

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLAŽ LIČEN

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLAŽ LIČEN

**UGOTAVLJANJE PROTEKTIVNOSTI FULLERENOLA *IN VIVO* PRI TERAPIJI
MALIGNIH NEOPLAZEM Z DOKSORUBICINOM NA PLJUČA PRI PODGANAH**

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF FULLERENOL *IN VIVO*
DURING DOXORUBICINE THERAPY OF MALIGN NEOPLASMA ON LUNGS 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 Injaca.

ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se zahvalil mentorju prof. dr. Borutu Štruklju ter vsem, ki so neposredno ali posredno pripomogli pri nastajanju te diplomske naloge. Posebno bi se zahvalil somentorju doc. dr. Radu Injacu za strokovno vodstvo, odzivnost in vsestransko pomoč tekom celotne izdelave diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi staršema, ki sta mi omogočili študij in v vseh trenutkih stala v oporo.

Izjava

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

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV
1 UVOD.....	1
1.1 DOKSORUBICIN.....	1
1.1.1 MEHANIZEM DELOVANJA DOKSORUBICINA.....	2
1.1.2 ZDRAVILA Z DOKSORUBICINOM.....	2
1.1.3 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI DOKSORUBICINA IN NASTANEK RADIKALOV.....	4
1.1.4 TOKSIČNOST DOKSORUBICINA NA ORGANIH.....	7
1.1.5 PULMOTOKSIČNOST POVZROČENA Z DOKSORUBICINOM.....	8
1.1.6 ZAŠČITA PRED TOKSIČNOSTJO POVZROČENO Z DOKSORUBICINOM.....	9
1.2 FULERENOL.....	12
1.2.1 FULERENI IN FULERENOL.....	12
1.2.2 SINTEZNI POSTOPEK FULERENOLA $C_{60}(OH)_{24}$ IN NJEGOVE LASTNOSTI.....	13
1.2.3 BIOLOŠKO AKTIVNI DERIVATI FULERENA.....	13
1.2.4 POTENCIALNA UPORABA FULERENOLA V TERAPIJI.....	15
1.2.5 ANTIOKSIDATIVNE LASTNOSTI FULERENOLA.....	16
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 PRIPRAVA IN APLIKACIJA $C_{60}(OH)_{24}$, DOKSORUBICINA IN VITAMINA C 18	
3.2 KEMIJSKA POVZROČITEV KOLOREKTALNIH TUMORJEV.....	20
3.3 KOEFICIENT MASE PLJUČ.....	20
3.4 OCENA PROTEKTIVNIH UČINKOV $C_{60}(OH)_{24}$ NA PLJUČNO TKIVO.....	21
3.5 STATISTIČNA ANALIZA.....	22
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23

4.1	MAKROSKOPSKE SPREMEMBE.....	23
4.2	TUMORJI.....	25
4.3	HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN AKTIVNOST SERUMSKIH ENCIMOV ..	26
4.4	OKSIDATIVNI STATUS PLJUČ.....	30
4.5	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA V RAZLIČNIH ODMERKIH IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA NA TKIVO PLJUČ	37
5	SKLEP.....	41
6	VIRI:.....	42
7	ŽIVLJENJEPIS	46

POVZETEK

Raziskovali smo učinke fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ v odmerkih 25, 50 in 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov na z doksorubicinom povzročeno toksičnost na tkivo pljuč pri podganah s kolorektalnim rakom. Uporabili smo *in vivo* model na samcih podgan vrste *Wistar* in ugotavljali, ali je fulerenol sposoben preprečiti kronične poškodbe pljuč, ki jih povzroči doksorubicin v odmerku 1,5 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Rezultate smo primerjali z učinki dobro poznane antioksidanta askorbinske kisline (vitamin C) v odmerku 100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Na podlagi rezultatov makroskopskih, mikroskopskih, hematoloških in biokemijskih raziskav lahko potrdimo, da ima fulerenol v vseh preiskovanih odmerkih zaščitne učinke na pljučno tkivo pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom.

ABSTRACT

We investigated the effects of fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ at doses of 25, 50 and 100 mg/kg/week (for a time period of three weeks) on lung tissue after doxorubicin-induced toxicity in rats with colorectal cancer. In our study we used an *in vivo* model on *Wistar* male rats, to explore if fullereneol could protect lung tissue against Doxorubicin-induced (1,5 mg/kg/week for three weeks) toxicity and compared the effect with well known antioxidant ascorbic acid (vitamin C) at doses 100 mg/kg/week for three weeks. The macroscopic, microscopic, hematological, and biochemical results we obtained confirmed, that at all examined doses, fullereneol has a protective influence on the lung tissue against chronic toxicity induced by doxorubicin.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALT	alaninska aminotransferaza
AST	aspartatna aminotransferaza
CAT	katalaza
CK	kreatinska kinaza
DMSO	dimetilsulfoksid ((CH ₃) ₂ SO)
DMH	1,2-dimetilhidrazin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EKG	elektrokardiogram
GSH-Px	glutationska peroksidaza
GSH	reducirana oblika glutaciona
GSSG	oksidirana oblika glutaciona
Hbg	hemoglobin
HCT	hematokrit
GR	glutationska reduktaza
KSP	kronično srčno popuščanje
LD ₅₀	odmerek, ki povzroči smrt pri polovici testiranih osebkov
LDH	laktatna dehidrogenaza
MDA	malondialdehid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika)
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana oblika)
NF-κB	jedrni dejavnik kappa B
RKS	reaktivne kisikove spojine
RDS	reaktivne dušikove spojine
SOD	superoksidna dismutaza
TNF-α	tumor nekrozirajoči dejavnik alfa
TP	skupna koncentracija proteinov
α-HBDH	alfa hidroksibutiratna dehidrogenaza

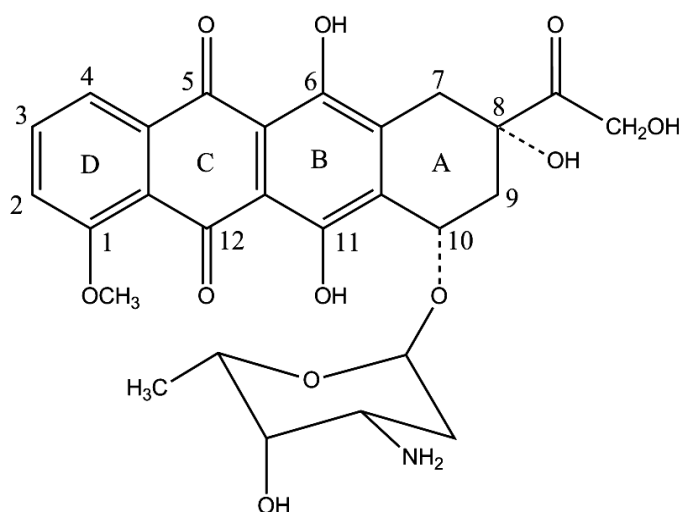
1 UVOD

1.1 DOKSORUBICIN

Doksorubicin (*Slika 1*) se uvršča med antraciklinske antibiotike (ATC klasifikacija - L01DB), v skupino učinkovin v terapiji malignih obolenj.

Prvega predstavnika te skupine, daunorubicin so izolirali iz bakterij vrste *Streptomyces peuceticus* že v 60-ih letih 20. stoletja. Vendar je šele leta 1969 izolirani doksorubicin (leta 1974 registriran kot Adriamycin) pospešil razmah uporabe te skupine kemoterapevtikov. Njegovo citotoksično delovanje je že vrsto let dokazano, vendar pa so mnenja o podrobnejšem biokemičnem mehanizmu delovanja še vedno različna. Poglavitni mehanizmi delovanja so nastanek kisikovih reaktivnih snovi, interakcije s topoizomerozo II in neposredne interakcije z deoksiribonukleinsko kislino (DNA) (1-4).

Najpogostejše indikacije zdravljenja z doksorubicinom so akutne levkemije, limfomi in trdni tumorji, kot so karcinom dojke, maternice, materničnega vratu, jajčnikov, sečnega mehurja, ščitnice, želodca, drobnocelični pljučni karcinom, sarkomi mehkih tkiv in osteogeni sarkomi, nevroblastom ter Wilmsov tumor. Vendar pa njegovo klinično uporabo omejujejo akutni in kronični neželeni učinki. Ti so predvsem kardiotoksičnost, pulmotoksičnost, hepatotoksičnost, poškodbe sluznic gastrointestinalnega trakta ter mielosupresija, kot najbolj pogosti neželeni učinki (3-6).



Slika 1: Struktura doksorubicina (14-hidroksi daunorubicin)-((8*S*,10*S*)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksi- α -*L*-liksoheksopiranozil)oksi]-6,8,11-trihidroksi-8-(hidroksiacetyl)-1-metoksi-7,8,9,10-tetrahidrotetracen-5,12-dion (4)

1.1.1 MEHANIZEM DELOVANJA DOKSORUBICINA

Strukturo doksorubicina sestavlja tetraciklični pretežno planarni del s kinonsko strukturo (aglikon) in nanjo pripet amino sladkor. Kinonski del je odgovoren za nastanek radikalov, ki poleg tega mehanizma nastajajo tudi po neencimski poti v reakciji z ioni železa. Radikali neposredno poškodujejo DNA in povzročijo lipidno peroksidacijo v celici. S planarnim delom se interkelira med bazne pare v DNA in preko zaviranja DNA polimeraze ovira podvajanje DNA. Dokazana je tudi kovalentna vezava na molekulo DNA, vendar pa je celotna skupina učinkovin znana predvsem po zaviranju topoizomeraze II, kar vodi v ustavitev sinteze nukleinskih kislin. Vsi ti mehanizmi vplivajo na aktivacijo encimskih poti v rakavi celici, kar vodi v naknadne apoptotične mehanizme. Vendar pa ti mehanizmi delujejo tudi na zdrave celice, kar je vzrok za neželene učinke, ki se najprej pokažejo predvsem pri hitro delečih se celicah (3,4,6).

1.1.2 ZDRAVILA Z DOKSORUBICINOM

Pripravki, registrirani v Republiki Sloveniji so navedeni v *preglednici I* (7). Vsa zdravila z doksorubicinom so namenjeni intravenski aplikaciji, saj se doksorubicin slabo absorbira skozi črevesno sluznico. Aplikacija poteka v obliki infuzije oziroma počasne injekcije (3-5 minut), sočasno s fiziološko raztopino in 5% ali 0,5% raztopino glukoze. Pri tem je potrebno čas injiciranja prilagoditi vsakemu bolniku individualno, saj lahko že prehitro injiciranje povzroči ekstravazacijo in s tem nekrozo tkiva na mestu injiciranja (*Slika 2*) (8,9).

Preglednica I: Seznam zdravil z doksorubicinom registriranih na slovenskem trgu

Ime produkta	Proizvajalec
ADRIPLASTINA 10 mg raztopina za injiciranje	Pfizer Luxembourg SARL
ADRIPLASTINA 50 mg raztopina za injiciranje	Pfizer Luxembourg SARL
CAELYX 2 mg/ml koncentrat za pripravo raztopine za infundiranje*	Schering - Plough Labo
DOXORUBICIN EBEWE 2 mg/ml, koncentrat za pripravo raztopine za infundiranje	Ebewe Pharma

*pripravek s pegiliranimi liposomi

Po vstopu v krvni obtok se doksorubicin hitro veže na plazemske proteine in dobro prehaja v tkiva ter se tam zadržuje več dni. Volumen distribucije v stanju dinamičnega ravnovesja je med 809 in 1214 l/m². Razpolovna doba distribucije je na začetku okoli 5 minut in je posledica hitrega razporejanja doksorubicina v tkiva, medtem ko je izločanje iz tkiv

upočasnjeno, s končnim razpolovnim časom med 20 in 48 ur. Doksorubicin ne prehaja hematoencefalne bariere, vendar prehaja placento in se porazdeljuje v materino mleko. V jetrih se delno metabolizira v aktivni doksorubicinol, oba pa sta nato podvržena drugi fazi metabolizma, predvsem sulfataciji in glukuronidaciji. Odstotek vezave doksorubicina in doksorubicinola na plazemske beljakovine znaša od 74 do 76 %. Izločanje poteka predvsem z žolčem, v katerem po 5 dneh zasledimo približno 40 % začetnega odmerka. V manjši meri se izloča tudi z urinom, v katerega se v enakem časovnem obdobju izloči od 5 do 10 % začetnega odmerka (8,9).



Slika 2: Ekstravazacija tkiva po aplikaciji doksorubicina (10)

Običajni odmerki doksorubicin-hidroklorida v monoterapiji so od 60 mg/m^2 do 75 mg/m^2 enkrat na vsake 3 tedne. Ugotovljeno je, da večanje kumulativnega odmerka poveča tveganje za nastanek srčnega popuščanja in kardiomiopatije. Pri kumulativnem odmerku 400 mg/m^2 se z doksorubicinom povezano kongestivno srčno popuščanje pojavi pri 5 % bolnikov, pri odmerku 500 mg/m^2 naraste na 16 % in pri 700 mg/m^2 kar na 48 % zdravljenih. Pri rizičnih bolnikih je v uporabi tudi alternativno odmerjanje od 20 mg/m^2 do 25 mg/m^2 na dan, 3 dni zapored vsak teden, v obdobju 3 tednov. Zaradi manjšega kumulativnega odmerka se zmanjša kardiotoksičnost, vendar se poveča tveganje za neželene učinke na sluznicah gastrointestinalnega trakta (6,9). Tveganje za pojav neželenih učinkov se lahko zmanjša tudi z uporabo dostavnih sistemov, kot so liposomi in nanodelci. V uporabi je zdravilo v obliki pegiliranih liposomov, ki se zaradi spremenjene farmakokinetike in s tem podaljšane časa zadrževanja, aplicira v nižjih odmerkih (4,8,11).

Poleg uporabe v monoterapiji se doksorubicin uporablja tudi v kombinaciji z drugimi učinkovinami v terapiji raka (*Preglednica II*). Takšen pristop poveča verjetnost učinkovitosti terapije in zmanjša možnost pojava odpornosti pri rakavih celicah. Pri kombinirani terapiji je odmerek doksorubicina običajno med 40 mg/m^2 in 60 mg/m^2 enkrat na 3 do 4 tedne (2,4,9).

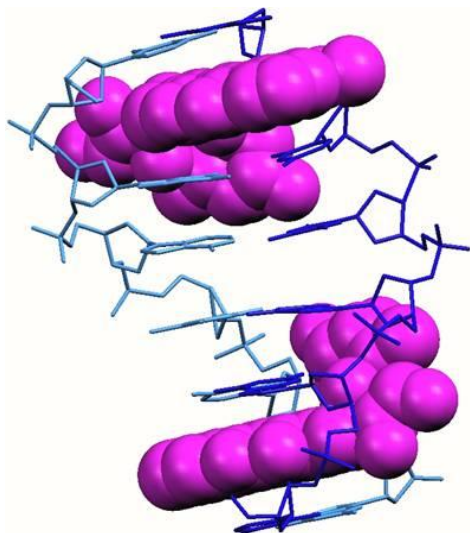
Preglednica II: Kombinacije doksorubicina z drugimi učinkovinami v terapiji raka

DOKSORUBICIN v kombinaciji z/s	INDIKACIJA
docetaksel	rak dojk
docetaksel, ciklofosamid	
ciklofosamid, etopozid	rak pljuč
ciklofosamid, vinkristin	
ciklofosamid, vinkristin, prednizolon	ne-Hodgkinov limfom
metotreksat, ciklofosamid, vinkristin, prednizolon, bleomicin	
bleomicin, vinblastin, dakarbazin	Hodgkinov limfom
vinkristin, prednizolon, etopozid, ciklofosamid, bleomicin	
vinkristin, prednizolon	akutna limfoblastna levkemija
fluorouracil, mitomicin	rak pankreasa
vinkristin, deksametazon	multipli mielom
ciklofosamid, vinkristin, metilprednizolon	

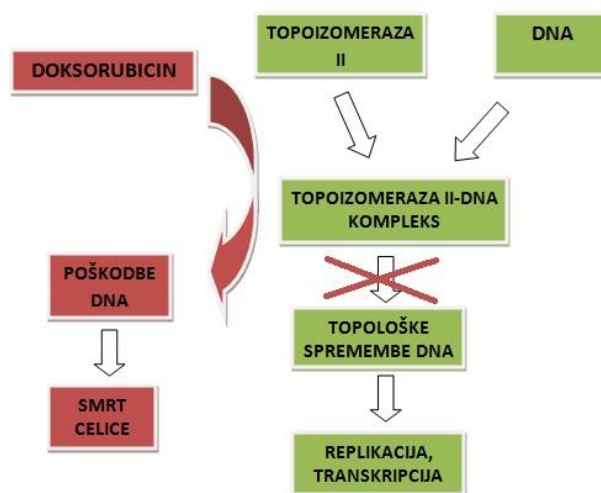
1.1.3 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI DOKSORUBICINA IN NASTANEK RADIKALOV

Mehanizmi toksičnosti doksorubicina so še vedno predmet raziskav, čeprav je učinkovina že dolgo v klinični uporabi.

S planarnim aglikonom se interkalira med sosednje bazne pare v DNA, lahko pa se kovalentno veže tudi na samo DNA (*Slika 3*). Te interakcije vodijo v nepravilno zvitje, inhibicijo popravljalnih mehanizmov in encimov udeleženih v procese replikacije ter transkripcije DNA (4,6). Raziskan je mehanizem inhibicije topoizomeraze II, encima, ki omogoča spreminjanje topološkega stanja zaprte dvovijačne DNA. Topoizomeraza II cepi in nato zopet združi dvovijačno DNA in s tem omogoči prehod druge dvovijačne DNA skozi cepitveno mesto. Ta proces je pomemben pri pripravi DNA na replikacijo in transkripcijo, kot tudi za kasnejšo kondenzacijo pri tvorjenju kromatina. Doksorubicin z vrivanjem v DNA in s kovalentno vezavo na topoizomerazo II stabilizira kompleks DNA-topoizomeraza II in s tem prepreči združitev cepljene dvovijačne DNA. Posledica tega so poškodbe DNA in aktivacija apoptotičnih mehanizmov, kar je vzrok genotoksičnosti doksorubicina (*Slika 4*) (4,6,12).

