

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARCEL KLEMENČIČ

**UGOTAVLJANJE PROTEKTIVNOSTI FULERENOLA *IN VIVO* PRI KRONIČNI  
NEFROPATJI V TERAPIJI MALIGNIH NEOPLAZEM Z DOKSORUBICINOM  
PRI PODGANAH**

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF FULLERENOL *IN VIVO* IN  
CHRONIC NEPHROPATHY DURING DOXORUBICINE THERAPY OF  
MALIGN NEOPLASMA IN RATS**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom doc. dr. Rada Injca.

#### ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se zahvalil mentorju prof. dr. Borutu Štruklju in vsem, ki so kakorkoli pripomogli k izdelavi diplomske naloge. Posebno zahvalo pa bi namenil svojemu somentorju doc. dr. Radu Injcu za vsestransko pomoč, preživete dneve v laboratoriju in za ažurnost pri vsakršnem problemu. Hvala, brez vas mi ne bi uspelo!

#### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod delovnim mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom doc. dr. Rada Injca.

Ljubljana, februar 2011

Marcel Klemenčič

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš

# VSEBINA

<b>POVZETEK .....</b>	<b>1</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>2</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. DOKSORUBICIN .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. SPLOŠNO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2. PRIPRAVKI .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3. FARMAKOKINETIKA IN ODMERJANJE .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.4. TOKSIČNOST .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. TOKSIČNOST DOKSORUBICINA.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1. MEHANIZEM TOKSIČNOSTI.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.1. Vpliv na topoizomerozo II in DNA.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.2. Nastanek kisikovih radikalov .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. VRSTE TOKSIČNOSTI.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2.1. Kardiotoksičnost.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2.2. Hepatotoksičnost .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2.3. Pulmotoksičnost.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2.4. Nefrotoksičnost .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. ZAŠČITA PRED TOKSIČNOSTJO, POVZROČENO Z DOKSORUBICINOM.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1. NARAVNE SPOJINE.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2. ZDRAVILNE UČINKOVINE.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.3. DRUGI PRISTOPI.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3.1. Fizična aktivnost in prehrana .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3.2. Dostavni sistemi .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. FULERENOL .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1. OPIS FULERENOLA.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1.1. Fuleren in fulerenol kot njegov derivat.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1.2. Sinteza fulerenola <math>C_{60}(OH)_{24}</math>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.1.3. Biološko aktivni derivati fulerena .....</b>	<b>20</b>

1.4.1.4.	Študije (in vitro/in vivo) .....	21
1.4.1.5.	Potencialna terapevtska uporaba derivata fulerena.....	22
1.4.2.	FULERENOL KOT ANTIOKSIDANT .....	23
2	NAMEN DELA.....	25
3	MATERIALI IN METODE.....	26
3.1.	PRIPRAVA IN APLIKACIJA C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub> , DOKSORUBICINA IN VITAMINA C.....	26
3.2.	KEMIJSKA POVZROČITEV KOLOREKTALNIH TUMORJEV .....	28
3.3.	KOEFICIENT TEŽE LEDVIC .....	29
3.4.	OCENA PROTEKTIVNIH UČINKOV C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub> NA LEDVICE .....	29
3.5.	REAKCIJI DOKAZOVANJA SEČNINE IN KREATININA, SHEMA OKSIDATIVNEGA STRESA.....	30
3.6.	STATISTIČNA ANALIZA .....	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	32
4.1.	MAKROSKOPSE SPREMEMBE.....	32
4.2.	TUMORJI.....	34
4.3.	HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN AKTIVNOST SERUMSKIH ENCIMOV .....	35
4.4.	OKSIDATIVNI STATUS .....	39
4.5.	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV OZIROMA ZDRAVILNIH UČINKOVIN PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA NA LEDVICE.....	44
5	SKLEP .....	48
6	LITERATURA .....	49
7	ŽIVLJENJEPIS.....	53

## POVZETEK

Proučili smo učinke fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  v odmerkih 25, 50 in 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov na ledvično tkivo podgan s kolorektalnim rakom. Poskuse smo izvedli *in vivo* na modelu podgan samcev vrste *Wistar* in proučili, ali lahko fulerenol prepreči nastanek kroničnih nefrotoksičnosti, povzročenih z doksorubicinom v odmerku 1,5 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Rezultate smo primerjali z učinki dobro poznanega antioksidanta askorbinske kisline (vitamina C – 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov). Na podlagi rezultatov makroskopskih, hematoloških in biokemijskih raziskav lahko zaključimo, da ima fulerenol v vseh preiskovanih odmerkih zaščitne učinke na ledvično tkivo pri toksičnosti, inducirani z doksorubicinom.

## ABSTRACT

The effects of fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$  at doses of 25, 50, and 100 mg/kg/week (for a time span of three weeks) on kidney tissue after doxorubicin-induced toxicity in rats with colorectal cancer were investigated. In the present study, we used an *in vivo Wistar* male rat model to explore whether fullereneol could protect against Dox-induced (1.5 mg/kg/week for three weeks) chronic nephrotoxicity and compared the effect with a well known antioxidant ascorbic acid (vitamin C – 100 mg/kg/week for three weeks). According to macroscopic, hematological, and biochemical results, we confirmed that, at all examined doses, fullereneol exhibits a protective influence on the kidney tissue against chronic toxicity induced by doxorubicin.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ACE	angiotenzinska konvertaza
ALT	alaninska aminotransferaza
AST	aspartatna aminotransferaza
ATP	adenozin trifosfat
CAPE	fenetilni ester kavne kisline
CAT	katalaza
CK	kreatinska kinaza
DMH	1,2 dimetilhidrazin
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilen diamin tetraacetna kislina
G-6-P	glukoza-6-fosfat
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GSH-Px	glutationska peroksidaza
GSSG	oksidirani glutation
GST	glutationska S-transferaza
HRP	hrenova peroksidaza
Hsp72	stresni protein
KSP	kongestivno srčno popuščanje
LAF	laminarni pretok zraka
LDH	laktatna dehidrogenaza
LPO	lipooksigenaza
MDA	malondialdehid
MnSOD	mangan superoksidna dismutaza
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
mtDNA	mitohondrijska DNA
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADP <sup>+</sup>	oksidiran nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

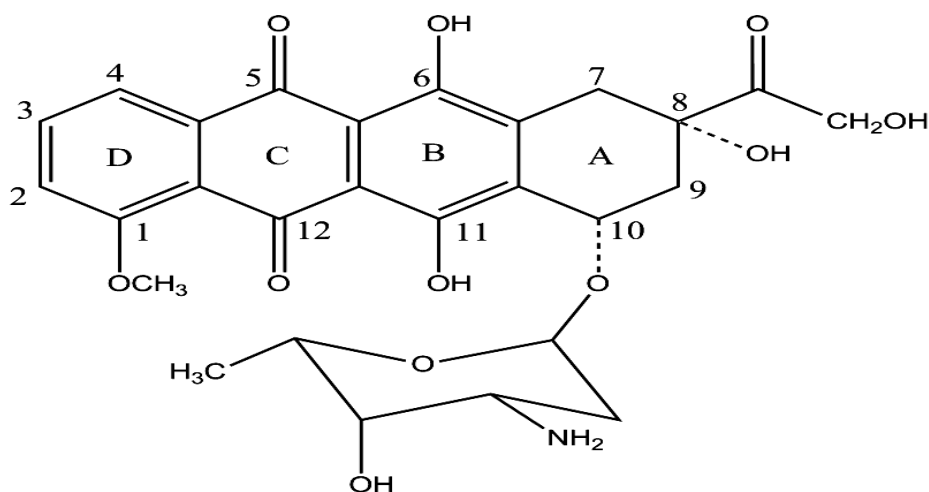
NADPH	reduciran nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NO	dušikov oksid
NOS	dušikov oksid sintaza
P450	citokrom P450
PHS	prostaglandinska H sintaza
RKS	reaktivne kisikove spojine
SCr	serumski kreatinin
SOD	superoksidna dismutaza
TBA	tiobarbiturna kislina
TP	skupna koncentracija proteinov
$\alpha$ -HBDH	alfa hidroksibutiratna dehidrogenaza

# 1 UVOD

## 1.1. DOKSORUBICIN

### 1.1.1. SPLOŠNO

Doksorubicin (*Slika 1*) je bil odkrit v začetku šestdesetih let 20. stoletja in je pomenil napredek v boju proti raku. Izolirali so ga leta 1969 iz vrste *S. peuceiticus var caesius*. Leta 1974 je bil odobren kot zdravilo proti raku in od takrat je eden najbolj razširjenih kemoterapevtikov po vsem svetu. Uvrščamo ga med antraciklinske antibiotike, uporablja se v terapiji mnogih malignih obolenj, saj izkazuje širok spekter antitumorske aktivnosti. Najpogosteje se uporablja pri zdravljenju različnih vrst karcinomov (pljuč, dojka, maternice, jajčnikov), Hodgkinove bolezni, sarkomov mehkih tkiv in pri zdravljenju nekaterih drugih vrst karcinomov (1-3).



**Slika 1:** Struktura doksorubicina (Adriamicina) ((8*S*,10*S*)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoks- $\alpha$ -*L*-iloksoheksopiranozil)oksi]-6,8,11-trihidroksi-8-(hidroksiacetil)-1-metoksi-7,8,9,10-tetrahidrotetracen-5,12-dion).

Doksorubicin deluje tako, da generira nastajanje kisikovih radikalov, inhibira topozomerozo II in se kovalentno veže na molekulo dezoksiribonukleinske kisline (DNA). Topozomeroza II je encim, ki pomaga regulirati strukturo DNA. Zaradi interakcije z DNA pride do inhibicije popravljalnih mehanizmov DNA, njenega nepravilnega zvitja, inhibicije podvojevanja dvojne vijačnice in prepisa DNA v informacijsko ribonukleinsko kislino (mRNK). Produkcija makromolekul v rakavi celici je spremenjena, kar vodi v aktivacijo apoptotičnih mehanizmov oziroma do celične smrti (3,4).



Zaradi njegovih akutnih in kroničnih neželenih učinkov je klinična uporabnost doksorubicina omejena. Najprej se pokažejo poškodbe miokarda, ki so odvisne od odmerka. Z zmanjšanjem odmerka se zmanjša njegova kardiotsičnost, prav tako pa tudi njegova antitumorna aktivnost. Poleg kardiotsičnosti izkazuje toksičnost do ledvic, jeter možgan, pljuč, skeletnih mišic, krvnih celic in testisov (1,3).

### 1.1.2. PRIPRAVKI

Antraciklinski antibiotiki se slabo absorbirajo iz črevesja, zato se aplicirajo intravensko v obliki infuzije ali počasne injekcije s hkratno infuzijo fiziološke raztopine. Pri injiciranju je potrebna previdnost, da ne pride do ektravazacije, ki povzroči lokalno nekrozo tkiva.

Pripravki doksorubicina se metabolizirajo v jetrih, kjer se delno pretvorijo v doksorubicinol, ki se presnavlja naprej in se večinoma izloča z žolčem (3,5,6). Pripravki, ki so registrirani na slovenskem trgu, so predstavljeni v preglednici 1 (3).

*Preglednica 1: Na slovenskem trgu registrirane farmacevtske oblike doksorubicina.*

Naziv zdravila	Proizvajalec
ADRIPLASTINA 10 mg raztopina za injiciranje	Pfizer Luxemburg (Pfizer Luxemburg)
ADRIPLASTINA 50 mg raztopina za injiciranje	Pfizer Luxemburg (Pfizer Luxemburg)
CP CAELYX 2 mg/ml koncentrat za pripravo raztopine za infundiranje	Schering – Plough Labo (Schering Plough Labo)
DOXORUBICIN EBEWE 2 mg/ml koncentrat za raztopino za infundiranje	EBEWE Pharma (EBEWE Pharma)
DOXORUBICIN PLIVA prašek za raztopino za injiciranje/infundiranje 10 mg	Pliva Predst. (Pliva Lachema/Pliva)
DOXORUBICIN PLIVA prašek za raztopino za injiciranje/infundiranje 50 mg	Pliva Predst. (Pliva Lachema/Pliva)
DOXORUBIN 2 mg/ml	Emporio Medical d.o.o. (Teva Ltd)

### 1.1.3. FARMAKOKINETIKA IN ODMERJANJE

Doksorubicin se po intravenskem injiciranju hitro veže na plazemske proteine, dobro prodira v tkiva in se tam zadržuje tudi po več dni (7). Zaradi hitrega privzema v tkiva znaša začetna razpolovna doba okoli 5 min, medtem ko je končni razpolovni čas od 20 do 48 ur posledica počasnega izločanja iz tkiv. Volumen distribucije v stanju dinamičnega ravnovesja znaša od 809 do 1214 l/m<sup>2</sup>, kar kaže na obsežni privzem učinkovine v tkiva, hematoencefalne bariere pa ne prehaja. Odstotek vezave doksorubicina in njegovega glavnega presnovka doksorubicinola na plazemske proteine je neodvisen od koncentracije doksorubicina v plazmi do 1,1 µg/ml in znaša od 74 do 76 %. Poleg vezave na plazemske proteine se oba izločata v mleko. Plazemski očistek znaša od 324 do 809 ml/min/m<sup>2</sup> in je pretežno posledica presnove in izločanja z žolčem. V petih dneh se v žolču pojavi približno 40 % odmerka, medtem ko se v urinu pojavi v istem časovnem obdobju le za 5 do 12 % učinkovine in njenih presnovkov. Prav tako se v urinu v več kot 7 dneh pojavi manj kot 3 % celotnega odmerka v obliki doksorubicinola. Teža pacienta vpliva na sistemski očistek, ki se zmanjša, če je njegova teža večja od 115 % idealne teže. V monoterapiji je najpogosteje uporabljen odmerek od 60 do 75 mg/m<sup>2</sup> v obliki enkratne intravenozne injekcije, v časovnem intervalu 21 dni. Pri pacientih z nezadostno rezervo kostnega mozga in hiperbilirubinemijo je potrebno odmerke temu primerno zmanjšati (6). Doksorubicin se uporablja sočasno z drugimi odobrenimi kemoterapevtiki in steroidnimi zdravili (*Preglednica 2*) (3).

**Preglednica 2:** Kombinacije doksorubicina in drugih učinkovin pri zdravljenju različnih vrst raka.

<b>Doksorubicin plus</b>	<b>Indikacija</b>
Docetaksel	Rak na dojki
Ciklofosamid/ vinkristin	Pljučni rak
Vinkristin/ prednizolon/ etopozid/ ciklofosamid/ bleomicin	Ne-Hodgkinov limfom
Docetaksel/ ciklofosamid	Rak na dojki
Bleomicin/ vinblastin/ dakarbazin	Hodgkinov limfom
Vinkristin/ prednizolon	Akutna limfoblastna levkemija

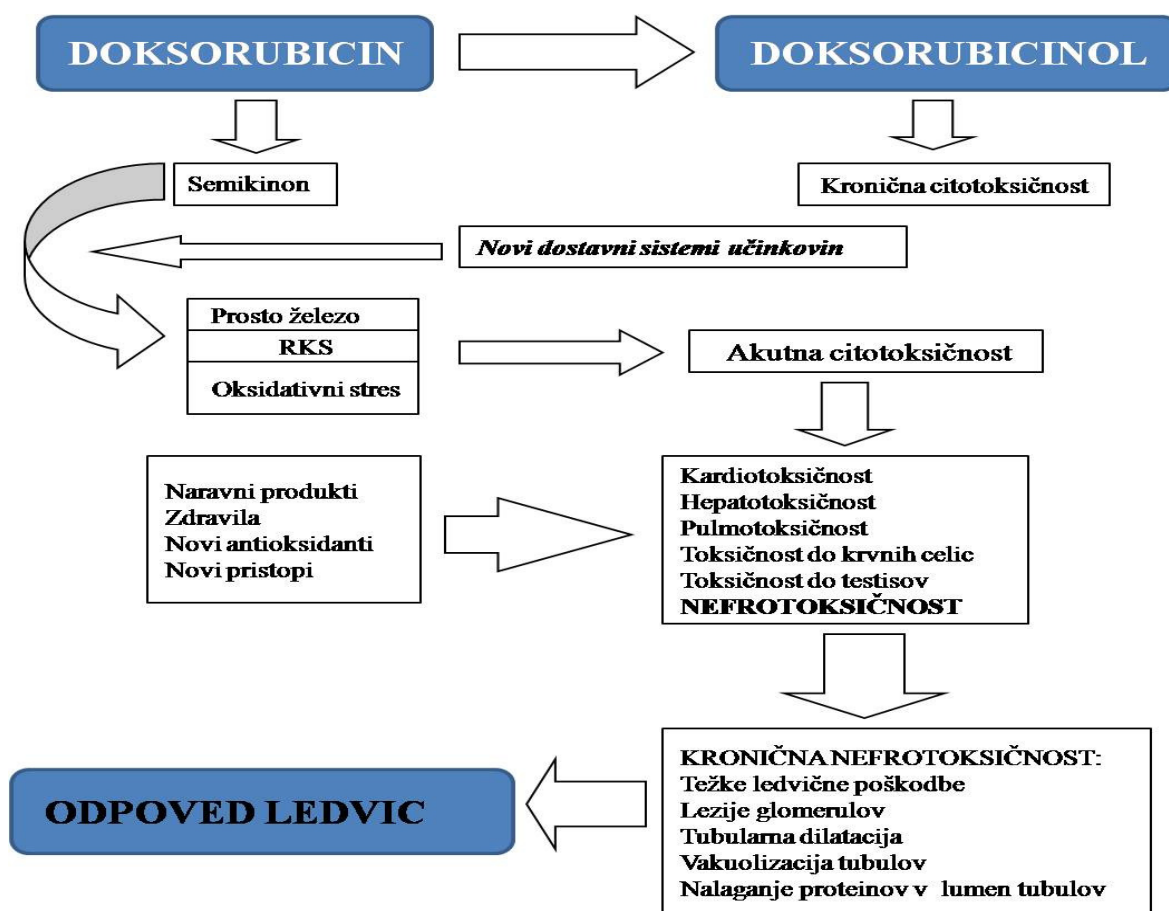
Fluorouracil/cisplatin	Rak na želodcu
Vinkristin/ prednizolon/ etopozid/ ciklofosfamid/ bleomicin/ vinblastin	Hodgkinov limfom
Ciklofosfamid/ vinkristin/ prokarbazin/ prednizon/ gemcitabin/ bleomicin	Hodgkinov limfom
Vinkristin/ deksametazon	Multipli mielom
Liposomska oblika	Rak na jajčnikih
Vinkristin/ prednizolon/ etopozid/ ciklofosfamid/ bleomicin/ prokarbazin	Hodgkinov limfom

Dokazano je, da so pri nekaterih vrstah kemoterapije neoplastičnih bolezni, kombinacije učinkovin boljše od uporabe ene same učinkovine, vendar koristi in tveganja takšne terapije še niso pojasnjeni. V kombinacijah z drugimi zdravili najpogosteje uporabljamo odmerek doksorubicina od 40 do 60 mg/m<sup>2</sup> v obliki enkratne intravenozne injekcije na 21 do 28 dni (6).

