

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara MILAVEC

**VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH
ZDRAVIL NA ALGO *Pseudokirchneriella subcapitata***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara MILAVEC

**VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA
ALGO *Pseudokirchneriella subcapitata***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**THE EFFECT OF THE SELECTED ANTI-CANCER DRUGS
MIXTURE ON ALGA *Pseudokirchneriella subcapitata***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze 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. Romano Marinšek Logar, za somentorico dr. Tino Elešek in za recenzentko prof. dr. Majo Čemažar.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentorica: dr. Tina Eleršek

Recenzentka: prof. dr. Maja Čemažar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Tina ELERŠEK
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

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 pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Sara Milavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 615.9:615.277:582.263(043)=163.6
KG enocelične zelene alge/*Pseudokirchneriella subcapitata*/protirakava zdravila/5-fluorouracil/imatinib mezilat/etopozid/toksičnost/test inhibicije rasti/neodvisno delovanje/seštevek koncentracij/vezava protirakavih zdravil/celična biomasa
AV MILAVEC, Sara, dipl. mikrobiol. (UN)
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ELERŠEK, Tina (somentorica)/ČEMAŽAR, Maja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2015
IN VPLIV MEŠANICE IZBRANIH PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA ALGO *Pseudokirchneriella subcapitata*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 55 str., 11 pregl., 16 sl., 124 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Protirakava zdravila so skupina farmacevtskih učinkovin z velikim potencialom za negativen vpliv na netarčne organizme. Zaradi nepopolne razgradnje v postopku čiščenja na čistilnih napravah se pojavljajo v različnih naravnih (vodnih) okoljih, in sicer ne posamično, ampak v obliki kompleksnih mešanic, katerih vpliv na netarčne organizme je zaenkrat zelo slabo preučen. Iz obstoječih študij je razvidno, da je učinek protirakavih zdravil v kombinacijah lahko večji kot le seštevek učinkov posameznih protirakavih zdravil. Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, kakšen je vpliv mešanice treh za kemoterapijo pogosto uporabljenih protirakavih zdravil (5-fluorouracil, imatinib mezilat, etopozid) na enocelično alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Spremljali smo inhibicijo rasti celičnih kultur alge *P. subcapitata* z dodano izbrano mešanico protirakavih zdravil v petih različnih efektivnih koncentracijah (EC). V koncentracijskem območju EC₅-EC₅₀ smo dokazali sinergističen učinek mešanice, pri najvišji EC (EC₉₀) pa je bil učinek antagonističen. Predvidena toksičnost mešanice, izračunana po matematičnih modelih, osnovanih na konceptih neodvisnega delovanja (IA) in seštevek koncentracij (CA), se je razlikovala od eksperimentalno izmerjene. Izbrana napovedna modela sta se izkazala za nezanesljiva. Ugotovili smo tudi, da se testirana protirakava zdravila na in/ali v celično biomaso vežejo v zelo majhnem deležu (0,01-0,1 % od celotne uporabljene količine).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 615.9:615.277:582.263(043)=163.6
- CX single-cell algae/*Pseudokirchneriella subcapitata*/anticancer drugs/5-fluorouracil/
imatinib mesylate/etoposide/toxicity/growth inhibition test/independent action/
concentration addition/anticancer drugs binding/cell biomass
- AU MILAVEC, Sara
- AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ELERŠEK, Tina (co-advisor)/
ČEMAŽAR, Maja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
- PY 2015
- TY THE EFFECT OF THE SELECTED ANTI-CANCER DRUGS MIXTURE ON
ALGA *Pseudokirchneriella subcapitata*
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
- NO XI, 55 p., 11 tab., 16 fig., 124 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Anticancer drugs represent a group of pharmaceutical substances with great potential for a negative impact on non-target organisms. Anticancer drugs can be found in various natural (aquatic) environments as they are not completely removed during cleaning processes at wastewater treatment plants. They are not present as single substances but as complex mixtures the effect of which has been inadequately studied so far. The existing studies show that the effect of anticancer drugs in combinations can be bigger than a simple sum of the single anticancer drug effects. The aim of the thesis was to determine the effect of the mixture consisting of three anticancer drugs which are widely used in chemotherapy (5-fluorouracil, imatinib mesylate, etoposide) on single-cell alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. We monitored growth inhibition in *P. subcapitata* cell cultures with added selected mixture of anticancer drugs in five different effect concentrations (EC). In EC₅-EC₅₀ concentration range the effect of the mixture was shown to be synergistic, and antagonistic in the case of the highest EC (EC₉₀). Predicted toxicity of the mixture, calculated using mathematical model established on concepts of independent action (IA) and concentration addition (CA), differed from experimentally measured toxicity. Selected predictive models proved to be unreliable. We also established that only a small share of selected anticancer drugs binds to cell biomass (0,01-0,1 % of total used quantity).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROTIRAKAVA ZDRAVILA	3
2.1.1 Klasifikacija protirakavih zdravil	3
2.1.2 Opis izbranih protirakavih zdravil	3
2.1.2.1 Fluorouracil	3
2.1.2.2 Imatinib	5
2.1.2.3 Etopozid	6
2.2 OKOLJSKA PROBLEMATIKA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL	7
2.2.1 Farmacevtsko aktivne učinkovine v okolju	7
2.2.2 Protirakava zdravila v okolju	8
2.2.2.1 Vir in pojavnost protirakavih zdravil v okolju	8
2.2.2.2 Usoda protirakavih zdravil v okolju	10
2.2.3 Učinek protirakavih zdravil na netarčne organizme	11
2.2.3.1 Zelena alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	13
2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA	13
2.4 MODELI ZA NAPOVEDOVANJE IN ANALIZO TOKSIČNOSTI MEŠANIC	14
2.4.1 Modela seštevka koncentracij in neodvisnega delovanja	14
2.4.2 Kombinacijski indeks	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Protirakava zdravila	17
3.1.2 Testni organizem	18
3.1.3 Gojišče OECD	18

3.2	METODE	19
3.2.1	Merjenje celične gostote kulture za inokulum	19
3.2.2	Priprava testnih mešanic protirakavih zdravil	20
3.2.3	Testiranje inhibicije rasti	21
3.2.4	Štetje celic s pretočnim citometrom	22
3.2.5	Izračun stopnje in inhibicije rasti	23
3.2.5.1	Stopnja rasti	23
3.2.5.2	Inhibicija rasti	24
3.2.6	Statistična analiza podatkov	24
3.2.7	Izračuna predvidene toksičnosti mešanice	24
3.2.7.1	Model seštevka koncentracij	25
3.2.7.2	Model neodvisnega delovanja	25
3.2.8	Kvantitativna opredelitev interakcij med sestavinami mešanice	25
3.2.9	Opredelitev stabilnosti in analiza vstopa protirakavih zdravil v celice	26
3.2.9.1	Priprava vzorcev za analizo	26
3.2.9.2	Izvedba analize	27
3.2.10	Mikroskopiranje z vrstičnim elektronskim mikroskopom	27
3.2.10.1	Priprava vzorca za elektronsko mikroskopijo	27
4	REZULTATI	28
4.1	UČINEK MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA TARČNI ORGANIZEM	28
4.1.1	Rast testnih kultur	28
4.1.2	Stopnje in inhibicije rasti	30
4.1.3	Rezultati statistične analize	32
4.1.4	Primerjava matematično predvidenih in dejanskih učinkov mešanice	33
4.1.5	Kvantitativna opredelitev interakcij med sestavinami mešanice	35
4.1.5.1	Kombinacijski indeksi	35
4.1.5.2	Razmerja odstopanja modela	35
4.1.6	Vpliv protirakavih zdravil na lastnosti celične površine	36
4.2	STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL	37
4.2.1	Supernatanti celičnih kultur	38
4.2.2	Založne raztopine protirakavih zdravil	38
4.3	VEZAVA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA/V CELIČNO BIOMASO	39
5	RAZPRAVA	39
5.1	VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA RAST	40
5.2	NAPOVEDNA VREDNOST NAPOVEDNIH MODELOV TOKSIČNOSTI	41
5.3	VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA LASTNOSTI CELIČNE POVRŠINE	42
5.4	STABILNOST PROTIRAKAVIH UČINKOVIN	42
5.5	VEZAVA PROTIRAKAVIH UČINKOVIN NA/V CELICE	43

6	SKLEPI	44
7	POVZETEK	45
8	VIRI	46
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Znani toksikološki podatki za izbrana protirakava zdravila.	10
Preglednica 2: Seznam spojin za pripravo založnih raztopin, potrebnih za pripravo gojišča OECD, in končne koncentracije posamezne sestavine v vsaki od založnih raztopin.	19
Preglednica 3: Koncentracija posameznega protirakavega zdravila v izbrani mešanici in skupna koncentracija protirakavih zdravil za vsako učinkovito koncentracijo mešanice.	21
Preglednica 4: Odstotek posameznega protirakavega zdravila v mešanici od skupne koncentracije za vsako učinkovito koncentracijo mešanice.	21
Preglednica 5: Pregled izračunov stopenj rasti alge <i>P. subcapitata</i> za celoten čas inkubacije (72 ur) in inhibicij rasti za vse učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).	31
Preglednica 6: Učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil, izračunane oz. opredeljene na podlagi eksperimentalnih podatkov in statistične analize, in napovedane po dveh napovednih modelih.	34
Preglednica 7: Kombinacijski indeksi za vse učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za algo <i>P. subcapitata</i> .	35
Preglednica 8: Razmerja odstopanja modela, izračunana glede na napovedi po dveh napovednih modelih, za vse učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za algo <i>P. subcapitata</i> .	36
Preglednica 9: Pričakovane in izmerjene koncentracije posameznih protirakavih zdravil na začetku in koncu testa (t_0 in t_3) za obe učinkoviti koncentraciji, izračunana odstopanja od pričakovanih vrednosti in razlike med koncentracijami na začetku in koncu testa.	38
Preglednica 10: Primerjava med predvidnimi in s kemijsko analizo ugotovljenimi koncentracijami posameznih protirakavih zdravil v založnih raztopinah.	39
Preglednica 11: Izračunana masa vsakega od protirakavih zdravil na gram končne liofilizirane biomase na začetku in koncu testa (t_0 in t_3) ter odstotek od celotne porabljene mase protirakavih zdravil, ki ga predstavlja količina, prisotna ob času t_3 (v in/ali na celicah).	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska zgradba fluorouracila; ime po IUPAC: 5-fluoro-1H-pirimidin-2,4-dion (ChEBI, 2014)	4
Slika 2: Kemijska zgradba imatiniba; ime po IUPAC: 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-{4-metil-3-[4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il]amino}fenil}benzamid (ChEBI, 2014)	5
Slika 3: Kemijska zgradba etopozida; ime po IUPAC: 4'-demetilepipodofilotoksin 9-(4,6-O-(R)-etilidene-beta-D-glukopiranozid) (ChEBI, 2014)	6
Slika 4: Celice alge <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	13
Slika 5: Shematski prikaz pretočnega citometra (Brown in Wittwer, 2000)	14
Slika 6: Hodogram poskusov	17
Slika 7: Števena komora (Veranič in sod., 2003)	20
Slika 8: Shematski prikaz mreže števne komore Bürker Türk	20
Slika 9: Primera točkovnih histogramov pretočnega citometra za alga <i>P. subcapitata</i> (levo zgoraj = uporabljen laserski senzor FL3 (okvir R1); levo spodaj = uporabljen laserski senzor FL4 (okvir R2) in primera spektrov fluorescence za alga <i>P. subcapitata</i> (desno zgoraj = uporabljen laserski senzor FL3; desno spodaj = uporabljen laserski senzor FL4, M1 = interval štetja).	23
Slika 10: Rastne krivulje testnih kultur alge <i>P. subcapitata</i> za vse učinkovne koncentracije (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC oz. kontrole (a, b, c) in štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).	29
Slika 11: Odvisnost celične gostote testnih kultur alge <i>P. subcapitata</i> od učinkovne koncentracije (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC oz. kontrole (a, b, c), vse meritvene točke in štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).	30
Slika 12: Inhibicija rasti alge <i>P. subcapitata</i> pri vseh učinkovnih koncentracijah (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC (a, b, c) in vse štiri ponovitve testa (A, B, C, D).	31
Slika 13: Učinek posameznih protirakavih zdravil in njihovih mešanic na rastno inhibicijo alge <i>P. subcapitata</i> . Prikazani sta tudi napovedi po dveh napovednih modelih.	33
Slika 14: Shematski prikaz primerjave dejanskih učinkov mešanic protirakavih zdravil na inhibicijo rasti alge <i>P. subcapitata</i> z napovedanimi po dveh napovednih modelih, od leve proti desni za vseh pet učinkovnih koncentracij (EC ₅ -EC ₉₀).	34
Slika 15: Makrostruktura liofilizirane biomase alge <i>P. subcapitata</i>	36
Slika 16: Mikrostruktura liofilizirane biomase alge <i>P. subcapitata</i> (posnetki z vrstičnim elektronskim mikroskopom; belo merilo zgornjih slik predstavlja 10 µm, spodnjih pa 1 µm).	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat (ang. Adenosine triphosphate)
CA	model seštevka koncentracij (ang. Concentration addition)
CDDP	cisplatin
CI	kombinacijski indeks (ang. Combination index)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EC	efektivna koncentracija (ang. Effective concentration)
ET	etopozid
FDA	Zvezni urad za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
FSC	fotodetektor iz smeri vira vpadne svetlobe (ang. Forward Scatter)
FU	5-fluorouracil
IA	model neodvisnega delovanja (ang. Independent action)
IM	imatinib mezilat
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)
KV	koeficient variacije
MEE	enačba za srednji učinek (ang. Median-effect equation)
MDR	razmerje odstopanja modela (ang. Model deviation ratio)
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (ang. Organisation for Economic Co-operation and Development)
RNK	ribonukleinska kislina
SEM	vrstični elektronski mikroskop (ang. Scanning electron microscope)
SD	standardni odklon (ang. Standard deviation)
SSC	fotodetektor pravokotno na vir vpadne svetlobe (ang. Side Scatter)

SLOVARČEK

citotoksičen (dejavnik)	dejavnik, ki je strupen za celice
efektivna koncentracija	koncentracija v mediju raztopljene testne učinkovine, ki povzroči x % zmanjšanje rasti testnega organizma v določenem času izpostavitve (npr. EC ₅₀ povzroči učinek, ki je natanko na sredini med največjim in najmanjšim možnim v določenem času)
evkariont	organizem, zgrajen iz evkariontskih celic (v grobem rastline, živali, glive, praživali, alge) = celic z jedrom idr. značilnostmi, ki jih ločujejo od prokariontskih celic (ciano)bakterij in arhej
fotoliza	kemijska reakcija, pri kateri pride do razbitja molekule zaradi vpliva fotonov
genotoksičen (dejavnik)	dejavnik, ki povzroči spremembo genske informacije (če se ta sprememba ohrani, govorimo o mutagenem delovanju)
karcinogen (dejavnik)	dejavnik, ki povzroči rakasto obolenje (izzove mutacijo ali pa spremeni izražanje genov brez poseganja v strukturo DNK)
klastogen (dejavnik)	mutagen dejavnik, ki povzroči spremembe kromosomov
liofilizacija	dehidracija z zamrzovanjem in nato znižanjem tlaka do te mere, da voda sublimira iz materiala
metabolit	produkt v procesu metabolizma (presnove)
ozonacija	proces uvajanja ozona v vodo (npr. z namenom dezinfekcije)
primarni producent	organizem, ki proizvaja organski material (biomaso) iz anorganskega materiala
supernatant	tekočina nad materialom, ki je sedimentiral (zaradi precipitacije, centrifugiranja, usedanja)
teratogen (dejavnik)	dejavnik, ki povzroča strukturne, funkcijske, presnovne in vedenjske nepravilnosti pri zarodku

1 UVOD

Protirakava zdravila so učinkovine, ki jih uporabljajo za sistemsko zdravljenje rakavih obolenj. Po načinu delovanja se med seboj razlikujejo - nekatera odstranijo rakave celice preko vpliva na genski material, druga delujejo na celične encime ali aktivirajo imunski odziv. Mnoga protirakava zdravila delujejo neselektivno, kar pomeni, da so poleg tarčnih rakavih celic za njihov vpliv dovzetne tudi netarčne, zdrave celice. To vodi v številne nezaželene stranske učinke zdravljenja, med katere spadajo tudi mutagenost, kancerogenost in teratogenost (Chabner in Longo, 2001; Schimmer in Tannock, 2013). Za zdravljenje jih večinoma uporabljajo v kombinacijah, saj s tem povečajo uspešnost terapije (Chen, 2013; Kurkjian in Kummar, 2009; Ocvirk, 2009).

Poraba protirakavih zdravil se zaradi naraščajočega števila rakavih bolnikov povečuje, vendar je količinsko še vedno relativno majhna v primerjavi s porabo zdravil iz drugih skupin (Kovalova, 2009). To pa še ne pomeni, da so z okoljskega vidika neproblematična skupina farmacevtskih učinkovin. Vsaj nekateri imajo namreč lahko toksičen učinek že v majhnih koncentracijah (Johnson in sod., 2008). Še toliko bolj pa lahko pride njihov vpliv do izraza v primeru, ko delujejo v kombinacijah (Altenburger in Greco, 2009; Brezovšek in sod., 2014; Faust in sod., 2001; Silva in sod., 2002), kar se v naravnem okolju dogaja neprestano. Iz bolnikov, zdravljenih s kemoterapijo, se v odpadne vode (bolnišnične in gospodinjne) namreč kontinuirano izločajo različna protirakava zdravila in njihovi metaboliti, zaradi nepopolnega odstranjevanja med postopkom čiščenja na čistilnih napravah pa posledično v obliki kompleksnih mešanic (njihovih metabolitov in transformacijskih produktov ter drugih snovi) prehajajo v vodna telesa (Kümmerer in sod., 1997; Mahnik in sod., 2007; Yin in sod. 2010). Med vire onesnaženja spadajo tudi izpusti iz farmacevtskih proizvodnih obratov ipd., vendar je glavnina povezana z bolniki na kemoterapiji (Besse in sod., 2012; Mahnik in sod., 2007). Različni organizmi v okolju so posledično stalno izpostavljeni kompleksnim mešanicam protirakavih in drugih farmacevtskih učinkovin, katerih kemijska sestava in učinki so izredno slabo preučeni, še posebno kronični, zato je težko oceniti okoljsko tveganje, ki ga protirakava zdravila predstavljajo. Glede na njihov način delovanja (npr. nespecifičen vpliv na genski material) lahko predvidevamo, da imajo potencial za škodljiv vpliv vsaj na večino evkariontskih organizmov (Besse in sod., 2012; Fent in sod., 2006; Johnson in sod., 2008; Kümmerer in al-Ahmad, 2010), npr. tudi na enocelične alge. Le te kot ene od dominantnih primarnih producentov igrajo ključno ekološko vlogo v večini vodnih ekosistemov (Pfleeger in sod., 1991; Lewis, 1995), zato se vsak vpliv na njihove združbe odrazi na višjih trofičnih nivojih. Neravnovesje med populacijami alg in cianobakterij zaradi različne dovzetnosti za delovanje protirakavih zdravil (Pei in Ma, 2002) pa lahko vodi tudi v druge nezaželene pojave kot npr. v pretirano razrast cianobakterij v celinskih vodah (Ma in sod., 2008), ki ima prav tako negativne posledice (cianobakterijski toksini) za višje organizme in ljudi (Žegura in sod., 2011).

1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Cilj magistrske naloge je bil ugotoviti, kakšen učinek ima mešanica treh izbranih protirakavih zdravil na primarnega producenta, algo *Pseudokirchneriella subcapitata* (*P. subcapitata*), in ga primerjati z učinkom, ki ga povzročijo izbrane učinkovine, če so dodane kulturi te alge posamezno ali v dvojicah. Eksperimentalno izmerjeno toksičnost mešanice smo primerjali s toksičnostjo, ki smo jo izračunali po matematičnih modelih za napovedovanje toksičnega učinka mešanic. Poleg tega smo želeli ugotoviti, v kakšni meri se izbrana protirakava zdravila vežejo na ali v celice izbranega testnega organizma.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze magistrske naloge so bile:

- mešanica treh izbranih protirakavih zdravil ima na algo *P. subcapitata* bolj toksičen učinek kot njene posamezne sestavine pri enakih efektivnih koncentracijah,
- matematični modeli za izračun predvidene toksičnosti mešanic niso uporabna metoda za napovedovanje učinka mešanic (antagonističen, aditiven, sinergističen),
- vezava citostatikov na oz. v algne celice je zanemarljiva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTIRAKAVA ZDRAVILA

2.1.1 Klasifikacija protirakavih zdravil

Protirakava zdravila so skupina zdravil, ki po Anatomsko-terapevtsko-kemičnem klasifikacijskem sistemu (ATC ang. Anatomical Therapeutic Chemical Classification System) spadajo v razred L01 (Zdravila z delovanjem na novotvorbe) (WHOCC, 2013). Na podlagi kemijske zgradbe in mehanizma delovanja jih delimo na dve večji skupini: citotoksike in citostatike (Besse in sod., 2012).

(I) Citotoksiki neposredno ali posredno vplivajo na DNK oz. RNK. (preprečujejo prepis ali podvojevanje DNK, lomijo enoverižno DNK, povzročijo nastanek lažne RNA ipd.; blokirajo encime, potrebne za sintezo DNK, preprečujejo razhajanje kromosomov ipd.). S svojim delovanjem povzročijo metabolne in morfološke spremembe celice, ki vodijo v njeno smrt.

(II) Citostatiki, za razliko od citotoksikov, ne vplivajo na nukleinske kisline, a imajo na celico enak učinek. Delimo jih na inhibitorje proteinskih kinaz (encimov, ki sodelujejo pri regulaciji večine celičnih poti) in monoklonska protitelesa. S svojim delovanjem npr. blokirajo celične rastne faktorje in s tem neposredno vplivajo na celično rast, ali pa npr. aktivirajo citotoksične celice (makrofage, monocite), ki posredno pripomorejo k odstranitvi rakavih celic.

