

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**„СРАВНИТЕЛНО КЛИНИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТА ОТ  
КОМБИНИРАНА ХИМИОТЕРАПИЯ С ЦИСПЛАТИН ВЪРХУ  
ПЛАЗМЕННИЯ АНТИОКСИДАНТЕН КАПАЦИТЕТ НА ПАЦИЕНТИ С  
БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ“**

**д-р Божил Стефанов Робев**

**Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен**

**„ДОКТОР“**

**Научна област: 7. Здравеопазване и спорт“**

**Професионално направление с шифър „7.1. Медицина“**

**Научна специалност: „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)“**

**Научни ръководители: доц. д-р Румен Николов, дм**

**доц. Вера Хаджимитова, дбф**

**София, 2019**

## СПИСЪК НА НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- 5-НТ – 5-hydroxytryptamine
- АКТ – serine/threonine-specific protein kinase
- АО – antioxidant/антиоксидант
- CAV – cyclophosphamide-adriamycin-vincristine
- ECOG – Eastern Cancer Cooperation Group
- PI3K – phosphatidyl-inositol-3-kinase
- PI3K /АКТ phosphatidylinositol 3-kinase -Akt Pathway
- МАРК – 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 (ТБА-RS) – продукти, които реагират с тиобарбитурова киселина
- ТЕАС – trolox equivalent antioxidant capacity

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>Въведение</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Литературен обзор</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1. Рак на белия дроб – значимост, разпространение, фактори</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.1. Социална значимост</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.2. Рискови фактори, свързани с появата на рак на белия дроб</b> .....	<b>10</b>
I.1.2.1. Тютюнопушене .....	10
I.1.2.2. Рак на белия дроб при непушачи .....	12
I.1.2.3. Генетични фактори .....	13
I.1.2.4. Влияние на пола .....	15
I.1.2.5. Влияние на възрастта .....	16
I.1.2.6. Замърсявания на въздуха .....	17
<b>I.1.3. Рак на белия дроб – общо описание</b> .....	<b>18</b>
<b>I.1.4. Класификация на белодробния карцином</b> .....	<b>21</b>
<b>I.1.5. Лечение на недребноклетъчен белодробен рак</b> .....	<b>24</b>
I.1.5.1. При пациенти в Стадий I-II заболяване .....	24
I.1.5.2. При пациенти в стадий III на заболяването .....	25
I.1.5.3. При пациенти в стадий IV на заболяването .....	26
<b>I.1.6. Лечение на дребноклетъчен белодробен рак</b> .....	<b>27</b>
I.1.6.1. Лечение на ограничена болест-LD .....	27
I.1.6.2. Лечение на обширно заболяване-ED .....	28
<b>I.1.7. Химиотерапевтични агенти</b> .....	<b>29</b>
I.1.7.1. Адриамицин .....	30
I.1.7.2. Винкристин .....	31
I.1.7.3. Циклофосфамид .....	32
I.1.7.4. Платинови производни .....	32
I.1.7.5. Гемцитабин .....	33
I.1.7.6. Таксани .....	34
I.1.7.7. Топоизомеразни инхибитори .....	35
I.1.7.8. Етопозид .....	36
I.1.7.9. Пеметрексет .....	37
I.1.7.10. Бевацизумаб .....	38
I.1.7.11. Ерлотиниб, Гефитиниб .....	38
<b>I.2. Свободно-радикални процеси в етиологията и патогенезата на онкологичните заболявания</b> .....	<b>40</b>
<b>I.2.1. Свободни радикали, оксидативен стрес и антиоксидантна защита</b> .....	<b>41</b>
I.2.1.1. Активни форми на кислорода – общ преглед, видове и източници..	41
I.2.1.2. Молекулни увреждания вследствие взаимодействието с АФК .....	45
I.2.1.3. Антиоксидантна защита срещу оксидативното увреждане .....	46
<b>I.2.2. Оксидативния стрес и онкологични заболявания</b> .....	<b>48</b>

I.2.2.1. Принос на СР в механизмите на сигнална трансдукция при инициране на неопластичните процеси .....	48
I.2.2.2. Роля на клетъчната антиоксидантната защитна система в процеса на адаптация на неопластични клетки .....	51
I.2.2.3. Значение на СР за подпомагане на преживяемостта, ангиогенезата и метастазирането .....	53
I.2.2.4. Модулиране на нивата на АФК като съпътваща терапия при лечение на онкологични заболявания .....	55
<b>II. Цел и задачи .....</b>	<b>59</b>
<b>III. Материали и методи .....</b>	<b>60</b>
<b>IV. Резултати .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1. Описание на пациентите .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на пациентите .....</b>	<b>67</b>
<b>IV.3. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус .....</b>	<b>81</b>
<b>V. Дискусия .....</b>	<b>94</b>
<b>VI. Изводи .....</b>	<b>98</b>
<b>VII. Приноси .....</b>	<b>100</b>
<b>VIII. Списък на публикациите .....</b>	<b>101</b>
<b>Литература .....</b>	<b>103</b>

## 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 2015г. 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 недробноклетъчен (аденокарцином, плоскоклетъчен карцином, едроклетъчен карцином). Често се описват и смесени форми. Недробноклетъчният белодробен карцином е 85 % от всички видове белодробен рак.

Като рискови фактори, свързани с появата на рак на белия дроб основно се посочва тютюнопушенето. Приблизително 85% от случаите се появява 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-следствената 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 полът на пациентите и заболяемостта и смъртността като едно от предполагаемите обяснения за тези различията, свързани с пола е разлика при метаболитно активиране или детоксикация на белодробни канцерогени а именно при клирънса на плазмения никотин от ензимите на цитохром P<sub>450</sub>.

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 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 използван в лечение на SCLC за 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 патофизиологичният механизъм на развитие на онкологичните заболявания. През годините има множество доказателство за приносът на свободните радикали в механизмите на сигнална трансдукция при инициерирането, 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 медираат 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.

## I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### I.1. Рак на белия дроб – значимост, разпространение, фактори.

#### I.1.1. Социална значимост

Ракът на белия дроб е водещата причина в световен мащаб от 1985 г. насам, както по отношение на честотата (1,350,000 нови случая или 12,4% заболяемост), така и по отношение на общата смъртност и смъртността от злокачествени неоплазми (съответно 1,180,000 смъртни случая или 17,6%). Една от страните, в които се води дългогодишна статистика за онкологичните заболявания е САЩ. Годишната смъртност от рак на белите дробове при американците е приблизително равна на смъртността от такива онкологични заболявания като рак на простатата, гърдата и дебелото черво взети заедно [Siegel *et al.*, 2011]. Петгодишната честота на преживяемост в САЩ за рак на белите дробове е 15,6% и макар да е имало известно подобрене в този показател през последните няколко десетилетия, нарастването на преживяемостта постигната при други често срещани злокачествени заболявания, все още не е постигната за пациентите диагностицирани с рак на белите дробове.

Честотата на това заболяване варира в зависимост от социалния статус, пола и възрастта на пациентите. В развиващите се страни се наблюдава голямо относително увеличение на броя на случаите на рак на белите дробове. През 1980 г. 69% от случаите на този вид рак в световен мащаб са регистрирани в развитите страни, докато сега приблизително половината (49,9%) от случаите са хора в развиващите се страни. Регистрираните случаи на рак на белите дробове в световен мащаб се е увеличил с 51% от 1985 г. насам, като увеличението е по-малко при мъжете - 44% и значително по-голямо при жените - 76%. В Съединените щати ракът на белите дробове и бронхите се нарежда на второ място при двата пола с около 115060 нови случая при мъжете (14% от всички нови ракови заболявания) и 106070 при жените (14% от всички нови ракови

заболявания) [Siegel *et al.*, 2011, Jemal *et al.*,2011]. Възрастово-коригираната честота на рак на белия дроб е 62 на 100 000 мъже и жени годишно в Съединените щати, като честотата на заболяемост е по-висока при мъжете, отколкото при жените (75.2 срещу 52.3 на 100 000). При пациенти с рак на белия дроб от двата пола се увеличава броят на предполагаемите смъртни случаи годишно (85600 или 28% от всички смъртни случаи при рак при мъжете и 71340 или 26% от всички смъртни случаи при рак при жените) [Jemal *et al.*,2011].

Честотата на белодробния карцином при мъжете в Европа и САЩ се намалява от началото на 80-те години на миналия век. Степента на разпространение и смъртност при рак на белия дроб са близки като стойност, тъй като повечето пациенти, диагностицирани с рак на белия дроб, в крайна сметка умират от него. При жените обаче смъртността от рак на белите дробове продължава да се увеличава с 0.3% годишно от 1995 до 2005 г. По-новите данни от 2003 до 2006 г. показват окуражаваща тенденция с начален спад от 0.9% годишно [Siegel *et al.*, 2011, Howlander *et al.*, 2011]. Честотата на рак на белите дробове сред жените е намалена през последните десетилетия, от 5.6% между 1975 и 1982 г. до 3.4% между 1982 и 1990 г., до 0.4% между 1991 г. и 2006 г. и до 2.3% между 2006 и 2008 г. [Howlander *et al.*, 2011]. Последните данни показват, че смъртността от рак на белия дроб намалява при жените за първи път, повече от десетилетие след тенденцията за намаляването при мъжете (поради промяна в честотата на рака на белия дроб при жените). Наблюдаваното забавяне на редуциране на честота на рак на белия дроб при жените в сравнение с мъжете се дължи на факта, че тютюнопушенето при жените достига своята популярност около две десетилетия по-късно, отколкото при мъжете. По този начин степента на смъртност от рак на белия дроб изглежда достига до плато, което е окуражаваща промяна в сравнение с рязкото увеличение през 70-те години на миналия век [Siegel *et al.*, 2011].

Ракът на белия дроб е най-честото злокачествено заболяване при мъжете и заема седмо място по честота при жените в България. Белодробният карцином представлява 18.9 % от всички злокачествени заболявания при мъжете и 4.8 % от тези при жените. През 2011 г. са регистрирани 3757 нови случая, от които 82 % са при мъжете. Фактичката заболеваемост от рак на белите дробове е 86.1 на 100 000 мъже и 17.9 на 100 000 жени. През 2011 г. от рак на белия дроб са починали 3357 души, от които 80.6 % са мъже. Фактичката смъртност е 75.6 на 100 000 мъже и 17.3 на 100 000 жени. Тенденциите в заболеваемостта и смъртността от рак на белия дроб показват увеличение съответно при мъжете с 1.2 % и с 0.2 % средногодишно и съответно при жените – с 2.3 % и с 0.5 % средногодишно.

Заболеваемостта от рак на белия дроб се увеличава бързо с напредване на възрастта при мъжете над 40 години, достига своя пик при 70-74 годишните (336.4 на 100 000), след което отново стръмно намалява. При жените също се наблюдава увеличение на заболеваемостта след 40-45 годишна възраст, но то е по-плавно. Заболеваемостта от рак на белия дроб при мъжете е най-висока в областите Добрич и Хасково (над 60 на 100 000), а при жените – в Хасково и София-град (над 11 на 100 000). Смъртността от рак на белия дроб при мъжете е най-висока в областите Пловдив, Плевен и Враца (над 50 на 100 000), при жените – в Перник, Велико Търново и Хасково (над 11 на 100 000). Морфологично са доказани 75 % от случаите. Разпределението по морфологични видове показва, че най-често се диагностицира плоскоклетъчен карцином на белия дроб (55 % при мъжете и 37.8 % при жените). Следващи по честота са дребноклетъчният карцином (14.8 % при мъжете и 11.9 % при жените) и аденокарциномът (12.3 % при мъжете и 23.1 % при жените).

Около 70 % от пациентите се диагностицират в напреднал (трети и четвърти) стадий на заболяването, като само при около 15 % то е установено в първи и втори стадий, при останалите – стадият е неуточнен. Заболеваемостта и

смъртността от рак на белия дроб при мъжете в България са по-високи от средните за Европа. Данни за 2012 г. показват заболеваемост за България 73.1 на 100 000 мъже, при средна за Европа – 68.3 на 100 000 мъже и смъртност – 67.7 и 59.1 на 100 000 мъже, съответно. При жените в България заболеваемостта е 12.4 на 100 000 и смъртността 11.3 на 100 000 от рак на белия дроб са по-ниски от средните за Европа – 21.6 и 17.2 на 100 000 жени, съответно. Относителната петгодишна преживяемост от рак на белия дроб в България е много ниска – 5.9 % при мъжете, 10.8 % при жените или 6.2 % общо двата пола (тя е по-ниска от средната за Европа – 13.0 %). Данни за 2014 г. показват над 4 000 новодиагностицирани случаи с рак на белия дроб.

## **I.1.2. Рискови фактори, свързани с появата на рак на белия дроб**

### **I.1.2.1. Тютюнопушене**

Тютюнопушенето е най-важният фактор, който увеличава риска от развитието на рак на белите дробове. Приблизително 85% от случаите на пациенти с рак на белия дроб се появява при настоящи или бивши пушачи. Цигареният дим съдържа повече от 60 известни канцерогени, от които за 20 има солидни доказателства, че причиняват тумори на белите дробове при изследвания, включващи лабораторни животни или хора [Hecht, 1999] От тях полициклични ароматни въглеводороди като бензопирен, специфични за тютюна, нитрозамини като 4- (метилнитрозамино) -1- (3-пиридил) -1 -бутанон (NNK) и ароматни амини -аминобифенил, имат важна роля в причинно-следствената връзка с рака. Нитрозамини като NNK индуцират белодробни тумори в мишки, независимо от начина на приложение. С ред полицикличните ароматни въглеводороди бензопиренът е най-широко изследван и първият, който се открива в тютюневия дим. Ролята му в канцерогенезата е добре

описана, като неговия диолепоксиден метаболит е причина за мутации в p53 гена [Denissenko *et al.*, 1996]. Един от канцерогенните ефекти на тютюневия дим в белите дробове е образуването на ДНК адукти, което води до грешки в репликацията на ДНК и до мутации. ДНК адукти са идентифицирани в бронхиалната тъкан на пациенти с рак на белия дроб. При настоящите пушачи нивата на адукта корелират с продължителността на излагане на тютюнев дим [Wiencke *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 1988]. При бившите пушачи времето, през което са употребявали цигари е обратно пропорционално на нивата на адукти на ДНК, което предполага, че превенцията на тютюнопушенето в юношеството е от изключителна важност за намаляване на риска от рак на белите дробове.

Въпреки, че употребата на тютюн е основната причина за поява на белодробен рак, повечето хронични пушачи не развиват рак на белия дроб. Причините за това могат да бъдат различни. Различната чувствителност към излагане на тютюнев дим може да бъде свързана с разлики в ензимите, метаболизиращи канцерогените; механизмите за възстановяване на ДНК; издръжливостта на хромозомите; както и на други хомеостатични механизми. Сред гените за ензими, метаболизиращи канцерогените, най-голямо внимание е фокусирано върху полиморфизмите в гените на цитохром P-450, CYP1A1, CYP2D6 и CYP2E1 и в ти-класа глутатион S-трансфераза (GSTM1). В допълнение към присъщата чувствителност към канцерогенните ефекти на тютюневия дим, големи проучвания за асоцииране с генома, са идентифицирани локусите за чувствителност към рак на белия дроб при 15q25, 5p15 и 6p21 [Landi *et al.*, 2009; Truong *et al.*, 2010]. По-специално полиморфизмите в никотиновите холинергични рецептори на хромозомата 15q25 изглежда корелират с mRNA и протеинова експресия на тези рецептори, както и функционални промени в калция на A5 никотиновия рецептор; тези различия придават чувствителност към поведението на тютюнопушенето [Sherva *et al.*, 2008].

### **I.1.2.2. Рак на белия дроб при непушачи.**

Терминът „непушачи“ се отнася за лица, които са пушили по-малко от 100 цигари през целия си живот, включително непушачи през целия живот. От наличната обаче общата глобална статистика се вижда, че 15% от раковите заболявания на белите дробове при мъжете и до 53% при жените не се дължат на тютюнопушенето, като непушачи, които представляват 25% от всички случаи на рак на белия дроб. Ракът при непушачи се разглежда отделно, той се нарежда като седма най-честа причина за смърт от рак в световен мащаб преди рак на шийката на матката, панкреаса и простатата [Rudin *et al.*, 2009].

Въпреки, че всички хистологични видове рак на белия дроб се свързват с пушенето на цигари, при пушачите асоциацията е по-силна за SCLC и за плоскоклетъчен карцином. За разлика от тях, аденокарциномът на белите дробове е по-честа при непушачите - 62% срещу 18%, на базата на 5144 случая, в сравнение с пушачите - 19% срещу 53% на база 21 853 случая [Sun *et al.*, 2007]. Въпреки това, аденокарциномът става все по-разпространен дори сред пушачите [Gray, 2006; Kenfield *et al.*, 2008]. Тази констатация може да се дължи на по-дълбоко вдишване на цигари, съдържащи катран и никотин, водещи до по-периферно разпределение на цигарения дим в белия дроб [Liu *et al.*, 2000]. Аденокарциномът се превръща в други типове рак на белия дроб при млади пациенти, но особено при непушачи [Wakelee *et al.*, 2007]. Съществуват и други проучвания, които показват широкото разпространение на аденокарцинома при непушачите [Toh *et al.*, 2006; Yang, 2011]. Въпреки, че не е имало преобладаващ етиологичен фактор, рисковите фактори, които се смятат за важни за непушачите, включват пасивното тютюнопушене; излагане на радон; екологични експозиции, като замърсяване на въздуха в затворени помещения, азбест и арсен; ХОББ и генетични фактори [Gorlova *et al.*, 2006].

При направени проучвания в Азия (Хонконг, Сингапур и Япония) е установено, че ракът на белите дробове сред непушачите се диагностицира на

по-ранна възраст, отколкото при пушачите [Shimizu *et al.*, 1984; Nordquist *et al.*, 2004]. При аналогични проучвания в САЩ или Европа тези данни не са потвърдени [Takeuchi *et al.*, 2006]. Предполага се, че прагът на изследване при симптоматичните непушачи е по-висок, което води до диагностициране на по-късни етапи при тях. Поради потенциално забавената диагноза и по-късно установяване на рака на белия дроб при непушачите, нивото на преживяемост не е по-добро от това на пушачите - 23% 5-годишен процент на преживяемост при непушачите [Takeuchi *et al.*, 2006]. Такива констатации предполагат, че ракът при непушачите може да се окаже друга болестна група. В тази посока са и данните, че съществуват и епидемиологични, клиничко-патологични и молекулярни различия между раковите заболявания на белите дробове при непушачи и пушачи, което дава основание някои изследователи да предполагат, че ракът на белия дроб при непушачите може да бъде различно заболяване. Изследванията на микроорганизми за генно профилиране установяват, че белодробните аденокарциноми са хетерогенни при пушачи и непушачи [Lam *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010].

### **I.1.2.3. Генетични фактори**

Данните от проучването на рака на белия дроб при непушачи изваждат на преден план друг фактор, който оказва влияние върху появата на това заболяване - генетичния. Проучвания показват връзка между рак на белия дроб при непушачите и фамилна анамнеза за рак на белия дроб, което установява ролята на генетичните фактори [Wu *et al.*, 2004; Bellet *et al.*, 2005; Gorlova *et al.*, 2007]. Например, проучване на случаите след 2400 роднини от 316 никога не са пушили, случаите на рак на белите дробове показват 25% по-висок риск от рак при роднини от рак на белодробния рак от първо ниво [Wu *et al.*, 2004]. Някои изследвания обаче показват ролята на пътя на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR), human mutS homolog 2 (hMSH2) и различни ензими –

цитохром P450 и глутатион-S-трансфераза [Pao *et al.*, 2004; Wenzlaff *et al.*, 2005; Wenzlaff *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006]. Последните данни обаче показват повишена честота на EGFR мутации в белодробните аденокарциноми на непущачите, проведени върху пациенти от азиатски произход [Kosaka *et al.*, 2004; Shigematsu *et al.*, 2005; Tohet *et al.*, 2006; Rudin *et al.*, 2009].

Анализът на предсказване на риска от рак на белите дробове, разработен от Spitz и колектив [2008a; 2008 b], включва множество променливи, като история на тютюнопушенето, експозиция на тютюнев дим в околната среда, професионално излагане на прах и азбест и фамилна анамнеза за рак. Те показаха влиянието на фамилната анамнеза за рак върху риска от рак на белия дроб при непущачи, бивши пушачи и настоящи пушачи. Cassidy *et al.* [2008]. също така установяват значително увеличен риск от рак на белите дробове, специално за лицата с фамилна анамнеза за ранен рак на белия дроб под 60 годишна възраст

Мета-анализ, включващ 32 проучвания, показва два пъти увеличен риск от рак на белия дроб при лица с фамилна анамнеза за рак на белия дроб с повишен риск за развитие на болестта при непущачи [Benhamou *et al.*, 2002]. Добавянето на историята на тютюнопушенето към тази предразположеност води до трикратно увеличаване на риска от рак на белия дроб.

