

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maša KOROŠEC

**VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH
ZDRAVIL NA CIANOBAKTERIJO *Synechococcus
leopoliensis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maša KOROŠEC

**VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA
CIANOBakterijo *Synechococcus leopoliensis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**THE EFFECT OF SELECTED ANTI-CANCER DRUGS MIXTURE
ON CYANOBACTERIA *Synechococcus leopoliensis***

M. SC. Thesis
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih Oddelka za gensko toksikologijo in biologijo raka.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorico dr. Tino Eleršek in za recenzentko prof. dr. Barbko Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentorica: dr. Tina Eleršek

Recenzentka: prof. dr. Barbka Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Eva RUŽIĆ SABLJIĆ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Tina ELERŠEK

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

Članica: prof. dr. Barbka JERŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravice shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja do javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maša Korošec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 615.9:615.277:582.232(043)=163.6
KG	cianobakterije/ <i>Synechococcus leopoliensis</i> /protirakava zdravila/5-fluorouracil/imatinib mezilat/etopozid/toksičnost/inhibicija rasti/ model neodvisnega delovanja/model seštevka koncentracij
AV	KOROŠEC, Maša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/ELERŠEK, Tina (somentorica)/JERŠEK, Barbka (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA CIANOBakterijo <i>Synechococcus leopoliensis</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	X, 65 str., 14 pregl., 12 sl., 150 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Protirakava zdravila se uporabljajo za zdravljenje raka in lahko prizadenejo tudi druge rastoče celice. Čeprav so njihove koncentracije v vodnih sistemih nizke, v območju ng/L- μ g/L, lahko izpostavljenost vsakega živega organizma predstavlja okoljsko tveganje, saj je njihov dotok stalen in brez specifične kontrole. Tveganja zaradi njihovega mehanizma delovanja ni enostavno predvideti, še posebej v primeru mešanic. Po navodilih smernice OECD TG 201 (2011) smo izvedli test inhibicije rasti primarnega producenta - cianobakterije <i>Synechococcus leopoliensis</i> . Testirali smo mešanico treh protirakavih zdravil 5-FU+IM+ET pri petih efektivnih koncentracijah (EC _x). Učinek mešanice je bil večji (EC ₂₀ , EC ₅₀) ali enak (EC ₅ , EC ₁₀ , EC ₉₀) učinku posameznega protirakavega zdravila in pri celotnem razponu EC _x večji od učinka binarne mešanice 5-FU+IM. Etopozid (ET) je kljub temu, da je za <i>S. leopoliensis</i> netoksičen (do 350 mg/L) očitno okreplil celokupno toksičnost mešanice. Toksičnost mešanice je pravilneje napovedal model seštevka koncentracij (CA) kot model neodvisnega delovanja (IA). Primerjava toksičnosti je razkrila, da je cianobakterija za mešanico manj občutljiva kot zelena mikroalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . V študiji stabilnosti protirakavih zdravil smo odkrili izobarično spojino ET, kar nakazuje na možnost biotskega razpada/transformacije tega protirakavega zdravila med testom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 615.9:615.277:582.232(043)=163.6
CX cyanobacteria/*Synechococcus leopoliensis*/anticancer drugs/5-fluorouracil/imatinib mesylate/etoposide/toxicity/growth inhibition/independent action/concentration addition
AU KOROŠEC, Maša
AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ELERŠEK, Tina (co-advisor)/JERŠEK, Barbka (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TI THE EFFECT OF SELECTED ANTI-CANCER DRUGS MIXTURE ON CYANOBACTERIA *Synechococcus leopoliensis*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO X, 65 p., 14 tab., 12 fig., 150 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Anticancer drugs are used to fight cancer and can also affect other growing cells. Although the concentrations of these drugs in aquatic systems are very low, in the range of ng/L- μ g/L, the exposure of each living organism may be of environmental risk as its introduction is continuous and without any specific control. Due to their mechanism of action the risk posed by these compounds is not easily predictable especially in a way of mixtures. According to OECD TG 201 (2011) guidelines we performed growth inhibition test with primary producer cyanobacteria *Synechococcus leopoliensis*. We tested the mixture of three anticancer drugs 5-FU+IM+ET at five EC_X. The mixture effect was greater (EC₂₀, EC₅₀) than or equal (EC₅, EC₁₀, EC₉₀) to the effect of individual drug exposure and greater than binary mixture 5-FU+IM over the entire range EC_X. Etoposide (ET), despite its no toxicity for *S. leopoliensis* (up to 351 mg/L), apparently enhanced the overall mixture toxicity. The mixture toxicity was more accurately predicted by concentration addition model (CA) than the independent action model (IA). Comparing mixture toxicity, *S. leopoliensis* is less sensitive than green microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Stability studies have revealed the presence of isobaric compound of ET, which indicates possible biotic degradation/transformation of this anticancer drug during the test.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KLASIFIKACIJA IN MEHANIZEM DELOVANJA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL	3
2.1.1 5-Fluorouracil	5
2.1.2 Etopozid.....	6
2.1.3 Imatinib mezilat.....	8
2.2 PORABA IN IZVOR PROTIRAKAVIH ZDRAVIL TER NJIHOVA USODA V OKOLJU	9
2.2.1 Sorpcija.....	12
2.2.2 Biološka razgradljivost in metabolizem izbranih protirakavih zdravil ...	13
2.2.3 Abiotska razgradnjna: direktna in indirektna fotoliza (fotooksidacija)	15
2.3 NAPOVED TOKSIČNOSTI MEŠANIC Z MODELOM SEŠTEVKA KONCENTRACIJ IN MODELOM NEODVISNEGA DELOVANJA	16
2.4 EKOTOKSIČNOST IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL TER NJIHOVIH MEŠANIC NA NETARČNE ORGANIZME	17
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI.....	20
3.1.1 Kemikalije	20
3.1.2 Testni organizem cianobakterija <i>Synechococcus leopoliensis</i>	21
3.1.3 OECD medij za rast cianobakterije <i>S. leopoliensis</i>	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Določanje volumna vcepka s števno komoro Bürker-Türk.....	22
3.2.2 Priprava testnih mešanic.....	23
3.2.3 Potek testa inhibicije rasti.....	24
3.2.4 Pretočna citometrija	25
3.2.5 Izračun specifične stopnje rasti in inhibicije rasti.....	27
3.2.6 Analiza podatkov in statistična ocena.....	28

3.2.7 Napoved toksičnosti mešanic z modelom seštevka koncentracij (CA) in modelom neodvisnega delovanja (IA).....	28
3.2.8 Kvantitativna analiza interakcij med protirakavimi zdravili v mešanici	29
3.2.9 Vrstična elektronska mikroskopija.....	30
3.2.10 Stabilnost protirakavih zdravil	31
3.2.10.1 Založne raztopine	31
3.2.10.2 Supernatanti testnih kultur.....	31
3.2.10.3 Izvedba analize	31
4 REZULTATI.....	32
4.1 RAST KONTROLNIH IN TESTNIH KULTUR	32
4.2 SPECIFIČNA STOPNJA RASTI IN INHIBICIJA RASTI	32
4.3 ANALIZA PODATKOV IN STATISTIČNA OCENA INHIBICIJE RASTI	36
4.4 PRIMERJAVA EKSPERIMENTALNE INHIBICIJE RASTI Z NAPOVEDNIMI MODELI	36
4.5 KVANTITATIVNA ANALIZA INTERAKCIJ PROTIRAKAVIH ZDRAVIL V MEŠANICI S KOMBINACIJSKIM INDEKSOM (CI).....	38
4.6 STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL.....	39
4.6.1 Založne raztopine protirakavih zdravil.....	39
4.6.2 Supernatanti mešanic protirakavih zdravil	40
4.7 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA POVRŠINO CELIC S. <i>leopoliensis</i>	41
5 RAZPRAVA.....	42
5.1 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA RAST CIANOBakterije <i>S. leopoliensis</i>	43
5.2 PRIMERJAVA NAPOVEDNIH MODELOV Z DEJANSKIMI INHIBICIJAMI RASTI	45
5.3 KVANTITATIVNA ANALIZA INTERAKCIJ V MEŠANICI PROTIRAKAVIH ZDRAVIL	46
5.4 STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL	46
5.5 POSNETKI POVRŠINE CELIC S. <i>leopoliensis</i> Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM.....	48
6 SKLEPI	49
7 POVZETEK	50
8 VIRI	51
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) po Anatomsko-terapevtski klasifikaciji (ATC) (JAZMP, 2015)	3
Preglednica 2: Mehanizem delovanja citotoksičnih in citostatičnih protirakavih zdravil (povzeto po Besse in sod., 2012).....	4
Preglednica 3: Poraba 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) ter njihove izmerjene okoljske koncentracije (MEC) in predvidene okoljske koncentracije (PEC)	11
Preglednica 4: Fizikalno-kemijske lastnosti izbranih protirakavih zdravil (povzeto po Booker in sod., 2014).	11
Preglednica 5: Biološka razgradnja 5-fluorouracila (5-FU) in imatinib mezilata (IM) z različnimi testi in podano inkubacijsko dobo ter začetno koncentracijo testne substance ..	14
Preglednica 6: Vrednosti EC ₅₀ za 5-fluoroucil (5-FU), etopozid (ET) in imatinib mezilat (IM) v različnih ekotoksikoloških testih z različnimi organizmi: cianobakterijo <i>Synechococcus leopoliensis</i> in <i>Anabaena flos-aquae</i> , zeleno algo <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> in <i>Desmodesmus subspicatus</i> , bakterijo <i>Pseudomonas putida</i> in <i>Vibrio fischeri</i> , ter vodno bolho <i>Ceriodaphnia dubia</i> in <i>Daphnia magna</i>	19
Preglednica 7: Uporabljeni protirakava zdravila in topila.....	20
Preglednica 8: Sestava gojišča OECD s podanimi končnimi koncentracijami posameznih sestavin	20
Preglednica 9: Posamezne in celokupne masne koncentracije protirakavih zdravil v trikomponentni mešanici 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) pri določeni efektivni koncentraciji (EC _X)	23
Preglednica 10: Odstotni delež masne koncentracije posameznega protirakavega zdravila od celokupne masne koncentracije vseh treh protirakavih zdravil v mešanici pri določeni EC _X	24
Preglednica 11: Izračunane specifične stopnje rasti in inhibicije rasti kontrolnih kultur in testnih mešanic (EC _X) cianobakterije <i>S. leopoliensis</i> za celotno trajanje testa (72 h), vse tri paralelke (a, b, c) in vseh pet veljavnih testov (A, B, C, D, E)	35
Preglednica 12: Eksperimentalno pridobljeni podatki za inhibicijo rasti pri posamezni efektivni koncentraciji (EC _X) skupaj z napovednim modelom CA (model seštevka koncentracij) in IA (model neodvisnega delovanja).....	38
Preglednica 13: Pričakovane in s kemijsko analizo izmerjene koncentracije protirakavih zdravil v posameznih založnih raztopinah z izračunanim odstopanjem.....	39
Preglednica 14: Pričakovane (izračunane) in izmerjene koncentracije posameznih protirakavih zdravil v mešanicah EC ₁₀ , EC ₂₀ , EC ₉₀ z izračunanim odstopanjem na začetku (dan 0) in tekom testa (dan 0-3).....	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Zaviranje delovanja timidilat sintaze (TS) s 5-fluorouracilom (5-FU) (prirejeno po Longley in sod., 2003).....	6
Slika 2: Model delovanja etopozida (ET) na človeško topoizomerazo II α (prirejeno po Bromberg in sod., 2003).....	7
Slika 3: Mehanizem delovanja imatinib mezilata (IM) (prirejeno po Goldman in Melo, 2001).....	9
Slika 4: Cianobakterija <i>Synechococcus leopoliensis</i> SAG 1402-1 (Eleršek, 2012).....	21
Slika 5: Števna komora Bürker-Türk	22
Slika 6: Sistem detektorjev pretočnega citometra: PMT – fotopomnoževalke fluorescentnih detektorjev različnih valovnih dolžin (prirejeno po Rahman, 2014).....	26
Slika 7: Točkovni histogram za cianobakterijo <i>S. leopoliensis</i> (levo) in spekter fluorescence (desno) uokvirjenih dogodkov.....	27
Slika 8: Rastne krivulje <i>S. leopoliensis</i> kontrolnih kultur in testnih mešanic EC _X za vse tri paralelke in vseh pet ponovitev testa (A, B, C, D, E) za celoten čas trajanja testa (72 h) ..	33
Slika 9: Povprečna koncentracija celic <i>S. leopoliensis</i> s podanim standardnim odklonom za dan 0, 1, 2, 3 pri posamezni efektivni koncentraciji (EC _X) za pet veljavnih ponovitev testa (A, B, C, D, E)	34
Slika 10: Inhibicija rasti cianobakterije <i>S. leopoliensis</i> za posamezna protirakava zdravila, 5-fluorouracil (5-FU), imatinib mezilat (IM) in etopozid (ET), ter njihovo trikomponentno (5-FU+IM+ET) in binarno (5-FU+IM) mešanico pri petih efektivnih koncentracijah (EC _X) za časovno obdobje 72 h. Podatki predstavljajo srednje vrednosti \mp 95 % interval zaupanja. Prikazana je tudi napoved z modelom seštevka koncentracij (CA, angl. Concentration Adition) in modelom neodvisnega delovanja (IA, angl. Independent Action). Statistično značilna razlika s kontrolo ($P < 0,05$) je označena s simbolom *	37
Slika 11: Ponazoritev primerjave eksperimentalne inhibicije rasti (z upoštevanim 95 % intervalom zaupanja) izbrane mešanice protirakavih zdravil z napovednim modelom IA (model neodvisnega delovanja, angl. Independent Action) in binarno mešanico (Brezovšek in sod., 2014)	38
Slika 12: Površina celic (mikrostruktura) cianobakterije <i>S. leopoliensis</i> posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) po 72 h inkubacije. A: kontrolna kultura; B: mešanica protirakavih zdravil EC ₁₀ . Merilo na dnu vsake slike predstavlja 1 μm	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

5-FU	5-fluorouracil
A	absorbanca
ATC	Anatomsko-terapevtska klasifikacija (angl. Anatomical Therapeutic Classification)
BCF	faktor biokoncentracije
CA	model seštevka koncentracij (angl. Concentration Addition)
CI	kombinacijski indeks
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC _X	efektivna koncentracija
ET	etopozid
FSC	fotodetektor postavljen v smeri svetlobnega vira (angl. Forward Scatter Chanell)
IA	model neodvisnega delovanja (angl. Independent Action)
IM	imatinib mezilat
K _{oc}	porazdelitveni koeficient na organski ogljik
K _{ow}	porazdelitveni koeficient <i>n</i> -oktanol/voda
KV	koeficient variacije
MEC	izmerjene okoljske koncentracije (angl. Measured Environmental Concentrations)
OH•	hidroksilni radikal
PEC	predvidene okoljske koncentracije (angl. Predicted Environmental Concentrations)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
SSC	fotodetektor postavljen pravokotno na vir svetlobe (angl. Side Scatter Chanell)
UV	ultravijolična svetloba

SLOVARČEK

akineta	posebna cianobakterijska celica z odebeleno celično steno in zrnato citoplazmo (visoka vsebnost glikogena in cianoficina), ki nastane s podaljšanjem vegetativne celice
apoptoza	visoko molekularno reguliran in kontroliran proces, ki preko morfoloških sprememb (krčenje celice, pojav izrastkov, razgradnja jedra in mitohondrijev, fragmentacija DNA) vodi v smrt celice in ima veliko vlogo pri odstranjevanju poškodovanih celic
biološka razgradnja	razgradnja organske snovi v manj kompleksno snov, CO_2 in H_2O z mikroorganizmi, ki energijo porabijo za izgradnjo biomase
biološka transformacija	metabolna modifikacija strukture molekule, pri čemer se spremeni lastnost izhodne snovi
citotoksičen	dejavnik, ki povzroči nekrozo (zaustavitev metabolizma, izguba membranske integritete in hitra celična liza) ali programirano celično smrt (apoptozo)
genotoksičen	kemikalija, ki povzroči poškodbe DNA
karcinogen	vsaka snov, ki izzove nastanek raka
kromosomska aberacija	nenormalne oblike kromosomov, zaradi izgube dela kromosoma (delecije), podvojitve (duplicacije), translokacij, inverzij in drugih sprememb
mutagen	fizikalni ali kemijski dejavnik, ki poveča frekvenco mutacij
teratogen	snov, ki zmoti razvoj zarodka in povzroči okvare ploda

1 UVOD

Farmacevtike so v vodnem okolju prvič odkrili v 70-ih letih 20. stoletja (Hignite in Aznaroff, 1977). Zasnovani so z namenom doseganja specifičnih bioloških vplivov na ciljnih tkivih in organih. Za mnoge so dokazali ali pa obstaja vsaj sum o njihovih škodljivih učinkih na vodne organizme in zdravje ljudi celo pri nizkih okoljskih koncentracijah (Fent in sod., 2006; Khetan in Collins, 2007; Johnson in sod., 2008). V humani in veterinarski medicini se uporablja številne farmacevtike, zato se le-ti v okolju nahajajo v večkomponentnih mešanicah (Kolpin in sod., 2002; Moldovan, 2006; Gomez in sod., 2007; Kasprzyk-Hordern in sod., 2008; Loos in sod., 2009; Vulliet in Cren-Olive, 2011). Kortenkamp in sod. (2009) so poročali, da je ekotoksičnost takih kemijskih mešanic ponavadi večja od toksičnosti posamezne učinkovine. Prisotnost farmacevtikov so dokazali v iztokih čistilnih naprav, površinskih in pitnih vodah, vendar je o njihovi usodi in učinkih malo znanega (Kümmerer in sod., 2000). V preteklosti so preučevali predvsem antibiotike in hormone, medtem ko so druge potencialno bolj toksične snovi, kot so protirakava zdravila, ostala manj raziskana (Zounkova in sod., 2007). Te molekule bi v preteklosti zagotovo zaslužile več pozornosti, vendar zaradi pomanjkanja analitskih metod (tudi multirezidualnih), s katerimi bi lahko zaznali njihove nizke koncentracije (ng/L), to ni bilo mogoče (Kosjek in Heath, 2011).

Poraba protirakavih zdravil je v primerjavi z ostalimi razredi farmacevtikov manjša, vendar narašča, s tem posledično narašča tudi verjetnost njihovega pojavljanja v okolju (Yin in sod., 2010; Besse in sod., 2012). Spadajo med najbolj nevarna onesnažila vodnega cikla (Seira in sod., 2013), o čemer pričajo njihovi škodljivi učinki na netarčnih organizmih - citotoksični, genotoksični, mutagni, karcinogni in teratogeni (Kümmerer in sod., 2000). Vodni organizmi so še posebej izpostavljeni, saj so zaradi stalnega vnosa farmacevtikov v vodno okolje le-tem izpostavljeni daljše obdobje ali celoten življenjski cikel. Podatkov o posledicah kronične izpostavljenosti primanjkuje. Podatki o akutni toksičnosti pa niso primerni za natančno naslavljanje vplivov dolgoročne izpostavljenosti in posledično ocene nevarnosti in tveganja. V ta namen se izvajajo testi kronične izpostavljenosti, kjer je mogoče oceniti toksične učinke na več generacijah (Fent in sod., 2006). Organizmi so v okolju hkrati izpostavljeni več različnim kemijskim onesnažilom. Ocenjevanje tveganja na podlagi ekotoksikoloških podatkov ene same snovi zato ne odseva resničnega stanja v

naravi, kar lahko privede do napačne predpostavke o odsotnosti tveganja (Silva in sod., 2002; Sumpter in sod., 2006; Pomati in sod., 2008; Magnusson in sod., 2010; Hagenbuch in Pinckney, 2012). Poleg tega se protirakava zdravila zaradi doseganja boljših terapevtskih učinkov pogosto uporabljajo v kombinacijah, kot npr. kombinirane kemoterapevtske sheme (Ocvirk, 2009). V magistrski nalogi smo zato preučevali vpliv mešanice treh izbranih protirakavih zdravil na ubikvitarnega predstavnika fitoplanktonskih organizmov, ki predstavlja temelj celotne vodne prehranjevale verige.

1.1 NAMEN DELA

Namen naše naloge je bil pridobiti eksperimentalne podatke o toksičnosti mešanice treh izbranih protirakavih zdravil, 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM). Vpliv mešanice smo testirali na fitoplanktonski cianobakteriji *Synechococcus leopoliensis* in eksperimentalne podatke primerjali z osnovnimi napovednimi izračuni.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- fitoplanktonska cianobakterija *S. leopoliensis* je na protirakava zdravila manj občutljiva kot evkariontske fitoplanktonske vrste (alge)
- izbrana mešanica protirakavih zdravil v primerjavi s posameznim zdravilom bolj zavira rast cianobakterije *S. leopoliensis* (aditiven ali sinergistični učinek)

2 PREGLED OBJAV

2.1 KLASIFIKACIJA IN MEHANIZEM DELOVANJA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

Protirakava zdravila se uporabljajo za sistemsko zdravljenje raka - bolezni, za katero je značilna nenadzorovana celična delitev in širitev nenormalnih celičnih oblik po telesu. Kemoterapija je poleg kirurškega odstranjevanja in obsevanja ena izmed treh najbolj pogostih pristopov zdravljenja raka (Kovalova, 2009). Anatomsko-terapevtska klasifikacija (ATC angl. Anatomical Therapeutic Classification) protirakava zdravila glede na terapevtske in kemijske lastnosti razvršča v razred L – Zdravila z delovanjem na novotvorbe in imunomodulatorje. Protirakava zdravila 5-FU, IM in ET se nahajajo v podrazredu L01 (Zdravila z delovanjem na novotvorbe), ki se nadalje razdeli v pet skupin: L01A alkilanti; L01B antimetaboliti; L01C rastlinski alkaloidi in druge naravne učinkovine; L01D citotoksični antibiotiki in sorodne učinkovine ter L01X druga zdravila z delovanjem na novotvorbe (JAZMP, 2015). V Preglednici 1 je podana klasifikacija protirakavih zdravil uporabljenih v naši študiji.

Preglednica 1: Klasifikacija 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) po Anatomsko-terapevtski klasifikaciji (ATC) (JAZMP, 2015)

	5-FU	ET	IM
Skupina	L01B Antimetaboliti	L01C Rastlinski alkaloidi in druge naravne učinkovine	L01X Druga zdravila z delovanjem na novotvorbe
Podskupina	L01BC Analogi pirimidinskih baz	L01CB Derivati podofilotoksina	L01XE Zaviralci protein kinaz

Protirakava zdravila in njihovi metaboliti so kemijsko zelo reaktivni in imajo širok spekter delovanja (citotoksičen, citostatičen in deluječ na hormone). Citotoksiki in citostatiki se v mehanizmu delovanja močno razlikujejo. Citotoksiki vplivajo na deoksiribonukleinsko kislino (DNA), kar povzroča presnovne in morfološke spremembe, ki preko različnih mehanizmov (Preglednica 2) vodijo v smrt celice. Citostatiki za razliko od citotoksikov ne vplivajo na DNA. Proliferacijo tumorskih celic zmanjšajo neposredno z blokiranjem rastnih faktorjev ali posredno s prerazporeditvijo imunskih celic (makrofagov in monocitov), kar vodi v smrt tumorskih celic (Besse in sod., 2012).