Velika večina protirakavih zdravil deluje neselektivno, torej na vse rastoče celice in ne izključno na rakave, zaradi česar prihaja pri zdravljenju z njimi do številnih nezaželenih stranskih učinkov. Mnoga med njimi so genotoksična, mutagena, karcinogena, citotoksična, ali teratogena (Chabner in Longo, 2001; Schimmer in Tannock, 2013; Zounkova in sod., 2007).

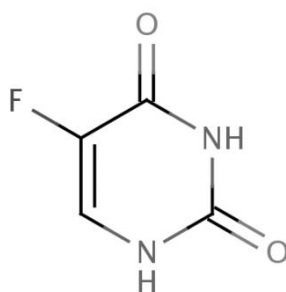
2.1.2 Opis izbranih protirakavih zdravil

2.1.2.1 Fluorouracil

Fluorouracil (FU; sinonimi: 5-fluorouracil, 5-FU, NSC-19893) je citotoksik, ki ga je kot protirakavo učinkovino razvil in patentiral Charles Heidelberger leta 1957 (Chu, 2007), v široki uporabi za zdravljenje številnih vrst raka pa je še danes. Kot antimetabolit spada v ATC skupino L01B, natančneje v podskupino pirimidinskih analogov (L01BC; oznaka L01BC02) (WHOCC, 2013).

Po zgradbi je analog pirimidina uracila (Slika 1) in deluje kot pirimidinski antagonist. Možni so trije mehanizmi delovanja (BC Cancer Agency, 2012):

- fluorouracilov metabolit fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) z uracilom tekmuje za vezavo s timidilat sintetazo (TS) in kofaktorjem folatom. Posledica tega je zmanjšana produkcija timidina in s tem okrnjena sinteza DNK in njeno popravljanje, kar v končni fazi omeji celično delitev.
- fluorouracilov metabolit fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) se vključi v DNK in s tem ovira njeno podvojevanje.
- fluorouracilov metabolit fluorouridin-5-trifosfat (FUTP) se vključi v RNA namesto uridin trifosfata (UTP), kar vodi v nastanek lažne RNA, ovirano procesiranje RNA ter posledično ovirano sintezo proteinov.



Slika 1: Kemijska zgradba fluorouracila; ime po IUPAC: 5-fluoro-1H-pirimidin-2,4-dion (ChEBI, 2014)

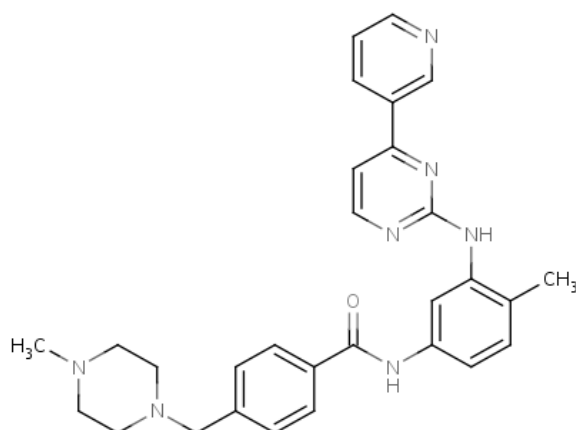
Fluorouracil primarno uporabljajo za zdravljenje raka debelega črevesa in danke, mehurja, dojke, želodca, glave, vratu, jajčnikov, trebušne slinavke in prostate, pa tudi za zdravljenje Bowenove bolezni (kožni rak), raka nožnice, požiralnika in ledvic (BC Cancer Agency, 2012). Uporaba je lahko parenteralna (vnos v žilo ali trebušno votlino; komercialno ime Adrucil®) ali topikalna (nanos na kožo v obliki kreme; komercialno ime Efudex® cream.) (BC Cancer Agency, 2012). Biološka razpoložljivost je 28-100 % (BC Cancer Agency, 2012). Po aktivaciji fluorouracila v celicah nastanejo trije aktivni metaboliti (FdUMP, FdUTP, FUTP) in neaktiven metabolit dihidrifluorouracil (BC Cancer Agency, 2012). Nespremenjen fluorouracil in njegovi metaboliti se v 80 % razgradijo v jetrih (Chabner in Longo, 2001) in iz telesa v 60-80 % izločijo v obliki CO₂ preko dihal ter v 2-3 % preko biliarnega sistema (z žolčem in nato blatom) (BC Cancer Agency, 2012), <10 % intaktnega fluorouracila pa se izloči z urinom (Chabner in Longo, 2001).

Stranski učinki zdravljenja s fluorouracilom so številni, med klinično pomembnejše spadajo kardiotsičnost, blage do močne bolečine v prsih, (huda) driska, stomatitis in palmarno-plantarna eritrodizestezija (PPE), dokazano pa je njegovo delovanje tudi mutageno (v primeru nekaterih bakterijskih sevov; klastogenost je bila pri sesalcih dokazana z *in vitro* in *in vivo* kromosomskimi testi (BC Cancer Agency, 2012)) in potencialno teratogeno. V registru Zveznega urada za hrano in zdravila (FDA ang. Food and Drug Administration) spada v nosečnostno kategorijo D (BC Cancer Agency, 2012), kar pomeni, da obstajajo

dokazi škodljivosti za plod, vendar potencialna korist za nosečnico v določenih primerih tveganje lahko upraviči.

2.1.2.2 Imatinib

Imatinib (IM; sinonim: imatinib mezilat, STI-571) je citostatična protirakava učinkovina, ki jo je konec devetdesetih let preteklega stoletja razvila raziskovalna skupina pod vodstvom biokemika Nicholasa Lydona, patentiran je bil leta 1996. Po klasifikaciji ATC spada v skupino L01XE (inhibitorji proteinskih kinaz; oznaka L01XE01) (WHOCC, 2013). Deluje kot inhibitor tirozinske kinaze BCR-ABL, fuzijskega proteina, ki nastane zaradi kromosomske abnormalnosti, imenovane kromosom Philadelphia (Ph). Ta je značilna za večino kroničnih mieloičnih levkemij (KML), za zdravljenje katerih se imatinib primarno uporablja (BC Cancer Agency, 2007), z njim pa zdravijo tudi akutno limfoblastno levkemijo s prisotnim kromosomom Philadelphia (Ph+ ALL) (Wassmann in sod., 2003). Kemijska zgradba molekule imatiniba je prikazana na Sliki 2.



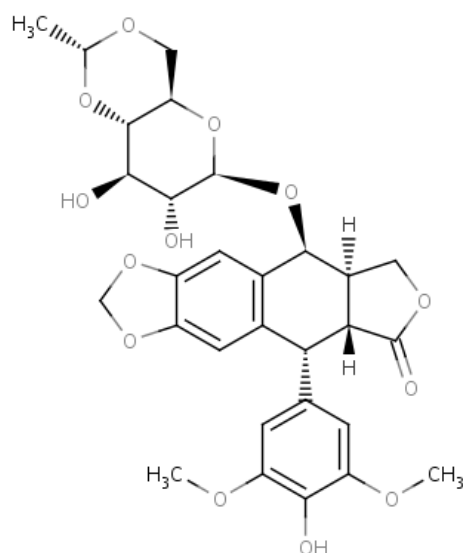
Slika 2: Kemijska zgradba imatiniba; ime po IUPAC: 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-{4-metil-3-[[4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il]amino]fenil}benzamid (ChEBI, 2014)

Tirozin kinaze so encimi, ki katalizirajo prenos fosfatne skupine (fosforilacija) iz adenozin trifosfata (ATP) na tirozinske ostanke proteina. Fosforilacija ima pomembno vlogo v mehanizmu znotrajceličnega prenosa signalov in pri regulaciji procesov celične difrenciacije, rasti in smrti (Hanks in sod., 1988). Imatinib z ATP tekmuje za vezavno mesto s tirozinsko kinazo BCR-ABL, kar vodi v inhibicijo fosforilacije proteinov, vključenih v prenos signalov z BCR-ABL. Celice, ki izražajo BCR-ABL, imajo tako ovirano rast ali apoptozo, s čimer je preprečena nekontrolirana delitev tumorskih celic, delovanje normalnih celic pa naj bi bilo neovirano (BC Cancer Agency, 2007). Imatinib poleg BCR-ABL inhibira tudi tirozin kinaze PDGF-R (receptor za rastni faktor trombocitov) in tirozin kinaze Kit (receptor za rastni faktor matičnih celic). Slednje so povezane z razvojem gastrointestinalnih stromalnih tumorjev (GIST), zato imatinib uporabljajo tudi za zdravljenje le teh (Joensuu in sod., 2001).

Komercialno ime za imatinib je Gleevec® oz. Glivec® in je na voljo v obliki kapsul ali tablet, uporaba zdravila je torej oralna. Biodostopnost učinkovine je 98 %. Aktivni metabolit imatiniba se imenuje N-desmethyl derivative (CGP 74588) (Ford, 2000), neaktivni metaboliti niso znani. Presnovi se v jetrih in se iz organizma izloči z urinom (13 %) in blatom (68 %). Kljub načeloma specifičnemu delovanju so znani številni stranski učinki zdravljenja z imatinibom, med katerimi so klinično pomembnejši slabokrvnost, nenormalno znižanje števila nevtofilcev in trombocitov, edem, povišana raven bilirubina in jetrnih encimov ALT, AST in alkalne fosfataze (BC Cancer Agency, 2007). Študije na živalih so pokazale karcinogen učinek (Dorval, 2006) in zmanjšano plodnost (East Hanover, 2006). Pri sesalcih se je z *in vitro* kromosomskimi testi izkazal za klastogenega (East Hanover, 2006). Je potencialno teratogen in v registru FDA uvrščen v nosečnostno kategorijo D (razloženo pod točko 2.1.2.1.) (East Hanover, 2006).

2.1.2.3 Etopozid

Etopozid (ET; sinonim: VP-16) je citotoksična protirakava učinkovina, ki po klasifikaciji ATC spada v skupino L01C (rastlinski alkaloidi in drugi naravni produkti) in podskupino L01CB (derivati podofilotoksina; oznaka L01CB01) (WHOCC, 2013). Je umetni derivat naravne učinkovine podofilotoksina. Ta se nahaja v koreninah in korenikah rastlin rodu *Podophyllum* (Xu in sod., 2009) in se že stoletja uporablja v ljudskem zdravstvu (Hande, 1998). V petdesetih letih 20. stoletja se je začelo iskanje bolj učinkovitega derivata, kar je privedlo do razvoja novega razreda protirakavih učinkovin, ki delujejo na topoizomerozo II (Hande, 1998). Prvič so etopozid (epipodofilotoksin) sintetizirali leta 1966, s strani FDA pa je bila njegova uporaba odobrena leta 1983 (Hande, 1998). Kemijska zgradba etopozida je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Kemijska zgradba etopozida; ime po IUPAC: 4'-Demetilepipodofilotoksin 9-(4,6-O-(R)-etilidene-beta-D-glukopiranozid) (ChEBI, 2014)

Topoizomeraze so encimi, ki regulirajo navoj DNK tako, da katalizirajo prekinitev in ponovno tvorbo fosfodiesterskih vezi. Topoizomeraza II cepi obe verigi DNK, nato DNK verigo ob konformacijski spremembi potegne skozi nastali prekinitev in nazadnje poveže skupaj proste konce. V DNK tako vnese dva dodatna supernavoja (Champoux, 2001). Etopozid onemogoča funkcijo topoizomeraze II s tem, da ji prepreči povezovanje prostih koncev DNK, DNK verige zato razpadejo, kar vodi v celično smrt (Hande, 1998; Pommier in sod., 2010).

Za zdravljenje je na voljo v obliki za oralno (komercialno ime Vepesid®) in parenteralno uporabo (komercialno ime Etopophos®). Po vnosu v organizem se v aktivne (in neaktivne) metabolite biotransformira v jetrih, izloči pa se z urinom (44-60 %, 67 % v nespremenjeni obliki) in blatom (do 16 %, nespremenjen in njegovi metaboliti) (BC Cancer Agency, 2013). Etopozid primarno uporabljajo za zdravljenje raka mehurja, vratu, glave, nožnice, jajčnikov, prostate, mod in pljuč, možganskih tumorjev in limfoma, pa tudi za zdravljenje hepatoma, Ewingovega in z AIDS povezanega Kaposijevega sarkoma, akutne limfocitne in mielocitne levkemije, neuroblastoma, rabdomiosarkoma in Wilmovega tumorja (McEvoy, 2004; Bristol-Myers Squibb, 2008). Med klinično pomembne stranske učinke zdravljenja z etopozidom spadajo preobčutljivostna reakcija med ali takoj po vnosu, supresija delovanja kostnega mozga, izčrpanost, izguba las in dlak, zaprtje, driska, anoreksija, slabost in bruhanje, vnetje ust in ustnic, spremenjeno okušanje, vnetje sluznic in akutna levkemija (BC Cancer Agency, 2013). Etopozid je potencialno karcinogen (rak epitelnih celic) (McEvoy, 2006) in mutagen (dokazano v *in vitro* testih mutacij pri sesalcih in z Amesovim testom; klastogenost pri sesalcih dokazana z *in vitro* in *in vivo* testi). V registru FDA je uvrščen v nosečnostno kategorijo D (razloženo pod točko 2.1.2.1.). Ker se izloča tudi z mlekom, ženske na terapiji ne bi smele dojiti (Bristol-Myers Squibb, 2008).

2.2 OKOLJSKA PROBLEMATIKA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

2.2.1 Farmacevtsko aktivne učinkovine v okolju

V številnih državah po svetu so rezultati študij dokazali prisotnost mnogih različnih farmacevtsko aktivnih učinkovin v odpadnih, površinskih in podtalnih vodah, zasledili pa so jih tudi že v pitni vodi (Heberer, 2002). Farmacevtsko aktivne učinkovine se v okolju ne pojavljajo same, temveč v obliki kompleksnih mešanic večih sestavin (Gomez in sod., 2007; Kasprzyk-Hordern in sod., 2008; Kolpin in sod., 2002; Moldovan, 2006; Vulliet in Cren-Olive, 2011). Iz znanstvenih raziskav o toksikologiji oziroma ekotoksikologiji kemijskih mešanic je razvidno, da je njihov skupni učinek pogosto večji od le seštevka učinkov vsake sestavine te iste mešanice, uporabljene posamezno, ne glede na kemijsko sestavo mešanice, izpostavljen organizem ali tarčno mesto delovanja posameznih sestavin (Kortenkamp in sod., 2009). Do jasnega ekotoksičnega učinka posamezne spojine večinoma privedejo šele v mnogo višjih koncentracijah, kot jih lahko pričakujemo v okolju (Han in sod., 2006; Miede in sod., 2006; Wilson in sod., 2004). Vendar pa so v različnih

študijah dokazali, da je lahko mešanica signifikantno toksična tudi v primeru, ko so vse sestavine zmesi prisotne v koncentracijah, ki uporabljene posamezno povzročijo zanemarljiv toksičen učinek (Altenburger in Greco, 2009; Faust in sod., 2001; Hass in sod., 2007; Kortenkamp in sod., 2007; Rajapakse in sod., 2002; Silva in sod., 2002). Zaradi trenutno prevladujočih študij toksičnosti posameznih učinkovin je potencialna nevarnost, ki jo farmacevtsko aktivne učinkovine predstavljajo za okolje, tako mnogokrat podcenjena.

2.2.2 Protirakava zdravila v okolju

2.2.2.1 Vir in pojavnost protirakavih zdravil v okolju

Pomembno skupino za okolje nevarnih farmacevtskih učinkovin predstavljajo protirakava zdravila, ki so potencialno citotoksična, genotoksična, mutagena in teratogena (Chabner in Longo, 2001; Schimmer in Tannock, 2013; Zounkova in sod., 2007). Po kemoterapiji se v določeni meri izločijo iz telesa bolnika (z blatom, urinom in drugimi telesnimi tekočinami). Z odpadno vodo bodisi nespremenjena bodisi v obliki aktivnih in/ali neaktivnih metabolitov, ki so lahko prav tako toksični (Kiffmeyer in sod., 1998), ter transformacijskih produktov vstopajo v okolje. Vir onesnaženja z njimi so npr. odpadne vode iz bolnišnic in emisije iz proizvodnih obratov, pomemben vir pa postajajo tudi odplake iz gospodinjstev (Besse in sod., 2012; Buerge in sod., 2006). Številni bolniki namreč jemljejo zdravila doma ali pa odidejo domov po prejetju odmerka zdravila v bolnišnici. Slednji okvirno predstavljajo kar 75 % vseh bolnikov na kemoterapiji, njihovo število pa še narašča (Johnson in sod., 2008; Lenz in sod., 2007). Izločene protirakave učinkovine in njihovi metaboliti se tako znajdejo v bolnišničnih in javnih čistilnih napravah (Kiffmeyer in sod., 1998).

Zdravljenje samo s posameznimi protirakavimi zdravili se je izkazalo za manj učinkovito, saj so v visokih koncentracijah zelo toksični, poleg tega pa se rakave celice in njihova dovzetnost med seboj razlikujejo (Ganta in Amiji, 2009; Lambert in sod., 2008; Nabholz in Riva, 2001; Piccart-Gebhart in sod., 2008). Kemoterapija je običajno najuspešnejša v primeru uporabe protirakavih zdravil v kombinacijah (Chen, 2013; Kurkjian in Kummar, 2009; Ocvirk, 2009). Posledično se le ta v različnih kombinacijah najpogosteje izločajo tudi v okolje.

V večini obstoječih študij so se osredotočili na merjenje vsebnosti protirakavih učinkovin v odpadni vodi iz bolnišnic. Količine v teh vzorcih so znotraj kratkih časovnih obdobij (teden dni) močno spremenljive, od nekaj ng L^{-1} do nekaj $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kümmerer, 2001), zato lahko sklepamo, da so količinsko spremenljive tudi emisije v okolje. Poleg bolnišničnih odplak (Kümmerer in sod., 1997; Steger-Hartmann in sod., 1996; Tauxe-Wuersch in sod., 2006; van Heijnsbergen in Schmitt, 2008) so jih zaznali še v:

- odpadnih vodah pred vstopom v čistilno napravo (van Heijnsbergen in Schmitt, 2008; Kümmerer in sod., 1997),

- v vodah po izstopu iz čistilne naprave (van Heijnsbergen in Schmitt, 2008; Kümmerer in sod., 1997; Kümmerer in sod., 2000; Ternes, 1998),
- v različnih okoljskih vzorcih, vključno s površinskimi vodami (Aherne in sod., 1990; Buerge in sod., 2006; Coetsier in sod., 2009; Halling-Sørensen in sod., 1998; Martin in sod., 2011; Moldovan, 2006; Valcárcel in sod., 2011; Yin in sod. 2010; Zuccato in sod., 2000).

Vse to nakazuje, da se med čiščenjem iz vode ne odstranijo (v celoti). Iz tega sledi, da se kontinuirano in nekontrolirano sproščajo v naravno vodno okolje. V primeru da dosežejo pitno ali rekreacijsko vodo, bi bilo lahko nevarnosti neposredno izpostavljeno tudi zdravje ljudi.

Poraba protirakavih zdravil je v primerjavi s farmacevtskimi učinkovinami iz drugih skupin količinsko nizka. Globalno je najpogosteje uporabljan FU, sledijo mu gemcitabin, ifosfamid, ciklofosfamid in metotreksat (Kovalova, 2009). V Franciji sta se leta 2008 v skupino štirih najpogosteje uporabljanih zdravil proti raku uvrstila FU in IM (3. in 4. mesto s skupno porabljenom maso 1733,20 kg oz. 873,90 kg), relativno visoko na lestvici pa je bil tudi ET (41,11 kg, kar pomeni 29. mesto od skupno 91 obravnavanih protirakavih zdravil) (Besse in sod., 2012). Nekoliko nižje so bile vrednosti v severozahodni Anglije (za leta 2010-2012: povprečno 22,99 kg leto⁻¹ za FU, 20,40 kg leto⁻¹ za IM in 1,23 kg leto⁻¹ za ET) (Booker in sod., 2014). V okolju se protirakava zdravila večinoma pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah (ng L⁻¹ in manj), ki pa že lahko zadoščajo za toksičen učinek na organizme (Johnson in sod., 2008). Prav nizke koncentracije so eden od verjetnih razlogov za slabo poznavanje njihove razširjenosti v okolju, saj so šele nedavno razviti napredni analitični instrumenti omogočili njihovo zaznavanje (Kosjek in Heath, 2011; Negreira in sod., 2013).

Učinkovine lahko, ko govorimo o njihovem vplivu na vodne organizme, po EU direktivi 93/67/EEC (Commission of the European Communities, 1996) razvrstimo v tri skupine glede na njihovo efektivno koncentracijo (EC ang. Effective concentration):

- zelo toksične (EC₅₀ <1 mg L⁻¹)
- toksične (EC₅₀ = 1-10 mg L⁻¹)
- škodljive (EC₅₀ = 10-100 mg L⁻¹)

Na podlagi EC₅₀, ki so jih opredelili Brezovšek in sod. (2014), se FU uvršča med zelo toksične za *P. subcapitata* oz. med toksične za *Synechococcus leopoliensis*, IM med toksične (za *P. subcapitata* in *S. leopoliensis*), ET pa med škodljive učinkovine (za *P. subcapitata* in *S. leopoliensis*) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Znani toksikološki podatki za izbrana protirakava zdravila.