Предиспозицията към рак на белия дроб се определя поне отчасти от генетичните фактори на индивида. Лицата с генетична чувствителност са изложени на по-висок риск, ако пушат тютюн. С напредването на технологиите е възможно да се насочат подгрупи, идентифицирани като генетично висок риск за рак на белия дроб, за специфични интервенции, включително интензивни усилия за прекратяване на тютюнопушенето, скрининг и програми за превенция.

#### **I.1.2.4. Влияние на пола.**

Ракът на белите дробове превъзхожда рака на гърдата като водеща причина за раковите смъртни случаи при жените в края на 80-те години и сега почти два пъти повече жени умират от рак на белия дроб, отколкото рак на гърдата [Siegel *et al.*, 2011]. Смята се, че това е следствие от нарастване на броя пушещи жени през предишния период от две десетилетия. Пушенето на цигари е достигнало връх по време на Втората световна война сред мъжете родени през 20-те години. Степента на пушене при жените достига най-много десетилетие по-късно сред родените през 30-те години на миналия век. Преобладаването на тютюнопушенето е по-голямо при мъжете (23%), отколкото при жените (18%); тази разлика обаче се намалява. С превенцията, която се провежда по отношение на намаляване на тютюнопушенето, смъртните случаи от рак на белия дроб се очаква да продължат да намаляват и при двата пола, защото възрастните мъже и жени и техните по-млади колеги пушат по-малко.

Въпреки, че общата възрастово-регулирана честота на рак на белите дробове е все още по-висока при мъжете, отколкото при жените, тази разлика намалява поради продължителното намаляване на честотата на рак на белия дроб при мъжете. Пушенето на цигари остава най-важният фактор за развитието на рак на белите дробове при жените, като някои от тях предполагат, че до 80% от случаите при жените са свързани с тютюнопушенето [Wakelee *et al.*, 2007].

Наблюдаваните различия в половата чувствителност могат да бъдат свързани с различията, свързани с пола, в метаболизма на никотин и при метаболитно активиране или детоксикация на белодробни канцерогени. Проучванията показват такива различия между половете при клирънс на плазмения никотин от ензимите на цитохром P450. Например, в няколко доклада са коментирани разликите между двата пола при рак на белите дробове, наблюдавани на молекулярно ниво. Ryberg *et al.* [1994] отбелязват, че жените с рак на белия дроб имат по-високи нива на DNA адукти отколкото мъжете.

Такива пациенти могат да бъдат по-податливи на канцерогени, което може да обясни защо изглежда, че жените развиват рак на белите дробове с по-слаба употреба на цигари. Освен това, хормоналните фактори също могат да играят роля в чувствителността. Проучване на случаите показва, че естрогенната заместителна терапия е свързана значително с повишен риск от аденокарцином, докато комбинацията от цигари и естроген заместител повишава значително този риск [Slatore *et al.*, 2010]. Обратно, ранната менопауза (на възраст 40 години или под 40 г.) е свързана с намален риск от аденокарцином. По-нови рандомизирани проучвания предполагат, че употребата на хормонални терапии, като естроген и прогестин, е свързана с повишен риск от рак на белия дроб при жените. Наблюдаваният риск е пропорционален на продължителността на експозицията на хормони с приблизително 50% повишен риск за тези, които са използвали хормонозаместителна терапия в продължение на 10 години.

#### **I.1.2.5. Влияние на възрастта.**

Средната възраст на диагностицирани с рак на белия дроб пациенти в развитите страни се увеличава. Въпреки, че честотата на тютюнопушенето е най-ниска сред лицата на 65 и повече години е около 9% в сравнение с лица на възраст от 18 до 24 години, чийто дял е около 20 %. В следващите две възрастови групи 25-44 години и 45-64 години, процентът леко нараства, но е близо до 20 % (съответно около 24% и 23 %). Повече от 65% от пациентите с рак на белия дроб са на възраст над 65 години [Dube *et al.*, 2009]. От тези данни се вижда, че малко над 30 % от пациентите с рак на белия дроб са между 65 и 74 години, почти толкова са между 75 и 84 години и около 8% са по-възрастни. Средната възраст по време на диагностицирането е над 70. Тази разлика между по-ниското разпространение на тютюнопушенето и по-високия процент на рака при възрастните хора вероятно отразява тежката история на тютюнопушенето при сегашната възрастна популация. През последното десетилетие честотата и

смъртността от рак на белите дробове са намалели сред хората на възраст 50 години и по-млади, но са се повишили сред лицата на възраст над 70 години [Gridelli *et al.*, 2007]. Пет-годишната честота на преживяемост при рак на белия дроб намалява нарастващо с възрастта за двата пола. Смята се, че броят на пациентите с рак на белия дроб на възраст 85 и повече години ще се увеличи четирикратно до 2050 г. Последните данни показват, че възрастните пациенти, особено функционално здравият възрастен, с рак на белите дробове, могат да се възползват от лечението, използвани за по-млади пациенти, включително операция за ранно стадийно заболяване и химиотерапия с едно лекарство за напреднало заболяване [Gridelli *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2010].

#### **I.1. 2.6. Замярявания на въздуха [Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013].**

Замяряването на въздуха се превърна в проблем в световен мащаб, като се има предвид сегашното ниво на глобализация и индустриализация. Борбата за по-чист въздух и намаляване на нивото на финни прахови частици в големите градове е във фокуса на вниманието на обществото. Ефектите от ниските нива на експозиция на замяряване на въздуха за по-дълъг период от време са по-трудни за измерване, особено дългосрочните и акумулиращи се ефекти върху рисковете от рак на белите дробове. Замяряването на външния въздух отдавна се смята, че увеличава риска от рак на белите дробове. Проучвания, включващи сравнения между градските и селските райони, показват, че "градски фактор" е свързан с 10% до 40% увеличение на смъртността от рак на белите дробове. Проучване на случаите на белодробен карцином в Швеция показват, относително повишен риск за лица, изложени на повече от 29.3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  азотен оксид (като мярка за замяряване на въздуха в трафика) в продължение на период от две до три десетилетия в сравнение с изложените на два и половина пъти по-ниски нива от 12.8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  азотен оксид. Замяряването, свързано с финни прахови частици и серен оксид, е свързано с 8% повишен риск

за смъртност от рак на белия дроб за всяко увеличение с  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  при дългосрочна средна околна концентрация на фини частици по-малко с диаметър повече от  $2,5 \mu\text{m}$ . Въпреки тези проучвания все още е трудно да се определи канцерогенната роля, която играят отделните съставки на замърсяването на въздуха.

### **I.1.3. Рак на белия дроб – общо описание.**

Има четири основни форми на рак на белите дробове, описани от Световната здравна организация (СЗО): аденокарцином, плоскоклетъчен карцином, едроклетъчен карцином и дребноклетъчен на белия дроб; Често се описват и смесени форми (например аденосквамозни карциноми) ,които са относително често срещани [Brambilla *et al.*, 2001; D'Addario *et al.*,2009]. Понякога дребноклетъчните карциноми се смесват с хистологии на недробноклетъчен рак на белия дроб (аденокарцином или сквамозен карцином) [Brambilla *et al.*, 2001]. През последните няколко десетилетия броят от сквамозните клетъчни карциноми намалява и този на аденокарциномите се увеличава. Интересното е, че аденокарциномите са най-разпространената форма на рак на белия дроб при жените, млади и непушачи. Въпреки това, сред жените честотата на плоскоклетъчния карцином и SCLC също се увеличават напоследък [Devesa *et al*, 2005]. По-голямата част от SCLC, карциноидите и 15% от NSCLC съдържат невроендокринни клетки. Основната функция на тези клетки е разработването, съхранението и секрецията на малки пептиди и биогенни амини [Gustafsson *et al.*, 2008].

Различните хистологични форми на рак на белите дробове възникват в различни области на белия дроб; централното местоположение е характеристика на SCLC и плоскоклетъчен карцином, докато аденокарциноми и

едроклетъчните карциноми се развиват главно периферно. Около 40% от дребноклетъчните карциноми са централно разположени [Posther & Harpole, 2006]. Те са по-чувствителни по отношение на прилагане на химио- и радиотерапия в сравнение с NSCLC.

Друго различие е, че в сравнение с NSCLC, SCLC има по-голяма тенденция да се развива бързо и по-рано да метастазира. SCLC представлява 13-20% от всички ракови заболявания на белите дробове и е с много лоша прогноза - без лечение средната обща преживяемост е 2-4 месеца [Simon & Turrisi, 2007]. Въпреки че NSCLC развива далечни метастази в по-малка степен, над 50% от пациентите имат метастази на по-късен етап в хода на заболяването. Пациентите с N2 метастази и аденокарцином като хистологичен подтип са по-склонни към мозъчни метастази [Tanoue, 2008].

Ракът на белия дроб може да се разпространи локално (т.е. интраторакално) чрез регионалните лимфни възли или хематогенно чрез формиране на отдалечени метастази. Метастази могат да се появят в повечето органи, но са по-чести в черния дроб, костите, белите дробове, мозъка и надбъбречните жлези [Tanoue, 2008]. Прогнозни фактори включват размер на тумора, стадия на рака, хистологичен тип, общо състояние на пациента, загуба на тегло до диагностицирането му, мутация на K-ras онкоген и делеция на туморни супресорни гени (p53) [DeVita *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 1999].

Най-честите симптоми на рак на белия дроб са кашлица, хемоптиза, болка, диспнея, загуба на апетит, загуба на тегло, чести пневмонии, анорексия, неразположение и слабост [Hamilton *et al.*, 2005; Sher *et al.*, 2008]. По-редки симптоми са синдромът на "Клод-Бернар-Хорнер", който се описва паранеопластичен. Ектопичната продукция на адренален кортикотропен хормон (АСТН) може да предизвика синдром на Cushing и до синдром на повишена секреция на АДН (SIADH) [Gustafsson *et al.*, 2008]. Паранеопластичните

симптоми могат също така да включват невропатия или други неврологични дефицити [Sher *et al.*, 2008].

Диагнозата на рак на белите дробове се основава на физически преглед, рентгенологичните находки (включително рентгенография на гърдите и компютърна томография на гърдите и горната коремна компютърна томография и / или магнитно резонансно изображение), както и хистологично/цитологично изследване. Фиброоптичната бронхоскопия позволява ендоскопско получаване на миеци, лаважни и трансезофагиални биопсични материали за патологичен анализ. Бронхоскопията е инструмент за получаване на биопсия и планиране на хирургическа резекция [Posther & Harpole, 2006; Sher *et al.*, 2008]. Ендоскопският ултразвук може да се извърши за подпомагане на оценката на лимфните възли [Krasnik *et al.*, 2006]. Компютърната томография е от съществено значение за оценка на стадия и терапевтичното поведение при рак на белите дробове. Добавянето на позитрон-емисионната-томография (PET) за диагностика на рак на белите дробове, особено при оценяването медиастинални лимфни възли, значително подобри чувствителността на диагнозата. В допълнение, може да се извърши медиастиноскопия за изследване на възможни метастази в медиастинума.

Клиничните симптоми на белодробния рак не са специфични, проявяват се сравнително късно и това затруднява диагностиката в ранните стадии. Повечето пациенти живеят месеци наред със симптоми на рак на белия дроб преди да бъдат окончателно диагностицирани. Нерядко асимптоматичните белодробни тумори се откриват случайно при рентгенов преглед по друг повод. Обикновено началните симптоми засягат дихателната система. Сухата, дразнеща, непродуктивна кашлица може да бъде сравнително ранен симптом на белодробен карцином. Кръвохракът обикновено се изразява като наличие на жилки кръв в храчките или наличие на „ръждиви“ храчки. Болката в гръдния кош се появява при ангажиране на плеврите или гръдната стена, т.е. когато

туморът е нараснал значително. При локално разпространение на тумора чрез прорастване или метастатично ангажиране на регионалните лимфни възли могат да се изявят следните симптоми: затруднено преглъщане (при засягане на хранопровода), одрезгавяване на гласа (пареза или парализа на гласна връзка), оток на шията и лицето и застойни шийни вени при притискане на структурите на горния преден медиастинум, поява на плеврален излив, проявяващ се с прогресивен задух и др. Неспецифични симптоми са причина около 10% от болните да потърсят лекарска помощ – загуба на тегло, слабост, отпадналост, наличие на световъртеж, болки по костите, немотивирана температура. Понеже много от симптомите на белодробния карцином са подобни на симптомите на по-малко сериозни заболявания, може да отнеме доста време на лекаря да постави точна диагноза.

#### **I.1.4. Класификация на белодробния карцином**

Етапната класификация за недребноклетъчен рак на белия дроб (NSCLC) следва парадигмата на тумора, възела, метастази (TNM), използван за повечето солидни тумори. Стадирането осигурява еднаква стандартизирана номенклатура, която описва анатомичната степен на заболяването, а именно мястото на първичния тумор (Т-компонента), както и разпространението на рака до възли (N компонент) или далечни метастатични места (компонент М). Последното (седмо издание) на класификацията на рака на белия дроб се основава на безпрецедентно усилие, насочено от Международната асоциация за изследване на рака на белия дроб (IASLC) [Goldstraw *et al.*, 2007; Rami-Porta *et al.*, 2007; Rusch *et al.*, 2007; Postmus *et al.*, 2007] включва международна база данни от над 100 000 пациенти, идентифицирана за периода 1990-2000 г. от 46 източника в 19 страни в Северна Америка, Азия, Австралия и Европа и сложен статистически анализ с обширно вътрешно и външно валидиране [Goldstraw *et*

*al.*, 2006]. Тази степен на класификация се отнася за SCLC и NSCLC, както и за карциноидни тумори [Shepherd *et al.*, 2007; Travis *et al.*, 2008]

Определенията на категориите T, N и M за NSCLC и дребноклетъчен белодробен рак (SCLC) са подробно очертани в по-долу [Detterbeck *et al.*, 2009]. Въпреки че в идеалния случай всеки етап би представлявал хомогенна група пациенти, това не е задължително случаят, както се вижда в диапазона на T, N и M комбинации, които включват етап IIB или IIIA, например. Въпреки това системата предоставя практичен начин за управление на сложността на голям брой категории T, N и M в по-ограничен брой групи.

### **T (първичен тумор)**

T1: < 3 cm, заобиколен от бял дроб или висцерална плевра, не по-проксимално от дялов бронх;

T1a = тумор < 2 cm,

T1b = тумор > 2, но < 3 cm.

T2: > 3, но < 7 cm или тумор с някоя от следните характеристики: нахлува във висцерална плевра, засяга главен бронх > 2 cm дистално от бифуркация на трахея, ателектаза/обструктивна пневмония, простираща се до хилуса, но не включваща цял бял дроб;

T2a = тумор > 3, но < 5 cm,

T2b = тумор > 5, но < 7 cm.

T3: тумор > 7 cm (T3>7); или директно навлизащ в гръдна стена, диафрагма, диафрагмен нерв или париетален перикард (T3Inv); или тумор в главен бронх < 2 cm дистално от бифуркация на трахея (T3Centr); или ателектаза/обструктивна пневмония в същия дял (T3Centr);

T4: тумор с всякакви размери, който навлиза в сърце, големи съдове, трахея, възвратен ларингеален нерв, хранопровод, тяло на прешлен или бифуркация на

трахея (T4INV); или отделни туморни възли в различен ипсилатерален дял (T4IPSINOTL).

### **N (регионални лимфни възли)**

N0: без метастаза в регионален възел.

N1: метастаза на ипсилатерални перибронхиални и/или перихиларни лимфни възли и интрапулмонарни възли, включително засягане чрез пряк растеж.

N2: метастаза в ипсилатерален медиастинален и/или лимфен(ни) възел(и) под бифуркация на трахея.

N3: метастаза в контралатерални медиастинални, контралатералнихилусни, ипсилатерални или контралатерални скаленови или супраклавикуларни лимфни възли.

### **M (далечна метастаза)**

M0: без далечна метастаза.

M1: отделни туморни възли в контралатерален дял (M1aContl.Nod) или злокачествена плеврална дисеминация (M1aPIDissem); далечни метастази (M1b).

За онкологичната практика, респективно за стратегията на лечение, е важно определяне на клиничния стадий на белодробния карцином, който се определя от следната класификация:

**Окултен карцином T<sub>x</sub>N0M0**

**Стадий 0 TisN0M0**

**Стадий IA T1N0M0**

**Стадий IB T2N0M0**

**Стадий IIA T1N1M0**

**Стадий IIB T2N1M0; T3N0M0**

**Стадий IIIA T1N2M0; T2N2M0; T3N1M0; T3N2M0**

**Стадий III** всяко TN3M0; T3 всяко NM0

**Стадий IV** всяко T всяко NM1

### **I.1.5. Лечение на недробноклетъчен белодробен рак**

Преди да се пристъпи към лечението на пациента с белодробен карцином се определя стадия на заболяването, като се използва класификацията TNM и се установи общото състояние на пациента. Взимат се под внимание други заболявания на пациентите – белодробни, сърдечни, както и възможността пациента да спазва лечението [Gridelli *et al.*, 2003].

Хирургията е най-ефективния метод на лечение за недробноклетъчен белодробен рак. В зависимост от специфичните характеристики на заболяването хирургията може да бъде или пулмонектомия, или лобектомия. Също така билобектомията е възможност в зависимост от обема и местоположението на тумора. Основните усложнения при операцията включват предсърдно мъждене, аритмии, ателектаза, емфизем и пневмония. Има съобщения на смъртността сред възрастните (1,5%) или тези с компрометирана белодробна функция (2.1%). Други усложнения, дължащи се на операция, могат да включват дълбока венозна тромбоза и други тромбоемболични събития, продължителен дренаж на гърдния кош, ателектаза, бронхиална фистула, пневмоторакс или кървене [Posther & Harpole, 2006].

#### **I.1.5.1. При пациенти в Стадий I-II заболяване**

В стадии I и II трябва да се извършва резекция винаги, когато е възможно, и адювантна химиотерапия на базата на цисплатина, когато е възможно, особено при болест в стадий II [Tanoue, 2008]. За съжаление, само

15-20% от белодробните тумори могат да бъдат радикално резектирани [Gridelli *et al.*, 2003]. В ранните етапи добавянето на лъчетерапия след операцията не е доказано, че подобрява преживяемостта [Gridelli *et al.*, 2003]. При пациенти, които не могат да се лекуват поради коморбидността или компрометираната белодробна функция, радикалната лъчетерапия е метод на избор за лечение [D'Addario *et al.*, 2009]. В такива случаи се облъчва само първичният тумор, ако заболяването е в I-ви клиничен стадий, докато при II стадий също се включва ипсилатералните лимфни възли [Chao *et al.*, 1999].

### **I.1.5.2. При пациенти в стадий III на заболяването**

Стадий III на рак на белия дроб е особено хетерогенна група от тумори и неточно могат да се дадат указания за лечението. Лечението на рак в стадий III също е предмет на интензивни клинични изследвания поради лошата си прогноза. Състоянието на медиастиналните лимфни възли (N2) често определят дали пациентът е подходящ за операция. В Европа и Япония пациентите с известни N2-позитивни тумори се лекуват с операция и след операцията се провежда адювантна химиотерапия, докато в САЩ се използват неoadювантна химиотерапия или неoadювантна химиорадиотерапия [Posther & Harpole, 2006].

Оптималното лечение на пациентите при локално авансирало заболяване остава противоречива [Battafarano *et al.*, 2002]. При неподходящи за радикално хирургично лечение случаи, се препоръчва лъчетерапия или химиорадиотерапия. Има два различни начина за комбинирана химиотерапия и лъчетерапия, като ги прилагат последователно или едновременно [Jassem, (2007)]. При последователното лечение се прилага комбинирана химиотерапия 4-6 цикъла, последвани от торакална лъчетерапия. Съпътстващият режим предизвиква повече нежелани събития; дългосрочната токсичност все пак е била сходна в последователните и едновременни проучвания на лечението. Липсата на локален контрол след проведеното лечение в NSCLC е все още най-

голямото предизвикателство [Gridelli *et al.*, 2003; Fietkau 2004]. Пет-годишната честота на преживяемост за локално напреднал белодробен рак е 13% и 5% за стадии IIIA и IIIB, съответно [Gridelli *et al.*,2003]. Лечението с последваща химиотерапия (доцетаксел, ерлотиниб илипеметрексед при не-сквамозноклетъчен рак) може да бъде от полза при някои пациенти [Fossella *et al.*,2003, D'Addario *et al.*,2009].

### **I.1.5.3. При пациенти в стадий IV на заболяването**

Приблизително една трета от всички пациенти с рак на белия дроб имат диагноза стадий IV [Tanoue, 2008]. Тук възможността за хирургично лечение е неуместно и затова се прилага само палиативна химиотерапия като възможност може да се приложи и радиотерапия [Fairchild *et al.*,2008]. Изключение са пациентите с единични метастази в мозъка. При тях може да се направи радикална резекция на първичния тумор след проведена радикална метастазектомия на мозъчните метастази [Posther and Harpole, 2006]. Целта на палиативното лечение е да се облекчат симптомите, да подобри качеството на живот и евентуално да удължи преживяемостта [Chao *et al.*, 1999].

