke et al. 2015).

החומר הרפואי בו אתמקד במחקר הוא Lamotrigine , תרופה זו נוגדת פרכוסים ומשמשת לטיפול באפילפסיה וכמייצבת מצב רוח (Vajda et al. 2013). נוכחות של Lamotrigine בסביבות מימיות דווח לראשונה ב- 2010 במחקר בו נדגמו מאגרי מים שונים וקולחים ברחבי ארצות הברית (Ferrer & Thurman 2010). בעבודה זו נמצא Lamotrigineבריכוזים גבוהים יחסית: טווח ריכוזים הנע בין ng/L 17-488 עבור Lamotrigine וריכוזים של מתחת לגבול הגילוי עד ל-ng/L 209 עבור המטבוליט העיקרי שלו Lamotrigine-2-N glucuronide (Lamotrigine-2N-G). במחקר אחר, עקבו אחר ריכוזם של 14 חומרים רפואיים פעילים בנקודת שחרור הקולחים אל נחל בארה"ב ומצאו גם כן Lamotrigine בריכוזים בטווח של ng/L1,760-5,700 ו-

ng/L 200-35,00 של המטבוליט Lamotrigine-2NG (Writer et al. 2013).

סיבה נוספת לדאגה מנוכחות חומרים רפואיים במי הקולחים היא נוכחתם בקרקעות חקלאיות לאחר ההשקיה בקולחים. במחקר שבדק את המצאות חומרים רפואיים בקרקע חקלאית נמצא ריכוז של g / ng1.2 Lamotrigine לפני תקופת הגידול ואף גבוה יותר בסוף תקופת הגידול, מה שמעיד על הצטברות החומר בקרקע (Grossberger et al., 2014). מחקר אחר שעסק ב Lamotrigine, ובתרופה נוגדת פרכוסים נוספת Carbamazepine והמטבולטים שלה מצא שהספיחה של Lamotrigine לקרקעות שונות היא הגדולה ביותר (Paz et al., 2016). בנוסף לנוכחותם בקרקע, החומרים יכולים להיקלט על ידי צמחים. מחקר שבדק את הצטברותם של חומרים רפואיים בירקות שורש, בעת השקיה בקולחים במערך ליזימטרים, מצא שחומרים רפואיים הצטברו בשורשים ובעלים. Lamotrigine נמצא בריכוז שלng/g 0.416 בשורש גזר ו- ng/g 0.983 בעלים של גזר (Malchi et al., 2014), מחקר נוסף שבדק בין היתר נוכחות של Lamotrigine בעגבנייה ומלפפון מצא גם כן נוכחת של החומר בעלים ובפרי עצמו במקרה של מלפפון, ואילו בעלים בלבד במקרה של עגבנייה (Goldstein et al., 2014).

שימוש בקולחים לחקלאות הולך וגובר בשנים האחרונות והצפי הוא שהשימוש ימשיך לעלות (אגף איכות מים, רשות המים, 2014; משרד הבריאות, 2015). המצאות חומרים אלה בקולחים מעידה על העמידות היחסית שלהם בסביבה. כאשר אנו אוכלים גידולים שהושקו בקולחים המכילים חומרים רפואיים, אנו נחשפים לחומרים אלו שלא צורך (Paltiel et al., 2016). לכן ישנו צורך גובר למצוא פתרון טיפול שיעזור לסילוקם מהקולחים לפני יישומם בשדה.

מחקרים רבים מציגים את היכולת של פטריות ריקבון לפרק מזהמים אורגנים קשי פירוק. פטריות ריקבון לבן הן בעלות יכולת ייחודית לפרק ליגנין, פולימר אורגני מורכב המצוי בדופן התא הצמחי ומצוי בקומפלקס עם צלולוז והמיצלולוז ונמצא בריכוז גבוה בצמחים מעוצים. לשם כך פיתחו פטריות הריקבון הלבן מערכות אנזימתיות רבות ומורכבות כגון ליגנין פרוקסידאז ((LiP מנגן פרוקסידאז ((MnP ולקאז ((Lac. כאשר החמצון של אנזימים אלו מתבצע באופן עקיף על ידי מולקולות בעלות משקל מולקולרי נמוך (Leonowicz et al.1999).