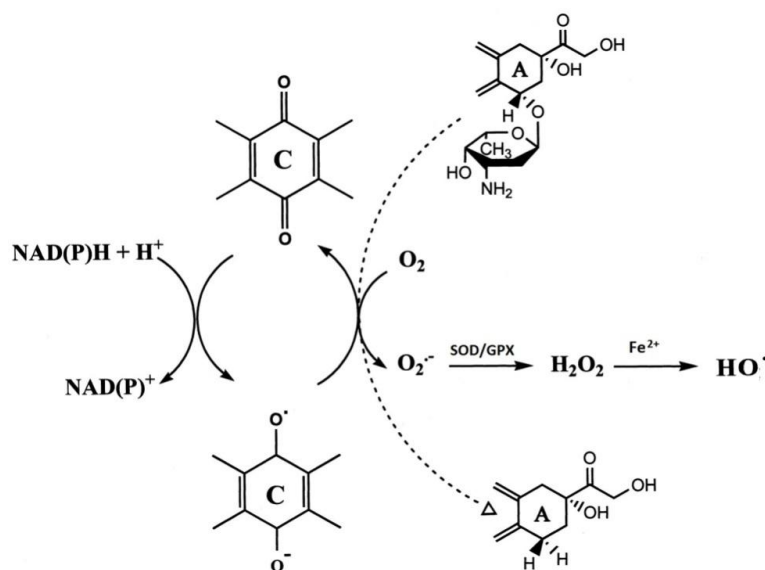


Slika 3: Interkalacija molekule doksorubicina med bazne pare v DNA (13)



Slika 4: Vpliv interakcije topoisomeraze II in doksorubicina (4,6,12)

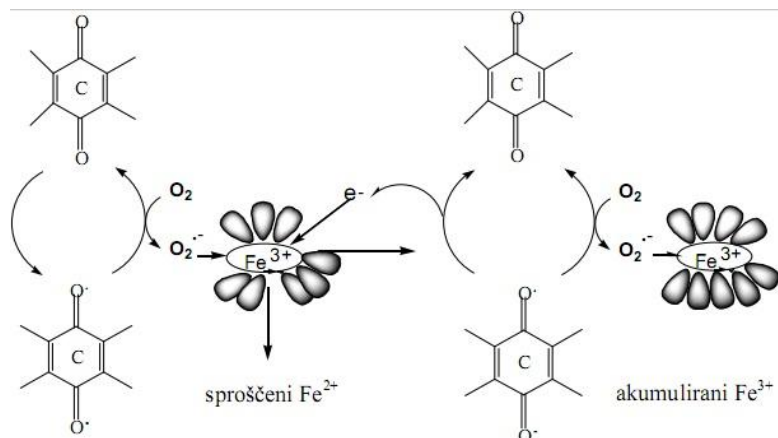
Zaradi vsebujoče kinonske strukture na obroču C lahko antraciklinski antibiotiki sprožijo redukcijo molekularnega kisika, kar vodi v nastanek reaktivnih kisikovih spojin (RKS). S pripajanjem enega elektrona na kinonsko strukturo nastane izredno reaktiven semikinon (slika 5), ki hitro preide nazaj v kinonsko strukturo z oksidacijo molekularnega kisika v superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$). Pri tem ciklu sodelujejo številne NAD(P)H-oksido-reduktaze, kot so citokromske b_5 reduktaze, mitohondrijske NADH dehidrogenaze, ksantinske dehidrogenaze in endotelne NO sintaze. Lahko pa semikinon v tem ciklu oksidira glikozidno vez med obročem A in daunozaminom. To privede do nastanka 7-deoksiaglikona, ki zaradi večje topnosti v lipidih preide tudi v biološke membrane. Tam lahko povzroči nastanek RKS, ki poškodujejo občutljive lipidne strukture (3,4).



Slika 5: Oksidacijsko-redukcijske reakcije doksorubicina (3,4)

Superoksidni anion se s pomočjo encima superoksidna dismutaza (SOD) pretvori do vodikovega peroksida H_2O_2 , ki ga v normalnih pogojih katalaza (CAT) ali glutationska peroksidaza (GSH-Px) razgradita na molekularni kisik in vodo. Če so ti mehanizmi nasičeni, lahko H_2O_2 reagira s Fe^{2+} ioni v bioloških sistemih in tako nastane veliko bolj reaktiven hidroksilni radikal (OH^\cdot), kar poznamo pod imenom Fentonova reakcija (3,4,14).

Ugotovljen je tudi neencimski mehanizem nastanka kisikovih radikalov, ki vključuje reakcije doksorubicina z železovimi ioni. Doksorubicin tvori s prostimi Fe^{3+} ioni kompleks v razmerju 3:1, ki je sposoben redukcije molekularnega kisika do njegovih RKS. Predvsem superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) je sposoben penetracije v feritin, skladiščni protein za železo, kjer zaradi nižjega redukcijskega potenciala reducira Fe^{3+} v Fe^{2+} . To povzroči izstop Fe^{2+} iz feritina in sklene enoelektronski cikel (Slika 6), ki je odgovoren za nastanek RKS in s tem za oksidativne poškodbe celic (3,4,15).

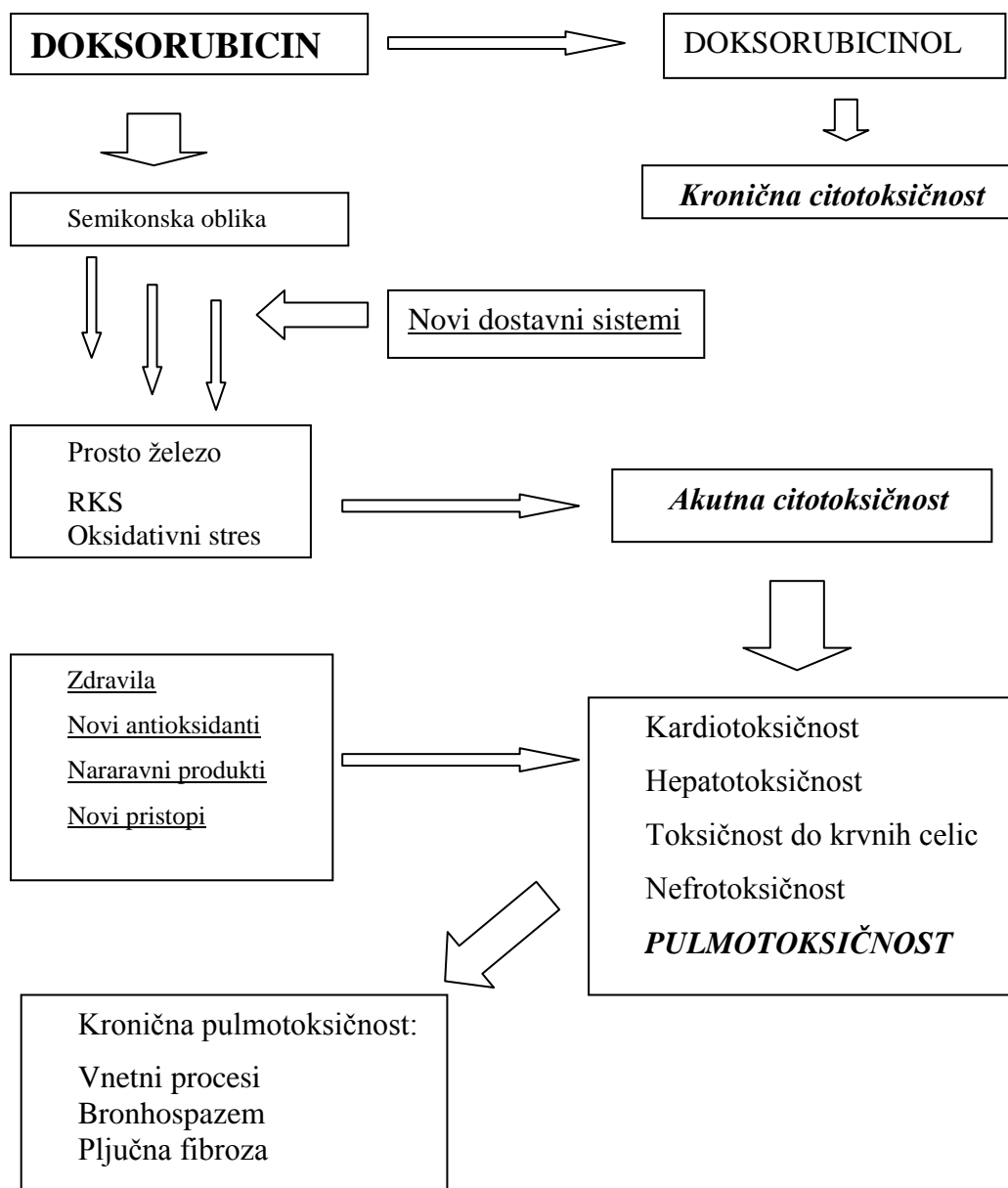


Slika 6: Sproščanje železa iz feritina zaradi doksorubicina (3)

Vendar to ni edini vpliv na homeostazo železa v celici. Predvidevajo, da doksorubicin vpliva na delovanje proteasomov in/ali lizosome udeleženih v razgradnjo feritina ter da sam superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) inducira posttranslacijske modifikacije feritina, ki še olajšajo izstop Fe^{2+} iz feritina. Poznana je tudi interakcija njegovega sekundarnega metabolita doksorubicinola s katalitično skupino [4Fe-4S] citoplazemske akonitaze, ki poleg udeležnosti pri izomerizaciji citrata v izocitrat vpliva tudi na izražanje feritina in receptorjev za transferin. Vsi ti mehanizmi rušijo homeostazo železa v celici in omogočajo nastanek RKS zaradi reakcij z železom. Nastanek radikalov aktivira apoptotične mehanizme v celici preko aktivacije jedrnega dejavnika- κB (NF- κB) (3).

Vsi ti mehanizmi povzročijo poškodbe tako na tumorskih, kot tudi zdravih celicah. Zdrave celice imajo v primerjavi z rakavimi večjo sposobnost regeneracije, zato citotoksična terapija poteka v časovnih presledkih, da si zdrave celice opomorejo in se resnost ter število neželenih

učinkov omeji. Kot posledica akutne toksičnosti se pojavljajo mielosupresija, izguba las, poškodbe ustne sluznice, bruhanje in slabost. Toksičnost se kaže tudi na organih, predvsem na srčni mišici, ki je tudi najbolj raziskana (4).



Slika 7: Toksičnost doksorubicina in pristopi zaščite (4,19)

1.1.4 TOKSIČNOST DOKSORUBICINA NA ORGANIH

Poznani so toksični učinki na različnih organih, med katerimi so najbolj raziskani tisti na miokardu. Pojavljajo se tako v akutni kot tudi kronični obliki. Akutna kardiotoksičnost se lahko pojavi že nekaj minut po injiciranju, predvsem v obliki arterijske hipotenzije, aritmije in tahikardije, kar se zazna s spremembami na elektrokardiogramu. Kronična toksičnost je bolj pogosta in se lahko pojavi tedne, mesece oziroma leta po zaključku zdravljenja, predvsem v

obliki kroničnega srčnega popuščanja (KSP) in lahko vodi v srčno odpoved. Ker so te poškodbe večinoma ireverzibilne in se verjetnost zanje večja z večanjem kumulativnega odmerka, je potrebna posebna previdnost pri zdravljenju bolnikov z boleznijo srca v anamnezi (6,16). Predvsem radikali in z njimi povzročen oksidativni stres zelo poškodujejo miokard, ki je zelo občutljiv na oksidativne poškodbe, ker v njem potekajo intenzivni oksidativni metabolični procesi in ima slabšo antioksidativno zaščito kot drugi organi (3,14,17). Poleg teorije o preobremenjenosti miokarda s kalcijem je poznana tudi njegova velika afiniteta do kardiolipina, fosfolipida, ki ga najdemo v membranah mitohondrijev in sarkoplazmatskega retikuluma kardiocitov. Kompleks kardiolipin-doksorubicin lahko tam sproži nastanek RKS, kar vodi v lipidno peroksidacijo membran celičnih organelov in motnje v procesu oksidativne fosforilacije. Vsi ti mehanizmi vodijo v prej naštetih poškodbe miokarda (3,16).

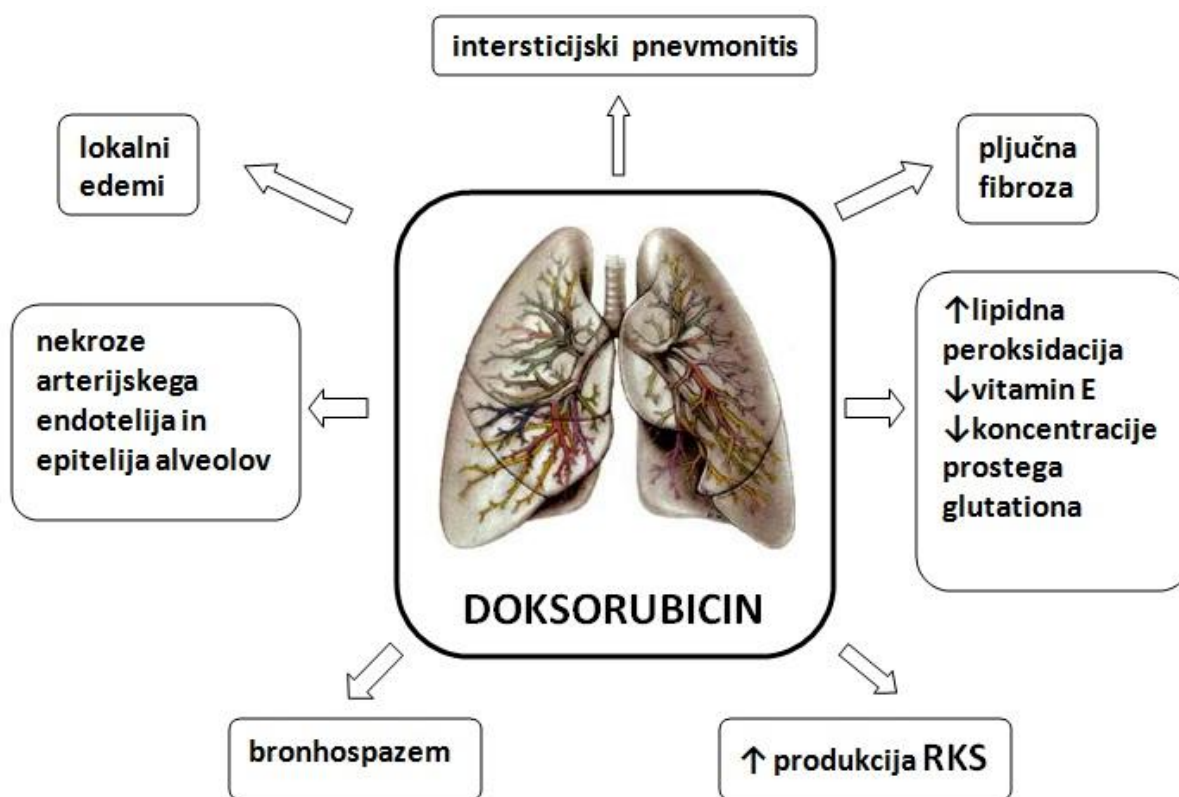
Toksičnost se že po enkratnem odmerku pokaže tudi na jetrih. Kot na drugih organih tudi tukaj večino poškodb pripisujejo povečanemu nastanku radikalov, kar lahko preobremeni tudi veliko antioksidativno kapaciteto jeter. Nastanek radikalov vodi v lipidno peroksidacijo, poškodbe celičnih organelov in vnetne procese v jetrih. Ti se izrazito povečajo v prisotnosti Fe^{3+} ionov. Vse to se klinično pokaže kot povečanje serumskih koncentracij alaninske aminotransferaze (ALT), aspartatne aminotransferaze (AST) ter bilirubina že kmalu po aplikaciji odmerka. Pojavijo se lahko steatoze, lokalne poškodbe hepatocitov ter žilja. Preučevali so tudi toksične učinke doksorubicina na ledvice in ugotovili, da slednji zelo poveča prepustnost glomerulnih membran in povzroči atrofijo glomerulov. To lahko vodi v resno proteinurijo in kronične poškodbe ledvic. Tudi na ledvicah večino poškodb predpisujejo radikalom in lipidni peroksidaciji celičnih membran (4,17).

1.1.5 PULMOTOKSIČNOST POVZROČENA Z DOKSORUBICINOM

Raziskave na področju pulmotoksičnosti, povzročene z doksorubicinom, so zelo omejene. Domnevajo, da je večina poškodb posledica zgoraj opisanega nastanka RKS in inhibiranja encimov, udeleženih v detoksifikacijske procese RKS. To povzroči lipidno peroksidacijo in oksidativne poškodbe proteinov, kar vodi do poškodb pljučnega tkiva in patoloških stanj, kot so bronhospazem, pljučna fibroza, lokalni edemi ter intersticijski pnevmonitis (18,19).

Pljuča so že zaradi svoje vloge v telesu izpostavljena visoki koncentraciji molekularnega kisika. Čeprav imajo večjo antioksidativno zaščito v primerjavi z miokardom, lahko že dejavniki iz okolja porušijo to ravnotežje. Več skupin je potrdilo vlogo RKS v poškodbah pljuč zaradi dejavnikov kot so azbest, dušikov dioksid ter bleomicin in doksorubicin. Dodaten

nastanek RKS lahko v pljučih povzročijo še fagociti, ki sodelujejo v vnetnem procesu, ki spremlja te poškodbe (18,19,20). Študije so pokazale padec koncentracije antioksidantov v pljučih ter povečanje produktov lipidne peroksidacije po zdravljenju z doksorubicinom, kar nakazuje na oksidativne poškodbe tkiva. Biopsija pljuč psov, katerim so *in situ* aplicirali doksorubicin, je odkrila tako nekroze arterijskega endotelija kot tudi epitelija alveolov. Vse to so spremljali edemi in hipetrofija tkiva (19,21). Raziskovali so tudi potencialen vpliv na mitohondrije in aktiviranost mehanizmov apoptoze v pljučih, vendar tega pri subkroničnih odmerkih niso dokazali. Predvidevajo, da se ti pojavijo pri večjih odmerkih, zaradi manjše akumulacije doksorubicina v pljučih, manjše prisotnosti mitohondrijev v primerjavi z drugimi organi in s tem posledično manjše udeležnosti doksorubicina v oksidativne procese (20).



Slika 8: Pulmotoksičnost povzročena z doksorubicinom

Vsi ti procesi lahko ob predhodni bolezni pljuč ali v povezavi z bolj pogosto kardiotoksičnostjo povzročijo resne posledice in podaljšajo okrevanje bolnika (18,20).

1.1.6 ZAŠČITA PRED TOKSIČNOSTJO POVZROČENO Z DOKSORUBICINOM

Zaradi pomembnosti doksorubicina v terapiji malignih obolenj so se pojavile tudi raziskave, ki so z različnimi pristopi poskušale zmanjšati njegove toksične učinke. S sintezo

analogov so poskušali povečati njegovo antineoplastično učinkovitost ter zmanjšati toksične učinke. To so poskušali tudi s spreminjanjem časa odmerjanja ter uporabo kombinirane terapije, vendar noben pristop ni prinesel željenih rezultatov.