#### 1.1.4. TOKSIČNOST

Doksorubicin povzroča vrsto toksičnosti, tako akutnih kot kroničnih. Posledice akutne toksičnosti so mielosupersija, bruhanje, slabost, izguba las in mukozitis. Najresnejše neželene učinke pripisujemo kardiotoksičnosti, ki lahko pripelje do kongestivnega srčnega popuščanja (KSP). Kardiotoksičnost je odvisna od odmerka in se pojavlja v treh oblikah; akutni, subakutni in kronični. Z večanjem kumulativnega odmerka se povečuje odstotek ljudi s KSP. Pri kumulativnem odmerku 400 mg/m<sup>2</sup> ima 5 % pacientov dokazano KSP, pri kumulativnem odmerku 550 mg/m<sup>2</sup> je takih pacientov 26 %, pri odmerku 700 mg/m<sup>2</sup> pa jih je že 48 % (8). Oksidativni stres (*Slika 13*) in nastanek radikalov igrata ključno vlogo pri mehanizmu toksičnosti (1). Poznana sta dva različna mehanizma nastanka radikalov, encimski preko kinonske strukture in neencimski, ki vključuje železove ione. Motnje v ravnotežju oksidanti-antioksidanti privedejo do lipidne peroksidacije in oksidacije proteinov, kar vodi v poškodbe tkiva in različnih organov v telesu. Številne študije so pokazale, da je kombinacija vnetnega procesa, radikalov, oksidativnega stresa in lipidne peroksidacije pogosto povezana z okvaro jeter. Strategija za zmanjšanje toksičnosti,

povzročene z doksorubicinom, je v optimizaciji odmerka, sintezi in uporabi analogov ter kombinirano zdravljenje z antioksidanti (1).



Slika 2: Toksičnost doksorubicina in njegovi protektivi.

## 1.2. TOKSIČNOST DOKSORUBICINA

### 1.2.1. MEHANIZEM TOKSIČNOSTI

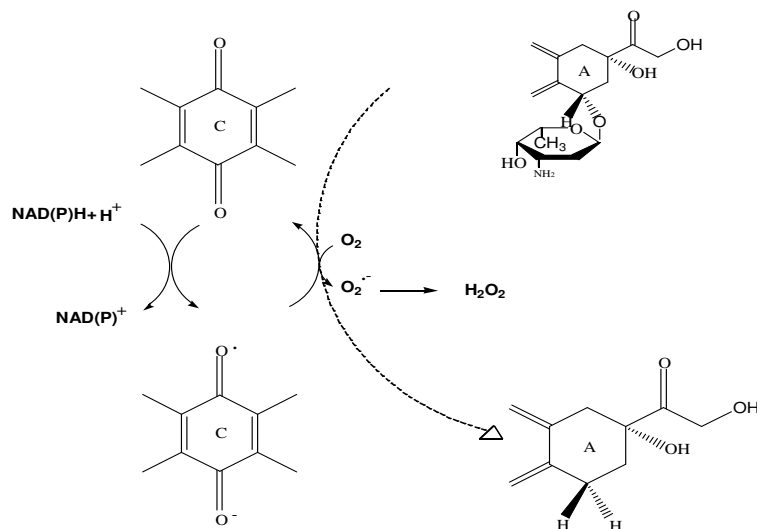
#### 1.2.1.1. Vpliv na topoizomerozo II in DNA

DNA giraza je encim, ki ima ključno vlogo pri DNA replikaciji, delimo pa ga na topoizomerozo I ter topoizomerozo II. Topoizomeroza I spremeni topologijo DNA tako, da prekine in ponovno združi eno verigo v DNA. Topoizomeroza II, ki ima nekatere značilnosti bakterijske giraze, omogoči odvitje dvojne verige DNA s prehodnim prelomom tako, da med podvajanjem hkrati cepi obe verigi matrične dvojne vijačnice. Pri doksorubicinu je bilo ugotovljeno, da se z vrivanjem njegovih kromoforov v DNA le-ta navzkrižno poveže, poleg tega pa povzroči kovalentno povezavo med DNA in proteinom,

za katerega so kasneje ugotovili, da gre za encim topoizomerazo II. Pride do inhibicije topoizomeraze II in do nastanka poškodb DNA, aktivirajo se apoptotični mehanizmi, sledi celična smrt (4,9).

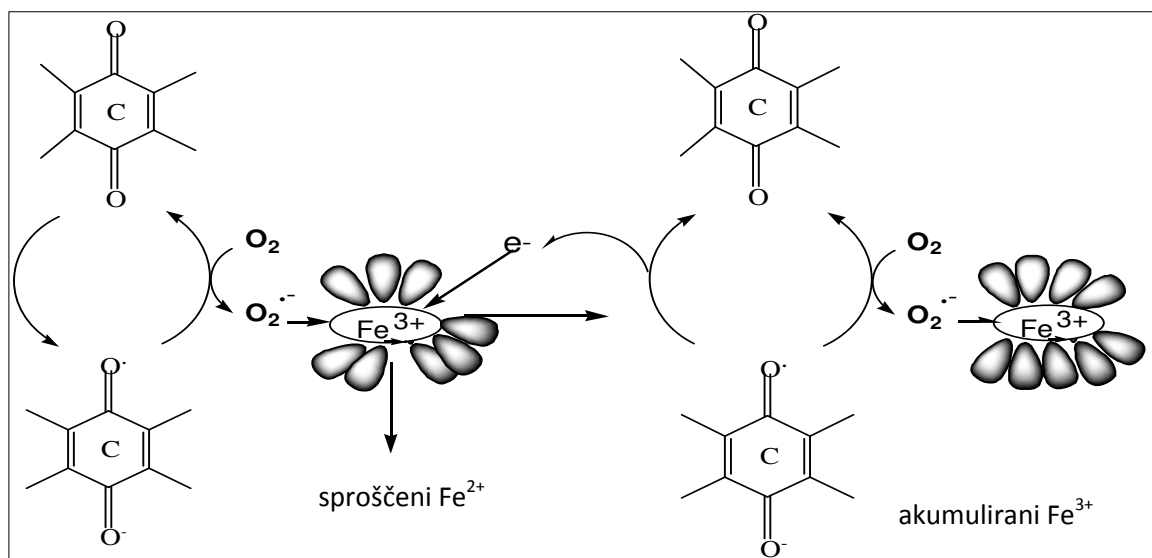
### 1.2.1.2. Nastanek kisikovih radikalov

- Semikinon nastane s pripetjem elektrona h kinonski strukturi obroča C (Slika 1) in hitro preide nazaj v kinon, z oksidacijo kisika pa v hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoksidni anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) in vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pri tem sodelujejo številne NAD(P)H oksidoreduktaze: ksantin dehidrogenaze, citokrom P450 ali  $b_5$  reduktaze, endotelne NO sintaze, mitohondrijske NADH dehidrogenaze. V primeru oksidacije vezi med daunozaminom in obročem A pride do deglikozidacije z nastankom 7-deoksiaglikona (Slika 3). Aglikoni se vgradijo v biološke membrane zaradi povečane topnosti v lipidih in v bližini občutljivih lipidnih struktur tvorijo reaktivne kisikove spojine (RKS) (3).



Slika 3: Oksidacijsko-redukcijske reakcije doksorubicina.

- Neencimski nastanek kisikovih radikalov pri doksorubicinu vključuje reakcije z železovimi ioni, ki se sproščajo iz feritina. Prosti železovi ioni ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in doksorubicin tvorijo kompleks  $\text{Fe}^{3+}$ :doksorubicin = 1:3. Kompleks doksorubicin-železo lahko reducira kisik do njegovih reaktivnih oblik in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , posledica pa so oksidativne poškodbe tkiv (Slika 4) (3).



**Slika 4:** Reakcija doksorubicina s prostimi železovimi ioni.

Doksorubicin s temi mehanizmi uničuje rakave celice, poleg njih pa prizadene tudi normalne netransformirane celice zato zdravljenje poteka v več ciklikih in obdobjih mirovanja, ki so namenjena regeneraciji organizma. Celice prebavnega trakta, lasnih mešičkov, kostnega mozga ter spermiji so na kemoterapijo najbolj občutljivi. Normalne celice se hitro obnavljajo, zato so neželeni učinki kemoterapije prisotni le kratek čas (3).

## 1.2.2. VRSTE TOKSIČNOSTI

### 1.2.2.1. Kardiotoksičnost

Doksorubicin lahko povzroči tako akutno kot kronično kardiotoksičnost. Pri akutni kardiotoksičnosti pride do hipotenzije, aritmij, oksidativnih poškodb tkiva in aktivnosti določenih bioloških označevalcev, pri kronični pa do dilatacijske kardiomiopatije ter KSP. Miokard ima slabše antioksidantne zaščitne mehanizme od drugih tkiv, zato je bolj podvržen poškodbam. Ključno vlogo pri mehanizmu kardiotoksičnosti doksorubicina ima nastanek radikalov, ki poškodujejo mitohondrije. Nastanek oksidativnega stresa je mogoče razložiti s kemično strukturo doksorubicina, ki je nagnjen h generiranju RKS. *In vitro* raziskave so pokazale, da sta tako znotrajcelična koncentracija kot tudi koncentracija znotraj mitohondrija skoraj dvakrat večji od zunajcelične koncentracije doksorubicina, zato so mitohondriji bolj izpostavljeni okvaram (10). Radikali so odgovorni tudi za peroksidacijo celične membrane in endoplazmatskega retikuluma. Kompleks doksorubicin- $\text{Fe}^{3+}$  ima veliko afiniteto do kardiolipina, fosfolipida, ki je del membrane

sarkoplazemskega retikuluma in mitohondrija, s čimer je motena oksidativna fosforilacija v mitohondrijih. Poškodba transportnega mehanizma za  $\text{Ca}^{2+}$  ione je posledica motene homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v miokardu. Povečana količina  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v celici privede do pomanjkanja adenozin trifosfata (ATP), disfunkcije mitohondrijev, motnje kontraktlnosti miokarda in celične smrti (7).

#### 1.2.2.2. Hepatotoksičnost

Neželene učinke pri zdravljenju z doksorubicinom, ki se presnavlja v jetrih, opazamo že po enkratnem odmerku v obliki trajnih poškodb jeter in povečanja apoptotskih procesov. Doksorubicin deluje preko generiranja radikalov, spremembe membranske funkcije in z vrivanjem med DNA. Po njegovi aplikaciji kmalu zaznamo povečanje bilirubina, aspartatne aminotransferaze (AST) in alaninske aminotransferaze (ALT) v plazmi, pri biopsiji jeter pa opazimo steatozo in žarišče infiltracije vnetnih celic. Terapevtski odmerki doksorubicina povečujejo lipidno peroksidacijo v jetrnih mitohondrijih in mikrosomih, še posebej v prisotnosti  $\text{Fe}^{3+}$  ionov. Pride do steatoze, kontaktne poškodbe na hepatocitih, žilne poškodbe ter kopičenja maščobnih kapljic v jetrih. Jetra imajo določeno antioksidantno kapaciteto, ki je odvisna od koncentracije glutationa. Večja kot je antioksidantna kapaciteta, manjše so z radikali povzročene poškodbe jeter (1,4,11).

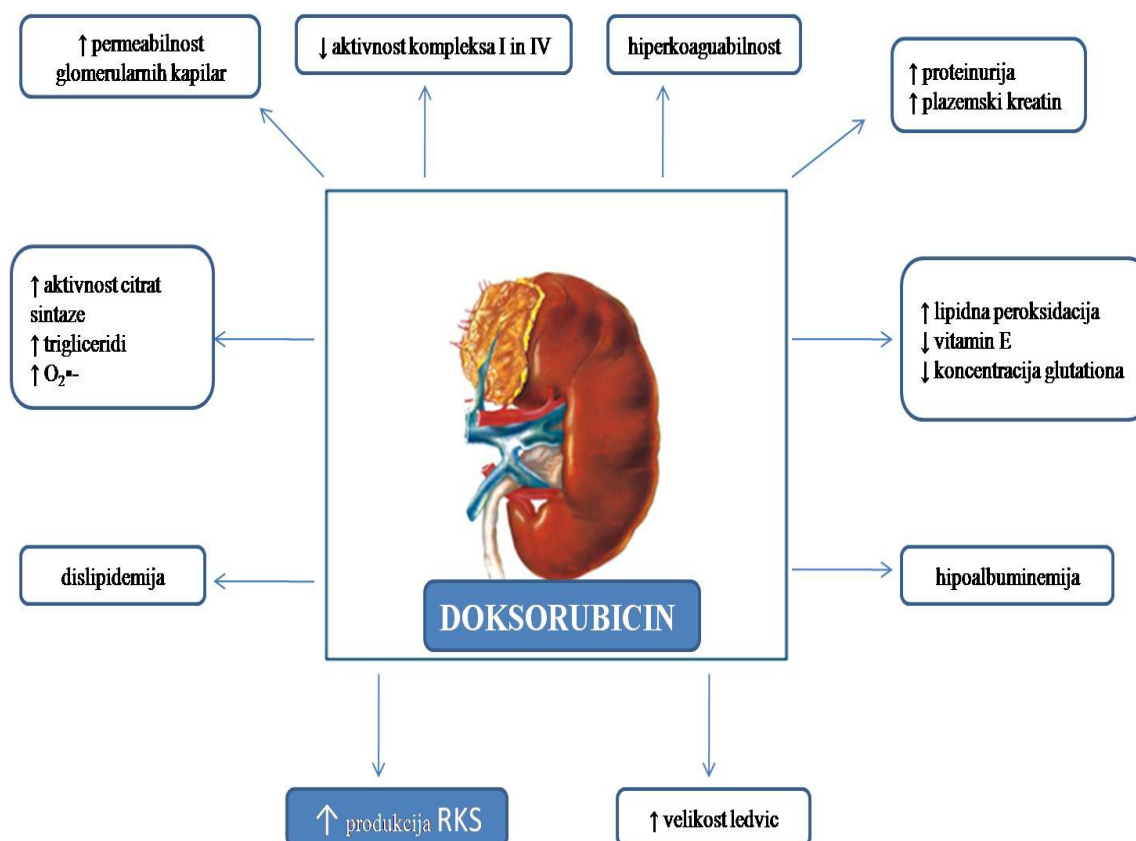
#### 1.2.2.3. Pulmotoksičnost

Encimi, ki so običajno prisotni v tkivih in nevtralizirajo RKS, so inhibirani s strani doksorubicina. Glavni razlog poškodb pljuč je porušeno ravnotežje med oksidanti in antioksidanti, ki privede do oksidacije proteinov in peroksidacije lipidov v pljučnem tkivu. Poškodbe pljuč, ki so posledica okoljskih toksinov in agensov iz zraka, so pojasnjene s povišano koncentracijo celičnih radikalov in z vnetnimi procesi. Med samim vnetnim procesom fagociti generirajo RKS, zato je njihova koncentracija takrat še povečana. RKS povzročajo številne bolezni pljuč, vključno s tistimi, povezanimi z izpostavljenostjo ozonu, azbestu, parakvatu, dušikovemu dioksidu in zdravilom proti raku, kot sta doksorubicin in bleomicin. Vse skupaj privede do lokalnih edemov, pljučne fibroze, bronhospazma in intersticijskega pnevmonitisa (4,12).

#### 1.2.2.4. Nefrotoksičnost

Ledvice so zelo občutljive na poškodbe, saj je njihova sposobnost obnavljanja dokaj majhna. Poškodbe glomerulov so znak nefropatij in lahko vodijo v razvoj glomeruloskleroze, ključno vlogo pri okvari glomerulov pa ima degeneracija epitelijskega. Številne študije govorijo o vplivu doksorubicina na glomerularne podocyte, kjer nastanejo poškodbe, ki posledično privedejo do nastanka nefropatij, največkrat omenjajo hudo proteinurijo. V primeru prehoda proteinov v glomerule lahko le-ti povzročijo strukturne spremembe v nefronu, ki vodijo do fokalne glomeruloskleroze, glomerulne bolezni, kot je proteinurija, hipertenzija, odpornosti na steroide in na koncu do odpovedi ledvic. Proteinurija je povezana z glomerularno vakuolizacijo, otekanjem epitelnih celic ter hitrim in naprednim razvojem odpovedi ledvic. Drugi pomembni učinki, ki pa so prisotni v manjšem obsegu invazivnosti, so: tubulna dilatacija, povečanje plazemske koncentracije kreatinina, dislipidemija, obsežne poškodbe glomerulov, hiperkoaguabilnost, hipoalbuminemija, intersticijska fibroza in vnetje, povečana prepustnost glomerulnih kapilar ter povečanje velikosti ledvic. Natančen mehanizem nefrotoksičnosti doksorubicina še ni znan, vendar nekatere študije kažejo, da toksičnost izvira iz formacije kompleksa (doksorubicin- $\text{Fe}^{3+}$ ), ki generira nastanek radikalov in povzroča oksidativne poškodbe pomembnih celičnih komponent. Nekateri znanstveniki domnevajo, da doksorubicin vstopi v mitohondrij, kar privede do produkcije RKS. Disfunkcija mitohondrijev je posledica poškodb mitohondrijske DNA (mtDNA) z RKS, zaradi česar pride do hitrega napredovanja okvar nefronov. Doksorubicin je odgovoren tudi za povečanje mutacij mtDNA, kar je posledica oksidativnega stresa in/ali zaviranja topoisomerase II. Poleg tega so znanstveniki dokazali, da doksorubicin zmanjša aktivnost kompleksov I in IV v mitohondrijih s povečanjem aktivnosti trigliceridov in citrat sintaze. V tem primeru pride do sprememb v dihalni verigi in poveča se stopnja  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ki lahko reagira z dušikovim oksidom (NO) ter spodbudi apoptotične procese. V drugih študijah znanstveniki domnevajo, da je vzrok za nastanek nefropatij, povzročenih z doksorubicinom, v lipidni peroksidaciji in znižanju stopnje naravnih antioksidantov – vitamina E in glutationa (GSH). Pri tem so opazili tubulne odlitke v urinu in zadebelitev Bowmanove kapsule (14).





**Slika 5:** Nefrotoksičnost, povzročena z doksorubicinom.

Nekateri znanstveniki so proučevali vpliv angiotenzinske konvertaze (ACE) na poškodbe ledvic pri zdravljenju z doksorubicinom. Opazili so povečano aktivnost ACE encima, ki je odgovoren za intersticijske poškodbe zaradi povzročitve akutne fibroze in provnetnega učinka ter vpliva na zmožnost avtoregulacije glomerulnega tlaka ledvic in posledično na hitrost glomerulne filtracije. Domnevajo, da je vzrok občutljivosti nefronov na toksičnost, ki jo povzročimo z doksorubicinom, lahko genetski in da so genetsko določene individualne razlike v ACE aktivnosti lahko razlog za različno dovzetnost na zdravljenje z doksorubicinom. Primeri nefropatije in proteinurije so pri ljudeh dejansko redki in lahko predstavljajo osnovno genetsko odpornost. Znanstveniki so predlagali, da napaka v genu, ki se deduje recesivno, povzroča nagnjenost k nefropatiji, povzročeni z doksorubicinom. Kljub temu večji del študij ugotavlja, da je za razvoj nefropatij kriva neposredna izpostavljenost celic doksorubicinu, neodvisno od njegove presnove. Prav tako je dobro znano, da je nefropatija, povzročena z doksorubicinom, kronična ter trajna značilnost kroničnih in progresivnih bolezni ledvic pri ljudeh. Glomeruloskleroza je najpogostejša progresivna glomerulna bolezen pri otrocih in drugi najpomembnejši vzrok končne faze

ledvičnih boleznih v tej starostni skupini. Segmentalna in fokalna glomeruloskleroza zavzema od 20 do 25 % idiopatskih nefrotskih sindromov pri odraslih. Te študije skupaj ugotavljajo, da je disfunkcija mitohondrijev in proizvodnja RKS, povzročena z doksorubicinom, glavni vzrok za poškodbe nefronov. Pri nastanku ledvičnih poškodb moramo upoštevati tudi velikost odmerka in trajanje terapije z doksorubicinom. Odmerek doksorubicina 3 mg/kg povzroči poškodbe ledvic po 6 tednih, medtem ko pri odmerku 25 mg/kg opazimo poškodbe ledvic že po 2 dneh (13,14).