Preglednica 2: Mehanizem delovanja citotoksičnih in citostatičnih protirakavih zdravil (povzeto po Besse in sod., 2012)

Citotoksiki	Mehanizem
Antimetaboliti (5-FU)	Blokirajo encime in motijo sinteze DNA
Zaviralci topoizomeraze (ET)	Blokirajo religacijo prekinjene DNA
Zaviralci mitoze	Zavirajo nastanek delitvenega vretena in razhajanje kromosomov
Citotoksični antibiotiki	Motijo sintezo in funkcijo DNA
Interkalanti	Lomijo enoverižno DNA
Alkilanti	Zavirajo prepisovanje DNA
Platinove spojine	Zavirajo podvojevanje DNA
Citostatiki	Mehanizem
Inhibitorji protein kinaz (IM)	Zavirajo delovanja protein kinaz, ki uravnavajo številne biološke procese (rast, migracija, preživetje celic,...)
Monoklonska protitelesa	Blokirajo zunajcelične receptorje

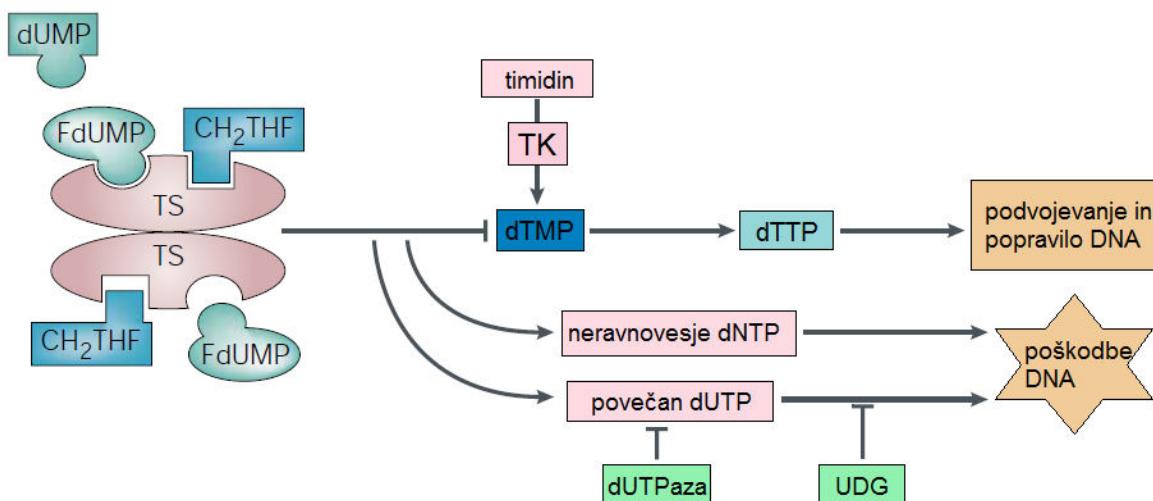
Protirakava zdravila niso specifična le za rakave celice, kar je povezano s številnimi stranskimi učinki in povečanim tveganjem za zdravje (Kiffmeyer in sod., 1998). Zaradi njihovega mehanizma delovanja, imajo protirakava zdravila lahko škodljive učinke na vodne organizme in zdravje človeka (Kümmerer in sod., 2000; Johnson in sod., 2008; Besse in sod., 2012). Mednarodna Agencija za raziskovanje raka (IARC angl. International Agency for Research on Cancer) snovi glede na karcinogeni potencial za ljudi deli v štiri skupine: skupina 1 (karcinogeni); skupina 2A (verjetno karcinogeni); skupina 2B (mogoče karcinogeni); skupina 3 (nerazvrščene snovi - ni dovolj dokazov o njihovi (ne-) karcinogenosti); in skupina 4 (verjetno nekarcinogeni). ET je uvrščen v skupino 1 in 5-FU v skupino 3 (IARC, 2015). IM poleg še najmanj dvajsetih protirakavih zdravil ni razvrščen v nobeno skupino, kar povečuje zdravstveno tveganje za ljudi, ki vsakodnevno rokujejo z njimi (Kopjar in sod., 2010). Delovna mesta take vrste so po zadnji smernici, kljub izboljšani varnostni politiki, še vedno naslovljena kot škodljiva (NIOSH, 2004). Številne publikacije namreč dokazujejo prisotnost ostankov protirakavih zdravil na delovnih površinah po že končanih postopkih čiščenja (Schmaus in sod., 2002; Touzin in sod., 2009; Sottani in sod., 2010). Posledično ne preseneča, da imajo poklicno izpostavljeni delavci povišan raven strukturnih kromosomskih aberacij in s tem povečano tveganje za razvoj raka (Smerhovsky in sod., 2001; Bouraoui in sod., 2011).

2.1.1 5-Fluorouracil

5-FU je strukturni analog uracila in spada v skupino antimetabolitov, ki so bili razviti v 50-ih letih prejšnjega stoletja na podlagi spoznanja, da celice hepatocelularnega karcinoma uracil porabljajo hitreje kot celice normalnih tkiv (Rutman in sod., 1954). Uporablja se peroralno ali parenteralno zlasti za zdravljenje raka debelega črevesa in trebušne slinavke, učinkovit pa je tudi pri raku dojke, jeter in nekaterih tumorjev v področju glave (Obreza, 2009). Klinično uporabnost omejujejo številni stranski učinki: gastrointestinalna toksičnost, motnje v delovanju kostnega mozga in hematološke težave (He in sod., 2003). Poleg tega ima zdravljenje še druge pomanjkljivosti: kratek biološki razpolovni čas (10-20 min v krvni plazmi) ter visoko (80 %) stopnjo presnove v jetrih z encimom dihidropirimidin dehidrogenaza. Za vzdrževanje terapevtskih serumskih koncentracij je zato potrebno zdravljenje z visokimi in neprestanimi odmerki (Arias in sod., 2008).

V celici osrednji mehanizem aktivacije 5-FU predstavlja nastanek fluorouridin monofosfata (FUMP), ki se v več encimsko kataliziranih stopnjah pretvori v tri aktivne metabolite: fluorouridin trifosfat (FUTP), fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) in fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) (Longley in sod., 2003). Čeprav se aktivni metaboliti v znatnih količinah vgrajujejo v DNA (FdUTP) in ribonukleinsko kislino (FUMP), ter tako povzročijo njuno poškodbo, glavni antitumorski učinek 5-FU predstavlja zaviranje delovanja encima timidilat sintaze (TS) (Slika 1) (Noordhuis in sod., 2004). TS zagotavlja edini znotrajcelični *de novo* vir deoksitimidin trifosfata (dTTP), ki se uporablja izključno za biosintezo in popravilo DNA. FdUMP s TS tvori časovno odvisen nastanek stabilnega trojnega kovalentnega kompleksa, nato se reakcija ustavi, saj fluorov atom ne disocira iz pirimidinovega obroča (močno elektronegativen), kar se odraža v počasni reverzibilni inaktivaciji encima (Santi in sod., 1987). Ena izmed predlaganih teorij, ki naj bi v takih okoliščinah prispevale k izgubi viabilnosti je, da DNA polimeraza, zaradi nezmožnosti razlikovanja, namesto dTTP v DNA vstavi deoksiuridin trifosfat (dUTP). Ta se izreže s pomočjo uracil-DNA glikozilaze, ki s tem za seboj pušča apirimidinsko mesto. Ob nadalnjem pomanjkanju dTTP in ponavljajočih se ciklih izrezovanja ter vstavljanja to vodi v usodni prelom vijačnice DNA (Aherne in Brown, 1999). Pomanjkanje dTTP preko povratnih mehanizmov povzroča motnje v ravneh še drugih deoksinukleotid trifosfatov (dNTP) in posledično poškodbe DNA (Curtin in sod., 1991; Canman in sod., 1994). To

sproži s tumor supresorskim proteinom p53 posredovano popravilo DNA, zaustavitev faze G1 celičnega cikla in apoptozo (O'Connor, 1987; Zambetti in Levine, 1993).



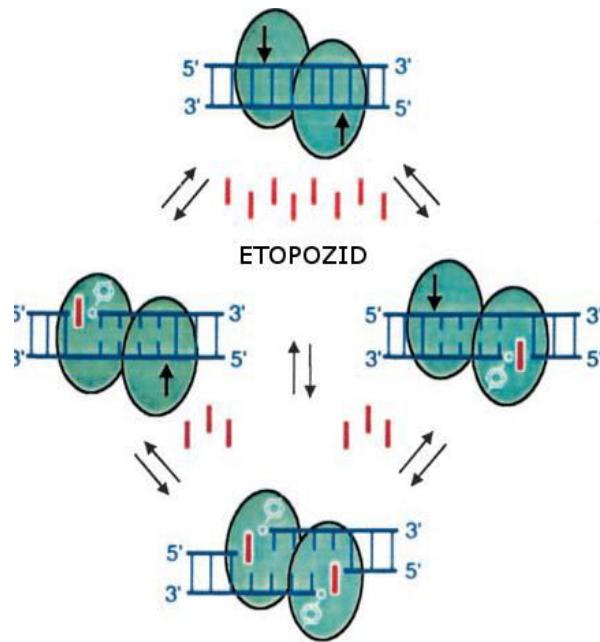
Slika 1: Zaviranje delovanja timidilat sintaze (TS) s 5-fluorouracilom (5-FU). TS katalizira s 5,10-metilentetrahidrofolatom (CH₂THF) posredovano reduktivno metilacijo deoksiuridin monofosfata (dUMP) do deoksitimidin monofosfata (dTMP). Fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) z vezavo na TS tvori stabilen trojni kompleks in tako onemogoči vezavo dUMP in s tem zavira sintezo dTMP. Posledica tega je neravnovesje v ravneh deoksinukleotidov (dNTP) in kopiranje zaloga deoksiuridin trifosfata (dUTP), kar povzroča poškodbe DNA. Raven poškodb je odvisen od količine pirofosfataze (dUTPase) in uracil-DNA glikozilaze (UDG). dTMP se lahko obnovi iz timidina s pomočjo timidin kinaze (TK), kar ublaži posledice nedelovanja TS - eden izmed možnih mehanizmov odpornosti proti 5-FU (prirejeno po Longley in sod., 2003)

2.1.2 Etopozid

ET (VP-16) je polsintezni derivat podofilotoksina, ki ga proizvaja severnoameriška rastlina *Podophyllum peltatum*. Prvič je bil sintetiziran leta 1966. Zvezna agencija za hrano in zdravila (FDA angl. Food and Drug Administration) je njegovo uporabo odobrila leta 1983. Uživa se ga intravenozno in oralno. Vodi je slabo topen. Glavni mehanizem protitumornega delovanja je inhibicija DNA topoizomeraze II (topo II). V manjši meri zavira tudi mitozo z delovanjem na citoskelet. Delovanje je najbolj izraženo v S in na začetku G₂ celičnega cikla. Uporablja se za zdravljenje drobnoceličnega karcinoma pljuč in raka na testisih v kombinaciji z drugimi učinkovinami. Učinkovitost se kaže tudi pri nekaterih limfomih. Za ET je značilno teratogeno delovanje, zato je uporaba v nosečnosti odsvetovana (Obreza, 2009).

Topo II je esencialni jedrni encim vseh evkariotskih organizmov, ki v DNA uvaja dvojne prelome in s pomočjo konformacijske spremembe pod vplivom ATP potegne intaktni

dvojni heliks skozi razpoko ter tako kontrolira topologijo DNA (Champoux, 2001). Vsak protomer encima ima v aktivnem mestu tirozinski ostanek, ki cepi eno verigo DNA vijačnice. Pri tem nastanejo enoverižni štrleči fosforilirani 5' konci, na katere je encim kovalentno vezan, s čimer se ohranja integriteta DNA (Sander in Hsieh, 1983). ET stabilizira topo II-DNA cepitveni kompleks in prepreči ligacijo cepljenih mest (Slika 2) (molekularni mehanizem je nepoznan). Topo II tako postane fiziološki toksin, ki povzroči kopičenje prelomov genoma. Smrt celice tako ne povzroči z blokiranjem katalitične aktivnosti encima, ampak s povečanjem koncentracije cepitvenega kompleksa (Burden in Osheroff, 1998). Toksičnost ET se še poveča, ko aktivnost polimeraze in helikaze zmoti cepitveni kompleks. Cepljeni deli niso več povezani z encimom, zato postanejo trajni in izpostavljeni rekombinacij in mutagenezi (Burden in Osheroff, 1998). Ko število prelomov preveč obremenjuje celico, pride do aktivacije apoptočnih signalnih poti, ki vodijo v celično smrt (Solary in sod., 1994). Pomembni mediatorji tega so kontrolni proteini celičnega cikla (p53, c-Myc, BAFF) (Tao in sod., 2003) in aktivnost kaspaz (poškodba mitohondrijev, jedrni kolaps) (Robertson in sod., 2002). Najresnejši zaplet uporabe ET je razvoj akutne mieloične levkemije (Pui, 1991).



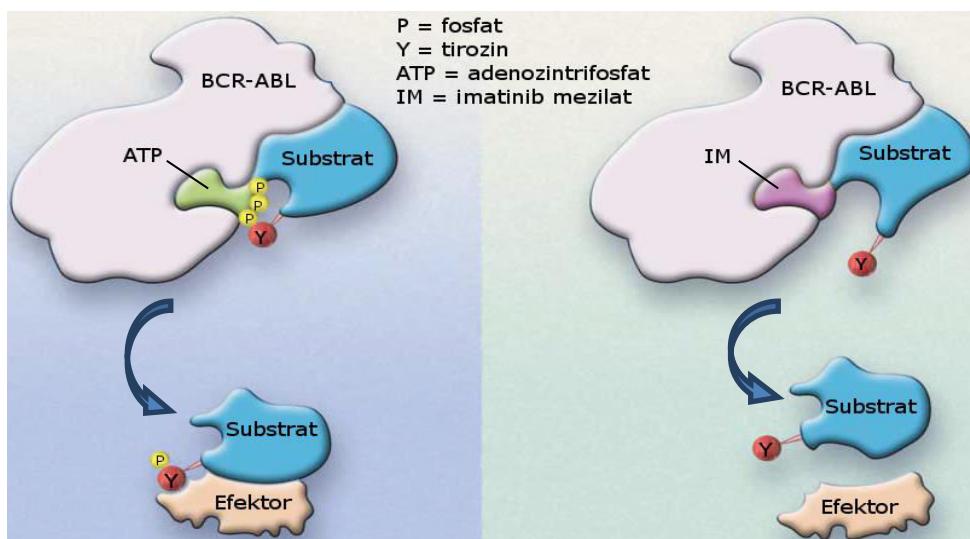
Slika 2: Model delovanja etopozida (ET) na človeško topoizomerazo IIα. Za nastanek dvojnih prelomov je potrebna vezava ET (rdeča črta) na obeh mestih cepitvenega kompleksa (spodaj). Vezava na eno ali drugo mesto cepitvenega kompleksa (črna puščica) je med seboj neodvisna in stabilizira le prekinitev ene verige (levo, desno). To nakazuje na malo ali nič molekularne komunikacije med obema aktivnima mestoma topo II (zeleni krogi) (prirejeno po Bromberg in sod., 2003)

2.1.3 Imatinib mezilat

IM (STI-571) danes velja za paradigma tarčnega zdravljenja rakovih obolenj. Uživa se ga oralno in je racionalno zasnovan, da selektivno zavira določene tirozin kinaze (receptorske in nereceptorske), ki so vpletene pri onkogenezi. Ti encimi kontrolirajo aktivacijo signalnih poti, ki uravnavajo ključne celične procese, kot so rast, diferenciacija in apoptoza, ter so pri številnih rakih prekomerno izražene (Savage in Antman, 2002).

Prvi dokaz o specifični genetski spremembi, ki pogojuje razvoju raka, sta leta 1960 podala Peter Nowell in David Hungerford, ko sta pri pacientih s kronično mieloično levkemijo (KML) odkrila značilen kariotip - prisotnost skrajšanega kromosoma 22, ki sta ga poimenovala kromosom Philadelphia (Ph) (Nowell in Hungerford, 1960). Ta nastane zaradi recipročne kromosomske translokacije med dolgima krakoma kromosoma 9 in 22, t(9;22)(q34;q11) (Rowley, 1973). Nastali onkogen BCR-ABL nosi zapis za 210 kDa velik protein (> 90 % Ph+ pacientov s KML in 30-35 % pacientov z akutno limfoblastno levkemijo) s konstitutivno in spremenjeno ABL tirozin kinazno aktivnostjo, ki je vzrok razvoja KML (Deininger in sod., 2000; Kantarjian in sod., 2006). Fuzijski protein BCR-ABL povzroči aktivacijo več (»downstream«) signalnih poti, kar vodi v transformacijo hematopoetskih stem celic – spremenjena celična adhezija, aktivacija mitogenih signalov in inhibicija apoptoze (Sawyers, 1997).

IM je 2-fenilaminopirimidin ATP kompetitivni inhibitor, ki z vezavo v kinazni žep neaktivne konformacije ABL prepreči vezavo ATP in prehod v konformacijsko aktivno obliko encima (Slika 3) (Savage in Antman, 2002). Proliferacijo tumorskih celic preprečuje brez sprožitve apoptoze, rast zdravih celic pa ovira minimalno (Holtz in sod., 2002). Njegovo delovanje ni popolnoma selektivno, saj zavira tudi avtofosforilacijo in tok signalnih dogodkov receptorskih tirozinskih kinaz tipa III: c-Kit, PDGFR- α in PDGFR- β (Buchdunger in sod., 2000). IM se zato uporablja tudi za zdravljenje gastrointestinalni stromalnih tumorjev, za katere je značilen aktiviran in pogosto mutiran protoonkogen c-kit (receptor za rastni faktor matičnih celic) (Rubin in sod., 2001), ter gliomov, mieloproliferativnih motenj, melanomov, karcinomov in sarkomov, ki so posledica prekomerno izraženega PDGFR (receptor za rastni faktor trombocitov) (Savage in Antman, 2002).



Slika 3: Mehanizem delovanja imatinib mezilata (IM). Onkoprotein BCR-ABL (levo) z vezano molekuljo adenozintrifosfata (ATP) v kinaznem žepu. IM z vezavo v kinazni žep (desno) prepreči vezavo ATP in nadaljno fosforilacijo tirozinskega ostanka substrata in efektorske molekule (prirejeno po Goldman in Melo, 2001)

Uporabo IM je FDA odobrila 10. maja 2001 - manj kot tri leta po začetku kliničnih preizkušanj. Opisani neželeni učinki so bili namreč blagi (blaga slabost, bruhanje, edem in mišični krči), resnejših zapleti (zastrupitev jeter) pa redki (Capdeville, 2002).

2.2 PORABA IN IZVOR PROTIRAKAVIH ZDRAVIL TER NJIHOVA USODA V OKOLJU

V razvitih državah sveta se v kemoterapiji uporablja več kot 50 različnih protirakavih zdravil (Johnson in sod., 2008). Njihova poraba je v primerjavi z drugimi razredi farmacevtikov nizka (Kovalova, 2009), vendar narašča. V Sloveniji se je incidenčna stopnja raka od leta 1950 pri moških zvečala za 589 % in pri ženskah za 346 % (Rak v Sloveniji 2011, 2015). Potrebno je upoštevati, da se protirakava zdravila uporabljajo ne samo pri kemoterapiji, temveč tudi pri zdravljenju drugih bolezni (npr. revmatizem). Opažen je tudi trend njihove povečane uporabe pri zdravljenju hišnih živali, kot so mačke in psi (Toolaram in sod., 2014). Poraba IM je v Franciji od leta 2004 do 2008 narastla za 50 % (Besse in sod., 2012), v Nemčiji pa za 478 % od leta 2002 do 2009 (Bergmann in sod., 2011). Nasprotno je upadla poraba rastlinskih alkaloidov, kamor spada ET, vendar je vzorec porabe odvisen od lokalnih kemoterapevtskih protokolov (Besse in sod., 2012). Kljub visoki porabi, usoda in prisotnost IM v okolju ostaja neznanka (Negreira in sod., 2013). Nedavno so Lin in sod. (2014) prvič (po našem znanju) potrdili prisotnosti 5-FU v

površinskih vodah (rečna voda v Tajvanu; 5-160 ng/L). Najvišje koncentracije protirakavih zdravil, več µg/L, se nahajajo v bolnišničnih odpadnih vodah: 5-FU (124 µg/L) (Mahnik in sod., 2007), karboplatin (100 µg/L) (Lenz in sod., 2007) in ifosfamid (86 µg/L) (Gomez-Canela in sod., 2014). V komunalnih odpadnih vodah se koncentracije gibljejo med ng/L in µg/L. V Preglednici 3 so podane izmerjene (MEC angl. Measured Environmental Concentrations) in predvidene okoljske koncentracije (PEC angl. Predicted Environmental Concentrations) za 5-FU, ET in IM.

Ferrando-Climent in sod. (2013) so pokazali, da je doprinos protirakavih zdravil med bolnišničnimi in odpadnimi vodami iz gospodinjstev enakovreden, kar lahko pripisemo velikemu deležu zunajbolnišničnih pacientov, ~ 80 % (Mahnik in sod., 2007). Konvencionalni postopki čiščenja odpadnih voda protirakavih zdravil ne odstranijo popolnoma, predstavljajo pa tudi izziv za nekonvencionalne tehnologije dekontaminacije (Zhang in sod., 2013). Verjetnost njihovega pojavljanja v odpadnih in površinskih vodah ter pitni vodi je zato velika (Kümmerer in sod., 1997; Johnson in sod., 2008; Liu in sod., 2010; Booker in sod., 2014). Zaskrbljenost povečuje dejstvo, da je proizvodnja farmacevtikov zaradi nižjih stroškov v 50 % preseljena v države v razvoju, kot sta Kitajska in Indija (Larsson, 2008). Infrastruktura za čiščenje odpadnih voda v teh predelih ni zadovoljiva, zato je tveganje za onesnaženje s farmacevtiki veliko (Zhang in sod., 2013). V okolju so protirakava zdravila in njihovi metaboliti podvrženi fizikalni, kemijski in biološki transformaciji: redčenju, hidrolizi, fotolizi, adsorpciji na suspendirane trdne delce in sedimente, biološki razgradnji, akumulaciji, itd... Ti procesi privedejo do nastanka transformacijskih produktov, ki imajo drugačne lastnosti od izhodnih kemikalij (Zhang in sod., 2013), njihova toksičnost pa še ni proučena.