Protirakavo zdravilo	EC ₅₀	Koncentracije v okoljskih vzorcih
5-fluorouracil (FU)	<ul style="list-style-type: none"> - 0,13 mg L⁻¹ za <i>P. subcapitata</i> (Brezovšek in sod., 2014) - 1,20 mg L⁻¹ za <i>S. leopoliensis</i> (Brezovšek in sod., 2014) - 44 µg L⁻¹ za <i>P. putida</i> (Zoukova in sod., 2010) 	<p><u>Bolnišnične odpadne vode:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - maksimalno 124 µg L⁻¹ (Mahnik in sod., 2007) - 35 in 92 ng L⁻¹ (Kosjek in sod., 2013) <p><u>Komunalne odplake:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 4,7 - 14 µg L⁻¹ (Kosjek in sod., 2013) <p>Prisotnost v površinski vodi potrebno potrditi.</p>
imatinib mezilat (IM)	<ul style="list-style-type: none"> - 2,29 mg L⁻¹ za <i>P. subcapitata</i> (Brezovšek in sod., 2014) - 5,36 mg L⁻¹ za <i>S. leopoliensis</i> (Brezovšek in sod., 2014) 	<p>Prisotnost v okolju potrebno potrditi. Možna kontaminacija vode in zemlje (v primeru raztrosa odpadnega blata iz čistilnih naprav na polja) (Booker in sod., 2014).</p>
etopozid (ET)	<ul style="list-style-type: none"> - 30,43 mg L⁻¹ za <i>P. subcapitata</i> (Brezovšek in sod., 2014) - brez toksičnega učinka do 351 mg L⁻¹ za <i>S. leopoliensis</i> (Brezovšek in sod., 2014) 	<p><u>Bolnišnične odpadne vode:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 6 - 380 ng L⁻¹ (Yin in sod., 2010) - 110 - 600 ng L⁻¹ (Catastini in sod., 2008) <p>Pričakovana visoka mobilnost v zemlji (TOXNET, 2015).</p>

P. subcapitata = *Pseudokirchneriella subcapitata*, *S. leopoliensis* = *Synechococcus leopoliensis*; *P. putida* = *Pseudomonas putida*

2.2.2.2 Usoda protirakavih zdravil v okolju

Protirakave učinkovine (tako nespremenjene kot njihovi metaboliti) so po vstopu v okolje podvržene nadaljnjim transformacijam, fizičnim, kemičnim in biološkim, npr. hidrolizi, fotolizi, adsorpciji na suspendirane trdne delce in sedimente, biorazgradnji in bioakumulaciji itd., vendar je podatkov o tem zaenkrat zelo malo.

Kosjek in Heath (2011) sta na podlagi trenutno znanih dejstev povzeli, da je večina protirakavih učinkovin polarnih, kar nakazuje njihovo težnjo po zadrževanju v vodni fazi, zato je malo verjetno, da se bodo v procesu čiščenja na čistilni napravi iz vode izločili z vezavo na organski material, ki ga na koncu odstranijo in obdelajo kot odpadno blato. Ker

so večinoma tudi slabo biorazgradljivi, se z vodo iz čistilnih naprav neovirano sproščajo v različna vodna telesa (Aherne in sod., 1990; Steger-Hartmann in sod., 1997).

Slaba biorazgradljivost naj bi bila značilna za ET (Kosjek in Heath, 2011). Rezultati eksperimentov za FU pa so pokazali, da je njegova biorazgradnja lahko uspešna v primeru zmerne začetne koncentracije in odsotnosti drugih protirakavih učinkovin (Kiffmeyer in sod., 1998). Razlike v biorazgradljivosti naj bi bile posledica razlik v kemijski strukturi. Lažje biorazgradljiva so tista protirakava zdravila, ki so npr. med drugim sestavljena iz (lahko razgradljivih) sladkorjev, prisotnost halogenih elementov pa biorazgradnjo otežuje (Kümmerer in al-Ahmad, 1997). Spreminjanje strukture obstoječih in oblikovanje novih protirakavih zdravil na način hkratne ohranitve terapevtske aktivnosti in povečane biorazgradljivosti bi lahko pripomogla k zmanjšanju količine protirakavih učinkovin v okolju (Kümmerer in sod., 2000).

Protirakave učinkovine so slabo hlapne, zato se jih po tej poti iz vode izloči le zanemarljivo majhen delež (Buerge in sod., 2006; Kosjek, 2009). Njihova kemijska zgradba le pri redkih omogoča absorpcijo zadostne količine sončne svetlobe, da lahko pride do direktne fotolize njihovih molekul. Med potencialne izjeme spada npr. ET (TOXNET, 2015). Več jih je dovzetnih za oksidacijo z ozonacijo, med njimi tudi FU (Rey in sod., 1999). Ta postopek se že uporablja za dezinfekcijo pitne vode, kot izgleda pa lahko služi tudi kot učinkovita metoda za odstranjevanje mikroonesnažil (Eggen in sod., 2014), med drugim tudi protirakavih zdravil. Prav tako bi bile za ta namen verjetno učinkovite nekatere druge metode za čiščenje vode, npr. nanofiltracija in reverzna osmoza (Kosjek in Heath, 2011), vendar trdnih dokazov za to trenutno še ni.

2.2.3 Učinek protirakavih zdravil na netarčne organizme

Protirakava zdravila delujejo neselektivno na vse rastoče celice in so potencialno karcinogena, citotoksična, genotoksična, mutagena in teratogena (Chabner in Longo, 2001; Schimmer in Tannock, 2013; Zounkova in sod., 2007). Zaradi njihovega načina delovanja (poškodbe in inhibicija podvojevanja DNK, prekinitve celične delitve) predvidevajo, da lahko škodljivo vplivajo na praktično vse evkariontske organizme, ki so jim izpostavljeni, tako tarčne (tudi pri človeku ovirajo delovanje rakavih in normalnih celic), kot tudi netarčne (Besse in sod., 2012; Fent, 2003; Johnson in sod., 2008; Kümmerer in al-Ahmad, 2010), npr. vodne primarne producente, katerih predstavnik v naši študiji je alga *P. subcapitata*.

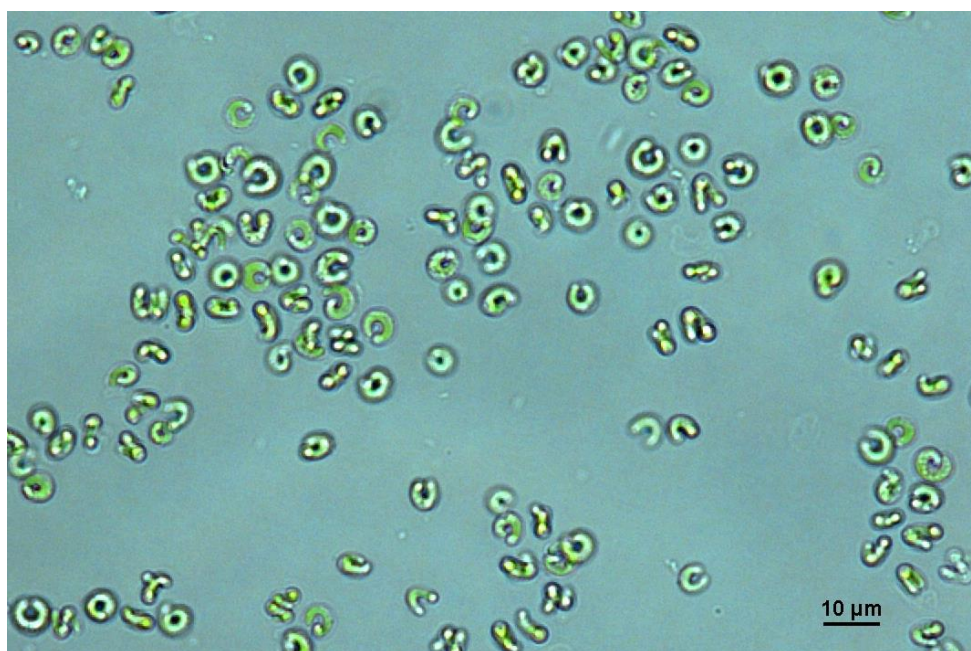
Vodni organizmi so zaradi naraščajoče porabe različnih protirakavih zdravil (Besse in sod., 2012; Booker in sod., 2014; Yin in sod., 2010) kronično izpostavljeni mešanici teh toksičnih učinkovin. Samo na podlagi objavljenih študij akutne toksičnosti, ki so trenutno prevladujoče (European Commission, 2002a; European Commission, 2002b), zato ne moremo zadovoljivo opredeliti njihovega okoljskega vpliva (Fent, 2003). Študij

kroničnega učinka (sledenje učinka preko številnih generacij testnega organizma) pa je zaenkrat malo (npr.: al-Ahmad in sod., 1997; al-Ahmad in Kümmerer, 2001; Hirose in sod., 2005; Zounkova in sod., 2007). Tveganja, ki ga protirakave učinkovine in njihovi metaboliti predstavljajo za okolje, zato še ne moremo zanesljivo oceniti (Fent, 2003), sklepamo pa lahko, da je mnogokrat podcenjeno, saj imajo posamezne učinkovine v splošnem pogosto jasen ekotoksičen učinek šele pri koncentracijah, ki so mnogo višje od okoljskih (Han in sod., 2006; Miede in sod., 2006; Wilson in sod., 2004). Poleg tega je treba upoštevati mnogokrat spregledano dejstvo, da v okolju niso izolirane od drugih učinkovin. Ob neupoštevanju dokazov o povečani toksičnosti mešanic kljub nizkim koncentracijam njihovih posameznih sestavin (Altenburger in Greco, 2009; Faust in sod., 2001; Hass in sod., 2007; Kortenkamp in sod., 2007; Rajapakse in sod., 2002; Silva in sod., 2002), tako lahko pridemo do zmotnega sklepanja o odsotnosti nevarnosti za ljudi in ekosisteme (Hagenbuch in Pinckney, 2012; Magnusson in sod., 2010; Pomati in sod., 2008; Silva in sod., 2002; Sumpter in sod., 2006).

Večjo toksičnost mešanic v primerjavi z delovanjem posameznega protirakavega zdravila so za alge in cianobakterije pred kratkim pokazali Brezovšek in sod. (2014). Testirali so učinke štirih protirakavih zdravil (FU, ET, IM in cisplatina (CDDP)) in nekaterih njihovih dvojnih mešanic (FU+CDDP, FU+IM in CDDP+ET). Uporabili so dva testna organizma, alga *P. subcapitata* in cianobakterijo *S. leopoliensis*. Učinek mešanice je bil sinergističen v primeru kombinacije FU+CDDP pri vseh testiranih koncentracijah za *P. subcapitata* in pri najvišjih za *S. leopoliensis* ter v primeru kombinacije FU+IM za *P. subcapitata*. Po drugi strani se je v primeru kombinacije CDDP+ET pri obeh testnih organizmih izkazal za antagonističnega, kot tudi v primeru kombinacije FU+IM za *S. leopoliensis*. Delovanje protirakavih zdravil se v kombinacijah torej lahko zelo razlikuje od njihovega delovanja v primeru, da so uporabljena posamezno. Iz rezultatov je bila med drugim v splošnem razvidna večja dovzetnost alge (evkarionta) za vpliv s strani izbranih protirakavih zdravil, tako posameznih kot v kombinacijah, kar je z ekološkega vidika pomembna informacija, saj lahko na podlagi tega sklepamo o potencialni nevarnosti za porušenje običajne sestave fitoplanktonskih združb. Zaradi različne občutljivosti na delovanje protirakavih zdravil (Pei in Ma, 2002) bi se lahko zelo zmanjšala npr. algna populacija, kar lahko vodi v prekomerno namnožitev cianobakterijskih populacij (Ma in sod., 2008). Še posebno zaskrbljujoča je prekomerna namnožitev cianobakterij, ki proizvajajo različne toksine, nevarne za ljudi in vodne organizme (Žegura in sod., 2011). Žal so trenutno študije na temo vpliva farmacevtskih učinkovin na različne organizme še zelo redke, glede na naraščajočo ozaveščenost o tej problematiki pa lahko pričakujemo, da se bo njihovo število sčasoma začelo povečevati.

2.2.3.1 Zelena alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pseudokirchneriella subcapitata ((Korshikov) F. Hindak), predhodno imenovana *Selenastrum capricornutum*, *Kirchneriella subcapitata* in *Raphidocelis subcapitata* (Nygaard in sod., 1986), je enocelična alga, ki jo najdemo v fitoplanktonskih združbah celinskih voda (jezera, mlake, reke) (John in Tsarenko, 2003). Celice imajo značilno zvito/srpasto obliko (Slika 4) in so velikosti 3-6 x 6-26 µm (John in Tsarenko, 2003). Običajno se med seboj ne povezujejo v večje skupke, razen občasno med celično delitvijo (Aruoja, 2011). Ta vrsta mikroalg je precej občutljiva na prisotnost toksičnih učinkovin in hkrati lahko dostopna ter ubikvitarna, zato jo zelo pogosto uporabljajo v toksikoloških testih (Nygaard in sod., 1986).

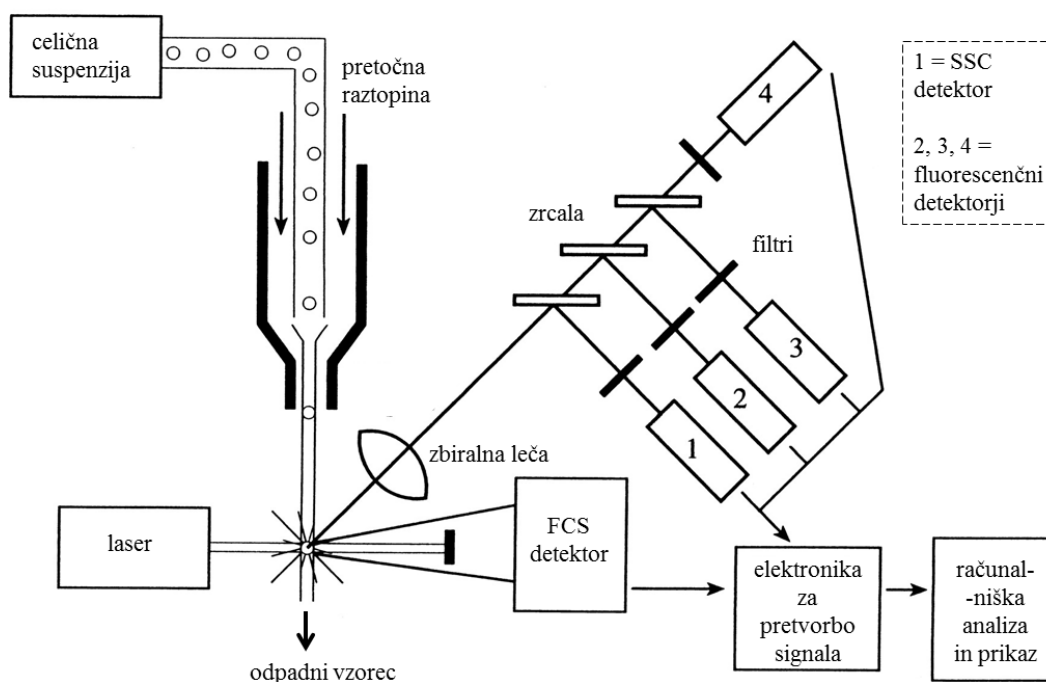


Slika 4: Celice alge *Pseudokirchneriella subcapitata*

2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je tehnika za simultano multiparametrično ugotavljanje lastnosti celic in njihovo štetje. Meritev poteka tako, da celice po tanki cevki ena za drugo potujejo skozi pretočno komoro z optičnim sistemom ogledal, leč in filtrov, mimo vira svetlobe (laserski žarek, npr. argonski, kriptonski, helij-kadmijski, helij-neonski). Svetlobni žarek (krajših valovnih dolžin), ki zadane celico, se odbije, lomi ali pa absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo daljših valovnih dolžin. Vse spremembe svetlobe ob prehodu posamezne celice zaznava sistem fotodetektorjev. Svetlobni impulzi se pretvorijo v električne, ti pa v digitalne. Slednje zbira, analizira in usklajuje računalnik. Po obdelavi z ustreznimi računalniškimi programi signal prikažemo matematično in grafično, v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov (Kotnik in sod., 2010; Ihan, 1999). Shematsko je zgradba pretočnega citometra prikazana na Sliki 5.

Odboj in lom svetlobe merita dva fotodetektorja, eden iz smeri vira vpadne svetlobe (FSC ang. Forward Scatter), drugi pa pravokotno nanj (SSC ang. Side Scatter). FSC posreduje informacijo o velikosti celice, SSC pa o njeni granuliranosti in površinski strukturi. Fluorescenčni detektorji preko sistema filtrov in zrcal prejmejo svetlobo določene valovne dolžine, ki so jo oddali fluorokromi. Tako dobimo še informacijo o vrsti in moči fluorescenčnih signalov (Ihan, 1999).



Slika 5: Shematski prikaz pretočnega citometra (Brown in Wittwer, 2000)

2.4 MODELI ZA NAPOVEDOVANJE IN ANALIZO TOKSIČNOSTI MEŠANIC

2.4.1 Modela seštevek koncentracij in neodvisnega delovanja

Modela seštevek koncentracij (CA ang. Concentration addition (Loewe in Muischnek, 1926) in neodvisnega delovanja (IA ang. Independent action (Bliss, 1939)) sta matematična modela, ki omogočata napovedovanje pričakovane toksičnosti mešanice toksičnih učinkovin na osnovi podatkov o toksičnosti posameznih sestavin mešanice. Napovedna moč obeh modelov je tako omejena s kvaliteto le teh (Backhaus in sod., 2004a).

(I) Osnova za CA je teoretično načelo, da se učinkovine, ki med seboj ne reagirajo, razlikujejo samo v moči delovanja, zato lahko vsako obravnavamo kot redčitev ostalih (Cedergreen, 2008). Različne redčitve iste učinkovine se vedno obnašajo v skladu s CA (Berenbaum, 1989), zato predvidevajo, da isto velja tudi za mešanice različnih učinkovin, ki pa imajo skupno molekularno tarčno mesto ali delujejo na podoben način (McCarty in Borgert, 2006). Vendar pa je samo mesto ali način delovanja težko definirati, saj za večino

učinkovin velja, da sta pri nizkih koncentracijah drugačna kot pri visokih, za mnoge učinkovine pa niti nista poznana (McCarty in Borgert, 2006). CA se je izkazal za natančen napovedni model v primeru mešanic sestavin s podobnim tarčnim mestom (Arrhenius in sod., 2004; Cedergreen in sod., 2007; Faust in sod., 2001; Junghans in sod., 2003), v primeru sestavin s podobnim načinom delovanja pa so rezultati nezanesljivi (Cedergreen in sod., 2007).

(II) IA pa temelji na predpostavki o farmakološki neodvisnosti sestavin mešanice, toksično delovanje vsake od sestavin je torej neodvisno od ostalih sestavin. IA lahko zato opiše le toksičnost mešanic, ki so sestavljene iz sestavin z različnimi mehanizmi delovanja (npr. v primeru, da imata sestavini isto tarčno vezavno mesto, bo med njima prišlo do tekmovanja za le to - njuno delovanje tako ne bo vzajemno neodvisno (Cedergreen, 2008)). Vendar pa se, kot je izpostavil Gessner (1988), postavlja vprašanje, če je sestava mešanice iz sestavin, ki ne bi niti posredno (na fizikalnem, kemijskem ali biološkem nivoju) vplivale na delovanje ostalih, sploh mogoča, glede na kompleksnost povezav v živih organizmih. Ne moremo namreč enostavno predvidevati, da vpliv na določen tarčni receptor, organ ali sistem ne bo do določene mere spremenil odzivnosti ostalih receptorjev, organov ali sistemov na druge, istočasno prisotne, dejavnike (Gessner, 1988). Kljub zadržkom s teoretičnega vidika se je IA v praksi večkrat izkazal za dober napovedni model v primeru mešanic učinkovin z različnimi mesti oz. načini delovanja (Backhaus in sod., 2000; Backhaus in sod., 2004a; Chen in Lu, 2002; Faust in sod., 2003), vendar ne izključno (Backhaus in sod., 2004b).

V študiji učinkov dvojnih mešanic protirakavih zdravil z različnimi mehanizmi delovanja, ki so jo izvedli Brezovšek in sod. (2014), se je na podlagi primerjave napovedanih in dejanski rezultatov izkazalo, da niti CA niti IA nista pravilno napovedala toksičnosti izbranih mešanic v izbranem koncentracijskem območju EC₅-EC₉₀.

Glede na naraščajočo porabo in številčnost različnih za terapije uporabljanih protirakavih zdravil je praktično nemogoče eksperimentalno oceniti ekološko tveganje za vse potencialne kombinacije, zato bi bilo nujno razviti zanesljive modele, ki bi lahko natančno napovedali skupen učinek mešanic protirakavih zdravil (idr. farmacevtskih učinkovin) na podlagi podatkov o toksičnosti posameznih učinkovin (Cedergreen in sod., 2008).