Iz zbranih dokazov lahko sklepamo, da lahko kisikovi radikali poškodujejo skoraj vse organe v telesu. Za vsak organ je tudi značilna njegova lastna pot nastanka poškodb. Zato pri zmanjšanju poškodb, povzročenih z doksorubicinom, stremimo najprej k zmanjšanju poškodb, nastalih z radikali, saj lahko na ta način zavarujemo večino organov v telesu, med drugim tudi ledvice (4).

### **1.3. ZAŠČITA PRED TOKSIČNOSTJO, POVZROČENO Z DOKSORUBICINOM**

#### **1.3.1. NARAVNE SPOJINE**

Dokсорubicin ima velik pomen pri zdravljenju raka, zato se raziskovalci trudijo najti načine, kako preprečiti oziroma zmanjšati njegove neželene učinke. Uporabili so različne pristope, kot so optimizacija odmerka, uporaba kombinirane terapije, sinteza in uporaba različnih analogov dokсорubicina. Želenih rezultatov pri zmanjšanju neželenih učinkov niso dosegli in prav tako niso povečali antineoplastičnega učinka z analogi dokсорubicina. Glavni mehanizem toksičnosti je nastanek radikalov, zato je pri zmanjšanju neželenih učinkov smiselna uporaba naravnih antioksidantov. Spojine, ki so najbolj raziskane in največkrat uporabljene kot naravni antioksidanti, so: vitamini (C, A, E), polifenoli, koencim Q, flavonoidi, deviško oljčno olje, antioksidanti rastlinskega izvora ter selen. Poleg teh spojin so preiskovali tudi druge naravne spojine, ki bi bile sposobne zaščititi organe pred toksičnostjo, povzročeno z dokсорubicinom (*Preglednica 3*) (4).

NARAVNE SPOJINE	ODMEREK (Naravne spojine)	ODMEREK (Doksorubicin)	METODA	REZULTATI
Jagode Goji	25 mg/kg p.o. 1x na teden 3 tedne	5 mg/kg i.v. 1x/teden 3 tedne	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Sprague-Dawley</i>	Zaščita srca
Flavonoidi	$10^{-4}$ - $10^{-6}$ M	$10^{-6}$ M	<i>In vitro</i> - kardiomiociti	Zaščita srca
Kreatin	0,2 g/kg/dan p.o. ; 30 dni	15 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Vitamin C + E	(250 mg/kg + 400 IU/kg) / dan 30 dni p.o.	15 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Flavonoidi	Različne koncentracije	2 mg/ml	<i>In vitro</i> - kardiomiociti, celična linija kardiomioblastov, vzorci človeških jeter	Zaščita srca in jeter
Kavina kislina N-acetilcistein Vitamin E	10 $\mu$ mol/g/kg i.p. dnevno 8 dni, 100 mg/g/kg i.p. dnevno 8 dni, 140 mg/g/kg p.o. dnevno 8 dni	20 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – albino podgane vrste <i>Wistar</i>	Zaščita jeter (vitamin E kot najbolj učinkovit)
Azijski vodni popnjak	200 mg/kg/dan, 21 dni	2,5 mg/kg i.p. 6x v 2 tednih	<i>In vivo</i> – albino podgane, samci vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Melatonin	10 mg/kg/dan, 7 dni	45 mg/kg i.v. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita pljuč, ledvic, jeter in možgan
Oleuropein	100 in 200 mg/kg i.p. 3 ali 5 dni	20 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Likopen	4 mg/kg p.o. 1.dnevno 10 dni - po aplikaciji doksorubicina, 2. dnevno 2 dni pred in 3 dni po aplikaciji doksorubicina	10 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Sprague-Dawley</i>	Zaščita srca in ledvic
Flavonoidi	100 - 500 mg/kg i.p. 1 h pred aplikacijo doksorubicina	4 mg/kg i.v./teden, 6 tednov	<i>In vivo</i> - samci miši <i>Balb/c</i>	Zaščita srca
Propolis	100 mg/kg/dan p.o., 4 dni	20 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> – samice podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca in jeter
Antocianini	50 in 100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	<i>In vitro</i> - kardiomiociti	Zaščita srca
Cistationin	10 mg/kg i.p. enkratni odmerek	5 mg/kg i.p. enkratni odmerek	<i>In vivo</i> - samci albino miši <i>Swiss</i>	Zaščita jeter
Derivati kumarinov	25 in 100 $\mu$ M v 24 h	25 $\mu$ M v 24 h	<i>In vitro</i> - človeške celice adenokarcinoma dojk	Zaščita na nivoju celic
Likopen	5 mg/kg/dan p.o. 7 tednov	4 mg/kg i.p. 3-6 teden	<i>In vivo</i> - podgane <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Paradižnikov oleoresin	5 mg/kg/dan p.o. 7 tednov	4 mg/kg i.p. 3-6 teden	<i>In vivo</i> – samci podgan vrste <i>Wistar</i>	Zaščita srca
Resveratrol	Različni odmerki in različne vrste aplikacij	Terapevtski	<i>In vivo</i> - podgane <i>In vivo</i> - klinične študije	Zaščita srca

**Preglednica 3:** Naravne spojine kot protektivi proti citotoksičnosti, povzročeni z doksorubicinom.

### 1.3.2. ZDRAVILNE UČINKOVINE

Velik vpliv na zaščito pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom, imajo določene zdravilne učinkovine, ki so že dobro uveljavljene ali pa gre za nove oziroma potencialne učinkovine. Njihova zaščita temelji na različnih poteh delovanja (4).

Znanstveniki so primerjali učinkovitost kalcijevih antagonistov; amlodipina, nifedipina in nitredipina pri zaščiti ledvic pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom. Njihovi dokazi so temeljili na imunohistokemičnih, biokemičnih in histopatoloških pristopih, raziskovanih na podganah. Pri podganah, zdravljenih z doksorubicinom, so odkrili signifikantne spremembe v količini serumskega kreatinina, proteinov v urinu in sečninskega dušika v krvi. Ti parametri ostanejo nespremenjeni, če z doksorubicinom hkrati apliciramo amlodipin. Aplikacija nifedipina ali nitredipina ne vpliva na nobenega od teh treh parametrov. Poleg tega so se pri podganah, zdravljenih z doksorubicinom, vrednosti glutationske S-transferaze (GST), superoksidne dismutaze (SOD) in GSH zmanjšale, vrednosti dušikov oksid sintaze (NOS), malondialdehida (MDA) in NO pa so se signifikantno povečale. Doksorubicin v ledvicah povzroča strukturne poškodbe ledvic kot tudi patološke spremembe v izražanju proteinov Bcl-2 in Bax, kar so razkrile biokemične in histopatološke preiskave. Na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo, da amlodipin deluje kot protektiv pri nefrotoksičnosti, povzročeni z doksorubicinom, medtem ko nifedipin in nitredipin nimata učinka (4).

V eni od raziskav so opazovali protektivne učinke morfina na kardiotoksičnost, povzročeno z doksorubicinom. Raziskava je potekala na podganah, in sicer na samcih vrste *Sprague-Dawley*. Podgane so bile zdravljene z doksorubicinom (1,25 mg/kg, i.p.) in morfinom (10 mg/kg, i.p.) 4-krat na teden, 28 dni. Opazovali so mikroskopske in makroskopske spremembe, elektrokardiografske parametre ter kontraktilno silo papilarne mišice levega ventrikla. Kljub temu da so rezultati z morfinom zelo spodbudni, je njegova uporaba vprašljiva, saj tudi druge učinkovine izkazujejo podobno protektivnost za srce brez neželenih učinkov morfina. Večina obolelih za rakom trpi neznosne bolečine, zato jih zdravijo tudi z opioidnimi analgetiki, tako da ima morfin dvojno vlogo. Dobro bi bilo opraviti več raziskav glede njegove protektivne vloge (4,15).

Med kardioprotektivnimi učinkovinami so testirali tudi tretjo generacijo beta blokatorjev, in sicer nebivolol. Teste so izvajali na izoliranem srcu podgan. Podgane vrste *Sprague-Dawley* so zdravili z doksorubicinom in daunorubicinom v kombinaciji s karvediolom

oziroma nebivololom. Na podlagi vrednosti GSH in oksidirane glutationa (GSSG) so z nebivololom dosegli boljše rezultate kot pri karvediolu. Pri nebivololu so opazili tudi zmanjšano aktivnost troponina T in kreatinske kinaze (CK), hkrati pa so opazili povečano sproščanje nitritov/nitratov, mangan superoksidne dismutaze (MnSOD) in glutationske peroksidaze (GSH-Px). Pri testu so spremljali tri srčne parametre in ugotovili, da nebivolol v kombinaciji z antraciklini najbolj varuje srčno tkivo (4).

Eritropoetin deluje direktno na hematopoezo in pripomore k izboljšanju anemij, zadnje čase pa ugotavljajo tudi pozitivne učinke na kultivirane kardiomiocite *in vitro*. Pri *in vivo* raziskavi, ki je bila pred kratkim objavljena, so ugotovili, da lahko klinično dostopni citokini protektivno delujejo pri nehematopoetičnih boleznih, kot so kardiotoksičnost, povzročena z doksorubicinom ter poškodba srca zaradi ishemije-reperfuzije in infarkta. Apoptoza, povzročena z doksorubicinom na kultiviranih kardiomicitih, je signifikantno zmanjšana ob sočasni uporabi eritropoetina, kar so določili z metodo TUNEL (ang. »terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labelling«). *In vivo* raziskava na podganah, zdravljenih z doksorubicinom, je pokazala izrazito zmanjšanje srčne funkcije. V primeru sočasne uporabe doksorubicina in eritropoetina pa pride do zmanjšanja fibroze, inhibicije apoptoze kardiomicitov, ureditve ekspresije proteina *Bcl-2* ter precejšnjega izboljšanja srčne funkcije (4).

### 1.3.3. DRUGI PRISTOPI

#### 1.3.3.1. Fizična aktivnost in prehrana

Fizična aktivnost predstavlja zaščito pred različnimi kroničnimi in akutnimi poškodbami miokarda, zlasti pred ishemijo-reperfuzijo. S fizično aktivnostjo se povečuje koncentracija miokardnega stresnega proteina (Hsp72) in SOD, ki naj bi bila kardioprotektiva. Testi na živalih so pokazali, da povišana stopnja miokardnega SOD ali Hsp72 deluje kardioprotektivno pri zdravljenju z doksorubicinom in pri ishemiji-reperfuziji. Kardioprotekcijo so opazili tudi v odsotnosti povečanja Hsp72 ali SOD, kar nakazuje, da so vključeni tudi drugi zaščitni mehanizmi. Narejeni sta bili dve raziskavi in obe sta potrdili, da fizična aktivnost pripomore k zmanjšanju toksičnosti, povzročeni z doksorubicinom, pri tem pa je pomembno tudi, v kakšni fizični pripravljenosti je bolnik in kako je bolezen napredovala. Ne smemo spregledati, da so bolniki, ki zbolijo za rakom, zelo slabotni in brez energije, tako da je za njih opravljanje vsakodnevnih opravil že velik

napor, kaj šele intenzivna vadba. Pri tem pa morajo biti pozorni tudi na prehrano, saj naj bi zmanjšan vnos hranil tudi pripomogel k zmanjšani toksičnosti, povzročeni z doksorubicinom. Vse skupaj je potrebno še preučiti in narediti raziskave na ljudeh, da bomo lahko trdili, da fizična aktivnost in dieta zmanjšata toksičen vpliv doksorubicina (4).

### 1.3.3.2. Dostavni sistemi

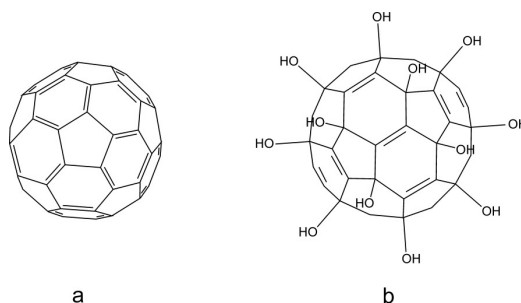
Vgrajevanje doksorubicina v različne dostavne sisteme, kot so ciljni sistemi pri zdravljenju raka, nanodelci in liposomi, so obetavni pristopi za zmanjšanje njegovih neželenih učinkov in povečanje učinkovitosti. Tehnologija izdelave je zelo draga in zapletena, vendar je zmanjšanje toksičnosti kot posledica spremenjenega prenašalnega sistema z zelo drobnimi praški in specifičnimi spojinami za ciljno zdravljenje raka del sodobne farmakoterapije. Nanotehnologija omogoča odstranjevanje oziroma omejevanje poškodb v začetni fazi raka brez sočasnega vpliva na zdravo tkivo. Najpomembnejša prednost uporabe nanodelcev v sodobnem zdravljenju raka je, da imajo nanodelci optične, magnetne ali strukturne lastnosti, ki jih večje molekule nimajo. Delci s premerom do 100 nm imajo veliko funkcionalnih skupin ter površinsko področje, s katerimi vežejo učinkovine. Kljub temu, da ciljno zdravljenje in uporaba nanodelcev predstavlja večjo skrb za bolnike z rakom zaradi zmanjšanja neželenih učinkov, njihova uporaba ni vedno sprejemljiva in uporabna. Doksorubicin na trgu najdemo v liposomski in pegelirani liposomski obliki. Antraciklini v obliki liposomov imajo daljši razpolovni čas ter se raje kopičijo v tkivu tumorja in ne v srčnem tkivu, s čimer je zagotovljena selektivnost in manj okvar srca. Pripravki doksorubicina v obliki liposomov povzročajo manj neželenih učinkov (diareja, slabost, bruhanje, izguba las) kot klasični pripravki, vendar drastično povečajo tveganje za nastanek palmarno-plantarne eritrodisestezijske in mukozitisa. Sodoben poudarek napredka pri zdravljenju neoplastičnih obolenj je na ciljnem vnosu zdravila, vnosu terapevtskih koncentracij učinkovine v rakasto tkivo brez poškodb zdravega tkiva. Liposomi in nanodelci so najbolj priljubljeni pripravki uporabljeni za ciljno zdravljenje raka, vendar pa niso edini. V literaturi lahko zasledimo nekaj zanimivih informacij o kompleksu polipeptid-doksorubicin kot predzdravilu, micelarno enkapsuliranemu doksorubicinu, aplikaciji dendrimerov za zdravljenje raka in različno konjugiranih oblikah doksorubicina. Ciljno zdravljenje raka bo imelo pomembno vlogo pri zgodnjem odkrivanju populacije spremenjenih celic z *ex vivo* analizo ali pri *in vivo* slikanju (4).

## 1.4. FULERENOL

### 1.4.1. OPIS FULERENOLA

#### 1.4.1.1. Fuleren in fulerenol kot njegov derivat

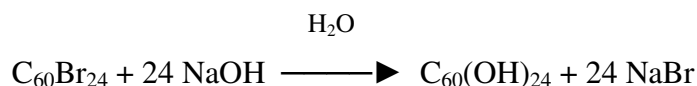
Fulereni so zgrajeni izključno iz ogljikovih atomov in imajo sferično prostorsko ureditev. Predstavljajo relativno novo skupino spojin, ime pa so dobili po arhitektu Buckminsterju Fullerju, ki je pri konstrukciji kupole ameriškega paviljona EXPO leta 1967 uporabil pentagonske in heksagonske strukture. Vsak fuleren ima konstantno število 12 pentagonov in je sestavljen iz  $2 \times (10 + M)$  ogljikovih atomov ( $M \geq 0$ ). Diamant in grafit sta kemijsko nereaktivna, kar pa ne velja za Fuleren  $C_{60}$ . V *in vitro* in *in vivo* raziskavah so se kot najbolj zanimivi pokazali polihidroksilirani fulerenovi derivati –  $C_{60}$ -fulerenoli ( $C_{60}(OH)_n$ ,  $n = 2-28$ ), ki so jih dobili z modifikacijo fulerena  $C_{60}$ . Na ta način so dobili številne vodotopne biološko aktivne molekule, ki so na bioloških in kemijskih modelnih sistemih pokazali izredno visoko antioksidativno aktivnost. Struktura fulerena  $C_{60}$  in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  je prikazana na sliki 6 (16).



**Slika 6:** Zgradbi fulerena  $C_{60}$  (a) in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  (b)

#### 1.4.1.2. Sinteza fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$

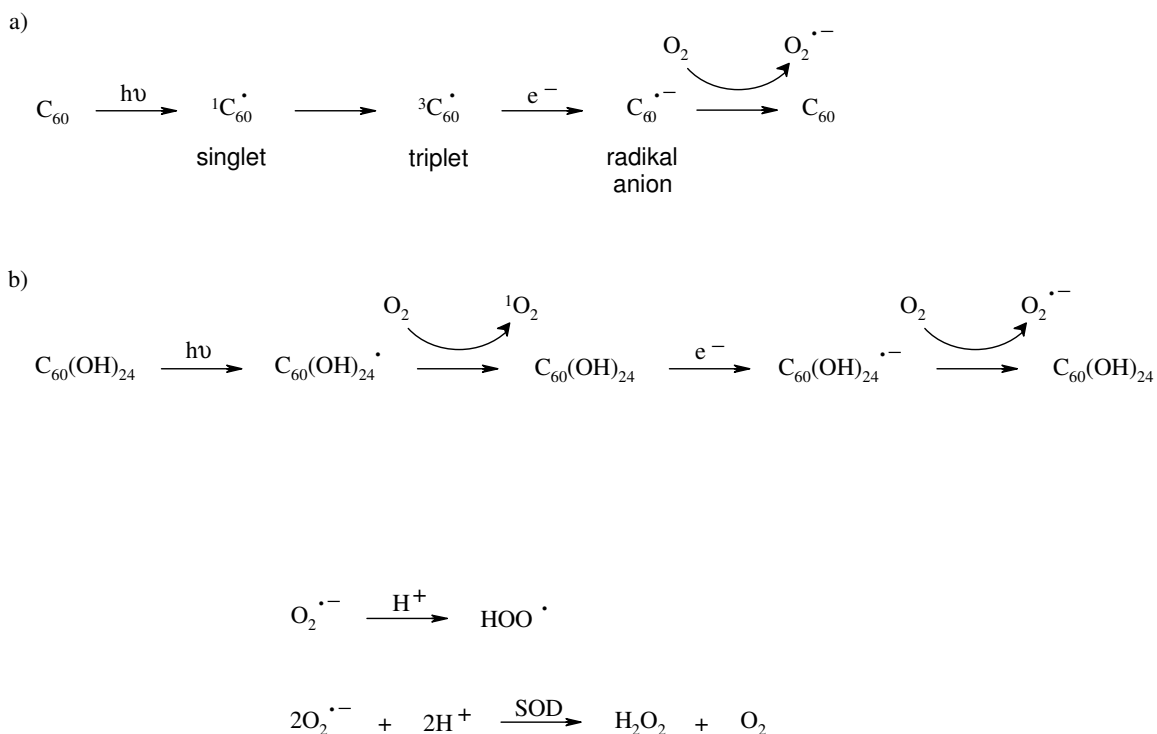
Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  sintetiziramo po naslednjem postopku:



Pridobivanje produkta z visoko stopnjo čistote (nad 95 %) je zelo težavno kljub nezahtevnemu postopku pridobivanja. Postopek sinteze: 150 mg  $C_{60}Br_{24}$  zmešamo s 5 ml 0,1 M raztopine NaOH. Ob sprotneem zniževanju pH z dodajanjem 0,1 M HCl do pH 4,5 mešamo raztopino 30 minut pri sobni temperaturi. Raztopino nato uparimo do suhega pod znižanim tlakom pri 40°C. Reakcijsko zmes spiramo trikrat s 25 ml metanola in dvakrat s 25 ml vodne raztopine etanola (1:1; v/v). Na koncu fulerenol speremo s 50 ml prečiščene vode in nato sušimo pri 50°C (16).