Booker in sod. (2014) so sestavili prednostno listo 15 protirakavih zdravil, ki bi jih bilo glede na porabo, delež nepresnovljenega zdravila, PEC, sposobnost biološke razgradnje in fizikalno-kemijskih lastnosti v okolju dobro spremljati. Na tej prednostni listi se nahajajo tudi protirakava zdravila 5-FU, ET in IM. Njihova usoda v okolju je delno odvisna tudi od fizikalno-kemijskih lastnosti, ki so podane v Preglednici 4. Topnost protirakavih zdravil sega od zelo dobro topnih ($\sim 10^3$ - 10^4 mg/L) do netopnih. Verjetnost, da bi iz vode izhlapela je majhna, saj imajo nizek izparilni tlak (Booker in sod., 2014).

Preglednica 3: Poraba 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) ter njihove izmerjene okoljske koncentracije (MEC) in predvidene okoljske koncentracije (PEC)

	Poraba*	Vzorec	MEC	PEC**	Reference
5-FU	1733,20 [kg/leto] 3. mesto	Bolnišnične odpadne vode	5-27 ng/L	-	Kovalova in sod., 2009
		Bolnišnične odpadne vode (onkološki oddelek)	8,6-124 µg/L	-	Mahnik in sod., 2007
		Bolnišnične odpadne vode (onkološki oddelek)	20,0-122,0 µg/L	-	Mahnik in sod., 2004
		Bolnišnične odpadne vode (onkološki oddelek)	35-92 ng/L	-	Kosjek in sod., 2013
		Bolnišnične odpadne vode	46-1500 ng/L	-	Lin in sod., 2014
		Bolnišnične odpadne vode	-	2,03 µg/L	Hartmann in sod., 1998
		Komunalne odpadne vode	-	< 23 ng/L	Tauxe-Wuersch in sod., 2006
		Komunalne odpadne vode (vtok)	4,7-14 ng/L	-	Kosjek in sod., 2013
		Odpadne vode (vtok)	-	44,8 ng/L	Straub, 2010
		Površinske vode	-	2,65 ng/L	Straub, 2010
		Površinske vode	-	7,91 ng/L	Besse in sod., 2012
		Površinske vode	5-160 ng/L	-	Lin in sod., 2014
ET	41,11 [kg/leto] 29. mesto	Bolnišnične odpadne vode	6-380 ng/L	-	Yin in sod., 2010
		Bolnišnične odpadne vode	714 ng/L	-	Ferrando-Climent in sod., 2014
		Odpadne vode (vtok)	15 ng/L	-	Martin in sod., 2011
		Odpadne vode (iztok)	3,4 ng/L	-	Martin in sod., 2011
IM	873,90 [kg/leto] 4. mesto	Površinske vode	-	0,87 ng/L	Besse in sod., 2012
				4,99 ng/L	Besse in sod., 2012

* podatki za Francijo za leto 2008 (Besse in sod., 2012)

** upoštevana stopnja izločanja in/ali odstranjevanje v čistilnih napravah (biološka razgradnja)

Preglednica 4: Fizikalno-kemijske lastnosti izbranih protirakavih zdravil (povzeto po Booker in sod., 2014)

ATC	Ime	pKa	Naboj pri pH 7,4	log K _{ow}	log D _{ow} pri pH 7,4	K _{oc}	BCF	Topnost v vodi [mg/L] pri 25 °C
L01BC02	5-FU	7,6-8,0, 13,0	Nevtralen	-0,93		4	3	1,11E+04
L01CB01	ET	9,8	Nevtralen	0,60		19	3	5,87E+01
L01XE01	IM	8,07, 3,73, 2,56, 1,52	Pozitiven		0,19	16	3	6,48E+01

ATC = Anatomsko-terapevtska klasifikacija, 5-FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET = etopozid, K_{ow} = porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda, K_{oc} = porazdelitveni koeficient na organski ogljik, BCF = faktor biokoncentracije

2.2.1 Sorpcija

Sorpcija je poleg bioloških transformacij najpomembnejši faktor, ki vpliva na usodo farmacevtikov v vodnem okolju (Kosjek in Heath, 2011). Opišemo jo lahko z dvema koeficientoma: K_{oc} (porazdelitveni koeficient na organski ogljik) in K_{ow} (porazdelitveni koeficient *n*-oktanol/voda). Slednji je izpeljan iz D_{ow} , ki določa sposobnost porazdelitve organskih molekul med lipide in maščobe ter sorpcijo v tla, sedimente in mulj, in upošteva koncentracijo neionizirane snovi. Za snovi, ki ne disocirajo pri okoljskih pH je $\log D_{ow}$ približno enak $\log K_{ow}$ (Kosjek in Heath, 2011). Za snovi z vrednostjo $\log D_{ow} < 1$ se ne pričakuje, da bi se biokoncentrirale ali vezale na organske delce, obratno, velja za snovi z $\log D_{ow} \geq 3$. Potemtakem sta 5-FU in ET visoko polarni molekuli z $\log K_{ow} < 1$, kar pomeni, da bosta prisotni v vodni fazi in se na suspendirane delce ne bosta vezali. Bosta pa dobro mobilni v tleh in sedimentu, saj imata nizko vrednost K_{oc} . Straub (2010) navaja, da so delež radioaktivno označenega [C^{14}]5-FU v sedimentu lahko izmerili šele po 5 dneh (9 %) in je nato začel strmo padati brez znakov akumulacije. Slabo se je vezal tudi na aktivno blato (AB) - po 24 h so zaznali le 2-5 % [C^{14}] 5-FU (Mahnik in sod., 2007).

Sorpcija je odvisna tudi od elektrostatskega privlaka. Protirakava zdravila, ki imajo pri okoljskih pH (5-9) pozitivno nabite funkcionalne skupine (IM) in vrednost $\log D_{ow} > 1$, z negativno nabito površino mikroorganizmov tvorijo močnejše elektrostatske sile, kot nenabite molekule. Booker in sod. (2014) so ocenili, da se na aktivno blato veže 6 % IM, kar glede na veliko porast njegove porabe v zadnjih letih, predstavlja potencialno nevarnost za kontaminacijo tal (z odlaganjem AB) in vodnih teles. Poenostavljeni empiričnimi modeli (npr. EPI-Suite) za ocenjevanje sorpcije elektrostatskega privlaka ne upoštevajo, zato je sposobnost sorpcije lahko podcenjena (Stevens-Garmon, 2011).

Protirakava zdravila se lahko tudi biokoncentrirajo v vodnih organizmih, kar opisuje faktor biokoncentracije (BCF). Definiran je kot razmerje med koncentracijo snovi v organizmu in koncentracijo snovi v vodi. BCF 5-FU, IM in ET je nizek (Preglednica 4), zato biokoncentracije v vodnih organizmih ne gre pričakovati.

2.2.2 Biološka razgradljivost in metabolizem izbranih protirakovih zdravil

Večina protirakovih zdravil je slabo biološko razgradljivih (Kosjek in Heath, 2011). Študije o biološki razgradljivosti 5-FU in IM so podane v Preglednici 5, medtem ko študij o biološki razgradljivosti ET ni. Študije so si za 5-FU nasprotuječe (Preglednica 5). Kosjek in sod. (2013) so pri koncentraciji 1 mg/L 5-FU beležili hitro biološko razgradnjo (40 h). Pri višji koncentraciji 10 in 20 mg/L je pred razgradnjo prišlo do dolge lag faze (~ 12 ur). Straub (2010) je kritično predlagal, da je biološka razgradnja koncentracijsko odvisna. Visoke koncentracije 5-FU naj bi na mikroorganizme imele citotoksičen učinek, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov (Buerge in sod., 2006). Negativni rezultati v preteklosti so tako verjetno posledica uporabe visokih koncentracij 5-FU (9-854 mg/L) (Straub, 2010). S to predpostavko se strinjajo tudi Kosjek in sod. (2013), ki pri koncentraciji 100 mg/L razgradnje niso zaznali niti po 43 h. Podobno predlagajo tudi v študiji Kümmerer in Al-Ahmad (1997), kjer naj bi bila razgradnja ustavljena zaradi sinergističnega učinka antibiotikov prisotnih v odpadni vodi ter dodane visoke koncentracije 5-FU. Opazili so tudi fenomen, kjer je bila koncentracija 5-FU prenizka, da bi izzvala optimalno biološko razgradnjo (Straub, 2010). Do popolne biološko razgradnje 5-FU je prišlo, kot navaja Straub (2010), tudi v študiji z okoljsko relevantno koncentracijo 5-FU (20 µg/L), ki so jo Mahnik in sod. (2004) izmerili v odplakah onkološkega oddelka (MEC 20-122 µg/L). 5-FU naj bi bil zato dobro biološko razgradljiv, še posebej z aktivnim blatom (AB), ki je prilagojeno na testne pogoje (Straub, 2010). Pa vendar, Kiffmeyer in sod. (1998) predlagajo, da v naravi take visoke stopnje biološke razgradnje ne gre pričakovati, saj mikroorganizmi v čistilnih napravah nimajo na voljo več dni trajajočega prilagoditvenega obdobja. Razgradnja v okolju naj bi bila tako nizka in podobna vrednostim izmerjenim v začetnih fazah študij (Preglednica 5).

Preglednica 5: Biološka razgradnja 5-fluorouracila (5-FU) in imatinib mezilata (IM) z različnimi testi in podano inkubacijsko dobo ter začetno koncentracijo testne substance

	Test	Dnevi inkubacije	Začetna koncentracija	Razgradnja	Viri
5-FU	CBT (OECD 301D)	28, 40	9,02 mg/L	0 % razgradnja	Kümmerer in Al-Ahmad, 1997
	ZWT (OECD 302B)	28	854 mg/L	2 % razgradnja	Kümmerer in Al-Ahmad, 1997
	OECD 303A (inkubacija z AB)	10	5, 10, 20 mg/L	100 % (15 % razgradnja po 1. dnevu, po 2. dnevu porast do 100 %). Hitrejša razgradnja pri nižji koncentraciji (5 mg/L)	Kiffmeyer in sod., 1998
	Inkubacija z AB	50	50 µg/L	< 60 % razgradnja	Yu in sod., 2006
	Inkubacija z AB	1	5, 500 µg/L	100 % razgradnja	Mahnik, 2007
	ZWT (OECD 302B)	21	270 mg/L	0 %, vnaprej prilagojeno AB	Straub, 2010
	Test biološke razgradnje, 4 g AB	14	20 µg/L 11, 4 mg/L	1. dan: > 25 % razgradnja pri obeh koncentracijah. Po 4 dneh: 65 % pri višji ter 100% pri nižji. Po 14 dneh: 97,5 % razgradnja pri višji in 100 % pri nižji koncentraciji	Straub, 2010
	OECD 303A	3	2,5, 10 mg/L	38 % razgradnja pri nižji in 92 % razgradnja pri višji koncentraciji	Straub, 2010
IM	Aerobni test, 92/69/EC (L383) C.4-C	28	/	9-12 %; težko razgradljiv	Booker in sod., 2014

CBT = Closed Bottle Test, ZWT = Zahn Wellens Test, AB = aktivno blato, / = ni podatka

Kümmerer in sod. (2000) so predstavili obetajoč pristop povečanja biološke razgradnje protirakavih zdravil in s tem zmanjšanja njihovega škodljivega vpliva na okolje. Na obstoječo molekulo so vezali sladkorno molekulo, ki je aktivirala bakterijske stereospecifične encime, pri tem pa je terapevtska učinkovitost protirakavega zdravila ostala nespremenjena.

Pri biološki razgradnji in metabolizmu nastanejo tudi produkti, ki so v okolju obstojni in toksični, zato njihova prisotnost v površinskih vodah lahko predstavlja potencialno tveganje (Kiffmeyer in sod., 1998). Primarna pot izločanja 5-FU je respiratorna (~ 90 % kot CO₂). Z urinom se v okolje izloči 7-20 % nespremenjenega 5-FU (90 % tega v prvih urah), preostali del večinoma kot neaktivni metabolit α-fluoro-beta-alanin (TOXNET,

2015a). Po intravenski aplikaciji ET se z urinom po 72 h izloči 40-60 % ET (nespremenjenega skupaj z aktivnimi in neaktivnimi metaboliti) in do 16 % z blatom (TOXNET, 2015b). Negreira in sod. (2015) so kot prvi v okoljskih vodnih vzorcih zaznali stranski produkt razgradnje ET, 3-O-desmetil etopozid (BP1), ki je bil kot metabolit najden tudi v človeški plazmi in urinu (Cai in sod., 1999). Koncentracija v neobdelani odpadni vodi je znašala 33 ng/L ter v rečnih vzorcih 14-31 ng/L. Tega ne gre zanemariti, saj BP1 izkazuje okrepljeno citotoksično aktivnost (Negreira in sod., 2015). Glede na to, da je kloriranje ena izmed najcenejših in zato najpogostejših načinov predobdelave bolnišničnih odpadnih voda (Verlicchi in sod., 2010; Zhang in sod., 2013), so Negreira in sod. (2015) preverili vpliv kloriranja na razpad ET. Klor ni najmočnejši oksidant, kar vodi v nastanek številnih transformacijskih produktov. Ugotovili so, da pri višjih koncentracijah klora (100-200 mg/L), ET zelo hitro razpade na metabolit BP1. Obstojnost le-tega pa je najdaljša (2 h) pri nižjih koncentracijah klora (10, 50 mg/L).

Pri presnovi IM nastane aktivni metabolit, derivat N-demetyl piperazina (CGP 74588), ki ima ohranjeno aktivnost IM, in več neaktivnih metabolitov. Razpolovni čas IM je 18 h in CGP 74588 40 h. V 7 dneh se z blatom izloči 68 % IM (20% odmerka nespremenjenega) in z urinom 13 % (5 % odmerka nespremenjenega) (TOXNET, 2015c).

2.2.3 Abiotska razgradnja: direktna in indirektna fotoliza (fotooksidacija)

Fotoliza je kemijska reakcija, kjer molekula pod vplivom (zadostne) energije fotonov razpade. Z direktno fotolizo razpade ET ($\lambda > 290$ nm), medtem ko 5-FU zanjo ni dovzetem (A_{max} 266 nm) (TOXNET, 2015a, 2015b). Podatkov za IM o tem ni. V procesu indirektne fotolize protirakava zdravila reagirajo s hidroksilnimi radikali (OH^\bullet), ki nastanejo kot posledica fotokemijskih reakcij. Nastanek OH^\bullet pospeši dodatek ozona in H_2O_2 z ali brez UV radiacije. Z dodatkom ozona razpade 5-FU (Rey in sod., 1999), medtem ko podatkov o tem za IM in ET ni moč zaslediti. V rečnih vodah je razgradnja s fotooksidacijo počasnejša, saj organski ogljik (DOM angl. Dissolved Organic Carbon) lahko deluje kot optični filter, ki z molekulami tekmuje za radikale (Lin in Reinhard, 2005).

2.3 NAPOVED TOKSIČNOSTI MEŠANIC Z MODELOM SEŠTEVKA KONCENTRACIJ IN MODELOM NEODVISNEGA DELOVANJA

Toksičnost vseh okoljsko pomembnih mešanic je eksperimentalno nemogoče določiti. V ta namen se najpogosteje uporablja dva napovedna izračuna, model seštevka koncentracij (CA angl. Concentration Adition) in model neodvisnega delovanja (IA angl. Independent Action). Oba modela temeljita na konceptu, da komponente v mešanici niso v medsebojni interakciji, torej ne zmanjšajo ali povečajo učinka druge (Kortenkamp in sod., 2009).

Koncept CA je možno zaslediti že v zgodnjih delih farmakologa Loeweja (Loewe in Muischnek, 1926). Opisuje skupen učinek komponent, ki imajo podoben mehanizem delovanja. V širšem smislu to pomeni, da različne učinkovine povzročijo enak toksikološki odziv (npr. smrt, inhibicija reprodukcije), moč le-tega pa je odvisna od biološke dostopnosti učinkovine. S tega vidika je bil CA izbran kot glavni pristop za oceno toksičnosti mešanic ne glede na mehanizem delovanja (Berenbaum, 1985). V ožjem smislu, pa je CA aplikativen le za snovi, ki se vežejo na identična vezavna mesta (Pöch, 1993). V tem primeru se predvideva, da je posamezna komponenta mešanice lahko delno ali popolnoma nadomeščena z enakim deležem enako učinkovite druge komponente, ne da bi se pri tem spremenila celokupna toksičnost mešanice, ali drugače – vse dokler vsota toksičnih enot ostaja konstantna (definicija toksične enote je podana v podpoglavlju 3.2.7).

Alternativni model IA je prvič formuliral Blis (1939) in temelji na ideji, da snovi v mešanici delujejo z različnim mehanizmom delovanja. To pomeni, da se snovi vežejo na različne molekularne tarče in dosežejo enak toksikološki odziv preko različnih reakcij. Dogodki so zato med seboj verjetnostno neodvisni, kar pomeni, da se učinek posamezne komponente ne spremeni v prisotnosti druge. Nekatere primerjalne študije so pokazale, da za takšne mešanice, IA podaja boljšo napovedno toksičnost kot CA (Backhaus in sod., 2000; Faust in sod., 2003). Model IA za razliko od CA ne predpostavlja doprinosa k toksičnosti za komponente, ki ne povzročijo statistično značilnega učinka, t.j. NOEC (No Observed Effect Concentration), vendar to ne pomeni, da učinka ni. Učinek take mešanice se zato lahko pričakuje, tudi če se vse komponente mešanice nahajajo v NOEC. To je še posebej pomembno, saj se nekateri farmacevtiki (med njimi tudi protirakava zdravila) v okolju nahajajo v koncentracijah, ki so nižje od tistih, ki v laboratorijskih poskusih izzovejo statistično značilen učinek (Kortenkamp in sod., 2009).

Nobeden od modelov ne upošteva biotransformacijskih poti, vezav na nespecifična mesta in razlik v toksokinetiki protirakavih zdravil, zato se poraja vprašanje ali je napovedna moč CA in IA v določenih primerih dovolj velika (Kortenkamp in sod., 2009). V našem primeru smo uporabili snovi z različnim mehanizmom delovanja, vendar v bioloških sistemih princip striktno neodvisnih dogodkov srečamo redko, saj imajo organizmi prepletene fiziološke procese in podobne signalne poti (Kortenkamp in sod., 2009). V naši študiji smo zato poleg IA uporabili tudi napovedni model CA.

2.4 EKOTOKSIČNOST IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL TER NJIHOVIH MEŠANIC NA NETARČNE ORGANIZME

O ekotoksikoloških vplivih protirakavih zdravil na prostoživeče organizme je malo znanega; še manj so poznani potencialno aditivno/sinergistični učinki mešanic, skupaj z njihovimi človeškimi presnovki in produkti razgradnje (Escher in sod., 2011). O dolgoročnih ekotoksikoloških vplivih protirakavih zdravil na netarčne organizme je težko sklepati (Buerge in sod., 2006; Besse in sod., 2012), saj razpoložljivi podatki temeljijo predvsem na akutnih učinkih posameznih farmacevtikov na ribah, vodnih bolhah, algah, bakterijah, deževnikih, vodnih rastlinah in drugih nevretenčarjih (Ferk in sod., 2009). Ekotoksikološki odziv se lahko odraža tudi kot posledica genotoksičnosti (Parrella in sod., 2015), ki je bila z različnimi testi in organizmi (bakterije, kvasovke, višje rastline, vodne bolhe) potrjena za vsa tri protirakava zdravila; 5-FU (Oda, 1987; Barclay in sod., 2001; Zounkova in sod., 2007, 2010; Parrella in sod., 2015), ET (Zounkova in sod., 2007; Parrella in sod., 2015) in IM (Pichler in sod., 2014; Parrella in sod., 2015).

Evropska Direktiva 93/67/ECC (Commission of the European Communities, 1996) toksičnost substanc za vodne mikroorganizme razvršča glede na vrednosti EC₅₀ kot zelo toksične (EC₅₀, < 1 mg/L), toksične (EC₅₀, 1-10 mg/L) in škodljive (EC₅₀, 10-100 mg/L), medtem ko substance z EC₅₀ > 100 mg/L niso opredeljene. Glede na študijo Brezovšek in sod. (2014) sta 5-FU in IM za cianobakterijo *S. leopoliensis* opredeljena kot toksična z EC₅₀ 1,20 mg/L oziroma 5,36 mg/L. ET je neopredeljen, saj za cianobakterijo ni bil toksičen niti pri najvišji testirani koncentraciji (NOEC), ki je znašala 351,05 mg/L. Brezovšek in sod. (2014) so testirali tudi vpliv binarnih mešanic (cisplatin (=CDDP)+5-FU, CDDP+ET, 5-FU+IM). Rezultati kažejo, da je cianobakterija *S. leopoliensis* manj

občutljiva kot zelena alga *P. subcapitata*. Toksičnost binarne mešanice CDDP+5-FU je bila pri *S. leopoliensis* pri nižjih efektivnih koncentracijah (EC_X) (EC_5 - EC_{20}) blizu napovednega modela IA, medtem ko je bila pri višjih EC_X višja (sinergizem). Eksperimentalni podatki za mešanico CDDP+ET so pokazali, da je ET popolnoma izničil toksični učinek CDDP, razen pri najvišji EC_X (EC_{90}). Mešanica 5-FU+IM je imela na *S. leopoliensis* za razliko od alge manjši učinek od predvidenega (antagonizem) čez celoten razpon EC_X . Učinke mešanic v celotnem koncentracijskem razponu v nobenem primeru ni pravilno napovedal niti model CA niti model IA.

V Preglednici 6 so zbrani ekotoksikološki podatki za 5-FU, ET in IM za različne organizme in različne teste. Mater in sod. (2014) so bili prvi, ki so pri okoljsko relevantnih koncentracijah (ng/L- μ g/L) dokazali sinergističen učinek mešanice treh zdravil, ki se pogosto uporabljajo pri zdravljenju raka. Beležili so porast prelomov DNA in porast inhibicije rasti alge *Selenastrum capricornutum*, medtem ko posamezno zdravilo prelomov ni povzročalo. Na rast *S. capricornutum* so posamezna protirakava zdravila imela različne učinke: stimulirajoč, hormetičen (v obliki črke U) in brez učinka.

Glede na to, da so dokazani škodljivi učinki protirakavih zdravil pri okoljsko relevantnih koncentracijah, smo testirali vpliv mešanice treh protirakavih zdravil (5-FU+ET+IM). Izbrali smo jih glede na veliko količino porabe (5-FU, IM) ter univerzalni način delovanja (5-FU). ET smo izbrali glede na študijo Brezovšek in sod. (2014), kjer niti sam niti v binarni mešanici ni bil toksičen za *S. leopoliensis*, in želeli preveriti ali se to spremeni v prisotnosti 5-FU in IM. Poleg tega se 5-FU in ET skupaj uporablja v kombiniranih kemoterapevtskih shemah, medtem ko se IM uporablja sam, vendar zaradi visoke in naraščajoče porabe, njegove prisotnosti v mešanicah z ostalimi protirakavimi zdravili v odpadnih vodah ne moremo izključiti.

