МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински факултет

Катедра по фармакология и токсикология

д-р Божил Стефанов Робев

Сравнително клинично проучване на ефекта от лечението с комбинирана химиотерапия с цисплатин върху плазмения антиоксидантен капацитет на пациенти с белодробен карцином

АВТОРЕФЕРАТ
На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна специалност: ФАРМАКОЛОГИЯ (ВКЛ. ФАРМАКОКИНЕТИКА И ХИМИОТЕРАПИЯ)

Научен ръководител: **Доц. д-р Румен Павлов Николов, дм**

Доц. Вера Ангелова Хаджимитова, дбф

София, 2019 г.

Дисертацията съдържа 121 стандартни машинописни страници, 24 фигури, 1 таблица и 152 литературни източници.

Дисертационния труд е обсъден, одобрен и насочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по фармакология и токсикология на Медицинския факултет, Медицинския университет – София, проведен на 21.05.2019 година

Защитата ще се състои на 26 август от 11 часа в Катедрата по фармакология и токсикология на МУ – София, пред научно жури, назначено със заповед на Ректора на МУ – София №РК36-1027/24.06.2019 г.

На пъвото си заседание научното жури определи:

Председател проф. д-р Красимира Симеонова Якимова, дмн- рецензент

проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, дм - рецензент

Становищата се изготвят от:

- Проф. д-р Мила Василева Власковска, дмн
- Проф. д-р Людмил Пейчев Пейчев, дм
- Доц. д-р Галя Цветанова Ставрева, дм.

Съкращения

5-HT - 5-hydroxytryptamine

AKT – serine/threonine-specific protein kinase

АО–antioxidant/антиоксидант

CAV - cyclophosphamide-adriamycin-vincristine

ECOG - Eastern Cancer Cooperation Group

PI3K - phosphatidyl-inositol-3-kinase

PI3K /AKT phosphatidylinositol 3-kinase -Akt Pathway

MAPK – Mitogen-activated protein kinases

MDA – malondialdehyde

MYC – MYC proto-oncogene

NNK - 4- (methylnitrosamine) -1- (3-pyridyl) -1 -butanone

NSCLS – non-small cell lung carcinoma

RAS - reticular activation system

SCLC - small cell lung carcinoma

SOD – superoxide dismutase

АФК – активни форми на кислорода

БОНД - Българско онкологично научно дружество

ESMO - European Society of Medical Oncology

ПКК – пълна кръвна картина

ТБА – активни продукти (TBA-RS) – продукти, които реагират с тиобарбитурова киселина

TEAC - trolox equivalent antioxidant capacity

СЪДЪРЖАНИЕ

I.ВЪВЕДЕНИЕ…… **3**
II.ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ…….. **6**
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ …… **7**
III.1.Клиничен дизайн и диагностични методи …… **7**
III.2.Експериментални методи за определяне на плазмена антиоксидантна активност …… **8**
IV. РЕЗУЛТАТИ …… **12**
IV.1. Описание на пациентите …… **12**
IV.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на пациентите …….. **12**
IV.2.1. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет по отношение на супероксидни радикали. …… **13**
IV.2.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет по отношение на хипохлоритни йони (хипохлориста киселина). …… **20**
IV.3. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите, определен чрез TBA-RS. …… **26**
IV.4. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите, определен чрез ABTS метод. …… **33**
V. ДИСКУСИЯ …….. **36**
VI. ИЗВОДИ …….. **41**
VII. ПРИНОСИ …….. **43**
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД …… **44**
IX. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ…… **45**

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на белия дроб е водещата причина за смъртта от онкологични заболявания в световен мащаб от 1985 г. насам, като България не прави изключение от общата тенденция. Публикуваните данни от Българския национален раков регистър – „Заболеваемост от рак в България, 2014 и 2015“ показват, че за 2015 г. броят на регистрираните нови случаи на злокачествени новообразувания с локализация бронхи и бял дроб е 3794 (52,9/100000), което е 12,2 % от всички новодиагностицирани. Годишната смъртност от рак на белите дробове е приблизително равна на смъртността от такива онкологични заболявания като рак на простатата, гърдата и дебелото черво, взети заедно. Петгодишната честота на преживяемост за рак на белите дробове е около 15 %. Около 70 % от пациентите се диагностицират в напреднал (трети и четвърти) стадий на заболяването. Хистологично белодробният карцином бива дребноклетъчен и недребноклетъчен (аденокарцином, плоскоклетъчен карцином, едроклетъчен карцином). Често се описват и смесени форми. Недребноклетъчният белодробен карцином е 85 % от всички видове белодробен рак.

Като рисков фактор, свързан с появата на рак на белия дроб, основно се посочва тютюнопушенето. Приблизително 85% от случаите се появяват при настоящи или бивши пушачи – цигареният дим съдържа полициклични ароматни въглеводороди като бензопирен, специфични за тютюна нитрозамини, като 4- (метилнитрозамино) -1- (3-пиридил) -1 -бутанон (NNK) и ароматни амини, -аминобифенил, които са с доказана причинно-следствена връзка с рака. През годините са проведени проучвания, доказващи влиянието на генетични фактори (доказана е връзката на фамилна анамнеза за рак на белия дроб с повишен риск за развитие на болестта при непушачи), инфекциозни

заболявания, замърсеност на въздуха. Някои фактори изтъкват дори връзка между пола на пациентите и заболеваемостта и смъртността. Като едно от предполагаемите обяснения за тези различия, свързани с пола, е разликата при метаболитно активиране или детоксикация на белодробни канцерогени, а именно при клирънса на плазмения никотин от ензимите на цитохром P_{450}.

Оптималното лечение на пациентите при локално авансирало заболяване, каквито са повечето случаи, остава противоречиво. При неподходящи за радикално хирургично лечение случаи се препоръчва лъчетерапия или комбинирана химиотерапия 4-6 цикъла, съобразена с общото състояние и съпътстващи заболявания на пациента. Настоящата практика за лечение на NSCLC включва циплатина или основана на карбоплатина комбинирана терапия. Никой от нововъведените агенти като винорелбин, гемцитабин, доцетаксел или паклитаксел не намират самостоятелно място в лечението на рака на белия дроб и те остават в допълнение към платината или като втора линия. SCLC се характеризира с бързо разпространение и се счита за системно заболяване. Той е чувствителен към химиотерапия, като комбинацията от циклофосфамид-адриамицин-винкристин (CAV) е успешно използвана за лечение на SCLC повече от 30 години. Днес стандартът на грижата за доброто състояние на пациентите е комбинация от етопозид с цисплатин или карбоплатин.

Съществуват редица данни, доказващи взаимовръзката между оксидативния стрес и патофизиологичния механизъм на развитие на онкологичните заболявания. През годините има множество доказателство за приноса на свободните радикали в механизмите на сигнална трансдукция при инициирането, осигуряването на преживяемостта, ангиогенезата и метастазирането на раковите клетки в процеса на развитие на неопластичните процеси. Доказано е повишено генериране на свободни радикали в сравнение с нормалните

клетки, изменения в системите за регулиране на редокс хомеостазата, установени са редокс чувствителни гени – замесените в препрограмирането на метаболизма на раковите клетки и кодиращи транскрипционни фактори, отговорни за контрола на клетъчния цикъл, апоптозата и малигнената трансформация, като RAS, MYC и AKT. Установено е, че свободните радикали медиират метастазирането при различни видове ракови клетки чрез регулиране на транскрипционните фактори и сигналните компоненти, включително MAPK и PI3K/AKT пътищата, HIF и EMT регулатора Snail.

Тези факти превръщат проследяването на антиоксидантния статус на пациенти през отделните етапи от лечението им важно, с цел събиране на допълнителна информация, можеща да даде насоки за оптимизиране на терапията.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е да се установи влиянието на стандартна комбинирана химиотерапия върху антиоксидантния статус на пациенти с белодробен карцином и да се потърси връзка с тежестта и прогнозата на заболяването, което би могло да се използва при оценката и подбора на терапевтичната стратегия.

За осъществяване на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Избор на критерии и подбор на пациенти (на базата на клинични и диагностични изследвания), планирани за провеждане на противотуморна химиотерапия в Клиниката по Хематология и онкология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски".

2. Хемилуминесцентно определяне на антиоксидантните свойства на кръвната плазма спрямо супероксиден радикал и хипохлоритен анион преди и след провеждане на противотуморната комбинирана терапия.

3. Определяне на оксидативния статус на пациентите посредством измерване количеството на ТБА – активни продукти в кръвната плазма и тоталния антиоксидантен капацитет на различни етапи от противотуморното лечение.

4. Сравнение на резултатите във всяка една от изследваните групи пациенти – изходен статус, хистологичен вид на тумора, използвана комбинирана химиотерапия и търсене на корелационни зависимости между получените резултати за оксиредукционния статус и клиничните данни.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III.1. Клиничен дизайн и диагностични методи

В изследването са включени пациенти с хистологично доказан белодробен карцином, планирани за провеждане на химиотерапия и приети в Клиниката по Хематология и онкология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски" за периода от април 2017 до април 2018 г. Снета е анамнеза по данни на болния и придружаващата медицинска документация и е оценено обективното състояние на пациента. Диагностичните методи включват използването на лабораторни методи (ПКК и обща биохимия), методи за образна диагностика (рентгенография на бял дроб и сърце, ехография на коремни орани, компютърна томография, ядрено-магнитен резонанс) и патоморфологична хистологична верификация. От проучването са изключени пациентите, имащи сърдечносъдови, чернодробни и метаболитни заболявания, както и болни, приемащи хранителни добавки на билкова основа.