### 1.4.1.3. Biološko aktivni derivati fulerena

V poskusih na človeških celicah so dokazali izjemno toksičnosti agregatov fulerena  $C_{60}$ , toksičnost polihidroksiliranih derivatov pa je izrazito manjša. Toksični so zaradi nastanka superoksidnih radikalov, ki poškodujejo celične membrane. Na sliki 7 je prikazan nastanek kisikovih radikalov, kar je posledica fotoekscitacije molekule  $C_{60}$ . Primarno nastaneta superoksidni anion in singletni kisik, ki povzročita nastanek hidroperoksidnega radikala in vodikovega peroksida.



**Slika 7:** Fotoekscitacija molekul  $C_{60}$  (a) in  $C_{60}(OH)_{24}$  (b) ter nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti.



Singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) predstavlja visokoreaktivno elektrofilno neradikalno molekulo in selektivni oksidant. Nastaja v nekaterih kemijskih reakcijah in fotokemično iz tripletnega kisika ( $^3\text{O}_2$ ), zaradi velike reaktivnosti pa ga v atmosferi praktično ne najdemo. Reagira v zelo kratkem času ( $10^{-6}$  s) z večino organskih spojin, ki so v celici: s spojinami, ki imajo z elektroni bogate dvojne vezi, lahko pa tudi z oksidirajočimi funkcionalnimi skupinami, kot so v anilinih, sulfidih (R-S-R) in fenolih.  $^1\text{O}_2$  lahko uporabljamo za oksidativno uničenje bakterij, saj povzroča fragmentacijo verige DNA. Fulerenski derivati, ki so onesnaženi, imajo citotoksični učinek predvsem, kadar traja čas tripletnega stanja več kot 100  $\mu\text{s}$ , kar povzroči poškodbe celične membrane in fragmentacijo DNA. Vezava fullerena na molekulo DNA v pufrski raztopini povzroči nastanek agregatov. Posledično lahko sklepamo, da dobimo z uvedbo ustreznih funkcionalnih skupin v molekulo fullerena strukture, ki lahko vplivajo na DNA znotraj celice, kar nakazuje na potencialno uporabo derivatov v genskem zdravljenju. Pri vezavi polarnih skupin (-NHCOR,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCCOR}$ ) na molekulo fullerena dobimo derivate, bolj topne v vodi od lipofilne molekule  $\text{C}_{60}$ . Fulerenoli oziroma polihidroksilirani derivati fullerena ( $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ ) so se izkazali kot odlične spojine za odstranjevanje radikalov (16).

#### 1.4.1.4. Študije (*in vitro/in vivo*)

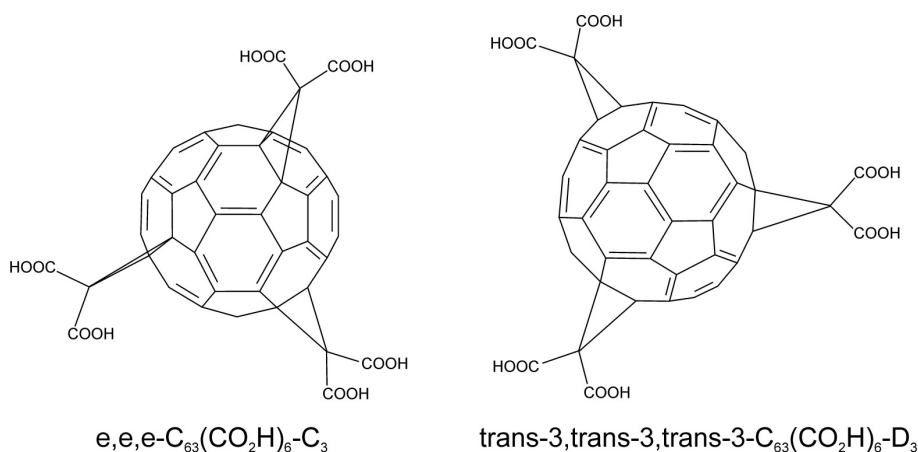
V *in vitro* raziskavah z živalskimi in s človeškimi celicami različnih linij (adenokarcinoma dojke, nefrona hrčka, eritrolevkemije, fibroblasta pri miših, Burkittovega limfoma) so ugotovili antiproliferativno aktivnost fulerenola  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ . Molekula fulerenola v nanomolskih koncentracijah v prvih 48 urah inhibira rast vseh naštetih tumorskih celičnih linij, izjema je linija Burkittovega limfoma, ki ima zelo nizko inhibicijo. Celice so po 48 urah rasti v mediju primerljive s kontrolnimi vzorci, saj je inhibicija rasti reverzibilna. V spermatozoidih sesalcev spodbudi železo iz sistema  $\text{Fe}^{2+}$ /askorbat lipidno peroksidacijo in pri tem poškoduje nenasičene maščobne kisline v membrani, pride do oksidativnega stresa v epididimisu in testisih ter na koncu do neplodnosti. Znanstvenikom je uspelo dokazati, da fulerenol  $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$  (predvsem  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18}$ ) preprečuje oksidativni stres, induciran z železom. Prvi znanstveni podatek o vplivu fulerenola na reproduktivna tkiva so dobili v *in vitro* raziskavah, kjer so uporabljali spermo samca koze. V raziskavi na celicah človeške eritrolevkemije K-562, obdelanih s fulerenolom  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ , so proučevali celični cikel, mitotsko aktivnost in sposobnost sinteze DNA. Na podlagi mitotskega in proliferacijskega

indeksa so ocenili sintezno in mitotsko fazo celičnega cikla. Mitotski indeks celic, obdelanih s fulerenolom, je manjši kot pri kontrolnih celicah, kar potrjuje hipotezo, da  $C_{60}(OH)_{24}$  inhibira nastanek delitvenega vretena in mikrotubulov, ne glede na čas inkubacije celic s fulerenolom. Molekula  $C_{60}(OH)_{24}$  torej spreminja celični cikel celic K-562, saj vpliva na mitotsko in sintezno fazo cikla. Visoka stopnja preživelih celic, ki so bile obdelane s fulerenolom, potrjuje, da ima na celični liniji humane eritrolevkemije K-562  $C_{60}(OH)_{24}$  večjo citostatično kot citotoksično aktivnost. Fulerenol v razponu koncentracij od 1 do  $10^3$   $\mu\text{g/ml}$ , v *in vitro* razmerah na človeških limfocitih periferne krvi ni pokazal genotoksičnosti (16).

V *in vivo* raziskavah na miših se je izkazal kot dobra zaščitna substanca pred obsevanjem. Zaradi antioksidativnih mehanizmov fulerenola potekajo intenzivne *in vivo* raziskave, največkrat na podganah. Namen raziskav je dokazati protektivno vlogo fulerenola pri toksičnosti, povzročeni z doksorubicinom. Največ raziskav je narejenih na srcu in na drugih organih, kot so jetra, pljuča in ledvice (16,17).

#### **1.4.1.5. Potencialna terapevtska uporaba derivata fulerena**

V dosedanjih raziskavah so fulerenoli v bioloških in kemijskih modelnih sistemih pokazali izredno visoko antioksidativno aktivnost. Preventivna uporaba fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  bi lahko pomembno zmanjšala toksične učinke doksorubicina pri zdravljenju malignih tumorjev. C3-karboksifulereni (*tris* in *bis* derivati; *Slika 8*) imajo vlogo antioksidantov v dopaminergičnih delih možganov, kjer pride zaradi povečane koncentracije ionov železa do nastanka oksidativnega stresa in patoloških razmer. S tem se odpirajo možnosti za uporabo vodotopnih derivatov fulerena v zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. Potrdili so, da lahko z injiciranjem C3-karboksifulerena po vnosu železa v intrastrialni del bazalnih ganglijev zmanjšamo poškodbe, ki nastanejo na dopaminergičnih receptorjih. Pri Parkinsonovi bolezni je vzrok za oksidativne poškodbe visok delež  $\text{Fe}^{3+}$  ionov v bazalnih ganglijih, poleg tega pa vplivajo C3-karboksifulereni tudi na vzdrževanje ionske homeostaze v celicah in so dobri blokatorji virusne replikacije. Obetavne so tudi radioprotektivne in citostatične lastnosti fulerenola (16).



**Slika 8:** Zgradba karboksifulerena s parnimi karboksilnimi skupinami na površini  $C_{60}$ . Izomera prikazujeta  $C_3$  in  $D_3$  simetrijo.

### 1.4.2. FULERENOL KOT ANTIOKSIDANT

Oksidativne poškodbe in oksidativni stres (*Slika 13*) sta odgovorna za poškodbe celic v številnih patoloških stanjih. Zaradi oksidativnega stresa pride do depolarizacije mitohondrijev in sproščati se začnejo majhne proapoptotične molekule, kot je citokrom C, ki vodijo do aktiviranja kaspazne kaskade in apoptoze. Polihidroksilirani derivati  $C_{60}$  in derivati z malonsko kislino so sposobni vezave na mitohondrije, posledica česar je citoprotektiven učinek zaradi antioksidantnega učinka. Antioksidantni učinek vodotopnih fulerenov se uporablja pri zaščiti različnih organov, kot so pljuča (poškodbe zaradi ishemije-reperfuzije), možgani (poškodbe, povezane z oksidativnim stresom zaradi starosti), jetra, srce in ledvice (zaradi različnih patoloških sprememb povzročenih z doksorubicinom). Nekateri znanstveniki omenjajo tudi, da imajo derivati  $C_{60}$  sposobnost lovljenja NO radikalov. Mono in di-derivati malonske kisline z  $C_{60}$  zavirajo relaksacijo aorte kuncev, povzročene z NO. Relaksacija gladke miškulature je povezana s proizvodnjo superoksida in nevtralizacijo NO s superoksidnim anionom, ob prisotnosti endogenega SOD pa je ta učinek prikrit. V tem primeru je z zmanjšanjem biološke razpoložljivosti NO nastanek peroksinitritnega aniona preprečen s strani fulerenola. NO je eden od prekursorjev preoksinitrita in je zelo reaktiven ter ima kratko razpolovno dobo. Pred kratkim je bila dokazana pomembna NO-antiradikalna aktivnost fulerenolu  $C_{60}(OH)_{24}$  (17). Fulerenol kot antioksidant ima katalitičen vpliv v zaključni stopnji radikalnih reakcij

oziroma na adicijsko-radikalnih reakcijah hidroksilnega radikala na dvojne vezi fulerenola, pri čemer nastanejo derivati  $C_{60}(OH)_n$  ( $n > 24$ ) (16).

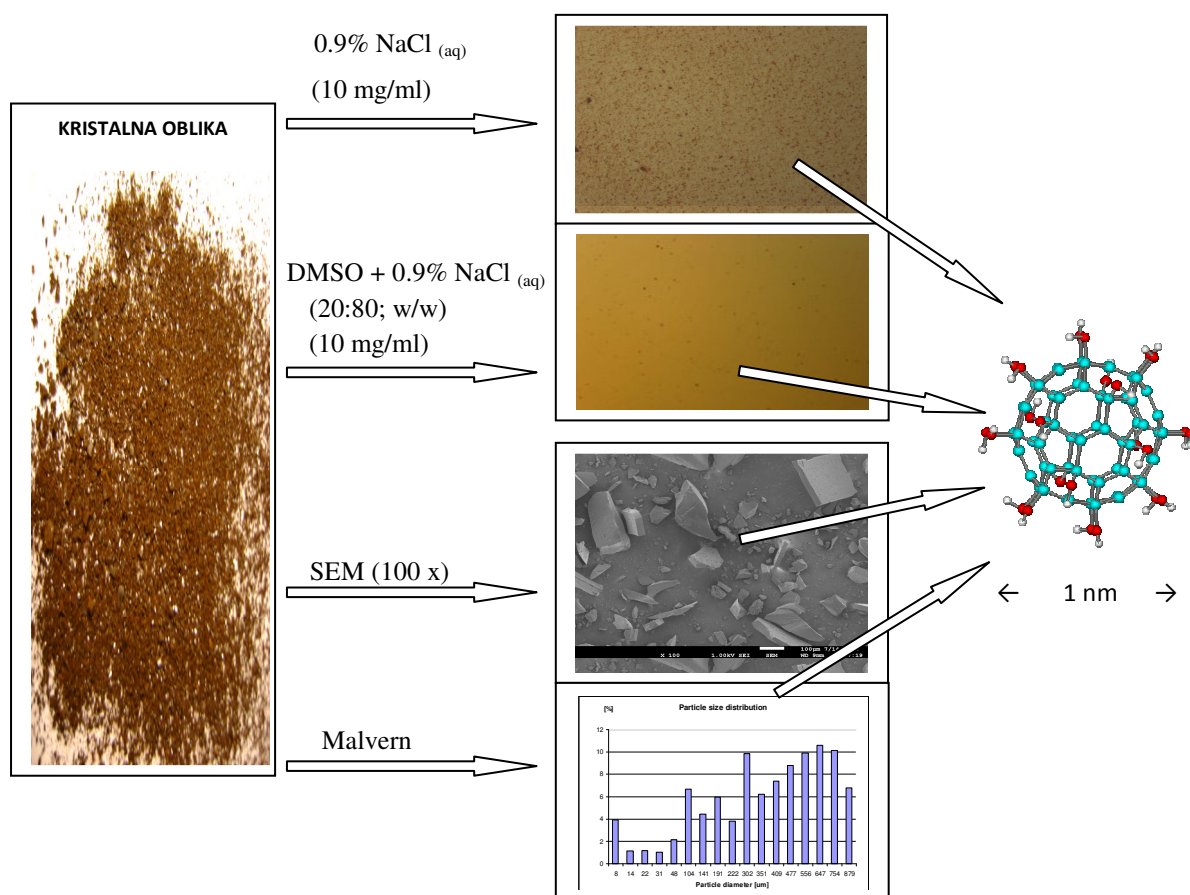
## 2 NAMEN DELA

Doksorubicin deluje tako na rakave kot tudi na zdrave celice. Poleg osnovnega terapevtskega učinka negativno vpliva na večino organov v telesu, mi pa bomo raziskovali negativne vplive doksorubicina na ledvice. Na podlagi vseh raziskav akutne in kronične nefrotoksičnosti doksorubicina lahko trdimo, da doksorubicin poškoduje zdrave celice ledvic. Na osnovi literaturnih podatkov in naših predhodnih raziskav smo postavili sledečo osnovno hipotezo: fulerenol v odmerkih od 25 do 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov zmanjša poškodbo ledvičnega tkiva pred neželenimi stranskimi učinki doksorubicina pri eksperimentalnih podganah. Poskuse bomo izvedli *in vivo* na modelu podgan samcev vrste *Wistar* in proučili, ali lahko fulerenol prepreči nastanek kroničnih nefrotoksičnosti, povzročenih z doksorubicinom, v odmerku 1,5 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Rezultate bomo primerjali z učinki dobro poznanega antioksidanta vitamina C (100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov). Na podlagi rezultatov makroskopskih, hematoloških in biokemijskih raziskav bomo raziskali morebitne pozitivne učinke fulerenola.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1. PRIPRAVA IN APLIKACIJA $C_{60}(OH)_{24}$ , DOKSORUBICINA IN VITAMINA C

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  (Novi Sad, Srbija) je bil tik pred uporabo raztopljen v sterilizirani in apirogeni NaCl (0.9%):DMSO (80:20; m/m) raztopini (10 mg/ml) v LAF (ang. »Laminar air flow«) komori (Slika 9). Doksorubicin (Adriablastina<sup>®</sup>) za i.v. aplikacijo je bil pridobljen od Pharmacia & Upjohn (Milano, Italija). Raztopina za i.p. aplikacijo je bila tik pred uporabo raztopljena v sterilizirani in apirogeni 0.9 % NaCl raztopini (2 mg/ml) v LAF komori. Vitamin C<sup>®</sup> (ampule), ki vsebujejo 500 mg L-askorbinske kisline na 5 ml ampule, raztopljen v vodi za injekcije, je bil pridobljen od Galenika a.d. (Beograd – Zemun, Srbija).



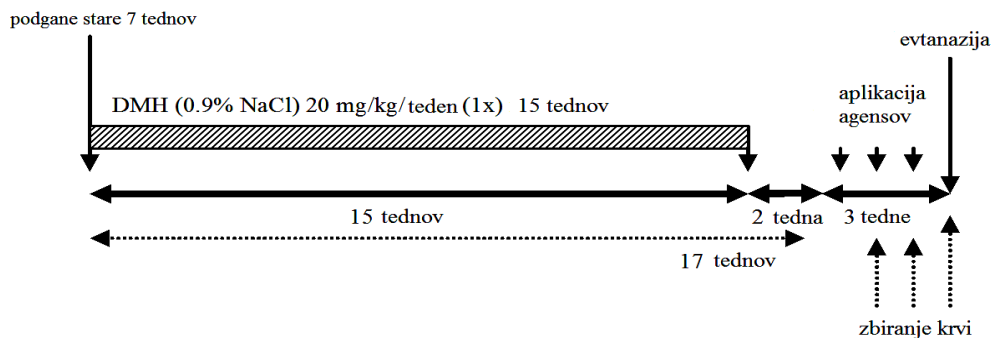
**Slika 9:** Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$ : makroskopski izgled (kristalna oblika); raztopljen v fiziološki raztopini (optični mikroskop, veliko število agregatov fulerenola z velikostjo od 50 do 100  $\mu\text{m}$ ), raztopljen v raztopini DMSO/0,9% NaCl (optični mikroskop, nekaj agregatov fulerenola; velikosti < 20  $\mu\text{m}$ ); SEM (ang. »scanning electron microscope«) pogled; porazdelitev velikosti delcev (Malvern metoda); strukturna shema (18).

Poskuse smo izvedli na podganah vrste *Wistar* (Medicinski eksperimentalni center, Ljubljana, Slovenija), samci, stari 7 tednov in nameščeni po 3 do 4 na kletko pri sobni temperaturi od 22 do 23°C, vlažnosti 55 ± 10 % in 12-urnem ciklu svetloba/tema. Imeli so prost dostop do standardne laboratorijske prehrane (Altromin, Nemčija) in vode. Vse poskuse je odobrila Etična komisija za poskuse na živalih Republike Slovenije (številka dokumenta 34401-61/2007/7). Vse študije so bile izvedene v skladu z Evropsko konvencijo za zaščito vretenčarjev (ang. »*European Convention for the protection of vertebrate animals*«), ki se uporablja za poskuse in druge znanstvene namene (ETS 123).