Preglednica 6: Vrednosti EC₅₀ za 5-fluorourcil (5-FU), etopozid (ET) in imatinib mezilat (IM) v različnih ekotoksikoloških testih z različnimi organizmi: cianobakterijo *Synechococcus leopoliensis* in *Anabaena flos-aquae*, zeleno algo *Pseudokirchneriella subcapitata* in *Desmodesmus subspicatus*, bakterijo *Pseudomonas putida* in *Vibrio fischeri*, ter vodno bolho *Ceriodaphnia dubia* in *Daphnia magna*

Organizem	EC ₅₀ 5-FU [mg/L]		EC ₅₀ ET [mg/L]		EC ₅₀ IM [mg/L]	
<i>S. leopoliensis</i>	1,2	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)	n.d.	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)	5,36	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)
<i>A. flos-aquae</i>	0,024	inh. rasti (72 h) (Straub, 2010)				
	0,044	inh. rasti (72 h) (Zounkova in sod., 2010)				
<i>P. subcapitata</i>	0,13	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)	30,43	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)	2,29	inh. rasti (72 h) (Brezovšek in sod., 2014)
	0,11	inh. rasti (96 h) (Zounkova in sod., 2007)	250	inh. rasti (96 h) (Zounkova in sod., 2007)		
<i>D. subspicatus</i>	48	inh. rasti (72h) (Zounkova in sod., 2010)				
	21	inh. rasti (72 h) (Straub, 2010)				
<i>V. fischeri</i>	0,122	biolum. (24 h) (Straub, 2010)				
<i>P. putida</i>	0,027	inh. rasti (16 h) (Zounkova in sod., 2007)				
<i>C. dubia</i>	501	smrtnost (24 h) (Parrella in sod., 2014)	16 % pri 120	smrtnost (24 h) (Parrella in sod., 2014)	31,92	smrtnost (24 h) (Parrella in sod., 2014)
	0,003	inh. reprod. (7 d) (Parrella in sod., 2014)	0,204	inh. reprod. (7 d) (Parrella in sod., 2014)	0,115	inh. reprod. (7 d) (Parrella in sod., 2014)
<i>D. magna</i>	20,84	inh. gibanja (48 h) (Parrella in sod., 2014)	25 % pri 120	inh. gibanja (48 h) (Parrella in sod., 2014)	11,97	inh. gibanja (48 h) (Parrella in sod., 2014)
	0,026	inh. reprod. (21 d) (Parrella in sod., 2014)	0,239	inh. reprod. (21 d) (Parrella in sod., 2014)	0,308	inh. reprod. (21 d) (Parrella in sod., 2014)

d = dan, inh. = inhibicija, biolum. = bioluminiscenca, reprod. = reprodukcija, n.d = ni določeno,
 EC₅₀ = efektivna koncentracija, ki povzroči 50% učinek

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 7: Uporabljeni protirakava zdravila in topila

Kemikalije	Proizvajalec	Založna koncentracija
5-FU	Sigma-Aldrich (Nemčija)	75 mg/mL (topilo DMSO)
ET	Santa Cruz Biotechnology (ZDA)	25 mg/mL (topilo DMSO)
IM	Santa Cruz Biotechnology (ZDA)	50 mg/mL (topilo dH ₂ O)
Dimetil Sulfoksid (DMSO)	Merck (Nemčija)	

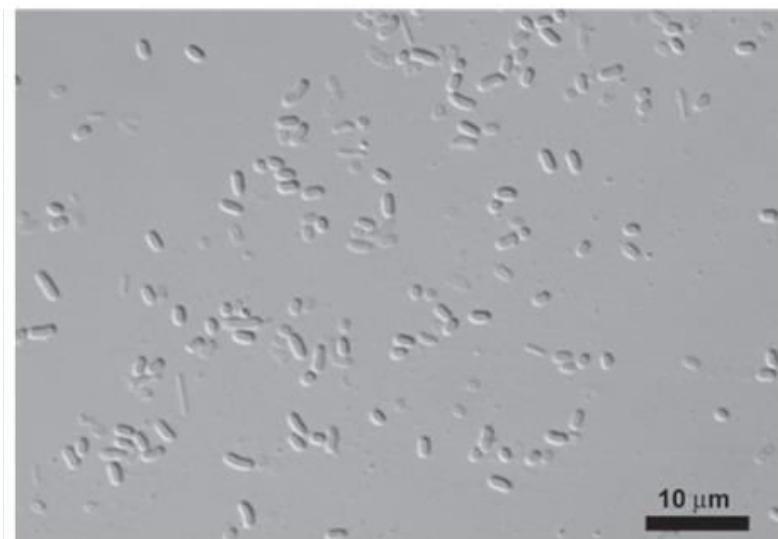
Preglednica 8: Sestava gojišča OECD s podanimi končnimi koncentracijami posameznih sestavin

Založna raztopina 1: makronutrenti	Koncentracija
NH ₄ Cl	1,5 g/L
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,2 g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L
Založna raztopina 2: železo	
FeCl ₃ x 6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	100 mg/L
Založna raztopina 3: elementi v sledovih	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O	1,5 mg/L
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	7 mg/L
Založna raztopina 4: bikarbonat	
NaHCO ₃	50 g/L

3.1.2 Testni organizem cianobakterija *Synechococcus leopoliensis*

V strupenostih testih z algami smo uporabili cianobakterijo *Synechococcus leopoliensis* (SAG 1402-1) iz zbirke "Sammlung von Algenkulturen Univerzitaett Goettingen" (=SAG). Kulturo smo vzdrževali v gojišču OECD pri sobni temperaturi in dnevni svetlobi. Z namenom ohranjanja njene čistosti in živosti smo jo redno precepljali.

Celice *S. leopoliensis* so zelo majhne ($4\text{-}6 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) in rastejo kot samostojne paličaste oblike. Najbolj pogosto opažena stopnja rasti v mediju OECD pri osvetlitvi $\sim 70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 21°C znaša 2,0-2,4/dan (OECD TG 201, 2011).



Slika 4: Cianobakterija *Synechococcus leopoliensis* SAG 1402-1 (Eleršek, 2012)

3.1.3 OECD medij za rast cianobakterije *S. leopoliensis*

Rastni medij OECD smo pripravili po navodilih OECD 201 (OECD TG 2012, 2011).

Pripravili smo ga tako, da smo 500 mL sterilne vode dodali:

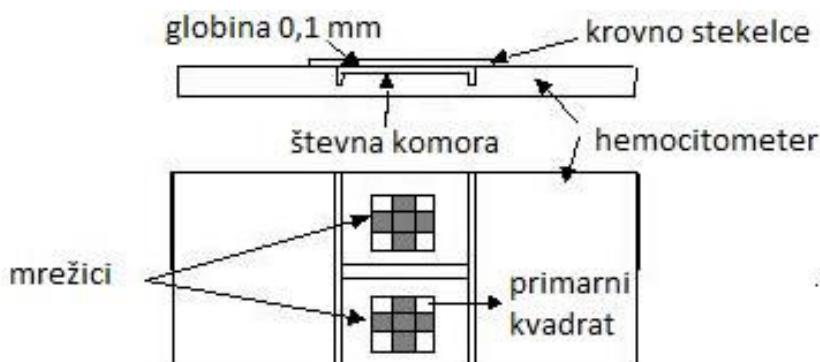
- 10 mL založne raztopine 1
- 1 mL založne raztopine 2
- 1 mL založne raztopine 3
- 1 mL založne raztopine 4

Temu smo dolili sterilno vodo do oznake 1000 mL. Založne raztopine smo pripravili tako, da smo v ločene steklenice natehtali ustrezone mase vseh sestavin (Preglednica 8) in jim dodali 250 mL destilirane vode. Založne raztopine smo potem sterilizirali z membransko filtracijo (premer pore 0,2 µm) in jih hranili v temi pri 4 °C. Pri enakih pogojih smo shranjevali tudi medij OECD, katerega temperaturo smo pred nastavitvijo poskusov uravnali na sobno.

3.2 METODE

3.2.1 Določanje volumna vcepka s števno komoro Bürker-Türk

Volumen vcepka za pripravo testnih mešanic smo določali s štetjem celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300) z uporabo števne komore Bürker-Türk (Slika 5). Na testne pogoje prilagojeno kulturo *S. leopoliensis* smo dobro premešali in sterilno odvzeli volumen 20 µL ter ga odpipetirali na mesto nanosa vzorca in ga pokrili s krovnim stekelcem. Istočasno smo preverjali tudi morfologijo in morebitno okuženost kulture.



Slika 5: Števna komora Bürker-Türk

Števna komora šteje dve mrežici. Vsaka mrežica ima štiri primarne kvadrate (bela barva, površina 1 mm²). Vsak primarni kvadrat je razdeljen še na 16 števnih polj (sekundarni kvadrati, površina 1/16 mm²). Mi smo upoštevali 4 diagonalna števna polja. Če upoštevamo obe mrežici, smo torej prešteli 32 števnih polj, tako da je bilo število preštetih celic večje od 400. Po enačbi (1) smo iz preštetih celic izračunali povprečno število celic na števno polje in to pomnožili z ustreznim faktorjem ($1,6 \times 10^5$), da smo dobili število celic/mL. Upoštevali smo celice znotraj kvadratov ter na njihovih zgornji in levih robovih, na spodnjih in desnih pa ne.

$1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ (prostornina vzorca nad primarnim kvadratom ob upoštevanju globine vzorca 0,1 mm)

$$\text{Število celic/mL} = \frac{\text{Število celic}}{32} \times 1 \times 10^4 \times 16 \quad \dots (1)$$

3.2.2 Priprava testnih mešanic

V testu smo uporabljali 5 različnih efektivnih koncentracij (EC_X) v 3 ponovitvah. Koncentracije so bile izbrane glede na rezultate vpliva vsakega protirakavega zdravila, ki je bilo izbrani cianobakteriji dodano posamično (Brezovšek in sod., 2014). Izračunane EC_X za vsako snov so služile kot osnova za naše eksperimente. Ker smo testirali vpliv trikomponentne mešanice (5-FU+ET+IM), smo v mešanico dodali tretjino vsake snovi glede na izračunano EC_X ; $\text{EC}_{5/3}$, $\text{EC}_{10/3}$, $\text{EC}_{20/3}$, $\text{EC}_{50/3}$, $\text{EC}_{90/3}$. V primeru, da bi mešanica protirakavih zdravil sledila modelu CA, bi bila inhibicija rasti mešanice tako 5 %, 10 %, 20 %, 50 % in 90 %. Pipetirali smo tako, da je bila količina topila pri kontroli enaka količini protirakavega zdravila pri najvišji EC_X (EC_{90}). Pri vsaki nižji EC_X (EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50}) je bila količina protirakavega zdravila nižja in količina topila višja, njuna vsota pa vedno enaka količini topila pri kontroli oz. protirakavemu zdravilu pri najvišji EC_X . Izjema je ET, saj smo ga zaradi njegove netoksičnosti pri vseh EC_X dodali enako količino in prav tako topila. Koncentracije posameznega protirakavega zdravila v mešanici pri posamezni EC_X so podane v Preglednici 9 in njihovi deleži v Preglednici 10.

Vsi eksperimenti so bili izvedeni v skladu z notranjimi varnostnimi standardi za ravnanje s protirakavimi zdravili (Eitel in sod., 2000). Vse ostanke, ki so pri eksperimentih nastali in so vsebovali protirakava zdravila, smo shranjevali ločeno ter jih ustrezeno zavrgli kot nevarne odpadke.

Preglednica 9: Posamezne in celokupne masne koncentracije protirakavih zdravil v trikomponentni mešanici 5-fluorouracila (5-FU), etopozida (ET) in imatinib mezilata (IM) pri določeni efektivni koncentraciji (EC_X)

EC_X	5-FU [$\mu\text{g/L}$]	ET [$\mu\text{g/L}$]	IM [$\mu\text{g/L}$]	Σ [$\mu\text{g/L}$]
EC_5	19,8	36578,9	866,3	37465,1
EC_{10}	42,5	36578,9	1041,0	37662,4
EC_{20}	97,3	36578,9	1270,7	37946,9
EC_{50}	400,7	36578,9	1786,3	38765,9
EC_{90}	3776,7	36578,9	3065,0	43420,6

Preglednica 10: Odstotki masne koncentracije posameznega protirakavega zdravila od celokupne masne koncentracije vseh treh protirakavih zdravil v mešanici pri določeni EC_X

EC _X	5-FU [%]	ET [%]	IM [%]	Σ [%]
EC ₅	0,05	97,63	2,31	100
EC ₁₀	0,11	97,12	2,76	100
EC ₂₀	0,26	96,39	3,35	100
EC ₅₀	1,03	94,36	4,61	100
EC ₉₀	8,70	84,24	7,06	100

5-FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET = etopozid, EC_X = efektivna koncentracija

3.2.3 Potek testa inhibicije rasti

Testne kulture *S. leopoliensis* smo gojili v tekočem OECD mediju v steklenih sterilnih erlenmajericah s kumulativnim volumnom 20 mL. Vse testne kulture, vključno s kontrolami, so vsebovale enako začetno koncentracijo celic, ki je znašala $5 \times 10^4\text{-}10^5$ celic/mL. Gojili smo jih v rastni komori na stresalniku (100 krožnih tresljajev/min) pri stalni temperaturi ($22\pm2^\circ\text{C}$) in svetlobi (intenziteta 80-100 $\mu\text{mol fotonov m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Začetna koncentracija vcepka je bila dovolj nizka, da je omogočala eksponentno rast celic skozi celoten potek testa brez tveganja pomanjkanja hranil. Kulturo vcepka smo pripravili 3 dni pred začetkom testa, tako da smo založno kulturo pri sterilnih razmerah prenesli v novo sterilno bučko, jo 2-3-krat redčili z medijem OECD in jo izpostavili enakim pogojem kot testne kulture. S tem smo dosegli prilagoditev na testne pogoje in maksimalno občutljivost testa.

Test je trajal 72 h. Njegovo veljavnost smo lahko potrdili, če je sledil smernicam OECD TG 201 (2011):

- eksponentni porast biomase kontrolnih kultur vsaj za faktor 16, kar ustreza specifični stopnji rasti 0,92/dan
- koeficient variacije povprečne dnevno specifične stopnje rasti (dnevi 0-1, 1-2, 2-3) kontrolnih kultur ne presega 35 %
- koeficient variacije povprečne specifične stopnje rasti med celotnim potekom testa (dnevi 0-3) kontrolnih kultur ne presega 10 %

Koeficient variacije prikazuje razpršenost statističnih enot okoli aritmetične sredine in je razmerje med standardno deviacijo (σ) in aritmetično sredino (\bar{x}).

Iz dobro premešane testne kulture smo vsakih 24 h odvzeli 70 μL , jih redčili s 70 μL destilirane filtrirane vode in s pomočjo pretočne citometrije določili število celic. Za izračun koncentracije celic (št. celic/mL) smo izmerjeno število celic pomnožili s faktorjem 20. Iz pridobljenih meritev smo izračunali stopnjo rasti in odstotek inhibicije rasti (podpoglavlje 3.2.5) izražene kot logaritmično povečanje biomase (povprečna specifična stopnja rasti) v odvisnosti od časa.

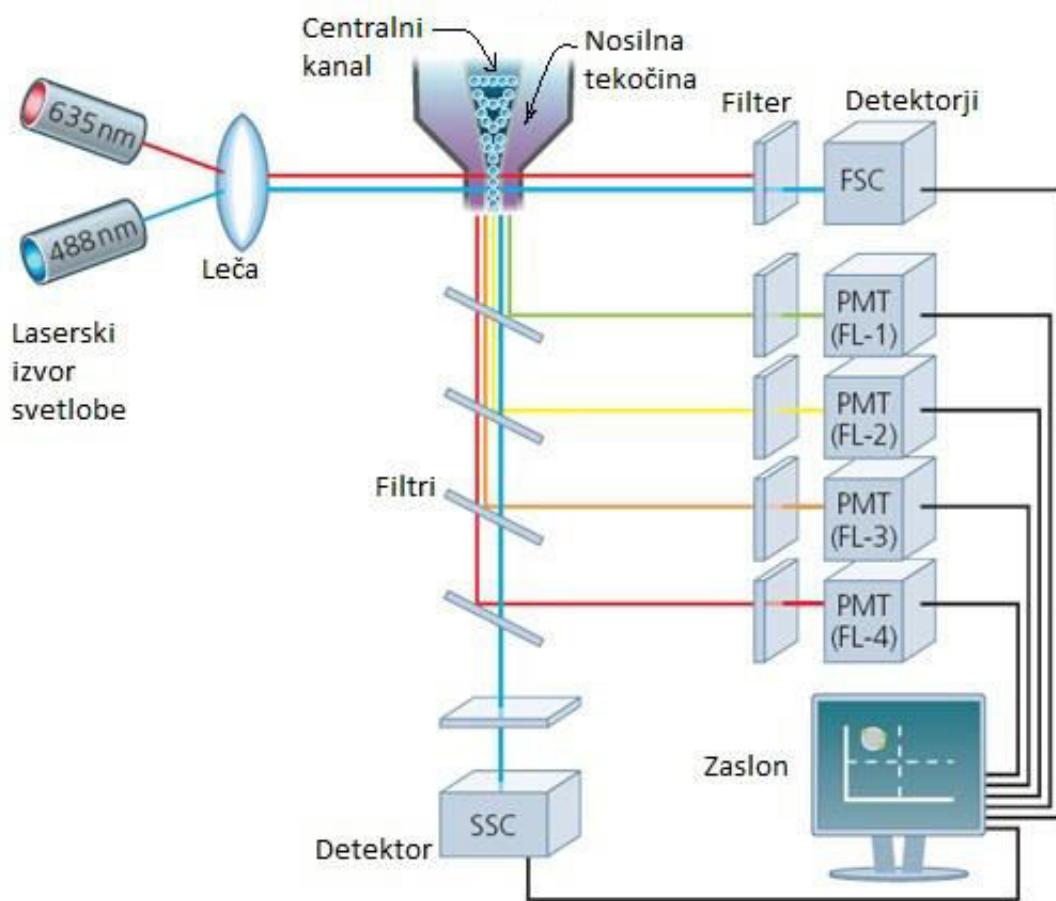
3.2.4 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je v strupenostnih testih z algami/cianobakterijami predlagana kot najboljša metoda za detekcijo algnih in cianobakterijskih celic ter njihove fluorescence. Razkrije tudi zgodnje spremembe v spektru fluorescence, ki so posledica specifičnih kemikalij oz. stresa, čeprav število celic še ni spremenjeno (Eleršek, 2012).

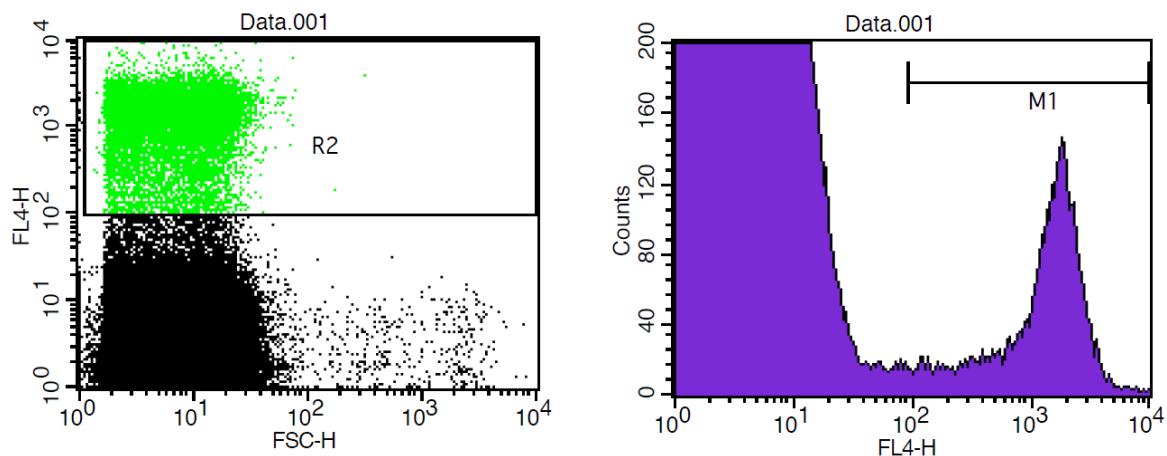
Edinstvena lastnost pretočne citometrije je sposobnost analize posameznih delcev. To omogoča hitrejša nosilna tekočina, ki v centralnem kanalu povzroči paraboličen tok vzorca (najvišja hitrost v sredini in nična ob steni). Delci tako eden za drugim potujejo mimo laserskega svetlobnega vira (najpogosteje argonski laser). Svetloba se lahko odbije oziroma sipa ali izseva v obliki fluorescence. Količino razpršene svetlobe, ki ima enako valovno dolžino kot obsevalna svetloba, merita dva fotodetektorja, FSC (angl. Forward Scatter Channel) in SSC (angl. Side Scatter Channel). Jakost prepuščene svetlobe, ki jo zaznava FSC, je obratnosorazmerna velikosti celice. Torej, večje celice prepustijo manj svetlobe, kar se na zaslonu pokaže kot močnejši signal. SSC zbira svetlogo, ki se zaradi interakcije s celičnimi organeli sipa pravokotno od smeri laserskega žarka in podaja informacijo o zrnatosti celice. Pretočni citometer ima tudi več detektorjev (FL), ki zaznavajo izsevanjo (avto)fluorescentno svetlogo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne svetlobe. Dikromatska ogledala naprej prepustijo le svetlogo določenih valovnih dolžin, preostalo odbijejo pod kotom 90°. Njihovo pravilno zaporedje tako omogoča zaznavanje več signalov hrati. Ko svetloba zadene fotodetektor, se ustvari šibek tok (nekaj miliamperov). Pripadajoča napetost je proporcionalna številu fotonov, ki jih fotodetektor sprejme. Napetost nato pomnožijo linearni in logaritemski pomnoževalci (PMT) ter jih

pretvorijo v električne signale, ki so dovolj veliki (5-10 V), da jih lahko prikažemo grafično na zaslonu. Logaritemsko pomnoževanje se uporablja pri študijah fluorescence. Pri tem se šibki signali okrepijo, močni pa stisnejo, kar omogoči enostaven prikaz porazdelitve na histogramu (Rahman, 2014). Shematski prikaz tipičnega pretočnega citometra je prikazan na Sliki 6.

Uporabili smo pretočni citometer BD FACSCalibur (ZDA). Hitrost pretoka pretočnega citometra smo nastavili na 65 $\mu\text{L}/\text{min}$ in uporabili fluorescenčni detektor FL4 s filtrom pri 675 nm. Programo CellQuestPro™ nam je izrisal točkovni histogram (Slika 7) in preštel le celice v območju, ki smo ga določili z okvirjem R2.