Цитостатичното лечение при проследяваните пациенти е съобразено с алгоритмите на БОНД (Българско онкологично научно дружество) и препоръките на ESMO (Европейско дружество по медицинска онкология). Използвани са схеми на лечение с цисплатин 75 mg/m^2 телесна повърхност на ден 1-ви и етопозид 100 mg/m^2 ден 1-ви – 3-ти или цисплатин 30 mg/m^2 и иринотекан 65 mg/m^2 ден 1-ви и ден 8-ми при дребноклетъчен рак на белия дроб. При недребноклетъчен рак на белия дроб схемите за лечение включват цисплатин 75 mg/m^2 ден 1-ви и гемцитабин 1200 mg/m^2 ден 1-ви и 8-ми през 21 дни. Дозите на цитостатиците и таргетните препарати са били адаптирани съгласно ECOG статуса на пациентите и кръвните им показатели. Прилагана е анти-еметичната профилактика – 5-HT3 антагонисти и дексаметазон. Цикълът на химиотерапия се повтаря на

21-дневни интервали (вторият химиотерапевтичен цикъл започва на ден 22). Планираният брой на химиотерапия цикли е шест, което съответства на продължителност от 4½ - 5 месеца лечение.

III.2. Експериментални методи за определяне на плазмена антиоксидантна активност

Спектрофотометрични методи

Определянето на оксидативния статус на пациентите беше осъществено посредством измерването на ТБА – активните продукти (TBA-RS) в кръвната плазма на пациентите и оценяване на тоталната ù антиоксидантна активност в моделна система, съдържаща стабилния ABTS радикал.

- **Определяне на ТБА – активни продукти (TBA-RS)** по метода на Asakawa and Matsushita [1980] – Този класически метод е приложен в два варианта: определено е нативното количество на TBA-RS и е определено максималното количество TBA-RS за всеки пациент, като последното изпълнява ролята на автоконтрола. В 1 ml фосфатен буфер с pH 7.4 са добавени 0.1 ml кръвна плазма, или 0.1 ml кръвна плазма и FeCl2 с крайна концентрация 0.1 mmol/L. За всеки пациент са приготвени по три идентични проби от всеки вид. Така подготвените проби са инкубирани за 30 мин. при 37°C. След това към реакционната смес са добавени по 0.5 ml от 0.5% разтвор на тиобарбитурова киселина и 0.5 ml от 2.8% разтвор на трихлороцетна киселина. Следва повторна инкубация при 100°C на водна баня в продължение на 20 мин. и центрофугиране на 3000 rpm за 20 мин. Екстинкцията на супернатантата е измерена при 532 nm. По-голямата екстинкция съответства на по-голямо количество TBA-RS продукти в пробата. Резултатите, получени за всеки пациент, са представени като

MDA еквивалент с помощта на калибровъчна крива, даваща връзка между концентрацията на MDA и екстинкцията при 532 nm.

- **Определяне на тоталната антиоксидантна активност чрез ABTS метод** – експериментите са проведени съгласно Re et al. [1999]. Към 2 ml от ABTS●+ са добавяни 10 µl кръвна плазма. Намаляването на екстинкцията е измерено на двадесетата минута, при 734 nm. Стойността на екстинкцията за контролите при 734 nm е 0.700 ± 0.01. Експериментите са проведени с по три идентични проби от всеки вид за дадения пациент. Антиоксидантният капацитет на плазмата за съответния пациент е определен, като разликата в екстинкцията на контролата и пробата е отнесена към екстинкцията на контролата в проценти.

Хемилуминесцентни методи

За регистрирането на способността на кръвната плазма на пациентите да понижава концентрацията на АФК, свързани с патофизиологичния модел на заболяването, в хемилуминесцентните системи е използван хемилуминометър LBK 1251 (Bioorbit, Turku, Finland), свързан посредством сериен порт с компютър. Събирането на получените данни в цифров вид и последващата им обработка са осъществени чрез MultiUse програмен продукт версия 1.08 (Bioorbit). Хемилуминометърът е свързан с автоматичен диспенсър, чрез който се осъществява впръскването в пробата на реагента, стартиращ процеса. Всички изследвания са проведени при температура 37°C. Резултатите са обработени, като изчислената площ под хемилуминесцентната крива, получена при генерирането на съответната система АФК, е означена като CL отговор и е мярка за генерирането ù. Отношението между CL отговор в присъствие на изследваните хидразони и този на контролните проби, изразено в проценти, е означено като хемилуминесцентен скевинджър индекс (CL-SI). Той е мярка за антиоксидантните свойства на изследваните съединения.

- Луминол-зависима хемилуминесценция в система на генерация на супероксид от KO_2

В 1 ml PBS буфер, pH 7.4, се съдържат 0.1 mmol/L луминол и плазма от пациенти с рак на белия дроб в указаните на фигурите концентрации. В контролните проби не е добавяно от плазмата. Измерването на хемилуминесцентният отговор започва непосредствено след добавянето на 20 μl KO_2, разтворени в DMSO.

- **Луминол-зависима хемилуминесценция в система на генериране на OCl— от NaOCl**

В 1 ml 50 mM K2HPO4/KH2PO4 буфер, pH 7.4, се съдържат 0.1 mmol/L луминол, 0.06 mmol/L NaOCl и изследваните проби в указаните на фигурите концентрации. Контролните проби не съдържат плазма. Хемилуминесцентният отговор е измерен за 1 минута, като е зададено програмата да отчита стойностите на всеки 50 ms.

Статистически методи

За статистически анализ и графично представяне на резултатите е използвана програмата Microsoft Office Excel 2010.

За всеки пациент, по всеки отделен метод е направена дескриптивна статистика и стойностите са представени като средна стойност и стандартно средноквадратично отклонение.

За всяка група пациенти (извадка) е определена медиана (median) на измерените експериментални стойности. За графично представени е използвана графика тип кутия („box plot”) с означени медиана, 1-ва и 3-та квартили, минимум и максимум, определени от стойностите на получените резултати за дадена извадка.

За сравняване на резултатите от различните извадки е използван модулът Data Analysis от Microsoft Office Excel 2010. Използва се тест за проверка на еднаквост на дисперсията – тест на Fisher (функция „F-Test Two-Sample for Variance“). В зависимост от резултата му сравнение на измерените стойности от различните извадки е направено чрез параметричен тест на Student (функции „t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances“ и „t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances“). Използва се нулева хипотеза, че няма статистически значима разлика в измерените стойности за различните извадки. Приетото ниво на съгласие е $P = 0,05$, т.е. нулевата хипотеза се отхвърля при $P < 0,05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ

IV.1. Описание на пациентите:

Пациенти	Брой
Пол	
Мъже	*24 (80%)*
Жени	*6 (20%)*
Навици за пушене	
Непушачи	*6 (20%)*
Бивши пушачи	*10 (33.3 %)*
Пушачи	*14 (46.7 %)*
Възраст	
Интервал	*46 - 74*
Медиана	*60*
BMI	
Интервал	*22 – 39*
Медиана	*26*

IV.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на пациентите

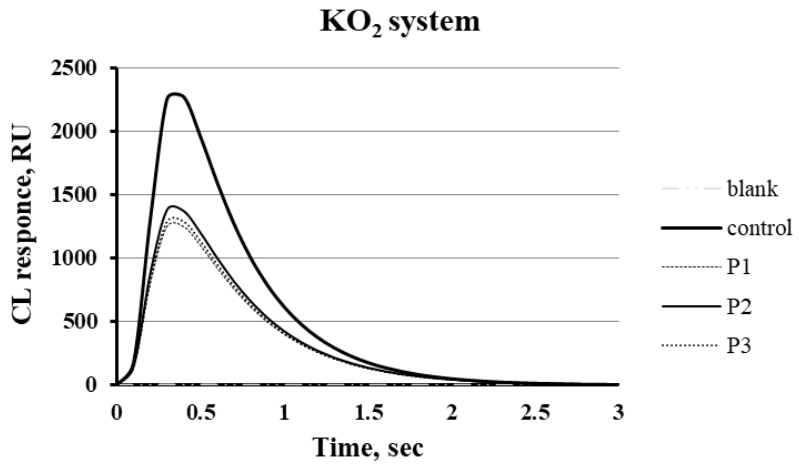
Експериментите имат за цел да оценяват антиоксидантния капацитет на кръвната плазма на пациентите спрямо два вида АФК: супероксидни радикали и хипохлоритни йони. Това са АФК, които имат отношение към иницииране на оксидативното увреждане. Способността да се елиминират този тип радикали ще даде допълнителна информация за евентуални промени в антиоксидантния статус на пациентите.

IV.2.1. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет по отношение на супероксидни радикали

Супероксидните радикали дават началото на всички останали АФК, които се генерират в организма, без предизвиканите от йонизиращи лъчения. Те се получават като страничен продукт при работата на дихателната верига в митохондриите, при работата на чернодробните ензимни системи в процеса на разграждане на ксенобиотиците, при кислородния взрив на фагоцитите и др.

Изследване на капацитета на кръвната плазма да елиминира тези радикали ще даде важна информация за оксидантния статус на пациентите. Елиминирането на супероксидните радикали се осъществява благодарение на SOD ензимите, съдържащи се в плазмата и благодарение на молекулите със скевинджърни свойства в нея.