Živali so bile naključno razdeljene v devet skupin (po 10 na skupino), kot sledi:

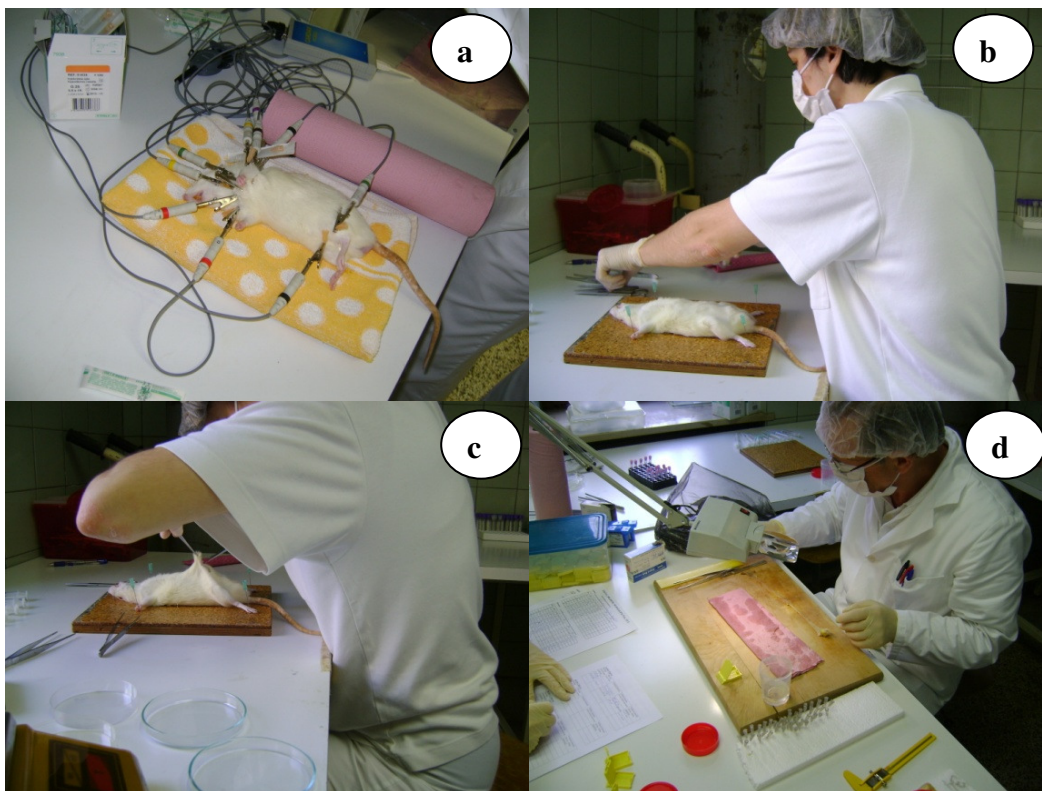
1. **Kontrolna zdrava skupina** – podgane, ki so enkrat na teden prejele fiziološko raztopino;
2. **Kontrolna skupina s kemijsko povzročenim rakom** – podgane, ki so prejele DMH, obdelan s fiziološko raztopino/DMSO (80/20; m/m, na teden);
3. **Doksorubicin skupina** – podgane, ki so prejele DMH in doksorubicin 1,5 mg/kg/teden;
4. **Fulerenol/Doksorubicin skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 100 mg/kg/teden 30 minut pred aplikacijo doksorubicina 1,5 mg/kg/teden;
5. **Fulerenol/Doksorubicin skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 50 mg/kg/teden 30 minut pred aplikacijo doksorubicina 1,5 mg/kg/teden;
6. **Fulerenol/Doksorubicin skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 25 mg/kg/teden 30 minut pred aplikacijo doksorubicina 1,5 mg/kg/teden;
7. **Vitamin C/Doksorubicin skupina** – podgane, ki so prejele DMH in vitamin C 100 mg/kg/teden 30 minut pred aplikacijo doksorubicina 1,5 mg/kg/teden;
8. **Fulerenol skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 100 mg/kg/teden;
9. **Vitamin C skupina** – podgane, ki so prejele DMH in vitamin C 100 mg/kg/teden.

Vseh 80 podgan (razen kontrolne zdrave skupine) je enkrat na teden v obdobju 15 tednov prejelo *i.p.* apliciran DMH (*Slika 10*). V 24., 25. in 26. tednu starosti so bile podgane zdravljene z doksorubicinom (1,5 mg/kg), fulerenolom (25, 50, 100 mg/kg), in/ali vitaminom C (100 mg/kg). Odmerki fulerenola C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> so bili izbrani glede na predhodne študije na zdravih odraslih podganah vrste *Wistar* in nadaljnjih raziskavah akutne toksičnosti, povzročene z doksorubicinom, na modelu raka dojke pri podganah (18).



*Slika 10: Eksperimentalni protokol.*

Sedem dni po zadnji aplikaciji (v 27. tednu starosti) smo podgane žrtvovali z uporabo CO<sub>2</sub>. Odstotek preživetja poskusnih živali do konca poskusa je bil 100 % (18).



*Slike 11a – 11d: Evtanazija podgan in priprava na obdukcijo.*

### 3.2. KEMIJSKA POVZROČITEV KOLOREKTALNIH TUMORJEV

Kolorektalni tumor je bil povzroččen z DMH (Fluka Chemie, Švica), ki je bil pripravljen po standardni metodi, pri kateri se DMH raztopi v 0,001 M etilen diamin tetraacetni kislini (EDTA), sledi uravnavanje pH vrednosti na 6,8 z 0,1 M raztopino NaOH. Pred aplikacijo



se vedno pripravi svežo raztopino. Med obdukcijo je bilo odstranjeno črevesje, prerezano vzdolžno, očiščeno s tekočo vodo, fiksirano v 10-odstotnem pufranem formalinu in makroskopsko pregledano za prisotnost tumorjev. Debelo črevo je bilo vzdolžno prerezano in poslano na histološki pregled celotnega tkiva za makroskopsko vidne poškodbe. Vsi vzorci tkiv so bili shranjeni v parafinu in obarvani s kromovim barvilom *Kreyberg-Jareg*.

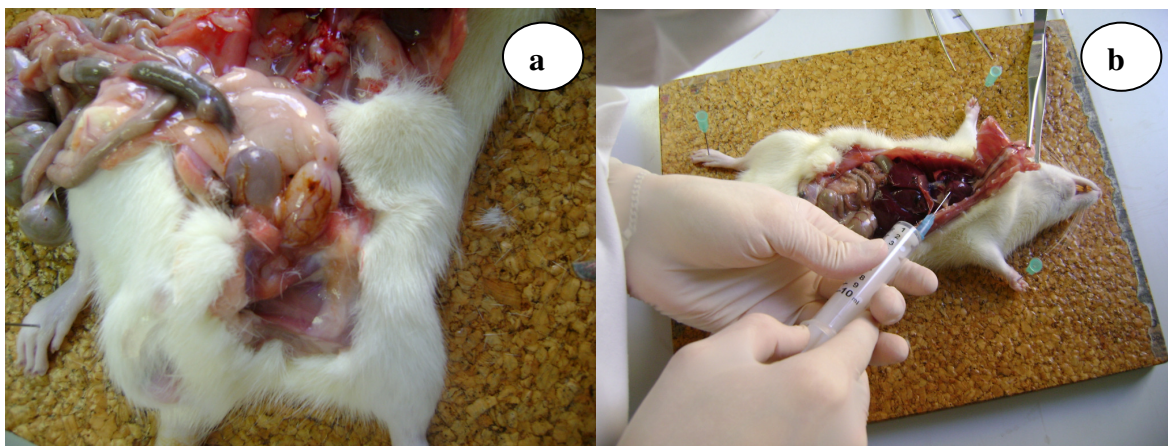
### 3.3. KOEFICIENT TEŽE LEDVIC

Koeficient tkiva ledvic glede na telesno maso se izračuna kot razmerje med tkivom organa (mokra teža v mg) glede na telesno težo (g). Med obdukcijo se ledvice izreže in stehta.

### 3.4. OCENA PROTEKTIVNIH UČINKOV C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> NA LEDVICE

Kri za analizo je bila odvzeta iz orbitalnega venskega sinusa, in s punkcijo srca po torakotomiji (*Slika 12b*). V krvi so bili določeni hematološki parametri: levkociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit in retikulociti. Serum je bil uporabljen za analizo aktivnosti encimov laktatne dehidrogenaze (LDH) in alfa hidrosibutiratne dehidrogenaze ( $\alpha$ -HBDH) ter za določitev koncentracije sečnine in kreatinina. Za določitev ravni LDH so bili uporabljeni komercialni reagenti *Chema Diagnostica* (Jesi, Italija), pri  $\alpha$ -HBDH pa komercialni reagenti *Dialab* (Dunaj, Avstrija). Koncentracijo sečnine v serumu smo določili z uporabo komercialnih kompletov *Pointe Scientific* (ZDA) z modificirano Berthelotovo metodo in izrazili v mmol/L. Koncentracijo kreatinina v serumu smo določili z uporabo komercialnih kompletov *Cayman Chemical* (ZDA) z Jaffejevo metodo in izrazili v  $\mu$ mol/L. Vsak organ je bil hitro odstranjen iz podgane, ki smo jo žrtvovali, in je bil postavljen v ledeno hladno raztopino. Maščobno tkivo je bilo obrezano. Na koncu smo razkosano tkivo ledvic homogenizirali v raztopini *Tris-buffer* (pH 7,4; organ/pufer=1/10; m/m) in razdeli na dva dela. Prvi del smo uporabili za določitev MDA, drugega pa smo centrifugirali pri 13.000 $\times$ g 20 minut pri 4°C (hladilnik *Beckman*, Ultracentrifuga). Supernatant smo nato uporabili za merjenje skupne koncentracije proteinov (TP; *Sentinel Diagnostics*, Milano, Italija), GSH, GSSG, GSH-Px (*Ransel*, Crumlin, VB), GR (Crumlin, VB), katalaze (CAT), LDH, SOD (*Ransod*, Crumlin, VB). Koncentracija prostega GSH in GSSG ter MDA je bila izmerjena s *Chromsystems Diagnostic* komercialnim kompletom za analizo HPLC (München, Nemčija) in izražena v mg/L oziroma  $\mu$ g/L pri MDA.

Izračunano je bilo tudi razmerje med prostim GSH/GSSG. Pri analizi smo uporabili HPLC Agilent HP 1100 sistem, opremljen z avtomatskim vzorčevalcem in fluorescenčnim detektorjem (Waldbronn, Nemčija). Z metodo Aebi smo določili katalazno aktivnost homogenata, pri kateri vodikov peroksid reagira s celičnim lizatом (način pridobitve je opisan zgoraj). Pri valovni dolžini 240 nm smo s spektrofotometrom določili začetno točko izginotja vodikovega peroksida (0 – 60 s) (13,18-20).



Sliki 12a – 12b: Odstranitev organov in odvzem krvi.

### 3.5. REAKCIJI DOKAZOVANJA SEČNINE IN KREATININA, SHEMA OKSIDATIVNEGA STRESA

Določanje koncentracije sečnine po modificirani Berthelotovi metodi:

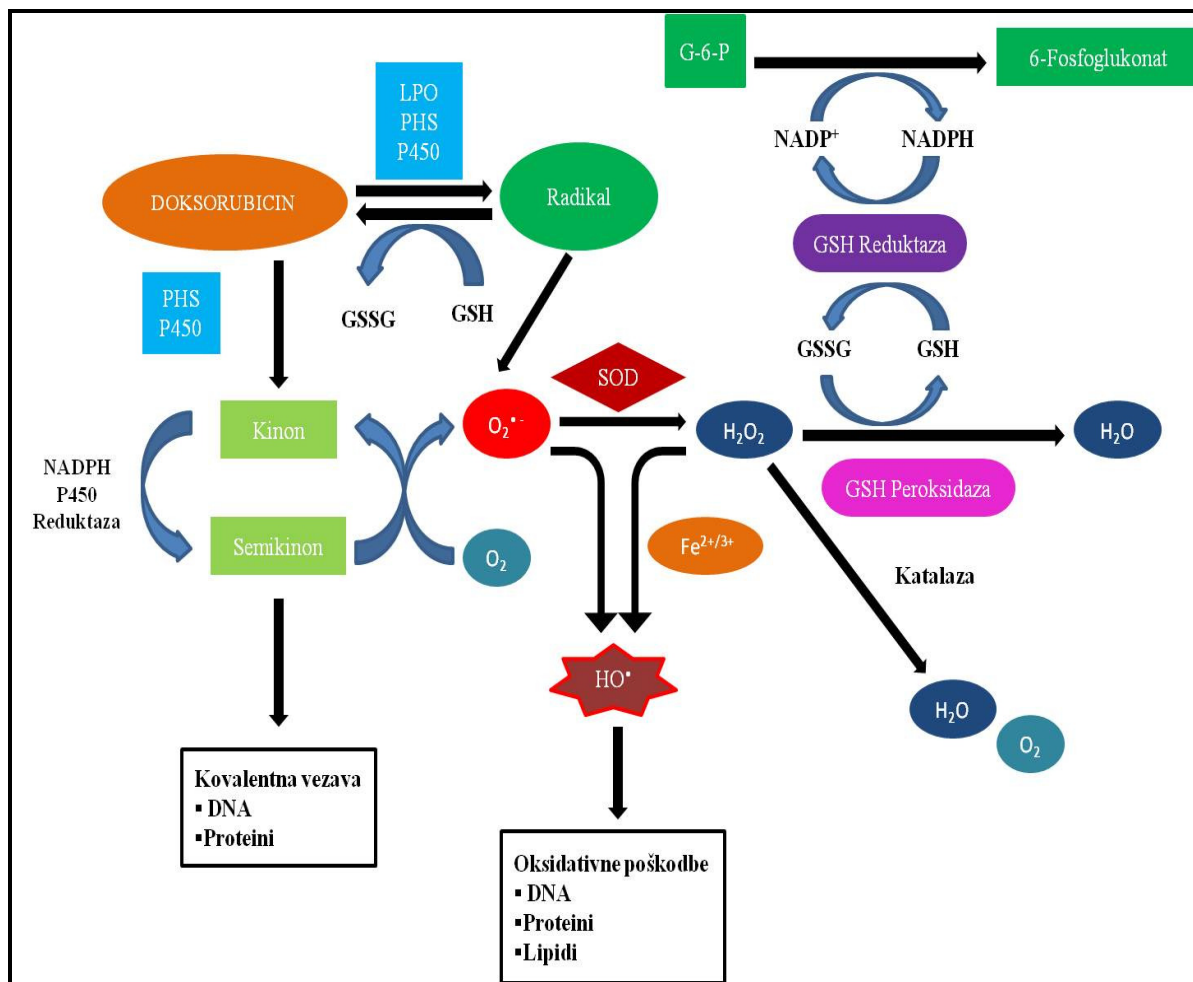
- Sečnina + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{Ureaza}}$  2NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>
- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 2 salicilat + OCl<sup>-</sup>  $\xrightarrow{[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}/\text{OH}^-}$  zeleno-modro obarvan kromofor

Absorbanco kromofora merimo spektrofotometrično in je sorazmerna s količino sečnine v vzorcu (19).

Določanje koncentracije kreatinina s pomočjo Jaffejeve metode:

- Kreatinin + pikrat  $\xrightarrow{\text{OH}^-}$  rdeče-oranžen kompleks

Absorbanco kompleksa merimo spektrofotometrično in je sorazmerna s količino kreatinina v vzorcu (20).



Slika 13: Shema oksidativnega stresa (21).

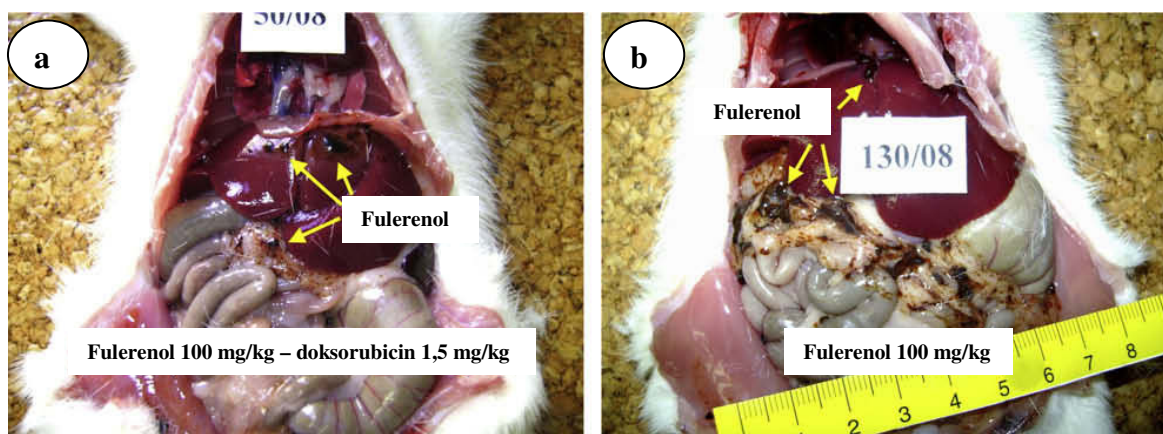
### 3.6. STATISTIČNA ANALIZA

Vrednosti so izražene kot srednja vrednost  $\pm$  standardni odklon (SD). ANOVA, ki mu je sledil LSD post hoc test (SPSS 15,0 za Windows), je bila uporabljena za primerjavo skupin, vrednosti  $p < 0.05$  so se štete za statistično značilne (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. MAKROSKOPSE SPREMEMBE

Z obdukcijo so odkrili, da se pri vseh skupinah podgan, ki so prejemale doksorubicin in/ali fulerenol pojavi oteklo tkivo jeter. Obdukcija je tudi razkrila, da se kar 20 % fulerenola pri uporabljenem najvišjem odmerku (100 mg/kg) ni absorbiralo zaradi velikosti delcev in slabe topnosti (Slika 9). Kopičenje neraztopljenega fulerenola v trebušni votlini (Sliki 14a – 14b) pa je odvisno od začetnega odmerka. Z zmanjšanjem odmerka s 100 na 25 mg/kg se je tudi delež nerazporejenega fulerenola zmanjšal. Fulerenol pri odmerku 100 mg/kg je pokazal tudi zaščitne učinke pri citotoksičnosti, povzročeni z dimetil sulfoksidom (DMSO). Protektivnost fulerenola na tkivo ledvic pri toksičnosti doksorubicina se je večala z manjšanjem odmerkov fulerenola (18). Rezultati potrjujejo znano dejstvo, da fulerenol deluje pri nizkih koncentracijah kot antioksidant, medtem ko imajo višje koncentracije že delno prooksidativno delovanje (1).



**Sliki 14a – 14b:** Makroskopske spremembe v trebušni votlini podgan, zdravljenih s fulerenolom – v predelu trebuha so vidni črni in rjavi delci fulerenola, predvsem na površini jeter ter v mezenterialni maščobi okoli jeter (18).

V nekaterih raziskavah so že dokazali, da lahko z uporabo drugih potencialnih antioksidantov, kot so etanolni ekstrakt *Solanum torvum* (solan), vodno-etanolni ekstrakt *Zingiber officinale* (zingiber) in feniletilni ester kavne kisline (CAPE), učinkovito zmanjšajo neželene stranske učinke doksorubicina na tkivo ledvic. Znanstveniki so v raziskavi na podganah sicer uporabili višje odmerke doksorubicina (enkratni odmerek doksorubicina v višini odmerka od 15 mg/kg do 67,75 mg/kg) in potrdili, da doksorubicin s

svojim delovanjem vpliva na ledvice in poškoduje njihovo tkivo. Z uporabo potencialnih antioksidantov (*Solanum torvum*, *Zingiber officinale*, *Caffeic acid phenethyl ester*) lahko zaščitimo ledvice pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom (22-24).