### **I.1.6. Лечение на дребноклетъчен белодробен рак**

SCLC се характеризира с бързо разпространение и се счита за системно заболяване [Ohe, 2004]. Поради това повечето пациенти с SCLC много рядко могат да бъдат оперирани (при малки ограничени тумори). SCLC е чувствителен към химиотерапия, което е основния метод на лечението му [Stupp *et al.*, 2004]. Комбинацията от циклофосфамид-адриамицин-винкристин (CAV) е успешно използвана в лечението на SCLC повече от 30 години [Schiller, 2001]. Днес стандарт в лечението е комбинация от етопозид с цисплатин или карбоплатин [Bauman *et al.*, 2009].

#### **I.1.6.1. Лечение на ограничена болест-LD**

Една трета от пациентите са с ограничен етап на SCLC [Jassem, 2007]. При ограничено заболяване, комбиниращо лъчелечение с химиотерапия значително подобрява отговора [Sher *et al.*, 2008]; от друга страна, въздействието върху преживяемостта не е напълно изяснена [Jassem, 2007]. Резултатите от няколко проучвания показват, че ранната и съпътстващата лъчетерапия с химиотерапията са оптималният вариант на лечение [Socinski and Bogart, 2007]. Оптималната доза от радиотерапията не е определена, но дози до 70 Gy са успешно поети без усложнения [Bauman *et al.*, 2009]. При ранна лъчетерапия 5-годишна преживяемост е била постигната в около 20% [Bauman *et al.*, 2009]. Тъй като мозъкът представлява локус за най-често метастазиране на SCLC се препоръчва профилактично облъчване на мозъка за всички пациенти, които постигат пълен отговор след химиотерапия и / или лъчетерапия [Decker & Wilson, 2008]. Въпреки първоначалната висока степен на отговор на химиотерапията, обаче продължителността на отговора обикновено е кратка. Рефрактерният SCLC има лоша прогноза, но втората линия химиотерапия може да бъде от полза за някои пациенти [Simon and Turrisi, 2007]. Ролята на новите

таргетни терапии в лечението на SCLC все още трябва да бъде изяснена [Bauman *et al.*, 2009].

### **I.1.6.2. Лечение на обширно заболяване-ED**

При ED на дребноклетъчен рак на белите дробове химиотерапията е основното средство за лечение [Bauman *et al.*, 2009]. Цисплатин комбинирана химиотерапия с етопозид или иринотекан в момента е стандартният режим в САЩ, както и в Европа. Стандартното лечение включва 4-6 цикъла химиотерапия, прилагани на 3-седмични интервали, като средно 20-30% постигат пълен отговор или стационаране на заболяването с обща преживяемост от 10 месеца [Simon & Turrisi, 2007]. Ролята на радиотерапията в обширен SCLC е предимно палиативен; все пак консолидиращата и роля в тези случаи трябва да се вземе пред вид [Bauman *et al.*, 2009].

Радиотерапията е един от основните начини на лечение при рака, както в лечебно, така и в лечебно-палиативно отношение [Jassem, 2007]. Тя рутинно се прилага в една трета от всички болни с рак на белите дробове [Delaney *et al.*, 2003].

### I.1.7. Химиотерапевтични агенти

Терминът адювантна химиотерапията се отнася до системно лечение, прилагано след първичното лечение на тумор, например хирургия или лъчетерапия. Неоадювантна химиотерапия означава химиотерапия, приложена преди планираното лечение, например хирургия или лъчетерапия при пациенти с локализирани тумори. Често срещана в практика е комбинирана химиотерапия, тъй като прилагането на няколко химиотерапевтика в режим предлага много предимства пред подхода с един агент.

Комбинираната химиотерапия осигурява максимално клетъчно разрушаване с приемливи нежелани реакции. Тя също осигурява по-широко покритие на възможни резистентни клетъчни линии и предотвратява образуването на нови такива. Основните предизвикателства в областта на химиотерапията са нейната токсичност за нормалните тъкани, както и развитието на резистентност срещу нея. Много химиотерапевтични режими упражняват своите ефекти чрез окисление. Такива лекарства са антрациклините (например адриамицин, епиадриамицин и даунорубицин), прокарбазин, блеомицин, винкристин, циклофосфамид, етопозид и митомицин [Fauré *et al.*, 1996]. Повечето противоракови средства оказват своето действие чрез започване на лечение апоптоза [Lopaczynski & Zeisel, 2001].

Въпреки, че настоящата практика за лечение на NSCLC включва циплатина- или основана на карбоплатина комбинирана терапия, никой от нововъведените агенти катовинорелбин, гемцитабин, доцетаксел или паклитаксел не намират самостоятелно място в лечението на рака на белия дроб и остават в допълнение към платината или като втора линия [Johnson and Turrisi, 2000]. Цисплатин действа като се намесва в ДНК структурата образувайки ДНК адукти. Тя показва активност срещу различни солидни тумори, включително рак на белите дробове. Нефротоксичност, невротоксичност, ототоксичност, повръщане и гадене са най-честите нежелани

реакции при лечението с цисплатин. В случаите на SCLC най-често използвани схеми са лечение с етопозид-платина, циклофосфамид-адиамицин-винкристин(CAV) [Schiller, 2001].

### **I.1.7.1. Адриамицин**

Антрациклините са в клинична употреба от 60-те години на миналия век. Адриамицинът (доксорубин) принадлежи към антрациклиновите антибиотици и първоначално е изолиран от *Streptomyces*. Адриамицинът се състои от аминокзахар, свързан с антрахинонов пръстен [Faure *et al.*, 1996]. Антитуморното му действие се основава на инхибиране на ензима топоизомераза II и последващо свързване с ДНК. Адриамицинът генерира свободни радикали, тъй като редукцията на един електрон в неговия пръстен В води до образуването на асемихинонов радикал. Лесно се окислява при аеробни условия поради отделянето на свободен електрон, който води до формирането на супероксиден радикал. Лекарството е силно липофилно с дълъг полуживот в организма и метаболитите се елиминират чрез жлъчката [Singalet *et al.*, 2000]. Известно е също, че адриамицин причинява липидна пероксидация и протеиново окисление при пациенти с рак [Faber *et al.*, 1995, DeAtley *et al.*, 1998].

Адриамицинът е един от най-ефективните и широко използвани химиотерапевтици, както при твърди тумори, така и при хематологични злокачествени заболявания [DeAtley *et al.*, 1999; Singa *et al.*, 2000]. Въпреки това, лечението с него може да бъде ограничено от остри и хронични нежелани реакции. Най-честите остри последици са миелосупресия, гадене и повръщане, са контролируеми и рядко ограничават дозата. Най - сериозно ограничаващото събитие е развитието на остра и хронична сърдечна токсичност, включително кардиомиопатия, чието появяване корелира с приложената обща доза [Singa *et al.*, 2000]. Изследванията са предоставили доказателства за производството на

свободни радикали, особено на хидроксилния радикал при свързаните с адриамицин нежелани събития [Faure *et al.*, 1996]. Апоптоза, липидна пероксидация, производство на свободни радикали и инхибиране на синтеза на нуклеинови киселини и протеини обясняват вредните сърдечни ефекти на това лекарство [DeAtley *et al.*, 1999; Singa *et al.*, 2000]. Следователно общата доза трябва да бъде ограничена до 500 mg/m<sup>2</sup>.

### **I.1.7.2. Винкристин**

Винкристинът, винбластинът и виндезинът принадлежат към групата на винка-алкалоиди. Това са естествено срещащи се или полусинтетични съединения, открити в растението *Catharanthus roseus*. Винка-алкалоидите са димерни молекули, състоящи се от две многодиректни единици, т.е. катарантинно ядро и виндолиново ядро. Цитотоксичното действие на винка алкалоидите представлява разрушаване на микротубулите след последващо разтваряне на микротубули и клетъчен арест в митоза [Rivera *et al.*, 1988]. Антитуморното действие на винкристин включва и пероксидативно увреждане [Schlaifer *et al.*, 1994]. Токсичността и клиничната активност на винка-алкалоидите варират значително. Винкристин има голям обем на разпределение, високи скорости на изчистване и дълъг плазмен полуживот (приблизително 23-85 h). Той се свързва широко с плазмените протеини, а също и с кръвните елементи като тромбоцити. Винкристин се метаболизира и се екскретира главно чрез хепатобилиарната система. Винкристинът се използва широко в комбинация с други химиотерапевтични средства при неходжкинов и ходжкинов лимфом, левкемии и белодробен рак, както и при солидни тумори. Периферната невротоксичност е основният неблагоприятен ефект на тази група лекарства. Други нежелани реакции са запек, абдоминални спазми, паралитичен илеус, задръжка на урина и хипертония. Основната нежелана реакция обаче е неутропенията.

### **I.1.7.3 Циклофосфамид**

Циклофосфамидът принадлежи към алкилиращите агенти и първоначално е разработен като бойно отровен газ. Основният му ефект се дължи на неговия активен метаболит фосфорамид мустард. Фосфорамид мустардът образува ДНК напречни връзки между и вътре в ДНК-нишките и се свързва с ДНК, като по този начин я модифицира химически. Той също така пречи на ДНК репликацията и транскрипцията. Циклофосфамидът се превръща от чернодробните микрозомални ензими до 4-хидроксициклофосфамид. Комбинирана химиотерапия, включително с циклофосфамид е показала, че намалява нивата на различни антиоксиданти и антиоксидантни ензими [Subramaniam *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 2005]. И в двата случая *in vitro* и *in vivo* проучвания показват, че лечението с циклофосфамид индуцира липидипероксидация и хиперлипидемия [Berrigan *et al.*, 1987; Muralikrishnan *et al.*, 2001]. Циклофосфамидът е най-широко използваният антитуморен алкилиращ агент. Използва се самостоятелно или в комбинация с други противотуморни химиотерапевтици при левкемии и лимфоми, както и при множествена миелома, саркома, рак на гърдата и белодробен рак. Може да се прилага или орално или интравенозно. Най-важният страничен ефект е левкопенията, която е доза-зависима. Другите нежелани реакции включват алоpecia и хеморагичен цистит. При високи дози може да се наблюдава кардиотоксичност [DeVita *et al.*, 2005].

### **I.1.7.4. Платинови производни**

Цитотоксичните ефекти на платиновите съединения се определят от относителното количество образувани ДНК адукти и тяхната структурата. Цисплатината и нейните аналози реагират преференциално в позиция N7 на гуанинови и аденинови остатъци, за да образуват различни монофункционални и бифункционални притегляния /адукти/ [Eastman, 1987]. Моноадуктите могат

да образуват кръстосани връзки в рамките на мрежата или между тях. Преобладаващите лезии, които се образуват, когато платиновите съединения се свързват с ДНК са d (GpG) Pt вътрешни вериги. Цисплатината също така образува кръстосани връзки между гуанинови остатъци, разположени върху противоположни нишки, и те представляват по-малко от 5% от общата свързана с ДНК платина. Образуването на адукти и кръстосани връзки е свързано с терапевтична ефикасност на тези съединения [Zhu *et al.*, 2013; Martens-de Kemp *et al.*, 2013]. Тези адукти реализират цитотоксичните ефекти на лекарството, като възпрепятстват клетъчните процеси, които изискват разделянето на двете ДНК вериги, такива като репликация и транскрипция [Epoiu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013]. Образуването на адукти на платина-ДНК водят до редица негативни ефекти за клетката, като клетъчна смърт чрез апоптоза, некроза или митотични дефекти или клетъчно оцеляване чрез активиране на различни защитни механизми, включително възстановяване на ДНК, сигнални пътища за увреждане на ДНК, спиране на клетъчния цикъл и автофагия.

Ефектите върху клетката, появяващи се като резултат от свързването на ДНК с платинови лекарства са изследванията от Sorenson & Eastman [1988]. Използвайки модел на клетки от яйчници на китайски хамстер, които не възстановяват ДНК показват, че преминаването през S фазата е необходимо за спиране на G2 и клетъчна смърт, което предполага, че ДНК репликацията върху повреден модел в натрупването на допълнителни увреждания. Преди апоптоза в този модел е наблюдавана аномална митоза.

#### **I.1.7.5. Гемцитабин**

Гемцитабин (2', 2'-дифлуорородооксицитидин) е дифлуориран аналог на дезоксицитидин. Въпреки сходството си в структурата, метаболизма и механизма на действие на ara-C, спектърът на противотуморната активност на гемцитабин е много по-широк [Reiter *et al.*, 2001; Mini *et al.*, 2006].

Транспортирането на гемцитабин в клетките изисква нуклеозидната транспортна система. Гемцитабин е неактивен в основната му форма и изисква вътреклетъчно активиране на неговите цитотоксични ефекти. Стъпките, свързани с метаболитната активация на гемцитабин, са подобни на тези, наблюдавани при ара-С, и двата лекарства се активират от същата ензимна машина до активния трифосфатен метаболит. След това гемцитабин трифосфатът се инкорпорира в ДНК, което води до терминиране на веригата и инхибиране на ДНК синтеза и функцията, или трифосфатната форма може директно да инхибира ДНК полимерази а, р и у, което на свой ред пречи на удължаването на ДНК веригата, ДНК синтеза, и ремонт на ДНК. Трифосфатният метаболит е също така мощен инхибитор на рибонуклеотид редуктазата, който допълнително медира инхибирането на ДНК биосинтезата чрез намаляване на нивата на ключови деоксинуклеотидни групи [Saif *et al.*, 2006].

#### **I.1.7.6. Таксани**

Механизмът на действие за паклитаксел първоначално е установен от Schiff и колектив през 1979 г., които показат, че той се свързва с вътрешната повърхност на микротубулния лумен в местата на свързване, напълно различни от тези на взаимозаменяемия GTP, колхицин, подофилотоксин и винка алкалоиди [Nogales, 2001]. Таксаните силно променят скоростните константи на дисоциация на тубулина в двата края на микротубула. Дозозависимото таксан  $\beta$ -тубуларно свързване предизвиква митотичен арест при G2 / M прехода и индуцира клетъчна смърт. Чрез стабилизиране на микротубулите те могат също така да задържат лиганд-зависим вътреклетъчен трафик, както е показано при улавянето на андрогенния рецептор към цитозола при пациенти с метастазен рак на простатата, лекувани с доцетаксел и е свързано с намалена андрогенно регулирана генна експресия, антиген (PSA) [Darshan *et al.*, 2011; Hoimes & Kelly

2010]. Периферната невропатия е обща доза-ограничаваща нежеланареакция сред антимиотубулните агенти и вероятно е резултат от техния директен ефект върху микротубулите. Проучванията показват, че инхибират anterogradния и/или retrogradен бърз аксонен транспорт и могат да обяснят демиелинизиращия модел на "умиране назад" и уязвимостта на сензорните неврони с най-дългите аксонални проекции [Nitiss & Wang, 1988].

#### **I.1.7.7. Топоизомеразни инхибитори**

Човешките клетки съдържат шест топоизомеразни гени, които са били номерирани исторически. Обикновено използваните съкращения са Top1 за топоизомерази I (Top1mt е митохондриална топоизомераза, чийто ген е кодиран в клетъчното ядро), Top2 за топоизомерази II и Top3 за топоизомерази III. Top1 е първата еукариотна топоизомераза, открита от Champroux и Dulbecco [1972]. Топоизомеразите решават топологичните проблеми на ДНК чрез разрязване на гръбнака на ДНК и ре-лигиране без помощта на каквато и да е допълнителна лигаза. Top1 и Top3 действат чрез разцепване / ре-лигиране на единична верига на ДНК дуплекса, докато Top2 ензимите разцепват и редират двете направления, като правят двойно обръщане се през с четири бази. Нечетните топоизомерази (Top1 и Top3) разцепват и редират една верига, докато четните топоизомерази (Top2c) разцепват и редират двете нишки.

Top1cc са цитотоксични, чрез тяхното превръщане в увреждане на ДНК, чрез репликация и при достигането на препарата до репликационната вилица. Това обяснява защо цитотоксичността е пряко свързана с експозицията на лекарството и защо стопа на ДНК репликацията предпазва клетките от камптотecin [Holm *et al.*, 1989; Hsiang *et al.*, 1989]. Двойното разцепване на репликацията се възстановява чрез хомоложна рекомбинация, което обяснява свръхчувствителността на BRCA-дефицитните ракови клетки към Top1cc-насочените лекарства [Maede *et al.*, 2014]. Top-ковалентните комплекси могат да

бъдат отстранени чрез два пътя, пътят на ексцизия, центриран около тирозил-ДНК фосфодиестераза 1 (TDP1) [Huang *et al.*,2011] и ендонуклеазния път, включващ 3'-флаг ендонуклеази като XPF-ERCC1.

Възможно е също така лекарство-свързаните Top1cc да генерират директно ДНК прекъсвания, когато са в рамките на 10 базови двойки на противоположни нишки на ДНК дуплекса или когато те се появяват до предварително съществуваща единична нишка на противоположната нишка. И накрая, не е изключено топологичните дефекти да допринасят за цитотоксичността на лекарствата, насочени към Top1cc [Koster *et al.*, 2007].

Иринотекан е предлекарство, съдържащо обемиста странична верига на дипиперидин при C-10 като се разцепва от ензим-преобразуващ карбоксилестераза в черния дроб и други тъкани, за да се получи активният метаболит SN-38.

#### **I.1.7.8. Етопозид**

Противоположно на камптотецините, инхибиторите на Top2 убиват раковите клетки без да се налага съприкосновение с ДНК репликация. В действителност, дори и след 30-минутна експозиция, доксорубицин и други лекарства, насочени към Top2cc, могат да убиват над 99% от клетките, което е в огромен излишък от фракцията на S-фазовите клетки в тъканна култура (обикновено по-малко от 50%) [Pommier *et al.*,1983; Long *et al.*, 1984]. Механизмът на съприкосновение в случая на Top2cc-насочени лекарства изглежда включва транскрипция и протеолиза на двете Top2 и РНК полимераза II. [Van *et al.*, 2013] Такава ситуация би довела до двойни прекъсвания на ДНК чрез разрушаване на Top2 димерната граница. Алтернативно, границата Top2 хомодимер може да бъде отделена чрез механично напрежение .Въпреки това, важно е да се има предвид, че 90% от Top2cc, уловени от етопозид, не са

съгласувани и следователно се състоят от еднократно разкъсване [Long *et al.*, 1985; Pommier *et al.*, 2010; Pommier, 2013], което е различно от доксорубицин, и двете Top2 са мономерни и се произвеждат от по-голямата част от ДНК двойни верижни счупвания. Накрая, не се изключва, че топологичните дефекти, произтичащи от секрецията на Top2 от лекарствено-индуцираните разцепващи комплекси, могат да допринесат за цитотоксичността на Top2-назначените лекарства. Такива топологични дефекти включват персистиращи ДНК възли и катенани, потенциално водещи до хромозомни счупвания по време на митоза.

#### **I.1.7.9. Пеметрексед**

Намалените фолати играят ключова роля в едно-въглеродния метаболизъм и те са от съществено значение за биосинтезата на пурините, тимидилата и протеиновата биосинтеза. Аминоптеринът е първият антиметаболит с документирана клинична активност при лечението на деца с остра левкемия през 40-те години. Този антифолатен аналог е заменен от метотрексат (MTX), 4-амино, 10-метилов аналог на фолиевата киселина, който остава най-широко използваният антифолатен аналог с активност срещу широк спектър от ракови заболявания

Пеметрексед е пиролопиримидинов, антифолатен аналог, който е насочен към множество ензими, участващи във фолиевия метаболизъм, включително тимидилат синтаза (TS), дихидрофолат редуктаза (DHFR), глицинамид рибонуклеотид (GAR) формалтрансфераза и аминоксидазол карбоксамид (AICAR) формалтрансфераза. [1,2]. Този агент има широкоспектърна активност срещу солидни тумори, включително злокачествен мезотелиом и рак на гърдата, панкреаса, главата и шията, недребноклетъчен белодробен рак, рак на дебело черво, стомаха, цервикален рак и рак на пикочния мехур [Vogelzang *et al.*, 2003; Kindler, 2008; Joerger *et al.*, 2010].

#### **I.1.7.10. Бевацизумаб**

Бевацизумаб е рекомбинантно хуманизирано моноклонално антитяло, получено чрез ДНК технология в клетъчни линии от яйчник на китайски хамстер. Бевацизумаб се свързва със съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF), основен стимулатор на васкулогенезата и ангиогенезата и по този начин инхибира свързването на VEGF с неговите рецептори - Flt-1(VEGFR 1) и KDR (VEGFR-2), намиращи се на повърхността на ендотелните клетки. Неутрализирането на биологичната активност на VEGF води до регресия на васкуларизацията на туморите, нормализира останалите туморни кръвоносни съдове и инхибира образуването на нови съдове в тумора, като по този начин инхибира туморния растеж. Приложението на бевацизумаб или сродното му антитяло на ксенотрансплантирани модели на рак при мишки е довело до екстензивна антитуморна активност, както и при рак при хора, включително на дебелото черво, млечната жлеза, панкреаса и простатата [Ellis *et al.*, 2006].