За да изследваме капацитета на кръвната плазма за елиминиране на супероксида, използвахме система, генерираща супероксидни радикали, които бяха регистрирани с помощта на луминол-зависима хемилуминесценция. Светенетето на луминола е пропорционално на количеството радикали, които се формират в пробата. Количеството на излъчената светлина, получено в тази контролна проба, се сравнява със светенето на пробата, в която е добавена кръвната плазма. Отношението на двата сигнала в проценти е наречено хемилуминесцентен скевинджър индекс (CL-SI) и той е максимално 100 % за контролата. Колкото е по-малка неговата стойност, толкова по-голям е антиоксидантния капацитет на добавената плазма. Типични хемилуминесцентни криви са показани на

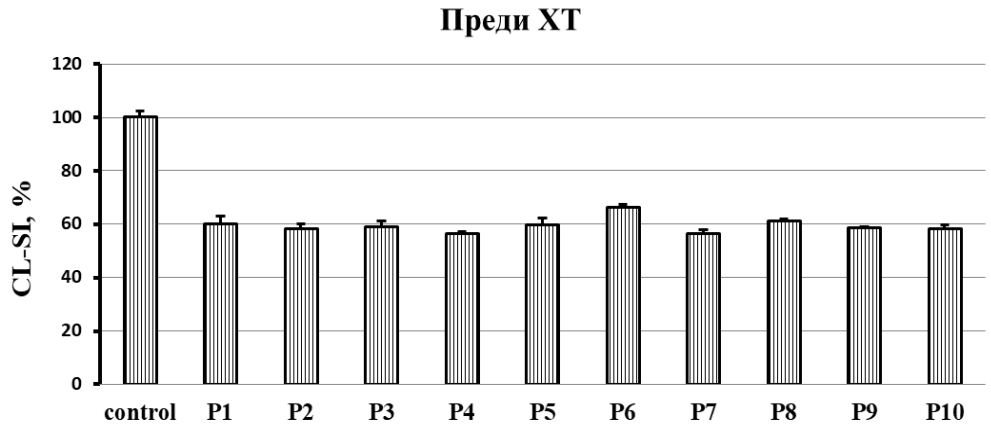


Фигура IV.1. Типични хемилуминесцентни криви, получени при изследване на антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на трима произволно избрани пациенти спрямо супероксидни радикали

На **Фигура IV.1.** кривата с най-голяма амплитуда съответства на контролата, която съдържа луминол и супероксид с концентрация, съответстваща на типични стойности на супероксидната генерация по време на кислородния взрив на фагоцитите. При добавяне на KO_2 към пробата се получава супероксид, който при взаимодействието си с луминола води до генериране на светене на възбудената от взаимодействието със супероксида молекула. Количеството излъчени фотони е пропорционално на количеството супероксид в системата – това е хемилуминесцентния отговор на системата. Хемилуминесцентният отговор математически представлява интеграла под кривата на **Фигура IV.1.** Луминолът се използва като регистрираща супероксида молекула. Добавянето на плазма в тази система води до намаляване на хемилуминесцентния отговор (кривите за пациенти P1, P2 и P3). Пациентите са подбрани случайно от базата данни и имат за цел да илюстрират получените по този метод резултати. Това намаление зависи от скевинджърния капацитет на добавената плазма.

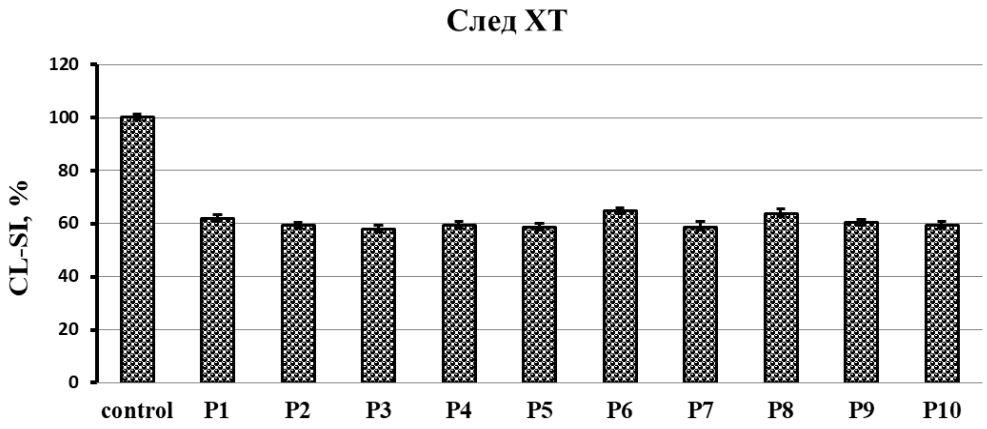
Колкото този капацитет е по-голям, толкова по слаб ще е хемилуминесцентният отговор на системата т.е. площта под кривата, която е пропорционална на получените фотони, ще бъде по-малка. Изчисления на базата на този отговор CL-SI, който е равен на отношението на двата интеграла в проценти, този на пробата с плазма към този на контролата, ще има по-малка стойност при по-голям скевинджър ефект на плазмата.

За всички пациенти са проведени такива експерименти, като е използвано едно и също количество кръвна плазма. Резултатите за 10 произволно избрани пациенти, преди да бъде започнат курс на химиотерапия, са показани на **Фигура IV.2.** Чрез тях се илюстрира как стойността на CL-SI на пробите се съотнася към този на контролата.



Фигура IV.2. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо $O_2^{\bullet-}$, взета от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия

От резултатите на тези две фигури се вижда, че CL-SI за индивидуалните пациенти варира малко, което показва стабилен показател без прогностична стойност.



Фигура IV.3. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо $O_2^{\bullet-}$, взета от пациенти след проведена химиотерапия

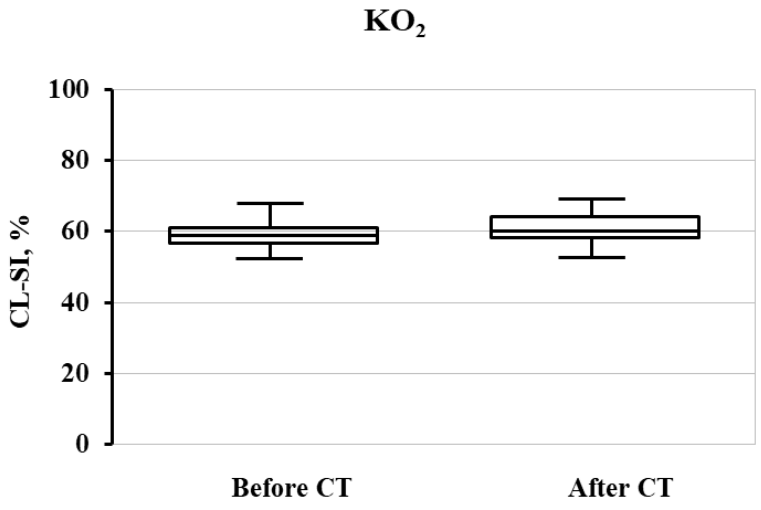
Вижда се, че антиоксидантният капацитет съответства на CL-SI със стойност около 60%. Това показва, че кръвната плазма може да елиминира около 40 % от супероксидните радикали в пробата.

Тези стойности имат относителен характер и трябва да се разглеждат в сравнение с резултатите, получени за плазмата на пациентите след провежданото лечение, които са представени на **Фигура IV.3.** За направената случайна извадка се вижда, че след проведената химиотерапия няма значителна промяна на CL-SI, който отново варира около 60%.

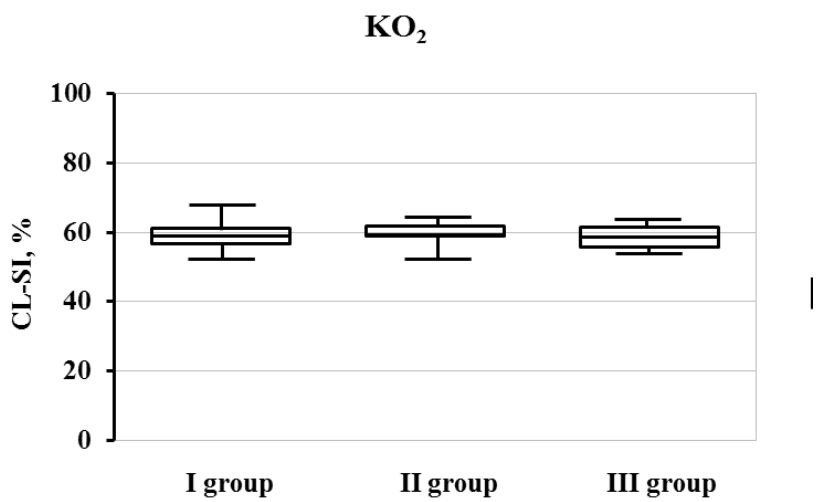
Доколкото представените резултати на **Фигури IV.2.** и **IV.3.** имат за цел да илюстрират получените данни за отделни пациенти, показаното не е достатъчно да се направят заключения за всички пациенти. Затова на базата на всички пациенти беше направена статистическа обработка на резултатите, което да позволи да се направи сравнение между антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата на пациентите с рак на белия дроб преди и след проведения курс на химиотерапия. Обобщените данни са показани на **Фигура IV.4.**

От резултатите на **Фигура IV.4.** се вижда, че проведеното лечение не води до статистически значима промяна в антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо супероксидните радикали.

За да може да се оцени до каква степен видът на прилаганата комбинирана терапия влияе върху този капацитет, получените от всички проби резултати бяха разделени на три групи. Пробите в група I са взети преди започване на химиотерапията. Групите II и III са резултатите от плазмата на пациентите след проведената химиотерапия, като във II група са пациентите с недребноклетъчен рак, лекувани с гемцитабин и цисплатин, а в III група са пациентите с дребноклетъчен белодробен карцином, чиято терапия включва иринотекан и цисплатин. Резултатите са показани на **Фигура IV.5.**



Фигура IV.4. Сравнение на антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата преди и след проведена химиотерапия (p>0.05)



Фигура. IV.5. Антиоксидантен капацитет спрямо супероксидни радикали на плазмата на пациентите преди химиотерапията (I група), след химиотерапия: лекувани с гемцитабин и цисплатин (II група) и лекувани с комбинацията от иринотекан и цисплатин (III група) (p>0.05)

От показаните резултати се вижда, че CL-SI на пробите и в трите групи е около 60 %, т.е. добавянето на кръвната плазма причинява намаляване с около 40 % хемилуминесцентния отговор на системата спрямо контролните проби, за които CL-SI е 100 %.

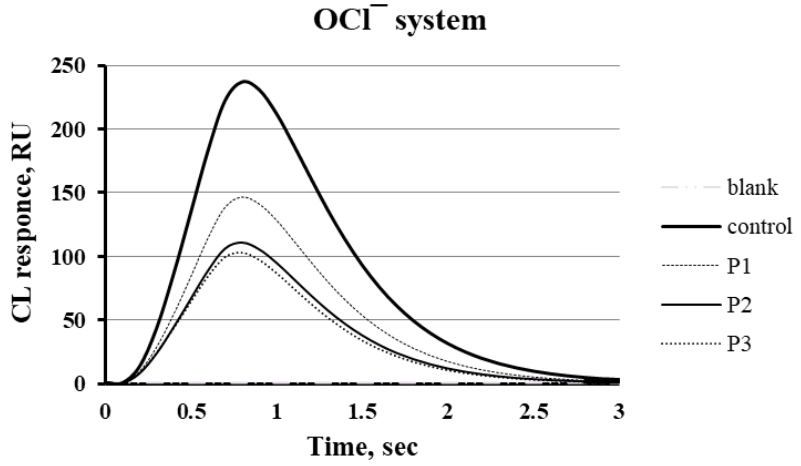
Анализът на резултатите показа, че независимо дали кръвните проби са взети преди или след проведената химиотерапия, не се наблюдават статистически различими промени в капацитета на кръвната плазма на пациентите да елиминира супероксидни радикали, тъй като CL-SI не се различава съществено. Сравнявайки групите II и III, в които са пробите от пациенти с различие по отношение на прилаганата терапия – цисплатин и гемзер (група II) или цисплатин и иринотекан (група III), също не се наблюдава статистически различима промяна в АО капацитет. Стойностите на CL-SI за медианите в трите групи варират между 58.6% и 59.2 %, което съответства на направените изводи.