הספציפיות הנמוכה של מערכות פירוק הליגנין, ומערכות אנזימטיות נוספות כגון אנזימים ממשפחת ציטוכרום 450P מונואוקסיגנאז אשר אחראיים לקוניוגציה, ואפילו מינרליזציה, של חומרים. עבודה רבה נעשתה בנושא פירוק מזהמים שונים על ידי פטריות ריקבון לבן, פטריות אלו יכולת לפרק מגוון רחב של מזהמים אורגנים כגון חומרי הדברה, צבעים סינטטיים חומרי נפץ, חומרים רפואיים ועוד (Harms et al. 2011). על בסיס ידע זה, ניתן להשתמש בפטריות ריקבון לבן כפתרון לפירוק מזהמים אורגניים קשי פירוק כמו החומר הרפואי Lamotrigine.

פטריית הריקבון הלבן המשמשת במחקר היא ה- *Pleurotus ostreatus .* פטריה זו, ממערכת פטריות הבסיסה (Basidiomycota), משמשת כפטריית מאכל נפוצה מאוד, בעלת יכולת פירוק ליגנין ומזהמים אורגניים נוספים. במחקר שנעשה במעבדתנו נמצא ש *P. ostreatus* יעילה בפירוק החומר הרפואי Carbamazepine כאשר נבדקו 3 זנים שונים של הפטרייה נמצא פירוק משמעותי של התרופה כאשר בזן 9PC, בו אתמקד בעבודתי, נמדדה העלמות של 99% מהחומר Carbamazepine תוך 10 ימי אינקובציה. בנוסף, הוצא שהאנזימים האחראים על פירוק זה, מנגן פרוקסידאז וציטוכרום 450P, לקבלת התוצרים 10,11- epoxycarbamazepine ו- 10,11-dihydroxycarbamazepine באינקובציה של *P. ostreatus* עם Carbamazepineעל גבי מצע GP ו-22 תוצרי פירוק נוספים באינקובציה על גבי קש כותנה (Golan-Rozen et al. 2011; Golan-Rozen et al. 2015).

**השערות ומטרת העבודה**

הנחת המחקר היא שפטריית הריקבון הלבן *P. ostreatus*  מסוגלת לפרק Lamotrigine תוך יצירת תוצרי טרנספורמציה שונים. לכן מטרת העבודה העיקרית היא לבדוק את יכולת הפטריה *Pleurotus ostreatus* לפרק Lamotrigine ולנסות, בעזרת אפיון של תוצרי הפירוק, להבין מהם המנגנונים האנזימתיים המעורבים בתהליך.

**תוכנית ושלבי העבודה**

גידול הפטרייה על מצע מוצק: דסקיות פטרייה בקוטר mm 5 יונחו על גבי צלחת פטרי בגודל mm90 המכילה מצע Glucose Peptone (GP) מוצק, הפטרייה תגודל במשך 5 ימים בטמפ' של 28 °C בחושך ומקצה המושבה תילקח דסקית נוספת להמשך תיחזוק ו/או גידול במצע נוזלי.

הדגרת *P. ostreatus* עם Lamotrigine

לתוך בקבוקי ארלנמייר בנפח mL 250, המכילים mL 50 מצע GP נוזלי יוספו שתי דיסקיות פטרייה בתנאים זהים למצע מוצק למשך 10 ימים. לאחר 10 ימים המצע יוחלף למצע טרי המכיל Lamotrigine בריכוז התחלתי שלL /mg 100. הבקבוקים יאטמו בפקק נייר ויוגדרו במצב סטטי למשך כל ימי הניסוי.

לקיחת דגימות

על מנת לבדוק את ריכוז ה Lamotrigine בתמיסה ונוכחות של מטבוליטים, ילקחו דגימות בנפח של mL 1.5 לאחר החלפת המצע בזמנים שונים לאורך תקופת ההדגרה. לקיחת דגימות תתבצע במנדף ביולוגי והדוגמאות ישמרו במבחנות אפנדורף mL2 בהקפאה (C°80-) עד למועד המדידה.