#### **I.1.7.11. Ерлотиниб и Гефитиниб**

Ерлотиниб и Гефитиниб са инхибитори на тирозин киназата на рецептора на епидермалния растежен EGFR, известен и като HER1). Ерлотиниб и Гефитиниб мощно инхибират интрацелуларното фосфорилиране на EGFR. EGFR се експресира върху клетъчната повърхност на нормалните и раковите клетки. В неклинични модели инхибирането на фосфотирозина на EGFR води до клетъчна стаза и/или смърт. EGFR-мутациите могат да доведат до конститутивно активиране на сигналните пътища на антиапоптоза и пролиферация. Мощната ефективност на ерлотиниб и гефитиниб при блокиране на EGFR медираното сигнализиране при тези тумори, положителни за EGFR мутация, се отдава на здравето свързване на двата препарата с мястото на свързване на АТФ в мутиралия киназен домейн на EGFR. Поради блокирането на междинното сигнализиране, пролиферацията на клетките се спира и се

индуцира клетъчна смърт посредством вътрешно присъщ апоптозен път. Наблюдавана е туморна регресия при модели на мишки с подсилена експресия на тези EGFR активиращи мутации [Takimoto & Calvo, 2008].

## **I.2. Свободно-радикални процеси в етиологията и патогенезата на онкологичните заболявания**

Активни форми на кислорода (АФК) се генерират във всички аеробни организми в резултат на техният клетъчен метаболизъм. При ниски до умерени концентрации те участват в нормално протичащите физиологичните клетъчни процеси свързани с междуклетъчна сигнализация и сигнална трансдукция, но повишаването на нивото им е свързано с настъпването на разнообразни неблагоприятни клетъчни изменения, включващи структурни промени в основните градивни единици на живите клетки - липиди, протеини и ДНК [Magder. S., 2006]. Непрекъснатата продукция на свободни радикали е обусловила възникването в хода на еволюцията в аеробните организми на множество защитни механизми включващи ензимни и неензимни антиоксиданти, които да блокират по ефективен начин неблагоприятните им въздействия. Нарушението на нормално съществуващото във всички здрави живи организми устойчиво равновесие между нивата на антиоксидантите и генерираните свободни радикали, което е свързано с изчерпване на капацитета на антиокислителната защитна система се нарича оксидативен стрес. Той е съпровождащ фактор в патофизиологичните процеси в основата на редица онкологични заболявания, невродегенеративни процеси, атеросклерозата, захарен диабет и др [Pham-Huy LA. *et al.*, 2008].

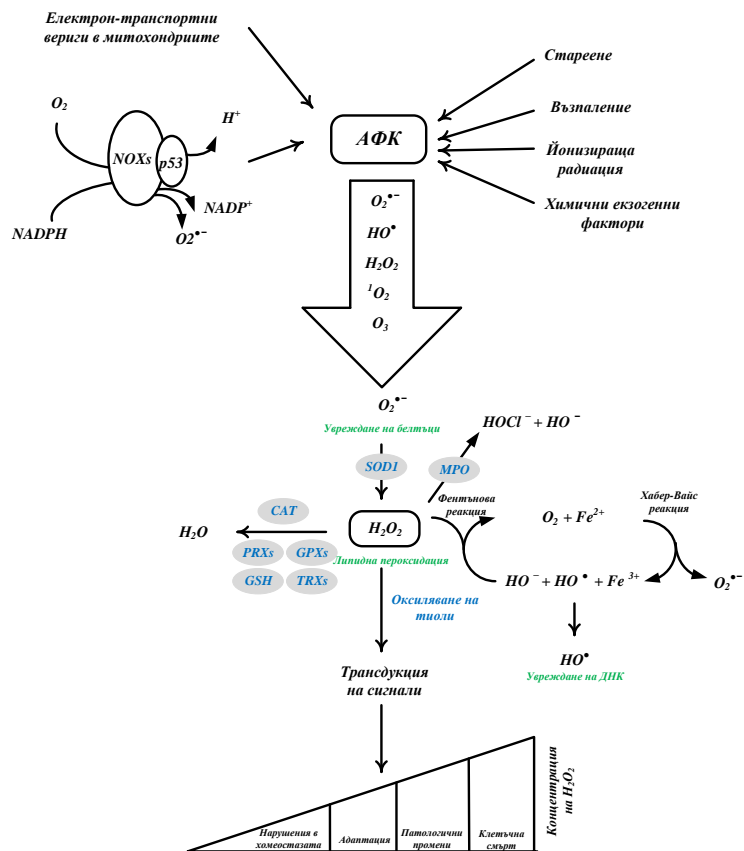
## **1.2.1. Свободни радикали, оксидативен стрес и антиоксидантна защита.**

### **1.2.1.1. Активни форми на кислорода – общ преглед, видове и източници**

Най-разпространени в живите организми от СР са активните форми на кислорода (АФК). Освен тях могат да бъдат открити азотни, въглеродни и фосфорни радикали, които също могат да бъдат опасни. Основни представители на АФК с най-голямо биологично значение са супероксиден анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), хидроксилен радикал ( $OH^{\cdot}$ ), водороден пероксид ( $H_2O_2$ ), синглетен кислород ( $^1O_2$ ) и озон ( $O_3$ ) [Halliwell *et al.*, 2007].

Супероксидният анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) се продуцира в електрон транспортната верига на митохондрите - първи продукт при едноелектронната редукция на  $O_2$ . Супероксидът не е способен да мигрира на големи разстоятия от мястото на образуването си, да окислява полиненаситените мастни киселини и непосредствено да индуцира увреждания на липидите в биологичните мембрани, но е субстрат за образяването на други много реактивоспособни и агресивни АФК като хидроксилният радикал и хипохлоритният йон.

Водородният пероксид ( $H_2O_2$ ) не е свободен радикал (не притежава несдвоен електрон), но е важен междинен продукт при едноелектронната редукция на кислорода. В присъствието на метали с променлива валентност той образува хидроксилен радикал ( $OH^{\cdot}$ ).  $H_2O_2$  е най-стабилната СР форма и в ниския наномоларен обхват може да засегне клетъчното сигнализиране като взаимодейства с избрани цистеинови остатъци върху целевите протеини. За разлика от супероксида и  $OH^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$  лесно дифундира през мембраните, което го прави идеалната вътреклетъчна сигнализираща молекула [Thomas *et al.*, С. 2009].



**Фигура 1. Основни инициатори на активни форми на кислорода и механизми за обезвреждането им в живите системи - образуване под действие на разтворими или мембранно-свързани ензими и по неензимни пътища.**

Хидроксилен радикал ( $OH^{\bullet}$ ) - най-реактивно способната от всички АКФ и най-мощният от всички известни окислители.  $OH^{\bullet}$  са способни да иницират оксидативни изменения в липидите, протеините и ДНК, водещи до увреждане на клетката. Като главни реакционни пътища, водещи до генерирането на  $OH^{\bullet}$  в литературата се посочват Fenton реакциите и метал-катализираната Haber-Weiss реакция.

Синглетен кислород  $^1O_2$  е изключително реактивоспособен и притежава възможност за присъединяване към двойната връзка на диенови съединения и

генерира циклични ендопероксиди; участва в окисление на олефини до хидропероксиди; има способност за присъединяване към богати на електрони двойни връзки с образуване на диоксиетани; окислява сулфиди до сулфоксиди. Възможността за получаването му е най-голяма при фотодинамични реакции.

Хипохлоритен йон ( $\text{OCl}^-$ ) – хипохлориста киселина – образува се при респираторния взрив при фагоцитозата.

Свободните радикали в живите системи могат да бъдат генерирани в резултат на действието на екзогенни източници, като например ултравиолетово лъчение, токсични химикали и лекарства, да са следствие от физиологични промени в организма свързани със стареене, нараняване/възпаление - резултат от вътреклетъчни (ендогенни) източници [Halliwell B., 2007].

Двата основни ендогенни източника на АФК са митохондриите и НАДФН-оксидазният комплекс (NOXs). В митохондриите и по-точно в електрон-транспортните вериги на вътрешната митохондриална мембрана където се осъществява четири електронната редукция на молекулен кислород с отделяне на две молекули вода се генерират супероксидни радикали в междинните стъпала на дихателната верига. Между 1 и 2% от консумирания клетъчен кислород не се редуцира до вода, а до  $\text{O}_2^{\bullet-}$  при окислението на редуцирания КоQ и с участието на цитохром оксидазата Освободеният в митохондриалния матрикс супероксид бързо бива трансформиран във  $\text{H}_2\text{O}_2$  под действието на ензима супероксид дисмутаза 2 (SOD 2) [Murphy, M.P., 2009]. Комплекс III може също да отдели супероксид в митохондриалното между мембранно пространство.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  преминава през потенциал-зависими анионни канали (VDAC) в цитозола където спонтанно или посредством взаимодействие ензима супероксид дисмутаза 1 (SOD 1) се превръща във  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

При активирането на фагоцитите - притежаващи мембранно-свързан, повърхностно разположен ензим - NADPH-оксидаза, който може да редуцира молекуления кислород се генерира супероксид, когато ензимната активност се

активира от бактерии, микроорганизми. Системата произвежда супероксидни радикали като основна функция [Bedard *et al.* К., 2007]. Тук супероксидът може да навлезе в клетката през хлоридните канали или под действие на SOD 3 да дисмутира в  $H_2O_2$ , който свободно дифундира през мембраните.

При наличието на йони на метали с променлива валентност (железни или медни), митохондриалния и произведения от NOX  $H_2O_2$  може да се превърне в  $OH^\bullet$  чрез фентънова реакция.

Освен в митохондриите, АФК също се образуват в цитоплазмата чрез различни ензими. Миелопероксидазата, намиращ се в неутрофилите, където катализира образуването на хипохлориста киселина. Образуваните ендогенни амини са мощни окислителни, отговорни в голяма степен за неутрофилната цитотоксичност. Азотен-оксид синтаза (NOS) произвежда  $NO^\bullet$  при превръщането на 1-аргинин в 1-цитрулин. Поради ниската си реактивоспособност тази активна форма на азота не участва пряко в СР процеси, но при взаимодействие със супероксид се получава пероксинитрит, който поради високата си реактивоспособност участва в оксидативните увреждания. Метаболизирането на арахидоновата киселина чрез циклооксигеназа до простагландини и чрез ензима липоксигеназа до левкотриени включва формирането на междинни пероксидни компоненти, а също и на хидроксилни радикали. Други клетъчни ензими, като ксантин оксидаза, липоксигеназа, циклооксигенази и семейства цитохром р450 също участват в генерирането на СР.

### **I.2.1.2. Молекулни увреждания вследствие взаимодействието с АФК.**

Високата реактивност на СР определя директно им взаимодействие с всички основни молекулни компоненти на клетки - липиди, протеини, въглехидрати, нуклеинови киселини. Това е съпроводено със структурни и функционални промени в клетките, предизвиква мембранни и клетъчни дефекти, проявяващи се в последствие на тъканно, и организмово ниво [Therond P., 2006].

- оксидативно увреждане на липиди – процесът е верижен и с автокаталитичен характер, като се характеризира с многообразие и токсичност на генерираните продукти. Основният субстрат на процеса са ненаситените липиди - полиненаситените метилен-прекъснати мастни киселини. При липидната пероксидация се генерират липидни радикали, синглетен кислород, хидроксилни радикали, липидни хидропероксиди, алдехиди, кетони, алкохоли, които активно взаимодействат и с други видове биомолекули. Процесът уврежда всички липидни компоненти на клетките, променяйки нормалните им биологични функции.

- Оксидативно увреждане на протеини - белтъчните молекули са обект и на директно радикално увреждане. Основен прицел са аминокиселините, съдържащи двойни връзки и тиолови групи като тирозин, триптофан, фенилаланин, хистидин, метионин и цистеин. Отнемането на водороден атом от сулфхидрилните групи в протеиновите молекули изисква малко енергия. Оксидацията на аминокиселините води до образуване на кръстосани връзки, агрегация на протеините, фрагментиране, дезинтегриране на действието на мултиензимни системи, настъпване на конформационни изменения, намаляване на устойчивостта на протеолитично разграждане.

- Оксидативно увреждане на въглехидрати - глюкозата е скевинджър на хидроксилни радикали. При физиологични условия е възможно автокисление като това се катализира от йони на преходни метали. Като междинни продукти

се генерират АФК, краен продукт на реакцията са кетоалдехиди взаимодействащи с протеините. Неензимното гликиране на протеините допринася за нарастване на чувствителността им към оксидативна увреда. Свободните радикали могат да инициират деполимеризацията.

- Оксидативно увреждане на нуклеинови киселини - СР водят до структурни изменения както в ДНК така и в репаративните ензими. Това е съпроводено с инициране на дефекти в генетичния апарат на клетките и стимулира мутагенна и канцерогенна активност. Най-чувствителни към оксидативна увреда от съставните части на ДНК са тимина и цитозина, следвани от аденина, гуанина и дезоксирибозата. Маркер за оксидативно увредената ДНК е количеството на 8-хидрокси-деокси-гуанозина. Процесът води до образуването на делеции, мутации и транслокации, едно - и двойно-верижни разкъсвания, разграждане на нуклеотиди, депуринизиране на ДНК и свързването ѝ с протеинови молекули.

Всички тези структурни изменения водят до нарастване цитоплазматична и ядрена трансдукция на сигнали, стимулиране на пролиферацията, нарастването на синтеза на стрес индуцирани протеини, активация на нуклеази, понижаване на ДНК-полимеразна активност и репарация чрез поражение на ензими или ДНК конформация, изменения в мембранния транспорт и потенциал и са от съществено значение при процесите на регулиране на клетъчен растеж, диференциация и смърт [Цветков и съавтори., 1995].

### **I.2.1.3. Антиоксидантна защита срещу оксидативното увреждане.**

Възпрепятстването на оксидативното увреждане в живите организми се постига благодарение на наличната в него антиоксидантна защитна система, която може условно да бъде разделена във функционално отношение на три нива:

- Ограничаване на ендогенното образуване на CP - посредством пространствено разделяне на субстратите необходими за протичането на свободно-радикалното увреждане

- Обезвреждане на образуваните CP – осъществява се от ензимните и неензимни антиоксиданти.

Към ензимните антиоксиданти се отнасят супероксид дисмутазите (SOD) - катализират дисмутацията на супероксидните радикали до водороден пероксид и молекулен триплетен кислород; каталазата (CTS) катализираща разграждането на водороден пероксид до вода; глутатион пероксидазите (GSH-P) - катализират редукцията на водороден пероксид и органични хидропероксиди и глутатион редуктаза (GSSG-R) който редуцира оксидирания глутатион, използвайки NADPH.

Неензимните антиоксиданти се делят на две големи групи: липо- и водоразтворими, като водноразтворимите са първа защитна линия. Към тях се отнасят - витамин Е (антиоксидант на липидната фаза), β-каротенът (най-мощният прехващач на синглетния кислород), витамин А (прехващач на тиолови радикали) витамин С (редуктор със супероксидни и хидроксилни радикали, водороден пероксид, хипохлорит) тиоловите съединения (албумина, редуцирания глутатион и цистеина) и пикочната киселина (водо-разтворим скевинджър на синглетния кислород и хидроксилния радикал).

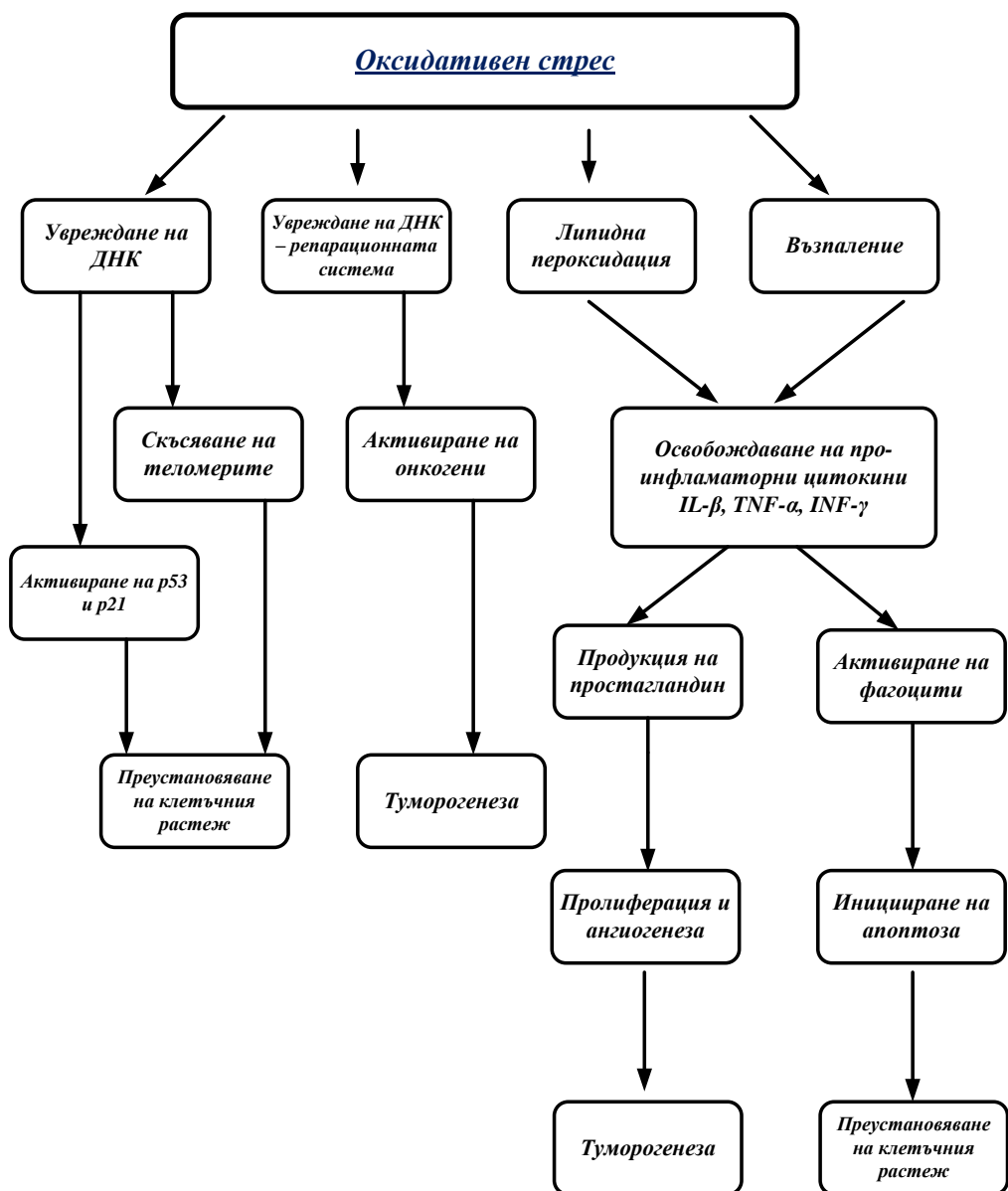
- Възстановяване на структурно увредените градивни единици – посредством действието на фосфолипаза А<sub>2</sub>, някои протеолитични ензими, метионин сулфоксид редуктаза, репаративните ензими за ДНК и др.

## **I.2.2. Оксидативен стрес и онкологични заболявания**

### **I.2.2.1. Принос на СР в механизмите на сигнална трансдукция при инициране на неопластичните процеси**

Считаше се, че АФК са токсични метаболитни странични продукти, които причиняват клетъчно увреждане. Под действието на различни видове стресови фактори, АФК могат да действат като фактор участващ в регулацията на различни сигнални пътища, водещи до активиране или репресиране на гените, определящи биосинтезата на различни ензими или да регулират експресията на редокс чувствителни гени. По този начин посредством пряко реагиране и модифициране на структурата на протеини, транскрипционни фактори и гени се осъществява модулиране на техните функции. Раковите клетки се характеризират с повишено генериране на СР в сравнение с нормалните клетки, което се дължи на изменения в системите за регулиране на редокс хомеостазата. Причините за продукция на СР в раковите клетки са промените в пътищата за сигнална трансдукция, които засягат клетъчния метаболизъм [Mendelsohn *et al.*, A.R. 2014].

Типичен пример е тумор-супресорния ген p53 имащ ключова роля при активирането на гените, кодиращи биосинтезата на защитните ензими, транскрипционни фактори и структурни протеини, които са отговорни за предотвратяването на увреждането на ДНК, протеините или липидите, и за да се възстанови редокс-баланса. Наличието на мутации в p53 е установено при 50% от онкоболните пациенти. Те са свързани с повишен риск от злокачествена трансформация, повишено СР генериране, висока туморна агресивност и лоша прогноза. Това прави мутациите на този тумор-супресорен ген най-често изследваната геномна промяна при злокачествените неоплазми и използването му като прогностичен маркер [B. Liu *et al.*, 2008].