Възможно обяснение на получените резултати е базирано на механизмите на елиминиране на супероксидните радикали, попаднали в кръвната плазма. Елиминирането на супероксидните радикали се осъществява благодарение на SOD ензимите, съдържащи се в плазмата и благодарение на молекулите със скевинджърни свойства в нея. При развитие на оксидативен стрес се изчерпват молекулите, които чрез скевинджърните си свойства реализират антиоксидантната защита, което да доведе до по-нисък скевинджър ефект на кръвната плазма. От друга страна, раковите клетки, с цел да се защитят от оксидативни увреждания, стимулират антиоксидантните системи на организма, което би могло да рефлектира в нарастване на активността на антиоксидантните ензимни системи, част от които е SOD. Това би довело до нарастване на елиминирането на супероксидните радикали и оттам на регистриране на по-висок скевинджър ефект на плазмата. Двата механизма действат в различни посоки, което е възможно обяснение на липсата на статистическа разлика между резултатите за CL-SI, показани на **Фигура IV.5.**

Използваните терапии не оказват влияние на скевинджърния антиоксидантен капацитет на плазмата на пациентите с рак на белия дроб спрямо $\mathbf{O_2^{\bullet -}}$.

IV.2.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет по отношение на хипохлоритни йони (хипохлориста киселина)

Другата моделна система, която е използвана, за да установи как терапията се отразява на АО капацитет на плазмата на пациентите като резултат от тяхното лечение, е свързана с хипохлоритни аниони, регистрирани чрез луминол-зависима хемилуминесценция. Хипохлористата киселина се произвежда от неутрофилите като последния в редицата от няколко процеса на продуциране на АФК окислителен агент. Тези експерименти имат за цел да се определи как терапията се отразява на скевинджърния капацитет на плазмата спрямо оксидативните процеси, свързани с активиране на фагоцитите.

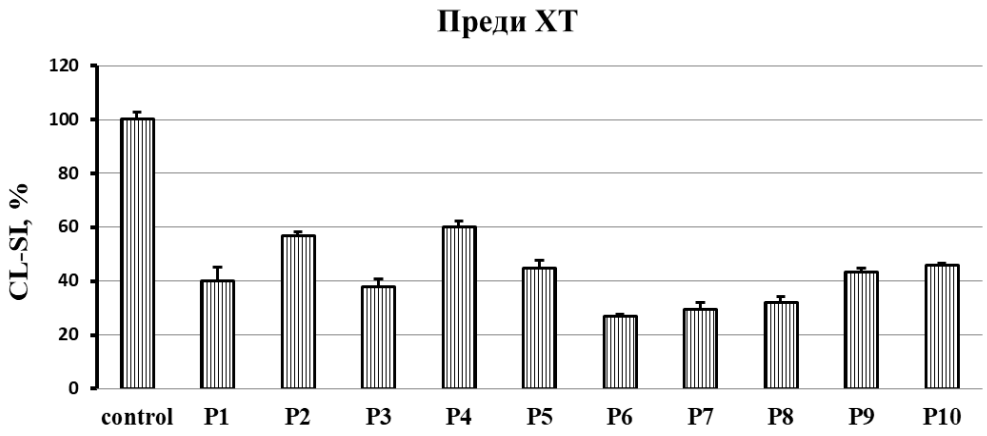


Фигура IV.6. Типични хемилуминесцентни криви, получени при изследване на антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на пациентите спрямо хипохлоритни йони

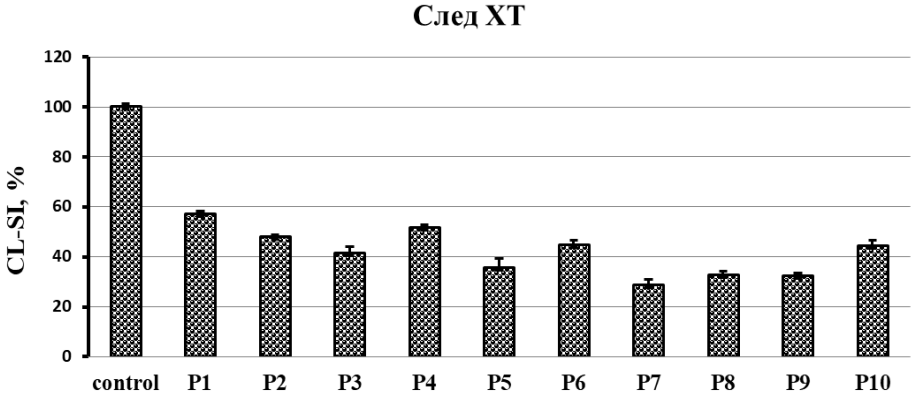
Към среда, съдържаща луминол, се добавя хипохлорит, който води до луминолово светене, стойността на което се приема за контрола. Концентрацията на хипохлорита е подбрана така, че да съответства на тази, която се получава по време на кислородния взрив на неутрофилите. На **Фигура IV.6.** са представени типични хемилуминтни криви, получени в хода на проведените експерименти. Контролата не съдържа кръвна плазма и съответства на максималната стойност на хемилуминесцентен отговор. Площта под всяка една от кривите е пропорционална на светлинните фотони, получени от взаимодействието на луминола и хипохлорита.

Добавянето на кръвна плазма води до намаляване на хемилуминесцентния отговор на системата и съответно на изчисления интеграл. Отношението между отговора на пробата, съдържаща кръвна плазма, и отговора без добавяне на плазма (контролата) е отбелязано като CL-SI и стойността му в проценти е показана на **Фигури IV.7. и IV.8.**

На **Фигура IV.7.** са данните, получени за случайно избрани пациенти преди прилагане на химиотерапия, докато на **Фигура IV.8.** са показани данните за кръвната плазма на пациентите след терапията. От показаните резултати се вижда, че има разлика между резултатите, получени за отделните пациенти, както преди, така и след химиотерапията. Наблюдават се значителни разлики за CL-SI между отделните пациенти, които варират от процени до два пъти. Като сравним тези резултати, имащи за цел да се определи антиоксидантният скевинджър капацитет спрямо хипохлористата киселина, с резултатите, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет спрямо супероксида, се вижда, че в първата система различията между отделните пациенти са добре изразени, докато във втората (**Фигура IV.2.**) резултатите на CL-SI за различните пациенти са доста близки.



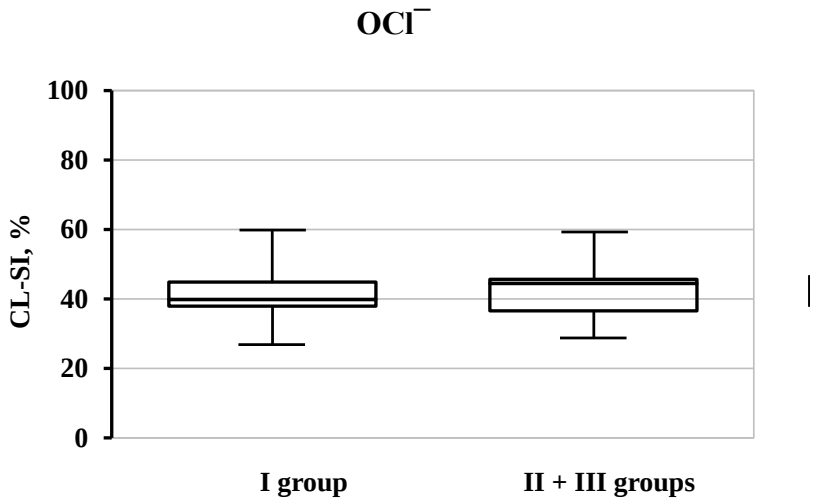
Фигура IV.7. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо OCl^-, взета от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия



Фигура IV.8. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо OCl^-, взета от пациенти след провеждане на курс на химиотерапия

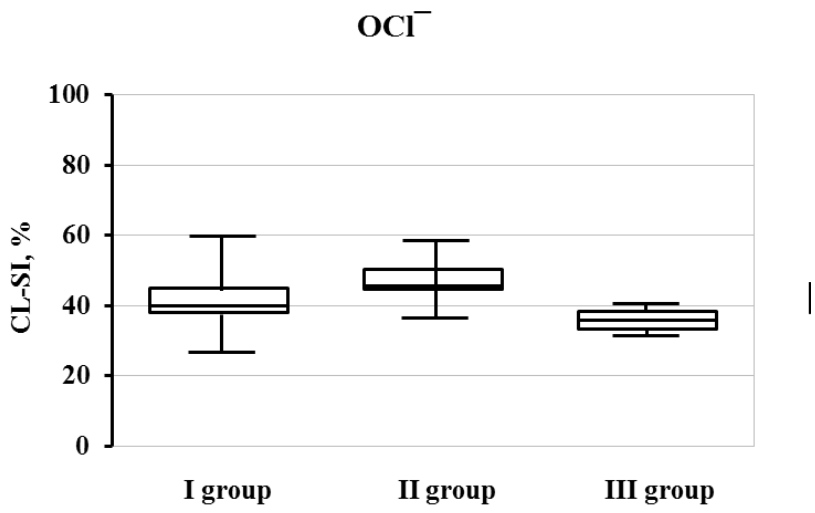
Стойността на CL-SI е мярка за капацитета на плазмата да елиминира този тип АФК. По-малката стойност на този индекс е свързано с по-голям капацитет на плазмата, тъй като по-малко луминолови молекули са успели да взаимодействат с хипохлорита в конкуренция с компоненти в плазмата, имащи скевинджър ефект.