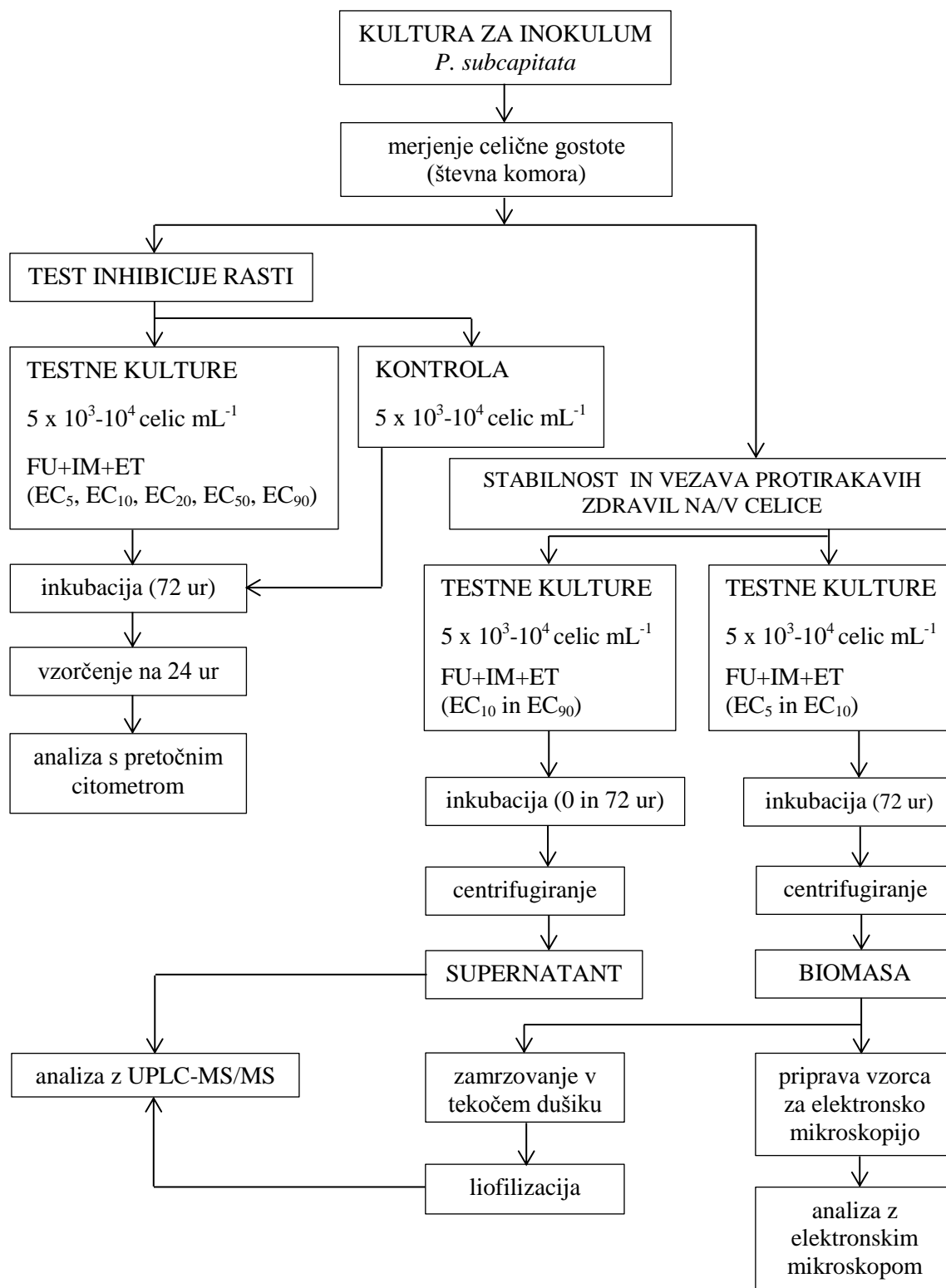
2.4.2 Kombinacijski indeks

Kombinacijski indeks (CI ang. Combination index) sta iz potrebe po standardizirani definiciji sinergizma v kontekstu študij učinkov zdravil v kombinacijah razvila Ting-Chao Chou in Paul Talalay leta 1983/84, na podlagi več desetletnih študij (Chou, 2010). Pred tem je bilo definicij sinergizma več (Goldin in Mantel, 1957), obstajale so tudi različne metode za njegovo opredelitev, ki pa se med seboj niso skladale (Greco in sod., 1995). CI v osnovi izhaja iz fizikalno-kemijskega zakona o vplivu koncentracij (po starem »zakon o

vplivu (delovanju) mas« ali ang. Mass-action law), na podlagi katerega je Chou preko izpeljave več kot 300 enačb o encimski dinamiki ter matematične indukcije in dedukcije leta 1974 uvedel enačbo za srednji učinek (MEE ang. Median-effect equation; podrobnejši opis v podpoglavju 3.2.5) (Chou, 2006).

CI enostavno kvantitativno opredeli sinergizem ($CI < 1$), aditiven učinek ($CI = 1$) in antagonizem ($CI > 1$) (Chou, 2006). Uporabnost koncepta se je močno povečala z razvojem ustreznega računalniškega programa za analizo odvisnosti učinka od koncentracije. Z napredkom na področju računalništva so program s časom še izboljšali, leta 2005 so tako razvili že tretjo generacijo t.i. programa CompuSyn (Chou, 2010).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 6: Hodogram poskusov

3.1 MATERIALI

3.1.1 Protirakava zdravila

V raziskavi smo uporabili tri protirakava zdravila in sicer 5-fluorouracil (FU) (Sigma-Aldrich, Nemčija), imatinib mezilat (IM) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., ZDA) in etopozid (ET) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., ZDA).

Stabilnost protirakavih zdravil smo preverili s kemijsko analizo (podrobneje opisano v podpoglavju 3.2.6).

Eksperimenti so bili izvedeni v skladu z internimi varnostnimi standardi za rokovanje s protirakavimi zdravili (Etiel in sod., 2000). Vse eksperimentalne odpadke, ki so vsebovali protirakava zdravila, smo ločeno shranjevali in ustrezno zavrgli kot nevarne odpadke.

3.1.2 Testni organizem

Za test smo, v skladu s priporočili iz smernice OECD TG 201 (2011), uporabili zeleno alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (*P. subcapitata*) (SAG 61.81) iz algne zbirke "Sammlung von Algenkulturen Univerzitaett Goettingen" (=SAG) Inštituta za fiziologijo rastlin Univerze v Göttingenu (Nemčija). Hranili smo jo v gojišču OECD pri sobni temperaturi in dnevni svetlobi. Kulturo smo redno precepljali v svež medij z namenom ohranjanja njene čistosti in živosti.

3.1.3 Gojišče OECD

Za izvedbo testa inhibicije rasti smo uporabili gojišče OECD. Pripravljali smo ga po navodilih iz smernice OECD TG 201 (2011) iz štirih vnaprej pripravljenih založnih raztopin (Preglednica 2).

Za vsako založno raztopino smo v ločeno steklenico natehtali ustrezne mase vseh sestavin in jim dodali 250 ml destilirane vode. Raztopine smo nato sterilizirali z membransko filtracijo (povprečen premer por 0,2 μm) in jih do uporabe shranjevali v hladilniku (4 °C). Za pripravo gojišča smo v 500 mL sterilne destilirane vode dodali 10 mL založne rastopine 1 in po 1 mL založnih raztopin 2, 3 in 4 ter steklenico dopolnili s sterilno destilirano vodo do skupno 1 L volumna.

Preglednica 2: Seznam spojin za pripravo založnih raztopin, potrebnih za pripravo gojišča OECD, in končne koncentracije posamezne sestavine v vsaki od založnih raztopin.

Hranila	Končna koncentracija
Založna raztopina 1: makro hranila	
NH ₄ Cl	1,5 g L ⁻¹
MgCl ₂ ×6H ₂ O	1,2 g L ⁻¹
CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,8 g L ⁻¹
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g L ⁻¹
+ dH ₂ O	250 mL
Založna raztopina 2: železo	
FeCl ₃ ×6H ₂ O	64 mg L ⁻¹
Na ₂ EDTA×2H ₂ O	100 mg L ⁻¹
+ dH ₂ O	250 mL
Založna raztopina 3: elementi v sledovih	
H ₃ BO ₃	185 mg L ⁻¹
MnCl ₂ ×4H ₂ O	415 mg L ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg L ⁻¹
CoCl ₂ ×2H ₂ O	1,5 mg L ⁻¹
CuCl ₂ ×2H ₂ O	0,01 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	7 mg L ⁻¹
+ dH ₂ O	250 mL
Založna raztopina 4: bikarbonat	
NaHCO ₃	50 g L ⁻¹
+ dH ₂ O	250 mL

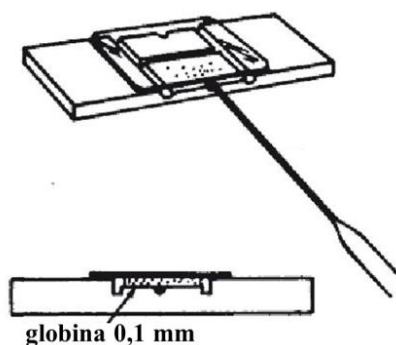
3.2 METODE

3.2.1 Merjenje celične gostote kulture za inokulum

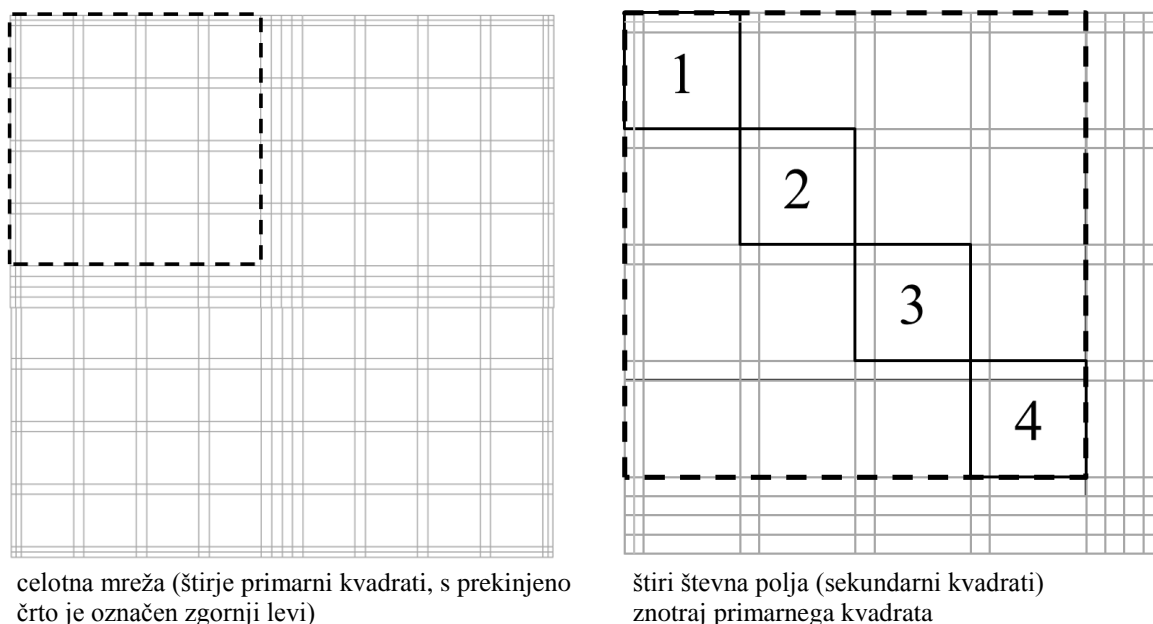
Koncentracijo celic kulture za inokulum smo ugotavljali neposredno, z uporabo števne komore (Bürker Türk, Brand, Nemčija) (Slika 7) in svetlobnega mikroskopa. Majhen vzorec dobro premešane kulture (20 µL) smo nanegli na za to določeno površino števne komore in ga pokrili s krovnim stekelcem. Preparat smo si ogledali z mikroskopom in prešteli celice znotraj površine kvadratnih števnih polj ter na njihovih zgornjih in levih robovih (na spodnjih in desnih pa ne).

Števna komora Bürker Türk ima dve mreži, vsaka je sestavljena iz štirih primarnih kvadratov (površina 1 mm²), znotraj vsakega od teh pa so štiri števna polja (sekundarni kvadrati, površina 1/16 mm²), skupno torej 32 števnih polj (Slika 8). Izračunali smo povprečno število prešteti celic na števno polje in ga pomnožili z ustreznim faktorjem

($1,6 \times 10^5$), ki smo ga izračunali na podlagi znanega volumna vzorca nad posameznim števnim poljem. Zmnožek s tako dobljenim faktorjem je predstavljal število celic mL^{-1} .



Slika 7: Števna komora (Veranič in sod., 2003)



Slika 8: Shematski prikaz mreže števne komore Bürker Türk

3.2.2 Priprava testnih mešanic protirakavih zdravil

Mešanico treh protirakavih zdravil (FU+IM+ET) smo pripravljali sproti iz založnih raztopin, ki smo jih v ustreznih volumnih dodali v gojišče vsake testne kulture. Koncentracije založnih raztopin so bile sledeče:

- 75 g L^{-1} za FU (v topilu DMSO (Merck, Nemčija)),
- 25 g L^{-1} za ET (v topilu DMSO),
- 50 g L^{-1} za IM (v OECD mediju).

Založne raztopine smo shranjevali v temi, v hladilniku pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na podlagi petih EC, ki so jih Brezovšek in sod. (2014) za vsako od izbranih protirakavih zdravil opredelili za alga *P. subcapitata* (EC₅, EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ in EC₉₀), smo sestavili pet trojnih mešanic s predvidoma istimi petimi EC. To smo izvedli tako, da smo za vsako od treh protirakavih zdravil izračunali pet tretjinskih EC (EC_{5/3}, EC_{10/3}, EC_{20/3}, EC_{50/3} in EC_{90/3}) in jih združili v pet mešanic tako, da so bile EC vseh treh protirakavih zdravil v vsaki od mešanic enake. Koncentracije vsakega protirakavega zdravila v mešanici pri posamezni EC in deleži od celotne količine treh protirakavih zdravil, ki ga le te predstavljajo, so prikazani v Preglednicah 3 in 4.

Preglednica 3: Koncentracija posameznega protirakavega zdravila v izbrani mešanici in skupna koncentracija protirakavih zdravil za vsako efektivno koncentracijo mešanice

	FU [$\mu\text{g L}^{-1}$]	IM [$\mu\text{g L}^{-1}$]	ET [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Σ [$\mu\text{g L}^{-1}$]
EC₅	2,9	184,2	4279,2	4466,4
EC₁₀	5,8	264,1	5621,6	5891,5
EC₂₀	12,1	390,3	7567,1	7969,5
EC₅₀	42,7	761,7	12569,2	13373,5
EC₉₀	315,0	2197,3	28087,5	30599,9

EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET = etopozid

Preglednica 4: Odstotek posameznega protirakavega zdravila v izbrani mešanici od skupne koncentracije za vsako efektivno koncentracijo mešanice.

	FU [%]	IM [%]	ET [%]	Σ [%]
EC₅	0,1	4,1	95,8	100
EC₁₀	0,1	4,5	95,4	100
EC₂₀	0,2	4,9	95,0	100
EC₅₀	0,3	5,7	94,0	100
EC₉₀	1,0	7,2	91,8	100

EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET = etopozid

3.2.3 Testiranje inhibicije rasti

Učinek mešanice protirakavih zdravil (FU+IM+ET) na rast alge *P. subcapitata* smo ugotavljali po postopku iz Evropske smernice OECD TG 201 (2011).

Celične kulture alge *P. subcapitata* smo gojili v tekočem gojišču OECD v steklenih erlenmajericah. Znotraj posamezne ponovitve poskusa je bilo na začetku eksperimenta v vseh testnih kulturah, vključno s kontrolami, enako število celic (znotraj intervala 5×10^3 - 10^4 celic mL^{-1} ; začetne koncentracije so se med ponovitvami poskusa razlikovale). V vseh testnih kulturah in kontrolah je bila enaka količina gojišča (20 mL) in topila (DMSO). Slednjega smo v vsako kulturo dodali toliko, da je bila končna vsota enaka tisti pri kulturi z najvišjo koncentracijo protirakavih zdravil (EC₉₀). Začetna celična gostota je morala biti

dovolj nizka, da je bila omogočena eksponentna rast skozi celoten čas inkubacije, torej da ni prišlo do rastne inhibicije zaradi pomanjkanja hranil. Kulturo za inokulum smo pripravili vnaprej in sicer smo jo nekaj dni pred začetkom testa inkubirali v rastni komori v enakih razmerah kot pozneje testne kulture. S tem smo algnim celicam omogočili prilagoditev na testne razmere.

Testne kulture smo po postopku iz smernice inkubirali v rastni komori na stresalniku, pri temperaturi 22 ± 2 °C in stalni osvetlitvi (jakost svetlobe $80-120 \mu\text{mol fotonov m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vsaka od petih mešanic z različnimi testnimi koncentracijami protirakavih zdravil (FU+IM+ET) in kontrola so bile zastopane v treh ponovitvah. Inkubacija je trajala 72 ur. V tem času smo vsakih 24 ur s pretočnim citometrom izmerili število celic v majhnem vzorcu vsake testne kulture oz. kontrole (70 μL , odvzetih takoj po temeljitem premešanju vsake posamezne testne kulture in redčenih s 70 μL destilirane filtrirane vode). Iz dobljenih rezultatov smo izračunali celično gostoto posamezne testne kulture oz. kontrole. Pretočna citometrija se je na podlagi predhodnih študij (Eleršek, 2012) izkazala za najprimernejšo metodo za ugotavljanje števila celic v okviru našega eksperimenta. Končni rezultat testa je bila inhibicija rasti, izražena kot logaritemsko povečanje celične gostote (povprečna specifična stopnja rasti) v 72 urnem času izpostavitve celičnih kultur.

Upoštevani kriteriji za določitev veljavnosti testa za izbran testni organizem (*P. subcapitata*) so bili po postopku iz Evropske smernice OECD TG 201 (2011) sledeči:

- biomasa v kontrolnih kulturah se mora v 72 urah eksponentno povečati za vsaj faktor 16 (specifična stopnja rasti vsaj $0,92 \text{ dan}^{-1}$),
- povprečen koeficient variacije specifične stopnje rasti kontrolnih kultur za vsak dan (dan 0-1, 1-2 in 2-3) ne sme preseči 35 %,
- koeficient variacije povprečne specifične stopnje rasti kontrolnih kultur v 72 urah ne sme preseči 7 %.

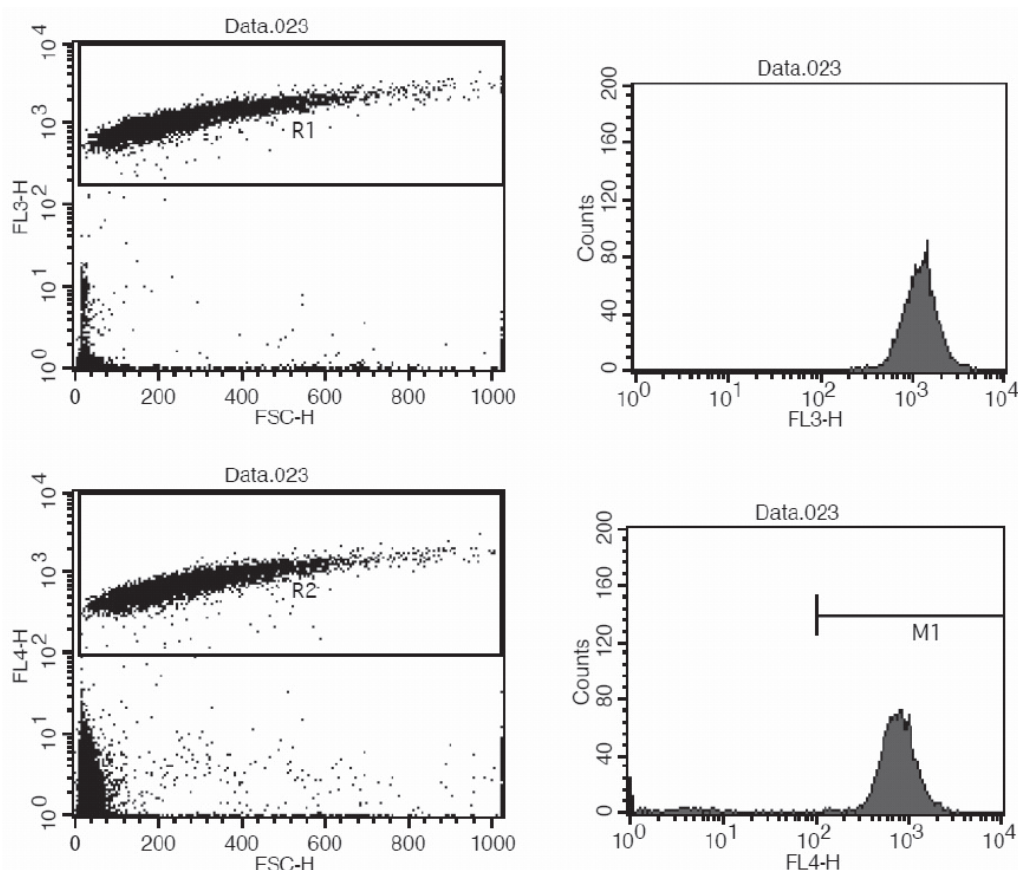
Koeficient variacije (KV) je brezdimenzijsko merilo za variabilnost parametra. Definiran je kot razmerje standardnega odklona (σ) in povprečja (\bar{x}) (enačba 1), in ga lahko izrazimo v odstotkih. Uporablja se kot mera za ponovljivost meritev.

$$KV = \sigma / \bar{x} \quad \dots (1)$$

3.2.4 Štetje celic s pretočnim citometrom

Celično gostoto testnih kultur alge *P. subcapitata* smo izračunali na vsakih 24 ur na podlagi analize majhnega vzorca, odvzetega iz vsake kulture (70 μL , redčenih s 70 μL destilirane filtrirane vode), s pretočnim citometrom (BD FACSCalibur, ZDA). Hitrost pretoka smo nastavili na $65 \mu\text{L min}^{-1}$. Uporabili smo fluorescenčna detektorja FL3 (s filtrom pri 620 nm) in FL4 (s filtrom pri 675 nm).

Podatke smo zbrali in analizirali z računalniškim programom BD CellQuest™. Na točkovnih histogramih smo določili območji (okvirja R1 in R2), v katerih se nahajajo celice alge *P. subcapitata* (Slika 9). Program je tako preštel le dogodke (celice), ki so se uvrstili v ti določeni območji. Hkrati je za te dogodke izrisal še spekter fluorescence (Slika 9).



Slika 9: Primera točkovnih histogramov pretočnega citometra za alga *P. subcapitata* (levo zgoraj = uporabljen laserski senzor FL3 (okvir R1); levo spodaj = uporabljen laserski senzor FL4 (okvir R2) in primera spektrov fluorescence za alga *P. subcapitata* (desno zgoraj = uporabljen laserski senzor FL3; desno spodaj = uporabljen laserski senzor FL4, M1 = interval štetja).

3.2.5 Izračun stopnje in inhibicije rasti

3.2.5.1 Stopnja rasti

Iz dnevno izračunanih koncentracij celic v vsaki testni kulturi smo izračunali stopnjo rasti po enačbi 2 (OECD TG 201, 2011), kjer je μ_{i-j} povprečna specifična stopnja rasti od časa i do j , X_i in X_j pa celični koncentraciji (število celic mL⁻¹) ob času i oz. j (t_i oz. t_j).

$$\mu_{i-j} = (\ln X_j - \ln X_i) / (t_j - t_i) \text{ (dan}^{-1}\text{)} \quad \dots (2)$$

Za vse kulture s testno mešanico protirakavih zdravil (FU+IM+ET) in kontrole smo na iz treh ponovitev izračunali povprečno stopnjo rasti od dneva 0-3, za kontrole pa dodatno tudi za vsak posamezen dan (0-1, 1-2, 2-3) za namen preverjanja veljavnosti testa (kriterij naveden v podpoglavju 3.2.3).