Ker je poglavitni toksični učinek na celice povezan z radikali, je pri terapiji smiselna uporaba antioksidantov, kar bi zmanjšalo oksidativni stres na zdrave celice. Največ študij je raziskovalo vpliv naravnih antioksidantov, kot so vitamini (C, E, A), flavonoidi, polifenoli, antioksidanti rastlinskega izvora in minerala selena. V *preglednici III* so navedene nekatere študije, ki so preučevale zaščito organov pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom (4).

Preglednica III: Naravni produkti kot možna zaščita pred toksičnostjo doksorubicina

Naravni produkt	Odmerek nar. pr.	Odmerek doksorubicina	Uporabljen model	Rezultati	Vir
kombinacija vitamina C + E	250 mg/kg + 400 IU/kg na dan 30 dni p.o.	15 mg/kg i.p. v enkratnem odmerku	<i>In vivo</i> – samci podgan <i>Wistar</i>	kardioprotektivnost	(22)
flavonoidi	različne koncentracije	2 mg/ml	<i>In vitro</i> – celična linija kardiomiocitov, kardiomioblastov in vzorci človeških jeter	kardioprotektivnost hepatoprotektivnost	(23)
likopen	4 mg/kg p.o. 1.) enkrat dnevno 10 dni pred doks., 2.) 2 dni pred in 3 dni po doks.	10 mg/kg i.p. v enkratnem odmerku	<i>In vivo</i> – samci podgan <i>Sprague-Dawley</i>	kardioprotektivnost nefroprotektivnost	(24)
melatonin	10 mg/kg/dan s.c., 7 dni	45 mg/kg i.v. v enkratnem odmerku	<i>In vivo</i> – samci podgan <i>Wistar</i>	kardioprotektivnost hepatoprotektivnost nefroprotektivnost <u>pulmoprotektivnost</u>	(25)
propolis	100 mg/kg/dan p.o. 4 dni zapored	20 mg/kg i.p. v enkratnem odmerku	<i>In vivo</i> – samice podgan <i>Wistar</i>	kardioprotektivnost hepatoprotektivnost	(26)
<i>Ginkgo biloba</i> (standardizirani ekstrakt)	5 mg/kg i.p. na 2 dni po odmerku doks., 3 odmerki	3 mg/kg i.p. na 2 dni, 3 odmerki	<i>In vivo</i> – samci podgan <i>Sprague-Dawley</i>	zaščita testisov	(27)
<i>Schisandrin B</i>	50 µM v 48h	5 µM v 48h	<i>In vitro</i> -humane celice raka jeter, humane celice raka dojke	citoprotektivnost	(28)
<i>kumarinski derivati</i>	25 in 100 µM v 24h	25 µM v 24h	<i>In vitro</i> – človeške celice adenokarcinoma dojke	citoprotektivnost	(29)

Öz E. in sodelavci so *in vivo* na podganah preučevali vpliv melatonina kot antioksidanta na pulmotoksičnost, povzročeno z doksorubicinom. Opazili so povečane vrednosti MDA in padec GSH v pljučnem tkivu zaradi doksorubicina ter več odstopanj hematoloških

parametrov. Sočasna uporaba melatonina je uspešno zmanjšala lipidno peroksidacijo pljučnega tkiva, katere marker je MDA (25).

Poleg raziskav z naravnimi produkti so raziskovali tudi potencialno zaščito z že uveljavljenimi in novimi sinteznimi spojinami. Nekatere izmed teh so pomembno vplivale na toksičnost doksorubicina in so predstavljene v preglednici IV.

Preglednica IV: Primeri sinteznih učinkovin z zaščitno vlogo v toksičnosti povzročeni z doksorubicinom

Učinkovina	Odmerek učinkovine	Odmerek doksorubicina	Uporabljen model	Rezultati	Vir
Amifostin	910 mg/m ² kratka i.v. infuzija pred terapijo	pediatrični odmerek	<i>In vivo</i> – klinične študije na pediatrični populaciji	citoprotektivnost	(30)
Deksrazoksan	500 – 1000 mg/m ²	terapevtski odmerek	<i>In vivo</i> – klinične študije	preprečevanje ekstravazalnih poškodb	(31)
Morfin	10 mg/kg i.p. 4x na teden, 4 tedne zapored, 30 min pred doks.	1.25 mg/kg i.p. 4x na teden – 4 tedne	<i>In vivo</i> – samci podgan Sprague-Dawley	kardioprotektivnost	(32)
L-karnitin	3 g pred doks., nato 1 g/dan še 21 dni po aplikaciji doks.	50 mg/m ² i.v. 600 mg/m ² kumulativno	<i>In vivo</i> – klinične študije, ne-Hodginkov limfom	citoprotektivnost	(33)
Nebivolol	5 mg/kg/dan i.p. 6 dni	3 mg/kg/dan i.p. 6 dni	<i>In vivo</i> – samci podgan Sprague-Dawley	kardioprotektivnost	(34)
Doksiciklin	2.5 mg/kg/dan i.p. vsak drugi dan, 3 odmerki	3 mg/kg/dan i.p. vsak drugi dan, 3 odmerki	<i>In vivo</i> – samci miši ICR	zaščita testisov	(35)

Amifostin je fosforiliran tiol, ki se v membrani celic pod vplivom alkalne fosfataze pretvori v aktivni metabolit s prostimi tiolnimi skupinami. Te v bioloških sistemih detoksificirajo radikale, ki nastajajo kot posledica kemoterapije. Ker so njegove koncentracije večje v zdravih celicah kot v tumorskih, zaščiti zdrave pred oksidativnimi poškodbami ob nespremenjeni antitumorski aktivnosti. Poznana je njegoa zaščita pred mielotoksičnimi učinki kemoterapije.

Največ raziskav je bilo opravljenih na deksrazoksanu, ki je tudi edini pripravek za preprečevanje toksičnosti antraciklinov, registriran v Evropi in ZDA. Dokazali so, da aplikacija deksazoksana pred aplikacijo doksorubicina zmanjša pojavnost ekstravazalnih zapletov ob injiciranju, toksičnih učinkov na hitro deleče se zdrave celice in pojavnost kardiotoksičnosti.

Raziskave preprečevanja kardiotoksičnosti so potekale tudi z morfinom. Podatki, ki so jih dobili z opazovanjem EKG, makroskopskih in mikroskopskih sprememb ter kontraktlnosti

levega ventrikla, nakazujejo obetajočo vlogo morfina pri preprečevanju toksičnosti. Vendar pa smiselnost njegove uporabe omejuje močan narkotičen učinek, ki bi lahko bil v primeru nekaterih indikacij tudi zaželen.

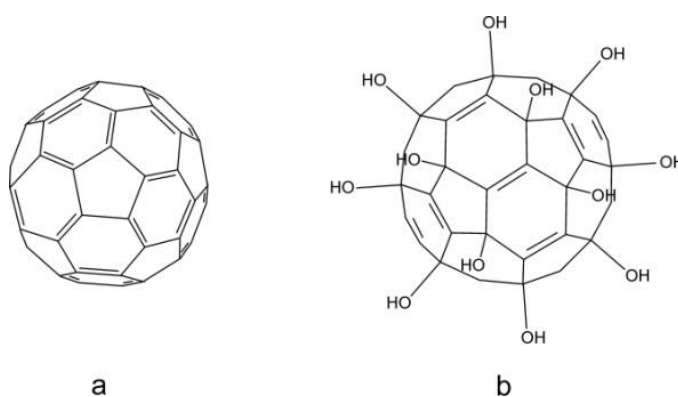
V želji po zaščiti srčne mišice so preverili tudi protektivne učinke nebivolola. Ugotovili so, da njegova sočasna uporaba zmanjša parametre oksidativnega stresa, kot tudi klinične kazalce poškodb miokarda kot, sta kreatinska kinaza in troponin T. Nebivolol, tako kot drugi beta blokatorji, zmanjša obremenjenost miokarda in protektivno vpliva na toksičnost zaradi doksorubicina.

To so le nekatere izmed spojin, katerih protektivnost so preverili v povezavi s toksičnostjo doksorubicina. Obstajajo še drugi pristopi povečanja aktivnosti in zmanjšanja neželenih učinkov terapije, ki vključujejo predvsem željo po ciljnii dostavi učinkovine (4).

1.2 FULERENOL

1.2.1 FULERENI IN FULERENOL

Fulereni predstavljajo poleg grafita in diamanta, tretjo alotropsko modifikacijo ogljika. C_{60} , kot njihov najbolj poznan in raziskan predstavnik, je bil odkrit leta 1985. Poimenovali so ga buckminsterfulleren ali krajše buckyball po ameriškem arhitektu R. Buckminster Fullerju, ki je v svojem najbolj znanem projektu leta 1967 uporabil skeletno strukturo z pentagoni in heksagoni. Za odkritje in določitev strukture fulerena C_{60} so 1996 podelili Nobelovo nagrado s področja kemije (4).



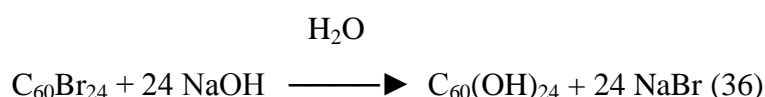
Slika 9: Zgradbi fulerena C_{60} (a) in fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (b) (36)

Struktura vsakega fulerena vsebuje $2 \times (10 + M)$, $M \geq 0$ ogljikovih atomov in konstantno število 12 pentagonov. Ogljikovi atomi so lahko razporejeni v obliki sferičnega grozda (C_{60}), elipsoida (C_{70}) ali cilindra (ogljikove nanocevke). Najstabilnejši C_{60} (Slika 9a) ima 20 heksagonov in 12 pentagonov ter kristalizira v prisekan ikozaeder z osjo simetrije pete vrste.

Čeprav so vsi atomi v strukturi enakovredni, to ne velja za vezi med njimi, saj so med heksagoni dvojne vezi, medtem ko so pentagoni in heksagoni povezani z enojnimi vezmi. To povzroči sferično strukturo, kjer so pentagoni odgovorni za konveksno okrivljenost, heksagoni pa za planarne površine. Njihova velika hidrofobnost je odgovorna za slabšo topnost v polarnih topilih, kar omejuje njihovo biološko uporabo. V vodni raztopini nastajajo stabilni agregati, kar so poskušali preprečiti z uporabo površinsko aktivnih snovi, ciklodekstrinov ter intenzivnega mešanja. V primerjavi z grafitom in diamantom so fulereni veliko bolj reaktivni, kar so izkoristili pri sintezi analogov. Z nukleofilnimi, elektrofilnimi, radikalskimi adicijami ter cikloadicijami so uspešno uvedli bolj polarne skupine (-OH, -NH₂, -NHR, -COOH, -OCCOR, -NHCOR in druge) na osnovno jedro in s tem povečali topnost. V *in vitro* in *in vivo* raziskavah so se za najbolj obetavne iskazali polihidroksifulereni C₆₀(OH)_n, ki iskazujejo visoko antioksidativno aktivnost (Slika 9b) (36).

1.2.2 SINTEZNI POSTOPEK FULERENOLA C₆₀(OH)₂₄ IN NJEGOVE LASTNOSTI

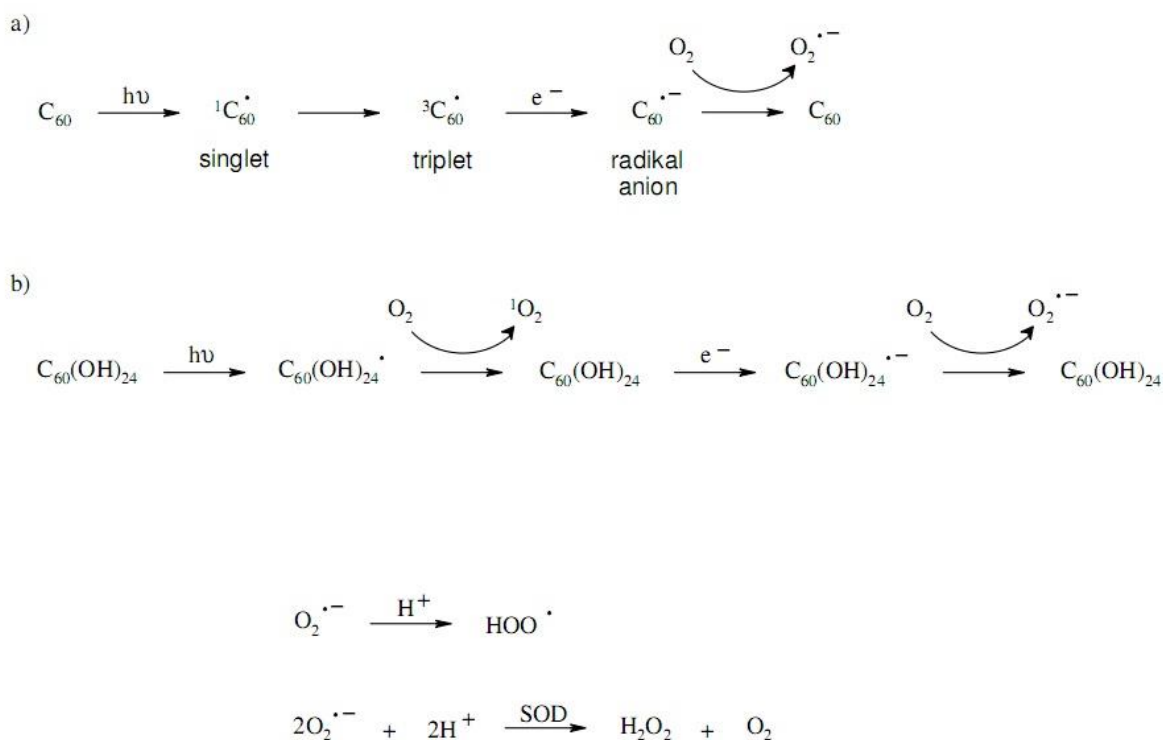
Fulerenol C₆₀(OH)₂₄ za potrebe raziskave so po originalnem postopku sintetizirali v Novem Sadu iz polibromiranega fulerena C₆₀Br₂₄. Reakcija poteka kot popolna substitucija v alkalnem mediju. Produkt s stopnjo čistosti, večjo od 95 %, je izredno težavno doseči (37).



V trdnem stanju je C₆₀(OH)₂₄ rjava, amorfna, higroskopna praškasta spojina, stabilna pri dnevni svetlobi in sobni temperaturi. Iskazuje tudi termostabilnost, saj po 24 urah pri 150 °C ostane nespremenjena še vedno 80 % spojine. V vodi je skoraj netopen (do 44 mg/ml) in tvori rjavo raztopino, ki v UV/VIS spektru ne daje značilnih vrhov. Za povečanje topnosti se mu pri parenteralni aplikaciji doda površinsko aktivno snov. Kot terciarni alkohol je v kislem v neionizirani obliki, v alkalnem pa je prisoten kot ioniziran C₆₀(OH)_{24-n} (ONa)_n (36).

1.2.3 BIOLOŠKO AKTIVNI DERIVATI FULERENA

Vpliv agregatov C_{60} so preučevali na človeških celicah, kjer so iskazali toksične učinke, medtem ko so bili ti pri $C_{60}(OH)_n$ manjši. Toksičnost povzročijo predvsem RKS, ki nastanejo s fotoekscitacijo molekule in nato vodijo v poškodbe celične membrane (36,38). Že triplet $C_{60}^{\cdot-}$ sam je dovolj reaktiven, da lahko povzroči citotoksične poškodbe na celicah, predvsem pa sproži nastanek RKS. V prvi fazi nastaneta superoksidni anion in singletni kisik (1O_2), ki se nato v naslednjih fazah pretvorita v hidroksilni radikal, vodikov peroksid in hidroperoksilni radikal (Slika 10). Predvsem singletni kisik, kot visokoreaktivna elektrofilna neradikalaska molekula in selektivni oksidant, reagira z vrsto biološko pomembnih skupin. Mednje sodijo z elektroni bogate dvojne vezi, enostavno oksidirajoče skupine, kot so sulfidi (R-S-R), anilini in fenoli, ter spojine, ki sodelujejo v Diels-Alderjevi reakciji (38). Posledica so poškodbe DNA ter lipidna peroksidacija celičnih membran. Ugotovili so tudi neposredne interakcije fulerena z DNA, kar nakazuje na uporabnost njegovih derivatov v terapiji genskega zdravljenja (36).



Slika 10: Fotoekscitacija molekul C_{60} (a) ter $C_{60}OH_{24}$ (b) ter nastanek RKS (4)

Lahko pa fulereni delujejo tudi kot lovilci radikalov, kar je potrdilo več raziskovalnih skupin. Predvsem polihidroksifulereni so v antioksidativnem modelnem sistemu pri inaktivaciji superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot-}$) in hidroksilnega (OH^{\cdot}) ter dušikovega oksida (NO^{\cdot}) dosegli odlične rezultate. Mehanizem temelji na katalitičnem vplivu v zaključni stopnji radikalnih reakcij oziroma na radikalsko-adicijskih reakcijah hidroksilnega radikala na

dvojne vezi v $C_{60}(OH)_n$ (36). Predvidevajo, da mehanizem apoptoze $C_{60}(OH)_n$ ne vključuje nastanka RKS, kar so dokazali pri fulerenih (39).

Zaščitne učinke C3-karboksifulerenov so odkrili na perifernih mononuklearnih celicah. Z delnim vgrajevanjem v membrane mitohondrijev so preprečili celično smrt, ki naj bi bila posledica vpliva 2-deoksi-D-riboze, dejavnika tumorske nekroze TNF- α in cikloheksimida. *In vivo* raziskave so potrdile antioksidativno delovanje v dopaminergičnem delu možganov, kjer povečana koncentracija železovih ionov povzroči oksidativni stres in z njim povezane patološke posledice, predvsem nevrodegenerativne bolezni. Injiciranje C3-karboksifulerena v intrastrialni del bazalnih ganglijev je zmanjšalo poškodbe na dopaminskih receptorjih, povzročene z vnosom železa. Znano je njihovo zaviranje virusne replikacije ter ugoden vpliv na vzdrževanje ionske homeostaze v celicah. Pojasnjen je vpliv C3-karboksifulerenov na inhibicijo relaksacije aorte kunca, povzročeno preko dušikovega oksida. Relaksacijo sproži nastanek NO, ki ga nato nevtralizira superoksidni radikal. Razgradnja superoksidnega radikala poteka pod vplivom SOD in tako naj bi delovali tudi C3-karboksifulerani (36).