От показаните на **Фигура IV.9.** данни се вижда, че обобщените резултати за антиоксидантния скевинджър капацитет срещу хипохлорита са много близки за пациентите преди и след проведената химиотерапия. Стойностите на CL-SI на медианите на двете групи са съответно около 40% и 44.5%, което показва лека тенденция към намаляване на капацитета на плазмата след проведената терапия спрямо капацитета на плазмата на тези пациенти след химиотерапия.



Фигура IV. 9. Антиоксидантен капацитет спрямо хипохлоритни йони на плазмата на пациентите преди (I група), след (II +III групи) химиотерапията (p>0.05)

Когато се направи анализ на резултатите според вида на комбинираната терапия, беше установено, че при пациентите, лекувани с гемцитабин и цисплатин (II група), се наблюдава намаляване на скевинджърния капацитет (CL-SI е по-висок спрямо стойността му преди химиотерапията - I група), докато за пациентите, лекувани с иринотекан и цисплатин (III група) се наблюдава нарастване на скевинджърния капацитет на плазмата им след проведената терапия (**Фигура IV.10.**).

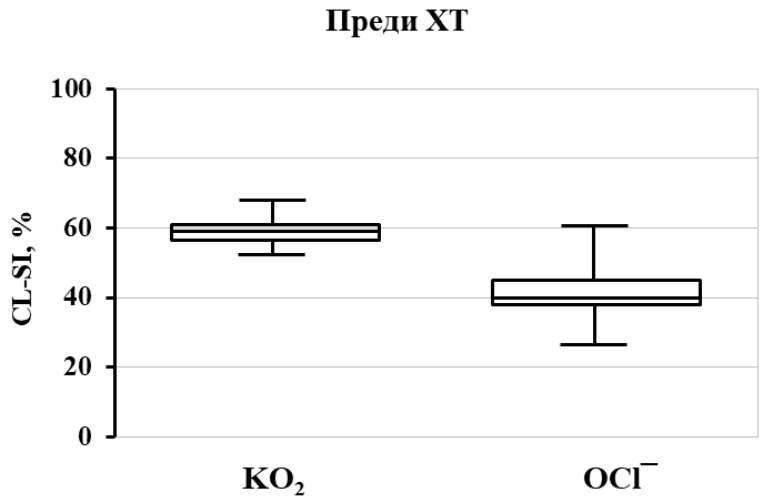


Фигура IV.10. Антиоксидантен капацитет спрямо хипохлоритни йони на плазмата на пациентите преди химиотерапията (I група), след химиотерапията: лекуваните с гемцитабин и цисплатин (II група) (p=0.07 > 0.05) и лекуваните с комбинацията от иринотекан и цисплатин (III група)(p<0.05)

От представените на **Фигура IV.10.** резултати можем да заключим, че при пациентите с дребноклетъчен рак, за които е прилагана комбинирана терапия с иринотекан и цисплатин (IIIgroup), води до статистически значимо нарастване на скевинджърния капацитет на плазмата им спрямо същия капацитет преди приложената терапия. Прави впечатление, че стойностите на CL-SI варират в по-тесен интервал за тези пациенти спрямо резултатите, получени за пациентите в група II.

На **Фигура IV.11.** са показани резултатите за двата вида АФК. От нея се вижда, че ако сравним резултатите, получени в двете тест системи – със супероксид и хипохлорит, се вижда, че CL-SI, изчислен за плазмата на пациентите преди химиотерапията в системата, съдържаща супероксид, е по-висок, отколкото изчисления за системата с хипохлорит при добавяне на едно и също количество плазма. Стойностите на медианите са съответно около 60 % и 40%, което

означава, че капацитетът за справяне на плазмата със супероксидни радикали е много по-малък от капацитета за справяне с хипохлоритни йони. Намалението за супероксидните радикали е с около 40 % от това на контролите, а за хипохлорита намалението е с около 60 %, т.е. с 50 % повече.



Фигура IV.11. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо съответно $O_2^{\bullet-}$ и OCl^- ($p<0.05$)

В кръвната плазма елиминирането на супероксидните радикали се реализира поне по два механизма – чрез прихващане на радикалите от молекулите със скевинджърни свойства, намиращи се в плазмата, или чрез SOD ензимите в нея. Двата процеса вървят паралелно и би могло да се очаква, че елиминирането им ще бъде по-бързо, отколкото ако нямаше ензимен механизъм. Това, че наблюдаваме по-слаб антиоксидантен ефект, може да се дължи на компенсаторните механизми, отключени от заболяването, които изместват окси-редукционния баланс. Хипохлоритът е по-реактивната частица, което е възможно обяснение за наблюдавания резултат.

IV.3. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите определен чрез TBA-RS

За да се оцени оксидативният статус на пациентите преди и след провеждането на курса химиотерапия, беше определено нивото на MDA-подобните продукти в кръвна плазма на пациенти. Количеството на тези продукти зависи от нивото на оксидативен стрес в тялото на пациента и може да се променя в зависимост от множество екзо- и ендогенни фактори. Целта е да се проследи как прилаганата химиотерапия променя нивото на тези продукти. В случай на силно интензифициране процесите на оксидативен стрес, оксидативните увреждания ще засягат голяма част от биологично важните молекули. Това води до неспособност на защитните системи в организма на пациентите да елиминират генерираните радикали и/или частично да възстановяват причинените от тях увреждания. Този дисбаланс води до нарастване на TBA-RS. За да оценим каква част от плазмените липиди са увредени, сравнихме количеството на MDA продуктите, съдържащи се в плазмата на пациента, с максималното количество възможни MDA продукти (max MDA) в същата плазма, както е описано в Материали и методи.

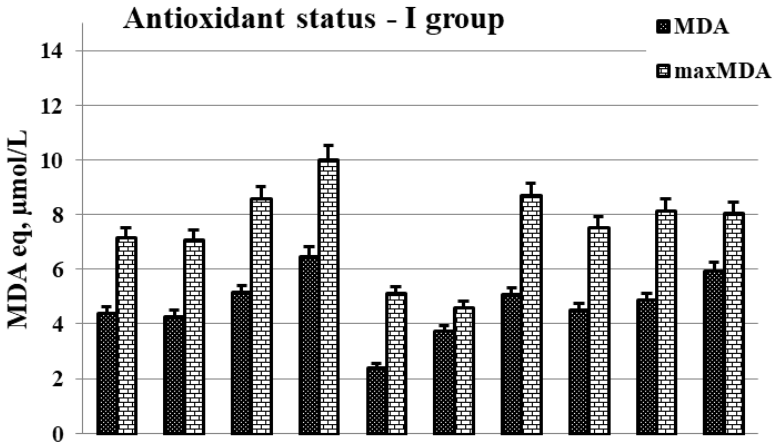
Този подход за оценка на оксидантния статус, при който освен нивото на MDA продуктите в плазмата, се измерват и maxMDA продуктите в същата плазма, беше прилаган в други наши проучвания [Georgieva *et al.,* 2015]. Целта на този подход е да се използва всеки пациент като автоконтрола и така да се стабилизират резултатите и изводите от тях. Разликата в двата показателя – maxMDA и MDA ни показва каква част от наличния липиден субстрат е претърпял окислителни процеси. Стойността на MDA продуктите показват колко са окислените продукти, даващи TBA реакция (TBA-RS) в милилитър плазма на пациента. Този подход се използва масово от авторите, тъй

като дава нивото на оксидативните увреждания на пациента и когато резултатите за по-голяма група се обобщят, се получава информация, която позволява да се градят хипотези за влиянието на различни фактори върху състоянието на пациентите в различни статистически групи. Към него като допълнение и възможност за извличане на допълнителна информация сме определяли разликата между максималния окислителен потенциал на плазмата и реално претърпелия окисление.

Този подход дава много полезни резултати, когато се прилага за пациенти в критично състояние [Georgieva *et al.,* 2015]. При тях успяхме да свържем този показател с изхода на състоянието. При голяма разлика между максималния окислителен потенциал и реално окислените липиди пациентите в интензивно отделение подобряват своето състояние и биват изписани. Когато тази разлика е малка или липсва, това статистически оформя групата на пациенти с летален изход от болестта. На базата на тези и други резултати беше успешно защитена дисертация [Georgieva *et al.,* 2015].

В случая на настоящото проучване пациентите не се намират в остра фаза на заболяване, тъй като става въпрос за заболяване, което продължава във времето, и лечението има за цел да стабилизира състоянието на пациента и той да премине в ремисия. Ние се стремим да разширим приложимостта на този показател, който да ни позволи да потърсим връзка между него и антиоксидантния капацитет на плазмата, определян чрез ABTS метода.

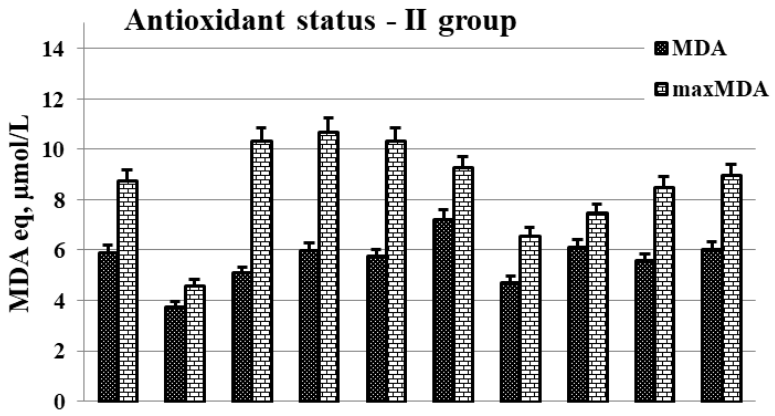
На **Фигура IV.12.** са показани резултатите на пациентите преди прилагане на химиотерапията, като са представени съвместно реалното количество на MDA продуктите и максималният окислителен потенциал (maxMDA).