מיצוי Lamotrigine ומטבוליטים מהפטרייה

על מנת לבדוק האם ישנה הצטברות של Lamotrigine בתוך תאי הפטרייה יתבצע מיצוי של החומר מהביומסה. לצורך כך תופרד הפטרייה ממצע הגידול, על ידי סינון בואקום, והתפטיר יעבור יבוש בהקפאה (לופילייזר). לאחר מכן הביומסה תעבור כתישה על ידי עלי ומכתש ויתבצע מיצוי במתנול של התפטיר בעזרת טלטול או בעזרת מכשיר ה-Accelerated Solvent Extraction. תמיסת המיצוי תיבדק לנוכחות Lamotrigine ובמקביל תשלח לאנליזתMS -LC לבדיקת נוכחות מטבוליטים בתמיסה.

מעכב אחר ריכוז Lamotrigine

על מנת לבדוק מה הוא ריכוז החומר בתמיסות השונות (מצע הגידול ותמיסות המיצוי) לאורך ימי הגידול תתבצע אנליזה כמותית באמצעות מערכת HPLC המצוידת בגלאי diode array באורך גל של nm 270. זיהוי וכימות ה-Lamotrigine יעשה על ידי עקום כיול חיצוני שיוכן על גבי תמיסת הרקע המתאימה.

זיהוי מטבוליטים

לצורך זיהוי וכימות מטבוליטים בתמיסות השונות נעשה אנליזת LC-MS, אנליזה זו תעשה על ידי ד"ר יוליוס בן ארי במעבדת הצב"מ.

הוספת מעכבים ומשרנים

כדי להבין מה הם המנגנונים המעורבים בתהליך העלמת ה-Lamotrigine על ידי הפטרייה, תתבצע סדרת ניסויים בה יבדקו חומרים שונים אשר אמורים לבצע עיכוב או שפעול אנזימטי, בין אם ספציפי או לא, על מנת לקבל מושג על האנזימים המשתתפים בתהליך.

בדיקת גידול הפטרייה ופרוק Lamotrigine על רקע של רכז קולחים שעברו התפלה

אחת הדרכים לסילוק מזהמים מקולחים הוא התפלה בעזרת אוסמוזה הפוכה. אולם ברכז שנוצר הריכוז של המזהמים עולה לפיכך רכז מקולחים במכון טיהור יהווה גם כן מצע לברור יכולת הפרוק של הפטרייה. יערכו ניסויים בדומה למתואר למעלה כאשר רכז קולחים ישמש מצע גידול לפטרייה.

**תוצאות ראשוניות**

**פיתוח שיטה ופרוטוקול גידול מתאימים**

בעבודה קודמת במעבדתנו נמצא שמצע הגידול המתאים ביותר לעידוד הפטרייה בפירוק ה- Lamotrigine הוא מצע Glucose Peptone (GP). מצע זה בעייתי כרקע לכימות ה-Lamotrigine ב-HPLC מכיוון ששיא הבליעה של החומר ממוסך על ידו. מרכיבי המצע אינם מופרדים כיאות מהחומר, אין אפשרות לקבל baseline ולכמת את ריכוז החומר, כפי שניתן לראות באיור מס' 1. כדי לנסות לדלדל את רעשי הרקע נלקח מצע GP המהול לחצי מכמות הנוטריינטים בהנחה שיכולת הפירוק תישאר משמעותית גם במצע מהול, אך גם במקרה זה ישנה הפרעה גדולה של מרכיבי המצע כפי שניתן לראות באיור מס' 2.

|  |  |
| --- | --- |
| B | A |
| איור 1. כרומטוגרפיה נוזלית של Lamotrigine בריכוז mg/L 5 על רקע מצע GP (A) ועל רקע מצע GP מדולל (B). Retention times ((R.T 10.25 דקות. | |

מכיוון שמצע ה-GP הוא המצע המתאים ביותר לעידוד פירוק ה-Lamotrigine על ידי *P. ostreatus* היה צורך לחפש את המרכיב הספציפי בתוך מצע זה המפריע לכימות ה-Lamotrigine כדי לראות האם ישנה אפשרות לגדל את הפטרייה ללא מרכיב זה ועדיין לקבל פירוק משמעותי של החומר. התבצעו סדרת ניסויים בהם רץ כל מרכיב של המצע בנפרד כדי לבדוק מה המרכיב או המרכיבים הספציפיים במצע ה-GP הממסכים את כימות ה- Lamotrigine.