1.2.4 POTENCIALNA UPORABA FULERENOLA V TERAPIJI

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ se preko krvnega obtoka dobro porazdeljuje v vsa tkiva, razen v možgane. Povečano akumulacijo so zasledili predvsem v jetrih, ledvicah, kosteh, slini ter trebušnih organih (39).

V *in vitro* raziskavah na živalskih in človeških celicah različnih tumorskih linij so odkrili antiproliferativno vlogo fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$. Inhibicijo rasti so ugotovili pri linijah eritrolevkemije, adenokarcinoma dojk, ledvičnih celicah hrčka ter fibroblastih pri miših, medtem ko je bila inhibicija pri Burkitem limfomu izrazito manjša. Inhibicija rasti je reverzibilna, saj so vrednosti po 48 urah inkubacije primerljive kontrolnim. Na človeških celicah eritrolevkemije K-562 so preučevali vpliv $C_{60}(OH)_{24}$ na sintezo DNA in celični cikel. Ugotovili so inhibicijo nastanka delitvenega vretena in mikrotubolov ter prevladujoč citostatičen učinek, kar je potrdila stopnja preživelih celic (36).

Fulerenol v *in vitro* raziskavah na človeških limfocitih ni pokazal genotoksičnih učinkov v koncentracijah do 10^3 $\mu\text{g/ml}$. Identična raziskovalna skupina je v *in vivo* raziskavi na podganah preučevala njegove radioprotektivne učinke. Ugotovili so, da odmerek 100 mg/kg, apliciran intraperitonealno 30 minut pred obsevanjen, zadovoljivo zaščiti organe živali pred poškodbami (40).

1.2.5 ANTIOKSIDATIVNE LASTNOSTI FULERENOLA

Oksidativne poškodbe celic se pojavljajo pri patoloških stanjih mnogih bolezni, lahko pa so tudi posledica zdravljenja. Oksidativni stres zelo poškoduje mitohondrije, ker v njih samih potekajo intenzivne oksidacijske reakcije in so vir nastanka večine RKS v celici. Pomembno vlogo naj bi imela prevsem depolarizacija notranje membrane mitohondrija, kar vodi v sprostitvev proapoptotičnih molekul, kot je citokrom c, ki sprožijo aktivacijo kaspaz in celično smrt (41). Raziskave so potrdile interakcije tako polihidroksifulerenov kot C3-karboksifulerenov z mitohondriji, kjer so zmanjšali oksidativne poškodbe in delovali citoprotektivno.

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ deluje kot antioksidant le v nižjih koncentracijah, tako da veže reaktivne radikale na svojo površino. Interakcija temelji na radikalski adiciji hidroksilnega radikala (OH^{\bullet}) na dvojne vezi v fulerenolu do produkta $C_{60}(OH)_{24} + (OH^{\bullet})_{2n}$ ($n = 1-12$). Drug mehanizem predvideva, da fulerenol odda proton (H^+) hidroksilnemu radikal (OH^{\bullet}) in s tem nastane stabilni radikal $C_{60}(OH)_{23}O^{\bullet}$, katerega obstoj so potrdili z elektronsko spinsko resonanco. *In vivo* in *in vitro* študije so dokazale tudi sposobnost odstranjevanja NO, ki se je sproščal iz dinatrijevega pentacianonitrozil ferata(III) ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$). Dušikov oksid lahko z superoksidnim anionom reagira do zelo reaktivnega peroksinitrita, ki povzroča oksidativni stres (42).

Primerjali so tudi antioksidativno učinkovitost fulerenola v primerjavi z askorbinsko kislino na gladkomišičnih celicah. Na dveh linijah celic je fulerenol dosegel večjo učinkovitost kot znani antioksidant (43).

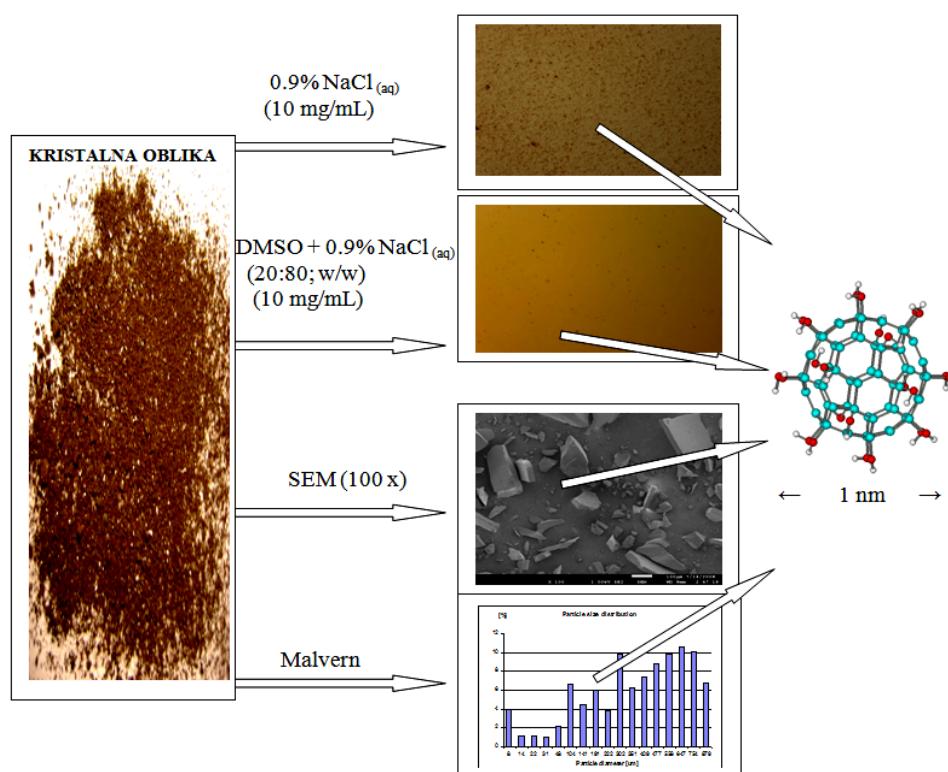
2 NAMEN DELA

Toksičnost doksorubicina se pokaže na večini organov in omejuje njegovo terapevtsko uporabo. Oksidativni stres, kot glavni povzročitelj toksičnosti doksorubicina, povzroča patološke poškodbe tudi na pljučnem tkivu. Namen naše raziskave je preučiti potencialne zaščitne učinke antioksidanta fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ v koncentracijah 25, 50 in 100 mg/kg/teden na kronične poškodbe pljuč povzročene z doksorubicinom v odmerku 1,5 mg/kg/teden v obdobju treh tednov. Poskuse bomo opravili na *in vivo* modelu s samci podgan vrste *Wistar*, katerim bomo predhodno povzročili kolonorektalne neoplazme s kemijsko aplikacijo DMH-ja (1,2-dimetilhidrazina). Rezultate bomo primerjali z učinki dobro poznanega antioksidanta askorbinske kisline (vitamina C) (100 mg/kg/teden v obdobju treh tednov) in na podlagi biokemijskih, hematoloških in makroskopskih rezultatov ocenili protektivno vlogo fulerenola na pljuča.

3 MATERIALI IN METODE

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

Vse raztopine so bile pripravljene neposredno pred aplikacijo v aseptičnih pogojih v brezprašni komori. Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ (Novi Sad, Srbija) je bil raztopljen v sterilizirani in apirogeni raztopini NaCl (0,9%) : DMSO (80 : 20; m/m), oboje v koncentraciji 10 mg/ml (Slika 10). Proizvajalec pri raziskavi uporabljenega doksorubicina (*Adriablastina*[®]) za i.v. (intravensko) uporabo je Pharmacia & Upjohn (Milano, Italija). Raztopina za i.p. (intraperitonealno) aplikacijo je bila pripravljena s sterilizirano in apirogeno 0,9 % raztopino NaCl (2 mg/ml). Vitamin C[®] (ampule 500 mg/5 ml) proizvajalca Galenika a.d. (Beograd – Zemun, Srbija), z L-askorbinsko kislino, je bil raztopljen v vodi za injekcije.



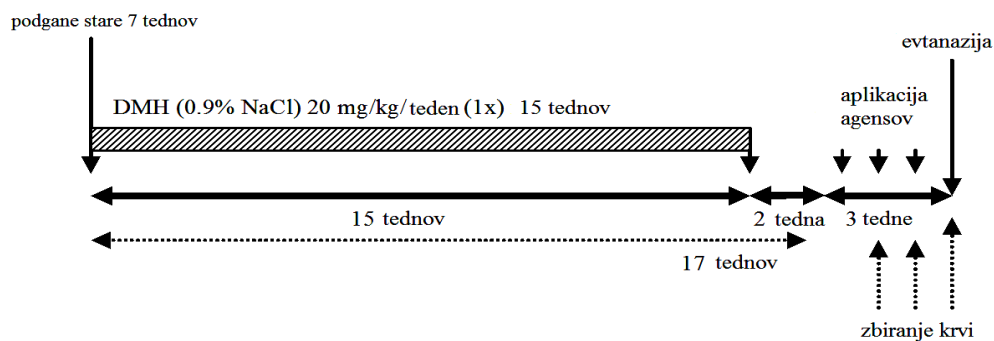
Slika 10: Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$: makroskopski izgled (kristalna oblika); raztopljen v fiziološki raztopini (optični mikroskop, veliko število agregatov fulerenola z velikostjo 50 – 100 μm), raztopljen v raztopini DMSO / 0,9% NaCl (optični mikroskop, nekaj agregatov fulerenola; velikosti < 20 μm); SEM (ang. »scanning electron microscope«) pogled; porazdelitev velikosti delcev (Malvern metoda); strukturna shema (44)

Poskusi so bili izvedeni na samcih podgan vrste *Wistar* (Medicinski eksperimentalni center, Ljubljana, Slovenija), starih 7 tednov in nameščenih po 3 ali 4 na kletko pri sobni temperaturi 22-23 °C, vlažnosti $55 \pm 10\%$ in 12 urnem ciklu svetloba/tema. Živali so imele 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). Študije so bile izvedene v skladu z Evropsko konvencijo za zaščito vretenčarjev (ang. »*European Convention for the protection of vertebrate animals*«), ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (ETS 123).

Živali so bile naključno razdeljene v naslednjih devet skupin (po 10 na skupino):

- 1) **Kontrolna zdrava skupina** – podgane, ki so enkrat na teden prejele fiziološko raztopino 0,9 % NaCl;
- 2) **Kontrolna skupina s kemijsko povzročnim rakom** – podgane, ki so prejele DMH, obdelan s fiziološko raztopino 0,9 % NaCl/DMSO (80/20; m/m, na teden);
- 3) **Dox skupina** – podgane, ki so prejele DMH in doksorubicin 1,5 mg/kg/teden;
- 4) **Frl/Dox skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 100 mg/kg/teden 30 minut pred doksorubicinom 1,5 mg/kg/teden;
- 5) **Frl/Dox skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 50 mg/kg/teden 30 minut pred doksorubicinom 1,5 mg/kg/teden;
- 6) **Frl/Dox skupina** – podgane, ki so prejele DMH in fulerenol 25 mg/kg/teden 30 minut pred doksorubicinom 1,5 mg/kg/teden;
- 7) **Vitamin C/Dox skupina** – podgane, ki so prejele DMH in vitamin C 100 mg/kg/teden 30 minut pred doksorubicinom 1,5 mg/kg/teden;
- 8) **Frl skupino** – 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.

Vsem 80 podganam (razen tistim v kontrolni zdravi skupini) je bil enkrat na teden v obdobju 15 tednov *i.p.* (intraperitonealno) apliciran DMH (1,2-dimetilhidrazin) (*Slika 11*).



Slika 11: Eksperimentalni protokol

Pri 24., 25. in 26. tednu starosti so bile podgane tretirane z doksorubicinom (1,5 mg/kg), fulerenolom (25, 50, 100 mg/kg), in/ali vitaminom C (100 mg/kg). Odmerki fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ so bili izbrani glede na predhodne študije na zdravih odraslih podganah vrste *Wistar* in nadaljnih raziskavah akutne toksičnosti, povzročene z doksorubicinom, na modelu raka dojke pri podganah (44). Sedem dni po zadnji aplikaciji (v 27. tednu starosti) so podgane žrtvovali z uporabo CO_2 . Odstotek preživetja poskusnih živali do konca poskusa je bil 100%.

3.2 KEMIJSKA POVZROČITEV KOLOREKTALNIH TUMORJEV

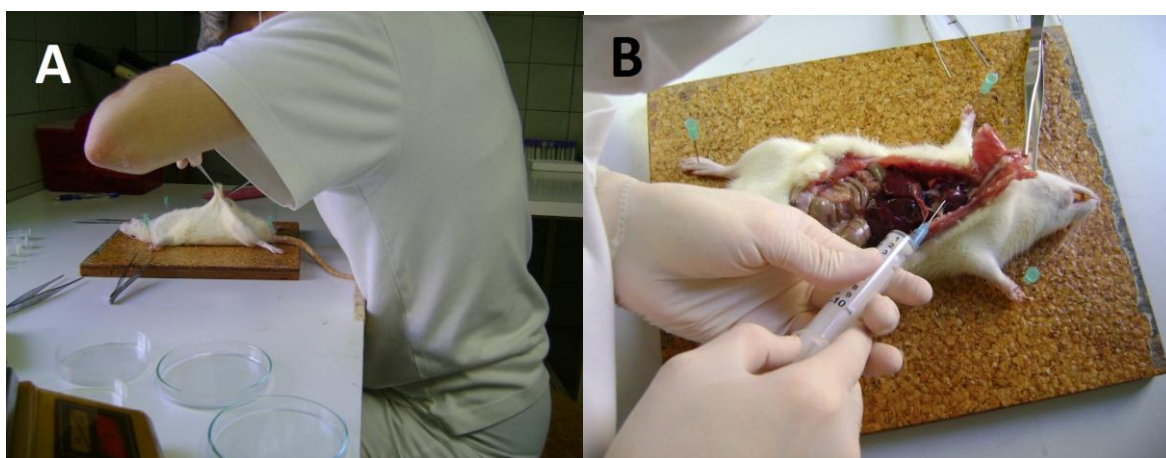
Kolorektalni rak je bil povzročen z DMH-jem (Fluka Chemie, Švica), pripravljenim po standardni metodi, pri kateri se DMH raztopi v 0,001 M EDTA, čemur sledi uravnavanje pH vrednosti na 6,8 z 0,1 M raztopino NaOH. Pred aplikacijo se je vedno pripravila sveža raztopina. Pri obdukciji živali je bilo odstranjeno črevesje, vzdolžno odprto, očiščeno s tekočo vodo, fiksirano v 10 % pufranem formalinu ter makroskopsko pregledano za prisotnost tumorjev (Slika 12a). Debelo črevo je bilo vzdolžno prerezano in poslano na histološki pregled celotnega tkiva za makroskopskimi vidnimi poškodbami. Vsi vzorci tkiv so bili shranjeni v parafinu in obdelani s kromovim barvilom *Kreyberg-Jareg*.

3.3 KOEFICIENT MASE PLJUČ

Koeficient tkiva pljuč glede na telesno maso se izračuna kot razmerje med tkivom organa (mokra masa v mg) glede na celotno telesno maso (g). Med obdukcijo se pljuča izreže in stehta.

3.4 OCENA PROTEKTIVNIH UČINKOV $C_{60}(OH)_{24}$ NA PLJUČNO TKIVO

Kri za analizo je bila odvzeta iz orbitalnega venskega sinusa, dokler so bile živali še žive, kasneje pa 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 hidroksibutiratne dehidrogenaze (α -HBDH). Uporabljena sta bila komercialna reagenta *Chema Diagnostica* (Jesi, Italija) za LDH in *Dialab* (Dunaj, Avstrija) za določitev α -HBDH. Postopek je potekal po protokolu proizvajalcev, rezultati so podani v U/l.



Slika 12a in 12b: Obdukcija živali in odvzem krvi po torakotomiji

Pljuča so bila odstranjena takoj po žrtvovanju podgan in postavljena v ledeno hladno raztopino. Maščobno tkivo je bilo fizično odstranjeno. Očiščeno tkivo pljuč je bilo nato razkosano in homogenizirano v pufru *Tris* (pH 7,4; organ/pufer = 1/10; m/m) ter razdeljeno na dva dela. Prvi del smo uporabili za določitev vsebnosti MDA, drugi del pa smo centrifugirali pri $13.000\times g$ 20 minut pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hladilnik *Beckman*, Ultracentrifuga). Po centrifugiranju smo supernatant uporabili za določitev celokupne koncentracije proteinov (TP), GSH, GSSH, GSH-Px, GR, SOD, CAT, LDH in α -HBDH.

Koncentracijo MDA (v $\mu\text{g/l}$) smo merili na osnovi tvorbe kompleksa MDA-tiobarbiturna kislina (MDA-TBA) z tiobarbiturno kislino, pri nizkem pH in povišani temperaturi. Uporabljen je bil komercialni komplet za HPLC *Chromsystems Diagnostic* (München, Nemčija). S tem kompletom sta bili izmerjeni tudi koncentraciji (v mg/l) prostega GSH in GSSG, ter iz njiju izračunano razmerje GSH/GSSG. Merjenje koncentracij je potekalo na HPLC sistemu *Agilent HP* model 1100, opremljenim z avtomatskim vzorčevalcem in fluorescenčnim detektorjem (Waldbronn, Nemčija). Ostali komercialni kompleti, uporabljeni

pri serumu, so bili: TP (*Sentinel Diagnostic*, Milano, Italija), GSH-Px in GR (*Ransel*, Crumlin, VB), CAT ter SOD (*Ransod*, Crumlin, VB). Aktivnost katalaze (CAT) je bila določena v skladu z *Aebi* metodo, kjer H_2O_2 reagira s celičnim lizatom. Spektrofotometrično smo pri 240 nm merili začetno porabo H_2O_2 (0 – 60 s). Vrednosti GSH-Px, GR, SOD, CAT so podane glede na maso celokupnih proteinov. Analize so bile izvedene v skladu z že prej znanimi protokoli (44).