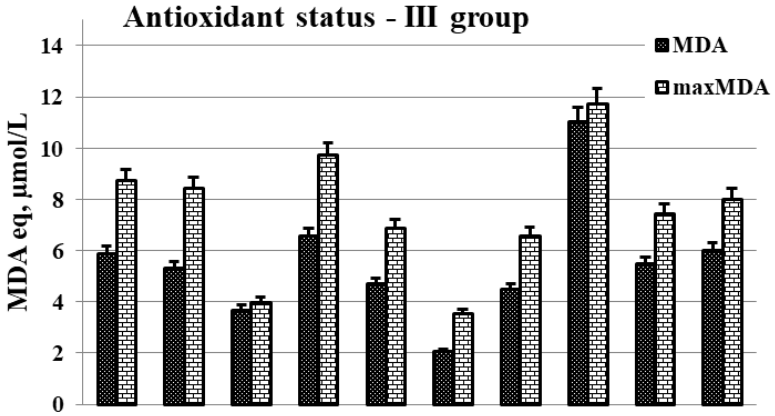
Фигура IV.12. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия

Представените на **Фигури IV.12., 13. и 14.** пациенти са избрани на случаен принцип от базата данни на всички пациенти и имат за цел да илюстрират получените резултати. **Фигура IV.12**. илюстрира резултатите преди химиотерепията. Аналогично на предишната глава с резултати, данните получени от пробите, взети преди химиотерапията, са групирани и маркирани като група I (Igroup на **Фигура IV.12.**). Вижда се, че за пациентите в тази група има разлика между maxMDA и MDA, която не може да бъде окачествена като минимална. Съдейки по тези данни, оксидативните увреждания, оценени по MDA продуктите, не обхващат всичкия наличен субстрат.

На **Фигури IV.13. и IV.14.** са представени по пациенти получените резултати за количеството MDA продукти и maxMDA. Пациентите след проведена химиотерапия сформират група II(II group), лекувани с комбинация от гемцитабин и цисплатин, и III група, в която са пациентите, приемали комбинация от иринотекан и цисплатин (III group).



Фигура IV.13. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти след проведен курс на химиотерапия с гемцитабин и цисплатин (II група)

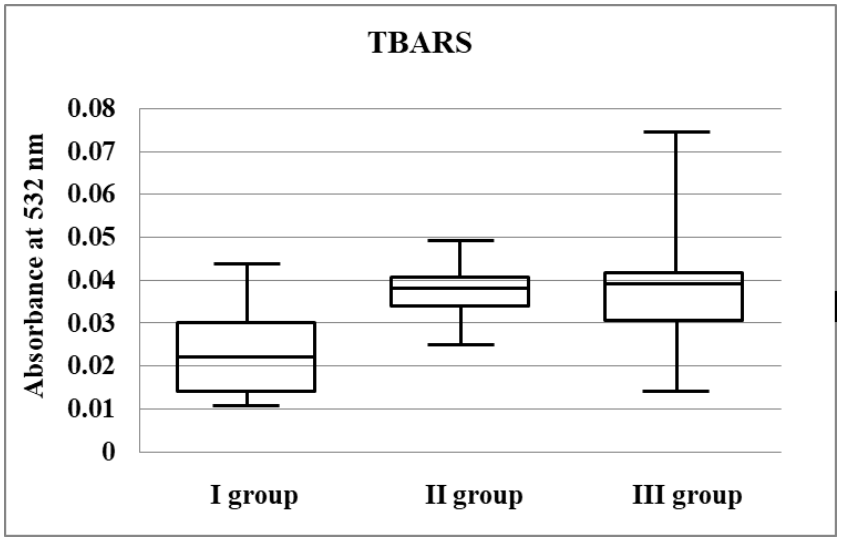


Фигура IV.14. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти след проведен курс на химиотерапия с иринотекан и цисплатин (III група)

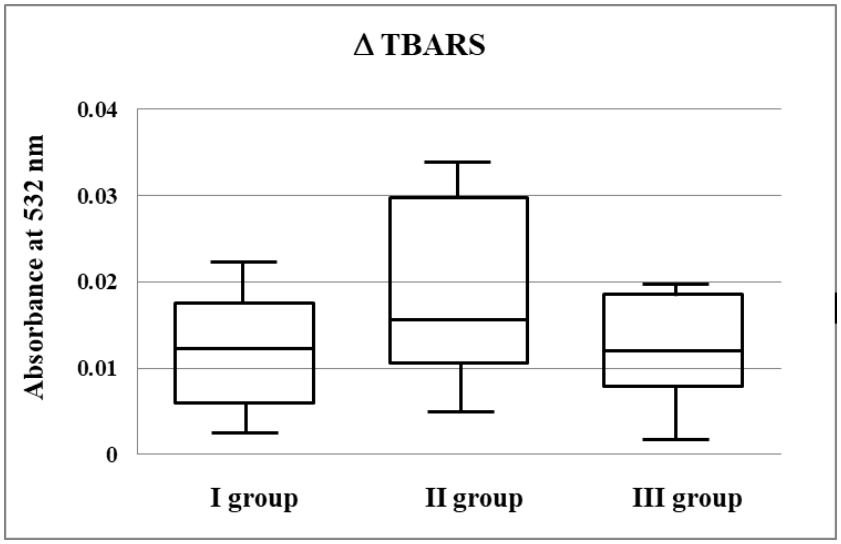
От представените резултати се вижда, че количеството на MDA продуктите след химиотерапията е по-високо спрямо преди провеждането ѝ при повечето пациенти. Това показва, че проведеното лечение с химиотерапевтици води до интензифициране на оксидативните процеси, което е довело до нарастване на оксидативните увреждания при пациентите, лекувани с двете

комбинирани терапии. Забелязва се леко сближаване на стойностите на MDA и maxMDA след химиотерапията спрямо отчетената разлика преди, но максималният окислителен капацитет на кръвната плазма далече не е достигнат. Предполага се, че това се дължи на задействани антиоксидантни защитни системи, които поддържат нивото на оксидативен стрес под контрол.

Прави впечатление, че стойностите на MDA продуктите силно варират между отделните пациенти. За да се сравнят ефектите на проведеното с химиотерапията лечение върху тези процеси, резултатите от **Фигури IV.12.**, **IV.13.** и **IV.14.** са статистически обработени и са представени на **Фигура IV.15.** и **Фигура IV.16.**



Фигура IV.15. Нивото на TBARS продуктите преди (I група) и след проведената химиотерапия, съответно с гемцитабин и цисплатин (II група) (p<0.05) и иринотекан и цисплатин (III група) (p=0.08 >0.05), представени като стойност на регистрираната екстинкция при 532 nm



Фигура IV.16. Разлика в нивата на ΔTBARS продуктите преди (I група) и след проведената химиотерапия, съответно с гемцитабин и цисплатин (II група)(p=0.07>0.05) и иринотекан и цисплатин (III група),.(p=0.08>0.05) представени като стойност на регистрираната екстинкция при 532 nm

На **Фигура IV.15.** са показани в обобщен вид резултатите от регистрираното количество TBARS активни продукти, отразяващи нивото на оксидативни увреждания по групи пациенти. На **Фигура IV.16.** са представени резултатите, показващи как провежданата терапия се отразява на разликата между нивото на окислителните процеси и максималния окислителен потенциал. Чрез тях може да се сравнят данните за трите групи и да се потърси зависимост между провежданата терапия и промените в оксидантния статус.

Показаните обобщени данни на **Фигура IV.15.** за наличните в плазмата MDA продукти потвърждават забелязаното при сравняването на **Фигура IV.12.** с **IV.13.** и **IV.14.** нарастване на оксидативния стрес след химиотерапията спрямо нивата ѝ преди стартиране на лечението. Сравнявайки стойностите на медианите на трите групи, беше установено, че има съществено различие между група II (пациентите с комбинирана терапия гемцитабин и цисплатин) и група I (пациенти преди химиотерапия), и между група III (пациенти с комбинирана

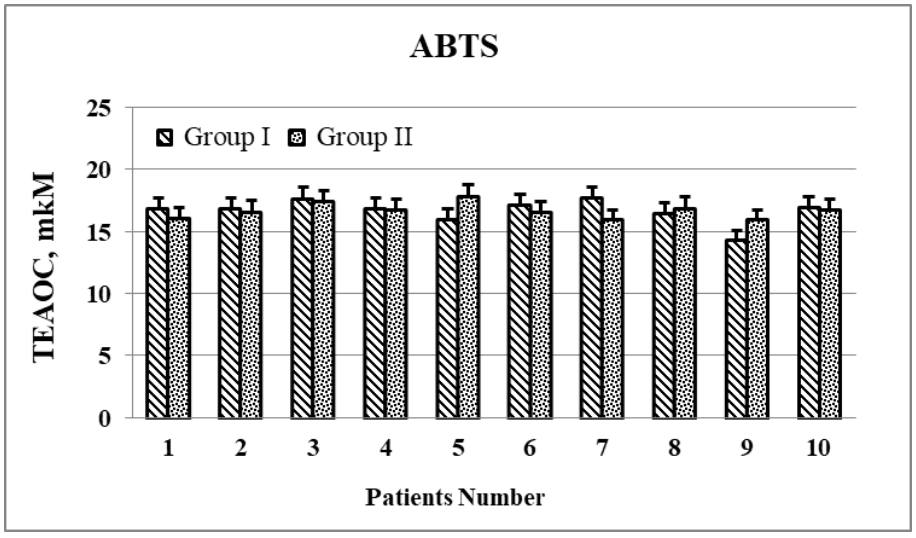
терапия иринотекан и цисплатин) и група I. Стойностите нарастват за група II с около 74 % спрямо група I, за група III спрямо група I с около 77 %. Прилаганата химиотерапия води до интензифициране на оксидативните процеси, като провежданата терапия с комбинация от цисплатин и иринотекан има лек, статистически незначим превес спрямо терапията с цисплатин и гемзер.