3.2.5.2 Inhibicija rasti

Inhibicijo rasti smo izračunali iz povprečnih stopenj rasti v 72 urah (od dneva 0-3) za vsako testno kulturo (kontrolno in vse EC) po enačbi 3, kjer je Y inhibicija rasti, μ_k povprečna specifična stopnja rasti za kontrolno, μ_{ECx} pa povprečna specifična stopnja rasti za kulturo z EC_x . Iz dobljenih inhibicij rasti za vse tri paralelke vseh testnih kultur smo za kontrolno in vsako EC izračunali povprečno inhibicijo rasti.

$$Y = (\mu_k - \mu_{ECx}) / \mu_k \quad \dots (3)$$

3.2.6 Statistična analiza podatkov

Za statistično analizo rezultatov smo izvedli nelinearno regresijsko analizo s programom Prism 5 (GraphPad Inc.). Podatke za učinek mešanice (inhibicija rasti) smo prikazali na grafikonu x, y (vrednosti na x smo transformirali kot \log_{10}) (Slika 13). Uporabili smo sigmoidno trendno črto z variabilnim naklonom, ki opisuje odvisnost učinka od koncentracije (opisano z enačbami 4-6) in skupno spodnjo vrednostjo (kontrolni nivo) za vse podatke. EC_F predstavlja koncentracijo protirakave učinkovine, ki privede do $F\%$ odziva v razponu med vrhom in dnom (npr. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50}). Vrh in dno sta platoja, podana v enotah odziva ($\%$ rastne inhibicije). Y predstavlja $\%$ rastne inhibicije, X pa logaritem koncentracije testiranih protirakavih zdravil.

$$\log EC_F = \log EC_{50} + (1 / \text{naklon}) \times \log(F\% / (100 - F\%)) \quad \dots (4)$$

$$F\% = (Y - \text{dno}) / (\text{vrh} - \text{dno}) \times 100 \quad \dots (5)$$

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

Statistično značilnost ($p < 0,05$) učinka mešanice v primerjavi s kontrolno smo ocenili z neparametrično analizo variance (Kruskal-Wallisov test) in Dunnovim post-testom pri 95 % intervalu zaupanja.

3.2.7 Izračuna predvidene toksičnosti mešanice

S programom Prism 5 (podpoglavje 3.2.6) pridobljene vrednosti za vrh, naklon, EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} in EC_{90} smo prenesli v program MS Excel (Microsoft) in jih uporabili za izračun napovedi po modelu seštevka koncentracij (CA) in neodvisnega delovanja (IA).

3.2.7.1 Model seštevek koncentracij

Napoved po CA smo izračunali po enačbi 7, kjer je $EC_{x(mix)}$ celotna napovedana EC mešanice n sestavin, ki povzroči učinek x (x % inhibicijo), p_i je koncentracija sestavine i v mešanici, EC_{x_i} pa je koncentracija sestavine i, ki bi povzročila enak kvantitativen učinek (x % inhibicijo) kot mešanica, če bi bila uporabljena posamezno. Izračunali smo $EC_{x(mix)}$ vrednosti za izbrane EC mešanice in izrisali napovedno krivuljo.

$$EC_{x(mix)} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x_i}} \right)^{-1} \quad \dots (7)$$

3.2.7.2 Model neodvisnega delovanja

Napoved po IA smo izračunali po enačbi 8, kjer je $E(c_{mix})$ učinek mešanice n sestavin pri koncentraciji $c_{mix} = \sum c_i$, $E(c_i)$ pa učinek sestavine i, če jo uporabimo posamezno v koncentraciji c_i (= v isti koncentraciji v kakršni je prisotna v mešanici). Izračunali smo učinke $E(c_{mix})$ za izbrane EC mešanice in izrisali napovedno krivuljo.

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

3.2.8 Kvantitativna opredelitev interakcij med sestavnimi mešanice

Za kvantitativno opredelitev interakcij med sestavinami mešanice smo izračunali CI s programom CompuSyn (ComboSyn, Inc.). MEE je prikazana kot enačba 9, kjer je f_a delež, pri katerem pride do učinka (ang. fraction affected), f_u delež, pri katerem do učinka ne pride (ang. fraction unaffected), D dana količina (ang. dose) in D_m količina, ki privede do srednjega učinka (ang. median-effect dose).

$$f_a / f_u = [D / D_m]^m, \text{ kjer je } f_a + f_u = 1 \quad \dots (9)$$

Enačba 10 je enačba za izračun CI za kombinacijo x učinkovin, kjer je ${}^n(CI)_x$ kombinacijski indeks za n učinkovin pri x % inhibiciji, $(D_x)_{1-n}$ je vsota količin n učinkovin, ki v kombinaciji privede do x % inhibicije, $[D]_j / \sum_1^n [D]$ je sorazmernost količin vsake od n učinkovin, ki privede do x % inhibicije v kombinaciji, $(D_m)_j \{ (f_{a_x})_j / [1 - (f_{a_x})_j] \}^{1/m_j}$ pa je količina vsake učinkovine posamezno, ki privede do x % inhibicije (f_{a_x} predstavlja frakcionalno inhibicijo pri x % inhibicije; m je naklon krivulje prikaza srednjega učinka (m = 1 nakazuje hiperbolično, m > 1 sigmoidno in m < 1 sploščeno sigmoidno krivuljo).

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

Interakcije med sestavinami mešanice smo po zgledu Petersen in sod. (2014) opredelili tudi z izračunom t.i. razmerij odstopanja modela (MDR ang. Model deviation ratio), torej razmerij med izmerjenimi EC ($EC_{x_{izm}}$) in napovedanimi EC ($EC_{x_{nap}}$) za vsako EC mešanico in za obe napovedi (po CA in IA) (enačba 11).

$$MDR = EC_{x_{izm}} / EC_{x_{nap}} \quad \dots (11)$$

3.2.9 Opredelitev stabilnosti in analiza vstopa protirakavih zdravil v celice

Analizo stabilnosti protirakavih učinkovin in njihovega vstopa v celice testnega organizma (*P. subcapitata*) so za nas izvedli v španskem laboratoriju (Spanish Council for Scientific Research (CSIC-IDAEA), Barcelona, Španija).

Izmerili smo koncentracije protirakavih zdravil v vseh treh založnih raztopinah, ki so bile med poskusi hranjene v hladilniku (4 °C).

Izmerili in primerjali smo tudi koncentracije protirakavih zdravil v supernatantih celičnih kultur testnega organizma (*P. subcapitata*) pred in po eksperimentu (72 ur pri eksperimentalnih razmerah, npr. stalna osvetljenost in mešanje, temperatura 22 ± 2 °C, prisotnost testnih mikroorganizmov) in v liofilizirani celični biomasi. Izbrali smo supernatante kontrolne kulture in testnih kultur z učinkovitim koncentracijama mešanice protirakavih zdravil (FU+IM+ET) EC_{10} in EC_{90} , celično biomaso pa smo zbirali iz kontrol ter testnih kultur z EC_5 in EC_{10} .

3.2.9.1 Priprava vzorcev za analizo

a) Založne raztopine protirakavih zdravil

Po 1 mL založnih raztopin vsakega od treh protirakavih zdravil (FU, IM, ET) smo poslali v analitični laboratorij v zatemnjeni posodi (preprečen razpad zaradi vpliva svetlobe).

b) Supernatanti celičnih kultur

S centrifugiranjem (4000 rpm, 10 min) za namen analize pripravljenih celičnih kultur smo pridobili 14 mL supernatanta iz kulture kontrole in iz kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil (FU+IM+ET; EC_{10} in EC_{90}) na začetku in koncu testa (t_0 in t_3), jih shranili pri -20 °C in poslali v analitični laboratorij na suhem ledu.

c) Celična biomasa

Zbirali smo celično biomaso iz kultur kontrole in iz kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil (FU+IM+ET; EC₅ in EC₁₀). Kulture smo gojili v enakih razmerah kot testne kulture (dodatni eksperimenti s po 100 mL gojišča na erlenmajerico namesto 20 mL). Po 72 urah smo s centrifugiranjem (4000 rpm, 10 min) zbrali nagojeno biomaso, jo sproti zamrzovali v tekočem dušiku in liofilizirali. Za zanesljivo analizo smo morali pridobiti 0,5 g suhe biomase (ločeno za kontrolo in obe EC).

3.2.9.2 Izvedba analize

Analizo so izvedli z visoko zmogljivo tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo (UPLC-MS/MS ang. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) (Negreira in sod., 2013). Uporabili so Acquity UPLC kromatografski sistem (Waters, ZDA) v kombinaciji s TQD triple quadrupole (QqQ) masnim spektrometrom, opremljenim z virom elektrosprej ionizacije (electrospray ionization (ESI)). Kromatografsko ločitev so izvedli pri sobni temperaturi s Purospher STAR RP-18 kolono z reverzno fazo (dimenzije kolone 125 x 2 mm, velikost delcev 5 µm) (Merck, Nemčija).

3.2.10 Mikroskopiranje z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Vrstični elektronski mikroskop (SEM ang. Scanning electron microscope) je tip elektronskega mikroskopa, ki omogoča neposredno opazovanje površine preparata. Snop primarnih elektronov izhaja iz katode, ki jo segreva električni tok. Ta elektronski snop od točke do točke potuje po površini preparata, pri čemer iz le te izhajajo sekundarni elektroni, ki jih zbira detektor, nameščen v neposredni bližini preparata. Scintilator jih nato spreminja v fotone, ti pa se na fotopomnoževalki pretvorijo v električni signal. Na monitorju se prikaže slika površine preparata (Veranič in sod., 2003).

3.2.10.1 Priprava vzorca za elektronsko mikroskopijo

Vzorec za elektronsko mikroskopijo smo pripravili tako, da smo na koncu eksperimentna (72 ur) s centrifugiranjem (4000 rpm, 10 min) zbrali celično biomaso iz 40 mL kontrole in testnih kultur z učinkovitima koncentracijama EC₅ in EC₁₀ ter jo fiksirali s kapljico formaldehida (37 %; nekajdnevna inkubacija pri 4 °C). Nato smo celice večkrat sprali z acetonom, jih namestili neposredno na nosilec za mikroskop in potopili v tekoči dušik. Tako pripravljene smo nprašili s platino in si jih ogledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JSM – 7500F (JEOL, Japan).

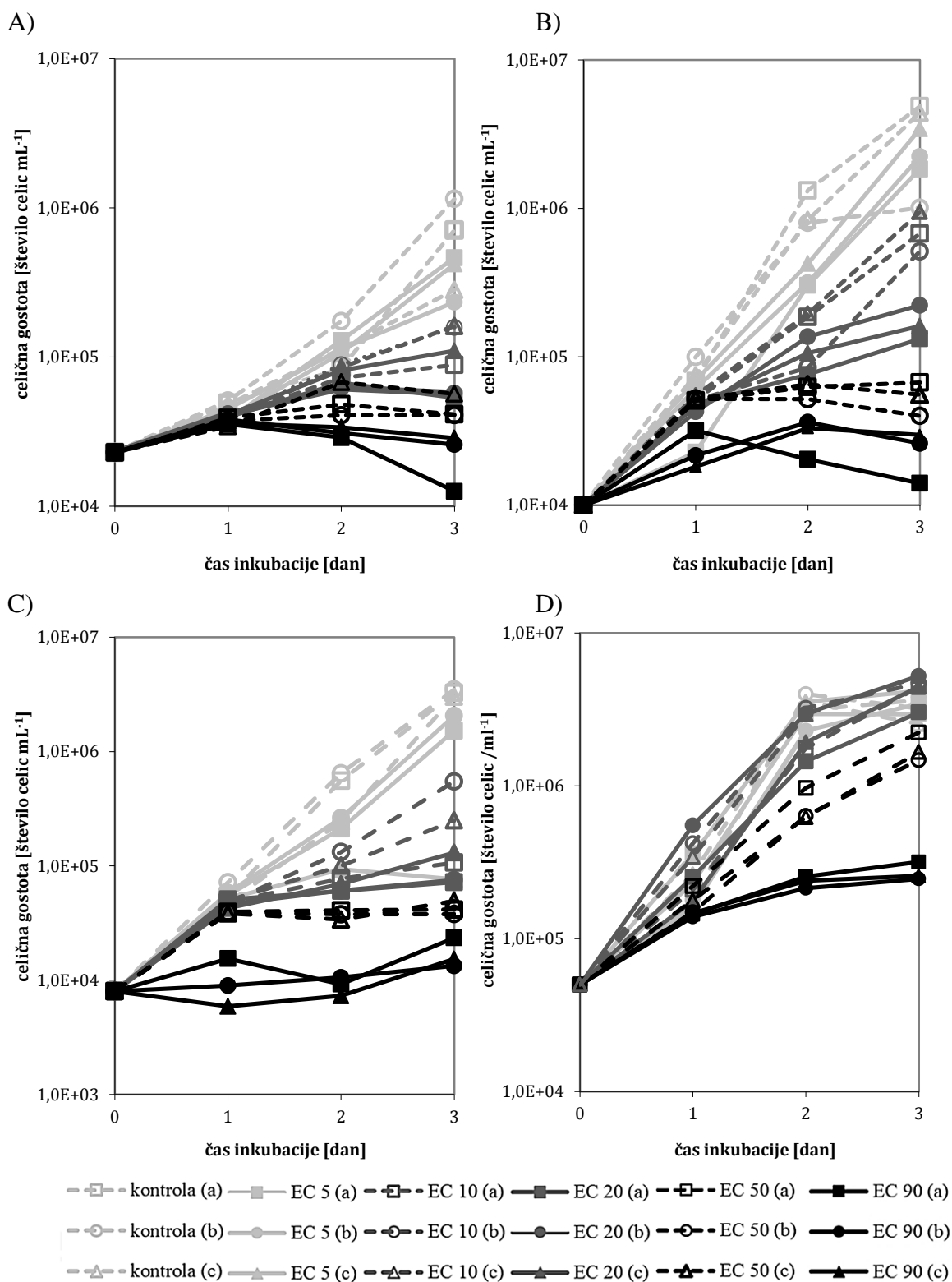
4 REZULTATI

4.1 UČINEK MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA TARČNI ORGANIZEM

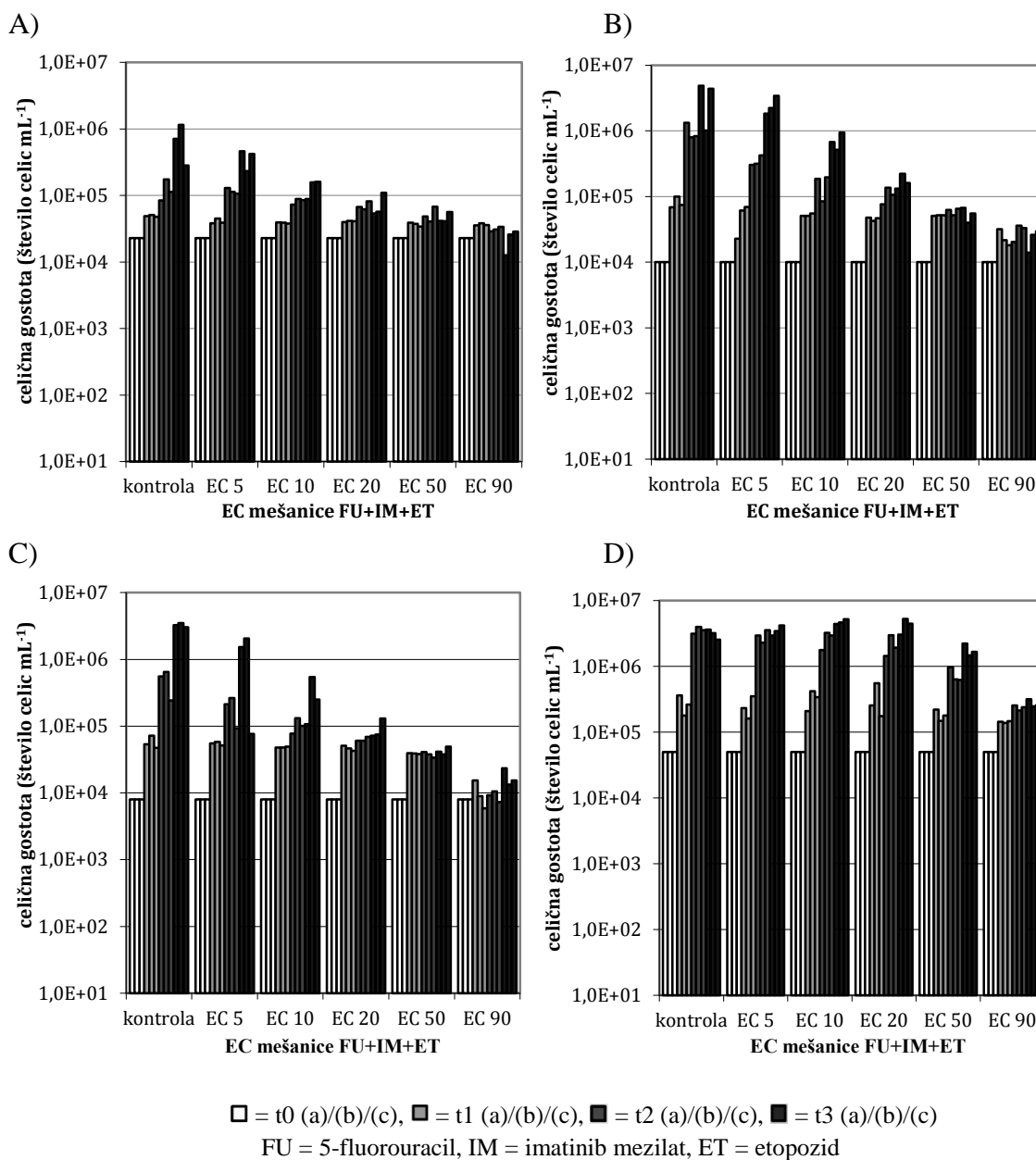
4.1.1 Rast testnih kultur

Učinek izbrane mešanice protirakavih zdravil (FU+IM+ET) na alga *P. subcapitata* smo ocenili pri petih različnih efektivnih koncentracijah (EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , EC_{90}) s testom inhibicije rasti iz Evropske smernice OECD TG 201 (2011).

Na Sliki 10 so prikazane rastne krivulje, na Sliki 11 pa odvisnost celične gostote od EC mešanice tekom celotnega trajanja testa (72 ur). Izhodna koncentracija vseh celičnih kultur je bila znotraj vsake od štirih ponovitev testa enaka, med ponovitvami pa različna (po določilu iz smernice je bila vrednost pri vseh ponovitvah testa znotraj intervala 5×10^3 - 10^4 celic mL^{-1}), zato celične koncentracije ob časih t_1 , t_2 in t_3 (24, 48 oz. 72 urna inkubacija kulture) niso neposredno primerljive. Iz obeh slik pa je razvidno, da se pri vsaki od štirih ponovitev testa (A, B, C, D) celične gostote pri različnih EC in kontroli ob t_1 večinoma manj razlikujejo med seboj kot ob časih t_2 in t_3 . Izjema je predvsem četrta ponovitev testa (D), kjer so razlike (razen pri EC_{90}) manjše. Preračunano je povprečno povečanje celične gostote (od začetne vrednosti) za vse štiri ponovitve testa v 24 urah (t_0 - t_1) od najmanj 2,5 do največ 5,4-kratno (pri EC_{90} in EC_{20}), v 48 urah (t_1 - t_2) od najmanj 4,1 do največ 56,0-kratno (pri EC_{90} in kontroli), v 72 urah (t_2 - t_3) pa od najmanj 3,7 do največ 114,5-kratno (pri EC_{90} in kontroli).



Slika 10: Rastne krivulje testnih kultur alge *P. subcapitata* za vse učinkovne koncentracije (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC oz. kontrole (a, b, c) in štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).



Slika 11: Odvisnost celične gostote testnih kultur alge *P. subcapitata* od efektivne koncentracije (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC oz. kontrole (a, b, c), vse meritvene točke in štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).

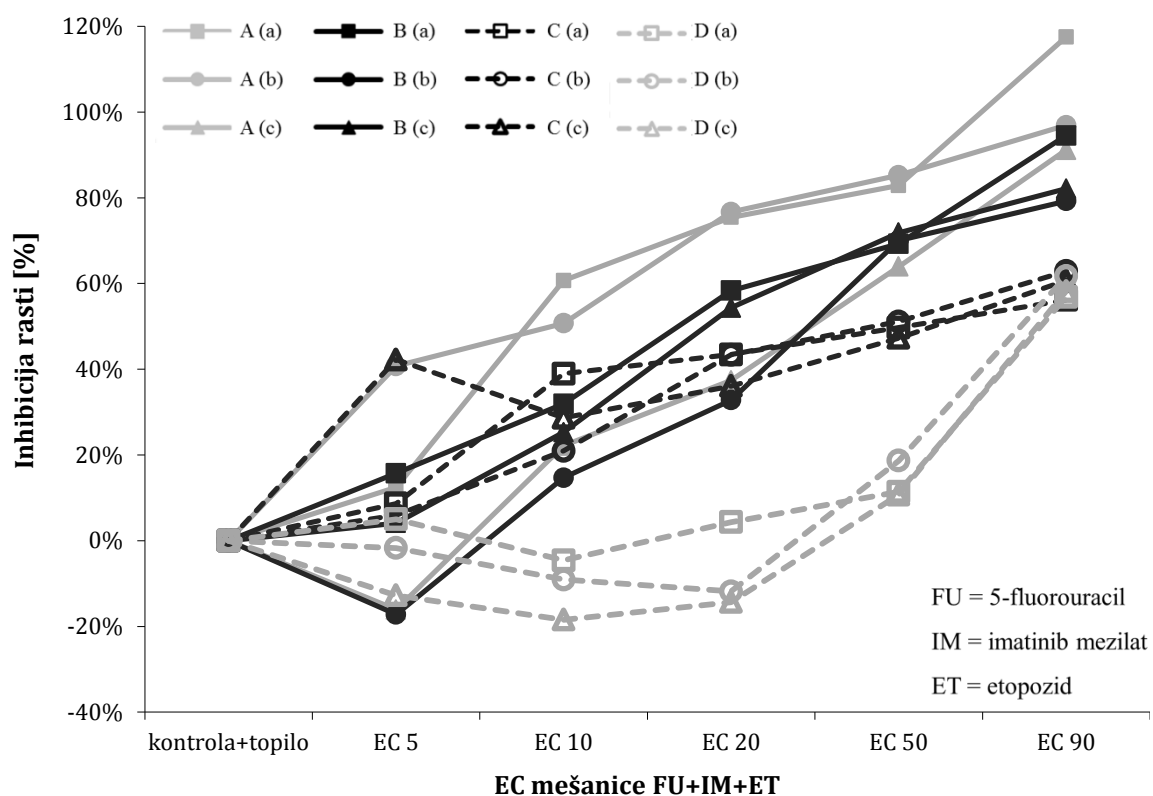
4.1.2 Stopnje in inhibicije rasti

Iz dnevno izračunanih gostot kultur smo izračunali stopnje in inhibicije rasti vseh testnih kultur za vsakega od veljavnih testov (Preglednica 5).