**Фигура 2.** Сигнална трансдукция, активирана в отговор на оксидативен стрес –биологични последствия водещи до физиологични дисфункции, туморогенеза и клетъчна смърт. [Mendelsohn *et al.*, A.R. 2014].

И други редокс чувствителни гени са замесени в препрограмирането на метаболизма на раковите клетки и кодиращи транскрипционни фактори отговорни за контрола на клетъчния цикъл, апоптоза и малигнена трансформация RAS, MYC и AKT [Behrend L *et al.*, 2003]. RAS активира

PI3K/АКТ/mTOR сигналният път, оказващ регулаторен ефект върху клетъчният цикъл, диференцията и пролиферация [Cantley LC., 2002]. Активирането на АКТ е свързано с натрупването на СР отчасти чрез АКТ/mTOR-зависимото увеличаване на митохондриалния метаболизъм и иницираното от АКТ фосфорилиране и инхибиране на FOXO транскрипционните фактори. Последните имат отношение към експресията на гените участващи в енергийния метаболизъм, устойчивостта към стрес и антиоксидантната защита [Nemoto S, *et al.*, 2000; Hedrick SM. 2009]

Транскрипционните фактори и антиоксидантните протеини като глутатион GSH и пероксиредоксинът PRX са също податливи на оксидативно увреждане. Активният център на протеин-тирозин фосфатазата, която инактивира продукти на различни онкогени като ABL, SCR и KRAS съдържа последователността Cys-X5-Arg, силно податлив на свободно радикално увреждане.

Съдържащите тиолови групи цистени са изключително чувствителни към  $H_2O_2$  оксидативно увреждане, което води до образуването на различни, обратими редокс форми.  $H_2O_2$ -регулираните сигнални пътища включват такива отговорни за регулацията на клетъчният цикъл и пролиферация и се осъществява посредством изменение в активността на фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K)/АКТ, хипоксия-индуциран фактор (HIF) и сигнални каскади, управлявани от митоген-активирана киназа (МАРК)/извънклетъчна сигнално-регулирана киназа (ERK), c-Jun Nterminal киназа (JNK) и P38 МАРК.

При различни ракови клетки е доказана, необходимостта от екзогенното набавяне на  $H_2O_2$  или ендогенното индуцирано посредством онкогени производство на СР, които впоследствие иницират пролиферацията чрез активиране на пролиферативни сигнални пътища като PI3K/АКТ/mTOR и МАРК/ERK каскадите [Cantley LC *et al.*, 2002]. СР насърчават оксидативно увреждане и инактивирането на фосфатазите, протеин тирозин фосфатаза 1В

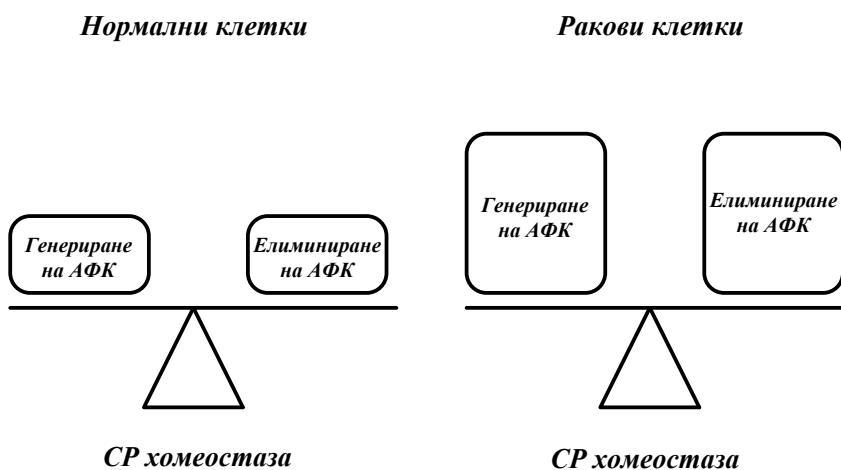
(PTP1B) и фосфатаза и тензин хомолог (PTEN), които регулират PI3K/AKT сигнализирането [Weinberg F *et al.*, 2009]. Освен това CP инактивират сигналните пътища инхибиращите MAPK фосфатазите, с цел активиране на митогенното сигнализиране. Потискането на активността се осъществява посредством оксидативно увреждане на цистеинови остатъци в активният център на фосфатазата. CP-медирана стимулация на развитието на неопластични процеси е доказана при рак на гърдата, белите дробове, черния дроб и различни други ракови клетки и се предотвратява чрез добавяне на CP скевинджъри.

#### **1.2.2.2. Роля на клетъчната антиоксидантната защитна система в процеса на адаптация на неопластичните клетки**

С цел да оцелеят в описаната среда с повишена концентрация на АФК и други CP, раковите клетки се адаптират и придобиват механизми за противодействие на потенциалните токсични въздействия на ОС.

По-конкретно, за да избегнат токсичните въздействия на CP, раковите клетки активно регулират локалните концентрации на различни антиоксидантни протеини в местата на повишена концентрация на CP. Например е доказано, че при RAS трансформирани клетки, които се характеризират с нарушена редокс хомеостаза, има по-високи нива на пероксиредоксини (PRXs) и тиоредоксини (TRXs) в сравнение с нормалните клетки. Главният антиоксидантен регулатор транскрипционния фактор Nrf2 и Nrf2/ARE сигнален път (повишаване нивата на Cu/Zn супероксиддисмутаза, хемоксигеназа-1), също се активират от различни онкогени, включително KRAS, MYC и PI3K, които подпомагат растежа и оцеляването на раковите клетки [Hu Y *et al.*, 2005; Saydam *et al.*, 1997]. Освен това в проби от тъкан от пациенти с онкологични заболявания се наблюдават повишени нива на антиоксидантните ензими, като например глутатион пероксидази (GPXs),

супероксид дисмутази (SODs) както пероксиредоксин (PRXs), като в същото време са установени и мутации в Keap1. Нормално Nrf2 е ситуиран в цитоплазмата в неактивно състояние, свързан с Keap1 репресорен протеин. Оксидативната модификация на Keap1 индуцира ядрената транслокация на Nrf2 и повишава експресията на гени на антиоксидантни ензими като HO-1, GCL, GST, SOD, участващи в антиоксидантната защита. Това предполага контрол на редокс баланса в раковите клетки, който подпомага туморогенезата [Shibata T. *et al.*, 2008;]



**Фигура 3: СР хомеостаза и оксидативния стрес вследствие на нарушен баланс между генерирането на АФК способността на антиоксидантите да ги елиминират при нормални и ракови клетки. И при двете групи клетки обичайно се наблюдава равновесие между продукцията на АФК и антиоксидант и се поддържа редокс хомеостазата.**

Раковите клетки функционират с по-високи нива на производство на СР и по-високи нива на антиоксидантни протеини в сравнение с нормалните клетки, с цел да се поддържа редокс хомеостаза. Това позволява високите нива на СР да активират про-канцерогенни сигнализиращи пътища без да се натрупват прекомерни количества АФК, които могат да предизвикат клетъчна

смърт или стареене. Важно е да се отбележи, че този баланс води до факта, че в раковите клетки също се установява равновесие СР/антиоксиданти, подобно на това в нормалните клетки.

### **I.2.2.3. Значение на СР за подпомагане на преживяемостта, ангиогенезата и метастазирането**

Както беше споменато, аномалните СР нива хипер-активират PI3K/АКТ сигналният път посредством инхибиране на PTEN.СР-индуцираното PI3K/АКТ сигнализиране и стимулиране на преживяемостта са доказани в модел на рак на простатата при мишка и при различни други ракови заболявания. Онкогените, като KRAS и АКТ, също могат да активират и стабилизират главния антиоксидантен регулатор Nrf2, за който е установено, че играе ключова роля в защитата срещу оксидативния стрес, с повишаване преживяемостта на клетките. СР могат да активират Nrf2 посредством окисляване и инактивиране на KEAP1 в редокс-чувствителни цистеинови остатъци. Тази оксидативна модификация инхибира KEAP1-медираното протеазомно разграждане на Nrf2, което позволява стабилизирането му, натрупването му в ядрото и благоприятства преживяемостта на раковите клетки. При рак на дебелото черво и меланома е установено СР активиране на проинфламаторния транскрипционен фактор, наричан нуклеарен фактор kappaB (NFkB). Той съществува като хетеродимерен комплекс, и регулира множество инфламаторни гени, като тези за продукция на цитокини, IL-8, TNF- $\alpha$  и азотен оксид (iNOS).

За своето оцеляване солидните туморните клетки трябва да разполагат с постоянен приток на кислород и хранителни вещества, необходими за поддържане на своята метаболитна активност. При туморните клетки повишеното производство на проангиогенни фактори е резултат от феномен, познат като ангиогенен превключвател.

Основният ангиогенен растежен фактор, който задейства образуването на нови кръвоносни съдове, е съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF). Множество фактори на средата спомагат стимулиране на експресията му, в това число хипоксия, ниско рН, хормони (напр. прогестерон, естроген), растежни фактори (напр. епидермален растежен фактор (epidermal growth factor, EGF), TGF- $\beta$ (бета), bFGF, PDGF, инсулиноподобен растежен фактор-1 (insulin-like growth factor, [IGF]-1) и цитокини (напр. IL-1 $\alpha$ , IL-6). Туморогенните мутации с участието на p53, p73, Src, Ras, vHL и BcrAbl също могат да стимулират експресията.

Хипоксията е отличителна характеристика на много видове рак, като доказано е свързана с нарастване на генерирането на СР. За да се поддържа туморният растеж и пролиферацията в тези хипоксични микросреде, раковите клетки преминават някои промени, за да се адаптират към това състояние с недостиг на кислород и хранителни вещества, включително селектиране на генотипа, благоприятстващ преживяемостта (например TP53 мутация) и активиране на транскрипционен фактор хипоксия-индуциран фактор-1 (HIF-1). При хипоксични условия се възпрепятства хидроксилирането на HIF-1 $\alpha$ , което не позволява разграждането му, както при нормални кислородни условия. Тогава HIF-1 $\alpha$  димеризира с HIF-1 $\beta$ , който по-късно се свързва с хипоксия-отговорен елемент (HRE). HIF-1 медира транскрипционната активация на няколко гени, които участват в ангиогенезата, включително VEGF, ангиопоетин (Ang-1, Ang-2), матрикс-металопротеинази (MMP-2, MMP-9) и глюкозен транспортер I.

Наличието на АФК води до стабилизиране на хипоксия-индуцирания транскрипционен фактор HIF чрез инхибиране на пролил-хидроксилази (PHDs), които при нормални кислородни условия маркират HIF $\alpha$  за протеазомално разграждане, и последващо активиране на VEGF. Последваща ангиогенеза и туморна прогресия може да бъде предотвратена от антиоксиданта N-ацетил-

цистеин (NAC). Третирането с NAC предпазва от стабилизиране на HIF и намалява MYC-медираната туморогенеза *in vivo*. Ангиогенезата позволява миграция на ракови клетки и метастази. Метастазирането изисква извънклетъчно ремоделиране и вътреклетъчни адаптации, включваща епително мезенхимен преход (EMT), намалена адхезия на клетките, повишена миграция и разграждане на тъканните бариери и екстрацелуларната матрица. Установено е, че СР медираат 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. СР могат също да модулират структурни промени в туморните клетки като например образуването на инвазивни микродомени, наречени инвадоподии, които насърчават клетъчната инвазия и метастази. СР подпомагат активирането на матрични металопроотеинази (MMPs), които участват в разграждането на мембраните и помагат на първичните туморни клетки да се отделят от извънклетъчната матрица. Взети заедно, тези СР-медиирани събития стимулират туморната прогресия.

#### **I.2.2.4. Модулиране на нивата на АФК като съпътваща терапия при лечение на онкологични заболявания**

##### ***Понижаване на нивата на АФК***

Наличните в литературата данни за ролята на оксидативният стрес и АФК в иницирането на неопластичните процеси и резултатите доказващи, че синтезираният широк спектър протеини с доказани антиоксидантни свойства при активирането на генният транскрипционен фактор Nrf2 се считат за туморни супресори дава основание за провеждането на изследвания съсредоточени върху потенциалните възможности на антиоксидантната терапия при онкоболни пациенти като нова терапевтична стратегия срещу туморогенезата.

Прилаганите терапии с антиоксиданти включват третиране с екстракти от естествени биоизточници съдържащи съставки известни със способността си да прихващат и обезвреждат АФК, лечение с екзогенни антиоксиданти и стратегии, които намаляват оксидативния стрес посредством модифициране на митохондриите, като естествен източник на АФК.

Най-често цитираните проучвания касаещи моделиране на транскрипционни ефекти с цел подобряване на антиоксидантния статус са свързани с регулиране на нивата на хипоксия-индуцирания транскрипционен фактор-1 (HIF-1). Други алтернативни изследвания касаещи приложението на антиоксидантните терапии *in vitro* с доказан антитуморен ефект са свързани с иницирането на свръх експресията на SOD 3. Въпреки обещаващите резултати от тези изследвания дългосрочните проучвания показват, че приемането на добавки с витамин Е значително увеличава риска от рак на простатата при здрави мъже, а добавката с  $\beta$ -каротин, витамин А или Е увеличават честотата на рак на белия дроб. Неотдавнашно проучване потвърждава тези открития, като показва, че антиоксидантите, N-ацетилцистеин и витамин Е ускоряват прогресията на рака на белия дроб при мишки като намаляват АФК. N-ацетилцистеин също не повлиява туморогенезата при многобройни модели на рак на гърдата *in vivo*. Независимо, че в тези случаи е доказано намаляване нивата на хипоксия-индуцирания транскрипционен фактор-1, е отчетена завишена оценка на риска от метастазиране.

Като цяло девет дългосрочни, рандомизирани контролирани проучвания за третиране с антиоксидантни добавки за профилактика на рак не дават доказателства, че хранителните антиоксидантни добавки са от полза при първичната профилактика на рака. Възможно обяснение на проявената слаба ефикасност като противоракови агенти, може да е фактът, че много от използваните за терапия антиоксиданти не се насочват по ефективен начин към локално произведените струпвания от АФК, които са необходими за

туморогенно сигнализиране. Проведените в последствие опити с митохондриално таргетиране на антиоксиданти са показали ефикасност за понижаване на туморогенния потенциал, когато при аналогично проведени експерименти антиоксидантите под форма на хранителни добавки не са постигнали това.

### ***Увеличаване на нивата на АФК***

Фармакологичното действие на много химиотерапевтични средства, както и йонизиращото лъчение се дължи на стимулиране на производството на АФК, като по този начин се генерират необратими оксидативни увреждания.

Химиотерапевтичните лекарства като таксани (например паклитаксел), винка-алкалоиди и антифолати, инициират клетъчна смърт посредством изменения в електрон-транспортните вериги на митохондриите, които в последствие предизвикват повишено генериране на супероксиди.

Действието на други химиотерапевтици като цисплатин, карбоплатин и доксорубин също значително увеличават АФК. Едно от първите противоракови лекарства, чийто механизъм на действие включва генериране на АФК, е прокарбазин, който лесно се окислява до неговото СР-иницииращо азо-производно, и е одобрено за лечението на лимфом и първични мозъчни тумори. Целевите лекарства, произвеждащи АФК, включват и моноклонални антитела като ритуксимаб, анти-CD20 антитяло, което се използва за лечение на неходжкинов лимфом. Арсеновият триоксид (АТО) уврежда функцията на митохондриалните електрон транспортни вериги и респективно увеличава производството на супероксиди. АТО агентите могат ефективно да лекуват остра промиелоцитна левкемия (APL) и някои други зависими от СР левкемии. Елескломол (STA-4783) е друго СР-произвеждащо съединение в клиничните изпитания за злокачествен меланом. Във фаза II при клинични изпитания монотерапия с елескломол е установено, по-дълга преживяемост без прогресия на болестта. При проведените проучвания в комбинация с

химиотерапевтичното средство паклитаксел е отчетено допълнително повишаване на ефикасността. Механизмът, по който елескломол увеличава генерираното количество СР, е неизвестен, но неутрализирането на СР чрез антиоксиданти потиска ефективността на лекарството.

Основен проблем при много химиотерапевтични противоракови лекарства, чийто механизъм на действие включва повишаване на генерирането на СР, е токсичният им ефект върху нормалните здрави клетки. Изследванията с разработените таргетирани противоракови лекарства, основани на същият механизъм на действие, също показват обещаващи резултати при индуциране на апоптоза в раковите клетки.

На база на проведените експерименти могат да бъдат направени следните основни заключения:

- 1) Свободните радикали и свободнорадикалово зависимата клетъчна сигнализация са от съществено значение за нормалната клетъчна функция
- 2) В определени случаи, свободните радикали могат стимулират оцеляването на туморните клетки
- 3) Антиоксидантите могат да попречат на химиотерапевтичното лечение, когато има зависимост от свободнорадикалово - индуцирана цитотоксичност.

## 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 органи, 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  $75 \text{ mg/m}^2$  телесна повърхност на ден 1-ви и етопозид  $100 \text{ mg/m}^2$  ден 1-ви – 3-ти или цисплатин  $30 \text{ mg/m}^2$  и иринотекан  $65 \text{ mg/m}^2$  ден 1-ви и ден 8-ми при дребноклетъчен рак на белия дроб. При недребноклетъчен рак на белия дроб схемите за лечение включват цисплатин  $75 \text{ mg/m}^2$  ден 1-ви и гемцитабин  $1200 \text{ mg/m}^2$  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-НТ3 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.

С цел осигуряване на необходимата за изследването на антиоксидантния статус на пациентите кръвна плазма е вземана допълнителна кръвна проба заедно с пробите за рутинните изследвания при постъпване в болница и след приключването на химиотерапията. Всички пациенти са уведомени предварително и е получено тяхното писмено информирано съгласие за включването им в проучването.

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

### **Спектрофотометрични методи**

Определянето на оксидативният статус на пациентите беше осъществено посредством измерването на ТБА – активните продукти (ТБА-RS) в кръвната плазма на пациентите и оценяване на тоталната ѝ антиоксидантна активност в моделна система, съдържаща стабилния ABTS радикал. Основни причини за подборът на тези две методики е фактът, че интензифицирането на свободно-радикалните процеси дава своето отражение в нарастване на количеството оксидативно увредени биологично важни молекули, като в това отношение степента на окисление сред липидите е най-висока. Продуктите от окислението попадат в кръвната плазма, което дава възможност посредством оценка на нивото на липидната ѝ пероксидация да се съди за мащабите на оксидативния стрес. От друга страна последният може да доведе до промени в антиоксидантния статус на организма, което се отразява на антиоксидантния капацитет на плазмата.

**Определяне на ТБА – активни продукти (ТВА-RS)** по метода на Asakawa and Matsushita [13] – Този класически метод е приложен в два варианта: определено е нативното количество на ТВА-RS и е определено максималното количество ТВА-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 FeCl<sub>2</sub> 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 ТВА-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. [12]. 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  $0.700 \pm 0.01$ . 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 ѝ. 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.

Хемилуминесцентните методи са се доказали през годините като надеждни, бързи и изключително чувствителни при определянето на антиоксидантната активност на новосинтезирани съединения [Van Dyke et al., 2002]. Нито един друг метод, който се използва за оценка на оксидативните процеси, не позволява проследяване на кинетиката на реакциите с такава висока скорост. Границите на откриване при тези методики стигат концентрации от порядъка на  $10^{-19}$ М. Тази стойност е в пъти по-ниска в сравнение с тези на флуоресцентния анализ ( $10^{-12}$ М), абсорбционната спектроскопия ( $10^{-9}$ М) и радиоизотопния анализ ( $10^{-18}$ М). Подбраните за нуждата на дисертацията методики са доказали приложимостта си при изследването на АОА на широк спектър от проби включително лекарствени медикаменти и биологични проби [Traykov et al., 1997; Hadjimitova et al., 2002; Хаджимитова дисертация –

приноси]. Те се основават на двуелектронното окисление на молекулите на луминола (5-амино-2,3-дихидро-1,4-фтаналзинедион), при което се образува ендопероксид. Неговата молекула е нестабилна – отцепва  $N_2$ , при което се образува продукт във възбудено електронно състояние (3-аминофталин), чийто преход в основно състояние е съпроводен с изсветване на фотон. Причината при провеждането на хемилуминесцентните експерименти да бъде използван луминол е фактът, че описаните в литературата експерименти цитират взаимодействие на люцигенина със супероксид, докато за луминолът е доказано взаимодействие с голям брой окислителни агенти, което прави луминол-зависимата хемилуминесценция неселективен метод за регистриране на АФК [Van Dyke et al., 2002; Campbell et al., 1988]. Използването на луминол-зависима CL позволява да се регистрира процеса в динамика, дори при такива бързо протичащи процеси каквито са взаимодействието с високо реактивоспособни радикали.