На **Фигура IV.16.** са сравнени резултатите между същите групи, но там е показана разликата между MDA и maxMDA, която ни показва до каква степен оксидативните увреждания са обхванали целия наличен субстрат на окислението за същия пациент. По този начин пациентът се използва за автоконтрола. Колкото тази разлика е по-малка, толкова оксидативните процеси са по-мащабни и по-интензивни. От показаното на **Фигура 16.** се вижда, че няма съществена промяна между разликата maxMDA и MDA за пациентите от групата след химиотерапията, провеждана с комбинацията от иринотекан и цисплатин спрямо групата преди химиотерапията. Медианата на група III спрямо тази на група I се намалява съвсем малко и няма статистически значимо различие. Това показва по косвен начин, че въпреки отчетеното нарастване на оксидативните увреждания, балансът между оксидативните процеси и антиоксидантните защитни системи се запазва.

За пациентите, лекувани с комбинацията от гемцитабин и цисплатин, резултатите показват леко нарастване на тази разлика (група II) спрямо група I. Стойността на медианата, съответстваща на група II, е с около 25 % по-висока стойност спрямо стойността на медианата на група I. Това нарастване показва, че интензифицирането на оксидативните процеси, което е предизвикано от лечението, вероятно е довело до активиране на антиоксидантни процеси, стремящи се да компенсират и/ или да елиминират оксидативната опасност.

IV.3. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите определен чрез ABTS метод

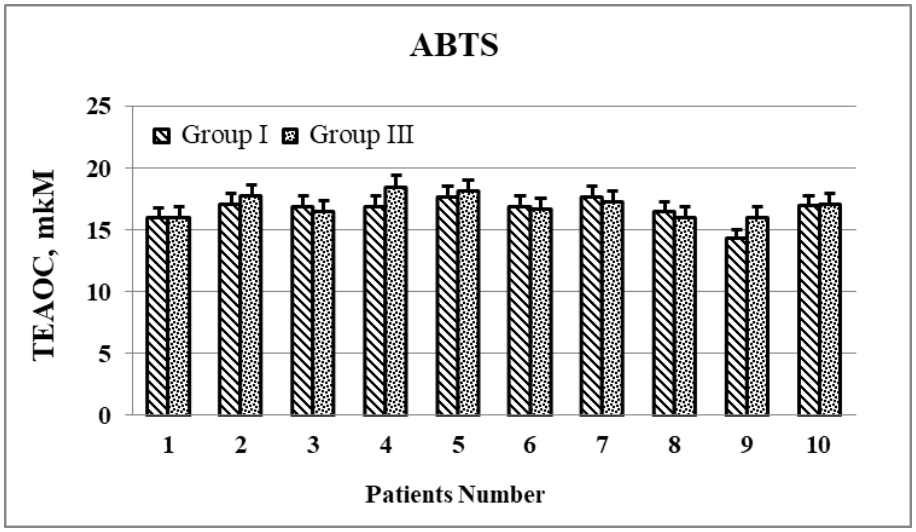
За да установим директно антиоксидантния капацитет на кръвната плазма на пациентите, използвахме ABTS тест. На базата на получените резултати за всеки пациент беше изчислена антиоксидантната активност на плазмата му, както е описано в Материали и методи. С помощта на калибровъчна крива тоталният антиоксидантен капацитет беше изчислен като тролокс еквивалент. Тези данни за част от пациентите са представени на **Фигура IV.17.**



Фигура IV.17. Тотален антиоксидантен капацитет на плазмата на пациенти преди химиотерапия (група I) и след приложена комбинирана терапия с гемцитабин и цисплатин (група II), определена чрез ABTS тест и представена като тролокс еквивалент

На фигурата са дадени данните за TEAC (тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет) преди и след химиотерапията, включваща гемзер. На **Фигура IV.18** са показани произволно избрани данни за

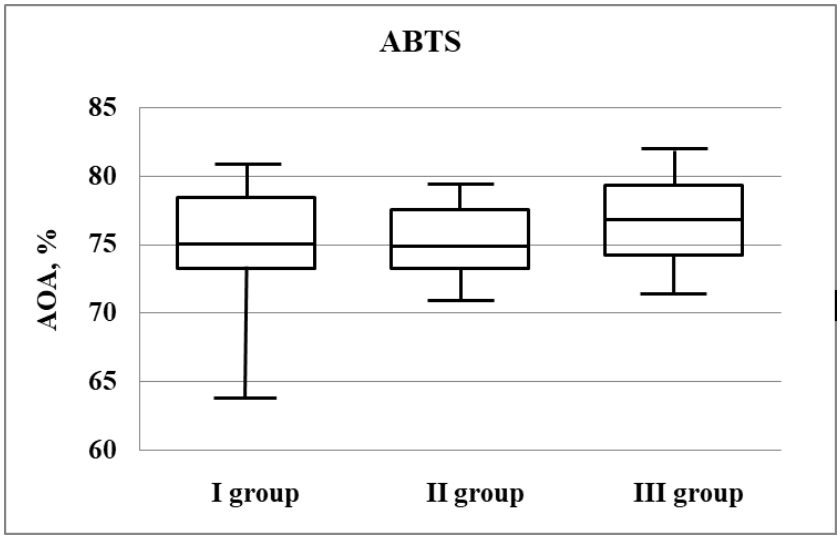
пациентите, които са получили терапия от иринотекан и цисплатин преди и след нея.



Фигура IV.18. Тотален антиоксидантен капацитет на плазмата на пациенти преди химиотерапия (група I) и след приложена комбинирана терапия с иринотекан и цисплатин (група III), определена чрез ABTS тест и представена като тролокс еквивалент

И на двете фигури се вижда, че има малко различие между TEAC преди и след химиотерапията, в повечето случаи без разлика или с лек превес на активността след химиотерапията.

На **Фигура IV.19.**, където данните са обобщени в трите групи, няма статистически значима разлика между антиоксидантния капацитет, определен чрез ABTS теста. Стойностите на медианите на групите за AOA, % варират между 75 и 77 %, съответно група III и група I.



Фигура IV.21. Антиоксидантна активност на кръвната плазма, определена чрез ABTS тест преди (I група) и след проведената химиотерапия, съответно с гемцитабин и цисплатин (II група) и иринотекан и цисплатин (III група), представени като проценти AOA (p>0.05)

Този резултат е в потвърждение на показаното на **Фигура IV.16.**, а именно, че антиоксидантните системи са активизирани с цел да компенсират нарастването на оксидативните процеси, установени по нарастването на нивото на липидна пероксидация (**Фигура IV.14**).

От тези резултати се вижда, че приложената комбинирана химиотерапия води до нарастване на оксидативните увреждания, с което се свързва и механизма на действие на подобен тип лечения. Независимо от значителното интензифициране на оксидативните процеси, пациентите запазват сравнително непроменен антиоксидантен статус, което вероятно се дължи на активиране на антиоксидантните защитни системи, като отговор на оксидативните процеси, причинени от терапията.

V. ДИСКУСИЯ

Много антинеопластични лекарства, като напр. цисплатин, винбластин, митомицин С, доксорубицин, камптотецин и други проявяват противотуморното си действие чрез АФК–зависима активация на програмираната клетъчна смърт (Fang et al., 2007).

Туморните клетки се характеризират с увеличаване на скоростта на производство на АФК в сравнение с нормалните клетки. Нарушаването на баланса между оксидативните и антиоксидантните процеси, водещо до промени в клетъчната хомеостаза или дефектно модулиране на АФК – предизвиканото увреждане допринася за отключване и прогресия на рака чрез индуциране на ДНК мутации, геномна нестабилност и анормално проканцерогенно сигнализиране (Moloney and Cotter, 2018). От друга страна, високите нива на АФК могат да стимулират антиканцерогенно сигнализиране и да предизвикват индуцирана от оксидативния стрес смърт на туморните клетки (Moloney and Cotter, 2018).

Изборът на дизайна на експеримента ни позволи да формираме извадка от пациенти, които да са подходящи за това проучване, включващо две различни схеми на комбинирана терапия при белодробен карцином: гемцитабин с цисплатин и иринотекан с цисплатин.

За да може да се прецени как терапията се отразява на оксиредукционния баланс на пациентите, бяха проведени множество експерименти, имащи за цел да оценят различни аспекти на антиоксидантния статус и така да получим по-пълна представа за промените в него.

Първите групи експерименти включват резултати от луминол-зависима хемилуминесценция, чрез която е определена скевинджърната активност на плазмата спрямо супероксидни радикали и хипохлоритни йони. Супероксидните радикали имат отношение към

канцерогенезата (Ivanova D*., et. al.,* 2013). В нашето проучване ние сме измервали способността на кръвната плазма да ги елиминира. Едно от местата за тяхното активно получаване е в туморните клетки, но ефектите от оксидативните процеси се отразяват и на кръвната плазма. Затова ние изследвахме антиоксидантния капацитет на плазма, за да потърсим отговор на въпроса как приложената терапия се отразява на оксидативния статус на пациентите.

В системата със супероксидни радикали установихме липсата на голяма разлика между CL-SI получен както за отделните пациенти, така и преди и след химиотерапията. Това ни позволява да предположим, че процесите на елиминиране не се променят или резултатите от евентуалните промени се компенсират. Механизмите на елиминиране са поне два: скевинджър ефект и ензимен – чрез SOD. И двата механизма са еднопосочни и водят до повишаване на капацитета на плазмата да намалява CL-SI. Приносът на всеки поотделно не може да бъде отдиферинциран чрез тези експерименти, а и данните показват липса на различие преди и след ХТ, както и спрямо прилаганата терапия.

Резултатите за антиоксидантния капацитет на плазмата спрямо хипохлоритните йони показват различни стойности по пациенти. Елиминирането им от плазмата се осъществява чрез скевинджър ефект. Вариациите между пациентите са видими, за разлика от експериментите със супероксидни радикали, но при статистическото обобщение на тези данни обобщените резултати показват липса на статистическа разлика преди и след химиотерапията. Когато бъдат разделени на пациентите според прилаганата терапия, тогава се показва тенденция на намаляване на скевинджърния капацитет при пациенти, лекувани с гемцитабин спрямо преди ХТ и статистически значимо спрямо него нарастване на скевинджърната активност при терапия с иринотекан. Това показва, че прилаганите два типа комбинирана терапия изместват оксиредукционния баланс в различни

посоки. Регистрирането на тази промяна зависи от използваната методика за оценка. Тя не се регистрира чрез метода със супероксид, но е добре различима при другия хемилуминесцентен метод – с хипохлорит.