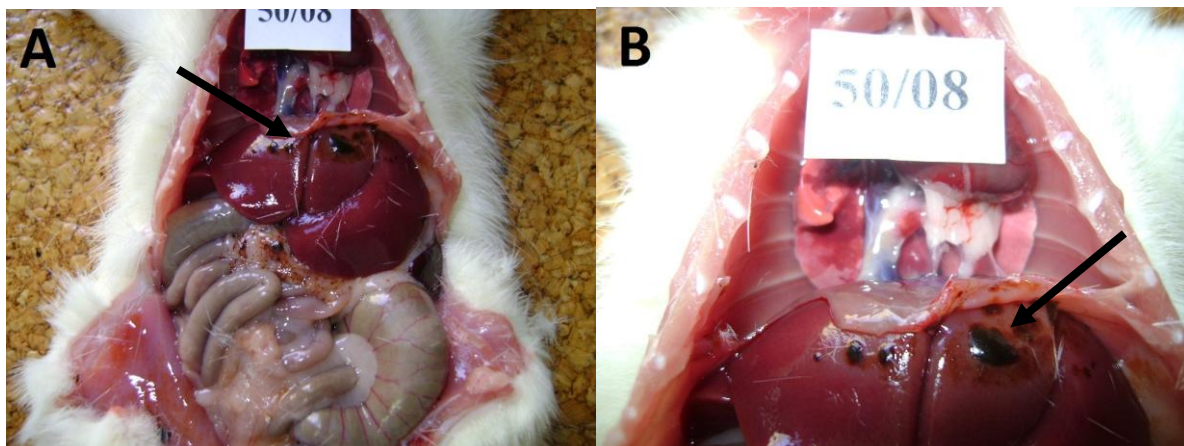
3.5 STATISTIČNA ANALIZA

Vrednosti so izražene kot srednja vrednost \pm standardni odklon (SD). Za primerjavo skupin je bila uporabljena analiza variance, ki mu sledi *LSD Post Hoc test* (SPSS 15.0 za Windows), vrednosti s $p < 0.05$ so se štele za statistično značilne (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 MAKROSKOPSE SPREMEMBE

Obdukcija podgan je pokazala edeme tkiva jeter pri vseh skupinah, ki so prejele doksorubicin in/ali fulerenol. Pri največjem odmerku fulerenola 100 mg/kg se kar 20 % učinkovine ni absorbiralo in se je neraztopljen nakopičila v trebušni votlini, predvsem na ventralni površini trebuha in jeter ter trebušnem maščobnem tkivu (Sliki 13a in 13b). Razlogi so predvsem v slabi topnosti in velikosti delcev fulerenola. Delež neraztopljenega fulerenola se je manjšal z zmanjševanjem odmerka od 100 mg/kg do 25 mg/kg. Prav tako sta nižja odmerka fulerenola izkazala boljšo protektivnost na tkivo jeter ter srca, kar nakazuje na antioksidativne lastnosti predvsem v nižjih koncentracijah. Odmerek 100 mg/kg je pokazal tudi zaščitne učinke na citotoksičnost, povzročeno zaradi i.p. aplikacije dimetil sulfoksida (44).



Slika 13a in 13b: Makroskopske spremembe v trebušni votlini pri podganah, ki so bile tretirane s fulerenolom. V trebušni votlini, zlasti na območju jeter in mezenterične (mezenterij = oporek tankega črevesja) maščobe okrog jeter, kjer opazimo črne in rjave delce fulerenola.

Uporaba antioksidantov pri preprečevanju neželenih učinkov doksorubicina na pljuča skorajda ni preučevana. V predhodnih študijah skupin Machado NG. (20) in Minch MF. (21) so dokazali, da doksorubicin oksidativno poškoduje tkivo pljuč in povzroči nastanek histopatoloških sprememb. Raziskovalna skupina Öz E. je pri večjem odmerku doksorubicina (45 mg/kg) preučevala zaščitne učinke melatonina pri preprečevanju njegove toksičnosti in ugotovila izboljšanje oksidativnega statusa pljuč, kot tudi drugih organov (25). Ti podatki in

ugotovitve skupine *Injac R.* (19), ki je raziskovala protektivnost fulerenola pri akutni pulmotoksičnosti doksorubicina, nakazujejo protektivno vlogo uporabe antioksidantov pri zaščiti pljuč pred toksičnostjo doksorubicina. Več raziskav z uporabo antioksidantov pri preprečevanju toksičnosti doksorubicina je bilo opravljenih tudi na drugih tkivih. Različni naravni ter sintezni antioksidanti (*Preglednica III in IV*) so uspešno zmanjšali neželene učinke doksorubicina na srce, jetra, ledvice in testise.

V *preglednici V* so predstavljeni rezultati telesne mase in koeficienta pljuč po skupinah, izmerjenih takoj po žrtvovanju živali. Koeficient pljuč je izračunan kot razmerje med mokro maso pljuč (mg) in telesno maso živali (g). Statistično značilne razlike med skupinami so podane kot a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$.

Preglednica V: Telesna masa in koeficient pljuč po skupinah

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

Telesna masa se je v vseh skupinah statistično zmanjšala glede na kontrolno skupino, ki je prejela le fiziološko raztopino. Glavni vzrok temu bi lahko bila aplikacija DMH in DMSO, saj je raziskava, ki je preučevala vpliv odmerka fulerenola (100 mg/kg) na preprečevanje kardiotoksičnosti enkratnega odmerka doksorubicina (8 mg/kg), ugotovila približno 17% padec telesne mase podgan pri vseh skupinah, ki so jim povzročili tumorje (17). Padec telesne mase je statistično največji ($p < 0,001$) v skupinah od tretje do sedme, ki so prejele doksorubicin sam ali v kombinaciji s fulerenolom ali vitaminom C. Do podobnih rezultatov je prišla tudi raziskovalna skupina *Machado NG.*, ki je prav tako zasledila padec telesne mase pri podganah, ki so prejele doksorubicin (20). Več raziskav predvideva, da naj bi doksorubicin zmanjšal absorbcijo hranil iz gastrointestinalnega trakta zaradi citotoksičnega vpliva na hitrodeleče se celice in s tem povzročil zmanjšanje telesne mase (20,22,35). Tudi fulerenol (100 mg/kg) sam povzroči padec telesne mase glede na zdravo kontrolno skupino,

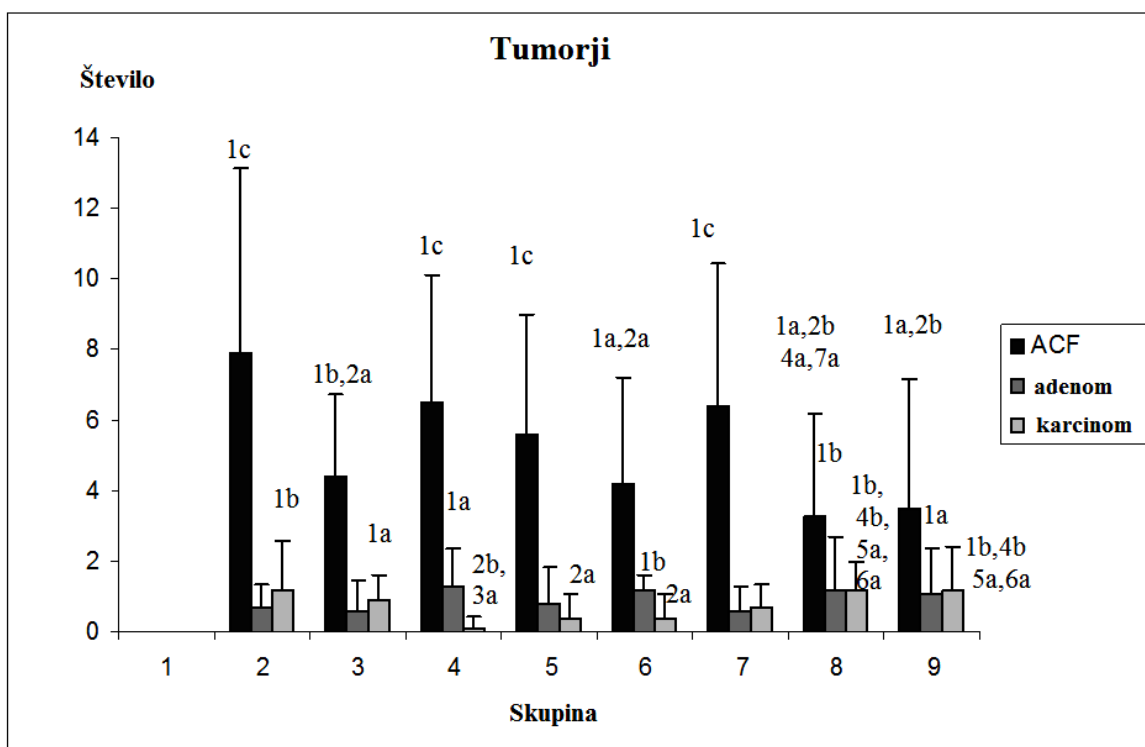
kar je po predvidevanjih posledica njegovega prooksidativnega delovanja v večjih koncentracijah. V skupinah, ki so prejele doksorubicin in fulerenol v različnih koncentracijah (4. do 6. skupina), je padec telesne mase največji. Znižanje telesne mase je največje v šesti skupini (fulerenol 25 mg/kg in doksorubicin) in peti skupini (fulerenol 50 mg/kg in doksorubicin), ki se statistično značilno ($p < 0,01$) razlikujeta tudi od kontrolne rakave skupine. To nakazuje, da fulerenol v teh dveh odmerkih ni uspel preprečiti oksidativnih poškodb zaradi doksorubicina in DMH. Četrta skupina (fulerenol 100 mg/kg in doksorubicin) je statistično podobna kontrolni rakavi skupini. Razlog je predvidoma boljša protektivnost fulerenola v višjih koncentracijah proti toksičnosti in s tem poškodbam tkiva zaradi doksorubicina. Skupina, ki je prejela izključno vitamin C, doseže statistično manjši padec telesne mase kot ostale skupine v primerjavi s zdravo kontrolno skupino. Skupinam, ki so prejele doksorubicin ali doksorubicin in fulerenol se telesna masa statistično značilno zmanjša ($p < 0,001$) v primerjavi s skupino, ki je prejela izključno vitamin C.

Koeficient pljuč se je povečal pri vseh skupinah glede na prvo skupino (zdrava kontrolna skupina). To pomeni, da že zdravljenje z doksorubicinom v kombinaciji s fulerenolom ali vitaminom C oziroma že samostojna aplikacija antioksidantov ali doksorubicina značilno poveča razmerje med maso organa in telesno maso. Skupinam od tretje do osme se je koeficient statistično značilno najbolj povečal ($p < 0,001$), medtem ko je ta razlika pri drugi in deveti skupini manjša ($p < 0,05$). Pri preučevanju akutne pulmotoksičnosti pri višjih odmerkih doksorubicina (8 mg/kg) so odkrili, da sočasna aplikacija fulerenola v odmerku 100 mg/kg statistično pomembno ($p < 0,05$) zmanjša povečanje koeficienta pljuč v primerjavi s skupino, ki je prejela le doksorubicin (19). Skupina *Machado NG*. je ugotovila padec telesne mase pri vseh podganah, ki so prejele doksorubicin, vendar statističnih razlik o masi pljuč med preiskovanimi skupinami niso odkrili (20).

4.2 TUMORJI

Na črevesju preiskovanih podgan je bila opravljena tudi histopatološka ocena tkiva. Rezultati kažejo, 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 že objavljenimi raziskavami v preteklosti (44). Dokazano je, da doksorubicin nima nobenega vpliva na število preneoplastičnih lezij, toda rezultati kažejo, da bistveno vpliva na razvoj karcinoma. Število karcinomov se je v skupini, ki je poleg doksorubicina predhodno prejela še 100 mg/kg fulerenola, statistično zmanjšalo ($p < 0,05$) glede na skupino, ki je

prejela le doksorubicin. Ti rezultati in ugotovitve pridobljene v *in vitro* raziskavah kažejo, da ima fulerenol citotoksične učinke na karcinogene celice. Razlike v številu kolorektalnih tumorjev med preiskovanimi skupinami so prikazane v *Grafu 1* (44).



Graf 1: Razlike v številu kolorektalnih tumorjev med preiskovanimi skupinami. Številke kažejo na pomembne 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, torej brez predhodnega poznavanja statusa vsake žival. Kriptna žarišča (ACF) so bila ocenjena po merilih, ki se rutinsko uporabljajo pri patologiji. Mikroskopske poškodbe, ki vsebujejo dve do pet displastičnih kript, so razvrščene kot ACF, tiste, ki pa so sestavljene iz več kot pet, so opredeljene kot adenom. Histološki kriteriji za določanje adenomov in karcinomov temeljijo na mednarodni klasifikaciji tumorjev pri glodavcih (4444).

4.3 HEMATOLOŠKI PARAMETRI IN AKTIVNOST SERUMSKIH ENCIMOV

Rezultati merjenja hematoloških parametrov so podani v *preglednici VI*. Preverjalo se je vrednosti bele krvne slike (levkociti) in rdeče krvne slike (eritrociti, retikulociti, hemoglobin (Hbg) in hematokrit (HCT)). Merjenje se je izvedlo en teden po vsakokratni aplikaciji doksorubicina, fulerenola in/ali vitamina C, v obdobju treh tednov do evtanazije živali (*slika II*). Statistična primerjava pomembnih sprememb znotraj skupine v obdobju treh tednov (eksponenti pred vrednostmi, *preglednica VI*) ter med posameznimi skupinami v enakem tednu (eksponenti za vrednostmi, *preglednica VI*) ni pokazala tolikšnih razlik, kot so bile ugotovljene pri preučevanju akutne toksičnosti doksorubicina po enkratnem odmerku 8 mg/kg po dveh tednih (44). Vzroki temu bi lahko bili v našem primeru nižji uporabljeni odmerki

doksorubicina (1,5 mg/kg/teden, v obdobju 3 tednov), ki je bliže terapevtskemu in daljše časovno obdobje merjenja ter aplikacije doksorubicina, fulerenola in/ali vitamina C. Celice so vsakokrat prejele manjši toksični enkratni odmerek in celokupni odmerek ter so imele več časa za prilagoditev na stresne pogoje kot tiste v raziskavi akutne toksičnosti doksorubicina.

V obdobju treh tednov opazimo statistično pomembno razliko med skupinami v koncentraciji levkocitov pri osmi (samo fulerenol) in deveti skupini (samo vitamin C), izjema je le peta skupina. Opaziti je tudi trend, da koncentracija levkocitov znotraj skupine iz prvega v drugi teden naraste in nato zopet pade v tretjem tednu, vendar razlika večinoma ni signifikantna. Pomembna razlika je tudi v vrednosti retikulocitov, ki so nezreli eritrociti z ostanki jedra in pokazatelj motenj v razvoju rdečih krvnih celic. Izrazito odstopa sedma skupina (vitamin C in doksorubicin) v drugem tednu, ki se statistično pomembno razlikuje od prvih šestih skupin v istem tednu. V vseh skupinah je opazen porast vrednosti po treh tednih glede na prvi teden v skupini, izjema je le peta skupina (doksorubicin in fulerenol 50 mg/kg/teden). V tej skupini vrednost po prvem tednu $(1178 \pm 150) \times 10^9/l$ močno pade v primerjavi z drugim tednom $(742 \pm 43) \times 10^9/l$ in nato zopet naraste v tretjem tednu $(998 \pm 228) \times 10^9/l$, vendar ne preseže vrednosti prvega tedna. Skupine, ki so prejele doksorubicin in različne odmerke fulerenola ali vitamina C, se v primerjavi s prvima dvema skupinama (kontrolni skupini) statistično pomembno razlikujejo v tretjem tednu. Pri ostalih rezultatih krvne slike (eritrociti, hematokrit in hemoglobin) ni bilo posebnosti.

Vsakega sedem dni po aplikaciji agensov v obdobju treh tednov so se podganam odvzeli vzorci krvi za oceno serumske aktivnosti encimov LDH in α -HBDH. Rezultati so podani v preglednici VI in iz njih je izračunano tudi razmerje α -HBDH/LDH.

Laktatna dehidrogenaza (LDH) je encim, ki se v visokih koncentracijah pojavlja v jetrih, srcu, skeletnih mišicah in ledvicah. V manjši meri je prisoten še v drugih tkivih, tudi pljučih. Katalizira pretvorbo laktata v piruvat in obratno. Povišane koncentracije so lahko posledica miokardnega infarkta, hepatitisa, ledvične odpovedi, anemije, malignih obolenj ali okužbe s HIV. α -hidroksibutiratna dehidrogenaza (α -HBDH) je eden izmed petih izoencimov LDH, ki se ločijo na elektroforezi in pri diagnostiki omogočajo razlikovanje med poškodbo srčnega oziroma jetrnega izvora (45).

Pri vseh skupinah podgan opazimo padec vrednosti obeh encimov znotraj skupine iz prvega v tretji teden. Skoraj v vseh primerih je ta razlika statistično značilna. V zdravi kontrolni skupini opazimo po prvih dveh tednih nenormalno visoke vrednosti obeh encimov, ki so verjetno posledica *i.p.* aplikacije fiziološke raztopine. Podgane iz drugih skupin so že pred tem 15 tednov prejemale *i.p.* apliciran DMH in so se že navadile osebja ter same

aplikacije učinkovin. Za podgane iz prve skupine pa je že aplikacija fiziološke raztopine predstavljala velik stres in posledično smo opazili velike koncentracije obeh encimov v prvih dveh tednih, ki nato v tretjem tednu statistično pomembno padejo, ko se živali prilagodijo stresu.

Po tretjem tednu zdravljenja s terapevtskim odmerkom doksorubicina (1,5 mg/kg/teden), lahko na podlagi zbranih rezultatov sklepamo, da je v podganah prišlo do prilagoditve biokemičnih poti v jetrih, kar nakazujejo vrednosti LDH in α -HBDH (44). Najvišje vrednosti LDH in α -HBDH po treh tednih smo ugotovili v sedmi skupini (vitamin C in doksorubicin). Statistično se razlikujejo od vseh ostalih skupin, ki so prejele doksorubicin, najbolj ($p < 0,001$) od četrte, pete in šeste skupine, kjer je namesto vitamina C apliciran fulerenol. Skupine (4., 5., 6. in 8.), ki so prejele fulerenol, so v tretjem tednu dosegle najnižje vrednosti obeh encimov med skupinami. Iz tega sklepamo, da fulerenol v tretjem tednu (sam ali skupaj z doksorubicinom), ugodno vpliva na preiskovana encima, saj se vrednosti statistično pomembno ($p < 0,05$ in $p < 0,001$) razlikujejo od druge skupine (kontrolna rakava). Najnižjo vrednost LDH je po tretjem tednu dosegla šesta skupina, ki je prejela doksorubicin in najnižji odmerek fulerenola, medtem ko je vrednost α -HBDH najnižja v skupini, ki je prejela samo fulerenol. Znotraj vseh skupin, razen druge in devete, pride tudi do statistično pomembnega padca vrednosti v tretjem tednu glede na prvi in drugi teden ($p < 0,05$).