Normalna stopnja rasti za alga *P. subcapitata* je 1,5-1,7 dan⁻¹. Kot je razvidno iz Preglednice 5 so bile povprečne stopnje rasti pri vsaki ponovitvi testa (A, B, C, D) v nekoliko drugačnem razponu (od največ 1,22 do najmanj -0,03 v primeru ponovitve A, od

največ 2,05 do najmanj 0,26 v primeru ponovitve B, od največ 2,93 do najmanj 1,17 v primeru ponovitve C in od največ 1,52 do najmanj 0,56 v primeru ponovitve D). Pri ponovitvah A, B in C je povprečna stopnja rasti z naraščajočo EC upadala, pri ponovitvi D pa upadanje ni jasno razvidno, z izjemo EC₅₀ in EC₉₀. V Preglednici 5 so prečrtani rezultati, ki jih zaradi znatnega odstopanja od vrednosti ostalih dveh paralelek ali iz drugih utemeljenih razlogov (npr. napake pri meritvi s pretočnim citometrom ipd.) nismo upoštevali pri nadaljnjih izračunih. Manjkajoči pa so rezultati, ki jih zaradi prej omenjenih neupoštevanih rezultatov nismo mogli izračunati.

Povprečna inhibicija rasti je pri ponovitvah A, B in C naraščala z naraščajočo EC, v primeru ponovitve D pa je bila pri najnižjih treh EC (EC₅, EC₁₀, EC₂₀) zaradi večje stopnje rasti od stopnje rasti kontrole negativna (Preglednica 5). Naraščanje inhibicij rasti z naraščajočo koncentracijo mešanice za večino testnih kultur pri vseh ponovitvah testa je razvidno tudi iz Slike 12, prav tako so pri ponovitvi testa D razvidne negativne vrednosti v koncentracijskem območju EC₅-EC₂₀.



Slika 12: Inhibicija rasti alge *P. subcapitata* pri vseh učinkovitih koncentracijah (EC) izbrane mešanice protirakavih zdravil za vse tri ponovitve posamezne EC (a, b, c) in vse štiri ponovitve testa (A, B, C, D).

Preglednica 5: Pregled izračunov stopenj rasti alge *P. subcapitata* za celoten čas inkubacije (72 ur) in inhibicij rasti za vse učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za štiri veljavne ponovitve testa (A, B, C, D).

ponovitev testa	testna kultura	stopnja rasti (μ)			povpr. μ	SD za μ	KV za μ [%]	inhibicija rasti (Y) [%]			povpr. Y [%]
		a	b	c				a	b	c	
A	kontrola	1,1	1,3	0,8	1,22	0,11	9	0	0		0
	EC ₅	1,0	0,8	1,0	0,91	0,12	14	12	41		27
	EC ₁₀	0,4	0,6	0,6	0,58	0,11	20	61	51		56
	EC ₂₀	0,3	0,3	0,5	0,37	0,13	36	75	77		76
	EC ₅₀	0,2	0,2	0,3	0,23	0,06	27	83	85		84
	EC ₉₀	-0,2	0,0	0,1	-0,03	0,15	-518	118	97		107
B	kontrola	2,1	1,5	2,0	2,05	0,02	1	0	0		0
	EC ₅	1,7	1,8	1,9	1,83	0,11	6	16	4		10
	EC ₁₀	1,4	1,3	1,5	1,41	0,10	7	32	25		29
	EC ₂₀	0,9	1,0	0,9	0,94	0,09	9	58	54		56
	EC ₅₀	0,6	0,5	0,6	0,56	0,09	16	69	72		71
	EC ₉₀	0,1	0,3	0,4	0,26	0,13	50	95	82		88
C	kontrola	2,9	3,0	2,9	2,93	0,02	1	0	0	0	0
	EC ₅	2,7	2,8	1,7	2,18	0,71	32	9	6		7
	EC ₁₀	1,8	2,3	2,1	2,06	0,27	13	39	21	29	30
	EC ₂₀	1,7	1,7	1,9	1,73	0,11	6	43	43	36	41
	EC ₅₀	1,5	1,4	1,5	1,48	0,04	3	50	51	47	49
	EC ₉₀	1,3	1,1	1,1	1,17	0,10	8	56	63	61	60
D	kontrola	1,4	1,4	1,3	1,37	0,06	4	0	0	0	0
	EC ₅	1,4	1,4	1,5	1,41	0,06	4	5	-2	-13	-3
	EC ₁₀	1,5	1,5	1,5	1,52	0,03	2	-5	-9	-18	-11
	EC ₂₀	1,4	1,6	1,5	1,47	0,09	6	4	-12	-14	-7
	EC ₅₀	1,3	1,1	1,2	1,19	0,07	6	11	19	11	14
	EC ₉₀	0,6	0,5	0,5	0,56	0,05	8	57	62	58	59

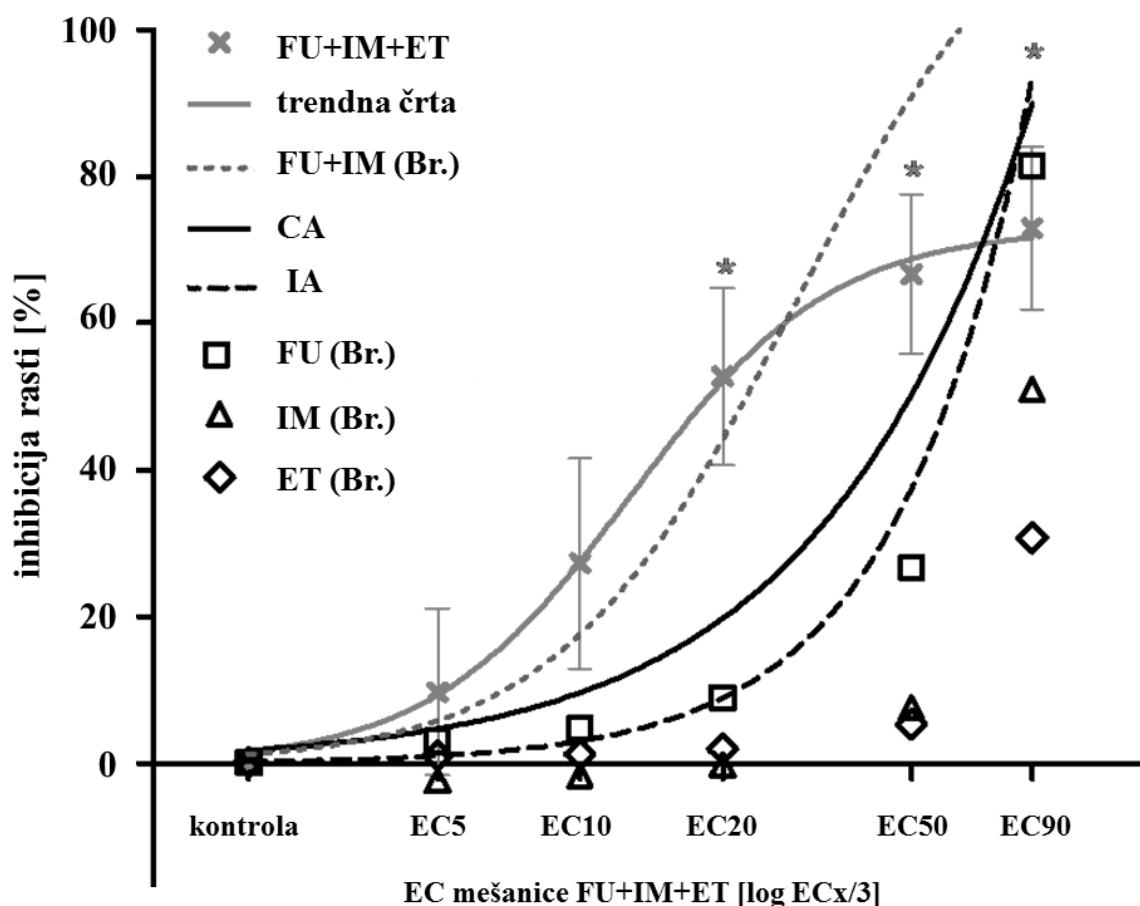
*povpr. = povprečna; EC = učinkovita koncentracija (ang. Effective concentration)

4.1.3 Rezultati statistične analize podatkov

Nelinearna regresijska analiza je grafično prikazana na Sliki 13. Podatki predstavljajo povprečje \pm 95 % intervale zaupanja, prikazane kot log krivulje odvisnosti inhibicije rasti od EC mešanice po 72 urah izpostavljenosti testnih kultur.

Iz Slike 13 lahko razberemo, da je bila inhibicija rasti testnega organizma v razponu koncentracij trojne mešanice (FU+IM+ET) protirakavih zdravil EC₁₀-EC₅₀ večja od inhibicije, ki so jo Brezovšek in sod. (2014) ugotovili v primerih, ko je bilo vsako protirakavo zdravilo na istem testnem organizmu uporabljeno posamezno v enakovredni EC. Pri EC₅₀ na primer je inhibicija rasti zaradi vpliva mešanice v primerjavi z inhibicijo rasti zaradi vpliva posameznega protirakavega zdravila 2,5-krat večja za FU, 8,9-krat večja

za IM in 12,5-krat večja za ET. Pri najvišji in najnižji koncentraciji (EC_5 in EC_{90}) pa so bile inhibicije rasti v primeru vseh treh protirakavih zdravil primerljive (ob upoštevanju intervalov zaupanja). Razvidno je tudi, da je bil učinek trojne mešanice v intervalu koncentracij EC_5 - EC_{20} zelo podoben učinku dvojne mešanice FU+IM, ki so ga za isti testni organizem ugotovili Brezovšek in sod. (2014), pri EC_{50} in EC_{90} pa znatno manjši.



* = signifikantna razlika v primerjavi s kontrolo ($P < 0,05$); intervali zaupanja = 95 %; Br. = Brezovšek in sod., 2014; EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); FU = 5-fluorouracil, IM = imatinib mezilat, ET = etopozid; CA = model seštevka koncentracij (ang. Concentration addition); IA = model neodvisnega delovanja (ang. Independent action)

Slika 13: Učinek posameznih protirakavih zdravil in njihovih mešanic na rastno inhibicijo alge *P. subcapitata*. Prikazani sta tudi napovedi po dveh napovednih modelih.

4.1.4 Primerjava matematično predvidenih in dejanskih učinkov mešanice

Iz podatkov nelinearne regresijske analize (vrednosti za mešanico za zgornji in spodnji plato, naklon, EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} in EC_{90}) smo izračunali predvidene učinke mešanic po matematičnih modelih CA in IA s programom MS Excel (Microsoft).

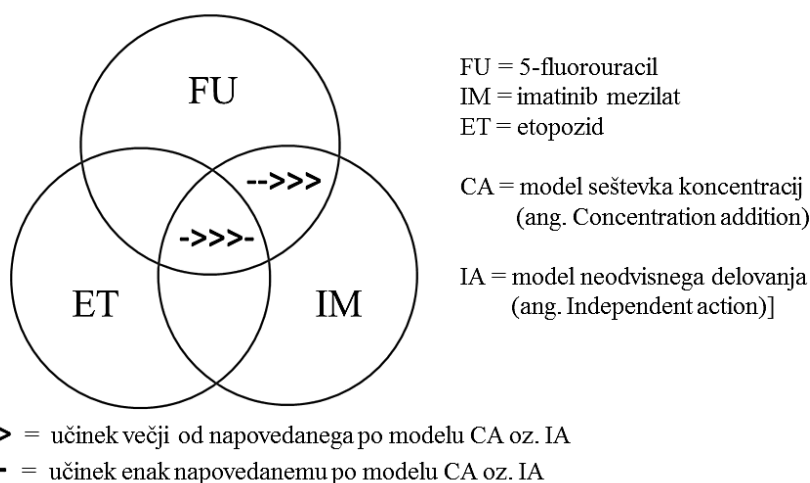
EC za mešanice ne moremo opredeliti v pravih koncentracijskih enotah (npr. mg L⁻¹), opredelimo jih kot učinek, torej kot % inhibicije rasti, ki ga mešanica, katere EC je bila predvidena kot EC_x (EC₅, EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ oz. EC₉₀), povzroči dejansko (izmerjeni učinki) oz. po napovedi (po CA in IA).

Eksperimentalno pridobljeni in po modelih CA in IA napovedani učinki mešanice so navedeni v Preglednici 6. Ob upoštevanju intervalov zaupanja sta napovedi po obeh modelih pravilni le v primeru EC₅ in EC₉₀. V primeru ostalih treh EC pa je bil napovedan učinek po obeh modelih podcenjen. Rezultati iz Preglednice 6 (z upoštevanimi intervali zaupanja) so shematsko prikazani na Sliki 14. Na slednji je prikazana tudi primerjava eksperimentalnih rezultatov in napovedanih vrednosti za dvojno mešanico FU+IM iz študije, ki so jo na algi *P. subcapitata* izvedli Brezovšek in sod. (2014). Pet simbolov po vrsti od leve proti desni predstavlja razmerje med dejanskimi in napovedanimi učinki pri petih efektivnih koncentracijah: EC₅, EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ in EC₉₀. Na Sliki 14 je prikazano, da sta bili tudi v primeru dvojne mešanice po obeh modelih pravilni le dve napovedi (za EC₅ in EC₁₀).

Preglednica 6: Efektivne koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil, izračunane oz. opredeljene na podlagi eksperimentalnih podatkov in statistične analize, in napovedane po dveh napovednih modelih.

EC _x	EC _x _{izm} [% inhibicije rasti]	EC _x _{nap} po CA [% inhibicije rasti]	EC _x _{nap} po IA [% inhibicije rasti]
EC ₅	9,77	5,00	1,71
EC ₁₀	27,29	10,00	4,46
EC ₂₀	52,72	20,00	10,58
EC ₅₀	66,71	50,00	35,74
EC ₉₀	72,94	90,00	93,71

EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); EC_x_{izm} = izmerjena EC; EC_x_{nap} = napovedana EC; CA = model seštevka koncentracij (ang. Concentration addition); IA = model neodvisnega delovanja (ang. Independent action)



Slika 14: Shematski prikaz primerjave dejanskih učinkov mešanic protirakavih zdravil na inhibicijo rasti alge *P. subcapitata* z napovedanimi po dveh napovednih modelih, od leve proti desni za vseh pet efektivnih koncentracij (EC₅-EC₉₀).

4.1.5 Kvantitativna opredelitev interakcij med sestavinami mešanice

4.1.5.1 Kombinacijski indeksi

V primerjavi z učinkom, ki ga pri isti koncentraciji (EC_x) povzroči vsako od treh protirakavih zdravil, če je uporabljeno posamezno, lahko učinek njihove mešanice (FU+IM+ET) na osnovi izračunanih kombinacijskih indeksov (CI) pri nižjih koncentracijah opredelimo kot sinergističen (EC_5 - EC_{20}), pri EC_{50} kot rahlo sinergističen (skoraj aditiven), pri EC_{90} pa kot antagonističen (Preglednica 7). Vrednost $CI = 1$ predstavlja aditiven, $CI < 1$ sinergističen, $CI > 1$ pa antagonističen učinek mešanice.

Preglednica 7: Kombinacijski indeksi za vse učinkovite koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za alga *P. subcapitata*.

EC	CI
EC_5	0,79572
EC_{10}	0,59596
EC_{20}	0,62765
EC_{50}	0,93935
EC_{90}	1,86816

EC = učinkovita koncentracija (ang. Effective concentration)

CI = kombinacijski indeks (ang. Combination index)

4.1.5.2 Razmerja odstopanja modela

Petersen in sod. (2014) so na podlagi razmerja med napovedanimi EC mešanic (po matematičnih modelih CA in IA) in dejanskimi izmerjenimi EC (t.i. razmerje odstopanja modela (MDR)) opredelili skupno delovanje sestavin mešanice kot sinergistično, če je bil rezultat >2 , kot antagonistično, če je bil $<0,5$, vmesne vrednosti (0,5-2) pa po njihovi definiciji pomenijo aditiven učinek.

Izračunani MDR za naš poskus so prikazani v Preglednici 8. Glede na napoved po CA gre pri EC_{10} in EC_{20} za sinergističen učinek, pri ostalih treh koncentracijah (EC_5 , EC_{50} in EC_{90}) pa za aditiven učinek mešanice. Glede na napoved po IA pa gre v primeru najnižjih treh koncentracij (EC_5 , EC_{10} in EC_{20}) za sinergističen učinek, pri najvišjih dveh (EC_{50} in EC_{90}) pa za aditiven učinek mešanice.

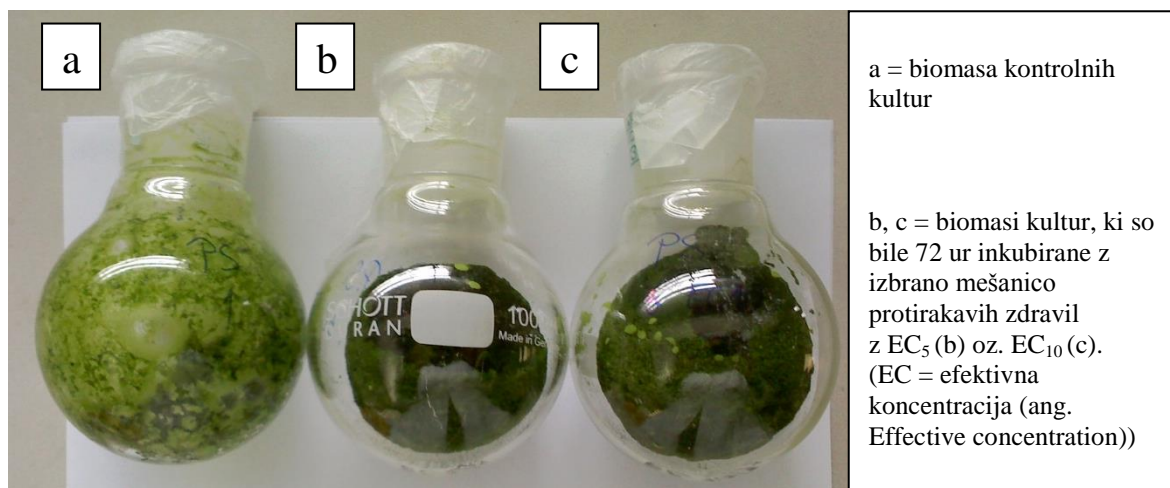
Preglednica 8: Razmerja odstopanja modela, izračunana glede na napovedi po dveh napovednih modelih, za vse ефективne koncentracije izbrane mešanice protirakavih zdravil za alga *P. subcapitata*.

EC	MDR glede na CA	MDR glede na IA
EC ₅	1,95	5,52
EC ₁₀	2,73	6,12
EC ₂₀	2,64	4,98
EC ₅₀	1,33	1,87
EC ₉₀	0,81	0,78

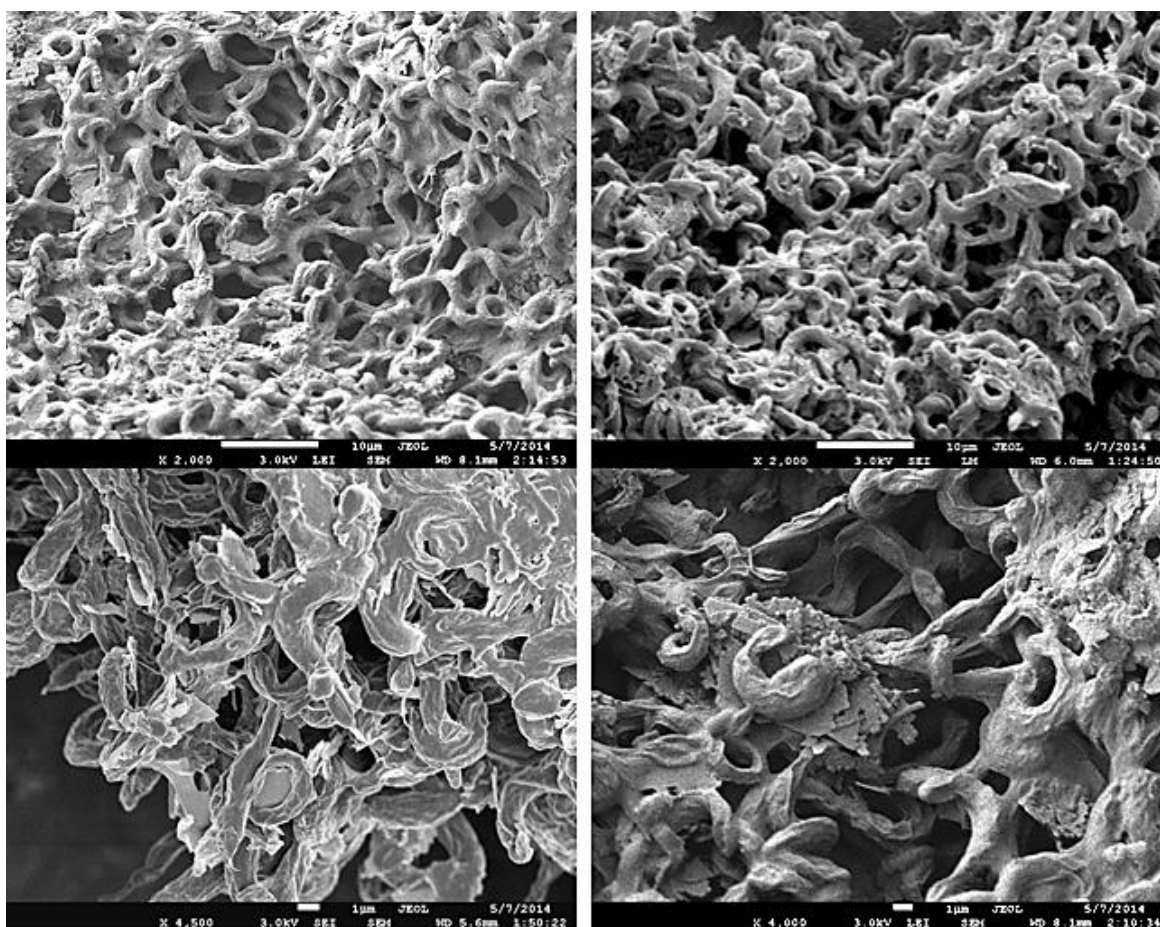
EC = ефективna koncentracija (ang. Effective concentration); MDR = razmerje odstopanja modela (ang. Model deviation ratio); CA = model seštevek koncentracij (ang. Concentration addition); IA = model neodvisnega delovanja (ang. Independent action)

4.1.6 Vpliv protirakavih zdravil na lastnosti celične površine

Pri preučevanju učinka trojne mešanice protirakavih zdravil (FU+IM+ET) na alga *P. subcapitata* smo opazili očitno razliko v agregaciji algne biomase. Na Sliki 15 je razvidna drugačna razporeditev suhe (liofilizirane) biomase kontrole v primerjavi z biomaso celičnih kultur, ki so bile 72 ur inkubirane z mešanicama protirakavih zdravil z EC₅ oz. EC₁₀. Masa celic v vseh treh stekleničkah je bila približno 0,5 g. Celična biomasa iz kontrolnih kultur se je izrazito oprijela sten bučke, v kateri smo jo liofilizirali, biomaso iz kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil (EC₅ in EC₁₀) pa sta med sušenjem s sten popolnoma odstopili. Vendar na mikro-nivoju, kot je razvidno iz posnetkov z elektronskim mikroskopom (Slika 16), razlike med površinami celic oz. površinskimi strukturami niso bile jasno vidne. V bodoče bi lahko za pridobitev bolj jasnega posnetka poskusili optimizirati postopek priprave preparata za mikroskopiranje.