Скевинджърният ефект на плазмата спрямо хипохлорита преди ХТ е по голям, отколкото спрямо супероксида, въпреки че хипохлоритът няма ензимен механизъм на елиминиране, за разлика от супероксида.

Възможно обяснение за тази по-висока антиоксидантна активност на плазмата спрямо хипохлорита по сравнение със супероксида е това различие да е свързано с тяхната различна реактивоспособност. Реактивоспособността на хипохлорита е по-голяма от тази на супероксида и това вероятно му позволява да взаимодейства с по-голям брой компоненти, съдържащи се в кръвната плазма. Това не обяснява разликата в резултатите при отделните пациенти и тези преди и след ХТ спрямо хипохлорита, което прави метода с хипохлорита интересен от прогностична гледна точка.

При оценка на оксидативния стрес авторите използват комбинации от различни методи, с които да запълнят общата картина на процесите. Неизменно сред тези методи присъства измерването на TBA-RS продуктите – класически метод, чрез който може да се определи нивото на липидна пероксидация и така да се оцени как терапията се отразява на оксидантния статус на пациентите.

И при двете комбинирани терапии се регистрира нарастване на нивата на TBA-RS, като за комбинацията на цисплатин и гемцитабин имаме статистическо различие спрямо тези продукти преди ХТ. При комбинираната терапия с цисплатин и иринотекан се наблюдава същата тенденция. Това показва, че терапиите водят до нарастване на оксидативните увреждания. Това е в съгласие с общото схващане за тясната връзка между оксидативния стрес и лечението на раковите заболявания, в частност на рака на белия дроб.

За нас представляваше интерес да установим каква част от липидите в плазмата са засегнати от окислението. Сравнявайки резултатите за разликите между maxMDA и MDA, установихме, че преди ХТ имаме по-малка разлика, докато след ХТ имаме тенденция към нарастване на тази разлика. Групата пациенти, лекувани с цисплатин и иринотекан, дават стойности, по-близки до резултатите от преди ХТ, отколкото лекуваните с цисплатин и иринотекан. Тази тенденция е сходна със скевинджърните ефекти в системата с хипохлоритни йони. Тук смисълът е различен – намаляването на тази разлика maxMDA и MDA показва интензифицирането на оксидативните процеси. Комбинацията от тези методи показва, че имаме еднопосочна тенденция, което ни показва различно развитие на оксидативните процеси.

Така получените резултати показват, че прилаганата при лечение на белодробен карцином терапия води да промяна в антиоксидантния статус на пациентите и тази промяна е по-голяма при пациентите с дребноклетъчен рак спрямо тези с недребноклетъчен рак, и че при пациентите с дребноклетъчен белодробен карцином се увеличава АО капацитет спрямо хипохлорит. С помощта на използваните хемилуминесцентни системи установихме, че АО капацитет зависи от вида на АФК и терапията се отразява по различен начин на капацитета за елиминиране на супероксид и хипохлорит. Това проучване показа, че луминоловата ХЛ позволява да се получава по-детайлна информация за АО капацитет на плазмата на пациенти спрямо методите, измерващи тоталната АОА.

ABTS тестът позволява да се регистрират компоненти в плазмата (молекули с антиоксидантен потенциал), които ни ориентират за общия антиоксидантен статус на пациента, докато разликата в TBARS продуктите ни позволява да градим хипотези за това как

антиоксидантните системи на организма реагират на химиотерапията. Двата показателя взаимно се допълват, макар донякъде да са свързани.

VI. ИЗВОДИ

1. Антиоксидантният скевинджър капацитет на плазмата спрямо супероксидни радикали ($O_2^{\bullet -}$) при пациенти с карцином на белия дроб преди да се проведе курс на химиотерапия е около 60%. След проведената комбинирана химиотерапия не се наблюдава статистически значима промяна в антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо супероксидните радикали.

2. При изследване на антиоксидантния капацитет на плазмата спрямо супероксидни радикали на групата от пациенти с химиотерапия, включваща комбинация от гемцитабин и цисплатин, и на групата от пациенти с химиотерапия, включваща комбинация от иринотекан и цисплатин, не се наблюдава статистически значима промяна (CL-SI на пробите и в двете групи е около 60 %).

3. Антиоксидантният скевинджър капацитет срещу хипохлорита (OCl^-) при пациенти с рак на белия дроб преди и след проведената противотуморна химиотерапия нараства, като стойностите на CL-SI на двете групи са съответно около 40% и 44,5%.

4. При пациентите, на които е проведена комбинирана терапия с иринотекан и цисплатин се установи нарастване на скевинджърния капацитет на плазмата след проведената терапия (намаляване на CL-SI), а при пациентите с комбинирана терапия, включваща гемцитибин и цисплатин се наблюдава намаляване на скевинджърния капацитет след химиотерапията (нарастване на CL-SI).

5. Експериментите с използване на TBA-RS за оценката на степента на развитие на оксидативните на пациенти с карцином на белите дробове

преди и след химиотерапия процеси не показва запълване на тоталния капацитет на плазмата.

6. След прилагане на комбинирана противотуморна химиотерапия се наблюдава увеличаване на количеството на ТВА-активни продукти (като индикация за нарастване на оксидативния стрес), като при пациентите, лекувани с комбинация от цисплатин и иринотекан има статистически незначим превес спрямо пациентите, получаващи терапия с цисплатин и гемцитабин.

7. Преди и след провеждането на комбинирана химиотерапия антиоксидантната активност на кръвната плазма при пациенти с белодробен карцином, определена чрез ABTS тест, показва баланс между оксидативен стрес – антиоксидантен капацитет, най-вероятно свързан с активиране на антиоксидантните системи на организма.

VII. ПРИНОСИ

1. За първи път се изследва антиоксидантния скевинджър капацитет на пациенти с белодробен карцином спрямо супероксидни радикали и хипохлорит чрез методите на луминол-зависима хемилуминесценция преди и след приложение на комбинирана противотуморна химиотерапия, включваща цисплатин.

2. Получените от нас резултати потвърждават увеличаване на интензитета на оксидативните процеси при пациенти с белодробен карцином след провеждане на комбинирана цитостатична терапия, включваща два режима – гемцитабин с цисплатин и иринотекан с цисплатин.

3. Резултати от настоящото проучване показват, че прилаганата при белодробен карцином химиотерапия води до промяна в антиоксидантния статус на пациентите, като тази промяна е по-голяма при пациентите с дребноклетъчен карцином спрямо тези с недребноклетъчен карцином.

4. Настоящето проучване показа, че луминоловата хемилуминисценция позволява да се получава по-детайлна информация за антиоксидантния капацитет на плазмата на пациенти спрямо методите, измерващи тоталната антиоксидантна активност.

5. Проведеното от нас изследване допринася за потвърждаване на връзката между свободните радикали и карцином на белия дроб, чрез класически и хемилуминесцентни методи, с цел изясняване на състоянието окислител/антиоксидант при пациенти с белодробен рак.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Робев Б,** Христова-Авакумова Н, Николов Р, Хаджимитова В. Влияние на химиотерапията върху оксидативния статус на пациенти с дребноклетъчен белодробен карцином. Сборник статии национална научна конференция "15 години фармация в Медицински университет – Пловдив" – 01-03 юни 2018г. гр. Девин, стр. 144- 148. ISBN 978-619-237-014-5
2. **Robev B,** Hristova-Avakumova N, Nikolov R, Traykov T, Hadjimitova V Chemiluminescent investigation of theantioxidant status in lung cancer patients. AIP Conference Proceedings 2075, 170023 (2019); https://doi.org/10.1063/1.5091388 ISSN: 0094-243X (print); 1551-7616 (web)
3. **Bozil Robev**, Nadya Hristova-Avakumova, Rumen Nikolov, Vera Hadjimitova. Impact of combination chemotherapy on plasma antioxidant status in lung cancer patients. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences 2019, (***in press*** - представена служебна бележка) ISSN: 1310-1331

Научни съобщения във връзка с дисертационния труд:

1. **Robev B**, Hristova-Avakumova N, Nikolov R, Hadjimitova V Impact of combination chemotherapy with irinotecan and cisplatin on plasma antioxidant status in lung cancer patients. 2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018) 07–10 September 2018 Varna, Bulgaria
2. **Robev B,** Hristova-Avakumova N, Nikolov R, Hadjimitova V Changes in plasma antioxidant status following cisplatin chemotherapy in lung cancer patients. XVII International Congress of Medical Sciences 10-13 май, 2018 София, България
3. **Robev B,** Hristova-Avakumva N, Nikolov R, Hadjimitova V. Changes in oxidant-antioxidant balance in small cell lung cancer patients. НАЦИОНАЛНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „15 ГОДИНИ ФАРМАЦИЯ В МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ГР. ПЛОВДИВ" гр. Девин, 1-3 юни 2018 г.
4. **Robev B**, Hristova-Avakumova N, Nikolov R, Traykov T, Hadjimitova V Chemiluminescent investigation of theantioxidant status in lung cancer patients. 10th Jubilee International Conference of the Balkan Physical Union, 26-30 August 2018 Sofia, Bularia.

IX. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

ДЕКЛАРАЦИЯ

от д-р Божил Стефанов Робев

докторант на самостоятелна подготовка
в Медицински университет – София

Катедра „Катедра по фармакология и токсикология“

Във връзка с провеждането на процедура за придобиване на образователна и научна степен **„доктор“** в Медицински университет – София, декларирам, че:

- Представената дисертация на тема „Сравнително клинично проучване на ефекта от лечението с комбинирана химиотерапия с цисплатин върху плазмения антиоксидантен капацитет на пациенти с белодробен карцином“, е мой труд;
- В нейното разработване не са използвани чужди публикации и разработки в нарушение на авторските им права;
- Цитиранията на всички източници на информация - текст, илюстрации, таблици, изображения и други, са обозначени според стандартите;
- Резултатите и приносите на проведеното дисертационно изследване са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които нямам участ