V preglednici 4 je predstavljena telesna masa podgan in koeficient ledvic po žrtvovanju. Glede na telesno maso smo koeficient ledvic izračunali kot razmerje med tkivom ledvic (mokra teža v mg) in telesno maso (g). Rezultati kažejo na značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

**Preglednica 4:** Telesna masa in koeficient ledvic.

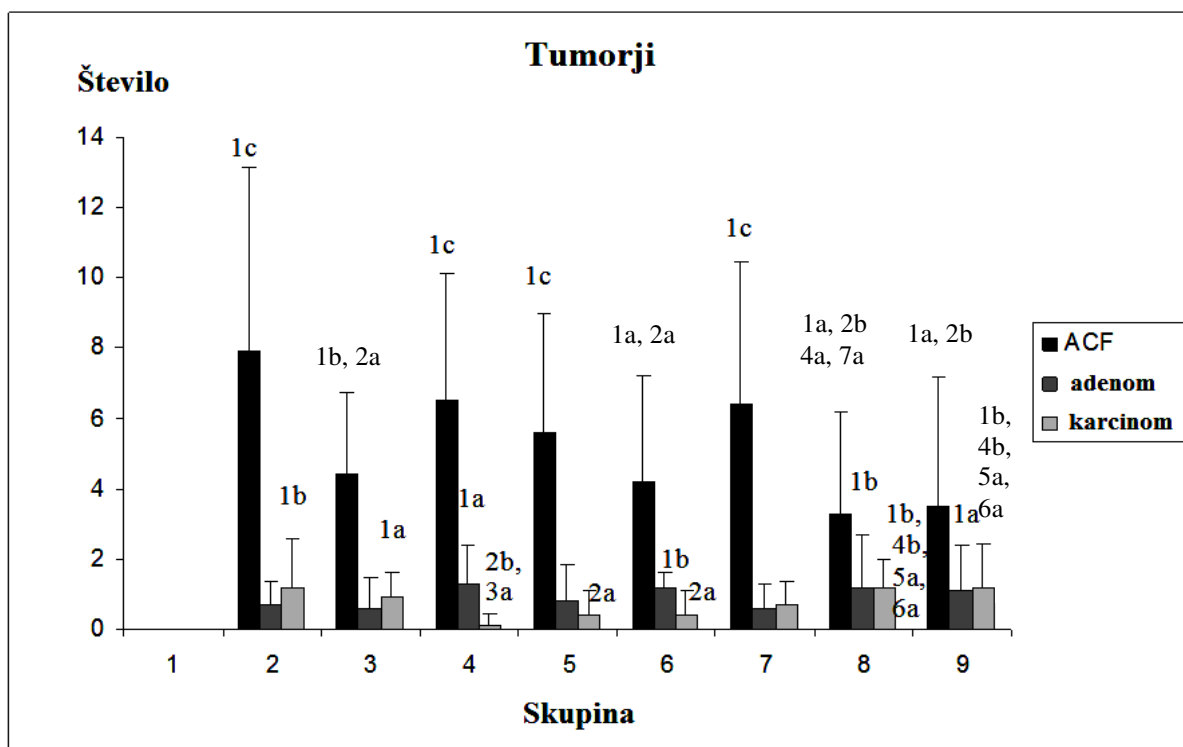
Skupina	Telesna masa (g)	Koeficient ledvic (mg/g)
1	526,4 ± 21,0	2,9 ± 0,1
2	410,1 ± 36,3 <sup>1c</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>1b</sup>
3	387,7 ± 15,6 <sup>1c</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>1c</sup>
4	390,4 ± 27,0 <sup>1c</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>1c</sup>
5	377,9 ± 26,0 <sup>1c2b</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>1c</sup>
6	368,5 ± 20,6 <sup>1c2b</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>1c</sup>
7	390,6 ± 33,2 <sup>1c</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>1c</sup>
8	399,0 ± 22,1 <sup>1c6a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>1c</sup>
9	434,1 ± 24,4 <sup>1c2a3c4c5c6c7c8b</sup>	3,9 ± 0,4 <sup>1c</sup>

Telesna masa se pri vseh skupinah od druge do devete statistično značilno razlikuje ( $p < 0.001$ ) od kontrolne zdrave skupine. Telesna masa pri podganah v navedenih skupinah se je torej statistično značilno zmanjšala glede na kontrolno zdravo skupino, ki je enkrat na teden prejela fiziološko raztopino. Pri podganah od tretje do sedme skupine, ki so dobivale doksorubicin, se je telesna masa najbolj znižala. Iz preglednice lahko tudi razberemo, da tako doksorubicin kot tudi fulerenol znižata telesno maso podganam, zato je največje znižanje telesne mase opaziti tudi pri skupinah, ki so prejemale oboje hkrati. Podganam s kemijsko povzročenim rakom, ki so prejemale izključno vitamin C, se je telesna masa najmanj zmanjšala.

Koeficient ledvic pri skupinah od tretje do vključno devete se je statistično značilno ( $p < 0.001$ ) povečal glede na prvo skupino. Najmanjše povečanje vrednosti koeficienta ledvic lahko opazimo pri drugi skupini. Glede na vrednosti, ki jih razberemo iz preglednice, opazimo da med drugo in deveto skupino ni večjih razlik, do povečanja koeficienta ledvic pa je najverjetneje prišlo zaradi *i.p.* aplikacije DMSO-ja. DMSO povzroča številne sistemske neželene učinke, med drugim tudi negativen vpliv na ledvice (25).

## 4.2. TUMORJI

Histopatološka analiza črevesja je pokazala, da fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  (100 mg/kg) in vitamin C kot antioksidanta zmanjšata razvoj spremenjenih kriptnih žarišč (ang. ACF »*aberrant crypt focuses*«), kar je v skladu z raziskavami, objavljenimi v preteklosti. Pri doksorubicinu je bilo dokazano, da na število preneoplastičnih lezij nima nobenega vpliva, ima pa vpliv na razvoj karcinoma. Pri podganah, zdravljenih z doksorubicinom, ki so predhodno dobivale tudi 100 mg/kg fulerenola, so rezultati pokazali še boljši zaščitni učinek pri pojavu karcinoma kot pri podganah, ki so bile zdravljene samo z doksorubicinom, kar je rezultat nekaterih *in vitro* študij fulerenola in njegove citotoksične aktivnosti na rakotvorne celice. Razlike v številu kolorektalnih tumorjev med preiskovanimi skupinami so prikazane na sliki 15 (18).



**Slika 15:** Razlike v številu kolorektalnih tumorjev med preiskovanimi skupinami. Številke kažejo na značilne razlike glede na določeno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ). Histološka ocena vzorcev tkiv je bila izvedena slepo, brez predhodnega poznavanja statusa vsake živali. Kriptna žarišča (ACF) so bila ocenjena po merilih, ki se rutinsko uporabljajo pri humani patologiji. Mikroskopske poškodbe, ki vsebujejo od 2 do 5 displastičnih kript, so razvrščene kot ACF poškodbe, sestavljene iz več kot pet displastičnih kript, pa so opredeljene kot adenom. Histološki kriteriji za določanje adenomov in karcinomov temeljijo na mednarodni klasifikaciji tumorjev pri glodavcih (18).

### 4.3. HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN AKTIVNOST SERUMSKIH ENCIMOV

Rezultati meritev bele krvne slike (levkociti) in rdeče krvne slike (eritrociti, hemoglobin, hematokrit in retikulociti) pri živalih, ki smo jih žrtvovali po treh tednih po prvi aplikaciji doksorubicina, fulerenola in/ali vitamina C, so prikazani v preglednici 5. Iz nje lahko razberemo statistično značilne spremembe nekaterih hematoloških parametrov v obdobju treh tednov (*Slika 10*). Primerjava posameznih hematoloških parametrov v obdobju treh tednov znotraj skupine (eksponenti pred vrednostmi, *Preglednica 5*) in primerjava med skupinami v okviru istega tedna (eksponenti za vrednostmi, *Preglednica 5*) ni pokazala tako značilne razlike, kot je bilo opisano v akutni fazi z doksorubicinom povzročene toksičnosti po enkratnem odmerku 8 mg/kg. Razlog za takšno razliko je lahko v uporabljenem odmerku doksorubicina, ki je v našem primeru bližje terapevtskemu odmerku (1,5 mg/kg/teden). Toksičnost enkratnega odmerka je zato manjša, kot je manjša tudi toksičnost zaradi daljšega časovnega obdobja, ki omogoča živalim, da se prilagodijo stresnim pogojem po aplikaciji zdravila. V obdobju treh tednov lahko opazimo pomembno razliko v vrednosti levkocitov glede na ostale skupine pri skupinah osem in devet, ki sta dobivali izključno fulerenol ali vitamin C (18). Do velikih statistično značilnih odstopanj prihaja tudi pri koncentracijah retikulocitov. Retikulociti so predstopnja eritrocitov, ki imajo še ostanke jedra, so nekoliko večji od zrelih eritrocitov in nakazujejo razvoj rdeče krvne slike. Najbolj se od ostalih skupin glede na isti teden razlikuje skupina sedem v drugem tednu; ta skupina je prejela doksorubicin in vitamin C. Skupine od četrte do sedme so dobivale doksorubicin in fulerenol v različnih odmerkih ali vitamin C in se glede na vrednosti retikulocitov statistično značilno razlikujejo tako od prve kot od druge skupine v tretjem tednu. Prav tako lahko opazimo porast vrednosti retikulocitov v vseh skupinah po treh tednih glede na prvi teden, izjema je peta skupina, ki je prejela doksorubicin in fulerenol 50 mg/kg/teden, kjer po drugem tednu opazimo velik padec vrednosti iz  $(1178 \pm 150) \times 10^9/L$  na  $(742 \pm 43) \times 10^9/L$  in nato precejšen porast na  $(998 \pm 228) \times 10^9/L$ , ki pa ne preseže vrednosti po prvem tednu.

Kar se tiče ostalih vrednosti (eritrociti, hemoglobin, hematokrit), ni večjih posebnosti. Pri vsaki aplikaciji agensov smo po sedmih dneh v obdobju treh tednov zbirali vzorce krvi za oceno vrednosti encimov LDH in  $\alpha$ -HBDH v serumu; podani so v preglednici 5. Poleg vrednosti samih encimov smo izračunali tudi razmerje med  $\alpha$ -HBDH/LDH (18).

**Preglednica 5: Hematološki parametri in vrednosti serumskih encimov med tedni znotraj skupine (eksponenti pred vrednostmi) in v okviru istega tedna med skupinami (eksponenti za vrednostmi). Številke kažejo na značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0.05; b:p < 0.01; c:p < 0.001); \*po prvi aplikaciji.**

Parameter	Teden*	Skupine								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Levkociti (x 10 <sup>9</sup> /L)	I	6,4±1,2	6,3±0,6	6,0±1,1	6,5±1,4	8,2±1,6 <sup>2a3a</sup>	6,4±0,7	6,5±1,9	9,7±1,8 <sup>1b2b3c4b6b7b</sup>	8,7±2,5 <sup>1a2a3c4b6a7a</sup>
	II	6,9±2,0	7,0±1,2	8,6±1,4	8,0±1,3	8,9±1,0	7,8±1,2	7,8±1,4	9,2±1,8	9,5±1,8
	III	5,9±0,6	6,8±1,1	6,9±1,5	6,5±0,7	6,9±1,1	6,6±0,9	6,4±0,9	7,3±1,4 <sup>1a</sup>	8,0±1,9 <sup>1c2a4b5a6a7b</sup>
Eritrociti (x 10 <sup>12</sup> /L)	I	9,1±0,4	8,4±0,3 <sup>1a</sup>	8,4±0,7 <sup>1a</sup>	8,9±0,4	8,7±0,4	8,3±0,2 <sup>1b1a</sup>	8,3±0,6 <sup>1b4a</sup>	8,6±0,3	8,6±0,6
	II	8,6±0,5	8,1±1,3	8,0±1,2	8,7±0,5	8,8±0,5	7,8±0,3 <sup>5a</sup>	7,9±0,5	8,3±0,2	8,4±0,8
	III	8,6±0,6	8,3±1,4	7,9±0,7 <sup>1a</sup>	8,4±0,3	8,3±0,3	8,4±0,5	7,8±0,7 <sup>1a</sup>	8,2±0,7	8,4±0,4
Hemoglobin (g/dL)	I	158,5±7,4	147,2±7,9 <sup>1a</sup>	154,5±8,1	156,0±6,1	156,6±8,9 <sup>2a</sup>	153,6±1,5	153,2±5,1	158,2±4,8 <sup>2a</sup>	158,4±9,9 <sup>2a</sup>
	II	154,3±13,2	145,6±19,8	147,8±11,0	157,4±9,7	159,4±6,1 <sup>2a</sup>	146,2±2,6	145,8±8,4	156,0±4,7	153,4±10,8
	III	151,9±5,9	149,7±15,7	146,2±9,3	150,6±5,7	147,8±7,8	151,3±8,3	143,0±13,4	149,6±12,1	150,3±8,7
Hematokrit (%)	I	0,5±0,0	0,4±0,0 <sup>c</sup>	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0 <sup>1b</sup>	0,4±0,0 <sup>1b</sup>	0,5±0,0	0,5±0,0 <sup>2a7a</sup>
	II	0,5±0,0	0,4±0,1 <sup>1a</sup>	0,4±0,0 <sup>1a</sup>	0,5±0,0	0,5±0,0 <sup>2a</sup>	0,4±0,0 <sup>1b5a</sup>	0,4±0,0 <sup>1b4a5a</sup>	0,5±0,0	0,5±0,0
	III	0,5±0,0	0,5±0,1 <sup>1a</sup>	0,4±0,0 <sup>1b</sup>	0,5±0,0	0,4±0,0 <sup>1a</sup>	0,4±0,0 <sup>1a</sup>	0,4±0,0 <sup>1c2a6a</sup>	0,5±0,0	0,5±0,0 <sup>7a</sup>
Retikuloцити (x 10 <sup>9</sup> /L)	I	612±86	603±176	662±303	808±325	1178±150 <sup>1c2c3c4b</sup>	958±224 <sup>1b2b3b5a</sup>	819±54 <sup>2a3b</sup>	691±82 <sup>5c6b</sup>	574±67 <sup>4a5c6b7a</sup>
	II	663±103	650±106	697±168	741±77	742±43	798±153 <sup>2a</sup>	949±180 <sup>1b2c3b4b5b6a</sup>	767±123 <sup>7a</sup>	677±76 <sup>7a</sup>
	III	749±40	745±86	774±172	899±204 <sup>1a2a</sup>	998±228 <sup>1b2c3b</sup>	982±259 <sup>1b2b3b</sup>	1013±170 <sup>1b2c3b</sup>	714±75 <sup>4b5c6c7c</sup>	615±79 <sup>3b4c5c6c7c</sup>
LDH (U/L)	I	1048±278	429±93 <sup>1b</sup>	962±68 <sup>2a</sup>	1558±302 <sup>1a2c3b</sup>	1239±318 <sup>2b4a</sup>	1006±152 <sup>2b4b</sup>	1502±431 <sup>1a2c3b5c6b</sup>	1093±274 <sup>2b4c7b</sup>	1054±393 <sup>2b4b7b</sup>
	II	829±104	1190±333 <sup>1a</sup>	1311±29 <sup>1b</sup>	1086±152	977±327 <sup>2a3b</sup>	1083±307 <sup>1b5a</sup>	545±316 <sup>1b2c3c4c5c6c</sup>	658±169 <sup>2c3c4b6c</sup>	631±246 <sup>2c3c4b5c6c</sup>
	III	295±79	426±154 <sup>1a</sup>	322±81	262±62 <sup>2b</sup>	246±66 <sup>2b</sup>	210±46 <sup>2c3a</sup>	529±215 <sup>1b3a4c5c6c</sup>	269±58 <sup>2b3a7c</sup>	407±116 <sup>4a5b6b7a8b</sup>
α-HBDH/ LDH (U/L)	I	513±182	238±47 <sup>1b</sup>	322±40	529±116 <sup>2c3b</sup>	294±76 <sup>1a4b</sup>	298±58 <sup>1a4b</sup>	538±104 <sup>2c3b5b6b</sup>	288±59 <sup>1a4c7c</sup>	303±110 <sup>1a4b7b</sup>
	II	361±96	377±74	451±93	344±49 <sup>3a</sup>	368±3 <sup>3b</sup>	344±43 <sup>3a</sup>	156±56 <sup>1c2c3c4c5b6c</sup>	180±43 <sup>1b2c3c4b5a6b</sup>	151±25 <sup>1c2c3c4c5b6c</sup>
	III	176±45	151±57	134±23 <sup>1a</sup>	103±13 <sup>1c2a</sup>	103±23 <sup>1c2a</sup>	102±29 <sup>1c2b3a</sup>	214±63 <sup>2b3b4c5c6c</sup>	171±19 <sup>1b2c3c4b5a6b</sup>	103±25 <sup>1c2a7c</sup>
α-HBDH/ LDH (U/L)	I	0,44±0,18	0,58±0,14 <sup>1a</sup>	0,33±0,04 <sup>2c</sup>	0,34±0,03 <sup>2c</sup>	0,26±0,03 <sup>1b2c</sup>	0,28±0,01 <sup>1b2c</sup>	0,33±0,02 <sup>2c</sup>	0,27±0,04 <sup>1b2c</sup>	0,33±0,05 <sup>1a2c</sup>
	II	0,43±0,07	0,34±0,05 <sup>1b</sup>	0,35±0,04 <sup>1a</sup>	0,32±0,02 <sup>1b</sup>	0,35±0,04 <sup>1a</sup>	0,29±0,02 <sup>1c</sup>	0,37±0,03 <sup>6a</sup>	0,31±0,07 <sup>1b</sup>	0,28±0,07 <sup>1b7a</sup>
	III	0,67±0,10	0,33±0,06 <sup>1c</sup>	0,34±0,08 <sup>1c</sup>	0,37±0,09 <sup>1c</sup>	0,35±0,05 <sup>1c</sup>	0,44±0,11 <sup>1c2a</sup>	0,39±0,08 <sup>1c</sup>	0,33±0,06 <sup>1c</sup>	0,41±0,15 <sup>1c</sup>



Laktatna dehidrogenaza (LDH) je encim, ki ga najdemo v jetrih, srcu, ledvicah in skeletnih mišicah v visokih koncentracijah, zastopan pa je tudi v drugih tkivih. Obstaja najmanj pet različnih izoencimov, ki se jih lahko loči s pomočjo elektroforeze. Vsak izmed njih je značilen za določeno tkivo, njihovo diferencialno določanje pa ima visoko diagnostično vrednost. Povišane vrednosti LDH nakazujejo na ledvično odpoved, miokardni infarkt, anemije, hepatitis, maligna obolenja ali poškodbo skeletnih mišic.  $\alpha$ -HBDH je eden izmed izoencimov LDH in se v primerjavi z ostalimi izoencimi pogosteje pojavlja v višjih koncentracijah v mišičnem tkivu srca (26).

Po tretjem tednu zdravljenja s terapevtskim odmerkom doksorubicina (1,5 mg/kg/teden) lahko na podlagi rezultatov (*Preglednica 5*) sklepamo, da je v organizmu testiranih podgan prišlo do adaptacije biokemičnih poti v ledvicah, kar je razvidno iz aktivnosti LDH in  $\alpha$ -HBDH (18). Pri zdravi kontrolni skupini opazimo velik padec vrednosti za LDH in  $\alpha$ -HBDH znotraj skupine. Po prvem tednu so vrednosti obeh encimov precej visoke, kar je najverjetneje posledica stresa zaradi *i.p.* aplikacije fiziološke raztopine. Podgane iz ostalih skupin so 15 tednov prejemale *i.p.* apliciran DMH in so se v tem času navadile na ljudi in aplikacijo agensov. Za podgane iz kontrolne zdrave skupine pa je sama aplikacija fiziološke raztopine pomenila velik stres in posledično visoke koncentracije encimov, ki pa so se hitro znižale in dokaj normalizirale v tretjem tednu. Po tretjem tednu je imela najvišje vrednosti LDH in  $\alpha$ -HBDH sedma skupina (vitamin C (100 mg/kg/teden) 30 minut pred aplikacijo doksorubicina). Skupine, ki so prejemale fulerenol (4, 5, 6 in 8) imajo vrednosti merjenih encimov LDH in  $\alpha$ -HBDH po treh tednih precej nižje od ostalih skupin. Za te skupine obstaja v tretjem tednu statistično značilna razlika v koncentraciji obeh encimov glede na drugo skupino, kar pomeni, da fulerenol sam ali v kombinaciji z doksorubicinom ugodno vpliva na upad koncentracij preiskovanih encimov. Če gledamo znotraj posameznih skupin, opazimo, da so v prvi, tretji in v že prej navedenih skupinah vrednosti preiskovanih encimov v tretjem tednu statistično značilno nižje glede na prvi in drugi teden. Sedma skupina najbolj izstopa izmed vseh skupin, saj se po vrednostih samega LDH in njegovega izoencima  $\alpha$ -HBDH v vseh tednih statistično značilno razlikuje skoraj od vseh skupin. Najnižjo vrednost LDH smo v tretjem tednu določili pri šesti skupini, ki je poleg doksorubicina prejemala najnižji odmerek fulerenola, najnižjo vrednost  $\alpha$ -HBDH pa pri skupini osem, ki je prejemala samo fulerenol. Z izračunom razmerja  $\alpha$ -HBDH/LDH (*Preglednica 5*) lahko ugotovimo, ali gre za poškodbe jeter ali za poškodbe srca oz. zmanjšanje ledvične funkcije. V primeru zmanjšanja vrednosti razmerja gre predvsem za

poškodbe jetrnega parenhima, kadar pa pride do povečanja LDH brez večjih sprememb  $\alpha$ -HBDH in posledično do povišanja vrednosti razmerja, pa je prišlo do obsežnih poškodb tkiva ledvic, srca in jeter (13). Po treh tednih se vrednosti razmerja  $\alpha$ -HBDH/LDH vseh preiskovanih skupin statistično značilno razlikujejo od prve skupine ob predpostavki  $p < 0.001$ , kar je povezano z načinom aplikacije (*i.p.*), makro poškodbami in tudi s kumulativnim učinkom fulerenola. Na podlagi teh dveh encimov ni možno zaključiti, kateri nivo poškodbe ledvic je prisoten v našem primeru (18).