Slika 15: Makrostruktura liofilizirane biomase alga *P. subcapitata*



kontrolna kultura

kultura, ki je bila 72 ur inkubirana z izbrano mešanico protirakavih zdravil z učinkovito koncentracijo EC_{10}

Slika 16: Mikrostruktura liofilizirane biomase alge *P. subcapitata* (posnetki z vrstičnim elektronskim mikroskopom; belo merilo zgornjih slik predstavlja 10 μ m, spodnjih pa 1 μ m).

4.2 STABILNOST PROTIRAKAVIH ZDRAVIL

Izmerili smo koncentracije vsakega posameznega protirakavega zdravila (FU, IM, ET) v njihovih založnih raztopinah ter ločeno v supernatantih in sedimentih celičnih kultur kontrol in kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil v izbranih EC. Primerjali smo razlike med predvidenimi oz. izmerjenimi začetnimi in izmerjenimi končnimi koncentracijami.

Za ET se je izkazalo, da se že ob času t_0 delno pretvori v drugo izobarično spojino (enaka nominalna masa, drugačna zastopanost posameznih elementov (McLafferty in Tureček, 1993)), ki smo jo označili z ET2. V nadaljevanju so zato navedene izmerjene koncentracije obeh posameznih sestavin (ET1 in ET2) in njune vsote ($ET1 + ET2 = ET$).

4.2.1 Supernatanti celičnih kultur

Spremembo koncentracij posameznih protirakavih zdravil med testom (t0-t3 oz. 0-72 ur) smo analizirali na podlagi supernatantov kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil v nizki (EC₁₀) in visoki (EC₉₀) efektivni koncentraciji (Preglednica 9). Povprečno odstopanje izmerjene začetne koncentracije (t0) od predvidene (povprečje odstopanj pri EC₁₀ in EC₉₀) je bilo najmanjše za FU (1 %), sledi IM (6 %), največje pa je bilo odstopanje v primeru ET (34 %). Razlika med začetno in končno koncentracijo (t0-t3) je bila prav tako najmanjša v primeru FU (2,3 % pri EC₉₀; zaradi manjkajočega podatka o koncentraciji ob času t3 za EC₁₀ razlike nismo mogli izračunati). Pri IM in ET sta bili razliki večji tako pri EC₁₀ (49,1 % za IM in 24,6 % za ET) kot EC₉₀ (38,0 % za IM in -24,9 % za ET).

Preglednica 9: Pričakovane in izmerjene koncentracije posameznih protirakavih zdravil na začetku in koncu testa (t0 in t3) za obe efektivni koncentraciji, izračunana odstopanja od pričakovanih vrednosti in razlike med koncentracijami na začetku in koncu testa.

	FU	IM	ET1	ET2	ET
	pričakovana vrednost [$\mu\text{g L}^{-1}$]				
kontrola	0,00	0,00	/	/	0,00
EC₁₀, t0	5,79	264,10	/	/	5621,64
EC₉₀, t0	315,00	2197,33	/	/	28087,54
	izmerjena vrednost [$\mu\text{g L}^{-1}$]				
kontrola	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EC₁₀, t0	5,80	252,20	3765,60	887,30	4652,90
EC₁₀, t3	<i>n.d.</i>	128,30	988,00	2518,50	3506,50
EC₉₀, t0	308,10	2030,80	13361,00	661,00	14022,00
EC₉₀, t3	301,00	1259,50	7674,50	9838,80	17512,20
	povprečno odstopanje od pričakovane vrednosti [%]				
t0 (EC₁₀ in EC₉₀)	1	6	/	/	34
	razlika med izmerjenimi koncentracijami (t0 – t3) [%]				
EC₁₀	/	49,1	73,8	-183,8	24,6
EC₉₀	2,3	38,0	42,6	-1388,5	-24,9

n.d. = ni določeno (ang. not determined); EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); FU = 5-fluorouracil; IM = imatinib mezilat; ET in ET 1 = etopozid, ET2 = izobarična spojina ET, ET1 + ET2 = ET

4.2.2 Založne raztopine protirakavih zdravil

Odstopanja koncentracij založnih raztopin od pričakovanih (Preglednica 10) so bila znotraj meja, dopuščenih v smernici OECD TG 201 (2011) (začetna koncentracija se tekom testa ne sme spremeniti (znižati) za več kot 20 %). Odstopanje v primeru FU je bilo 7 %, v primeru IM 6 %, v primeru ET pa 4 %.

Preglednica 10: Primerjava med predvidnimi in s kemijsko analizo ugotovljenimi koncentracijami posameznih protirakavih zdravil v založnih raztopinah.

protirakavo zdravilo	predvidena koncentracija	FU	IM	ET1	ET2	ET	odstopanje od pričakovanega [%]
FU [g L⁻¹]	75	69,6	-	-	-	-	7
IM [mg L⁻¹]	500	-	471,5	-	-	-	6
ET [mg L⁻¹]	25000	-	-	23801,3	77,9	23879,2	4

n.d. = ni določeno (ang. not determined); FU = 5-fluorouracil; IM = imatinib mezilat; ET in ET 1 = etopozid, ET2 = izobarična spojina ET, ET1 + ET2 = ET

4.3 VEZAVA PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA/V CELIČNO BIOMASO

Iz podatkov, pridobljenih s kemijsko analizo liofilizirane celične biomase, smo izračunali maso posameznega protirakavega zdravila (FU, IM, ET), ki je bila na koncu poskusa (t3) prisotna v samih celicah alge *P. subcapitata* ali vezana na njihovo površino, na gram liofilizirane biomase. Skupno količino posameznega protirakavega zdravila, porabljeno na gram liofilizirane biomase (t0), pa smo prezračunali iz volumna gojišča z dodano mešanico protirakavih zdravil (EC₅ in EC₁₀), ki smo ga porabili za nagojitev končne količine biomase. Nazadnje smo izračunali odstotek od celotne uporabljene mase vsakega protirakavega zdravila, ki se je med testom (t0-t3) vezal v in/ali na celice biomase. Pri FU gre za 0,11 % (končna masa (t3) znana le za EC₅), pri IM za povprečno 0,09 %, pri ET pa za povprečno 0,01 % (Preglednica 11).

Preglednica 11: Izračunana masa vsakega od protirakavih zdravil na gram končne liofilizirane biomase na začetku in koncu testa (t0 in t3) ter odstotek od celotne porabljene mase protirakavih zdravil, ki ga predstavlja količina, prisotna ob času t3 (v in/ali na celicah).

	FU	IM	ET1	ET2	ET
Masa protirakavega zdravila na g liofilizirane biomase [ug g⁻¹], t0					
EC₅	63,86	4056,31	42201,62	52031,72	94233,34
EC₁₀	141,25	6431,76	35915,06	100990,53	136905,59
Masa protirakavega zdravila na g liofilizirane biomase [ug g⁻¹], t3					
EC₅	0,07	3,94	2,49	3,07	5,56
EC₁₀	<i>n.d.</i>	5,42	4,36	12,26	16,62
Del protirakavega zdravila, ki je vezan v/na celice [%], t3					
EC₅	0,11	0,10	0,01	0,01	0,01
EC₁₀	<i>n.d.</i>	0,08	0,01	0,01	0,01

n.d. = ni določeno (ang. not determined); EC = efektivna koncentracija (ang. Effective concentration); FU = 5-fluorouracil; IM = imatinib mezilat; ET in ET 1 = etopozid, ET2 = izobarična spojina ET, ET1 + ET2 = ET

5 RAZPRAVA

Zaradi velike in še vedno naraščajoče porabe farmacevtskih učinkovin postaja problematika njihove pojavnosti v okolju in njihovega vpliva na netarčne organizme vse bolj pereča, še toliko bolj zaradi vse številnejših dokazov o povečanih in nepredvidljivih učinkih, ki jih te učinkovine povzročijo v kombinacijah, četudi so prisotne v nizkih koncentracijah. V tej raziskavi smo se osredotočili na protirakava zdravila, ki spadajo med farmacevtske učinkovine z velikim potencialnim negativnim vplivom na netarčne organizme. V vodnih telesih jih sicer večinoma zaznavajo v relativno nizkih koncentracijah, ki pa so vseeno lahko zadostne za toksičen učinek (Johnson in sod., 2008). Poleg tega gre za zelo obstojne spojine, odporne proti fizikalni, kemijski in biološki razgradnji (Kosjek in Heath, 2011), tako da se ne samo kontinuirano izločajo v okolje temveč imajo tudi potencial za ohranjanje v njem. Organizmi v okolju so zato kronično izpostavljeni kompleksnim mešanicam protirakavih zdravil, njihovih metabolitov in transformacijskih produktov ter drugih farmacevtsko aktivnih učinkovin, študije posledic, do katerih to privede, pa so zaenkrat zelo redke. Raziskovali smo vpliv na vodne evkariontske organizme, predstavnika katerih (alga *P. subcapitata*) smo izbrali za svoj testni organizem. Testirali smo učinek mešanice treh protirakavih zdravil (FU+IM+ET), ki jih za kemoterapijo pogosto uporabljajo, zato pričakujemo, da je tudi njihova pojavnost v okolju količinsko relativno visoka in da se tudi v okolju pojavljajo istočasno. Vse izbrane EC_x, vključno z najnižjimi, so sicer višje od tistih, ki so jih do sedaj zaznali v okoljskih vzorcih (Preglednica 1), z izjemo koncentracije FU v bolnišničnih odpadnih vodah (124 µg L⁻¹), ki so jo izmerili Mahnik in sod. (2007).

5.1 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA RAST

Izbrana mešanica protirakavih zdravil (FU+IM+ET) je po pričakovanjih na rast celic alge *P. subcapitata* večinoma delovala zaviralno v primerjavi s kontrolo (manjše povečanje celične gostote v enakem časovnem intervalu) in sicer v celotnem koncentracijskem razponu (EC₅-EC₉₀). Velikost učinka je bila odvisna od EC (pri večini ponovitev testa je bil učinek tem večji čim višja je bila koncentracija) in od časa inkubacije (ob časih t₂ in t₃ so se celične gostote kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil pri večini testnih ponovitev bolj razlikovale od celičnih gostot kontrole kot ob času t₁) (Sliki 10 in 11). Povprečna stopnja rasti se je z naraščajočo EC večinoma zmanjševala, povprečna inhibicija rasti pa je z naraščajočo EC večinoma naraščala (izjeme pri ponovitvi testa D) (Preglednica 5, Slika 12). Učinek (inhibicija rasti testnega organizma) trojne mešanice v koncentracijskem območju EC₁₀-EC₅₀ je bil večji od učinkov, ki jih je vsako protirakavo zdravilo povzročilo, če je bilo v enakovredni EC uporabljeno posamezno, pri EC₅ in EC₉₀ pa so bile inhibicije rasti v primeru vseh treh protirakavih zdravil ob upoštevanju intervalov zaupanja primerljive (Slika 13). Zaradi razlik med učinkoma dvojne (FU+IM) in trojne (FU+IM+ET) mešanice pri različnih EC (Slika 13) sklepamo, da ima ET na rast alg zelo različen učinek v odvisnosti od koncentracije.

Intervali zaupanja za inhibicijo rasti so precej široki (Slika 13), kar lahko pojasnimo z naravno variabilnostjo rasti alge v danih neoptimalnih rastnih razmerah (stalna osvetlitev, prisotnost topila ipd.). Povprečna variabilnost rasti dnevno izmerjenih celičnih gostot vseh kontrolnih celičnih kultur za vse dni eksperimenta in vse ponovitve testa je bila 9 % (izražena kot KV%). Na podlagi opazovanj sklepamo, da na različno obnašanje kultur lahko med drugim vplivajo tudi razmere, pri katerih so celice rasle preden smo jih uporabili za test (predpostavljamo, da v sami izvedbi med posameznimi ponovitvami testa ni bilo bistvenih razlik). Prve tri ponovitve testa so bile namreč izvedene v treh zaporednih tednih v aprilu, zadnja pa avgusta, ko so bile temperature v prostoru, kjer smo kulture vzdrževali, višje in intenziteta sončne svetlobe večja. Še toliko bolj se je možen vpliv temperaturnih/svetlobnih razmer pokazal v primeru dveh ponovitev testa, ki sta bili izvedeni v času velike poletne vročine (konec junija in začetek julija), rezultati so bili namreč tako variabilni, da sta bili obe ponovitvi posledično neveljavni.

Zaključimo lahko, da so mešanice protirakavih učinkovin za *P. subcapitata* in morda tudi ostale mikroalge ter druge mikroorganizme (npr. cianobakterijo *S. leopoliensis*, kot so ugotovili Brezovšek in sod. (2014)) v intervalu EC_{10} - EC_{50} bolj toksične kot če vsako od izbranih protirakavih zdravil uporabimo posamezno. Vpliv je odvisen tako od koncentracije protirakavih zdravil kot tudi same sestave mešanice.

Izračunani CI in MDR so v intervalu EC_5 - EC_{20} oz. EC_{10} - EC_{20} enako opredelili skupen učinek sestavin mešanice, skoraj enak je bil tudi rezultat pri EC_{50} (Preglednici 7 in 8). To nakazuje, da tudi manj kompleksen izračun MDR (v primerjavi s CI) lahko zagotovi precej dobro oceno skupnega učinka sestavin mešanice. Kljub temu ocenjujemo, da lahko učinek mešanice bolj zanesljivo točno opredelimo na podlagi CI.

Oboji rezultati (CI in MDR) nakazujejo pomembnost vključevanja nizkih in visokih koncentracij testnih učinkovin v študije toksičnosti, saj je iz njih razvidno, da se učinki iste mešanice v odvisnosti od koncentracije lahko zelo razlikujejo.

5.2 NAPOVEDNA VREDNOST NAPOVEDNIH MODELOV TOKSIČNOSTI

Eksperimentalni podatki so v intervalu EC_{10} - EC_{50} pokazali večjo toksičnost v primerjavi z napovedano po obeh matematičnih modelih (CA in IA), pravilni pa sta bili samo napovedi za najnižjo in najvišjo koncentracijo (EC_5 in EC_{90} , ob upoštevanju intervalov zaupanja) (Slika 13). Nekoliko bližje eksperimentalnim rezultatom so bile napovedi po modelu CA, vendar sta se kljub temu tako IA kot CA izkazala za nezanesljivi orodji za napovedovanje toksičnosti mešanic izbranih protirakavih zdravil. Netočnost napovedi po obeh modelih so za dvojne mešanice protirakavih zdravil v koncentracijskem območju učinkovitih koncentracij EC_5 - EC_{90} ugotovili tudi Brezovšek in sod. (2014). Prav tako so do ugotovitve o netočnosti obeh napovedi v 50 % primerov prišli Cedergreen in sod. (2008), ki so testirali 98 različnih mešanic predvsem pesticidov in farmacevtskih učinkovin. Uporabili

so različne testne organizme (*P. subcapitata*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Tripleurospermum inodorum*, *Stellaria media*). Napoved po modelu IA je bila pravilna za približno 20 % mešanic, napoved po modelu CA za približno 10 % mešanic, le v primeru 10 % mešanic pa je bila napoved pravilna po obeh modelih.

5.3 VPLIV MEŠANICE PROTIRAKAVIH ZDRAVIL NA LASTNOSTI CELIČNE POVRŠINE

Kljub očitnim razlikam v agregiranosti (makroskopski vidik) biomase kontrole in kultur z dodano mešanico protirakavih zdravil (Slika 15), fotografije na mikroskopskem nivoju niso razkrile očitnih sprememb na površini celic (Slika 16). Predpostavljamo, da bi spremembe v agregiranosti alg lahko vplivale na položaj celic v vodnem stolpcu, kar bi lahko povzročilo za fotosintezo neoptimalno lego (Grewe in Markus, 2000). To bi potencialno lahko vodilo tudi v izumrtje določenih vrst primarnih producentov in s tem v zmanjšanje biodiverzitete in stabilnosti ekosistemov. Gre za nepričakovan in še neraziskan vidik učinka protirakavih zdravil na netarčne organizme, ki bi ga bilo potrebno osvetliti v nadaljnjih raziskavah.

5.4 STABILNOST PROTIRAKAVIH UČINKOVIN

Rezultati kemijske analize so pokazali, da so vsa tri uporabljena protirakava zdravila (FU, IM, ET) ob ustreznem načinu shranjevanja v časovnem obdobju nekaj mesecev (pri nizki temperaturi in v temi) stabilna (v okviru dopustnih meja iz smernice OECD TG 201 (2011)) (Preglednica 10).

Možnost, da alga *P. subcapitata* proizvaja uporabljenim protirakavim zdravilom podobne snovi, smo izključili s kontrolo (kultura brez dodanih protirakavih zdravil) – izmerjene koncentracije vseh treh protirakavih zdravil so bile v kontrolni kulturi 0 (Preglednica 9).

Dejanske (izmerjene) koncentracije ob t_0 za FU in IM niso močno odstopale od predvidenih (povprečno 1 oz. 6 %), medtem ko sta bili koncentraciji opazno manjši od pričakovanih v primeru ET (povprečno 34 %) (Preglednica 9). Ob hkratnem upoštevanju razlik med izmerjenimi koncentracijami na začetku in koncu testa (t_0 - t_3 ; Preglednica 9) lahko sklepamo, da FU v 72 urah pri izbranih eksperimentalnih razmerah razpade in/ali interagira s celicami le v majhnem deležu. V primeru IM sta razliki sicer veliki, vendar dodatni (predhodni) eksperimenti, ki niso bili del te naloge, kažejo, da povprečna razlika, merjena vsak dan eksperimenta, ne presega 20 %, torej ustreza zahtevani stabilnosti po smernici OECD TG 201 (2011). V primeru ET pa na podlagi teh razlik, relativno velikega odstopanja od pričakovane koncentracije že ob času t_0 , in rezultatov drugih (prehodnih) eksperimentov, katerih rezultati še niso bili objavljeni, sklepamo, da pri eksperimentnih razmerah dejansko pride do zelo hitrega razpada oz. metabolizma v prisotnosti celic, poleg delnega razpada/transformacije izhodnega protirakavega zdravila na izobarično spojino

(ET2; koncentracija ET1 se tako do časa t_3 zmanjša, koncentracija ET2 pa, obratno, poveča).

Zgolj na podlagi predstavljenih rezultatov ne moremo narediti trdnih zaključkov. Meritve bi bilo potrebno ponoviti večkrat in na večjemu številu vzorcev, da bi lahko izključili napake pri odvzemu, transportu in/ali analizah in prišli do statistično signifikantnih rezultatov. Prav tako bi za boljše ovrednotenje potrebovali oceno napake pri meritvah v sklopu kemijske analize (ki je nismo izvajali sami). Kljub vsemu (tudi zaradi upoštevanja pridobljenega podatka o nizkem deležu vezave v/na celično biomaso (podpoglavje 5.5)) sklepamo, da se izbrana protirakava zdravila v času poskusa pri eksperimentalnih razmerah in v stiku z algnimi celicami delno spremenijo, transformirajo in/ali razgradijo, čeprav naj bi bila načeloma slabo (bio)razgradljiva (Kosjek in Heath, 2011).

5.5 VEZAVA PROTIRAKAVIH UČINKOVIN NA/V CELICE

Iz naših rezultatov (pridobljenih samo na podlagi biomase kultur z dodanimi protirakavimi zdravili v nizkih EC) sklepamo, da v celice vstopi ali se na njihovo površino veže le majhen delež izbranih protirakavih zdravil (Preglednica 11). Do podobnega zaključka so prišli tudi Vannini in sod. (2014), ki so na istem testnem organizmu (*P. subcapitata*) testirali učinek različnih farmacevtsko aktivnih učinkovin. V celicah so zaznali prisotnost večine testiranih učinkovin, a le v sledovih.