Razmerje α -HBDH/LDH se uporablja za razlikovanje med boleznimi jeter in srca. Padec razmerja nakazuje večjo poškodbo jetrnega parenhima, medtem ko porast obeh encimov kaže na poškodbe srčnega tkiva (9). Vrednosti vseh skupin se po treh tednih statistično razlikujejo ($p < 0,001$) od zdrave kontrolne skupine, kar je verjetno posledica *i.p.* aplikacije, makroskopskih poškodb ter tudi kumulativnega učinka fulerenola. Znotraj skupin je opazen porast razmerja α -HBDH/LDH iz prvega v tretji teden, vendar je razlika statistično pomembna le pri obeh kontrolah (1. in 2. skupina) ter skupinama, ki sta prejeli nižji odmerek fulerenola in doksorubicin (5. in 6. skupina). Na podlagi teh dveh encimov ne moremo potrditi, da je prišlo do poškodb pljučnega tkiva. Je pa raziskovalna skupina *Minch R.F.* potrdila dvig serumskih vrednosti LDH po *in situ* perfuziji pljuč psov z doksorubicinom v različnih odmerkih, kar nakazuje na patološke procese v pljučih zaradi doksorubicina (21).

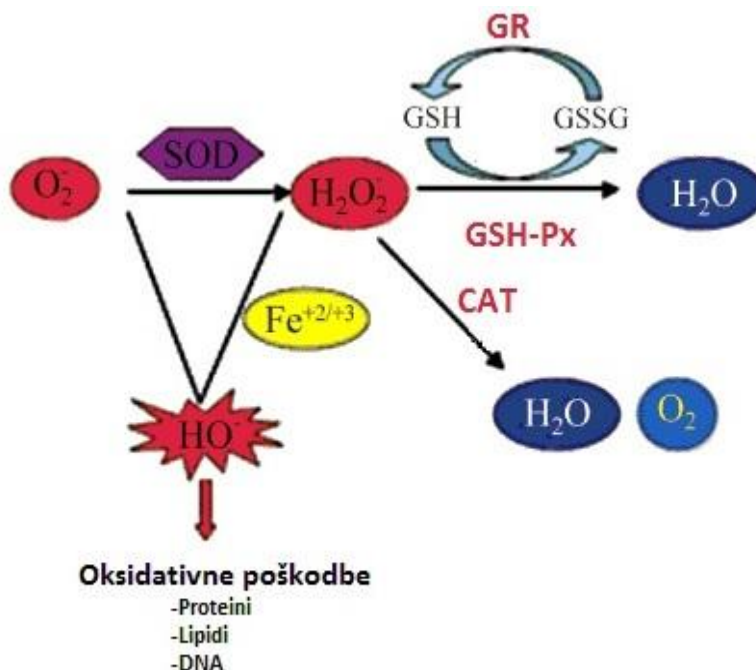
Preglednica VI: Hematološki parametri in vrednosti serumskih encimov v obdobju teh tednov v isti skupini (eksponenti pred vrednostmi) in v okviru istega tedna med skupinami (eksponenti po vrednostih). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001); * po prvi aplikaciji.

Parameter	Teden*	Skupine								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
levkociti (x 10 ⁹ /l)	I	6,4±1,2	6,3±0,6	6,0±1,1	6,5±1,4	8,2±1,6 ^{2a}	6,4±0,7	6,5±1,9	9,7±1,8 ^{1b2b3c4b6b7b}	8,7±2,5 ^{1a2a3b4a6a7a}
	II	6,9±2,0	7,0±1,2	1b ⁸ 6,6±1,4	1b ⁸ 8,0±1,3	8,9±1,0	1b ⁷ 7,9±1,2	7,8±1,4	9,2±1,8	9,5±1,8
	III	5,9±0,6	6,8±1,1	1b ⁶ 6,9±1,5	1b ⁶ 6,5±0,7	1b ⁶ 6,9±1,1	1b ⁶ 6,6±0,9	6,4±0,9	7,3±1,4 ^{1a}	8,0±1,9 ^{1c2a4b5a6a7b}
eritrociti (x 10 ¹² /l)	I	9,1±0,4	8,4±0,3 ^{1a}	8,4±0,7 ^{1a}	8,9±0,4	8,7±0,4	8,3±0,2 ^{1b1a}	8,3±0,6 ^{1b1a}	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 ^{3a}	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 ^{1a}	1b ⁸ 8,4±0,3	1b ⁸ 8,3±0,3	1b ⁸ 8,4±0,5	7,8±0,7 ^{1a}	8,2±0,7	8,4±0,4
hemoglobin Hbg (g/dl)	I	158,5±7,4	147,2±7,9 ^{1a}	154,5±8,1	156,0±6,1	156,6±8,9 ^{2a}	153,6±1,5	153,2±5,1	158,2±4,8 ^{2a}	158,4±9,9 ^{2a}
	II	154,3±13,2	145,6±19,8	147,8±11,0	157,4±9,7	159,4±6,1 ^{2a}	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	1b ¹ 147,8±7,8	151,3±8,3	143,0±13,4	149,6±12,1	150,3±8,7
hematokrit HCT (%)	I	0,5±0,0	0,4±0,0 ^{1c}	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0 ^{1b}	0,4±0,0 ^{1b}	0,5±0,0	0,5±0,0 ^{2a}
	II	0,5±0,0	0,4±0,1 ^{1a}	0,4±0,0 ^{1a}	0,5±0,0	0,5±0,0 ^{2a}	0,4±0,0 ^{1b5a}	0,4±0,0 ^{1b4a5a}	0,5±0,0	0,5±0,0
	III	0,5±0,0	0,5±0,1 ^{1a}	0,4±0,0 ^{1b}	0,5±0,0	0,4±0,0 ^{1a}	1b ¹⁰ 0,5±0,0	0,4±0,0 ^{1c2a6a}	0,5±0,0	0,5±0,0 ^{7a}
retikulociti (x 10 ⁹ /l)	I	612±86	603±176	662±303	808±325	1178±150 ^{1c2c3c4b}	958±224 ^{1b2b3b5a}	819±54 ^{2a5b}	691±82 ^{5c6b}	574±67 ^{4a5c6b7a}
	II	663±103	650±106	697±168	741±77	1b ⁷ 42±43	798±153 ^{2a}	949±180 ^{1b2c3b4b5b6a}	767±123 ^{7a}	1c ⁷ 75±76 ^{7a}
	III	1b ⁷ 49±40	1b ⁷ 45±86	774±172	1b ⁸ 899±204 ^{1a2a}	1b ⁹ 998±228 ^{1b2c3b}	982±259 ^{1b2b3b}	1a ¹⁰ 113±170 ^{1b2c3b}	714±75 ^{4b5c6c7c}	1b ⁶ 615±79 ^{3b4c5c6c7c}
LDH (U/l)	I	1048±278	429±93 ^{1b}	962±68 ^{2a}	1558±302 ^{1a2c3b}	1239±318 ^{2b4a}	1006±152 ^{2a4b}	1502±431 ^{1a2c3b5b6b}	1093±274 ^{2b4b7b}	1054±393 ^{2b4b7b}
	II	829±104	1c ¹ 1190±333 ^{1a}	1b ¹ 131±29 ^{1b}	1b ¹ 1086±152	977±327 ^{2a3b}	1083±307 ^{1b5a}	1c ¹ 545±316 ^{1b2c3c4c5b6c}	1b ⁶ 58±169 ^{2c3c4b6c}	1a ⁶ 631±246 ^{2c3c4b5b6c}
	III	1c ^{1b} 995±79	1b ^{1c} 426±154 ^{1a}	1c ^{1c} 322±81	1c ^{1b} 262±62 ^{2b}	1c ^{1b} 246±66 ^{2b}	1c ^{1c} 210±46 ^{2c3a}	1c ¹ 529±215 ^{1b3a4c5c6c}	1c ^{1b} 269±58 ^{2b3a7c}	1b ⁴ 407±116 ^{4a5a6b7a8b}
α-HBDH (U/l)	I	513±182	238±47 ^{1b}	322±40	529±116 ^{2c3b}	294±76 ^{1a4b}	298±58 ^{1a4b}	538±104 ^{2c3b5b6b}	288±59 ^{1a4c7c}	303±110 ^{1a4b7b}
	II	361±96	1b ³ 77±74	1b ⁴ 51±93	1b ³ 44±49 ^{3a}	303±68 ^{2b}	344±43 ^{3a}	1c ¹ 56±56 ^{1c2c3c4c5b6c}	1b ¹ 180±43 ^{1b2c3c4b5a6b}	1b ¹ 151±25 ^{1c2c3c4c5b6c}
	III	1b ^{1a} 176±45	1a ^{1c} 151±57	1b ^{1c} 134±23 ^{1a}	1c ^{1c} 103±13 ^{1c2a}	1c ^{1c} 103±23 ^{1c2a}	1c ^{1c} 102±29 ^{1c2b3a}	1c ¹ 214±63 ^{2b3b4c5c6c}	1c ^{1b} 71±19 ^{1c2b3b7c}	1c ¹ 103±25 ^{1c2a7c}
α-HBDH/ LDH	I	0,44±0,18	0,58±0,14 ^{1a}	0,33±0,04 ^{2c}	0,34±0,03 ^{2c}	0,26±0,03 ^{1b2c}	0,28±0,01 ^{1b2c}	0,33±0,02 ^{2c}	0,27±0,04 ^{1b2c}	0,33±0,05 ^{1a2c}
	II	0,43±0,07	1b ⁰ 3,4±0,05 ^{1b}	0,35±0,04 ^{1a}	0,32±0,02 ^{1b}	1b ⁰ 3,5±0,04 ^{1a}	0,29±0,02 ^{1c}	0,37±0,03 ^{5a}	0,31±0,07 ^{1b}	0,28±0,07 ^{1b7a}
	III	1a ^{1b} 0,67±0,10	1b ⁰ 3,3±0,06 ^{1c}	0,34±0,08 ^{1c}	0,37±0,09 ^{1c}	1b ⁰ 3,5±0,05 ^{1c}	1a ^{1a} 0,44±0,11 ^{1c2a}	0,39±0,08 ^{1c}	0,33±0,06 ^{1c}	0,41±0,15 ^{1c}

Tudi skupina Öz E. je potrdila statistično pomemben dvig serumskih vrednosti LDH zaradi aplikacije doksorubicina. V raziskavi so dokazali, da sočasna uporaba melatonina kot antioksidanta zmanjša porast serumskih vrednosti LDH zaradi doksorubicina in ugodno vpliva na serumske vrednosti albuminov, gama-glutamil transpeptidaze in celokupnih proteinov (25).

4.4 OKSIDATIVNI STATUS PLJUČ

Oksidativni status je definiran kot razmerje med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Če se ravnotežje poruši v korist prvih procesov, pravimo da pride do oksidativnega stresa, ki pogosto vodi do oksidativnih poškodb celice. Vzrok temu je lahko zmanjšanje same količine antioksidantov v telesu, povečanje koncentracij nekaterih kovin ali povečanje produkcije RKS in/ali reaktivnih dušikovih spojin (RDS). Mehanizem delovanja je odvisen od mesta nastanka, reaktivnosti in polarnosti RKS. Do poškodb lahko prihaja na lipidih (polinenasičene maščobne kisline), proteinih (mitohondriji) ali genskem materialu (posredne in neposredne) celice (Slika 14). Zaščito pred radikali opravljata dve vrsti encimov: hidroperoksidaze (katalaza (CAT) in peroksidaze) in superoksidna dismutaza (SOD) (14,17). Podatki do sedaj opravljenih raziskav kažejo, da doksorubicin z oksidativnimi procesi poškoduje tkivo pljuč (19,21).



Slika 14: Porušenje ravnotežja med oksidanti in antioksidanti v celici vodi v nastanek reaktivnih kisikovih spojin in radikalov, ki lahko povzročijo celične poškodbe (47)

Encimi, ki sodelujejo v zaščiti pred radikali so:

Superoksidna dismutaza (EC 1.15.1.1, SOD) je ime za širšo skupino encimov, ki vsebujejo kovinski ion in katalizirajo pretvorbo superoksidnega aniona ($O_2^{\cdot -}$) do manj reaktivnega H_2O_2 ($2O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Poleg tega ščitijo dehidrataze pred aktivacijo s superoksidnim anionom. Za določitev aktivnosti SOD se uporabljajo encimski imunski testi (ELISA) ali bolj razširjeni komercialni reagenti, katerih produkte določamo spektrofotometrično (46).

Katalaza (EC 1.11.1.6, CAT) je encim, ki katalizira reakcijo neposredne razgradnje H_2O_2 do vode in molekularnega kisika ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). Določanje aktivnosti poteka s komercialnimi reagenti, kjer se z inhibitorjem prekine reakcijo, nato pa preostanek H_2O_2 oksidira kromogen, ki ga določimo spektrofotometrično (46). V naši raziskavi smo aktivnost CAT določili z uporabo *Aebi* metode s celičnim lizatoma (44).

Glutationska peroksidaza (EC 1.11.1.19, GSH-Px) je encim, ki z oksidacijo glutationa (GSH) odstranjuje H_2O_2 ($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSH + 2H_2O$). Do H_2O_2 ima veliko večjo afiniteto kot CAT, zato v živalskih celicah in eritrocitih velja za poglavitni odstranjevalec H_2O_2 . Poleg tega katalizira še od GSH odvisno redukcijo peroksidov maščobnih kislin in sinteznih peroksidov. Redoks cikel GSH je učinkovitejši pri nižji stopnji oksidativnega stresa, medtem ko je CAT pomembnejša pri intenzivnejšem oksidativnem stresu. Določitev aktivnosti GSH-Px temelji na nastanku oksidiranega glutationa (GSSG) s *t*-butilhidroperoksidom kot encimskim substratom. GSSG oksidira NADPH v $NADP^+$, padec absorbance pa zaznamo spektrofotometrično (46).

Glutationska disulfidna reduktaza (EC 1.8.1.7, GR) je encim, ki vzdržuje razmerje med GSH in GSSG. Omogoča pretvorbo oksidirane oblike glutationa nazaj v reducirano ($GSSH + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$). Določanje aktivnosti poteka spektrofotometrično (46).

Za oceno vpliva fulerenola in vitamina C na z doksorubicinom povzročeni oksidativni stres na tkivo pljuč smo izmerili aktivnost antioksidantnih encimov SOD, GSH-Px, GR in CAT in tkivne koncentracije TP, LDH, GSH, GSSH, MDA (*preglednica VII, grafi 2, 3, 4 in 5*).

Skupna koncentracija proteinov (TP) v tkivu pljuč se je pri vseh skupinah statistično znižala glede na zdravo kontrolno skupino, razen pri skupinah, ki sta prejeli le fulerenol ali vitamin C. Pri teh dveh skupinah je padec TP najmanjši glede na kontrolno zdravo skupino in statistično ($p < 0,01$) dosežeta višje vrednosti kot peta skupina (fulerenol 50 mg/kg in doksorubicin), kjer je padec TP največji. Pri tkivnih koncentracijah LDH opazimo statističen porast vrednosti pri vseh skupinah glede na kontrolno zdravo skupino, razen pri peti skupini (fulerenol 50 mg/kg in doksorubicin). Statistično se peta skupina ne razlikuje od kontrolne zdrave skupine, je pa

njena koncentracija LDH signifikantno nižja ($p < 0,001$) glede na tretjo skupino, ki je prejela le doksorubicin. Tudi četrta (fulerenol 100 mg/kg in doksorubicin) in šesta skupina (fulerenol 25 mg/kg in doksorubicin) dosežeta statistično nižje vrednosti LDH kot tretja skupina. Sedma (vitamin C in doksorubicin), osma (fulerenol 100 mg/kg) in deveta skupina (vitamin C) so dosegle najslabše rezultate, saj so izmerjene koncentracije LDH statistično višje od vseh prvih šestih skupin. Podobne rezultate je zaznala tudi skupina *Injac R.*, ki je ugotovila statistično pomemben padec tkivnih koncentracij LDH pri podganah, ki so prejele doksorubicin v enkratnem i.p. odmerku 8 mg/kg. Fulerenol sam ali v kombinaciji z doksorubicinom ni povzročil dviga LDH in je dosegel vrednosti, primerljive kontrolni skupini (19).

Preglednica VII: Učinek fulerenola na različne parametre oksidativnega stresa pri z doksorubicinom povzročeni pulmotoksičnosti pri podganah. Številke kažejo na statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

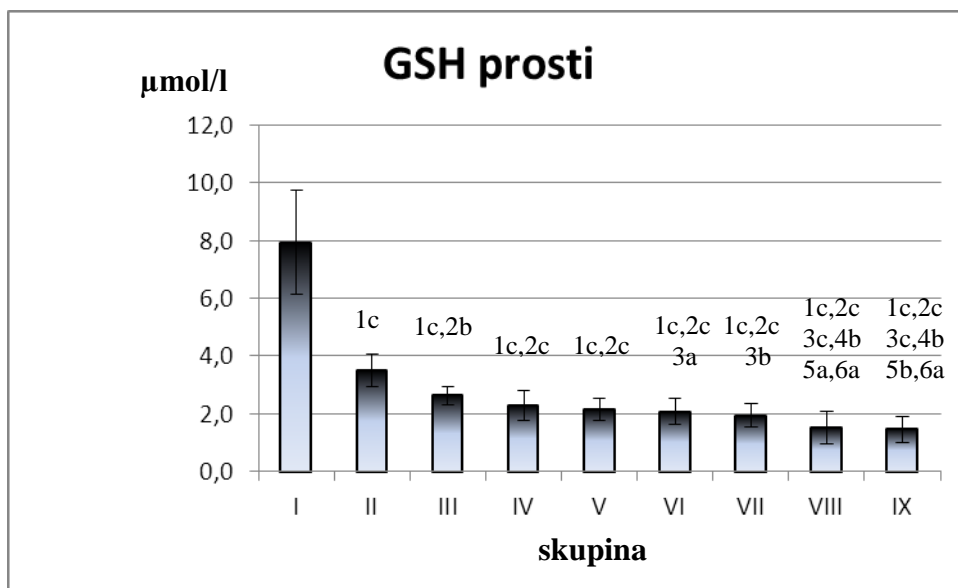
Skupina	TP g/l	LDH U/l	SOD (U/mg proteina)	GSH-Px (U/g proteina)	GR (U/g proteina)	CAT (U/mg proteina)
1	12,2±7,3	654,3±90,4	1,4±0,8	43,9±11,3	2,1±1,1	2,3±1,1
2	6,4±4,5 ^{1b}	1185,4±187,0 ^{1c}	5,3±2,4 ^{1b}	54,4±15,4	3,3±1,9	5,7±2,2
3	4,4±3,5 ^{1c}	1246,8±100,0 ^{1c}	12,5±2,1 ^{1c,2c}	31,9±15,8 ^{2b}	10,8±4,8 ^{1c,2c}	13,2±3,9 ^{1c,2b}
4	6,7±6,3 ^{1a}	1040,4±300,8 ^{1c,3a}	6,6±2,8 ^{1c,3c}	53,4±17,2 ^{3b}	3,4±1,4 ^{3c}	12,8±2,8 ^{1c,2b}
5	3,4±2,1 ^{1c}	803,6±168,9 ^{2c,3c,4b}	7,4±3,1 ^{1c,3c}	54,0±16,3 ^{3b}	6,2±2,6 ^{1b,2a,3b,4a}	19,4±5,8 ^{1c,2c,3b,4b}
6	4,2±2,9 ^{1c}	860,5±214,8 ^{1a,2c,3c,4a}	5,1±2,1 ^{1b,3c}	43,5±2,8	4,9±2,0 ^{1a,3c}	7,8±2,7 ^{1b,3a,4a,5c}
7	6,1±1,4 ^{1b}	1458,9±68,7 ^{1c,2b,3a,4c,5c,6c}	5,3±1,5 ^{1c,3c,5a}	30,5±11,5 ^{2b,4b,5b}	8,1±1,8 ^{1c,2c,3a,4c,6a}	12,8±3,7 ^{1c,2b,5b,6a}
8	9,4±6,2 ^{3b,5b,6b}	1467,7±108,2 ^{1c,2b,3a,4c,5c,6c}	3,8±1,2 ^{1a,3c,4b,5b}	24,6±9,4 ^{1a,2c,4c,5c,6a}	7,5±1,3 ^{1c,2b,3b,4b,6a}	9,7±3,3 ^{1c,5c}
9	8,2±3,1 ^{5b}	1483,6±154,1 ^{1c,2c,3b,4c,5c,6c}	4,3±1,8 ^{1b,3c,4a,5b}	24,2±8,3 ^{1a,2c,4c,5c,6a}	6,4±2,4 ^{1b,2a,3b,4a}	10,9±4,7 ^{1c,2a,5c}