בניסויים אלו נמצא שמרכיב ה- Yeast Extract (Y.E) הוא המפריע ביותר בכימות ה-Lamotrigine. מכיוון שמרכיב זה הוא חיוני לגידול הפטרייה, התבצע פרוטוקול דו שלבי, בו תחילה הפטרייה גודלה במצע GP מלא על כל מרכיביו במשך 10 ימים כדי שתוכל לבסס ביומסה מספיקה ולקבל את כל הנוטריינטים הדרושים לה. בשלב השני התבצעה החלפת מצע, למצע GP מדולל ((GP D-Diluted אשר לא מכיל Y.E וכן מכיל את החומר הרפואי Lamotrigine. במקביל, כדי להתרחק מרעשי הרקע הועלה ריכוז ה-Lamotrigine ההתחלתי בניסוי פי 10. נמצא שישנו הבדל משמעותי של המצע לאורך ימים בגידול בהסתכלות עליו כרקע לכימות ב-HPLC, לכן כימות ה-Lamotrigine נעשה על ידי עקומי כיול חיצונים שהוכנו על גבי תמיסות הרקע (מצע GP ללא Yeast Extract) בהתאם לימי הדיגום, כאשר עקומי כיול הכנו עבור מצע טרי מיום 0, מצע משומש (שגדלה עליו פטריה) מיום 5, מצע משומש מיום 10 ומצע משומש מיום 20. כפי שניתן לראות באיור מס' 2 אכן הייתה העלמות של 50% מהחומר בניסוי זה.

איור 2. העלמות Lamotrigine על ידי *P. ostreatus* במצע גלוקוז פפטון מדולל ללא תמצית שמרים, כאשר Lamotrigine בריכוז התחלתי של 100 mg/L.

**זיהוי מטבוליטים**

Lamotrigine עובר שינוי מטבולי בגוף האדם. כאמור, המטבוליט העיקרי של התרופה הוא Lamotrigine-2NG כאשר 90% מהתרופה הופכת למטבוליט זה והוא מופרש בשתן. לצד מטבוליט זה נמצאו ביונקים מטבוליטים נוספים אשר חלקם, כמו ה-Lamotrigine-2NG, נוצרים על הטבעת הטריאזנית של ה-Lamotrigine וחלקם נוצרים על טבעת הדיכולורובנזן, כאשר באחרון ישנו חיבור עם מולקולת Glutathione (U. A. Argikar 2009; Hao Chen, Scott Grover, Linning Yu 2010).

תחילה נלקחו דגימות ממצע הגידול של הפטרייה בחשיפה לתרופה בזמנים שונים (ימים 5, 10 ו-20), אך עקב נוכחות נמוכה של מטבוליטים אלה במצע הגידול, יבדקו האם חומרים אלו נוכחים ומצטברים בתוך תאי הפטרייה.

שלב זה נמצא כרגע בביצוע.

**הבנת המנגנונים המעורבים בתהליך העלמות Lamotrigine בנוכחות *P. ostreatus***

ביונקים, כאמור, מתבצעת קוניוגציה על ה-Lamotrigine הן בטבעת הטריאזינית והן בטבעת הדיכלורובנזן. ריקאציות אלו מתבצעות על ידי אנזימים שונים, רק חלקם ידועים בספרות. המטבוליט העיקרי בגוף האדם Lamotrigine-2NG, נוצר על ידי אנזימים ממשפחת [UDP](https://en.wikipedia.org/wiki/Uridine-diphosphate)-glucuronosyltransferases (UGT), UGTs הם האנזימים האחראים לחיבור של חומצה גלוקורונית לקבוצות פונקצינאליות שונות. באדם ישנה תת- משפחה שנקראת UGT1A. בכבד מתבטא האנזים UGT1A4 אשר פועל על העמדה ה-N2 בטבעת הטריאזנית (U. A. Argikar 2009).