V preglednici 6 so predstavljene serumske vrednosti sečnine in kreatinina po treh tednih. Pri sečnini med skupinami ni večjih statistično značilnih razlik, izjema je deveta skupina, kar je najverjetneje posledica *i.p.* aplikacije vitamina C kot kislega agensa, ki povzroči porast koncentracije sečnine. Nižja kot je koncentracija fulerenola, nižjo vrednost sečnine smo določili. Šesta skupina, ki je prejela doksorubicin in najnižjo koncentracijo fulerenola, je imela primerljive rezultate zdravi kontrolni skupini.

Pri kreatininu smo najnižjo vrednost določili tretji skupini, ki je prejela le doksorubicin in je statistično značilno različna v primerjavi z vsemi skupinami od pete do devete skupine. Od skupin, ki so prejemale fulerenol, je zdravi kontrolni skupini najbolj primerljiva četrta skupina (doksorubicin in fulerenol 100 mg/kg/teden). Glede na rezultate za vrednosti kreatinina ni nobene logične znanstvene razlage.

Poleg ostalih poškodb na ledvicah povzroči doksorubicin dvig koncentracije kreatinina v plazmi, v našem primeru pa se je koncentracija znižala (14). V literaturi najdemo dokaze, da pri aplikaciji doksorubicina (15 mg/kg do 67,75 mg/kg – kumulativni ali enkratni odmerki) pride do povišanja koncentracije kreatinina v plazmi. Pri višjih odmerkih doksorubicina se koncentracija kreatinina tudi bolj poveča, in sicer za faktor 2,8. V literaturi najdemo dokaze, da določeni antioksidanti (etanolni ekstrakt *Solanum torvum* in *Zingiber officinale*) ter nekatere zdravilne učinkovine (*telmisartan*, *kaptopril*) ob sočasni uporabi doksorubicina ne povzročijo dviga koncentracije kreatinina v plazmi, same vrednosti pa so primerljive zdravi kontrolni skupini (22,23,27).

**Preglednica 6:** Učinek fulerenola na vrednosti sečnine in kreatinina pri podganah na nivoju ledvic, pri toksičnosti, povzročeni z doksorubicinom. Številke kažejo na statistično značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

Parameter Skupina	Sečnina (mmol/L)	Kreatinin ( $\mu$ mol/L)
1	6,18 $\pm$ 0,84	35,90 $\pm$ 5,09
2	7,30 $\pm$ 1,16 <sup>1a</sup>	37,59 $\pm$ 7,36
3	6,86 $\pm$ 1,06	31,70 $\pm$ 3,48
4	6,85 $\pm$ 1,00	34,10 $\pm$ 5,88
5	6,62 $\pm$ 0,59	38,64 $\pm$ 4,37 <sup>3a</sup>
6	6,21 $\pm$ 0,77 <sup>2b</sup>	42,94 $\pm$ 8,91 <sup>1a,3b,4b</sup>
7	6,54 $\pm$ 0,93	41,18 $\pm$ 8,01 <sup>3b,4a</sup>
8	7,02 $\pm$ 0,58	43,43 $\pm$ 9,88 <sup>1a,3b,4b</sup>
9	7,63 $\pm$ 1,06 <sup>1b,5a,6b,7b</sup>	40,35 $\pm$ 10,01 <sup>3a</sup>

#### 4.4. OKSIDATIVNI STATUS

Pri oksidativnem stresu pride v celici do prevlade prooksidativnih procesov nad antioksidativnimi, kar lahko vodi do oksidativnih poškodb (*Slika 13*). Oksidativni stres je posledica zmanjšanja količine antioksidantov v telesu, povečanega vnosa železovih in nekaterih drugih kovinskih ionov ali povečane produkcije RKS. Ob prekomernem generiranju RKS, vključno s superoksidnim anionom ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilnim radikalom, vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ) in singletnim kisikom, lahko pride do poškodb celic. RKS napadajo polinenasičene maščobne kisline v lipidnih membranah, genski material in lipide. Po do sedaj znanih podatkih poškoduje doksorubicin ledvice z oksidativnimi procesi (10,13).

Tako imenovana prva obrambna zaščita pred radikali so antioksidantni encimi:

- Superoksidna dismutaza (EC 1.15.1.1, SOD) pretvori visoko reaktivni superoksidni radikal ( $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) do manj reaktivnega  $H_2O_2$ , ki ga lahko odstranijo katalaze ali peroksidaze. Metode za določanje aktivnosti SOD temeljijo večinoma na kemičnih reakcijah s standardnimi komercialnimi reagenti. Njihove produkte določamo spektrofotometrično (26).
- Katalaza (EC 1.11.1.6, CAT) katalizira reakcijo pretvorbe  $H_2O_2$  do vode in molekularnega kisika ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ). Za določanje CAT so na voljo komercialni reagenti, postopek določanja pa temelji na prekinitvi reakcije z dodajanjem inhibitorja. Preostanek  $H_2O_2$  oksidira določen kromogen s pomočjo hrenove peroksidaze (HRP), dobimo modro obarvan kromofor, ki ga določimo spektrofotometrično (26).

- Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.19, GSH-Px) odstranjuje  $H_2O_2$  tako, da ga porablja za oksidacijo glutationa (GSH):  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ . Aktivnost GSH-Px se lahko določi z merjenjem hitrosti nastajanja oksidiranega glutationa (GSSG) s t-butilhidroperoksidom kot primernim encimskim substratom. GSSG oksidira NADPH v  $NADP^+$ , spremembo absorbance pa spremljamo s spektrofotometrom. Redoks cikel glutationa je glavni vir zaščite pred nizko stopnjo oksidativnega stresa, CAT pa je bolj pomembna na področju zaščite pri močnejšem oksidativnem stresu. Zaradi veliko manjše afinitete katalaze do  $H_2O_2$ , kot jo ima GSH-Px, je GSH-Px pri živalskih celicah in človeških eritrocitih dolgo časa veljal kot glavni antioksidantni encim za razstrupljanje  $H_2O_2$ .

- Glutation–disulfid reduktaza (EC 1.8.1.7, GR) pa je encim, ki je pomemben za ohranjanje razmerja med reducirano in oksidirano obliko glutationa. Omogoča pretvorbo oksidirane oblike glutationa do njegove reducirane oblike:  $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ . Določanje koncentracije poteka spektrofotometrično (26).

Tkivne koncentracije TP, LDH, GSH, GSSG, MDA in aktivnost antioksidantnih encimov SOD, GSH-Px, GR in CAT smo izmerili zaradi ocene vpliva fulerenola in vitamina C na oksidativni stres, povzročen z doksorubicinom na tkivo ledvic (*Preglednica 7, Slika 16 in Slika 17*). Skupna koncentracija proteinov (TP) v tkivu ledvic je pri vseh skupinah statistično gledano nespremenjena, razen pri skupini 3 (doksorubicin 1,5 mg/kg/teden) je vrednost TP statistično značilno nižja od vrednosti kontrolne zdrave skupine ob predpostavki  $p < 0.05$ . Pri vrednostih LDH (*Preglednica 7*), ki smo jih določili v tkivu ledvic, lahko opazimo precejšnje razlike med skupinami. Doksorubicin sam ali v kombinaciji s fulerenolom oziroma z vitaminom C je povzročil intenziven porast LDH, in sicer tudi do dvajsetkratno povečanje glede na vrednosti kontrolne zdrave skupine. Izjema je šesta skupina, ki je poleg doksorubicina prejemale najnižji odmerek fulerenola. Vrednosti LDH pri omenjeni šesti skupini ter osmi in deveti skupini so statistično značilno primerljive prvi in drugi preiskovalni skupini.

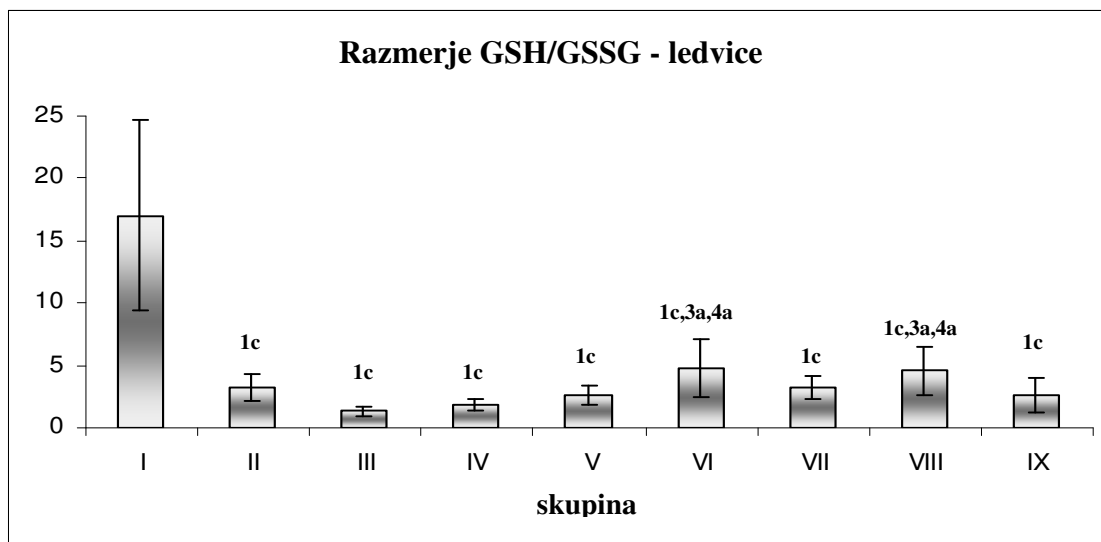
Glede na kontrolno zdravo skupino so se vrednosti vseh antioksidantnih encimov po treh tednih povečale, kar je posledica dolgoročnega zdravljenja z agensi. Večja, kot je bila produkcija RKS zaradi apliciranih agensov, bolj so narasle koncentracije antioksidantnih encimov zaradi adaptacije organizma na povečane koncentracije RKS. Pri vrednostih SOD opazimo, da sam doksorubicin oziroma v kombinaciji z vitaminom C najbolj poviša njene vrednosti. Skupine, ki so kakorkoli prejemale fulerenol, pa izkazujejo najboljše rezultate.

Podobno velja za vrednosti GSH-Px, najvišje vrednosti smo določili pri skupini, ki je prejela samo doksorubicin ali samo vitamin C. Skupine, ki so kakorkoli prejemale fulerenol, izkazujejo najboljše rezultate, pri šesti skupini opazimo celo nižje vrednosti kot pri zdravi kontrolni skupini. Pri vrednostih GR opazimo podobne rezultate za najvišje in najnižje vrednosti pri istih skupinah kot pri SOD in GSH-Px, vendar pa rezultati skupin, ki so kakorkoli prejemale fulerenol, niso primerljivi zdravi kontrolni skupini, kljub temu da so v teh skupinah vrednosti nižje kot pri ostalih. Kar se tiče rezultatov CAT, pa smo najvišje vrednosti določili skupini, ki je hkrati prejela doksorubicin in vitamin C, ponovno pa smo najnižje vrednosti določili skupinam, ki so kakorkoli prejemale fulerenol. Pri šesti skupini smo tudi pri vrednostih CAT določili rezultate, primerljive zdravi kontrolni skupini.

**Preglednica 7:** Učinek fulerenola na različne parametre oksidativnega stresa pri podganah na nivoju ledvic pri toksičnosti povzročeni z doksorubicinom. Številke kažejo na statistično značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

Skupina	TP g/L	LDH U/L	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (U/g protein)	GR (U/g protein)	CAT (U/mg protein)
1	19,5±7,6	36,1±11,6	1,1±0,4	46,9±21,5	4,6±2,9	2,4±1,0
2	15,6±5,3	42,8±8,5	1,9±0,6 <sup>1b</sup>	70,9±15,2	9,7±3,3 <sup>1b</sup>	4,6±2,5 <sup>1a</sup>
3	12,9±4,7 <sup>1a</sup>	277,4±116,2 <sup>1b,2b</sup>	2,7±0,7 <sup>1c,2a</sup>	100,9±21,0 <sup>1c,2a</sup>	14,3±3,9 <sup>1c,2b</sup>	7,3±2,8 <sup>1c,2b</sup>
4	17,2±8,6	399,3±315,1 <sup>1c,2c</sup>	1,9±0,8 <sup>1b,3b</sup>	53,2±21,4 <sup>3c</sup>	10,2±4,4 <sup>1b,3b</sup>	6,0±2,8 <sup>1b</sup>
5	15,2±6,0	723,8±241,7 <sup>1c,2c,3c,4c</sup>	1,9±0,7 <sup>1b,3b</sup>	59,7±19,2 <sup>3c</sup>	9,8±2,5 <sup>1b,3b</sup>	6,4±1,5 <sup>1b</sup>
6	17,1±6,9	46,1±21,3 <sup>3b,4c,5c</sup>	1,8±0,5 <sup>1a,3b</sup>	42,1±21,3 <sup>2a,3c</sup>	9,8±2,0 <sup>1b,3b</sup>	2,8±1,7 <sup>3c,4b,5b</sup>
7	13,9±4,0	474,9±149,6 <sup>1c,2c,3a,5b,6c</sup>	2,5±0,3 <sup>1c,6a</sup>	85,7±35,0 <sup>1b,4b,5a,6b</sup>	12,4±2,8 <sup>1c</sup>	8,0±1,3 <sup>1c,2b,6c</sup>
8	14,0±3,2	33,9±17,9 <sup>3b,4c,5c,7c</sup>	1,8±0,3 <sup>1a,3b,7a</sup>	50,5±13,4 <sup>3c,7b</sup>	12,0±1,8 <sup>1c</sup>	4,3±0,8 <sup>3b,7b</sup>
9	15,5±5,6	32,1±10,2 <sup>3b,4c,5c,7c</sup>	2,2±0,5 <sup>1c</sup>	109,0±22,1 <sup>1c,2b,4c,5c,6c,7a,8c</sup>	13,6±1,6 <sup>1c,2b,4a,5a,6a</sup>	7,6±1,3 <sup>1c,2b,6c,8b</sup>

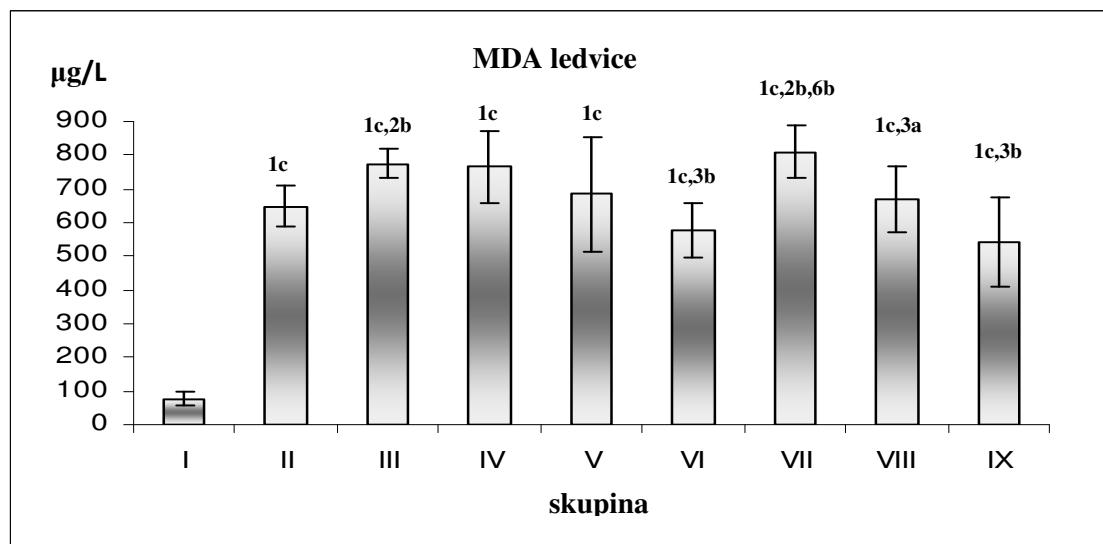
Splošno gledano izkazuje najboljše rezultate šesta skupina, ki je poleg doksorubicina prejela najnižje koncentracije fulerenola. Pri tej skupini opazimo, da je povečanje koncentracij vseh antioksidantnih encimov glede na kontrolno zdravo skupino najmanjše, kar pomeni, da je pri tej skupini prišlo tudi do najmanjše produkcije RKS zaradi aplikacije agensov.



**Slika 16:** Razmerje prostega GSH/GSSG v ledvicah. Številke kažejo na statistično značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

Glutation (GSH) je tripeptid, sestavljen iz glutaminske kisline, cisteina in glicina. Poleg funkcije kofaktorja za GSH-Px je vključen tudi v druge metabolične procese. V zdravem organizmu je več kot 90 % glutaciona v krvi ugotovljeno kot prostega glutaciona, tako da je razmerje GSH/GSSG običajno večje od 10/1. Sprememba tega ravnovesja v prid oksidirane glutaciona (GSSG) kaže na povečano generiranje radikalov in je pokazatelj povečanja oksidativnega stresa (26).

Iz slike 16 je razvidno, da je glede na kontrolno zdravo skupino pri vseh skupinah prišlo do statistično značilnega zmanjšanja razmerja prostega GSH/GSSG v ledvicah, ob predpostavki  $p < 0.001$ . Zmanjšanje razmerja prostega GSH/GSSG v ledvicah je pri vseh skupinah zelo izrazito, kar je najverjetneje posledica *i.p.* aplikacije DMSO-ja, zato je zagotavljanje zadostne zaščite ledvičnega tkiva proti oksidativnem stresu zelo zmanjšano. Najmanjši padec vrednosti razmerja zasledimo pri skupini, ki je poleg doksorubicina prejela najmanjši odmerek fulerenola. Opazimo tudi statistično značilno razliko med skupinama tri (samo doksorubicin) in štiri (doksorubicin in najvišji odmerek fulerenola) ter skupinama šest in osem (samo fulerenol) ob predpostavki  $p < 0.05$ .



**Slika 17:** Vrednosti MDA v ledvicah. Številke kažejo na statistično značilne razlike glede na ustrezno skupino (a:  $p < 0.05$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p < 0.001$ ).