Porast aktivnosti je opazen pri vseh antioksidativnih encimih (razen GSH-Px) pri vseh skupinah v primerjavi z zdravo kontrolno skupino (1. skupina), kar je posledica dolgotrajnega zdravljenja z agensi. Najvišjo vrednost SOD doseže tretja skupina, ki je prejela le doksorubicin in se statistično razlikuje od vseh ostalih skupin. Najnižjo aktivnost SOD iskaže prva skupina, sledi pa ji osma, ki je prejela izključno fulerenol, vendar je še vedno statistično pomembno ($p < 0,01$) višja od prve skupine. Podobne vrednosti doseže tudi deveta skupina, ki je prejela izključno vitamin C. Med vsemi skupinami, ki so prejele doksorubicin, doseže najboljše rezultate šesta skupina (fulerenol 25 mg/kg in doksorubicin). V aktivnosti GSH-Px prihaja do večjih odstopanj kot pri ostalih antioksidativnih encimih. Statistično nižje vrednosti ($p < 0,05$) od kontrolne zdrave skupine dosežeta osma (fulerenol 100 mg/kg) in deveta

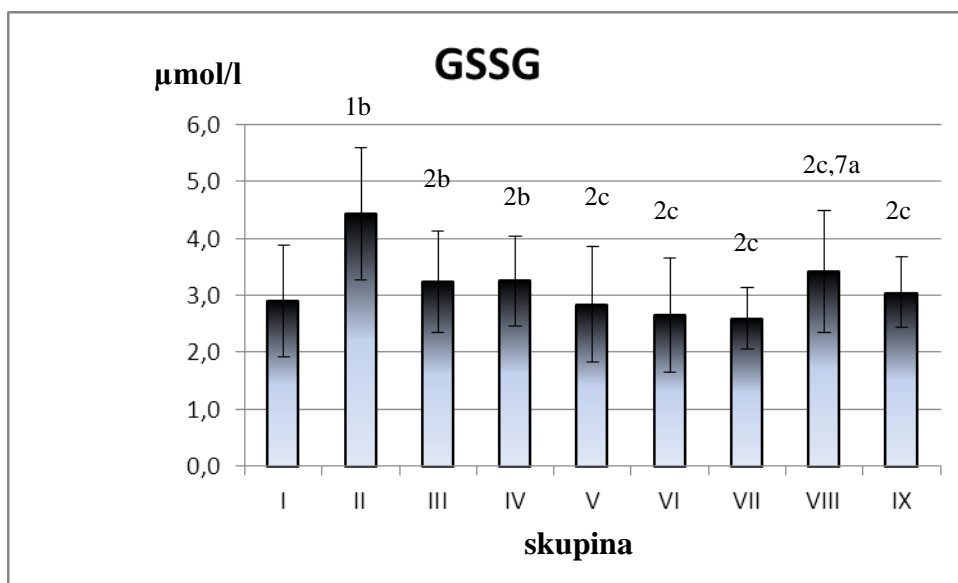
skupina (vitamin C). Ugotovljeno je bilo, da že sama aplikacija doksorubicina (3. skupina) ali njena kombinacija z vitaminom C (7. skupina) zmanjša aktivnost GSH-Px glede na prvo skupino. Vzrok temu se pripisuje nizkim vrednostim GSH, ki je kofaktor GSH-Px. Pomankanje GSH in posledično manjša aktivnost GSH-Px še dodatno povečata verjetnost poškodb zaradi oksidativnega stresa (19). Skupine, ki so prejele fulerenol in doksorubicin, se statistično ne razlikujejo od zdrave kontrolne skupine. Se pa četrta (fulerenol 100 mg/kg in doksorubicin) in peta (fulerenol 50 mg/kg in doksorubicin) skupina statistično pomembno ($p < 0,01$) razlikujeta od tretje skupine, ki je prejela samo doksorubicin in zadnjih treh skupin, ki so dosegle statistično največji padec v aktivnosti GSH-Px. Aktivnost GR je najnižja v obeh kontrolnih skupinah, katerima statistično podobne vrednosti doseže tudi četrta skupina (fulerenol 100 mg/kg in doksorubicin). Ta skupina doseže najmanjšo aktivnost med vsemi skupinami, ki so prejele doksorubicin in/ali fulerenol oziroma vitamin C. Največja aktivnost GR je opazna v tretji skupini, ki je prejela le doksorubicin. Pri aktivnosti CAT je prav tako opazen porast v vseh skupinah glede na kontrolni skupini. Najmanjše povečanje aktivnosti doseže šesta skupina (fulerenol 25 mg/kg in doksorubicin), ki se statistično razlikuje od vseh skupin, ki so prejele doksorubicin sam ali v kombinaciji s fulerenolom ali vitaminom C. Peta skupina (fulerenol 50 mg/kg in doksorubicin) doseže največjo aktivnost CAT in se statistično razlikuje od vseh ostalih skupin.

Tretja skupina (samo doksorubicin) kaže največji porast preiskovanih parametrov oksidativnega stresa med vsemi skupinami, ki so prejele doksorubicin sam ali v kombinaciji. Med skupinami, ki so poleg doksorubicina prejele tudi enega od antioksidantov, se je najbolje odrezala skupina z najnižjim odmerkom fulerenola (25 mg/kg). Ostali skupini, ki sta prejeli fulerenol in doksorubicin, sta v večini primerov dosegli boljši oksidativni status kot skupina, ki je prejela doksorubicin in vitamin C, čeprav smo pri teh dveh skupinah v nekaterih primerih zasledili prooksidativno delovanje fulerenola v višjih koncentracijah. Tudi skupina *Injac R.* je potrdila statistično pomembno porast tkivnih koncentracij encimov SOD, CAT, GR v pljučih po aplikacije doksorubicina. Prav tako so v skupini, ki je prejela le doksorubicin zasledili padec GSH-Px, kar so pripisali nizkim tkivnim vrednostim GSH. Sam fulerenol v odmerku 100 mg/kg ali skupaj z doksorubicinom (8 mg/kg i.p.) je ugodno vplival na vrednosti vseh encimov in dosegel statistično podobne vrednosti kot zdrava kontrolna skupina v raziskavi (19). To sovпада z našimi podatki z izjemo vrednosti CAT, kjer je v naši raziskavi prišlo do večjega odstopanja v peti skupini. Ta je prejela fulerenol 50 mg/kg skupaj z doksorubicinom in dosegla najvišje vrednosti CAT med vsemi skupinami.

Izmerjene so bile tudi tkivne koncentracije glutationa, tako reducirane (GSH) kot oksidirane oblike (GSSG), ter iz njih izračunano razmerje GSH/GSSH. Vrednosti so predstavljene v grafih 2, 3 in 4.



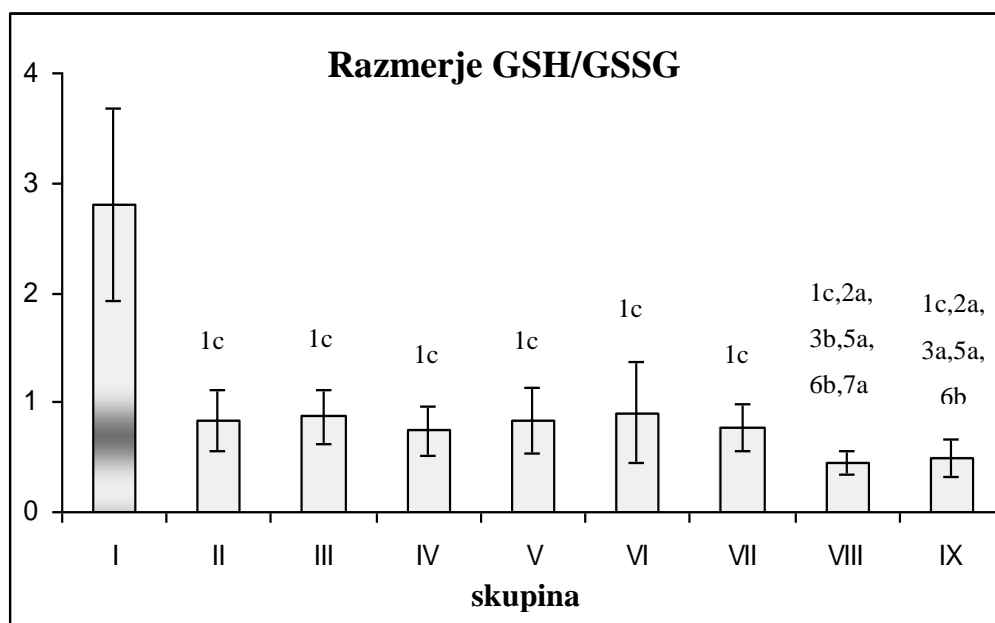
Graf 2: Vrednosti reduciranega (prostega) GSH v tkivu pljuč. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).



Graf 3: Vrednosti oksidiranega GSSG v tkivu pljuč. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

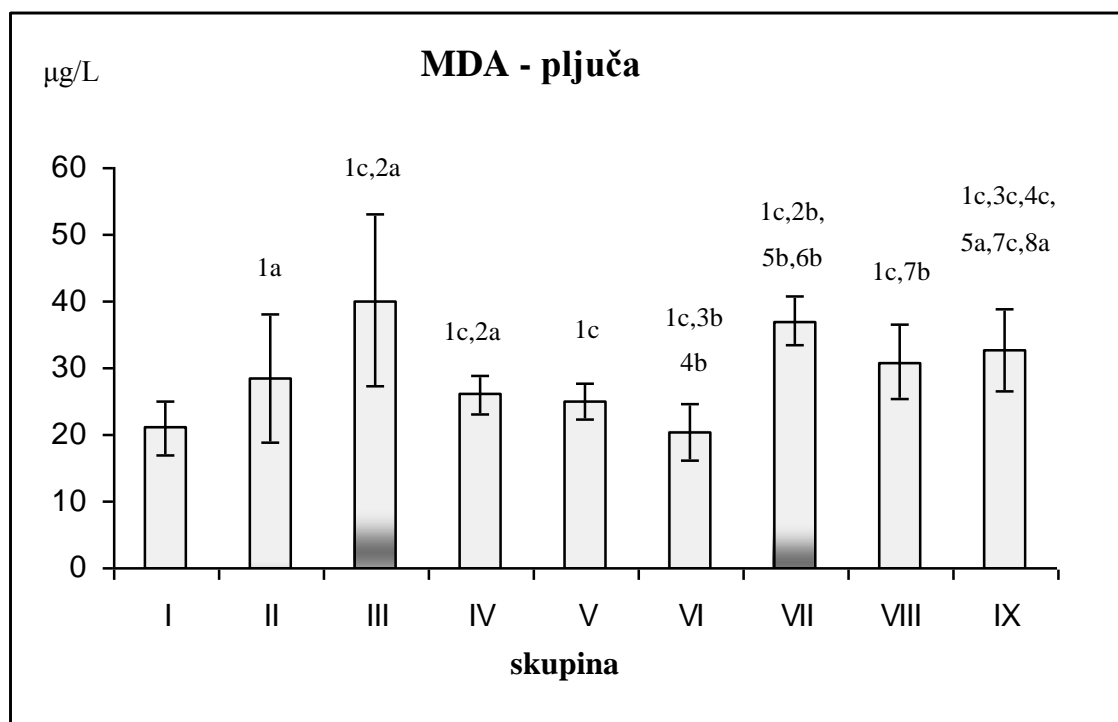
Glutation je tripeptid zgrajen iz glutaminske kisline, cisteina in glicina. Kot kofaktor je potreben pri delovanju GSH-Px, poleg tega pa sodeluje tudi v mnogih drugih biokemičnih procesih v telesu. V zdravem organizmu se približno 90 % glutationa nahaja v reducirani obliki, zato je razmerje GSH/GSSG običajno večje od 10. Padeč razmerja nakazuje porast koncentracije GSSG ter s tem povečano produkcijo radikalov in drugih dejavnikov oksidativnega stresa v organizmu (46). Pri vrednostih GSH je opazen statistično pomemben (p

< 0,01 in $p < 0,001$) padec pri vseh skupinah glede na zdravo in rakavo kontrolno skupino. Predvidevamo, da je vzrok temu sama *i.p.* aplikacija DMSO-ja in DMH, saj doseže druga skupina (rakava kontrolna skupina) statistično pomembno nižje vrednosti GSH kot prva skupina, ki je prejela le fiziološko raztopino. Prav tako smo pri drugi skupini izmerili največje vrednosti GSSG, ki se statistično pomembno ($p < 0,01$) razlikujejo od vseh ostalih skupin. Ostale skupine, vključno z zdravo kontrolno, se med seboj statistično ne razlikujejo v vrednostih GSSG. Pri vseh skupinah od druge do devete, smo ugotovili statistično pomemben ($p < 0,001$) padec razmerja GSH/GSSG glede na prvo skupino. Največji padec vrednosti GSH in razmerja GSH/GSSG je bil ugotovljen v skupinah, ki sta prejeli le fulerenol ali vitamin C (8. in 9. skupina). Ti dve skupini tudi posledično dosežeta najnižji aktivnosti GSH-Px, pri katerem ima GSH vlogo encimskega kofaktorja. Vrednosti niso skladne z našimi pričakovanji, saj smo predvidevali izboljšanje oksidativnega statusa (porast GSH in padec GSSG) v skupinah, ki so prejele doksorubicin in fulerenol v primerjavi s tretjo skupino, ki je prejela le doksorubicin. Statistično se skupine od druge do sedme niso razlikovale v vrednostih razmerja GSH/GSSG. Skupina *Öz E.* je ugotovila statističen padec vrednosti GSH glede na zdravo skupino v skupini podgan, ki je prejele le doksorubicin. Vendar sočasna uporaba melatonina in doksorubicina statistično ni izboljšala GSH statusa v pljučih (25). Skupina *Injac R.* je prav tako ugotovila statistično pomemben padec GSH v skupini, ki je prejela le doksorubicin, vendar so ga uspešno preprečili s sočasno administracijo 100 mg/kg fulerenola. V skupini, ki je prejela doksorubicin, so ugotovili tudi relativen porast GSSG v primerjavi z rakavo kontrolno skupino, kar je dodatek fulerenola normaliziral (19).



Graf 4: Razmerje prostega GSH/GSSG v tkivu pljuč. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Malondialdehid (MDA) je pomemben produkt lipidne peroksidacije in se pogosto uporablja kot pokazatelj oksidativnih poškodb celične membrane, ki jo večinoma sestavljajo lipidi. Znano je, da povzroča poškodbe DNA in je lahko iniciator karcinogenih sprememb. Metoda, ki smo jo uporabili, temelji na spektrofotometrični določitvi roza fluorescence kompleksa MDA-tiobarbiturna kislina (MDA-TBA). Ta nastane po reakciji MDA s tiobarbiturno kislino pri nizkem pH in pri povišani temperaturi. Monoenolna oblika MDA napade aktivirano metilensko skupino TBA in nastane kompleks MDA-TBA (46). Vrednosti MDA so predstavljene v grafu 5.



Graf 5: Vrednosti MDA v pljučih. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Vrednosti MDA so v vseh skupinah statistično značilno ($p < 0,001$) višje glede na kontrolno zdravo skupino, le da je razlika s kontrolno rakavo skupino značilno manjša ($p < 0,05$). Do podobnih ugotovitev sta prišli tudi skupini *Öz E. in Injac R.* kjer je aplikacija doksorubicina povzročila statističen porast vrednosti MDA v pljučnem tkivu podgan (19,21). Tudi skupina *Machado NF.*, ki je preučevala vpliv doksorubicina (2 mg/kg subkutano) na pljučno tkivo podgan v obdobju 7 tednov je ugotovila statistično pomemben porast vrednosti MDA in sočasen padec vitamina E, ki je pomemben antioksidant predvsem v lipidih (20).

Najvišje vrednosti v naši raziskavi so bile izmerjene v tretji skupini, ki je prejela le doksorubicin in sedmi skupini, ki je poleg doksorubicina prejela tudi vitamin C. Najmanjšo stopnjo lipidne peroksidacije doseže šesta skupina (fulerenol 25 mg/kg in doksorubicin), ki se statistično pomembno razlikuje ($p < 0,01$) od tretje (samo doksorubicin), četrte (fulerenol 100 mg/kg in doksorubicin) in sedme skupine (vitamin C in doksorubicin). Skupine, ki so poleg doksorubicina prejele še fulerenol (4., 5. in 6.), izkažejo najmanjši porast vrednosti MDA glede na zdravo kontrolno skupino. Raziskava akutne pulmotoksičnosti doksorubicina (8 mg/kg i.p.) skupine *Injac R.* je prav tako potrdila zaščitni vpliv fulerenola v enkratnem odmerku 100 mg/kg na vrednosti MDA v pljučnem tkivu (19). To sovпада s podatki predhodnih študij, ki so bile izvedene na tkivu jeter in srca podgan, ter potrjuje učinkovitost fulerenola v zaščiti pred lipidno peroksidacijo v celicah (17,44). Domnevajo, da preprečevanje lipidne peroksidacije vključuje neposredno odstranjevanje začetnih radikalov, kot sta hidroksilni radikal (HO^\cdot) in peroksinitrit (ONOO^\cdot), ki bi lahko sprožila radikalne reakcije v lipidnih delih celice (17).