- **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  $\mu$ l  $KO_2$ , разтворени в DMSO.

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

В 1 ml 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  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 представяне е използвана графика тип кутия („box plot“) с означени медиана, 1-ва и 3-та квантили, 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:

Таблица 1.

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

\* медиана/ интервал

В проучването са включени 30 пациента с рак на белия дроб. От тях 10 са с дребноклетъчен карцином и 14 са с недребноклетъчен. В проучването са включени 6 жени и 24 мъже. Жените всички са непушачи, а мъжете са или пушачи или бивши пушачи. За бивши пушачи се приемат хора, които са престанали да пушат преди повече от шест месеца преди проучването. Обобщено данните за пациентите са представени в таблица 1.

На всеки пациент е прилагано стандартно за заболяването му лечение, което е според протокола за добрата медицинска практика и се прилага в болница „Св. Иван Рилски“.

Всеки пациент е подписал информирано съгласие, както за прилаганото му лечение, извършваните изследвания и манипулации, така и документ удостоверяващ съгласието му за участие в този експеримент. Информацията за състоянието на пациентите е достъпна само на лекуващия му лекар, но не и за другите участници в колектива. Пробите са с номера и участниците в експеримента разполагат само с посочените в Таблица 1 данни.

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

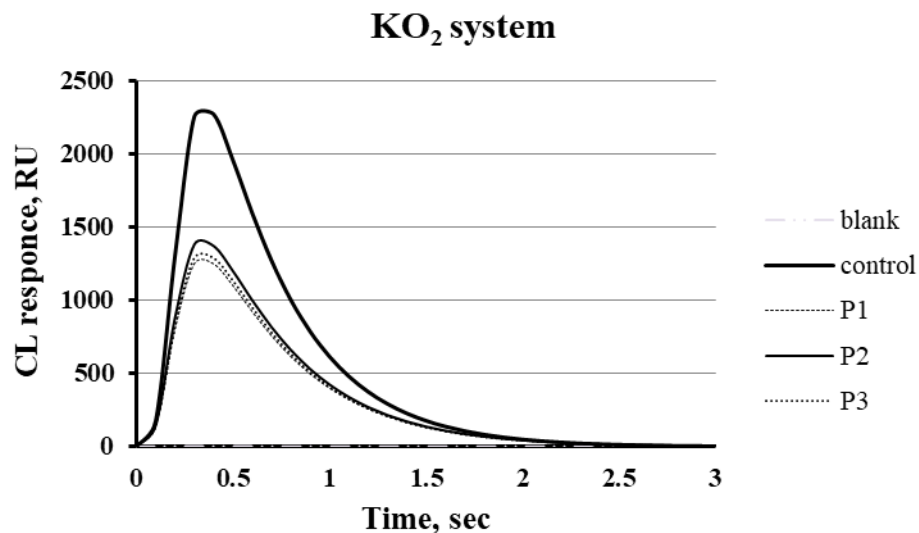
Експериментите имат за цел да оценяват антиоксидантния капацитет на кръвната плазма на пациентите на два вида радикали : супероксидни и хипохлорит. Това са радикали, които имат отношение към инициране на оксидативното увреждане. Способността да се елиминират този тип радикали ще даде допълнителна информация 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 работат 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. Светенете 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 наречен 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.

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  $\text{KO}_2$  към пробата се получава супероксид, който при взаимодействието си с луминола води до генериране на светене на възбудената от взаимодействието със супероксида молекула. Това светене се регистрира от апаратурата. 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.

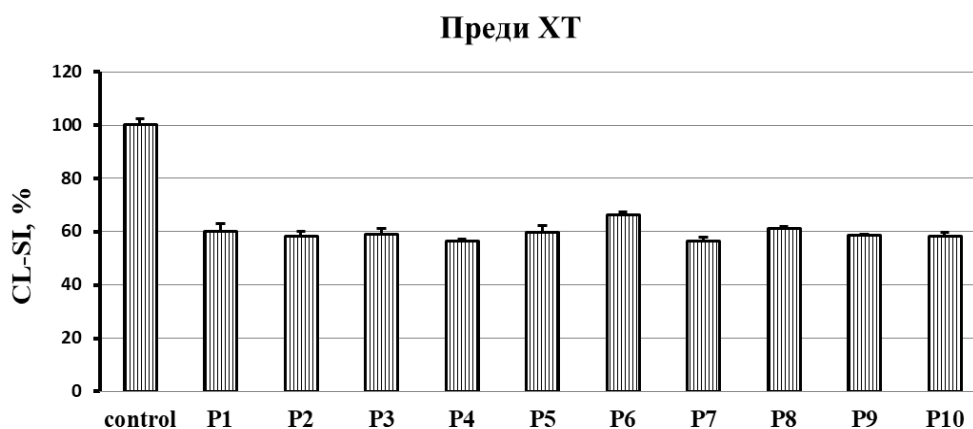


***Фигура IV.1. Типични хемилуминесцентни криви, получени при изследване на антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на трима пациенти спрямо супероксидни радикали***

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, този на пробата с плазма към този на контролата, ще има по-малка стойност при по-голям скевинджър ефект на плазмата. На същата фигура кривата, която е отбелязана като Blank и практически съвпада с оста *x* на графиката представлява пробата, в която има останалите компоненти без луминол. Това е базисната линия, която отчита собственото светене на пробата. Интегралът на

blank пробата се изважда от стойността на интегралите на всички проби, преди изчисляване на CL-SI.

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.

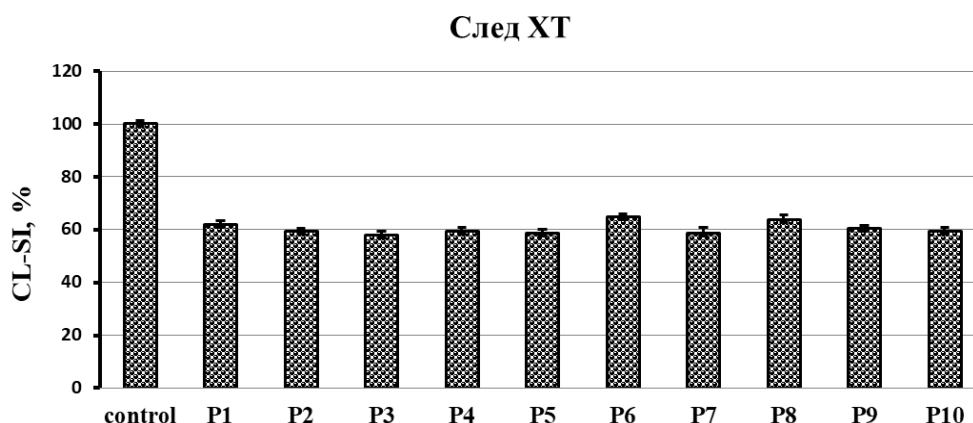


**Фигура IV.2. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо  $O_2^{\bullet-}$ , взета от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия**

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

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%.

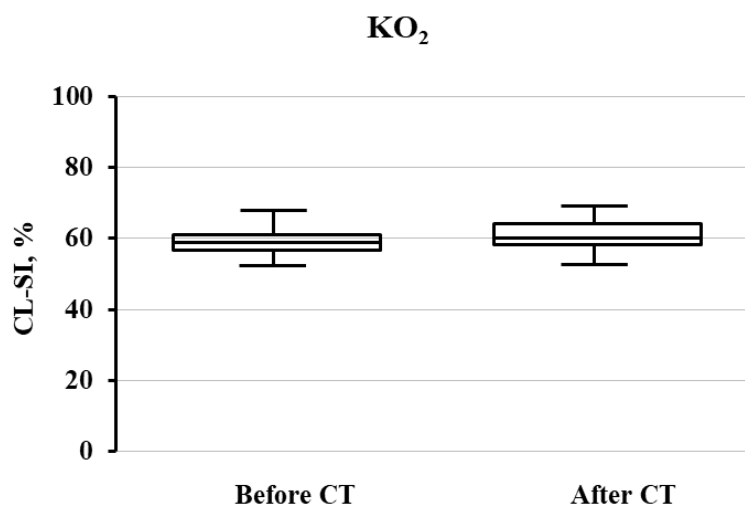


**Фигура IV.3.** *Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо  $O_2^{\bullet-}$ , взета от пациенти след проведена химиотерапия*

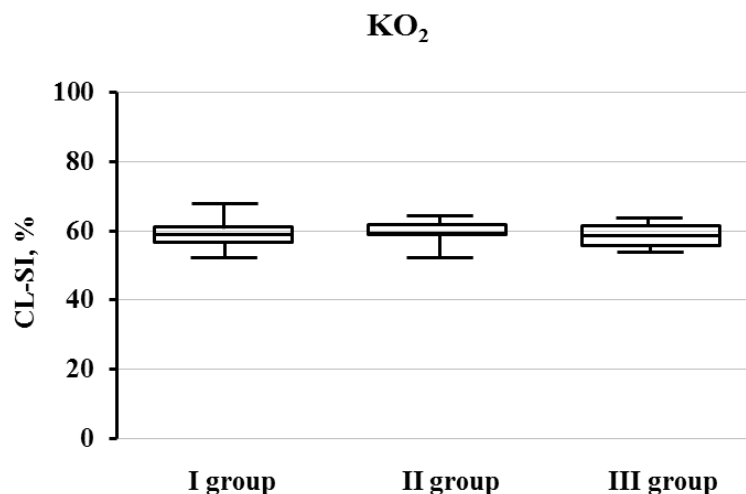
Доколкото представените резултати на **Фигури IV.2** и **IV.3** имат за цел да илюстрират получените данни за отделни пациенти, показаното не е достатъчно да се направят заключения за всички пациенти. Затова на базата на всички пациенти беше направена статистическа обработка на резултатите, което да 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 недробноклетъчен рак, лекувани с гемцитабин и цисплатин, а в III група са пациентите с дробноклетъчен 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 %.

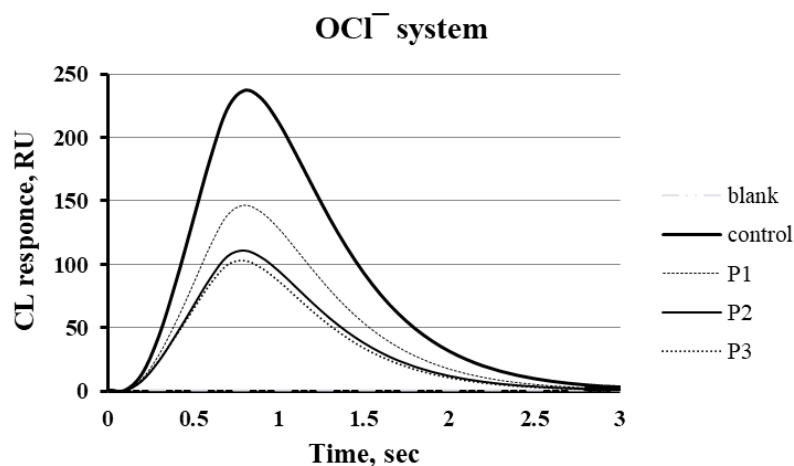
Анализът на резултатите показва, че независимо дали кръвните проби са взети преди или след проведената химиотерапия, не се наблюдават статистически различни промени в капацитета на кръвната плазма на пациентите да елиминира супероксидни радикали, тъй като CL-SI не се различава съществено. Сравнявайки 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  $O_2^{\bullet-}$ .

#### **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.



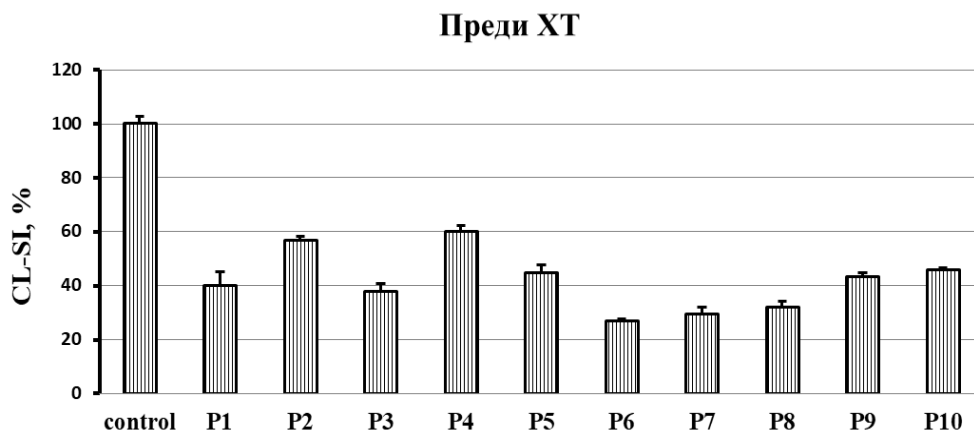
*Фигура IV.6. Типични хемилуминесцентни криви, получени при изследване на антиоксидантния скевинджър капацитет на кръвната плазма на пациентите спрямо хипохлоритни йони*

Към среда, съдържаща луминол, се добавя хипохлорит, който води до луминолово светене, стойността на което се приема за контрола.

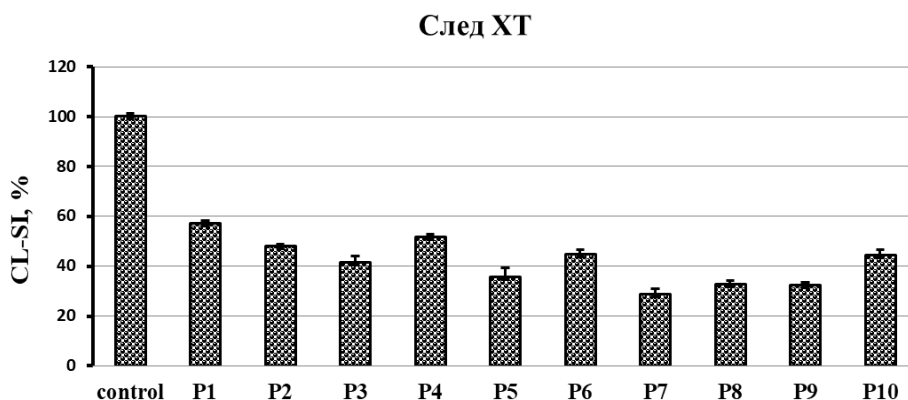
Концентрацията на хипохлорита е подбрана така, че да съответства на тази, която се получава по време на кислородния взрив на неутрофилите. На **Фигура IV.6.** са представени типични хемилуминентни криви, получени в хода на проведените експерименти. Контролата не съдържа кръвна плазма и съответства на 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  $OSI^-$ , взета от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия*

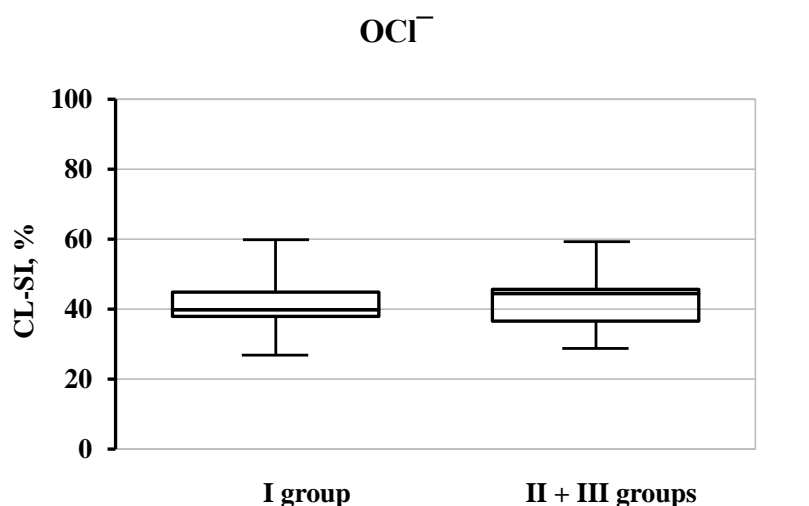


*Фигура IV.8. Резултати, получени за антиоксидантния скевинджър капацитет на плазмата спрямо  $OSI^-$ , взета от пациенти след провеждане на курс на химиотерапия*

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.

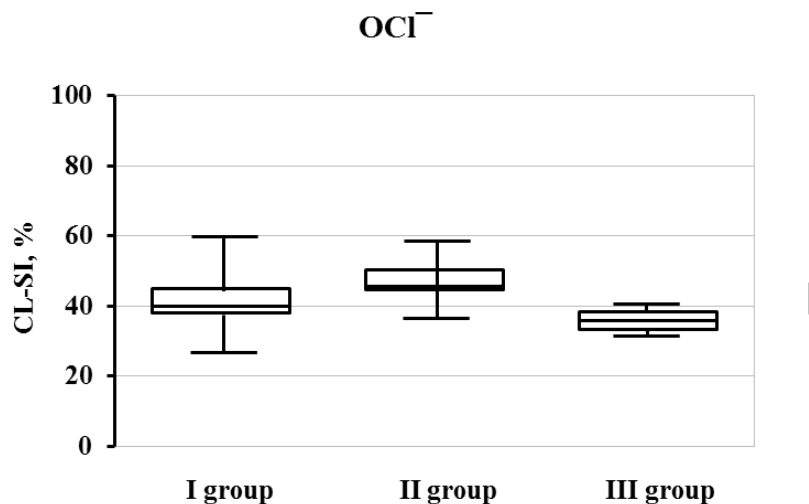
От показаните на **Фигура IV.9.** данни се вижда, че обобщените резултати за антиоксидантния скевинджър капацитет срещу хипохлорита са много близки за пациентите преди и след проведената химиотерапия. Стойностите на CL-SI на медианите на двете групи са съответно около 40% и 44.5%, което показва лека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

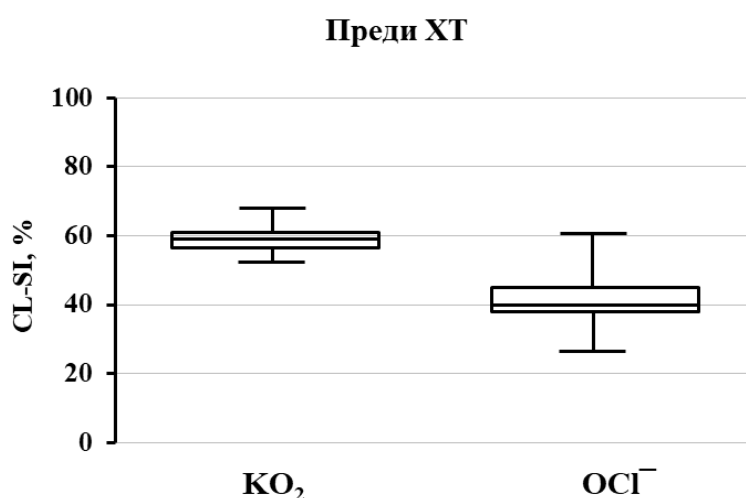


**Фигура IV.10.** Антиоксидантен капацитет спрямо хипохлоритни йони на плазмата на пациентите преди химиотерапията (I група), след химиотерапията: лекуваните с гемцитабин и цисплатин (II група) ( $p=0.07 > 0.05$ ) и лекуваните с комбинацията от иринотекан и цисплатин (III група) ( $p<0.05$ )

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  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{OCl}^-$  ( $p < 0.05$ )**

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**

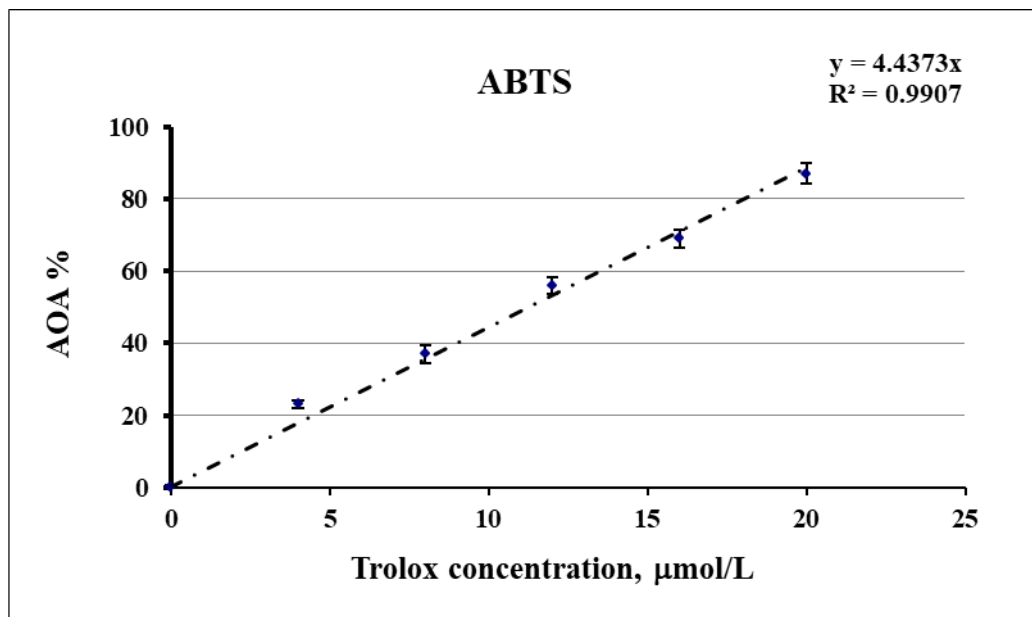
#### **IV.3.1. Калибровъчни криви за спектрофотометричните методики**

**Резултати, получени за концентрационната зависимост между АОА, на използвания за стандарт антиоксидант Тролокс в система съдържаща АВТS радикали.**

За да се стандартизират изследванията, получени за антиоксидантната активност на кръвната плазма на пациентите в система за определяне на тотален антиоксидантен капацитет ТАОС, съдържаща АВТS радикали, беше снета зависимостта на антиоксидантната активност на Тролокса в същата система. Така резултатите за ТАОС на плазмата на пациентите включени в настоящото проучване биха могли да се сравняват с данните получени за кръвната плазма на пациенти изследвани от други автори.