Slika 6: Sistem detektorjev pretočnega citometra: PMT – fotopomnoževalke fluorescentnih detektorjev različnih valovnih dolžin (prirejeno po Rahman, 2014)



Slika 7: Točkovni histogram za cianobakterijo *S. leopoliensis* (levo) in spekter fluorescence (desno) uokvirjenih dogodkov (za okvir R2 smo uporabili laserski senzor FL4, M1 = interval štetja)

3.2.5 Izračun specifične stopnje rasti in inhibicije rasti

Specifično stopnjo rasti smo izračunali kot logaritemsko povečanje biomase po enačbi (2), kjer je μ_{i-j} povprečna specifična stopnja rasti od časa i do j , X_i in X_j pa koncentracija celic v času i oziroma j . Specifično stopnjo rasti smo izračunali za posamezne dneve (dan 0-1, 1-2, 2-3) ter za celotno obdobje trajanja testa (dan 0-3). V prvem primeru samo za kontrolne kulture, v drugem primeru pa poleg kontrolnih kultur še za testne mešanice (EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90}). Z izračunom specifične stopnje rasti za posamezne dneve smo preverjali veljavnost testa in ali je rast kontrole enakomerna.

$$\mu_{i-j} = (\ln X_j - \ln X_i) / (t_j - t_i) (/dan) \quad \dots (2)$$

Inhibicijo rasti smo izračunali po enačbi (3), kjer je Y inhibicija rasti, μ_k povprečna specifična stopnja rasti kontrole ob dnevu 0, μEC_X pa povprečna specifična stopnja rasti testne kulture EC_X ob dnevu 3.

$$Y = (\mu_k - \mu EC_X) / \mu_k \quad \dots (3)$$

Vse izračune, tako za specifično stopnjo rasti kot za inhibicijo rasti, smo izračunali glede na kontrolo, ki protirakavih zdravil ni vsebovala, je pa vsebovala topilo DMSO.

3.2.6 Analiza podatkov in statistična ocena

Eksperimentalne podatke za inhibicijo rasti (%) mešanice 5-FU+IM+ET smo modelirali z nelinearno regresijsko analizo, enačbe (4), (5) in (6), v statističnem programu Prism 5 (GraphPad Inc.). Uporabili smo sigmoidno trendno črto (variabilen naklon) in skupno vrednost (shared values for all data sets) za dno in vrh. Upoštevali smo meritev vseh ponovitev in ne samo povprečja paralelk, tako da smo pridobili čim več informacij. Rezultat smo prikazali grafično kot % inhibicije rasti v odvisnosti od log EC_X (Slika 10).

$$F\% = (Y - dno) / (vrh - dno) \times 100 \quad \dots (4)$$

$$\log EC_F = \log EC_{50} + (1 / \text{naklon}) \times \log(F\% / (100 - F\%)) \quad \dots (5)$$

$$Y = dno + (vrh - dno) / \left(1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot \text{naklon}}\right) \quad \dots (6)$$

EC_F je koncentracija protirakavega zdravila, ki v razponu med dnom (najnižnjim delom krivulje) in vrhom (najvišnjim delom krivulje) privede do odziva F %, (npr. EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀). Vrh in dno sta torej platoja podana v enotah odziva (% inhibicije rasti). Naklon opisuje strmino družine krivulj, Y % inhibicije rasti in X logaritmirane efektivne koncentracije protirakavih zdravil.

Statistično značilnost ($p < 0,05$) med testnimi kulturami EC_X in kontrolami smo izvedli z neparametričnim testom ANOVA (Kruskal – Wallisov test) in Dunnovim post testom pri 95 % intervalu zaupanja.

3.2.7 Napoved toksičnosti mešanic z modelom seštevka koncentracij (CA) in modelom neodvisnega delovanja (IA)

Napovedni učinek mešanice po modelu CA smo izračunali po enačbi (7), pri čemer je c_i koncentracija i -te komponente v n -komponentni mešanici z učinkom x %, EC_{Xi} koncentracija komponente i , ki bi sama izzvala enak učinek (x %), kot ga izzove mešanica.

Kvocient $\frac{c_i}{EC_{Xi}}$ se imenuje toksična enota.

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{Xi}} = 1 \quad \dots (7)$$

Napovedni učinek mešanice po modelu IA smo izračunali po enačbi (8), kjer je $E(c_{mix})$ učinek celotne mešanice pri koncentraciji $c_{mix} = \sum c_i$, in $E(c_i)$ učinek komponente, če bi bila uporabljena sama pri enaki koncentraciji, kot v mešanici.

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad \dots (8)$$

Za izračun napovednih modelov smo potrebovali podatke za vrh, dno, naklon in EC₅, EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀, ki smo jih uvozili iz računalniškega programa Prism 5. Izračune smo opravili v programu MS Excel (Microsoft).

3.2.8 Kvantitativna analiza interakcij med protirakavimi zdravili v mešanici

Odstopanje eksperimentalnih podatkov mešanice 5-FU+IM+ET od napovednih modelov CA in IA, smo poskušali ovrednotiti s programom CompuSyn (ComboSyn, Inc.), ki se v farmakologiji pogosto uporablja. Program na podlagi izračunanega kombinacijskega indeksa (CI) interakcije opredeli kot aditivne (CI = 1), sinergistične (CI < 1) ali antagonistične (CI > 1). Teoretično ozadje izračuna predstavlja zakon o masah (angl. mass action law), na podlagi katerega je Chou leta 1976 izpeljal enačbo za srednji učinek (MEE angl. Median Effect Equation), ki je prikazana z enačbo (9). Ta predstavlja splošni teorem odnosa koncentracija-učinek in kljub kompleksnosti bioloških sistemov še vedno sledi temeljnim fizikalno-kemijskim principom farmakodinamike. Za izračun CI je MEE razširjena v algoritem, prikazan z enačbo (10). Sinergizem je definiran kot učinek večji od aditivnega in antagonizem manjši od aditivnega (Chou in Talalay 1984; Chou, 2006). Pred tem je bilo opredelitev več, pristopi pa niso podpirali eden drugega (Greco in sod., 1995). Kombiniranje zdravil je zato v biomedicinski znanosti poznano kot področje z največ dvomi in nejasnostmi.

$$f_a / f_u = (D / D_m)^m, f_a + f_u = 1 \quad \dots (9)$$

f_a (angl. fraction affected) predstavlja frakcijo učinka, ki ga povzroči količina (koncentracija) D , f_u frakcijo nepovzročenega učinka ($1-f_a$), D_m količino, ki povzroči srednji učinek (50 % inhibicija rasti), m pa podaja obliko krivulje: hiperbolična ($m = 1$), sigmoidna ($m > 1$) in ploščato sigmoidna ($m < 1$).

$${}^n(\text{CI})_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \left\{ [D]_j / \sum_1^n [D] \right\}}{(D_m)_j \left\{ (fa_x)_j / [1 - (fa_x)_j] \right\}^{1/m_j}} \quad \dots (10)$$

${}^n(\text{CI})_x$ je kombinacijski indeks n komponent pri x % inhibiciji, $(D_x)_{1-n}$ vsota odmerkov n komponent, ki v kombinaciji povzročijo x % inhibicijo, $\left\{ [D]_j / \sum_1^n [D] \right\}$ sorazmernost odmerka vsake od n komponent, ki v kombinaciji povzroči x % inhibicijo, $(D_m)_j \left\{ (fa)_j / [1 - (fa)_j] \right\}$ je odmerek posamezne komponente, ki sama povzroči x % inhibicijo, D_m je oderek, ki povzroči srednji učinek, fa_x delež inhibicije pri x % inhibiciji, m pa podaja naklon oz. obliko krivulje (hiperbolična $m = 1$, sigmoidna $m > 1$ in ploščato sigmoidna $m < 1$) (Chou, 2006).

3.2.9 Vrstična elektronska mikroskopija

Prednost vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM angl. Scanning Electron Microscope) je dobra ločljivost in dobra globinska ostrina, ki daje zelo dobro 3-D podobo vzorca. Primarni elektroni, ki izhajajo iz katode (ob segrevanju z električnim tokom), od točke do točke otipavajo površino preparata in pri tem izbijajo sekundarne elektrone, ki jih zbira detektor. Scintilator jih spremeni v fotone, ti pa se na fotopomnoževalki pretvorijo v električni signal. Na monitorju so luknje/gube zaradi manj izbitih elektronov videti temnejše, vrhovi/ravnine pa so zaradi več izbitih elektronov svetlejše.

Z vrstično elektronsko mikroskopijo smo pregledali celice kulture EC₁₀ in kontrole. Po koncu inkubacije (72 h) smo 40 mL kulture centrifugirali (4000 rpm, 10 min) in celice nato fiksirali s kapljico 37 % formaldehida ter jih inkubirali nekaj dni na 4 °C. Potem smo jih večkrat sprali z acetonom, jih namestili direktno na nosilec za mikroskop in potopili v tekoči dušik. Nazadnje smo jih naprašili še s platino in si jih ogledali pod elektronskim vrstičnim mikroskopom JSM – 7500F (JEOL, Japonska).

3.2.10 Stabilnost protirakavih zdravil

Možno je, da se tekom trajanja strupenostnih testov koncentracije toksikantov znižajo. V ta namen smo zato izračunali odstopanje med izmerjenimi in pričakovanimi koncentracijami protirakavih zdravil v založnih raztopinah in v supernatantih izbranih testnih mešanic. Koncentracije posameznih protirakavih zdravil so s kemijsko analizo določili v španskem laboratoriju (Spanish Council for Scientific Research (CSIC-IDAEA), Barcelona, Španija).

3.2.10.1 Založne raztopine

Pripravili smo sveže založne raztopine posameznih protirakavih zdravil (5-FU, ET in IM) in po 1 mL vsake v zatemnjeni posodi poslali v zgoraj omenjeni laboratorij. Med poskusmi smo založne raztopine hranili v hladilniku (4°C , tema), saj protirakava zdravila na svetlobi razpadajo.

3.2.10.2 Supernatanti testnih kultur

Za opredelitev stabilnosti smo se odločili uporabiti supernatante testnih mešanic EC₁₀, EC₂₀, EC₉₀ in kontrole. Testne mešanice smo pripravili kot za vsak poskus dotlej (podpoglavlje 3.2.2). S centrifugiranjem (4000 rpm, 10 min) smo pridobili po 14 mL supernatantov na začetku (dan 0) in na koncu testa (dan 3). Na analizo smo jih poslali na suhem ledu. Do takrat smo jih hranili v zamrzovalniku (-20°C).

3.2.10.3 Izvedba analize

Za analizo stabilnosti protirakavih zdravil so uporabili sistem visoko zmogljive tekočinske kromatografije (Acquity UPLC System) v kombinaciji z masnim spektrometrom (Waters TQD triple quadrupole) opremljenim z virom elektrosprej ionizacije. Kromatografsko ločitev so izvedli na koloni Purospher STAR RP-18 z reverzno fazo (125 mm x 2 mm, velikost delcev 5 μm) (Merck, Darmstadt, Nemčija) pri sobni temperaturi (25°C). Natančen opis pogojev in metode je podan v študiji Negreira in sod. (2013).

4 REZULTATI

Pri obravnavanju rezultatov smo upoštevali pet veljavnih testov, označenih s črkami A, B, C, D, E, ki so sledili smernicam OECD TG 201 (2011). Kriteriji veljavnosti testa so navedeni v podpoglavlju 3.2.3.

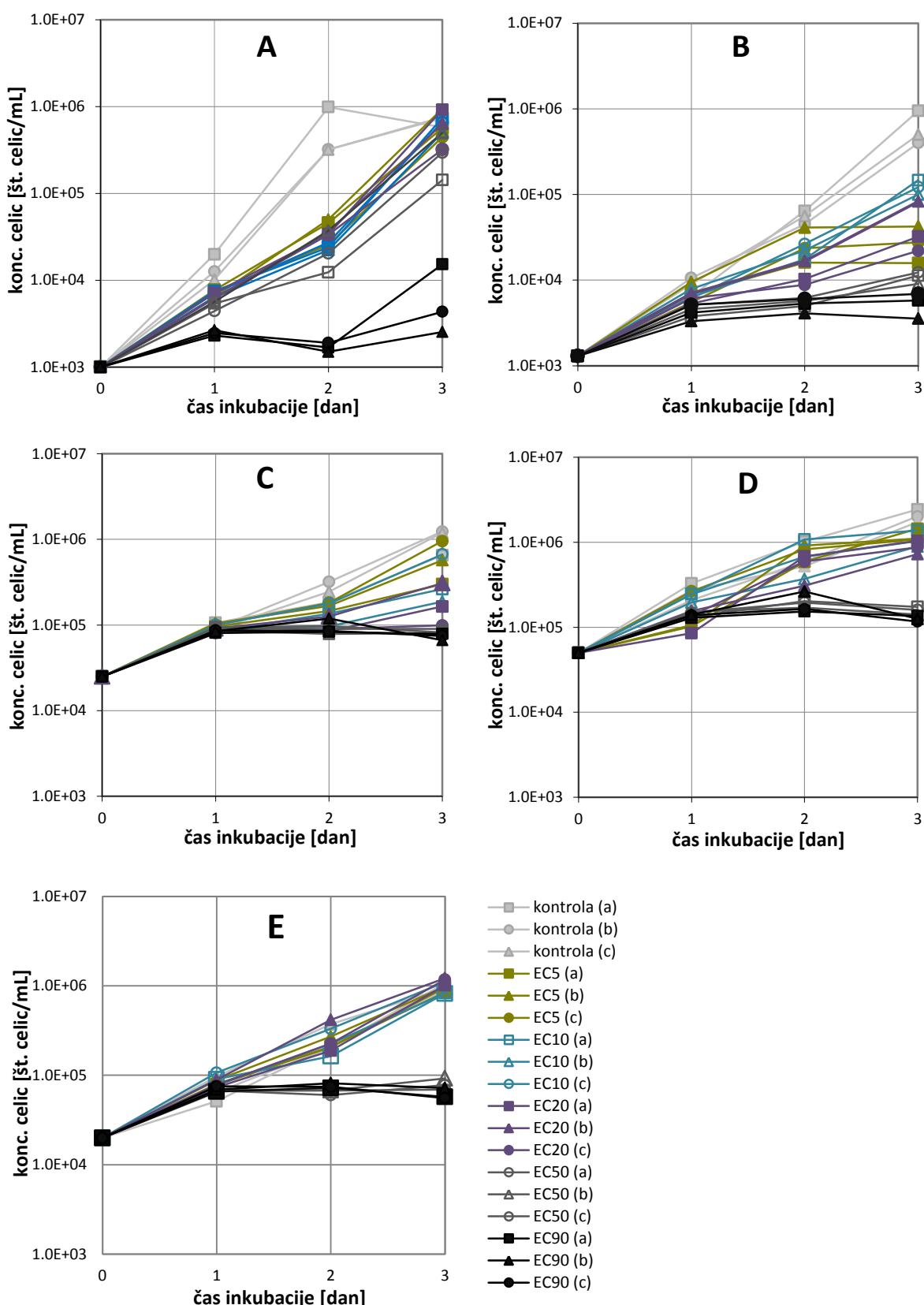
4.1 RAST KONTROLNIH IN TESTNIH KULTUR

Po navodilih iz smernice OECD TG 201 (2011) je začetna koncentracija celic pri vseh ponovitvah testa (A, B, C, D, E) znašala $5 \times 10^4\text{-}10^5$ celic/mL in je bila znotraj posameznega testa enaka za kontrolne kulture in testne mešanice EC_X (EC₅, EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀). Pri ponovitvi testa A in B smo začetno koncentracijo celic znižali, saj kulture v nasprotnem primeru ne bi bile v logaritemski fazi rasti, kar lahko vidimo iz rastnih krivulj (Slika 8). Povprečna koncentracija celic *S. leopoliensis* pri posamezni EC_X je prikazana na Sliki 9. Iz obeh slik je razvidno, da so koncentracije celic znotraj posameznega testa med posameznimi EC_X najbolj primerljive na dan 1 (po 24 h), kasneje pa so razlike večje. Povprečno povečanje biomase testnih mešanic EC_X (razen za EC₅₀ in EC₉₀) in kontrol je bilo za posamezne dneve (0-1, 1-2, 2-3) v splošnem najnižje za dan 1-2.

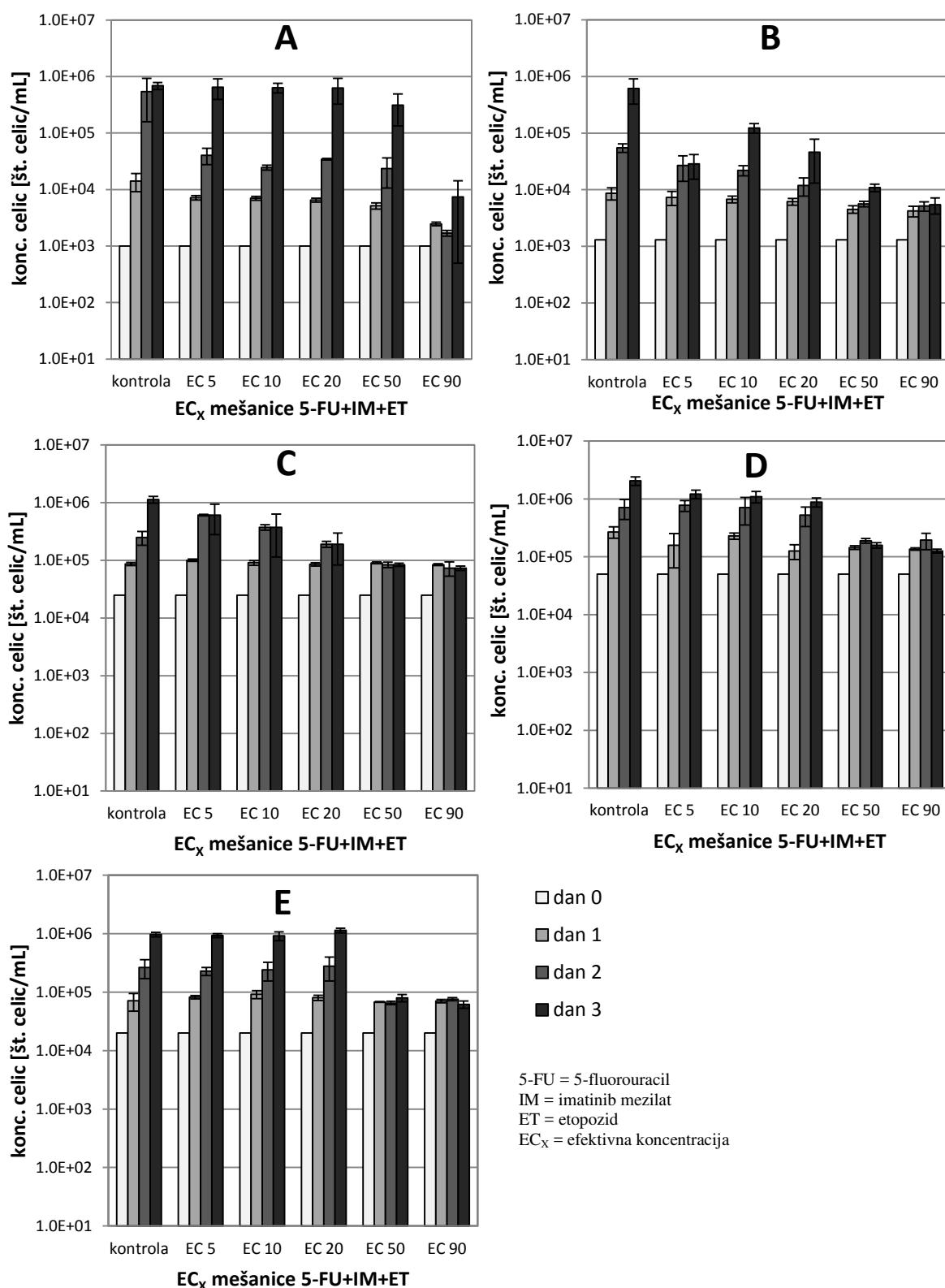
4.2 SPECIFIČNA STOPNJA RASTI IN INHIBICIJA RASTI

Specifično stopnjo in inhibicijo rasti smo izračunali z enačbama, ki sta podani v podpoglavlju 3.2.5. Vrednosti za specifične stopnje rasti in inhibicije rasti so podane v Preglednici 11.

Povprečna specifična stopnja rasti kontrolnih kultur za dan 0-3 je v prvih dveh ponovitvah testa (A in B) sovpadala z opisano normalno specifično stopnjo rasti za *S. leopoliensis* (2,0-2,4/dan). V preostalih testih (C, D, E) so si bile specifične stopnje rasti med seboj zelo podobne, vendar nižje (1,2-1,3/dan) od normalne specifične stopnje rasti. Pri testu A in E (Preglednica 11) lahko opazimo negativne inhibicije rasti, ki so posledica višjih stopenj rasti testnih kultur EC_X od kontrolnih kultur. Izstopa tudi visoka inhibicija rasti vseh treh paralelk EC₅ v testu B, ki so posledica nizke specifične stopnje rasti v primerjavi s kontollo.



Slika 8: Rastne krivulje *S. leopoliensis* kontrolnih kultur in testnih mešanic EC_X za vse tri paralelke in vseh pet ponovitev testa (A, B, C, D, E) za celoten čas trajanja testa (72 h)



Slika 9: Povprečna koncentracija celic *S. leopoliensis* s podanim standardnim odklonom za dan 0, 1, 2, 3 pri posamezni efektivni koncentraciji (EC_x) za pet veljavnih ponovitev testa (A, B, C, D, E)

Vrednosti inhibicij rasti, označene s sivo barvo (Preglednica 11), je program Prism 5 zaznal kot osamelce in jih pri statistični analizi (izris trendne črte, Slika 10) ni upošteval. Razlog je lahko napaka pri meritvi s pretočnim citometrom (npr. mašenje kolone pretočnega citometra). Podatke iz praznih polj smo že pred statistično analizo izločili sami, saj je bil KV specifične stopnje rasti kontrolne kulture paralelke a testa A za dan 2-3 višji od predpisanih 35 % (podatki niso prikazani).