4.5 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA V RAZLIČNIH ODMERKIH IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA NA TKIVO PLJUČ

Številne raziskave so potrdile, da je doksorubicin povezan s povečanjem oksidativnega stresa v organizmu. Radikali in druge reaktivne spojine, ki povečano nastajajo pri zdravljenju z doksorubicinom, povzročijo nastanek poškodb tudi na pljučnem tkivu organizma (6,18,19). Spojine z antioksidativnim delovanjem in nekatere druge so ugodno vplivale na zaščito celic in izbranih organov pred oksidativnim stresom zaradi doksorubicina in so predstavljene v *Preglednici III* in *IV*. V naši raziskavi smo preverili potencialne protektivne vplive antioksidanta fulerenola $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ v odmerkih 25, 50 in 100 mg/kg/teden na pljučno tkivo pri *Wistar* podganah, ki so prejele 1,5 mg/kg doksorubicina na teden. Rezultate smo primerjali z učinki dobro znanega antioksidanta vitamina C, ki smo ga v odmerku 100 mg/kg/teden prav tako aplicirali podganam.

Čeprav je pulmotoksičnost doksorubicina že dolgo znana, je malo raziskav, ki so se osredotočile nanjo ali načine kako jo preprečiti. V *preglednicah VIII* in *IX* je podan pregled podatkov do sedaj opravljenih raziskav na zaščiti pred pulmotoksičnostjo doksorubicina, vključno z našo.

Preglednica VIII: Primerjava raziskav pulmotoksičnosti glede na enostavno oceno vrednosti (višje ↑ oz. nižje ↓ ali normalo =) MDA, SOD, GSH-Px, GR in CAT v primerjavi s kontrolno zdravo skupino. Znak x pomeni, da raziskava ni preverjala podatka.

Uporabljeni antioksidant	Odmerek doksorubicina	Uporabljeni model in vivo	Ocena vrednosti v tkivu pljuč glede na kontrolno zdravo skupino					
			MDA	SOD	GSH-Px	GR	LDH	Referenca
fulerenol 100 mg/kg/teden i.p., 3 tedene (4.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	↑	↑	=	=	↑	naša raziskava
fulerenol 50 mg/kg/teden i.p., 3 tedne (5.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	↑	↑	=	↑	=	naša raziskava
fulerenol 25 mg/kg/teden i.p. 3 tedne (6.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	↑	↑	=	↑	↑	naša raziskava
vitamin C 100 mg/kg/teden i.p., 3 tedne (7. skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	↑	↑	=	↑	↑	naša raziskava
melatonin 10 mg/kg/dan s.c., 7 dni	45 mg/kg i.v. enkratni odmerek	samci podgan Wistar	=	x	x	x	x	25
fulerenol 100 mg/kg i.p., enkratni odmerek	8 mg/kg i.p. enkratni odmerek	samci podgan Sprague-Dawley	=	=	=	=	=	19

Pri vrednostih MDA je prišlo do razlik med raziskavami. Skupini *Öz E.* in *Injac R.* sta preučili protektivnost melatonina (10 mg/kg/dan s.c., 7 dni) in fulerenola (100 mg/kg i.p., enkratni odmerek) pred akutno toksičnostjo enkratnega odmerka doksorubicina (45 mg/kg i.v. in 8 mg/kg i.p.), ki je bil višji kot v naši raziskavi (1,5 mg/kg/teden i.p., 3 tedne). V obeh raziskavah, ki sta se izvajali krajši čas, je doksorubicin povzročil statistično pomembno porast vrednosti MDA glede na zdravo kontrolno skupino, ki sta jo antioksidanta uspešno preprečila (19,21). Tudi dolgotrajnejše zdravljenje z doksorubicinom (2 mg/kg/teden s.c., 7 tednov), ki ga je izvedla skupina *Machado NF.* (20), je povzročilo statističen porast vrednosti MDA v pljučih glede na zdravo kontrolno skupino. To sovпада s podatki naše raziskave, kjer je tretja skupina, ki je prejela le doksorubicin, dosegla statistično največje vrednosti MDA. Vse skupine v naši raziskavi, ki so prejele enega od antioksidantov in doksorubicin so dosegle statistično večje vrednosti MDA glede na zdravo kontrolno skupino (*graf 5*). Šesta skupina, ki je prejela fulerenol v najnižjem odmerku, doseže najmanjši porast vrednosti MDA glede na zdravo kontrolno skupino in se edina statistično pomembno razlikuje od skupine, ki je prejela le doksorubicin. Skupina *Injac R.* je ugotovila, da že enkratna aplikacija doksorubicina povzroči statistično pomembno povečano aktivnost SOD, CAT, GR, LDH in zmanjšano pri

GSH-Px, kar je fulerenol v odmerku 100 mg/kg uspešno preprečil in dosegel statistično primerljive aktivnosti zdravi kontrolni skupini (19).

V naši raziskavi doseže najmanjše odstopanje v aktivnosti encimov v primerjavi z zdravo kontrolno skupino šesta skupina z odmerkom fulerenola 25 mg/kg (*preglednica VII*). Druge skupine v naši raziskavi (4., 5. in 7.) kažejo večja odstopanja v primeru posameznih encimov. Vitamin C doseže statistično višjo aktivnost LDH od vseh skupin, ki so prejele doksorubicin in obeh kontrolnih skupin. Prav tako doseže statistično višje aktivnosti CAT in GR od šeste skupine. Odmerek fulerenola 50 mg/kg (5. skupina) najmanj prepreči porast aktivnosti CAT, SOD in GR med skupinami, ki so prejele doksorubicin in fulerenol. Četrta skupina (100 mg/kg fulerenola) statistično doseže večje aktivnosti CAT in LDH v primerjavi s šesto skupino. Celovitejši pogled omogoči *preglednica IX*, kjer je podana enostavna ocena vrednosti glede na tretjo skupino, ki je prejela le doksorubicin. Razvidno je, da samo šesta skupina doseže padeč vrednosti MDA glede na tretjo skupino. Čeprav doseže statistično enako aktivnost GSH-Px kot tretja skupina, je ta enaka in bližje vrednostim zdrave kontrolne skupine. Opazen je tudi porast vrednosti LDH v skupini, ki je poleg doksorubicina prejela vitamin C.

Preglednica IX: Primerjava raziskav pulmotoksičnosti glede na enostavno oceno vrednosti (višje ↑ oz. nižje ↓ ali normalo =) MDA, SOD, GSH-Px, GR in CAT v primerjavi s skupino, ki je prejela le doksorubicin. Znak x pomeni, da raziskava ni preverjala podatka.

Uporabljeni antioksidant	Odmerek doksorubicina	Uporabljeni model in vivo	Ocena vrednosti v tkivu pljuč glede na skupino, ki je prejela le doksorubicin					Referenca
			MDA	SOD	GSH-Px	GR	LDH	
fulerenol 100 mg/kg/teden i.p., 3 tedne (4.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	=	↓	↑	↓	↓	naša raziskava
fulerenol 50 mg/kg/teden i.p., 3 tedne (5.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	=	↓	↑	↓	↓	naša raziskava
fulerenol 25 mg/kg/teden i.p. 3 tedne (6.skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	↓	↓	=	↓	↓	naša raziskava
vitamin C 100 mg/kg/teden i.p., 3 tedne (7. skupina)	1,5 mg/kg/teden i.p. 3 tedne	samci podgan Wistar	=	↓	=	↓	↑	naša raziskava
melatonin 10 mg/kg/dan s.c., 7 dni	45 mg/kg i.v. enkratni odmerek	samci podgan Wistar	↓	x	x	x	x	25
fulerenol 100 mg/kg i.p., enkratni odmerek	8 mg/kg i.p. enkratni odmerek	samci podgan Sprague-Dawley	↓	↓	↑	↓	↓	19

Iz primerjav lahko sklepamo, da uporaba antioksidantov ugodno vpliva na zaščito tkiva pljuč pred toksičnimi učinki doksorubicina. Vse skupine v naši raziskavi, ki so prejele doksorubicin in fulerenol (4., 5. in 6.), so dosegle izboljšanje oksidativnega statusa v primerjavi s skupino, ki je prejela le doksorubicin. Posebno dobre rezultate je iskazala šesta skupina, kjer je bil uporabljen najnižji odmerek fulerenola.

5 SKLEP

Na podlagi rezultatov hematoloških in biokemijskih meritev ter opisanih makroskopskih sprememb lahko sklepamo, da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ v vseh uporabljenih odmerkih (25, 50 in 100 mg/kg) izkazuje antioksidativne lastnosti in prepreči učinke kronične toksičnosti doksorubicina na tkivo pljuč. Makroskopske spremembe so pokazale, da doksorubicin sam poškoduje pljučno tkivo, sočasna uporaba fulerenola pa to uspešno prepreči. Kljub temu, da smo ugotovili kopičenje delcev fulerenola v trebušni votlini, to ni vplivalo na njegovo protektivno delovanje na pljučno tkivo. Protektivnost je večja pri nižjih odmerkih, pri katerih je tudi delež neraztopljenega fulerenola ugodno manjši. Hematološki pregled krvi je pokazal, da so skupine, ki so prejele fulerenol, po treh tednih dosegle nižje vrednosti LDH in α -HBDH kot ostale. Ocenili smo tudi oksidativen status tkiva pljuč po aplikaciji doksorubicina in ugotovili ugoden vpliv sočasne uporabe fulerenola, kar je do sedaj edina raziskava na področju preprečevanja kronične pulmotoksičnosti doksorubicina. Aktivnosti izbranih encimov SOD, GR, GSH-Px, CAT, LDH in vrednosti TP, GSH, GSSG in MDA so se v skupinah, ki so prejemale fulerenol in doksorubicin, približale vrednostim zdrave kontrolne skupine in v večini primerov statistično razlikovale od skupine, ki je prejela le doksorubicin. Najboljše rezultate smo zasledili pri skupini, ki je prejela fulerenol v odmerku 25 mg/kg/teden. Zbrani rezultati dokazujejo perspektivnost nadaljnih raziskav z nižjimi odmerki fulerenola, kljub pomislekom glede slabe topnosti učinkovine, saj bi jo lahko obvladali z novimi tehnološkimi pristopi.

6 VIRI:

1. De Vita TV, Hellman JRS, Rosenberg AS: *Cancer principles and practice in oncology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
2. Priestman T: *Cancer chemotherapy in clinical practice*. Springer-Verlag, London, 2008.
3. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et. al.: *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. *Pharmacol Rev*, 2004; 56: 185-229.
4. Injac, R: *Doktorska disertacija: Ugotavljanje protektivnosti fulerenola in vivo v akutni in kronični kardiomiopatiji pri terapiji malignih neoplazem z doksorubicinom pri podganah (slo/ang)*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM et. al.: *Rang and Dale's Pharmacology 6th ed.*, Churchill Livingstone, London, 2007: 718-733.
6. Injac R, Štrukelj B: *Recent Advances in Protection Against Doxorubicin-induced Toxicity*. *Technol. Cancer Res Treat*, 2008; 7: 497-516.
7. *Register zdravil RS*. Inštitut za varovanje zdravja RS [internet]. Dostopen na: <http://www.ivz.si/register> [15.6.2011].
8. Sweetman SC: *Martindale: the complete drug reference 35th ed*. Pharmaceutical Press, London, 2007: 646-648.
9. USP, Doxorubicin Hydrochloride for injection. Pfizer [internet]. Dostopen na: <http://www.pfizer.com> [15.6.2011].
10. *Slika 2: Ekstravazacija tkiva po aplikaciji doksorubicina*. The National Extravasation Information Service [internet] Dostopen na: <http://www.extravasation.org.uk/slideshow.htm> [15.6.2011]
11. *Povzetek glavnih značilnosti zdravila, Cealyx 2 mg/ml konc. za raztopino za infundiranje*. Evropska komisija [internet] Dostopen na: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/atc.htm> [15.6.2011]
12. Dal-Ben D, Palumbo M, Zagotto G et. al.: *DNA Topoisomerase II Structures and Anthracycline Activity: Insight into Ternary Complex Formation*. *Current Pharm Design*, 2007; 13: 2766-2780.

13. *Structure of a DNA oligonucleotide with two doxorubicin drugs (shown in pink) intercalated between the base pairs.* University of Birmingham [internet] Dostopen na: <http://chemweb.bham.ac.uk/~hannonmj/Mike%20page/3wayjunction.htm> [15.6.2011]
14. Matés JM, Sánchez-Jiménez F: *Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes.* *Frontiers in Bioscience*, 1999; 4: 339-345.
15. Luft FC: *Doxorubicin toxicity in the Iron Age.* *J Mol Med*, 2006; 84: 529-531.
16. Ferreira ALA, Matsubara LS, Matsubara BB: *Anthracycline-Induced Cardiotoxicity.* *Cardiovascular and Hematological Agents in Med. Chem*, 2008; 6: 278-281.
17. 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: 15-26.
18. Meadors M, Floyd J, Perry MC: *Pulmonary toxicity of chemotherapy.* *Semin Oncol*, 2006; 33: 285-293.
19. Injac R, Radic N, Govedarica B et. al.: *Acute doxorubicin pulmotoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress.* *Pharmacol Reports* 2008; 61: 335-342.
20. Machado NG, Baldeiras I et. al.: *Sub-chronic administration of doxorubicin to Wistar rats results in oxidative stress and unaltered apoptotic signaling in the lung.* *Chemico-Biological Interactions*, 2010; 188: 478-486.
21. Minchin RF, Johnston MR, Schuller HM et. al.: *Pulmonary toxicity of doxorubicin administered by insitu isolated lung perfusion in dogs.* *Cancer*, 1988; 61: 1320–1325.
22. Santos RVT, Batisata MLJr, Caperuto EC et al.: *Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after doxorubicin treatment in rats.* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007; 34: 1294-1299.
23. Kaiserova H, Simunek T, van der Vijgh WJF et al.: *Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase.* *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1772: 1065-1074.
24. Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E et al.: *Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity.* *Toxicology*, 2006; 218: 164-171.

25. Öz E, İlhan MN: *Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin.* Mol Cell Biochem 2006; 286: 11-15.
26. Benguedouar L, Boussenane HN, Kebsa W et al.: *Efficiency of propolis extract mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats.* Ind J Exp Biol, 2008; 46: 112-119.
27. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC et. al.: *A standardized extract of Ginko biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes.* Br J Pharmacol, 2009; 156: 48-61.
28. Li L, Lu Q, Shen Y et al.: *Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells.* Biochem Pharmacol, 2006; 71: 584-595.
29. Beillerot A, Dominguez JCR, Kirsch G et al.: *Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin.* Bioorg Med Chem Lett, 2008; 18: 1102-1105.
30. Stolarska M, Mlynarski W, Zalewska-Szewczyk B et al.: *Cytoprotective effect of amifostine in the treatment of childhood neoplastic diseases – a clinical study including the pharmacoeconomic analysis.* Pharmacol Rep, 2006; 58: 30-34.
31. Hasinoff BB: *The use of dexrazoxane for the prevention of anthracycline extravasation injury.* Expert Opin Investig Drugs, 2008; 17: 217-223.
32. Kelishomi RB, Ejtemaemehr S, Tavangar SM et al.: *Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat.* Toxicology, 2008; 243: 96-104.
33. Waldner R, Laschan C, Lohninger A et al.: *Effects of doxorubicin-containing chemotherapy and a combination with L-carnitine on oxidative metabolism in patients with non-Hodgkin lymphoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2006; 132: 121-128.
34. De Nigris F, Rienzo M, Schiano C et al.: *Prominent cardioprotective effects of third generation beta blocker nebivolol against anthracycline-induced cardiotoxicity using the model of isolated perfused rat heart.* Eur J Cancer, 2008; 44: 334-340.
35. Yeh YC, Lai HC, Ting CT et. al.: *Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes.* Biochem Pharmacol, 2007; 74: 969-980.
36. Injac R, Kočevnik N, Štrukelj B: *Fulerenol C₆₀(OH)₂₄ kot potencialna učinkovina.* Farmacevtski vestnik, 2008; 59: 257-262.

37. Djordjević A: *Biological Active Derivatives of fullerene C₆₀*. Zadužbina Andrejević, Beograd, 2002.
38. Pickering KD, Wiesner MR: *Fullerol-Sensitized Production of Reactive Oxygen Species in Aqueous Solution*. Environ Sci Technol, 2005; 39: 1359-1365.
39. Injac R, Radic N, Govedarica B et. al.: *Bioapplication and activity of fulleranol C₆₀(OH)₂₄*. Afr. Journal of Biotech, 2008; 7: 4940-4950.
40. Trajković S, Dobrić S, Djordjević A et al.: *Radioprotective efficiency of fulleranol in irradiation mice*. Mater Sci Forum, 2005; 494: 549–553.
41. Orrenius S: *Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death*. Drug Metabolism Review, 2007; 39: 443-455.
42. Djordjevic A, Bogdanovic G, Dobric S: *Fullerenes in Biomedicine*. J BUON, 2006; 11: 391–404.
43. Lu LH, Lee YT, Chen CW et al.: *The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fulleranol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells*. Brit J Pharmacol, 1998; 123: 1097–1102.
44. Injac R, Perse M, Cerne M et. al.: *Protective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer*. Biomaterials, 2009; 30: 1184-1196.
45. Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE et. al.: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders, Missouri, 2008.
46. Radic N, Injac R, Djordjevic A et. al.: *Analysis of parameters significant for oxidative stress and cell injury*. Transworld Research Network 2009; Kerale, India.
47. *Slika 13: Nastanek RKS in oksidativne poškodbe celice*. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. [internet] Dostopen na: <http://www.scielo.br/img/revistas/abo/v71n6s0/15f1.gif> [15.6.2011].

7 ŽIVLJENJEPIS

Rodil sem se 10.3.1985 v Celju, kjer sem tudi obiskoval osnovno šolo. Šolanje sem nadaljeval na Splošni in strokovni gimnaziji Lava v Celju, kjer sem se navdušil nad naravoslovnimi predmeti. Julija 2004 sem uspešno opravil maturo in se vpisal na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Med študijem sem udeleževal različnih dejavnosti, tako športnih kot tudi študijskih. V 4. letniku sem prostovoljno pomagal pri delu dr. Marjeti Podobnik na Kemijskem inštitutu, kjer sem se navdušil nad biotehnologijo. Večkrat sem opravljal počitniško delo v JZ Celjske Lekarne, kjer sem spomladi 2009 tudi uspešno opravil obvezno prakso pod mentorstvom Mihaele Tršinar, mag. farm., spec..