בנתיב השני, Lamotrigine עובר מודיפקציות על טבעת הדיכלורובנזן. ריאקציה זו מתבצעת על ידי אנזמים ממשפחת ה-Cytochromes (CYPs) P450 , כאשר בכבד האדם מתבטא האנזים 6A2 450P, בתהליך זה Lamotrigine עובר חמצון כאשר נוצר תוצר ביניים (לא יציב) הנקרא arene- oxide. לאחר מכן יש חיבור של מולקולת Glutathione על ידי האנזים Glutathione S-transferase, המולקולה יכולה להמשיך לעבור מודפיקציות על טבעת הדיכלורובזן וליצור תוצרים נוספים(Hao Chen, Scott Grover, Linning Yu 2010).

תחילה, בדקתי את המעכב 1-Aminobenzotriazole (1-ABT), שהוא מעכב לא ספציפי, בלתי הפיך, הפועל על ציטוכרום P450, אנושי ולא אנושי, נבדק רבות בהקשר של מטבוליזם של תרופות (Sun et al. 2011) ונמצא כמעכב את הריאקציה בפירוק החומר הרפואי Carbamazepine (Golan-Rozen et al. 2011). זאת כדי לבדוק האם משפחת אנזימים אלו מעורבים בריאקציה של פירוק ה-Lamotrigine. בניסוי זה נמצא עיכוב מלא של הריאקציה, אשר יכול לנבוע מריכוז גבוה של המעכב. עיכוב זה יכול לרמז שמשפחת אנזימי P40 מעורבים בריאקציה (איור 3). ניסויים נוספים יעשו בנושא כאשר ייבדק המעכב בריכוזים שונים ויבדקו התוצרים המתקבלים בריאקציה.

שנית, נבדק המעכב 8-Methoxypsoralen (8-mop), שהוא מעכב ספציפי של האיזומר בתת-משפחה של האנזים P450-2A6 (Tiong et al. 2014), אשר נמצא מעורב במסלול המטבוליטים של Lamotrigine ביונקים (Hao Chen, Scott Grover, Linning Yu 2010). בניסוי זה נמצא גם כן עיכוב משמעותי בפירוק ה-Lamotrigine כאשר המעכב נבדק בשני ריכוזים שונים (איור 3). גם כאן ישנו רמז למעורבותה של תת משפחת אנזימים זו. בהמשך ייבדק האם יש שוני בתוצרים המתקבלים תחת מעכב זה.

בנוסף, נבדק האם הכנסה של benzoic acid (A.B) לאינקובציה של *P. ostreatus* עם Lamotrigine,אשר דווחה כמבצעת אינדוקציה לאנזימי P450 (Ning et al. 2010), תגרום לפירוק מוגבר. בניסוי זה נמצא כי A.B שימשה כמעכב לריאקציה, דבר היכול לנבוע מהוספה של A.B בריכוז גבוה. אמשיך לבדוק האם ישנה השפעה של הA -.B על פירוק Lamotrigine כאשר תיבדק החומצה בריכוז זהה לריכוז ה-Lamotrigine, או לחילופין, תוסף לפטרייה לאחר שכבר נחשפה לLamotrigine.

כמו כן יבדקו מעכבים לריאקציה בה משתתפים אנזימים ממשפחת UGT כגון המעכב Sodium valproate, המשמש כתרופה הניתנת לחולים יחד עם ה-Lamotrigine וגורם בגוף האדם לעיכוב מסלול יצירת המטבוליט Lamotrigine-2NG, כך שהמערכת מובלת לכיוון יצירת המטבוליט arene- oxide במסלול ה-P450 (Anderson 2002).

איור 3. העלמות Lamotrigine על ידי *P. ostreatus* במצע גלוקוז פפטון מדולל ללא תמצית שמרים, כאשר Lamotrigine בריכוז התחלתי של 100 mg/L (כחול), העלמות Lamotrigine בנוכחות מעכב –ABT1 (כתום), בנוכחות מעכב 8-mop בריכוז mM 0.8 (אפור), בנוכחות מעכב 8-mop בריכוז mM 0.4 (צהוב).

שלב זה נמצא כרגע בביצוע. זמן ביצוע משוער של שני השלבים האחרונים הוא כ-8 חודשים.