Preglednica 11: Izračunane specifične stopnje rasti in inhibicije rasti kontrolnih kultur in testnih mešanic za celotno trajanje testa (72 h), vse tri paralelke (a, b, c) in vseh pet veljavnih testov (A, B, C, D, E)

	μ [/dan]			$\bar{\mu}$ [/dan]	SD	KV [%]	Y [%]			\bar{Y} [%]	Oznaka testa
	a	b	c				a	b	c		
kontrola	2,2	2,2	2,20	0,05	2		0	0	0		A
EC₅	2,0	2,3	2,14	0,13	6		8	-4	2		
EC₁₀	2,2	2,1	2,15	0,07	3		2	6	4		
EC₂₀	1,9	2,2	2,12	0,18	8		13	2	8		
EC₅₀	1,9	2,1	1,87	0,21	11		14	6	10		
EC₉₀	0,5	0,3	0,57	0,31	54		78	86	82		
kontrola	2,2	1,9	2,0	2,03	0,15	8	0	0	0		B
EC₅	0,8	1,0	1,2	1,00	0,16	17	63	48	43	51	
EC₁₀	1,6	1,5	1,4	1,51	0,06	4	29	21	28	26	
EC₂₀	1,1	0,9	1,4	1,13	0,23	21	52	52	31	45	
EC₅₀	0,7	0,7	0,6	0,71	0,05	8	69	62	69	67	
EC₉₀	0,5	0,6	0,3	0,46	0,11	28	79	73	85	79	
kontrola	1,2	1,3	1,3	1,27	0,05	4	0	0	0	0	C
EC₅	0,8	1,2	1,0	1,03	0,19	19	32	7	19	19	
EC₁₀	0,8	1,1	0,7	0,85	0,22	26	35	16	48	33	
EC₂₀	0,6	0,5	0,8	0,64	0,19	30	48	65	35	49	
EC₅₀	0,4	0,4	0,4	0,40	0,02	5	67	67	70	68	
EC₉₀	0,4	0,4	0,3	0,36	0,03	8	69	72	75	72	
kontrola	1,3	1,2	1,2	1,24	0,06	5	0	0	0	0	D
EC₅	1,1	1,0	1,0	1,06	0,05	5	13	17	12	14	
EC₁₀	1,1	1,0	1,0	1,03	0,07	7	15	18	19	17	
EC₂₀	1,0	1,0	0,9	0,95	0,06	6	22	23	24	23	
EC₅₀	0,4	0,4	0,3	0,38	0,04	9	68	69	71	69	
EC₉₀	0,3	0,3	0,3	0,31	0,03	8	74	77	74	75	

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 11: Izračunane specifične stopnje rasti in inhibicije rasti kontrolnih kultur in testnih mešanic (EC_X) za celotno trajanje testa (72 h), vse tri paralelke (a, b, c) in vseh pet veljavnih testov (A, B, C, D, E)

	μ [/dan]			$\bar{\mu}$ [/dan]	SD	KV [%]	Y [%]			\bar{Y} [%]	Oznaka testa
	a	b	c				a	b	c		
kontrola	1,3	1,3	1,3	1,29	0,03	2	0	0	0	0	E
EC₅	1,3	1,3	1,3	1,28	0,02	2	2	2	0	1	
EC₁₀	1,2	1,2	1,3	1,27	0,06	4	3	6	-4	2	
EC₂₀	1,3	1,4	1,4	1,35	0,03	2	-3	-3	-6	-4	
EC₅₀	0,5	0,5	0,4	0,46	0,05	10	64	62	68	65	
EC₉₀	0,4	0,4	0,3	0,37	0,05	12	72	68	73	71	

μ = specifična stopnja rasti, $\bar{\mu}$ = povprečna specifična stopnja rasti, Y = inhibicija rasti, \bar{Y} = povprečna inhibicija rasti, KV = koeficient variacije, SD = standardna deviacija, EC_X = efektivna koncentracija

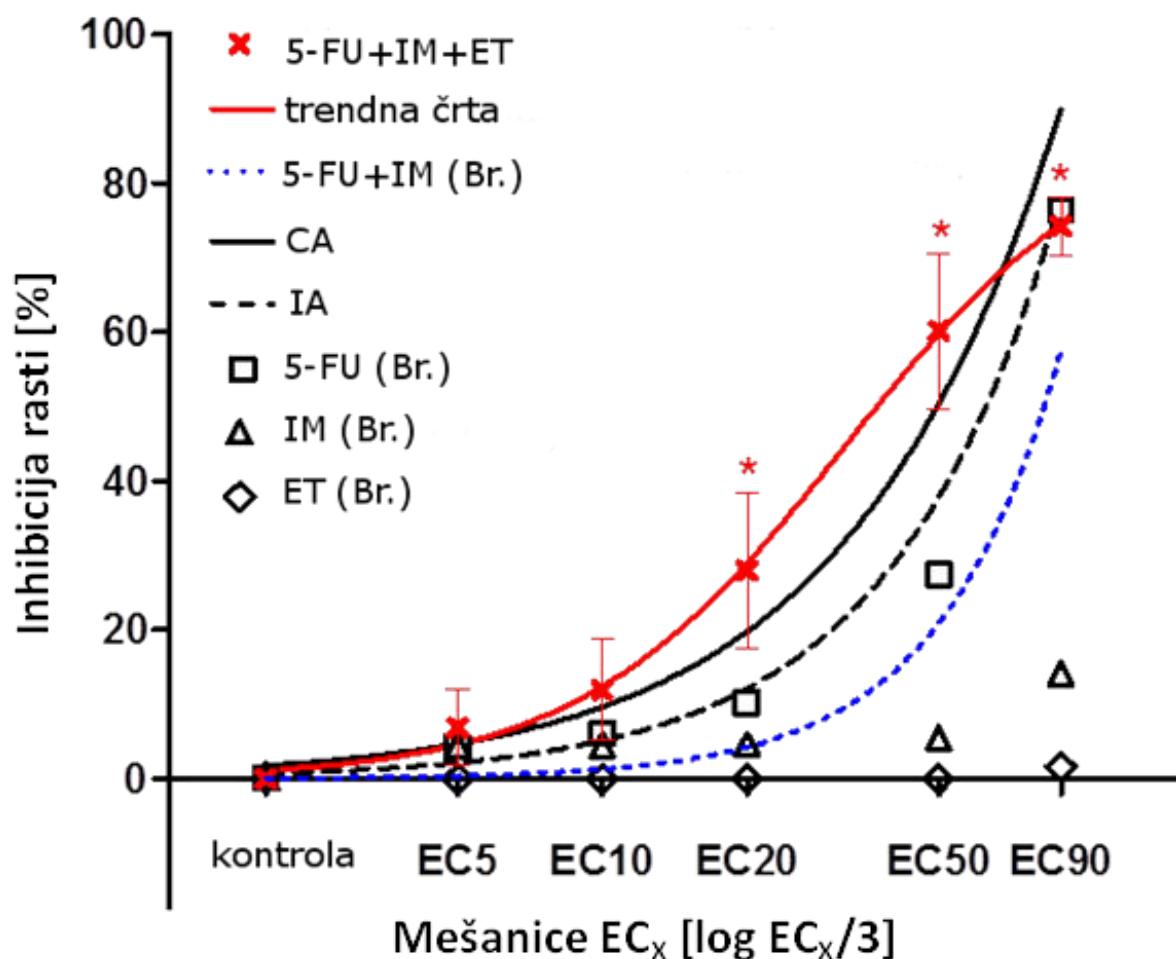
4.3 ANALIZA PODATKOV IN STATISTIČNA OCENA INHIBICIJE RASTI

Statistični program Prism 5 je s pomočjo nelinearne regresijske analize izrisal sigmoidno trendno črto inhibicije rasti (%) v odvisnosti od mešanic EC_X [$\log EC_X/3$] (Slika 10). Iz slike je razvidno, da je trikomponentna mešanica (5-FU+IM+ET) pri vseh EC_X povzročila večjo inhibicijo rasti kot binarna mešanica (5-FU+IM), kljub temu, da ET po raziskavah Brezovšek in sod. (2014) za *S. leopoliensis* ni toksičen. Inhibicija trikomponentne mešanice je z upoštevanjem 95 % intervala zaupanja pri EC_5 , EC_{10} in EC_{90} primerljiva z inhibicijo 5-FU in/ali IM. Pri EC_{20} in EC_{50} pa je ta znatno višja od vseh protirakavih zdravil uporabljenih posamezno pri enaki EC_X . Pri EC_{50} je inhibicija trikomponentne mešanice 2-krat večja kot pri 5-FU, 11-krat večja kot pri IM in 60-krat večja kot pri ET uporabljenim posamezno.

4.4 PRIMERJAVA EKSPERIMENTALNE INHIBICIJE RASTI Z NAPOVEDNIMI MODELMI

Napovedne učinke po modelu CA in IA smo izračunali po enačbah, ki sta navedeni v podpoglavlju 3.2.7. Za izračun smo potrebovali podatke iz nelinearne regresijske analize (podatki za vrh, dno, naklon, EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90}). Napovedni krivulji CA in IA smo prikazali na grafikonu inhibicije rasti v odvisnosti od EC_X (Slika 10), ki smo ga prikazali tudi v članku Eleršek in sod. (2016).

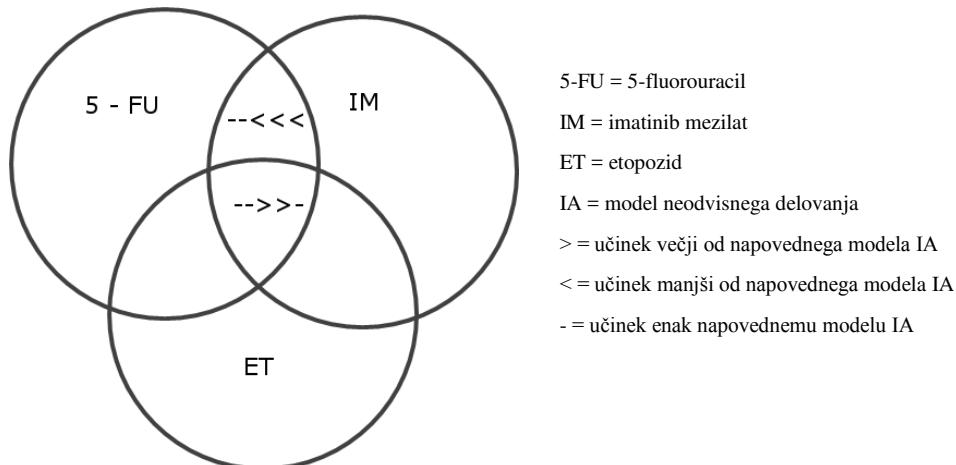
Napoved toksičnosti izbrane mešanice protirakavih zdravil je z upoštevanjem 95 % intervala zaupanja v razponu EC₅-EC₅₀ pravilno napovedal model CA, z izjemo EC₂₀ in EC₅₀ pa tudi model IA, ki je pravilno napovedal še učinek pri EC₉₀. Pri EC₂₀ in EC₅₀ je učinek mešanice z modelom IA podcenjen, medtem ko so Brezovšek in sod. (2014) podcenjen učinek mešanice 5-FU+IM opazili čez celoten razpon EC_X (Slika 10). Primerjava inhibicije rasti in napovednih učinkov z obema modeloma, CA in IA, je prikazana v Preglednici 12 in podana grafično na dva različna načina: Slika 10 in Slika 11 (za IA).



Slika 10: Inhibicija rasti cianobakterije *S. leopoliensis* za posamezna protirakava zdravila, 5-fluorouracil (5-FU), imatinib mezilat (IM) in etopozid (ET), ter njihovo trikomponentno (5-FU+IM+ET) in binarno (5-FU+IM) mešanico pri petih efektivnih koncentracijah (EC_X) za časovno obdobje 72 h. Podatki predstavljajo srednje vrednosti \pm 95 % interval zaupanja. Prikazana je tudi napoved z modelom seštevka koncentracij (CA, angl. Concentration Adition) in modelom neodvisnega delovanja (IA, angl. Independent Action). Statistično značilna razlika s kontrolo ($P < 0,05$) je označena s simbolom *. Inhibicijo rasti za posamezna zdravila in binarno mešanico (5-FU+IM) so določili Brezovšek in sod., 2014 (Br.).

Preglednica 12: Eksperimentalno pridobljeni podatki za inhibicijo rasti pri posamezni efektivni koncentraciji (EC_X) skupaj z napovednim modelom CA (model seštevka koncentracij) in IA (model neodvisnega delovanja).

EC_X	EC_X izmerjena [% inhibicije rasti]	EC_X napovedna CA [% inhibicije rasti]	EC_X napovedna IA [% inhibicije rasti]
EC_5	6,91	5,00	8,44
EC_{10}	11,92	10,00	10,27
EC_{20}	28,00	20,00	14,35
EC_{50}	60,14	50,00	31,41
EC_{90}	74,13	90,00	80,05



Slika 11: Ponazoritev primerjave eksperimentalne inhibicije rasti (z upoštevanim 95 % intervalom zaupanja) izbrane mešanice protirakavih zdravil z napovednim modelom IA (model neodvisnega delovanja, angl. Independent Action) in binarno mešanico (Brezovšek in sod., 2014). Pet zaporednih simbolov (-, <, >) v vrstih od leve proti desni označuje učinke pri petih efektivnih koncentracijah: EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90}

4.5 KVANTITATIVNA ANALIZA INTERAKCIJ PROTIRAKAVIH ZDRAVIL V MEŠANICI S KOMBINACIJSKIM INDEKSOM (CI)

V program CompuSyn smo za vsako protirakavo zdravilo posebej vnesli vrednosti EC_X (koncentracija D) z pripadajočo inhibicijo rasti (učinek f_a , vrednost med 0 in 1), ki so jih določili Brezovšek in sod. (2014), ter enako za njihovo trikomponentno mešanico, le da smo vnesli vrednosti $EC_X/3$ z inhibicijami rasti značilnimi za mešanico. Za netoksični ET smo vnesli najmanjši možni učinek, ki ga po navodilih Chou (2006) program še sprejme (t.j. $f_a = 0,01$, saj je $\log 0 = -\infty$). Program CI ni mogel izračunati, saj, kot je navedeno v teoretičnih osnovah Chou (2006), to za mešanice z netoksičnimi komponentami ni mogoče. Program namreč CI izračuna glede na dva parametra, D_m (koncentracija, ki povzroči 50 % učinek) in m (oblika krivulje), ki sta v primeru ET znašala 0. Skladnost eksperimentalnih podatkov s principom srednjega učinka (zakon o masah) program

opredeli z določitvijo linearnega korelacijskega koeficiente r , ki ga v našem primeru ni mogel določiti (priporočena vrednost $> 0,95$).

4.6 STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

V španskem laboratoriju (Spanish Council for Scientific Research (CSIC-IDAEA) so z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti v kombinaciji z masno spektrometrijo določili koncentracijo posameznih protirakavih zdravil (5-FU, IM, ET) v vzorcih založnih raztopin in v testnih mešanicah EC₁₀, EC₂₀ in EC₉₀. Nato smo izračunali odstopanje (%) med izmerjenimi in pričakovanimi (izračunanimi) koncentracijami na začetku (dan 0) in na koncu testa (dan 3). Na podlagi teh izračunov smo nato opredelili kakšna je stabilnost izbranih protirakavih zdravil v naših eksperimentalnih pogojih in ali je odstopanje znotraj okvirja, ki ga določa evropska smernica OECD TG (2011), t.j. $\pm 20\%$ pričakovane vrednosti.

4.6.1 Založne raztopine protirakavih zdravil

Iz Preglednice 13 lahko ugotovimo, da koncentracije protirakavih zdravil v založnih raztopinah od pričakovanih ne odstopajo več kot določa smernica OECD TG (2011). Odstopanje je bilo največje pri IM (5,7 %), nato pri ET (4,5 %) in najmanjše pri 5-FU (-1,5 %). Negativna vrednost pri slednjemu je posledica izmerjene koncentracije, ki je bila višja od pričakovane. Vidimo tudi, da je ET že takoj na začetku razpadel na izobarično spojino, poimenovano ET2, koncentracija le-te pa se je tekom trajanja testa še povečala (Preglednica 14). Izobarično spojino v našem primeru definiramo kot spojino z enako nominalno maso in različnim retencijskim časom. Celokupno koncentracijo ET predstavlja seštevek etopozida (ET1) in njegove izobarične spojine (ET2).

Preglednica 13: Pričakovane in s kemijsko analizo izmerjene koncentracije protirakavih zdravil v posameznih založnih raztopinah z izračunanim odstopanjem

	5-FU	IM	ET1	ET2	ET
pričakovana koncentracija [mg/L]	750	500	/	/	25000
izmerjena koncentracija [mg/L]	761,5	471,5	23801,3	77,9	23879,2
odstopanje od pričakovane koncentracije [%]	-1,5	5,7	/	/	4,5

5-FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET1 = etopozid, ET2 = izobarična spojina, ET = ET1+ET2

4.6.2 Supernatanti mešanic protirakavih zdravil

Odstopanje začetnih koncentracij od predvidenih je bilo najmanjše pri 5-FU (1,4 %), potem pri IM (5,6 %) in največje pri ET (55,6 %). Tekom celotnega testa (dan 0-3 oz. 72 h) je bilo odstopanje prav tako največje pri ET (od -8,4 % pri EC₂₀ do -52,5 % pri EC₁₀), sledil je IM (0,0 % pri EC₁₀ do 43,9 % pri EC₉₀) in najmanjše pri 5-FU (14,9 % pri EC₉₀, odstopanj za EC₁₀ in EC₂₀ zaradi manjkajočih izmerjenih koncentracij na dan 3 nismo mogli izračunati). Glede na preliminarne študije nestabilnosti, pogoji so bili enaki kot v naši študiji, abiotiska nestabilnost k zmanjšanju koncentracije prispeva manj kot 20 %. Kar je več, bi potem takem lahko pomenilo vezavo na celice cianobakterij ali biotsko spremembo teh snovi.

Preglednica 14: Pričakovane (izračunane) in izmerjene koncentracije posameznih protirakavih zdravil v mešanicah EC₁₀, EC₂₀, EC₉₀ z izračunanim odstopanjem na začetku (dan 0) in tekom testa (dan 0-3)

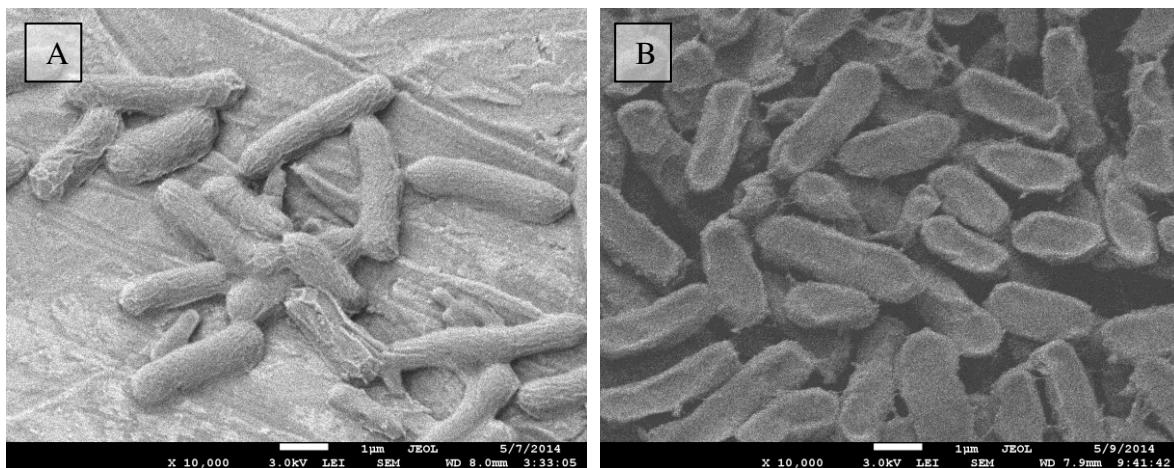
	5-FU	IM	ET1	ET2	ET
Pričakovane konc. [µg/L]					
kontrola	0,00	0,00	/	/	0,00
EC₁₀	42,53	1040,00	/	/	45330,00
EC₂₀	97,33	1270,00	/	/	45330,00
EC₉₀	3780,00	3070,00	/	/	45330,00
Izmerjene konc., dan 0 [µg/L]					
kontrola	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EC₁₀	44,00	1028,90	21360,20	818,60	22178,80
EC₂₀	91,40	1219,70	17099,70	1326,60	18424,30
EC₉₀	3719,0	2704,10	19475,50	305,70	19780,20
Odstopanje od pričakovane konc., dan 0 [%]					
EC₁₀	-3,5	11,1	/	/	51,1
EC₂₀	6,1	4,0	/	/	59,4
EC₉₀	1,6	11,9	/	/	55,6
Izmerjene konc., dan 3 [µg/L]					
EC₁₀	/	1028,60	14098,30	19717,90	33815,20
EC₂₀	/	1016,00	8689,60	11284,10	19973,70
EC₉₀	3166,40	1517,70	12304,10	16473,00	28777,10
Odstopanje med izmerjenimi konc., dan 0-3 [%]					
EC₁₀	/	0,0	34,0	-2308,7	-52,5
EC₂₀	/	16,7	49,2	-750,6	-8,4
EC₉₀	14,9	43,9	36,8	-5288,6	-45,5

5-FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET1 = etopozid, ET2 = izobarična spojina, ET = ET1+ET2, konc. = koncentracija

4.7 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA POVRŠINO CELIC *S. leopoliensis*

Pri vzporedno opravljeni študiji z algo *Pseudokirchneriella subcapitata* (Eleršek in sod., 2016) so pri liofilizirani biomasi (~ 0,5 g) testne mešanice EC₅ in EC₁₀ v primerjavi s kontrolo po 72 h inkubacije opazili vidne razlike v makrostrukturi (agregaciji) algne biomase. Pri kontroli so bile celice po liofilizaciji popolnoma pritrjene na steno bučke, medtem ko se celice pri mešanici EC₅ in EC₁₀ stene bučke niso oprijele. Morebiten vpliv mešanice protirakavih zdravil (5-FU+IM+ET) na površino celic smo zato želeli preveriti tudi pri cianobakteriji *S. leopoliensis*. V ta namen smo izvedli vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Posnetki površine celic *S. leopoliensis* so prikazani na Sliki 12 (A: kontrola; B: mešanica protirakavih zdravil pri EC₁₀).

Na slikah vidnih razlik v mikrostrukturi celic med kontrolno kulturo in testno mešanicu EC₁₀ nismo opazili. Prav tako jih, kljub vidnim razlikam v agregaciji, niso opazili pri celicah *P. subcapitata* (Eleršek in sod., 2016). Potrebno bi bilo optimizirati postopek priprave preparata naših celic za opazovanje s SEM, vendar to presega okvire te naloge.