Čeprav je s celicami interagiral le 0,01-0,1 % vseh protirakavih zdravil, ki so prišla v stik z njimi, je vseeno prišlo do inhibicije rasti alg (podpoglavje 5.1), kar je zelo zanimivo in pomembno z okoljskega in ekotoksikološkega vidika. Ugotovitev nakazuje, da toksičnosti protirakavih učinkovin za primarne producente ne bi smeli podcenjevati. Njihove učinek moramo interpretirati zelo previdno, saj so koncentracije protirakavih zdravil, ki so povezane s celicami, 1000 do 10000-krat nižje od začetnih koncentracij, katerim so bile celice izpostavljene. Poleg tega je potrebno upoštevati učinek (naravnih) vodnih medijev, ki so lahko zelo različni in kompleksni, in bi tudi lahko signifikantno vplivali na koncentracije s celicami povezanih protirakavih zdravil. Prav tako moramo upoštevati razliko med rastnimi razmerami tekom laboratorijskih testov (stalna osvetljenost, stalna optimalna temperatura za rast, zadostna količina hrane itd.) in naravnimi, kar tudi vpliva na dovzetnost algnih celih za delovanje protirakavih zdravil in drugih farmacevtsko aktivnih učinkovin.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov našega raziskovalnega dela smo prišli do sledečih zaključkov:

- mešanica izbranih protirakavih zdravil (FU+IM+ET) ima (na podlagi inhibicij rasti) v intervalu EC_{10} - EC_{50} bolj toksičen učinek na alga *P. subcapitata* kot vsako od izbranih treh protirakavih zdravil, če ga v enaki efektivni koncentraciji uporabimo posamezno. V primeru EC_5 in EC_{90} pa se učinka ne razlikujeta.
- kvantitativno (na podlagi CI) smo učinek izbrane mešanice protirakavih zdravil (FU+IM+ET) v primerjavi z učinkom posameznih treh protirakavih zdravil opredelili kot sinergističen v koncentracijskem intervalu EC_5 - EC_{50} , pri EC_{90} pa kot antagonističen.
- učinek trojne mešanice (FU+IM+ET) je (na podlagi inhibicij rasti) v intervalu koncentracij EC_5 - EC_{20} zelo podoben učinku dvojne mešanice FU+IM, v primeru EC_{50} in EC_{90} pa manjši od učinka dvojne mešanice FU+IM.
- učinek mešanice protirakavih zdravil je odvisen od njene sestave in EC.
- napovedi toksičnosti izbrane mešanice protirakavih zdravil za alga *P. subcapitata* po obeh matematičnih modelih (CA in IA) sta se v večini primerov izkazali za nepravilni. Izbrana modela nista zanesljiva metoda za napovedovanje učinka mešanic.
- mešanica protirakavih zdravil (FU+IM+ET) vpliva na agregiranost biomase na makroskopskem nivoju, na mikroskopskem nivoju učinka na lastnosti celične površine (z uporabljeno metodo) nismo zaznali.
- protirakava zdravila so po 72 urah s celicami testnega organizma povezana (vstop v celice, vezava na celice) le v zelo majhnem deležu (0,01-0,1 % od celotne uporabljene količine). Vendar se koncentracije vseh treh protirakavih zdravil v 72 urah (koncentracije v gojišču) zmanjšajo za več kot delež, vezan z biomaso, kar nakazuje, da pride do razpada, transformacije ali metabolizma izbranih protirakavih zdravil s strani celic testnega organizma, alge *P. subcapitata*.

7 POVZETEK

Protirakava zdravila se v okolju pojavljajo v nizkih koncentracijah, a hkrati v obliki kompleksnih mešanic, za katere obstaja vse več dokazov o večji toksičnosti od enostavnega seštevka toksičnosti njihovih sestavin. Zaradi potencialno nespecifičnega načina delovanja protirakavih zdravil je zelo verjetno, da lahko škodljivo vplivajo tudi na netarčne, predvsem evkariontske, organizme v različnih okoljih in s tem na celotne ekosisteme. Študije učinkov mešanic protirakavih zdravil na netarčne organizme so zaenkrat zelo redke. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kako se učinek mešanice treh izbranih protirakavih zdravil (FU+IM+ET) na primernega producenta, alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, razlikuje od učinka vsakega od teh protirakavih zdravil, če jih uporabimo posamezno v enaki efektivni koncentraciji (EC). FU (5-fluorouracil), IM (imatinib mezilat) in ET (etopozid) so tri za kemoterapijo pogosto uporabljena protirakava zdravila, zato je pričakovano njihovo skupno pojavljanje v okolju. Eksperimentalni del študije smo izvedli v skladu s priporočili v Evropski smernici OECD TG 201 (2011). Osnovna metoda je bil test inhibicije rasti. Ugotavljali smo celične gostote testnih kultur z dodanimi protirakavimi zdravili in kontrol preko analize vzorcev s pretočnim citometrom v določenih časovnih intervalih. Rezultati so pokazali, da ima izbrana mešanica (FU+IM+ET) v koncentracijskem intervalu EC₁₀-EC₅₀ res bolj negativen učinek na alga *P. subcapitata* v primerjavi z učinkom posameznega protirakavega zdravila v enaki EC, pri najvišji in najnižji uporabljeni EC (EC₅ in EC₉₀) pa so bili učinki podobni. Učinek trojne mešanice (FU+IM+ET) je bil zelo podoben učinku dvojne mešanice FU+IM v intervalu EC₅-EC₂₀, pri EC₅₀ in EC₉₀ pa manjši. Kvantitativno (CI) smo učinek mešanice v primerjavi z učinkom posameznih protirakavih zdravil v koncentracijskem območju EC₅-EC₅₀ opredelili kot sinergističen, pri EC₉₀ pa je bil učinek antagonističen. Ocenili smo tudi zanesljivost z uporabo matematičnih modelov napovedanih toksičnosti mešanice. Tako za model seštevka koncentracij (CA) kot neodvisnega delovanja (IA) se je izkazalo, da napovedi v večini primerov niso bile pravilne. Iz rezultatov kemijske analize stabilnosti protirakavih zdravil je razvidna pomembnost zaznavanja ne izključno izvornih učinkovin, saj lahko tako spregledamo prisotnost in vpliv potencialno prisotnih metabolitov oz. transformacijskih produktov (v primeru naše študije smo zaznali izobarično spojino etopozida). Na podlagi rezultatov kemijske analize biomase smo zaključili, da protirakava zdravila interagirajo s celicami testnega organizma. Koncentracije, ki so povezane s celicami, predstavljajo le 0,01-0,1 % začetnih koncentracij, katerim so bile celice izpostavljene, kar pa očitno zadošča za vpliv na celično rast.

Rezultati naše študije dokazujejo pomembnost nadaljnega ugotavljanja toksičnosti mešanic (in ne le posameznih) protirakavih zdravil za netarčne organizme, saj bomo le tako lahko pravilno ovrednotili tveganje, ki ga predstavljajo za okoljske ekosisteme, in na podlagi tega ustrezno ukrepali (npr. v smeri zmanjševanja izločanja protirakavih zdravil v okolje in razvoja bolj učinkovitih načinov čiščenja odpadnih voda).

8 VIRI

- Aherne G. W., Hardcastle A., Nield A. H. 1990. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42, 10: 741-742
- al-Ahmad A., Kümmerer K., Schön G. 1997. Biodegradation and toxicity of the antineoplastics mitoxantron hydrochloride and treosulfane in the Closed Bottle Test (OECD 301 D). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 5: 704-711
- al-Ahmad A., Kümmerer K. 2001. Biodegradation of the antineoplastics vindesine, vincristine, and vinblastine and their toxicity against bacteria in the aquatic environment. *Cancer Detection and Prevention*, 25, 1: 102-107
- Altenburger R., Greco W. R. 2009. Extrapolation concepts for dealing with multiple contamination in environmental risk assessment. *Integrated Environmental Assessment Management*, 5, 1: 62-68
- Arrhenius A., Gronvall F., Scholze M., Backhaus T., Blanck H. 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology*, 68, 4: 351-367
- Aruoja V. 2011. Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of the chemicals and synthetic nanoparticles. Doctoral Dissertation. Tartu, Estonian University of Life Sciences: 111 str.
- Backhaus T., Altenburger R., Boedeker W., Faust M., Scholze M., Grimme L. H. 2000. Predictability of the toxicity of multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 9: 2348-2356
- Backhaus T., Arrhenius A., Blanck H. 2004a. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: Predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environmental Science and Technology*, 38, 23: 6363-6370
- Backhaus T., Faust M., Scholze M., Gramatica P., Vighi M., Grimme L. H. 2004b. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2: 258-264
- BC Cancer Agency. 2007. BCCA cancer drug manual© - Imatinib. Vancouver, BC Cancer Agency: 8 str.
http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/D7ACAA43-3160-4998-9BFB-4B7AA62040A4/52869/ImatinibMonograph_1Feb07.pdf (10. sept. 2014)
- BC Cancer Agency. 2012. BCCA cancer drug manual© - Fluorouracil. Vancouver, BC Cancer Agency: 12 str.
http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/1B7ACB80-4AB6-4D20-BC19-A8BD61258BBB/57273/fluorouracilmonograph_1May2012_formatted.pdf (10. sept. 2014)

- BC Cancer Agency. 2015. BCCA cancer drug manual© - Etoposide. Vancouver, BC Cancer Agency: 11 str.
http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/337DA0E5-D776-4348-A1B2-468EA6ECB58B/73849/Etoposide_monograph_9Jan2015_LR_phosphate_formatte.pdf (22. jan. 2015)
- Berenbaum M. C. 1989. What is synergy? *Pharmacological Reviews*, 41: 93-141
- 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
- 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
- Bristol-Myers Squibb. 2008. VEPESID® product monograph. Montreal, Bristol-Myers Squibb Canada: 20 str.
- Brown M., Wittwer C. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46, 8: 1221-1229
- 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 surface waters. *Environmental Science and Technology*, 40, 23: 7242-7250
- Cedergreen N., Kudsk P., Mathiasen S., Streibig J. C. 2007. Combination effects of herbicides: Do species and test system matter? *Pest Management Science*, 63, 3: 282-295
- Cedergreen N., Christensen A. M., Kamper A., Kudsk P., Mathiasen S. K., Streibig J. C., Sørensen H. 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 7: 1621-1632
- Catastini C., Mullet J. U., Boukari S., Mazellier P., Levi Y., Cervantes P., Ormsby J. N. 2008. Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *European Journal of Water Quality*, 39, 2: 171-180
- Chabner B. A., Longo D. L. 2001. *Cancer chemotherapy and biotherapy*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 848 str.
- Champoux J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 369-413
- ChEBI. 2014. The database and ontology of chemical entities of biological interest. Cambridge, EMBL-EBI; baza podatkov
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/> (15. okt. 2014)

- Chen C. Y., Lu C. L. 2002. An analysis of the combined effects of organic toxicants. *Science of the Total Environment*, 289, 1-3: 123-132
- Chen E. X. 2013. Pharmacology of anticancer drugs. V: *The basic science of oncology*. 5th ed. Tannock I. F., Hill R. P., Bristow R. G., Harrington L. (eds.). New York, McGraw-Hill: 575 str.
- 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. 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, 70, 2: 440-446
- Chu E. 2007. Ode to 5-Fluorouracil. *Clinical Colorectal Cancer*, 6, 9: 609-609
- Coetsier C. M., Spinelli S., Roig B., Touraud E. 2009. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environment International*, 35, 5: 787-792
- 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.
- Eggen R. I., Hollender J., Joss A., Schaerer M., Stamm C. 2014. Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: the benefits of upgrading wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, 48, 14: 7683-7689
- Etiel A., Scherrer M., Kümmerer 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 fluorimetric measurement in algal toxicity test. *Acta Biologica Slovenica*, 55, 2: 3-11
- European Commission. 2002a. Guidance document of aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. Sanco/3268/2001 rev 4, final. Brussels, European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General: 62 str.
- European Commission. 2002b. Guidance document on terrestrial ecotoxicology under council directive 91/414/EEC. Sance/10329/2002 rev 2, final. Brussels, European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General: 39 str.
- Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M., Grimme L. H. 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56, 1: 13-32
- 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

- Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140-141: 353-365
- Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 2: 122-159
- Ford J. M. 2000. STI571 (formerly CGP 57 148 B) investigators brochure. Basel, Novartis Pharma AG: 77 str.
- Ganta S., Amiji M. 2009. Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Molecular Pharmaceutics*, 6, 3: 928-939
- Gessner P. K. 1988. A straightforward method for the study of drug interactions: isobolographic analysis primer. *Journal of the American College of Toxicology*, 7: 987-1012
- Goldin A., Mantel N. 1957. The employment of combinations of drugs in the chemotherapy of neoplasia: a review. *Cancer Research*, 17, 7: 635-654
- Gomez M. J., Martinez Bueno M. J., Lacorte S., Fernandez-Alba 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
- 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: 332-385
- Grewe M., Markus M. 2000. Aggregation to colonies of the green alga *Pediastrum*: experiments and simulations. *Journal of Biological Systems*, 8, 4: 373-398
- 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
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P. F., Ingerslev F., Holten-Lützhøft H. C., Jørgensen S. E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, 36, 2: 357-393
- Han G. H., Hur H. G., Kim S. D. 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1: 265-271
- Hande K. R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34, 10: 1514-1521
- Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 4861: 42-52
- Hass U., Scholze M., Christiansen S., Dalgaard M., Vinggaard A. M., Axelstad M., Metzdorff S. B., Kortenkamp A. 2007. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1: 122-128
- Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131, 1-2; 5-17

- Hirose J., Kondo F., Nakano T., Kobayashi T., Hiro N., Ando Y., Takenaka H., Sano K. 2005. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis. *Chemosphere*, 60, 8: 1018-1024
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Kranj, Kemomed: 64 str.
- Joensuu H., Roberts P. J., Sarlomo-Rikala M., Andersson L. C., Tervahartiala P., Tuveson D., Silberman S., Capdeville R., Dimitrijevic S., Druker B., Demetri G. D. 2001. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *New England Journal of Medicine*, 344, 14: 1052-1056
- John D. M., Tsarenko P. M. 2003. Order Chlorococcales. V: The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. John D. M., Whitton B. A., Brook A. J. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 361-361.
- Johnson A. C., Jürgens M. D., Williams R. J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J. P. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348, 1-2: 167-175
- Junghans M., Backhaus T., Faust M., Scholze M., Grimme L. H. 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Management Science*, 59, 10: 1101-1110
- 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
- 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
- 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
- Kortenkamp A., Faust M., Scholze M., Backhaus T. 2007. Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental Health Perspectives*. 115, 1: 106-114
- Kortenkamp A., Backhaus T., Faust M. 2009. State of the art report on mixture toxicity. Brussels, European Commission: 31 str.
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf (10. sept. 2014)
- Kosjek T. 2009. Occurrence, Fate and removal of pharmaceutical residues in water treatment. Doctoral Dissertation. Ljubljana, Jožef Stefan International Postgraduate School: 223 str.

- Kosjek T., Heath E. 2011. Occurrence, fate and determination of cytostatic 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
- Kovalova L. 2009. Cytostatics in the aquatic environment: analysis, occurrence, and possibilities for removal. Doctoral Dissertation. Aachen, RWTH Aachen University: 76 str.
- Kotnik V., Čurin Šerbec V., Hartman Pretnar K., Ihan A., Jeras M., Kopitar A. N., Malovrh T., Simčič S., Stopinšek S., Skvarč M., Vidan Jeras B., Wraber B. 2010. Imunološki priročnik. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo: 194 str.
- Kurkjian C., Kummar S. 2009. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. *American Journal of Therapeutics*, 16, 5: 412-420
- 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 Effluent. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 25, 4: 166-172
- Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M. 1997. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, 31, 11: 2705-2710
- 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, 7: 767-773
- Kümmerer K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources e a review. *Chemosphere*, 45, 6-7: 957-969
- Kümmerer K., al-Ahmad A. 2010. Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environmental Science and Pollution Research International*, 17, 2: 486-496
- Lambert L., Qiao N., Hunt K., Lambert D., Mills G., Meijer L., Keyomarsi K. 2008. Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model. *Cancer Research*, 68, 19: 7966-7974
- Lenz K., Mahnik S. N., Weissenbacher N., Mader R. M., Krenn P., Hann S., Koellensperger G., Uhl M., Knasmueller S., Ferk F., Bursch W., Fuerhacker M. 2007. Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. *Water Science and Technology*, 56, 12: 141-149
- Lewis M. A. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution*, 87, 3: 319-336

- Loewe S., Muischnek H. 1926. Über Kombinationswirkungen. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 114, 5: 313-326
- Ma J., Chen J., Wang P., Tong S. 2008. Comparative sensitivity of eight freshwater phytoplankton species to isopropyl carb, propargite, flumetralin and propiconazole. Polish Journal of Environmental Studies, 17, 4: 525-529
- 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
- McCarty L. S., Borgert C. J. 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 45, 2: 119-143
- McLafferty F. W., Tureček F. 1993. Interpretation of mass spectra. 4th ed. Mill Valley, University Science Books: 371 str.
- 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
- Miege C., Favier M., Brosse C., Canler J. P., Coquery M. 2006. Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta, 70, 4: 739-744
- Moldovan Z. 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. Chemosphere, 64, 11: 1808-1817
- Nabholtz J. M., Riva A. 2001. The choice of adjuvant combination therapies with taxanes: rationale and issues addressed in ongoing studies. Clinical Breast Cancer, 2, 1: S7-S14
- 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
- Nygaard G., Komárek J., Kristiansen J., Skulberg O. M. 1986. Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL 1 (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. Copenhagen, Council for Nordic Publications in Botany: 46 str.
- Ocvirk J. 2009. Advances in the treatment of metastatic colorectal carcinoma. Radiology and Oncology, 43, 1: 1-8
- OECD TG 201. 2011. Guidelines for the testing of chemicals: Section 2: Effects on biotic systems Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Paris, OECD Publishing: 25 str.

- Pei H., Ma J. 2002. Study on the algal dynamic model for West Lake, Hangzhou. *Ecological Modelling*, 148: 67-77
- Petersen K., Heiaas H. H., Tollefsen K. E. 2014. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. *Aquatic Toxicology*, 150: 45-54
- Pfleeger T. G., Mcfarlane J. C., Sherman P., Volk G. 1991. A short-term bioassay for whole plant toxicity. V: *Plants for toxicity assessment*. Vol. 2 (STP 1115). Gorsuch J. W., Lower W. P. Wang W., Lewis M. A. (eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials: 355-364
- Piccart-Gebhart M., Burzykowsk T., Buyse M., Sledge G., Carmichael J., Lück H., Mackey J., Nabholtz J., Paridaens R., Biganzoli L., Jassem J., Bontenbal M., Bonnetterre J., Chan S., Basaran G., Therasse P. 2008. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 12: 1980-1986
- Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Luciani F., Zuccato E. 2008. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Science*, 102, 1: 129-137
- Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry and Biology*, 17, 5: 421-33
- Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A. 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no- observed- effect concentration dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives*, 110, 9: 917-921
- Rey R. P., Padrón A. S., León L. G., Pozo M. M., Baluja C. 1999. Ozonation of Cytostatics in Water Medium. Nitrogen Bases. *Ozone: Science and Engineering*, 21, 1: 69-77
- Schimmer A. D., Tannock I. F. 2013. Discovery and evaluation of anticancer drugs. V: *The basic science of oncology*. 5th ed. Tannock I. F., Hill R. P., Bristow R. G., Harrington L. (eds.). New York, McGraw-Hill: 575 str.
- 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
- Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Schecker J. 1996. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 726, 1-2: 179-184
- Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A. 1997. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, 2: 174-179
- 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

- Tauxe-Wuersch A., Felipe de Alencastro L., 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
- Ternes T. A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32, 11: 3245-3260
- TOXNET. 2015. Hazardous Substances Data Bank (HSDB) - Etoposide. Bethesda, U.S. National Library of Medicine: 86 str.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~Nu4PiW:1> (1. feb. 2015)
- Valcárcel Y., González Alonso S., Rodríguez-Gil J. L., Gil A., Catalá M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84, 10: 1336-1348
- van Heijnsbergen E., Schmitt H. 2008. Risks of cytostatics in the aquatic environment – a Dutch case study. *H2O_The Dutch Journal for Water Management*, 18: 5 str.
<http://www.groenegezondheid.nl/admin/myuploads/Media/Risks%20of%20cytostatics%20in%20the%20aquatic%20environment%20Heijnsbergen%20Schmitt%202008.pdf> (6. sept. 2014)
- Vannini C., Domingo G., Marsoni M., De Mattia F., Labra M., Castiglioni S., Bracale M. 2014. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 101, 2: 459-465
- Veranič P., Romih R., Pšeničnik M. 2003. Praktični pouk celične biologije. 1. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 118 str.
- 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
- Wassmann B., Scheuring U., Pfeifer H., Binckebanck A., Käbisch A., Lübbert M., Leimer L., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann O. G. 2003. Efficacy and safety of imatinib mesylate (Glivec) in combination with interferon-alpha (IFN-alpha) in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Leukemia*, 17, 10: 1919-1924
- WHOCC. 2013. ATC/DDD index. Oslo, WHOCC: 1 str.
http://www.whooc.no/atc_ddd_index/?code=L01 (11. jun. 2014)
- Wilson C. J., Brain R. A., Sanderson H., Johnson D. J., Bestari K. T., Sibley P. K., Solomon K. R. 2004. Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology*, 38, 32: 6430-6439
- Xu H., Lv M., Tian X. 2009. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003-2007. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3: 327-349

- 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
- 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
- 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
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*, 355, 9217: 1789-1790
- Žegura B., Štraser A., Filipič M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation Research*, 727, 1-2: 16-41

ZAHVALA

Zahvaliti se želim:

Oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo, za omogočeno izvedbo magistrskega dela v okviru evropskega projekta CytoThreat.

Somentorici in delovni mentorici dr. Tini Eleršek, za vso pomoč, usmerjanje in svetovanje, dostopnost, odprtost, potrpežljivost in nalezljivo dobrovoljnost.

Mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, recenzentki prof. dr. Maji Čemažar in prof. dr. Metki Filipič, za pregled magistrske naloge, popravke in nasvete.

Staršem, ki so mi omogočili brezskrbna študentska leta.

Iskrena hvala.