**רשימת ספרות**

Anderson, G.D., 2002. Children versus adults: Pharmacokinetic and adverse-effect differences. *Epilepsia*, 43, pp.53–59.

Ferrer, I. & Thurman, E.M., 2010. Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(19), pp.8161–8168.

Golan-Rozen, N. et al., 2011. Transformation of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by pleurotus ostreatus: Role of cytochrome P450 monooxygenase and manganese peroxidase. *Environmental Science and Technology*, 45, pp.6800–6805.

Golan-Rozen, N. et al., 2015. Transformation Pathways of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by the White-Rot Fungus Pleurotus ostreatus: Effects of Growth Conditions. *Environmental Science and Technology*, 49(20), pp.12351–12362.

Goldstein, M., Shenker, M. & Chefetz, B., 2014. Insights into the uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environmental Science and Technology*, 48(10), pp.5593–5600.

Grossberger, A. et al., 2014. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 185, pp.168–177. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.038.

Gurke, R. et al., 2015. Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. *Science of the Total Environment*, 532, pp.762–770.

Hao Chen, Scott Grover, Linning Yu, G.W. and A.M., 2010. Bioactivation of Lamotrigine in Vivo in Rat and in Vitro in Human Liver Microsomes, Hepatocytes, and Epidermal Keratinocytes: Characterization of Thioether Conjugates by Liquid Chromatography. *Chemical Research in Toxicology*, 23(1), pp.159–170.

Harms, H., Schlosser, D. & Wick, L.Y., 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Publishing Group*, 9, pp.177–192.

Leonowicz, A. et al., 1999. REVIEW Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, pp.175–185.

Malchi, T. et al., 2014. Irrigation of root vegetables with treated wastewater: Evaluating uptake of pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environmental Science and Technology*, 48, pp.9325–9333.

Ning, D., Wang, H. & Zhuang, Y., 2010. Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by Phanerochaete chrysosporium. *Biodegradation*, 21, pp.297–308.

Paltiel, O. et al., 2016. Human Exposure to Wastewater-Derived Pharmaceuticals in Fresh Produce: A Randomized Controlled Trial Focusing on Carbamazepine. *Environmental Science and Technology*, 50(8), pp.4476–4482.

Paz, A. et al., 2016. Fate of carbamazepine, its metabolites, and Lamotrigine in soils irrigated with reclaimed wastewater: Sorption, leaching and plant uptake. *Chemosphere*, 160, pp.22–29. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.048.

Sun, Q. et al., 2011. 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug Metabolism and Disposition*, 39, pp.1674–1679.

Tiong, K.H. et al., 2014. Inhibitory potency of 8-methoxypsoralen on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) allelic variants CYP2A6\*15, CYP2A6\*16, CYP2A6\*21 and CYP2A6\*22: Differential susceptibility due to different sequence locations of the mutations. *PLoS ONE*, 9(1), p.e86230.

U. A. Argikar, and R.P.R., 2009. Variation in glucuronidation of Lamotrigine in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 39(5), pp.355–363.

Vajda, F.J.E., Dodd, S. & Horgan, D., 2013. Lamotrigine in epilepsy, pregnancy and psychiatry-a drug for all seasons? *Journal of Clinical Neuroscience*, 20(1), pp.13–16.

Writer, H. et al., 2013. In-Stream Attenuation of Neuro-Active Pharmaceuticals and Their Metabolites. *Environmental Science and Technology*, 47, pp.9781–9790.

כהן, א., פיימן, ד., קולר, נ., רשות הטבע והגנים. איסוף וטיפול בשפכים וניצול קולחים להשקיה חקלאית. סקר ארצי- 2012, דצמבר 2014,אגף איכות מים, רשות המים.

### [דוח סיכום פעילות ההשקיה בקולחים לשנת](https://www.google.co.il/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0ahUKEwjPqr_2jKvRAhWKeFAKHS1cDLUQFggmMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.health.gov.il%2FPublicationsFiles%2FBSV_Ratag-2014.pdf&usg=AFQjCNFhgu4_rgy8DNFfyDL8bzToirpx7g) 2014, יוני 2015 המחלקה לבריאות הסביבה, משרד הבריאות.