Slika 12: Površina celic (mikrostruktura) cianobakterije *S. leopoliensis* posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) po 72 h inkubacije. A: kontrolna kultura; B: mešanica protirakavih zdravil EC₁₀. Merilo na dnu vsake slike predstavlja 1 µm

5 RAZPRAVA

V zadnjem desetletju je število bolnikov, ki prejemajo kemoterapijo precej naraslo in bo v naslednji letih še naraščalo (Ribes in sod., 2008). Razloge gre iskati v staranju prebivalstva in nezdravemu življenjskemu slogu, kar pripomore k večji incidenčni stopnji raka (Rak v Sloveniji 2011, 2015). Ocenjujejo, da se bo potreba po protirakavih zdravilih v naslednjih 10 letih podvojila (Nussbaumer in sod., 2011). Po uporabi je odvajanje protirakavih zdravil (in metabolitov) v okolje neurejeno niti deležno specifične kontrole. Temu botrujejo predvsem premalo robustna določila ocenjevanja okoljskega tveganja (ERA angl. Environmental Risk Assessment) (Zhang in sod., 2013). Po določilih Evropske agencije za zdravila (EMA angl. European Medicines Agency) se testi obstojnosti, bioakomulacije in toksičnosti ne izvajajo, če vrednost PEC znaša $\leq 0,01 \mu\text{g}/\text{L}$ (EMA, 2006) oziroma $\leq 1 \mu\text{g}/\text{L}$ (FDA, 1998), kar protirakava zdravila redko dosegajo. Hkrati morajo biti izvzeta tudi druga okoljska tveganja, kar za protirakava zdravilo ravno tako težko trdimo. Večina od njih namreč deluje neposredno na DNA, zato spodnje (varne) meje uporabe ni možno določiti, še posebno takrat, ko se nahajajo v mešanicah. Pomanjkanje podatkov o ekotoksikoloških vplivih protirakavih zdravil in njihovih mešanic na netarčne organizme zato ne preseneča. V magistrski nalogi smo zato žeeli preveriti vpliv mešanice treh protirakavih zdravil (5-FU+IM+ET) na cianobakterijo *S. leopoliensis*. Cianobakterije so namreč pomembni ubikvitarni predstavniki vodnih primarnih producentov.

Cianobakterije spadajo med fotosintetske prokarionte in so prvi znani kisik proizvajajoči organizmi. Fosili dokazujejo, da njihov obstoj sega preko 2,5 milijard let nazaj (Summons in sod., 1999). Tekom dolge evolucijske zgodovine so se cianobakterije prilagodile na številne okoljske pogoje, zato nekatere od njih uspevajo v ekstremnih okoljih - vroča, hladna, kisla in alkalna okolja, v celinskih vodah pa lahko postanejo najštevilčnejši predstavnik primarnih producentov (Mur in sod., 1999). Cianobakterije iz rodu *Synechococcus* sodijo med najbolj številčne ($> 10^5$ celic/mL) ubikvitarne predstavnike pikoplanktona v odprtih oceanih, kjer predstavlja ~ 25 % primarne produkcijske (Waterbury in sod. 1986; Li in sod., 1998). Predstavniki tega rodu so številčni tudi v različnih estuarijskih ekosistemih, kjer lahko dosežejo več kot 50 % delež primarne produkcijske (Affronti in Marshall, 1994). Poleg tega, da ti predeli sodijo med najbolj produktivne habitate, so tudi najbolj izpostavljeni človekovi dejavnosti, saj sprejemajo

odpadne vode iz notranjih in obalno poseljenih območij (Paerl in sod., 2003; van Dolah in sod., 2007). Odpadne vode vsebujejo kompleksno mešanico kemikalij, med katerimi najdemo tudi protirakava zdravila (Frederic in Yves, 2014). V visoko produktivnih sistemih je motnost večja in koncentracija CO₂ manjša (visoka vrednost pH > 9). Prednost cianobakterij je v boljši kinetiki privzema CO₂ in sposobnosti vzgona s plinskimi vakuolami. Ko postanejo koncentracije CO₂ prenizke, preostali del fitoplanktona ni zmožen več uspevati, zato ga cianobakterije prerastejo/izključijo iz skupnosti (Shapiro, 1997). Sposobne so koristiti tudi nizke okoljske koncentracije fosforja bodisi s hidroliziro s fosfatazami iz organskega vira (Coleman, 1992) ali s porabo intracelularno skladiščenega fosforja v obliki polifosfatnih teles (Healey, 1982). V okoljih, kjer močno primanjkuje dušika, nekatere vrste cianobakterij fiksirajo atmosferski dušik v heterocistah (Oliver in Ganf, 2000) ali pa gre le za časovno ločen potek fiksacije (ponoči) in fotosinteze (podnevi), saj je nitrogenaza občutljiva na kisik (Stal in sod., 2010). V neugodnih pogojih (temperatura, izsuševanje, hranila,...) lahko tvorijo različne preživitvene oblike, npr. akinete (Kaplan-Levy in sod., 2010). Kot vidimo, so cianobakterije, z vsemi svojimi prilagoditvami, skupina, ki lahko v raznolikih pogojih bolje uspeva kot ostali primarni producenti v vodah (evkariontske alge in makrofiti), zato je njihov pomen še toliko večji.

5.1 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA RAST CIANOBAKTERIJE *S. leopoliensis*

Učinek trikomponentne mešanice 5-FU+IM+ET je bil v celotnem razponu EC₅-EC₉₀ z upoštevanjem 95 % intervala zaupanja večji od učinka binarne mešanice 5-FU+IM in pri EC₂₀ in EC₅₀ od vseh treh posameznih protirakavih zdravil (Slika 10). Inhibicija rasti (%) mešanice je pri EC₅₀ glede na EC₅₀ 5-FU (1,20 mg/L) večja za faktor 2, v primeru IM (5,36 mg/L) za faktor 11 in v primeru ET (n.d.) za faktor 60. Glede na Evropsko Direktivo 93/67/ECC (Commission of the European Communities, 1996), ki toksičnost substanc za vodne mikroorganizme deli glede na vrednosti EC₅₀ (podpoglavlje 2.4), toksičnost naše mešanice lahko opredelimo kot zelo toksično. Medtem sta 5-FU in IM za *S. leopoliensis* opredeljena kot toksična in ET kot neopredeljen. Intervalli zaupanja so, kot lahko opazimo iz Slike 10, precej široki. Vzrok je lahko visoka povprečna naravna variabilnost koncentracije dnevno izmerjenih celic kontrolnih kultur izražena kot KV (16 %). Čeprav cianobakterije zajemajo svetlobo nizkih in visokih intenzitet pri širokem razponu valovnih

dolžin, je pri določeni EC_X znotraj in med poskusi lahko prihajalo do razlik v kvaliteti svetlobe (zasedanje različnih mest na stresalniku) ter različnih pogojev vzdrževanja kulture za začetni inokulum (različna sobna temperatura in dnevna svetloba). Na začetku testiranja smo se soočali z rastnimi težavami kontrolne kulture (Slika 8, test A, paralelka a), kar se je ponovilo tudi v naslednjih dveh ponovitvah testa, zaradi česar sta bila ta neveljavna. Z odstopanjem od predvidene rasti (rastna krivulja) smo sklepali, da kultura nima normalnih rastnih lastnosti. V naslednjih poskusih (B, C, D, E) smo zato uporabili novo kulturo *S. leopoliensis* (SAG 1402-1).

Specifične stopnje rasti kontrolnih kultur za obdobje 72 h so ustrezale opisani normalni specifični stopnji rasti (2,0-2,4/dan) le v testu A in B. V preostalih testih (C, D, E) so si bile vrednosti med seboj zelo podobne (1,24-1,29), vendar precej manjše od normalne specifične stopnje rasti. Poleg že zgoraj navedenih razlogov je temu lahko botrovalo intenzivno stresanje (100 krožnih tresljajev/min), ki je negativno vplivalo na fotosintezo in posledično na rast kulture, vendar smo le na tak način lahko zagotovili dovolj velik masni prenos CO₂ iz okoliškega zraka v medij. Razlike v specifični stopnji rasti med testom A, B ter C, D, E je lahko začetna koncentracija celic (Slika 8), ki je bila v prvih dveh testih manjša od predpostavljenih 5×10^4 - 10^5 celic/mL, zaradi česar so celice imele na voljo več hrani. S štetjem celic v števni komori smo namreč število celic precenili in posledično je bil volumen vcepka premajhen. Na problematiko štetja majhnih celic *S. leopoliensis* opozarja tudi smernica OECD TG 201 (2011). Delo smo žeeli izvajati čim bolj natančno, zato smo celice šteli na več ravninah mikroskopskega preparata in jih pri tem očitno precenili. Za štetje celic med poskusom smo uporabljali metodo s pretočnim citometrom.

Mešanico 5-FU+IM+ET so v vzporedno opravljeni študiji testirali tudi na zeleni mikroalgi *P. subcapitata* (Eleršek in sod., 2016). Objavljene eksperimentalne inhibicije rasti so večje kot v primeru cianobakterije *S. leopoliensis* (Preglednica 12): pri EC₅ za 29 %, pri EC₁₀ za 56 %, pri EC₂₀ za 47 % in pri EC₅₀ za 10 %. Manjšo toksičnost za *S. leopoliensis* so beležili tudi Brezovšek in sod. (2014) v primeru posameznih protirakavih zdravil. Vrednosti EC₅₀ 5-FU in IM sta bili 10-krat oziroma 2-krat višji kot pri zeleni algi *P. subcapitata*, medtem ko ET za cianobakterijo sploh ni bil toksičen. Z ekološkega vidika je poznavanje občutljivosti alg in cianobakterij za farmacevtike zelo pomembno, saj to lahko vpliva na strukturo fitoplanktona. Cvetenje cianobakterij je namreč posledica kompleksnih

sinergističnih učinkov več okoljskih dejavnikov (Dokulil in Teubner, 2000). Poleg fizikalnih (mešanje, svetloba, temperatura) in prehranskih dejavnikov (dušik, fosfor) nekatere publikacije navajajo tudi onesnažila, na katere so alge in cianobakterije različno občutljive (Pei in Ma, 2002). Primerjalne študije so razkrile, da so alge na protirakava zdravila (Brezovšek in sod., 2014) in pesticide bolj občutljive kot cianobakterije. Posledično lahko razbohotene cianobakterijske vrste izrinejo prej prevladujoče algne vrste (Ma, 2005; Ma in sod., 2006; Ma in sod., 2008). Njihova prevlada je še posebej zaskrbljujoča, če dominantne vrste proizvajajo številne cianotoksine in druge nepoznane biološko aktivne molekule, ki so nevarne za vodne organizme in človeka (Žegura in sod., 2011). Testni organizem *S. leopoliensis* sicer ne proizvaja toksinov, vendar to lahko velja za druge toksin proizvajajoče cianobakterije (*Microcystis*, *Dolichospermum*, *Nodularia*,...).

Koncentracije posameznih protirakavih zdravil, ki smo jih uporabili v mešanici 5-FU+IM+ET so bile sicer višje od MEC (Preglednica 3), vendar lahko podobno kot Brezovšek in sod. (2014) zaključimo, da okolskega tveganja na lokalnih mestih v primeru uporabljeni mešanice ne moremo izključiti. Toksičnost se namreč ne izraža samo kot zaviranje rasti, ampak tudi na druge načine (genotoksičnost, spremenjeno prepisovanje genov), kot so to dokazali Kovacs in sod. (2015) za okolske koncentracije 5-FU. Predlagajo, da ti učinki ob kronični izpostavljenosti lahko izzovejo degenerativne spremembe na vodnih organizmih. Vrednosti EC₅₀ so pri kronični izpostavljenosti namreč občutno nižje (Preglednica 6). Če k temu prištejemo še okrepljene/sinergistične učinke mešanic, tveganja pri kronični izpostavljenosti vsekakor ne moremo izključiti.

5.2 PRIMERJAVA NAPOVEDNIH MODELOV Z DEJANSKIMI INHIBICIJAMI RASTI

Eksperimentalni podatki inhibicije rasti z upoštevanjem 95 % intervala zaupanja v razponu EC₅-EC₅₀ sledijo napovednemu modelu seštevka koncentracij (CA, angl. Concentration Addition) in pri EC₉₀ modelu neodvisnega delovanja (IA, angl. Independent Action), ki je pravilno napovedal še učinek pri EC₅ in EC₁₀. Učinek pri EC₂₀ in EC₅₀ je bil z IA podcenjen, medtem, ko je bila toksičnost binarne mešanice 5-FU+IM čez celoten razpon EC_X manjša od obeh napovednih modelov (Brezovšek in sod., 2014). Dodatek ET je kljub temu, da je za *S. leopoliensis* netoksičen, očitno vplival na celokupno toksičnost mešanice

5-FU+IM+ET. Nobeden od modelov v analizirani mešanici ne predpostavlja farmakokinetičnih in farmakodinamičnih interakcij (Kortenkamp in sod., 2009), zato s stališča definicije aditivnosti sklepamo, da je ET vplival na privzem, transport in/ali metabolizem 5-FU in IM.

5.3 KVANTITATIVNA ANALIZA INTERAKCIJ V MEŠANICI PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

Interakcij med protirakavimi zdravili v trikomponentni mešanici 5-FU+IM+ET z računalniško simulacijo nismo mogli kvantitativno opredeliti na sinergistične, antagonistične ali aditivne. Glede na eksperimentalne in napovedne rezultate bi lahko zaključili, da ima trikomponentna mešanica sinergističen učinek, vendar se ta izraz po definiciji Chou (2006) lahko uporablja le v primerih, kjer vsaka izmed komponent izkazuje določen učinek. V primeru, kjer komponenta mešanice učinka ne izzove (v našem primeru ET), govorimo o potenciranju oziroma okrepitevi učinka (Chou, 2006). ET je glede na binarno mešanico 5-FU+IM učinek najbolj okreplil pri EC₁₀ (179-krat) in pri EC₅ (15-krat). Pri višjih EC_x je bilo potenciranje manjše; EC₂₀ 4-krat, EC₅₀ 3-krat in EC₉₀ 1,3-krat. Do največje okrepiteve učinka je torej prišlo pri najnižjih EC_x, kar je še posebej pomembno iz stališča nizkih okoljskih koncentracij protirakavih zdravil, in da na celokupen učinek mešanice lahko vplivajo tudi komponente, ki same po sebi niso toksične. Fenomen so Silva in sod. (2002) opisali z izrazom »Something from Nothing« za mešanico osmih estrogenov, katerih koncentracija je bila nižja od NOEC, in je kljub temu privedla do statistično značilnega učinka. Iz okrepljenega učinka naše mešanice lahko sklepamo tudi na povišano tveganje sprostitve cianotoksinov iz cianobakterij, saj so vzroki sprostitve, poleg naravnega odmiranja celic in fizičnega stresa, lahko tudi onesnažila (Ross in sod., 2006).

5.4 STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

Koncentracija 5-FU se v supernatantu tekom testa (72 h) ni znižala za več kot določa smernica OECD TG 201 (2011), t.j. \mp 20 % nominalne vrednosti. Pri IM je bilo odstopanje večje v primeru EC₉₀ (43,9 %), vendar glede na predhodno študijo Eleršek in sod. (2016), lahko rečemo, da tudi IM sledi predpisankemu okvirju, saj povprečno odstopanje tekom testa (glede na dan 0) ni bilo večje od 20 %. Tega niso mogli potrditi za

ET, kar je skladno z našimi rezultati stabilnosti. ET je že takoj na začetku razpadel na izobarično spojino ET2. V založni raztopini je ta predstavljala 0,3 % in v supernatantih 4 % celokupnega ET. Tekom testa se je ta delež povečal na 58 %, koncentracija ET1 pa se je nasprotno zmanjšala ($ET1+ET2=ET$) (Preglednica 14). Enak trend so opazili tudi v supernatantih algnih kultur, medtem ko ga v kontrolnem mediju OECD (brez celic) niso zaznali. ET2 je tako lahko posledica biotske razgradnje/transformacije z algnimi celicami. Enako lahko predpostavimo tudi v našem primeru za *S. leopoliensis*. Opazimo lahko tudi, da je povprečna začetna koncentracija ET v supernatantih testnih mešanic ~ 50 % nižja kot v založnih raztopinah. Glede na to, predpostavljam, da je prišlo do hitre začetne abiotske razgradnje (npr. fotoliza, ET je za njo dovzeten) ali vezave na cianobakterijske celice, kasneje, tekom testa, pa do razgradnje/transformacije s cianobakterijskimi celicami. Hande (1992) kot klinično problematiko ET navaja ravno njegovo močno lipofilnost in kemijsko nestabilnost. Poleg tega našo domnevo potrjujejo rezultati vzporedno opravljene študije s *P. subcapitata* (Eleršek in sod., 2016), kjer so s kemijsko analizo liofilizirane biomase ugotovili, da v stik s celicami po 72 h pride le od 0,1-0,01 % protirakavih zdravil. Take vrste podatkov za cianobakterije v znanstveni literaturi (še) ni.

Negreira in sod. (2013) so stabilnost 5-FU, IM in ET preverjali v vodi pri 25 °C (tema). Rezultati za 5-FU so bili skladni z rezultati študije Eleršek in sod. (2016) (> 80 % detektiranega, po 24 h), medtem ko je bila stabilnost IM manjša in stabilnost ET večja kot v mediju OECD in supernatantih. Na stabilnost protirakavih zdravil je potem takem lahko vplivala svetloba, mešanje, sestavine medija in prisotnost še drugih protirakavih zdravil v njem.

Da bi dobili bolj zanesljive, statistično značilne rezultate, bi morali analizo izvajati večkrat z več vzorci ter poznati tudi eksperimentalno napako meritev. Tako bi lahko izključili morebitne napake pri odvzemuh, transportu in/ali sami kemijski analizi.

5.5 POSNETKI POVRŠINE CELIC *S. leopoliensis* Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

Posnetki razlik v mikrostrukturi celične površine med kontrolo in testno mešanico EC₁₀ ne razkrivajo (Slika 12). Metodo smo izvajali zaradi opaženih razlik v makrostrukturi (agregiranosti) liofilizirane celične biomase *P. subcapitata* (Eleršek in sod., 2016), kjer razlik v mikrostrukturi celične površine prav tako niso zaznali. Kobližek in sod. (2000) so raziskovali vpliv nekaterih kemikalij na agregacijo celic *Synechococcus elongatus*, ki v naravi praviloma rastejo kot samostojne celice. Kot ključnega sprožilca povečane agregacije navajajo spremenjen tok elektronov v fotosistemu PSI in posledični nastanek reaktivne zvrsti kisika (ROS, angl. reactive oxygen species), superoksidnega radikala (O₂⁻) (Mehlerjeva reakcija). Agregacija se je povečala tudi ob dodatku glutationa, kar po navedbah lahko potrjuje vlogo ROS. Glutation je dobro poznan antioksidant, ki sodeluje pri metabolizmu nekaterih protirakavih zdravil (Deenen in sod., 2011), pa vendar bi bilo nadaljnje sklepanje prenagljeno, saj mehanizmi signaliziranja z glutationom niso popolnoma jasni.

Agregacija fitoplanktona je vsekakor pomemben proces v vodnem okolju, ki narekuje plovnost (iskanje optimalne svetlobe in hrani), tonjenje (kroženje ogljika) in oblikovanje površinske gošče (senčenje in izključitev drugih vrst). V prihodnosti bi bilo vsekakor dobro raziskati to sicer še povsem neraziskano področje vpliva protirakavih zdravil. Predvsem pa se moramo zavedati, da je vodno okolje kompleksna mešanica najrazličnejših aktivnih snovi, ki jih človek s svojim obstojem vsakodnevno (neodgovorno) odvaja v prostor, kjer se prvotno naj ne bi nahajale.

6 SKLEPI

- Inhibicija rasti trikomponentne mešanice 5-FU+IM+ET je bila v celotnem razponu efektivnih koncentracij (EC_5 - EC_{90}) večja od učinka binarne mešanice 5-FU+IM. Od vseh treh posameznih protirakavih zdravil je bil učinek večji pri EC_{20} in EC_{50} , pri ostalih je bil učinek primerljiv z učinkom 5-FU in/ali IM.
- Mešanica 5-FU+IM+ET na cianobakterijo *S.leopoliensis* deluje manj zaviralno (razen pri EC_{90}) kot na zeleno mikroalgo *P. subcapitata*.
- Toksični učinek mešanice 5-FU+IM+ET je bolje primerljiv z napovedjo modela CA in višji od napovednega učinka z modelom IA, razen pri EC_{90} .
- Dodatek netoksičnega ET, ki na rast cianobakterij nima vpliva do koncentracije 351 mg/L, kadar je apliciran individualno, je spremenil antagonistični učinek 5-FU+IM v okrepljen ekotoksikološki učinek mešanice 5-FU+IM+ET, najbolj pri EC_5 in EC_{10} . Raziskava je zato pokazala nujnost izvajanja ekotoksikološkega testiranja mešanic s komponentami, ki samostojno za določen organizem niso toksične.
- Posnetki elektronskega vrstičnega mikroskopa razlik v mikrostrukturi med kontrolno kulturo in testno mešanico EC_{10} ne razkrivajo.
- S kemijsko analizo smo ugotovili, da ET hitro razpade na izobarično spojino, katere koncentracija se je tekom testa še povečala, koncentracija matične spojine pa zmanjšala, kar nakazuje na možnost biotske razgradnje/transformacije s celicami *S. leopoliensis*. Medtem, sta 5-FU in IM tekom testa ostala stabilna.

7 POVZETEK

Protirakava zdravila vplivajo na strukturo in funkcijo DNA bodisi direktno ali nedirektno. Zaradi narave delovanja njihove tarče niso popolnoma specifične. Iz istega vzroka prav tako ni mogoče določiti spodnje varne meje izpostavljenosti. Poleg tega se protirakava zdravila v vodi nahajajo v obliki mešanic, zato je učinke še težje napovedati. Če k temu prištejemo še njihov stalen in nekontroliran dotok v okolje, izpostavitev vsakega organizma lahko predstavlja tveganje.

V naši študiji smo izvedli ekotoksikološki test vpliva mešanice protirakavih zdravil 5-FU+IM+ET na rast cianobakterije *S. leopoliensis*, ki ima pomembno vlogo primarnega producenta. Izbrano mešanico protirakavih zdravil smo testirali, ker se glede na kombinirane kemoterapevtske sheme (5-FU+ET) in visoko stopnjo (5-FU, IM) porabe, lahko pričakuje njihovo skupno prisotnost v vodnem okolju. Inhibicijo rasti smo izvajali v skladu s smernico OECD TG 201 (2011) pri petih EC_X. Ugotovili smo, da je bil učinek (inhibicija rasti) mešanice pri EC₂₀ in EC₅₀ višji od učinka vseh treh posameznih protirakavih zdravil. Pri EC₅, EC₁₀, EC₉₀ pa je bil ta zelo podoben učinku 5-FU in/ali IM. Eksperimentalne inhibicije rasti bolje sledijo napovednemu modelu CA, medtem ko so napovedni učinki z modelom IA podcenjeni, razen pri najvišji EC₉₀. V naši študiji smo potrdili, kar so že pokazali v nekaterih študijah – da na celokupno toksičnost mešanice vplivajo tudi učinkovine, ki same po sebi niso toksične. Učinki mešanice 5-FU+IM+ET so bili čez celoten razpon EC_X večji od binarne mešanice 5-FU+IM. ET je učinek najbolj okreplil pri EC₅ in EC₁₀, kar je še posebej pomembno iz stališča nizkih okoljskih koncentracij protirakavih zdravil. S primerjavo eksperimentalnih inhibicij rasti 5-FU+IM+ET smo ugotovili, da mešanica na cianobakterijo deluje manj zaviralno (razen pri EC₉₀) kot na zeleno mikroalgo *P. subcapitata*. S kemijsko analizo stabilnosti protirakavih zdravil smo odkrili prisotnost izobarične spojine ET, kar nakazuje na biotsko razgradnjo/transformacijo matične učinkovine. O prisotnosti, obstojnosti in toksičnosti metabolnih presnovkov, produktov abiotske in biotske razgradnje/transformacije je znanega zelo malo, kar predstavlja dodaten vidik, ki pripomore h kompleksnosti problema protirakavih zdravil ter njihovih mešanic.