За целта бяха приготвени стандартни разтвори на Тролокс, които бяха тествани в същата система както е описана в главата Материали и методи. След едночасова инкубация на тъмно място бяха измервани екстинкциите на пробите тролокс с различни концентрации. С помощта на формулата за АОА, дадена в главата Материали и методи бяха получени резултатите показани на **Фигура IV.12.**

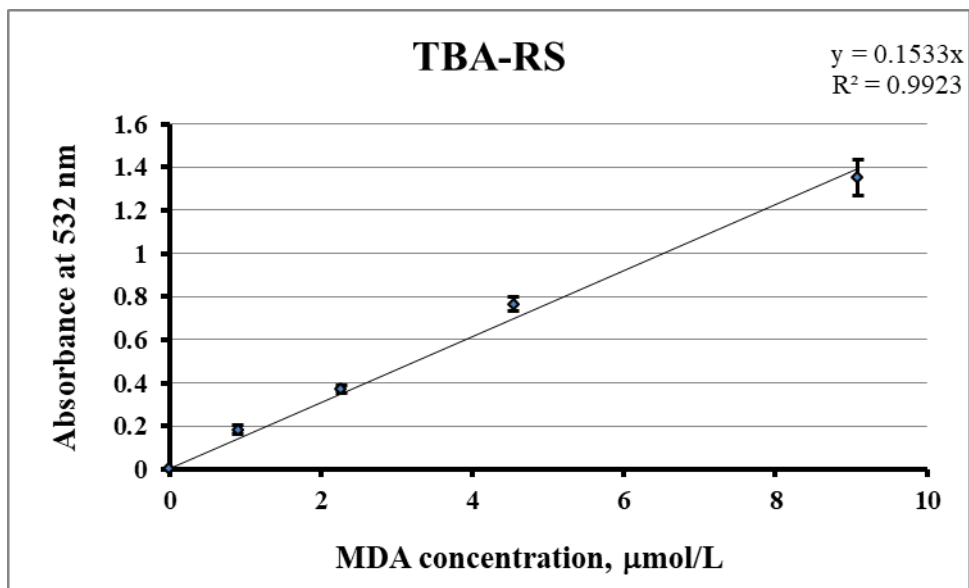
На фигурата са показани аналитичния вид на зависимостта и  $R^2$ . На базата на уравнението  $y = 4.4373x$ , което има много добра линейност -  $R^2 = 0.9907$ , беше изчислена стойността на С-50 на тролокса  $C-50 = 11.27 \mu\text{mol/L}$ .



*Фигура IV.12. Зависимост между антиоксидантната активност на тролокса и неговата концентрация, получена при условията, в които е тествана антиоксидантната активност на кръвната плазма.*

**Резултати, получени за TBARS реакцията на малонов диалдехид в зависимост от концентрацията му.**

За нуждите на представяне на резултатите, получени за нивото на липидна пероксидация на кръвната плазма на пациентите, беше построена калибровъчна крива между концентрацията на МДА стандарт и екстинкцията на TBARS продуктите, които той дава при условията на експеримента, провеждан за плазмата. Резултатите са представени на **Фигура IV.13**.



**Фигура IV.13. Зависимост между екстинкцията при 532 nm и концентрация на MDA, получена при условията, в които е определяно нивото на липидна пероксидация на кръвната плазма.**

На фигурата са показани аналитичния вид на зависимостта и  $R^2$ . На базата на уравнението  $y = 0.1533x$ , което има много добра линейност -  $R^2 = 0.9923$ , беше изчислена стойността на моларен екстинкционен коефициент  $\epsilon = 15330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , който е използван за представяне на резултатите на пациентите.

### **IV.3.2. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите определен чрез TBARS**

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.

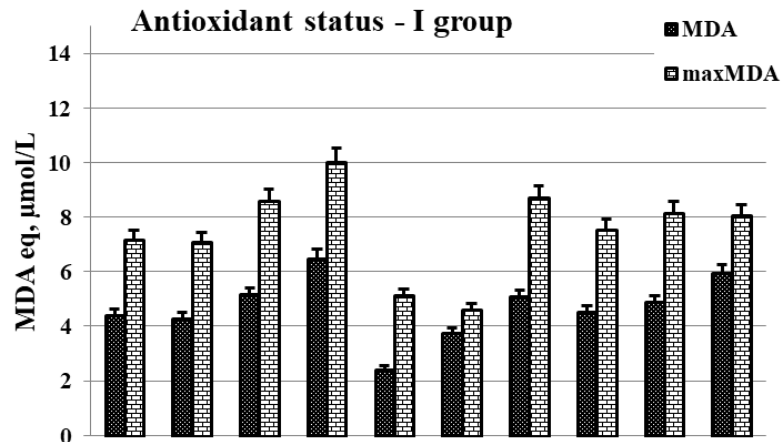
Този подход за оценка на оксидантния статус, при който освен нивото на MDA продуктите в плазмата, се измерват и maxMDA продуктите в същата плазма, беше прилаган в други наши проучвания [Georgieva *et al.*, 2015]. Целта на този подход е да се използва всеки пациент като автоконтрола и така да се стабилизируют 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.

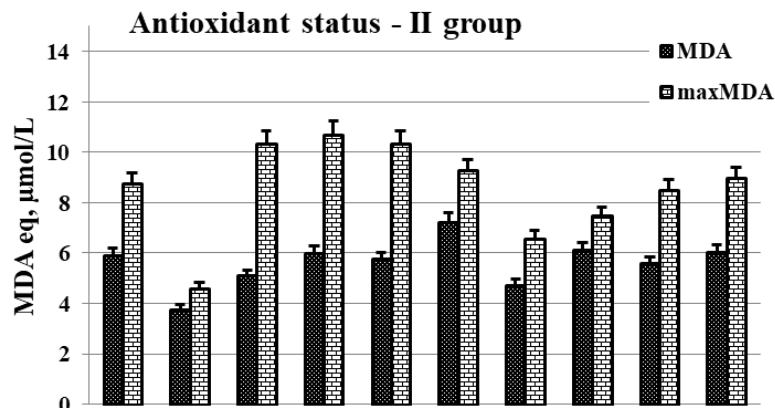
На **Фигура IV.14.** са показани резултатите на пациентите преди прилагане на химиотерапията, като са представени съвместно реалното количество на MDA продуктите и максималният окислителен потенциал (maxMDA).



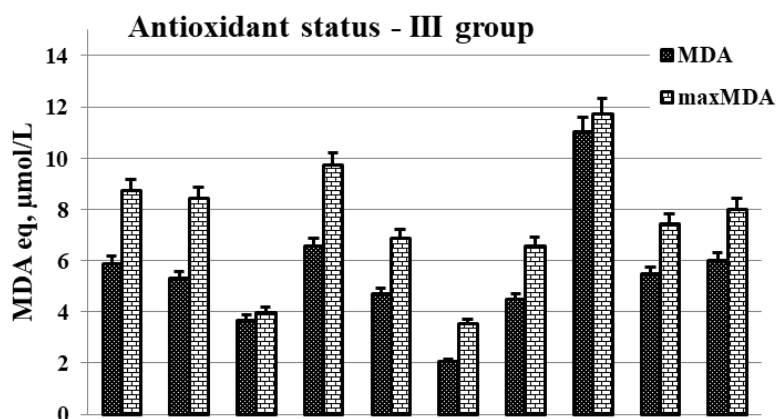
*Фигура IV.14. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти преди да се проведе курс на химиотерапия*

Представените на **Фигури IV.14., 15. и 16.** пациенти са избрани на случаен принцип от базата данни на всички пациенти и имат за цел да илюстрират получените резултати. **Фигура IV.14.** 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.14.**). 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 всички наличен субстрат.

На **Фигури IV.15. и IV.16.** 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).



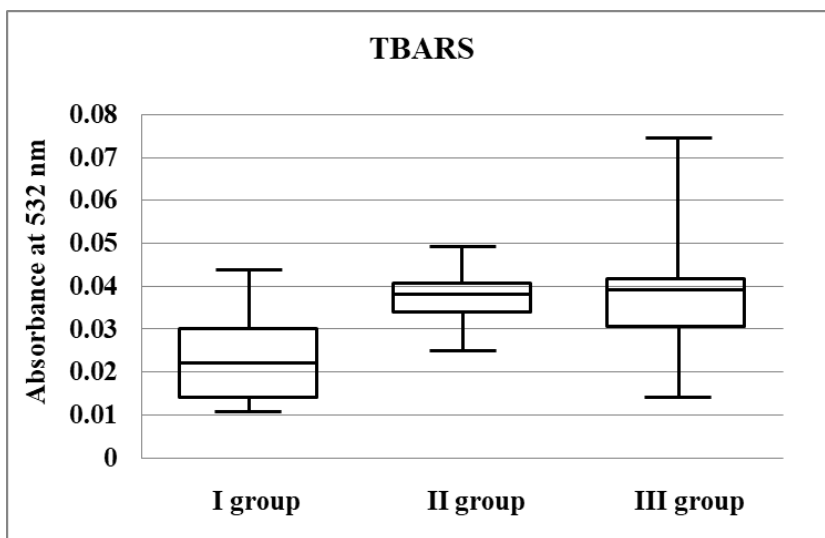
*Фигура IV.15. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти след проведен курс на химиотерапия с гемцитабин и цисплатин (II група)*



*Фигура IV.16. Резултати, получени за антиоксидантния статус на плазмата от пациенти след проведен курс на химиотерапия с иринотекан и цисплатин (III група)*

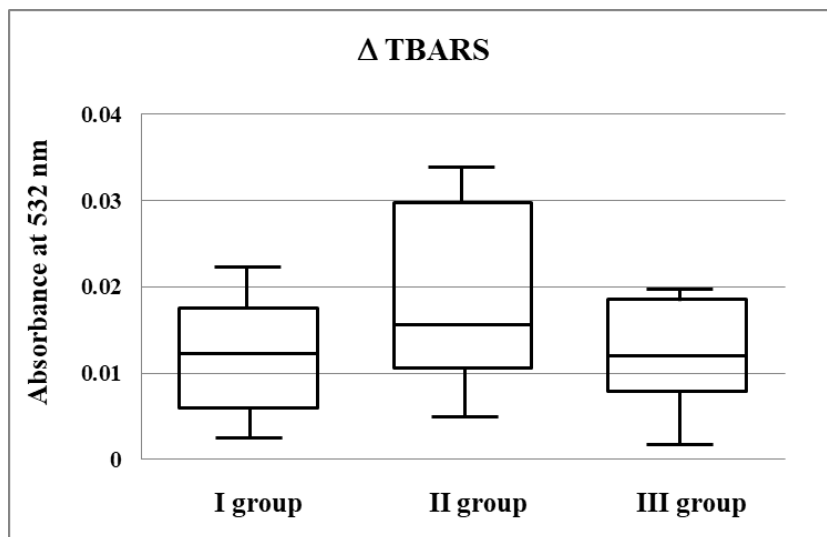
От представените резултати се вижда, че количеството на MDA продуктите след химиотерапията е по-високо спрямо преди провеждането ѝ при повечето пациенти. Това показва, че проведеното лечение с химиотерапевтици води до интензифициране на оксидативните процеси, което е довело до

нарастване на оксидативните увреждания при пациентите, лекувани с двете комбинирани терапии. Забелязва се леко сближаване на стойностите на MDA и махMDA 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.



*Фигура IV.17. 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*

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.14., IV.15. и IV.16.** са статистически обработени и са представени на **Фигура IV.17.** и **Фигура IV.18.**



**Фигура IV.18.** *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.17.** са показани в обобщен вид резултатите от регистрираното количество TBARS активни продукти, отразяващи нивото на оксидативни увреждания по групи пациенти. На **Фигура IV.18.** 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.17.** за наличните в плазмата MDA продукти потвърждават забелязаното при сравняването на **Фигура IV.14.** с **IV.15.** и **IV.16.** 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

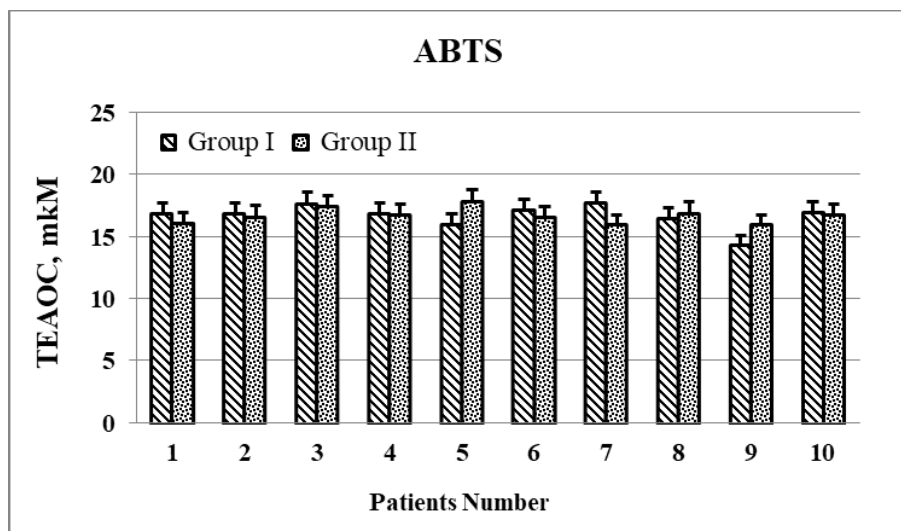
група II (пациентите с комбинирана терапия гемцитабин и цисплатин) и група I (пациенти преди химиотерапия), и между група III (пациенти с комбинирана терапия иринотекан и цисплатин) и група I. Стойностите нарастват за група II с около 74 % спрямо група I, за група III спрямо група I с около 77 %. Прилаганата 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 гемцер.

На **Фигура IV.18.** 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-малко и по-интензивни. От показаното на **Фигура 18.** 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.3.3. Резултати, оценяващи антиоксидантния статус на пациентите определен чрез ABTS метод

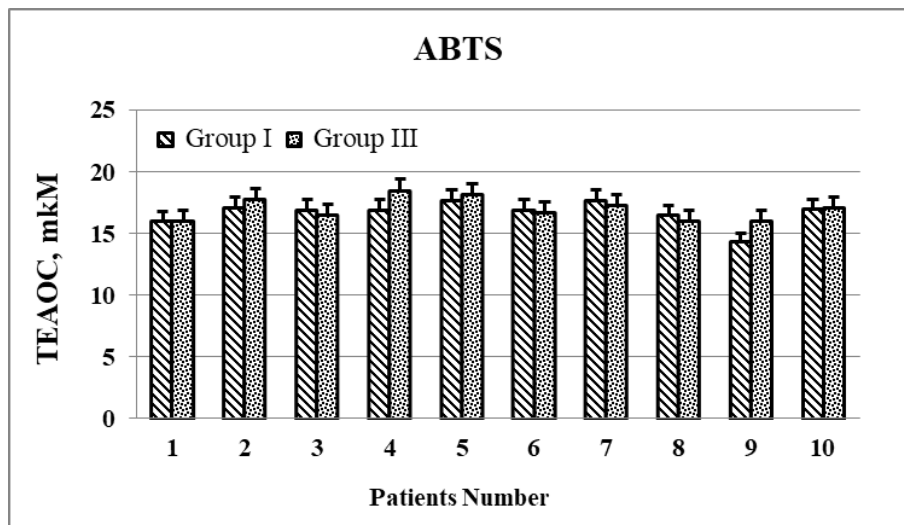
За да установим директно антиоксидантния капацитет на кръвната плазма на пациентите, използвахме ABTS тест. На базата на получените резултати за всеки пациент беше изчислена антиоксидантната активност на плазмата му, както е описано в Материали и методи. С помощта на калибровъчна крива тоталният антиоксидантен капацитет беше изчислен като тролокс еквивалент. Тези данни за част от пациентите са представени на **Фигура IV.19.**



**Фигура IV.19.** *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.

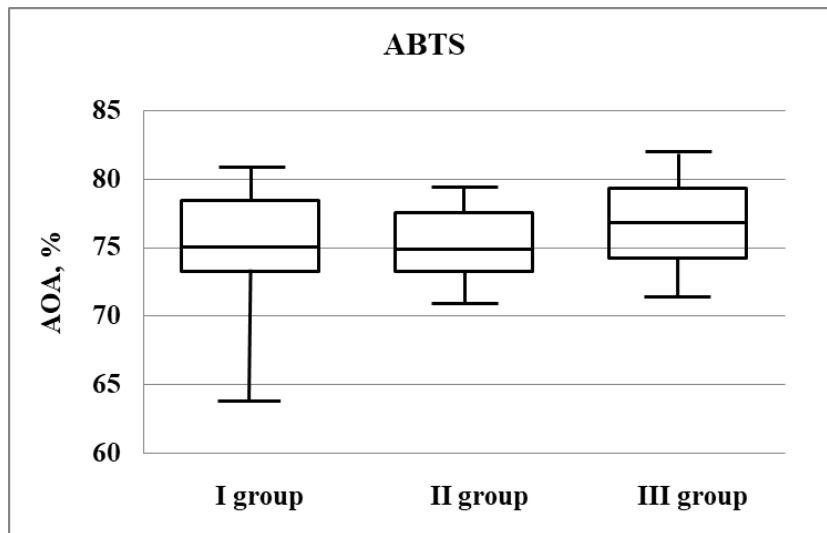
На **Фигура IV.20** са показани произволно избрани данни за пациентите, които са получили терапия от иринотекан и цисплатин преди и след нея.



**Фигура IV.20.** *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.21.**, 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 АОА ( $p>0.05$ )*

Този резултат е в потвърждение на показаното на **Фигура IV.18.**, 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.16**).

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 аномално 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 дизайн 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 ТВА-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 ТВА-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 терапията 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  $\text{maxMDA}$  и  $\text{MDA}$ , 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  $\max\text{MDA}$  и  $\text{MDA}$  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 показва, че луминоловата ХЛ позволява да се получава по-детайлна информация за АО капацитет на плазмата на пациенти спрямо методите, измерващи тоталната АОА.

АВТS тестът позволява да се регистрират компоненти в плазмата (молекули с антиоксидантен потенциал), които ни ориентират за общия антиоксидантен статус на пациента, докато разликата в ТВARS 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 намалява, 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 гемцититибин и цисплатин – наблюдава намаляване на скевинджърния капацитет след химиотерапията (нарастване 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 TBA-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. Антиоксидантна активност на кръвната плазма при пациенти с белодробен карцином, определена чрез ABTS тест преди и след провеждането на комбинирана химиотерапия показва баланс между оксидативен стрес – антиоксидантен капацитет.