Malondialdehid (MDA) je eden najbolj poznanih toksičnih sekundarnih produktov lipidne peroksidacije in se najpogosteje uporablja kot pokazatelj oksidativnih poškodb celic in tkiva. MDA pripomore k poškodbi DNA in nastanku mutacij, ki nastanejo endogeno preko lipidne peroksidacije (28). Najbolj razširjena metoda za določanje MDA je spektrofotometrična. S spektrofotometrom določamo kompleks MDA-tiobarbiturna kislina (MDA-TBA), ki je roza barve. Kompleks nastane pri reakciji MDA s tiobarbiturno kislino pri nizkem pH in pri povišani temperaturi. Temelj reakcije je napad monoenolne oblike MDA na aktivno metilensko skupino tiobarbiturne kisline. Koncentracijo MDA določimo na podlagi različne intenzitete obarvanosti kompleksa (26).

Iz slike 17 je razvidno, da je glede na kontrolno zdravo skupino pri vseh preiskovanih skupinah prišlo do statistično značilnega povečanja koncentracije MDA, torej je pri vseh skupinah prišlo do lipidne peroksidacije. Najmanj se je povečala koncentracija MDA skupini, ki je poleg doksorubicina prejela najnižjo koncentracijo fulerenola, in skupini, ki je prejela samo vitamin C.

#### 4.5. PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV OZIROMA ZDRAVILNIH UČINKOVIN PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA NA LEDVICE

Številne raziskave potrjujejo, da doksorubicin negativno vpliva na ledvično tkivo, kar privede do odpovedi ledvic. Doksorubicin tvori z železovimi ioni kompleks, ki je odgovoren za nastanek radikalov. Pri zdravljenju z doksorubicinom pride do povečanja oksidativnega stresa v organizmu zaradi nastanka RKS in s tem tudi do poškodb tkiva (14). Spojine z antioksidativnim delovanjem lahko ugodno vplivajo na zaščito organizma in posamezne organe, med drugim tudi ledvice, saj zmanjšajo poškodbe, ki so nastale zaradi RKS. Te spojine so lahko naravnega izvora ali pa so zdravilne učinkovine (*Preglednica 8*) in ščitijo ledvice pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom (24).

V naši raziskavi smo proučili učinke fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  v odmerkih 25, 50 in 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov na ledvično tkivo podgan s kolorektalnim rakom. Poskuse smo izvedli *in vivo* na modelu podgan samcev vrste *Wistar* in proučili, ali lahko fulerenol prepreči nastanek kroničnih nefrotoksičnosti, povzročenih z doksorubicinom v odmerku 1,5 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Rezultate smo primerjali z učinki dobro poznanega antioksidanta vitamina C (100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov). Za boljšo primerjavo smo v preglednici 8 navedli še nekatere naravne antioksidante in zdravilne učinkovine ter jih primerjali med seboj. Vse spojine, navedene v preglednici, se statistično značilno razlikujejo od skupine, ki je prejela samo doksorubicin. V naši preglednici smo naredili primerjavo glede na zdravo kontrolno skupino.

Pri vseh substancah so se vrednosti MDA povišale, kar pomeni, da je povsod prišlo do lipidne peroksidacije v ledvicah zaradi aplikacije doksorubicina. Vrednosti MDA so pri podganah, ki so poleg doksorubicina prejemale etanolni ekstrakt *Zingiber officinale* in Vitamin E, ostale primerljive kontrolni zdravi skupini. To je verjetno posledica kratkotrajne raziskave, saj je bil tudi pri skupini, ki je prejela samo doksorubicin, porast koncentracije MDA zanemarljiv v primerjavi z našo raziskavo, kjer se je koncentracija MDA povečala do 10-krat v primerjavi z zdravo kontrolno skupino. Kar se tiče vrednosti SOD, so se pri naši raziskavi zaradi adaptacijskih mehanizmov organizma vrednosti malce povečale, vendar v manjši meri kot pri skupini, ki je prejela le doksorubicin. Pri ostalih substancah smo prišli do podobne ugotovitve. Učinkovina, ki ugodno vpliva na ledvice,



povzroči rahel porast koncentracije SOD glede na zdravo kontrolno skupino. Po pričakovanih zaradi kratkotrajne raziskave in počasnih adaptacijskih mehanizmov organizma pride pri etanolnem ekstraktu *Zingiber officinale* in Vitaminu E do znižanja vrednosti SOD, vendar v manjši meri kot pri skupini, ki je prejela samo doksorubicin. Med zdravilnimi učinkovinami najslabše rezultate izkazuje nitredipin, saj so se vrednosti SOD znižale še bolj kot pri skupini, ki je prejela le doksorubicin. Pri vrednostih GSH-Px opazimo rahla odstopanja navzgor in navzdol v primerjavi z zdravo kontrolno skupino, vendar brez posebnosti. Vse substance kažejo izrazito statistično značilno razliko v primerjavi s skupino, ki je prejela le doksorubicin. Pri pregledu vrednosti CAT opazimo, da so njene koncentracije pri vseh substancah primerljive oziroma rahlo povišane glede na zdravo kontrolno skupino. Pri etanolnem ekstraktu *Solanum torvum* opazimo znižanje vrednosti CAT, kar je verjetno posledica visokega odmerka doksorubicina (67,75 mg/kg), znižanje vrednosti pa je še vedno manjše kot pri skupini, ki je prejela samo doksorubicin. Pri sečnini opazimo, da je večina vrednosti primerljivih zdravi kontrolni skupini, izjema so vrednosti pri etanolnem ekstraktu *Solanum torvum*, kjer so koncentracije sečnine povišane zaradi visokega odmerka doksorubicina. Od zdravilnih učinkovin slabše rezultate dajeta nifedipin in nitredipin, saj so tudi tukaj vrednosti sečnine povišane. Kar se tiče vrednosti serumskega kreatinina (SCr), so se koncentracije v vseh primerih rahlo povišale ali pa so primerljive zdravi kontrolni skupini. Ponovno slabše rezultate izkazuje nifedipin in nitredipin, pri katerih je bilo povečanje vrednosti precej izrazito (22-24, 27, 29).

**Preglednica 8:** Primerjava različnih antioksidantov/zdravilnih učinkovin glede na vrednosti MDA, SOD, GSH-Px, CAT, sečnine in SCr v primerjavi s kontrolno zdravo skupino (povečanje koncentracije ↑ oz. zmanjšanje koncentracije ↓ ali brez večjih sprememb koncentracije =). Znak x pomeni, da v raziskavi ni na voljo podatka.

Uporabljeni antioksidant oz. zdravilna učinkovina	Odmerek doksorubicina	Uporabljeni model <i>in vivo</i>	Ocena vrednosti glede na kontrolno zdravo skupino						
			MDA	SOD	GSH-Px	CAT	Sečnina	SCr	Referenca
Fulerenol 100 mg/kg/teden (4.skupina)	1,5 mg/kg/teden <i>i.p.</i> 3 tedne	Samci podgan <i>Wistar</i>	↑	↑	=	↑	=	=	Naša raziskava
Fulerenol 50 mg/kg/teden (5.skupina)	1,5 mg/kg/teden <i>i.p.</i> 3 tedne	Samci podgan <i>Wistar</i>	↑	↑	=	↑	=	=	Naša raziskava

Fulerenol 25 mg/kg/teden (6.skupina)	1,5 mg/kg/teden <i>i.p.</i> 3 tedne	Samci podgan <i>Wistar</i>	↑	↑	=	=	=	↑	Naša raziskava
Vitamin C 100 mg/kg/teden (7.skupina)	1,5 mg/kg/teden <i>i.p.</i> 3 tedne	Samci podgan <i>Wistar</i>	↑	↑	↑	↑	=	=	Naša raziskava
Etanolni ekstrakt <i>Solanum torvum</i> (100 mg/kg, <i>p.o.</i> ) dnevno-4 tedne	67,75 mg/kg, <i>i.v.</i> 2 dneva pred žrtvovanjem	Podgane <i>Wistar</i>	x	↓	x	↓	↑	↑	22
Etanolni ekstrakt <i>Solanum torvum</i> (300 mg/kg, <i>p.o.</i> ) dnevno-4 tedne	67,75 mg/kg, <i>i.v.</i> 2 dneva pred žrtvovanjem	Podgane <i>Wistar</i>	x	↑	x	↓	↑	↑	22
Etanolni ekstrakt <i>Zingiber officinale</i> (200 mg/kg, <i>p.o.</i> ) 1h pred <i>i.p.</i> aplikacijo doksorubicina	15 mg/kg, <i>i.p.</i> 72 ur pred žrtvovanjem	Samice podgan <i>Sprague- Dawley</i>	=	↓	↓	=	=	=	23
Etanolni ekstrakt <i>Zingiber officinale</i> (400 mg/kg, <i>p.o.</i> ) 1h pred <i>i.p.</i> aplikacijo doksorubicina	15 mg/kg, <i>i.p.</i> 72 ur pred žrtvovanjem	Samice podgan <i>Sprague- Dawley</i>	=	↓	=	=	=	=	23
Vitamin E (200 mg/kg, <i>p.o.</i> ) 1h pred <i>i.p.</i> aplikacijo doksorubicina	15 mg/kg, <i>i.p.</i> 72 ur pred žrtvovanjem	Samice podgan <i>Sprague- Dawley</i>	=	↓	↓	=	=	=	23
CAPE (10 μmol/kg/dan, <i>i.p.</i> ) 12 dni, nato odvzem krvi	15 mg/kg, <i>i.p.</i> apliciran tretji dan	Samci podgan <i>Sprague- Dawley</i>	↑	↑	=	=	x	x	24
Telmisartan (10 mg/kg/dan, <i>p.o.</i> ) začetek isti dan kot doksorubicin (skupna perioda 5 tednov)	2.5mg/kg <i>i.p.</i> - 6x na 48 ur, da dosežemo kumulativni odmerek 15 mg/kg v dveh tednih	Odrasli samci albino podgan	↑	↑	↑	x	=	=	27

Kaptopril (60 mg/kg/dan, <i>p.o.</i> ) začetek isti dan kot doksorubicin (skupna perioda 5 tednov)	2.5mg/kg i.p.-6x na 48 ur, da dosežemo kumulativni odmerek 15 mg/kg v dveh tednih	Odrasli samci albino podgan	↑	↑	↑	x	=	=	27
Nifedipin (15 mg/kg/dan, <i>p.o.</i> ) 30 dni	6,5 mg/kg, <i>i.v.</i> prvi dan	Samci podgan <i>Sprague-Dawley</i>	↑	=	x	x	↑	↑	29
Nitredipin (10 mg/kg/dan, <i>p.o.</i> ) 30 dni	6,5 mg/kg, <i>i.v.</i> prvi dan	Samci podgan <i>Sprague-Dawley</i>	↑	↓	x	x	↑	↑	29
Amlodipin (5 mg/kg/dan, <i>p.o.</i> ) 30 dni	6,5 mg/kg, <i>i.v.</i> prvi dan	Samci podgan <i>Sprague-Dawley</i>	↑	=	x	x	=	↑	29

Iz vseh teh primerjav lahko zaključimo, da lahko z uporabo antioksidantov ali zdravilnih učinkovin zaščitimo ledvice pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom. Razvidno je, da izkazuje fulerenol v vseh odmerkih protektivne učinke na ledvično tkivo, posebej dobre rezultate pa smo zasledili pri skupini, ki je prejela najnižji odmerek fulerenola.

## 5 SKLEP

Na osnovi rezultatov, ki temeljijo na opisih makroskopskih sprememb ter hematoloških in biokemijskih meritev, lahko potrdimo, da fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  v uporabljenih odmerkih (25, 50 in 100 mg/kg) izkazuje antioksidantne učinke in ščiti ledvično tkivo pred kronično toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom.

Na podlagi makroskopskih sprememb lahko zaključimo, da smo kljub kopičenju neraztopljenega fulerenola pri najvišji koncentraciji dobili spodbudne rezultate. Protektivnost fulerenola na tkivo ledvic pri toksičnosti doksorubicina se je celo večala z manjšanjem odmerkov, s tem pa se manjša delež neraztopljenega fulerenola. Pri pregledu krvne slike opazimo, da imajo skupine, ki so prejemale fulerenol, vrednosti merjenih encimov LDH in  $\alpha$ -HBDH po treh tednih precej nižje od ostalih skupin. To pomeni, da fulerenol sam ali v kombinaciji z doksorubicinom ugodno vpliva na upad koncentracij LDH in  $\alpha$ -HBDH. Fulerenol vpliva tudi na koncentracijo sečnine v serumu, in sicer tako, da zniža njeno koncentracijo, ki naraste zaradi vpliva doksorubicina. Najboljše rezultate smo zasledili pri skupini z najnižjo koncentracijo fulerenola. Pri oceni oksidativnega statusa smo preiskovali tkivne koncentracije antioksidantnih encimov TP, LDH, SOD, GSH-Px, GR ter CAT in prišli do zaključka, da fulerenol, posebno v najnižji uporabljeni koncentraciji, ugodno vpliva na njihove vrednosti in jih približa vrednostim zdrave kontrolne skupine. Do enakih ugotovitev smo prišli pri določitvi razmerja prostega GSH/GSSG v ledvicah in pri določitvi koncentracije MDA, ki nam poda oceno lipidne peroksidacije. V vseh primerih fulerenol ugodno vpliva na ledvično tkivo, najboljše rezultate pa zasledimo pri skupini, ki je prejemala fulerenol v odmerku 25 mg/kg. Iz vsega tega lahko zaključimo, da fulerenol v vseh uporabljenih odmerkih (25, 50 in 100 mg/kg) ščiti ledvično tkivo v primeru nefrotoksičnosti, povzročene z doksorubicinom. Posebej lahko izpostavimo preiskovano skupino 6, ki je prejemala najnižji odmerek fulerenola (25 mg/kg) in je tudi na splošno imela najboljše rezultate glede na zdravo kontrolno skupino. Pridobljeni rezultati so dokaz, da bi bilo dobro narediti še nadaljnje raziskave fulerenola z nižjimi odmerki, saj fulerenol dokazano ščiti ledvice pred kronično toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom.

## 6 LITERATURA

1. Injac, R., Perse, M., Obermajer, N., et al. *Potential hepatoprotective effects of fulleranol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas*. *Biomaterials* 29, 3451-3460 (2008).
2. Metsa-Ketela, M., Niemi, J., Mantsala, P., et al., Anthracycline biosynthesis: Genes, enzymes and mechanisms, In *Anthracycline Chemistry and Biology I: Biological Occurrence and Biosynthesis, Synthesis and Chemistry, Vol. 1*, pp 1019142. Ed., K.Krohn, Springer, Berlin (2008).
3. Injac, R. *Doktorska disertacija (slo/ang)*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, (2008).
4. Injac, R., and Strukelj, B., *Recent Advances in Protection Against Doxorubicin-induced Toxicity*. *Technology in Cancer Research and Treatment*, Volume 7, Number 6, December 2008; 497-516.
5. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Flower.,R.J. *Rang and Dale's Pharmacology* (6th ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 718-733 (2007).
6. USP, *Doxorubicin Hydrochloride for Injection*. Pfizer [internet]. Dostopen na: <http://www.pfizer.com> [15.5.2010].
7. Aleksandra, B., *Doxorubicin Cardiotoxicity in a Rat Model*. *Eskulap* 2007;2(3):1-5.
8. Hande, K. R. *Topoisomerase II inhibitors*. *Update on Cancer Therapeutics* 3, 2008.
9. Priestman, T., *Cancer chemotherapy in clinical practice*. Springer-Verlag, London, UK (2008).

10. Injac, R., Perse, M., Boskovic, M., et al., *Cardioprotective Effects of Fullereneol C60(OH)24 on a Single Dose Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats with Malignant Neoplasm.*, Technol Cancer Res Treat 2008; 7 (1): 15–26.
11. King, P., D., Perry, M., C., *Hepatotoxicity of Chemotherapy*, The Oncologist 2001;6:162-176.
12. Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., et al. *Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C60(OH)24 through inhibition of oxidative stress.* Pharmacol, In production (2008).
13. Injac, R., Boskovic, M., Perse, M., et al. *Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60(OH)24 via suppression of oxidative stress.* Pharmacological Reports 2008; 742–749.
14. Carvalho, C., Santos, R., X., Cardoso, S., et al. *Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect.* Current Medicinal Chemistry, 2009, Volume 16, 3267-3285.
15. Kelishomi, R. B., Ejtemaemehr, S., Tavangar, S.M., et al. *Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat.* Toxicology 243, 96-104 (2008).
16. Injac, R., Kočevar, N., and Štrukelj, B. *Farm vestnik* 59, 257-262 (2008).
17. Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., et al. *Bioapplication and activity of fullereneol C60(OH)24.* African Journal of Biotechnology Vol. 7 (25), pp. 4940-4050, 29 December, 2008.
18. Injac, R., Perse, M., Cerne M., et al. *Protective Effects of Fullereneol C60(OH)24 against Doxorubicin induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats with Colorectal Cancer: A Chronic Investigation.* Biomaterials 30 (2009) 1184–1196.
19. *Urea Nitrogen (BUN), Berthelot/Colorimetric.* Pointe Scientific [internet]. Dostopen na: [www.pointescientific.com](http://www.pointescientific.com) [7.10.2010].

20. *Creatinine assay kit*. Cayman Chemical [internet]. Dostopen na: <http://www.caymanchem.com> [7.10.2010].
21. *Oxidative Stress*. Sigma aldrich [internet]. Dostopen na: <http://www.sigmaaldrich.com> [23.9.2010].
22. Mohan, M., Kamble, S., Gadhi, P., et al. *Protective effect of Solanum torvum on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 48, (2010), 436–440.
23. Ajith, T., A., Aswathy, M., S., Hema, U., *Protective effect of Zingiber officinale roscoe against anticancer drug doxorubicin-induced acute nephrotoxicity*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 46, (2008), 3178–3181.
24. Yagmurca, M., Erdogan, H., Iraz, M., et al. *Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats*. Clin Chim Acta, (2004), 348, 27–34.
25. Santos, N., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., et al. *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. Biochemical Pharmacology Vol. 65, (2003), 1035–1041.
26. Radic, N., Injac, R., Djordjevic, A., et al. *The Analysis of Pharmacologically Active Compounds and Biomolecules in Real Samples*. Transworld Research Network, Kerala, India (2009).
27. Ibrahim, M., A., Ashour, O., M., Ibrahim, Y., F., et al. *Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity*. Pharmacological Research Vol. 60, (2009), 373–381.

28. Grotto, D., Santa M., L., Valentini, J., et al. *Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification.* *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 169-174, (2009).
29. Liu, L., Li, Q., X., Xia, L., et al. *Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats.* *Toxicology* 231, 81-90, (2007).



## 7 ŽIVLJENJEPIS

Rodil sem se 18.3.1984 v Ljubljani. Osnovno šolo sem med leti 1991 in 1999 obiskoval v Velenju. Z vstopom v osnovno šolo sem začel trenirati smučarske skoke, ki so pustili pomemben pečat v mojem življenju. Po zaključeni osnovni šoli sem se vpisal na Ekonomsko gimnazijo Kranj. Šport me je spremljal skozi osnovno in srednjo šolo, po uspešno zaključeni srednji šoli pa sem dal prednost izobrazbi, zato sem se vpisal na Fakulteto za farmacijo, za katero me je navdušila sestra. Kot študent sem sodeloval pri različnih dejavnostih, tako športnih kot študijskih, med drugim tudi kot organizator *Leciklarne*. Med študijem sem si izkušnje za nadaljnjo kariero nabiral tudi preko študentskega dela na razvojnem oddelku v Leku. Leta 2009 sem v okviru desetega semestra opravljal in uspešno zaključil praktično usposabljanje v lekarni Vir, pod mentorstvom Rezar Andreja, mag. farm.