8 VIRI

- Affronti L. F. Jr., Marshall H. G. 1994. Using frequency of dividing cells in estimating autotrophic picoplankton growth and productivity in the Chesapeake Bay. *Hydrobiologia*, 284, 3: 193-203
- Aherne G. W., Brown S. 1999. The role of uracil misincorporation in thymineless death. V: Anticancer drug development guide: antifolate drugs in cancer therapy. Jackman A.L. (ed.). Totowa, Humana Press: 409-421
- Arias J. L., Ruiz M. A., Lopez-Viota M., Delgado A. V. 2008. Poly(alkylcyanoa- crylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids and Surfaces B*, 62, 1: 64-70
- Backhaus T., Altenburger R., Boedeker W., Faust M., Scholze M., Grimme L. H. 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 9: 2348-2356
- Barclay B. J., DeHaan C. L., Hennig U. G., Iavorovska O., von Borstel R. W., von Borstel R. C. 2001. A rapid assay for mitochondrial DNA damage and respiratory chain inhibition in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38, 2-3: 153-158
- Berenbaum M. C. 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *Journal of Theoretical Biology*, 114, 3: 413-431
- Bergmann A., Fohrmann R., Weber F.-A. 2011. Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Dessau-Roßlau, Umweltbundesamt: 16-16
<https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4188.pdf> (10.12.2015)
- Besse J.-P., Latour J.-F., Garric J. 2012. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*, 39, 1: 73-86
- Bliss C.I. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26, 3: 585-615

- Booker V., Halsall C., Llewellyn N., Johnson A., Williams R. 2014. Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Science of the Total Environment*, 473-474: 159-170
- Bouraoui S., Brahem A., Tabka F., Mrizek N., Saad A., Elghezal H. 2011. Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 1: 250-257
- Brezovšek P., Eleršek T., Filipič M. 2014. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Research*, 52: 168-177
- Bromberg K. D., Burgin A. B., Osheroff N. 2003. A two drug model for etoposide action against human topoisomerase IIα. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 9: 7406-7412
- Buchdunger E., Cioffi C. L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B. J., Lydon N. B. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor ST1571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295, 1: 139-145
- Buerge I. J., Buser H.-R., Poiger T., Müller M. D. 2006. Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surfacewater. *Environmental Science and Technology*, 40, 23: 7242-7250
- Burden D. A., Osheroff N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 1-3: 139-154
- Cai X., Woo M. H., Edick M. J., Relling M.V. 1999. Simultaneous quantitation of etoposide and its catechol metabolite in human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 728, 2: 241-250
- Canman C. E., Radany E. H., Parsels L. A., Davis M. A., Lawrence T. S., Maybaum J. 1994. Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumour cells by expression of Escherichia-coli deoxyuridine triphosphatase. *Cancer Research*, 54, 9: 2296-2298
- Champoux J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 369-413

- Chou T. C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58, 3: 621-681
- Chou T. C., Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22: 27-55
- Coleman J. E. 1992. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 21: 441-483
- Commission of the European Communities. 1996. Technical guidance document in support of Commission Directive 93/ 67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II; environmental risk assessment. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities: 328 str.
https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf
(10.12.2015)
- Curtin N. J., Harris A. L., Aherne G. W. 1991. Mechanisms of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2 deoxyuridine 5 triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Research*, 51, 9: 2346-2352
- Deenen M. J., Cats A. 2011. Part 3: pharmacogenetic variability in phase II anticancer drug metabolism. *Oncologist*, 16, 7: 992-1005
- Deininger M. W., Goldman J. M., Melo J. V. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 10: 3343–3356
- Dokulil M. T., Teubner K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438, 1: 1–12
- Eitel A., Scherrer M., Kümmeler K. 2000. Handling cytostatic drugs: a practical guide. Freiburg, Bristol-Myers-Squibb: 42 str.
- Eleršek T. 2012. The advantages of flow cytometry in comparison to fluorometric measurement in algal toxicity test. *Acta Biologica Slovenica*, 55, 2: 3-11
- Eleršek T., Milavec S., Korošec M., Brezovšek P., Negreira N., Zonja B., Lopez de Alda M., Barcelo D., Heath E., Ščančar J., Filipič M. 2016. Toxicity of the mixture of

- selected antineoplastic drugs against aquatic primary producers. Environmental Science and Pollution Research, doi: 10.1007/s11356-015-6005-2: 11 str. (v tisku)
- EMA. 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London, European Medicines Agency: 12 str.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf (10.12.2015)
- Escher B. I., Baumgartner R., Koller M., Treyer K., Lienert J., McArdell C. S. 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. Water Research, 45, 1: 75-92
- Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M., Grimme L. H. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. Aquatic Toxicology, 63, 1: 43-63
- FDA. 1998. Guidance for industry environmental assessment of human drug and biologics applications. Silver Spring, Food and Drug Administration: 39 str.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070561.pdf> (10.12.2015)
- Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology, 76, 2: 122-159
- Ferk F., Mišik M., Grummt T., Majer B., Fuerhacker M., Buchmann C., Vital M., Uhl M., Lenz K., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Knasmüller S. 2009. Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 672, 2: 69-75
- Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D. 2013. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of 10 anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information dependant acquisition tool (IDA) in sewage samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 18: 5937-5952
- Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D. 2014. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. Environmental Pollution, 193: 216-223

- Frederic O., Yves P. 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, 115: 31-39
- Gomez M. J., Martinez Bueno M. J., Lacorte S., Fernandez-Alba A. R., Aguera A. 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66, 6: 993-1002
- Gomez-Canela C., Ventura F., Caixach J., Lacorte S. 2014. Occurrence of cytostatics compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high – resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 16: 3801-3814
- Greco W. R., Bravo G., Parsons J. C. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*, 47, 2: 331-385
- Hagenbuch I. M., Pinckney J. L. 2012. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research*, 46, 16: 5028-5036
- Hande K. R. 1992. Etoposide pharmacology. *Seminars in Oncology*, 19, 6, Suppl. 13: S3-S9
- Hartmann A., Alder A. C., Koller T., Widmer R. M. 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 3: 377-382
- He Y. C., Chen J. W., Cao J., Pan D. Y., Qiao, J. G. 2003. Toxicities and therapeutic effect of 5-fluorouracil controlled release implant on tumor-bearing rats. *World Journal of Gastroenterology*, 9, 8: 1795-1798
- Healey F. P. 1982. Phosphate. V: The biology of cyanobacteria. Carr N.G., Whitton B.A. (eds.). Berkeley, University of California Press: 105-124
- Hignite C., Aznaroff D. L. 1977. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants chlorophenoxyisobutirate and salycilic acid in sewage effluent. *Life Science*, 20, 2: 337-341
- Holtz M. S., Slovak M. L., Zhang F., Sawyers C. L., Forman S. J., Bhatia R. 2002. Imatinib mesylate (ST1571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood*, 99, 10: 3792–3800

- IARC. 2015. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1-112. Lyon, International Agency for Research on Cancer: 34 str.
<https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
(10.12.2015)
- JAZMP. 2015. Veljavna klasifikacija ATC. Ljubljana, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke: 68 str.
http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/ATC_2015.pdf
(10.12.2015)
- Johnson A. C., Jürgens D. M., 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, 1-2: 167-175
- Kantarjian H. M., Talpaz M., Giles F., O'Brien S., Cortes J. 2006. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Annals of Internal Medicine*, 145, 12: 913–923
- Kaplan-Levy R. N., Hadas O., Summers M. L., Rucker J., Sukenik A. 2010. Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. V: Dormancy and resistance in harsh environments. Lubzens E., Cerda J., Clark M.S. (eds.). Berlin-Heidelberg, Springer: 5-27
- Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R. M., Guwy A. J. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42, 13: 3498-3518
- Khetan S. K., Collins T. J. 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Reviews*, 107, 6: 2319-2364
- Kiffmeyer T., Götze H.-J., Jursch M., Lüders U. 1998. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 2: 185-191
- Kobližek M., Komenda J., Masojidek J., Pechar L. 2000. Cell aggregation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: role of electron transport chain. *Journal of Phycology*, 36: 662-668
- Kolpin D. W., Furlong E. T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber L. B., Buxton H. T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater

- contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology, 36, 6: 1202-1211
- Kopjar N., Želježić D., Kašuba V., Rozgaj R. 2010. Antineoplastični lijekovi kao čimbenik rizika u radnom okolišu: mehanizmi djelovanja na razini stanice i pregled metoda za otkrivanje njihovih genotoksičnih učinaka. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, 61: 121-146
- Kortenkamp A., Backhaus T., Faust M. 2009. State of the art report on mixture toxicity-final report, Part 1: The state of the art of mixture toxicology - a critical appraisal of published scientific literature. Brussels, European Commission: 1-42
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf
(16.2.2016)
- Kosjek T., Heath E. 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatics pharmaceuticals in the environment. Trends in Analytical Chemistry, 30, 7: 1065-1087
- Kosjek T., Perko S., Žigon D., Heath E. 2013. Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. Journal of Chromatography A, 1290: 62-72
- Kovacs R., Csenki Z., Bakos K., Urbanyi B., Horvath A., Garaj-Vrhovac V., Gajski G., Gerić M., Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D., Heath E., Kosjek T., Žegura B., Novak M., Zajc I., Baebler Š., Rotter A., Ramšak Ž., Filipič M. 2015. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. Water Research, 77: 201-212
- Kovalova L. 2009. Cytostatics in the aquatic environment: analysis, occurrence, and possibilities for removal. Doctoral Dissertation. Aachen, RWTH Aachen University: 11-12
- Kovalova L., McArdell C. S., Hollender J. 2009. Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216, 7: 1100-1108
- Kümmerer K., Al-Ahmad A., Bertram B., Wiessler M. 2000. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: Influence of glucosidation and of stereochemistry. Chemosphere, 40: 767-773

- Kümmerer K., Al-Ahmad A. 1997. Biodegradability of the anti-tumour agents 5-fluorouracil, cytarabine, and gemcitabine: impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluents. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 25, 4: 166-172
- Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M. 1997. Biodegradability of the antitumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, 31, 11: 2705-2710
- Larsson D. G. J. 2008. Drug production facilities - an overlooked discharge source for pharmaceuticals to the environment. V: Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. Kümmerer K. (ed.). Berlin-Heidelberg, Springer: 37-42
- Lenz K., Koellensperger G., Hann S., Weissenbacher N., Mahnik S. N., Fuerhacker M. 2007. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere*, 69, 11: 1765-1774
- Li W. K. W. 1998. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface waters. *Limnology and Oceanography*, 43, 7: 1745-1753
- Lin A. Y., Lin Y. C., Lee W. N. 2014. Prevalence and sunlight photolysis of controlled and chemotherapeutic drugs in aqueous environments. *Environmental Pollution*, 187: 170-181
- Lin A. Y.-C., Reinhard M. 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 6: 1303-1309
- Liu X., Zhang J., Yin J., Duan H., Wu Y., Shao B. 2010. Analysis of hormone antagonists in clinical and municipal wastewater by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 8: 2977-2985
- Loewe S., Muischnek H. 1926. Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Pharmakologie und experimentelle Pathologie*, 114: 313-326
- Longley D. B., Harkey D. P., Johnston P. G. 2003. 5-fluorouracil: Mechanism of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3, 5: 330-338

- Loos R., Gawlik B. M., Locoro G., Rimaviciute E., Contini S., Bidoglio G. 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157, 2: 561-568
- Ma J. 2005. Differential sensitivity of three cyanobacterial and five green algal species to organotins and pyrethroids pesticides. *Science of the Total Environment*, 341, 1-3: 109-117
- Ma J., Chen J., Wang P., Tong S. 2008. Comparative sensitivity of eight freshwater phytoplankton species to isoprocarb, propargite, flumetralin and propiconazol. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, 4: 525-529
- Ma J., Lu N., Qin W., Xu R., Wang Y., Chen X. 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 2: 268-274
- Magnusson M., Heimann K., Quayle P., Negri A. P. 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 11: 1978-1987
- Mahnik S. N., Lenz K., Weissenbacher N., Mader R. M., Fuerhacker M. 2007. Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere*, 66, 1: 30-37
- Mahnik S. N., Rizovski B., Fuerhacker M., Mader R. M. 2004. Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 1: 31-35
- Martin J., Camacho-Munoz D., Santos J. L., Aparicio I., Alonso E. 2011. Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 34, 22: 3166-3177
- Mater N., Geret F., Castillo L., Faucet-Marquis V., Albasi C., Pfohl-Leszkowicz A. 2014. In vitro tests aiding ecological risk assessment of ciprofloxacin, tamoxifen and cyclophosphamide in range of concentrations released in hospital wastewater and surface water. *Environment International*, 63: 191-200
- Moldovan Z. 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64, 11: 1808-1817

- Mur L. R., Skulberg O. M., Utkilen H. 1999. Cyanobacteria in the environment. V: Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health, consequences, monitoring and management. Chorus I., Bartram J. (eds.). Suffolk, St. Edmundsbury Press: 15-40
- Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D. 2015. Degradation of the cytostatic etoposide in chlorinated water by liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry: Identification and quantification of by-products in real water samples. *Science of the Total Environment*, 505-506: 36-45
- Negreira N., Mastroianni N., Lopez de Alda M., Barcelo D. 2013. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta*, 116: 290-299
- NIOSH. 2004. Preventing occupational exposure to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. Cincinnati, National Institute for Occupational Safety and Health: 1-7
<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-165/pdfs/2004-165.pdf> (10.12.2015)
- Noordhuis P., Holwerda U., Van der Wilt C. L., Van Groeningen C. J., Smid K., Meijer S., Pinedo H. M., Peters G. J. 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of Oncology*, 15, 7: 1025-1032
- Nowell P. C., Hungerford D. A. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132: 1497-1501
- Nussbaumer S., Bonnabry P., Veuthey J.-L., Fleury-Souverain S. 2011. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85, 5: 2265-2289
- O'Connor P. M. 1987. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Journal of Cancer Survivorship*, 29: 151-182
- Obreza A. 2009. Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji. *Farmacevtski vestnik*, 60, 2: 48-60
- Ocvirk J. 2009. Advances in the treatment of metastatic colorectal carcinoma. *Radiology and Oncology*, 43, 1: 1-8
- Oda Y. 1987. Induction of SOS responses in *Escherichia coli* by 5-fluorouracil. *Mutation Research*, 183, 2: 103-108

- OECD TG 201. 2011. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Test No. 201: freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Paris, OECD Publishing: 25 str.
- Oliver R. L., Ganf G. G. 2000. Freshwater blooms. V: The ecology of cyanobacteria. Whitton B.A., Potts M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 149-194
- Paerl H., Valdes L. M., Pinckney J. L., Piehler M. F., Dyble J., Moisander P. H. 2003. Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. BioScience 53, 10: 953-963
- Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Fiumano V., Isidori M. 2014. Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans. Chemosphere, 115: 59-66
- Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Isidori M. 2015. Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. Journal of Hazardous Materials, 286: 573-580
- Pei H., Ma J. 2002. Study on the algal dynamic model for West Lake, Hangzhou. Ecological Modelling, 148, 1: 67-77
- Pichler C., Filipič M., Kundi M., Rainer B., Knasmüller S., Mišik M. 2014. Assessment of genotoxicity and acute toxic effect of the imatinib mesylate in plant bioassays, Chemosphere, 115: 54-58
- Pöch G. 1993. Combined effects of drugs and toxic agents: Modern evaluation in theory and practice. Wien, Springer: 15-38
- Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Luciani F., Zuccato E. 2008. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. Toxicological Sciences, 102, 1: 129-137
- Pui C. H. 1991. Epipodophyllotoxin-related acute myeloid. Lancet, 338, 8777: 1269-1270
- Rak v Sloveniji 2011. 2015. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije: 34 str.
http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2011.pdf
(16.2.2016)
- Rey R. P., Padron A. S., Leon L. G., Pozo M. M., Baluja C. 1999. Ozonation of cytostatics in water medium. Nitrogen bases. Ozone: Science & Engineering, 21, 1: 69-77

- Ribes J., Cleries R., Buxo M., Ameijide A., Valls J., Gispert R. 2008. Predictions of cancer incidence and mortality in Catalonia to 2015 by means of Bayesian models. Proyección de la incidencia y la mortalidad del cáncer en Cataluña hasta el año 2015 mediante un modelo bayesiano. *Medicina Clinica*, 131, 1: 32-41
- Robertson J. D., Enoksson M., Suomela M., Zhivotovsky B., Orrenius S. 2002. Caspase 2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome C release during etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33: 29803-29809
- Ross C., Santiago-Vazquez L., Paul V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 78, 1: 66-73
- Rowley J. D. 1973. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 243: 290-293
- Rubin B. P., Singer S., Tsao C., Duensing A., Lux M. L., Ruiz R., Hibbard M. K., Chen C. J., Xiao S., Tuveson D. A., Demetri G. D., Fletcher C. D., Fletcher J. A. 2001. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research*, 61, 22: 8118-8121
- Rutman R. J., Cantarow A., Paschkis K. E. 1954. Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil- 2-C14 by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Research*, 14, 2: 119-123
- Sander M., Hsieh T. 1983. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 13: 8421-8428
- Santi D. V., Hardy L. W. 1987. Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26, 26: 8599–8606
- Savage D. G., Antman K. H. 2002. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *New England Journal of Medicine*, 346, 9: 683-693
- Sawyers C. L. 1997. Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillière's Clinical Haematology*, 10, 2: 223-231
- Schmaus G., Schierl R., Funck S. 2002. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography–mass spectrometry and voltammetry. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 59, 10: 956-961
- Seira J., Claparols C., Joannis-Cassan C., Albasi C., Montrejaud-Vignoles M., Sablayrolles C. 2013. Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate

- chemometric approach for the determination of anticancer drugs in sludge by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1283: 27–38
- Shapiro J. 1997. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biology*, 37, 2: 307-323
- Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A. 2002. Something from “Nothing” - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science and Technology*, 36, 8: 1751–1756
- Smerhovsky Z., Landa K., Rossner P., Brabec M., Zudova Z., Hola N. 2001. Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environmental Health Perspectives*, 109, 1: 41-45
- Solary E., Bertrand R., Pommier Y. 1994. Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells (Review). *Leukemia & Lymphoma*, 15, 1-2: 21-32
- Sottani C., Porro B., Comelli M., Imbriani M., Minoia C. 2010. An analysis to study trends in occupational exposure to antineoplastic drugs among health care workers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878, 27: 2593-2605
- Stal L. J., Severin I., Bolhuis H. 2010. The ecology of nitrogen fixation in cyanobacterial mats. V: Recent advances in phototrophic prokaryotes. Hallenbeck P.C. (ed.). New York, Springer: 31-45
- Stevens-Garmon J., Drewes J. E., Khan S. J., McDonald J. A., Dickenson E. R. V. 2011. Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. *Water Research*, 45, 11: 3417-3426
- Straub J. O. 2010. Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6, S1: 540-566
- Summons R. E., Jahnke L. L., Hope J. M., Logan G. A. 1999. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature*, 400, 6744: 554-557
- Sumpter J. P., Johnson A. C., Williams R. J., Kortenkamp A., Scholze M. 2006. Modeling effects of mixtures of endocrine disrupting chemicals at the river catchment scale. *Environmental Science and Technology*, 40, 17: 5478-5489

- Tao W., Hangoc G., Hawes J. W., Si Y., Cooper S., Broxmeyer H. E. 2003. Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34+ cells treated with etoposide. *Experimental Hematology*, 31, 3: 251-260
- Tauxe-Wuersch A., De Alencastro L. F., Grandjean D., Tarradellas J. 2006. Trace determination of tamoxifen and 5-fluorouracil in hospital and urban wastewaters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 86, 7: 473-485
- Toolaram A. P., Kümmerer K., Schneider M. 2014. Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: a focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings. *Mutation Research*, 760: 18-35
- Touzin K., Bussieres J. F., Langlois E., Lefebvre M. 2009. Evaluation of surface contamination in a hospital hematology-oncology pharmacy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 15, 1: 53-61
- TOXNET. 2015a. Hazardous substance data bank: 5-fluorouracil. Bethesda, U.S. National Library of Medicines: 31 str.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~dfdLJN:1> (10.12.2015)
- TOXNET. 2015b. Hazardous substance data bank: Etoposide. Bethesda, U.S. National Library of Medicines: 61 str.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~b9f5hl:1> (10.12.2015)
- TOXNET. 2015c. Hazardous substance data bank: Imatinib mesylate. Bethesda, U.S. National Library of Medicines: 12 str.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~q74f6d:1> (10.12.2015)
- van Dolah R., Riekerk G., Bergquist D., Felber J., Chestnut D., Holland A. 2007. Estuarine habitat quality reflects urbanization at large spatial scales in South Carolina's coastal zone. *Science of the Total Environment*, 390, 1: 142-154
- Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barcelo D. 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389, 3-4: 416-428
- Vulliet E., Cren-Olive C. 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159, 10: 2929-2934

- Waterbury J. B., Watson S. W., Valois F. W., Franks D. G. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 214: 71-120
- Yin J., Shao B., Zhang J., Li K. 2010. A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 84, 1: 39-45
- Yu J. T., Bouwer E. J., Coelhan M. 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. Agricultural Water Management, 86, 1-2: 72-80
- Zambetti G. P., Levine A. J. 1993. A comparison of the biological activities of wild type and mutant p53. FASEB Journal, 7, 10: 855-865
- Zhang J., Chang V. W. C., Giannis A., Wang J-Y. 2013. Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: a review. Science of the Total Environment, 445-446: 281-298
- Zounkova R., Kovalova L., Blaha L., Dott W. 2010. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere, 81, 2: 253-260
- 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, 10: 2208-2214
- Žegura B., Štraser A., Filipič M. 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. Mutation Research, 727, 1-2: 16-4

ZAHVALA

Somentorici, dr. Tini Eleršek, se zahvaljujem za vso strokovno pomoč tekom laboratorijskega dela, posredovanje znanje, usmerjanje in popravilo pisnega izdelka.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem Oddelka za gensko toksikologijo in biologijo raka, ki so mi nudili kakršnokoli pomoč in pripomogli k pozitivnemu delovnemu vzdušju.

Mentorici, prof. dr. Darji Žgur – Bertok, se zahvaljujem za prevzem mentorstva in vso pomoč ter možnost opravljanja projektnega in prostovoljnega dela na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov.

Prof. dr. Barbki Jeršek se zahvaljujem za recenzijo dela.

Iskrena hvala tudi družini za vso podporo tekom študija.