## VII. ПРИНОСИ

1. За първи път се изследва антиоксидантния скевинджър капацитет на пациенти с белодробен карцином спрямо супероксидни радикали и хипохлорит преди и след приложение на комбинирана противотуморна химиотерапия, включваща цисплатин чрез методите на луминол-зависима хемилуминесценция.
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. Настоящото проучване показва, че луминоловата хемилуминесценция 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. Дени стр. 144- 148. ISBN 978-619-237-014-5
2. **Robev B.** Hristova-Avakumova N, Nikolov R, Traykov T, Hadjimitova V Chemiluminescent investigation of the antioxidant status in lung cancer patients. AIP Conference Proceedings 2075, 170023 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5091388>
3. **Bozil Robev,** Nadya Hristova-Avakumova, Rumens Nikolov, Vera Hadjimitova Impact of combination chemotherapy on plasma antioxidant status in lung cancer patients

### 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-Avakumova 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 the antioxidant status in lung cancer patients.  
10th Jubilee International Conference of the Balkan Physical Union, 26-30 August  
2018 Sofia, Bulgaria.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Asakawa, T. and Matsushita, S. (1980) Coloring Condition of Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Hydroperoxides. *Lipids*, 15, 137-140.
2. Ban Y, Ho CW, Lin RK, Lyu YL, Liu LF. Activation of a novel ubiquitin-independent proteasome pathway when RNA polymerase II encounters a protein roadblock. *Mol Cell Biol* 2013;33(20):4008–4016.
3. Battafarano RJ, Meyers BF, Guthrie TJ, Cooper JD, Patterson GA (2002): Surgical resection of multifocal non-small cell lung cancer is associated with prolonged survival. *Ann Thorac Surg* 74:988–993
4. Bayman NA, Sheikh H, Kularatne B, Lorigan P, Blackhall F, Thatcher N, Faivre-Finn C (2009): Radiotherapy for small-cell lung cancer-where are we heading? *Lung Cancer* 63:307–314.
5. Bedard, K., K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 87 (1) (2007) 245–313.
6. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 2003;31:1441–4.
7. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, Sharma SV, Brannigan BW, Mohapatra G, Settleman J, Haber DA. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet.* 2005;37(12):1315–1316.
8. Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, Brockmöller J, Clapper ML, Daly A, Dolzan V, Ford J, Gaspari L, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kihara M, Kremers P, Le Marchand L, London SJ, Nazar-Stewart V, Onon-Kihara M, Rannug A, Romkes M, Ryberg D, Seidegard J, Shields P, Strange RC, Stücker I, To-Figueras J, Brennan P, Taioli E. Meta-and pooled analyses

- of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2002;23(8):1343–1350.
9. Berrigan MJ, Struck RF, Gurtoo HL (1987): Lipid peroxidation induced by cyclophosphamide. *Cancer Biochem Biophys* 9:265–270.
  10. Blanchard EM, Arnaoutakis K, Hesketh PJ. Lung cancer in octogenarians. *J Thorac Oncol*. 2010;5(6):909–916.
  11. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001): The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18:1059–1068.
  12. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296: 1655–7.
  13. Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, Page RD, Liloglou T, Duffy SW, Field JK. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer*. 2008;98(2):270–276.
  14. Champoux JJ, Dulbecco R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA—a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69(1):143–146.
  15. Chao CKS, Perez CA, Brady LW (2001): Radiation oncology: management decisions. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA
  16. Chou WC, Jie C, Kenedy AA, Jones RJ, Trush MA, Dang CV. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:4578–83
  17. D’Addario G, Felip E; ESMO Guidelines Working Group (2009): Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20:iv68–70.
  18. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, Gjyrezi A, Chanel-Vos C, Shen R, Tagawa ST, Bander NH, Nanus DM,

- Giannakakou P. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2011;71:6019–6029.
19. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Carney JM, Butterfield DA (1998): Adriamycin induces protein oxidation in erythrocyte membranes. *Pharmacol Toxicol* 83:62–68.
  20. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Harris B, Hadley R, Cole Harper P, Carney JM, Butterfield DA (1999): Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett* 136:41–46.
  21. Decker RH, Wilson LD (2008): Advances in radiotherapy for lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 29:285–290.
  22. Delaney G, Barton M, Jacob S, Jalaludin B (2003): A model for decision making for the use of radiotherapy in lung cancer. *Lancet Oncol* 4:120–128.
  23. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996;274:430–432.
  24. Detterbeck F, Tanoue L, Boffa DJ. The new lung cancer staging system. *Chest* 2009;136:260–271.
  25. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM (2005): International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 117:294–299.
  26. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds (2005): *Cancer principles & practice of oncology*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA
  27. Dube S, McClave A, James C, et al. Vital signs: current cigarette smoking among adults aged  $\geq 18$  years—United States, 2009. *MMWR*. 2010;59:1135–1140. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6205a2.htm>

28. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987;34:155–166.
29. Ellis LM. Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2006 Oct;33(5 Suppl 10):S1-7. Review.
30. Enoiu M, Jiricny J, Schärer OD. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Res* 2012;40:8953–8964.
31. Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M, Favier A (1995): Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res* 47:117–123.
32. Fairchild A, Harris K, Barnes E, Wong R, Lutz S, Bezjak A, Cheung P, Chow E (2008): Palliative thoracic radiotherapy for lung cancer: a systematic review. *J Clin Oncol* 26:4001–4011.
33. Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007; 15(7-8):475-486.
34. Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J, Favier A (1996): 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients. *Free Radic Biol Med* 20:979–983.
35. Fietkau R (2004): Stage-III NSCLC: multimodality therapy for inoperable tumours. *Lung Cancer* 45:S113–123
36. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, Kaukel E, Mattson KV, Ramlau R, Szczesna A, Fidias P, Millward M, Belani CP (2003): Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum

- combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol* 21:3016–3024.
37. Gao P, Zhang H, Dinavahi R, Li F, Xiang Y, Raman V, et al. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 2007;12:230–8.
38. Georgieva, V., N.Hristova-Avakumova, D. Tzoneva, Al. Todorov, V. Hadjimitova Alanyl-Glutamine Dipeptide Ameliorates Antioxidant Status and Disease Outcome in Critically Ill Patients without Exhibiting Antioxidant Properties in Vitro *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, Vol 68:8, 1007-1014.
39. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706–714.
40. Goldstraw P, Crowley J. The International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Project on Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1:281–286.
41. Gorlova OY, Weng SF, Zhang Y, Amos CI, Spitz MR Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *Int J Cancer*. 2007;121(1):111–118.
42. Gorlova OY, Zhang Y, Schabath MB, Lei L, Zhang Q, Amos CI, Spitz MR. Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors. *Int J Cancer*. 2006;118(7):1798–1804.
43. Gray N. The consequences of the unregulated cigarette. *Tob Control*. 2006;15(5):405–408.
44. Gridelli C, Langer C, Maione P, Rossi A, Schild SE Lung cancer in the elderly. *J Clin Oncol*. 2007;25(14):1898–1907.

45. Gridelli C, Rossi A, Maione P (2003): Treatment of non-small-cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. *Oncogene* 22:6629–6638
46. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM (2008): Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 113:5–21.
47. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM (2008): Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 113:5–21
48. Halliwell B (2007): Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401:1–11.
49. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th. Oxford, UK: Oxford University Press; 2007.
50. Hamilton W, Peters TJ, Round A, Sharp D (2005): What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax* 60:1059–1065
51. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010;13:1713–48.
52. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1194–1210.
53. Hedrick SM. The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nature Immunology* 2009;10:1057–63.
54. Hoimes CJ, Kelly WK. Redefining hormone resistance in prostate cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2010;2:107–123.
55. Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cell. *Cancer Res* 1989;49(22):6365–6368.
56. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012,

National Cancer Institute. Bethesda, MD,  
[https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/),

57. Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. Arrest of DNA replication by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 1989;49(18):5077–5082.
58. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:39485–92.
59. Huang SN, Pommier Y, Marchand C. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1(Tdp1) inhibitors. *Expert Opinion Ther Pat* 2011;21(9):1285–1292.
60. Jassem J (2007): The role of radiotherapy in lung cancer: where is the evidence? *Radiother Oncol* 83:203–213
61. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
62. Joerger M, Omlin A, Cerny T, Früh M. The role of pemetrexed in advanced non small-cell lung cancer: special focus on pharmacology and mechanism of action. *Curr Drug Targets* 2010;11:37–47.
63. Johnson DH, Turrisi A (2000): Postoperative radiotherapy in resected non-small-cell lung cancer: every creek has two banks. *Curr Oncol Rep* 2:51–53.
64. Jung CY, Choi JE, Park JM, Chae MH, Kang HG, Kim KM, Lee SJ, Lee WK, Kam S, Cha SI, Kim CH, Han SB, Jung TH, Jeon SH, Park JY. Polymorphisms in the hMSH2 gene and the risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
65. Kenfield, S. A., Wei, E. K., Stampfer, M. J., Rosner, B. A., & Colditz, G. A. (2008). Comparison of Aspects of Smoking Among Four Histologic Types of Lung Cancer. *Tobacco Control*, 17(3), 198–204.
66. Kindler HL. Systemic treatments for mesothelioma: standard and novel. *Curr Treat Options Oncol* 2008;9:171–179.

67. Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang CY, Zhang M, et al. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008;7:2319–27.
68. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;64(24):8919–8923.
69. Koster DA, Palle K, Bot ES, Bjornsti MA, Dekker NH. Antitumor drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* 2007;448(7150):213–217.
70. Krasnik M, Vilmann P, Herth F (2006): EUS-FNA and EBUS-TBNA; the pulmonologist's and surgeon's perspective. *Endoscopy* 38:S105–109
71. Lam DC, Girard L, Suen WS, Chung LP, Tin VP, Lam WK, Minna JD, Wong MP. Establishment and expression profiling of new lung cancer cell lines from Chinese smokers and lifetime never-smokers. *J Thorac Oncol.* 2006;1(9):932–942.
72. Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, Mirabello L, Jacobs K, Wheeler W, Yeager M, Bergen AW, Li Q, Consonni D, Pesatori AC, Wacholder S, Thun M, Diver R, Oken M, Virtamo J, Albanes D, Wang Z, Burdette L, Doheny KF, Pugh EW, Laurie C, Brennan P, Hung R, Gaborieau V, McKay JD, Lathrop M, McLaughlin J, Wang Y, Tsao MS, Spitz MR, Wang Y, Krokan H, Vatten L, Skorpen F, Arnesen E, Benhamou S, Bouchard C, Metspalu A, Vooder T, Nelis M, Välk K, Field JK, Chen C, Goodman G, Sulem P, Thorleifsson G, Rafnar T, Eisen T, Sauter W, Rosenberger A, Bickeböller H, Risch A, Chang-Claude J, Wichmann HE, Stefansson K, Houlston R, Amos CI, Fraumeni JF Jr, Savage SA, Bertazzi PA, Tucker MA, Chanock S, Caporaso NE. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009;85:679–691.

73. Liu NS, Spitz MR, Kemp BL, Cooksley C, Fossella FV, Lee JS, Hong WK, Khuri FR. Adenocarcinoma of the lung in young patients: the M.D. Anderson experience. *Cancer*. 2000;88(8):1837–1841.
74. Liu, B., Y. Chen, D.K. St Clair, ROS and p53: versatile partnership, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (8) (2008) 1529–1535.
75. Long BH, Musial ST, Brattain MG. Comparison of cytotoxicity and DNA breakage activity of congeners of podophyllotoxin including VP16-213 and VM26: a quantitative structure-activity relationship. *Biochemistry* 1984;23(6):1183–1188.
76. Long BH, Musial ST, Brattain MG. Single- and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide. *Cancer Res* 1985;45(7):3106–3112.
77. Lopaczynski W, Zeisel SH (2001): Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res* 21:295–307.
78. Maede Y, Shimizu H, Fukushima T, Kogame T, Nakamura T, Miki T, Takeda S, Pommier Y, Murai J. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drug in a genetic DT40 repair screen panel. *Mol Cancer Ther* 2014;13(1):214–220.
79. Magder, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?, *Crit. Care* 10 (1) (2006) 208.
80. Martens-de Kemp SR, Dalm SU, Wijnolts FM, Brink A, Honeywell RJ, Peters GJ, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. DNA-bound platinum is the major determinant of cisplatin sensitivity in head and neck squamous carcinoma cells. *PLoS One* 2013;8:e61555.
81. Mendelsohn, A.R., J.W. Larrick, Paradoxical effects of antioxidants on cancer, *Rejuvenation Res.* 17 (3) (2014) 306–311.
82. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 2006;17:v7–v12.

83. Moloney JN, Cotter TG. ROS signaling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 80: 50-64.
84. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K (2001): Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer Lett* 169:115–120.
85. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* 417 (1) (2009) 1–13.
86. Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:7311–8.
87. Nitiss J, Wang JC. DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(20):7501–7505.
88. Nogales E. Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:397–420.
89. Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, Bepler G. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest.* 2004;126(2):347–351.
90. Ohe Y (2004): Chemoradiotherapy for lung cancer: current status and perspectives. *Int J Clin Oncol* 9:435–443.
91. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(36):13306–13311.
92. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS.* 2008;4(2):89-96.

93. Phillips DH, Hewer A, Martin CN, Garner RC, King MM. Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature* 1988;336:790–792.
94. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 2010;17(5):421–433.
95. Pommier Y, Zwelling LA, Mattern MR, Erickson LC, Kerrigan D, Schwartz R, Kohn KW. Effects of dimethyl sulfoxide and thiourea upon intercalator-induced DNA single-strand breaks in mouse leukemia (L1210) cells. *Cancer Res* 1983;43(12 Pt 1):5718–5724.
96. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol* 2013;8(1):82–95.
97. Posther KE, Harpole DH Jr (2006): The surgical management of lung cancer. *Cancer Invest* 24:56–67.
98. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, et al. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Patz EF Jr, Yokomise H; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:686–693.
99. Qiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD, et al. Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *Journal of National Cancer Institute* 2009;101:507–18.
100. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, Xun WW, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Sommar J, Forsberg B, Modig L, Oudin A, Oftedal B, Schwarze PE, Nafstad P, De Faire U, Pedersen NL,

- Ostenson CG, Fratiglioni L, Penell J, Korek M, Pershagen G, Eriksen KT, Sørensen M, Tjønneland A, Ellermann T, Eeftens M, Peeters PH, Meliefste K, Wang M, Bueno-de-Mesquita B, Key TJ, de Hoogh K, Concin H, Nagel G, Vilier A, Grioni S, Krogh V, Tsai MY, Ricceri F, Sacerdote C, Galassi C, Migliore E, Ranzi A, Cesaroni G, Badaloni C, Forastiere F, Tamayo I, Amiano P, Dorronsoro M, Trichopoulou A, Bamia C, Vineis P, Hoek G. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):813-22.
101. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, Tsuboi M, Vallières E, Goldstraw P; International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:593–602.
102. Re R(1), Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26 (9-10):1231-7.
103. Reiter A, Hochhaus A, Berger U, Kuhn C, Hehlmann R. AraC-based pharmacotherapy of chronic myeloid leukaemia. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:1129–1135.
104. Rivera-Fillat MP, Pallarés-Trujillo J, Domènech C, Grau-Oliete MR (1988): Comparative uptake, retention and action of vincristine, vinblastine and vindesine on murine leukaemic lymphoblasts sensitive and resistant to vincristine. *Br J Pharmacol* 93:902–908.
105. Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, Schwartz AG, Vahakangas KH, Samet JM. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5646–5661.

106. Rudin CM, Avila-Tang E, Samet JM. Lung Cancer in Never Smokers: A Call to Action. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(18):5622-5625.
107. Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, Goldstraw P, Im JG, Tsuboi M, Tsuchiya R, Vansteenkiste J; International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:603–612.
108. Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res*. 1994;54(22):5801–5803.
109. Saif MW, Sellers S, Li M, Wang W, Cusimano L, Wang H, Zhang R. A phase I study of bi-weekly administration of 24-h gemcitabine followed by 24-h irinotecan in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60:871–882.
110. Saydam N, Kirb A, Demir O, Hazan E, Oto O, Saydam O, et al. Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Letters* 1997; 119:13–9.
111. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277:665–667.
112. Schiller JH (2001): Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Oncology* 61:3–13.
113. Schlaifer D, Cooper MR, Attal M, Rousseau A, Pris J, Laurent G, Myers CE (1994): Potential strategies for circumventing myeloperoxidase-catalyzed degradation of vinca alkaloids. *Leukemia* 8:668–671.
114. Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, et al. Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, Shaikh Z, Goldstraw P;

- International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:1067–1077.
115. Sher T, Dy GK, Adjei AA (2008): Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc* 83:355–367
116. Sherva R, Wilhelmsen K, Pomerleau CS, Chasse SA, Rice JP, Snedecor SM, Bierut LJ, Neuman RJ, Pomerleau OF. Association of a single nucleotide polymorphism in neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 5 (CHRNA5) with smoking status and with ‘pleasurable buzz’ during early experimentation with smoking. *Addiction* 2008;103:1544–1552.
117. Sheu CC, Ye Y, de Andrade M, Wang L, Chang SC, Aubry MC, Aakre JA, Allen MS, Chen F, Cunningham JM, Deschamps C, Jiang R, Lin J, Marks RS, Pankratz VS, Su L, Li Y, Sun Z, Tang H, Vasmatazis G, Harris CC, Spitz MR, Jen J, Wang R, Zhang ZF, Christiani DC, Wu X, Yang P. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol.* 2010;11(4):321–330.
118. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:13568–73
119. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(5):339–346.

120. Shimizu H, Tominaga S, Nishimura M, Urata A. Comparison of clinico-epidemiological features of lung cancer patients with and without a history of smoking. *Jpn J Clin Oncol*. 1984;14(4):595–600.
121. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61(4):212–36.
122. Simon GR, Turrisi A; (2007): Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132:324S–339S
123. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N (2000): Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207:77–86.
124. Slatore CG, Chien JW, Au DH, Satia JA, White E. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1540–1546.
125. Sorenson C, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 1988;48:4484–4488.
126. Spitz MR, Etzel CJ, Dong Q, Amos CI, Wei Q, Wu X, Hong WK An expanded risk prediction model for lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008;1(4):250–254.
127. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, Shete S, Etzel CJ. A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(9):715–726.
128. Stupp R, Monnerat C, Turrisi AT 3rd, Perry MC, Leyvraz S (2004): Small cell lung cancer: state of the art and future perspectives. *Lung Cancer* 45:105–117.

129. Subramaniam S, Subramaniam S, Shyamala Devi CS (1994): Erythrocyte antioxidant enzyme activity in CMF treated breast cancer patients. *Cancer Biochem Biophys* 14:177–182.
130. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):778-90. Review
131. Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T, Takahashi T. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1679–1688.
132. Takimoto CH, Calvo E. "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" in Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 11 ed. 2008.
133. Tanoue LT (2008): Staging of non-small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 29:248–260.
134. Teoh-Fitzgerald ML, Fitzgerald MP, Zhong W, Askeland RW, Domann FE. Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation, tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2014;33:358–68
135. Therond P. Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr*. 2006 Nov;64(6):383-9. Review. French.
136. Thomas, C., M.M. Mackey, A.A. Diaz, D.P. Cox, Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation, *Redox Rep*. 14 (3) (2009) 102–108.
137. Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, Hsu AA, Eng P, Koong HN, Thirugnanam A, Tan EH. Never-smokers with lung cancer:

- epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2245–2251.
138. Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, Hsu AA, Eng P, Koong HN, Thirugnanam A, Tan EH. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2245–2251.
139. Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, Jett J, Kennedy C, Rami-Porta R, Rusch VW, Goldstraw P; International Staging Committee and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of broncho-pulmonary carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2008;3:1213–1223.
140. Truong T, Hung RJ, Amos CI, Wu X, Bickeböller H, Rosenberger A, Sauter W, Illig T, Wichmann HE, Risch A, Dienemann H, Kaaks R, Yang P, Jiang R, Wiencke JK, Wrensch M, Hansen H, Kelsey KT, Matsuo K, Tajima K, Schwartz AG, Wenzlaff A, Seow A, Ying C, Staratschek-Jox A, Nürnberg P, Stoelben E, Wolf J, Lazarus P, Muscat JE, Gallagher CJ, Zienolddiny S, Haugen A, van der Heijden HF, Kiemeny LA, Isla D, Mayordomo JI, Rafnar T, Stefansson K, Zhang ZF, Chang SC, Kim JH, Hong YC, Duell EJ, Andrew AS, Lejbkowitz F, Rennert G, Müller H, Brenner H, Le Marchand L, Benhamou S, Bouchardy C, Teare MD, Xue X, McLaughlin J, Liu G, McKay JD, Brennan P, Spitz MR. Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:959–971.
141. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003;21:2636–2644.

142. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK, West DW. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):472–478.
143. Weinberg F, Chandel NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009;66:3663–73.
144. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Santer SK, Schwartz DR, Schwartz AG. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26(12):2207–2212.
145. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Schwartz AG GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):395–401.
146. Wiencke JK, Thurston SW, Kelsey KT, Varkonyi A, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC. Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:614–619.
147. Wu PF, Lee CH, Wang MJ, Goggins WB, Chiang TA, Huang MS, Ko YC. Cancer aggregation and complex segregation analysis of families with female non-smoking lung cancer probands in Taiwan. *Eur J Cancer*. 2004;40(2):260–266.
148. Yang P. Lung cancer in never smokers. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(1):10-21. Review.
149. Zhang W, Shu XO, Li H, Yang G, Cai H, Ji BT, et al. Vitamin intake and liver cancer risk: a report from two cohort studies in China. *Journal of National Cancer Institute* 2012;104:1173–81.
150. Zhu G, Song L, Lippard SJ. Visualizing inhibition of nucleosome mobility and transcription by cisplatin-DNA interstrand crosslinks in live mammalian cells. *Cancer Res* 2013;73:4451–4460.

151. Zhu G, Song L, Lippard SJ. Visualizing inhibition of nucleosome mobility and transcription by cisplatin-DNA interstrand crosslinks in live mammalian cells. *Cancer Res* 2013;73:4451–4460.
152. Н. Цветков, П. Бочев Свободно-радикални увреждания и перспективи на антиоксидантната профилактика и терапия 1995 ISBN 954-8627-17-5.