

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



EVA KOPRIVEC FURLAN

**MAGISTRSKA NALOGA**

PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINE

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



EVA KOPRIVEC FURLAN

**UGOTAVLJANJE ORGANOPROTEKTIVNOSTI FULERENOLA PO  
PERORALNI IN INTRAPERITONEALNI APLIKACIJI *IN VIVO* PRI TERAPIJI Z  
DOKSORUBICINOM PRI PRAŠIČIH**

**INVESTIGATION OF ORGANOPROTECTIVE EFFECTS OF ORAL AND  
INTRAPERITONEAL APPLICATION OF FULLERENOL *IN VIVO* DURING  
DOXORUBICINE THERAPY ON SMALL PIGS**

**MAGISTRSKA NALOGA**

Ljubljana, 2013

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

## ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Borutu Štruklju in somentorju doc. dr. Radu Injcu se zahvaljujem za vodenje in pomoč pri raziskovalnem delu. Hvala za izkazano pomoč in zaupanje.

Hvala mami za pomoč in podporo.

Na koncu pa zahvala še mojemu možu Janezu ter Maticu in Maji, ki so me vzpodbujali in mi vseskozi stali ob strani.

Hvala vam!

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod delovnim mentorstvom prof. dr. Borut Štruklja in somentorstvom doc. dr. Rada Injca.

## VSEBINA

VSEBINA .....	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT.....	III
1 UVOD.....	- 1 -
1.1 ANTRACIKLINI .....	- 2 -
1.1.1 DOKSORUBICIN .....	- 3 -
1.1.1.1 MEHANIZEM PROTIITUMORSKEGA DELOVANJA DOKSORUBICINA .....	- 4 -
1.1.1.2 ZAVIRANJE TOPOIZOMERAZE II Z ANTRACIKLINI.....	- 4 -
1.1.1.3 VLOGA RADIKALOV .....	- 5 -
1.1.1.4 LIPIDNA PEROKSIDACIJA IN POŠKODOVANJE DNA.....	- 6 -
1.1.1.5 KARDIOTOKSIČNOST DOKSORUBICINA .....	- 7 -
1.1.1.6 HEPATOTOKSIČNOST DOKSORUBICINA .....	- 8 -
1.1.1.7 NEFROTOKSIČNOST DOKSORUBICINA.....	- 9 -
1.2 OKSIDATIVNI STRES .....	- 11 -
1.2.1 ANTIOKSIDATIVNA ZAŠČITA .....	- 12 -
1.2.1.1 ENCIMSKI MEHANIZMI OKSIDATIVNE ZAŠČITE.....	- 12 -
1.2.2 MALONDIALDEHID.....	- 15 -
1.2.3 GLUTATION .....	- 15 -
1.3 RAZLIČNI PRISTOPI V ZAGOTAVLJANU ZAŠČITE PROTI TOKSIČNOSTI POVZROČENI Z DOKSORUBICINOM .....	- 16 -
1.3.1 Naravni produkti .....	- 16 -
1.3.2 Zdravilne učinkovine .....	- 16 -
1.3.3 Nove dostavne oblike in aplikacija doksorubicina .....	- 17 -
1.3.4 Novi antioksidanti.....	- 17 -
1.3.4.1 FULEREN IN FULERENOL .....	- 17 -
2 NAMEN.....	- 20 -
3 MATERIALI IN METODE.....	- 21 -
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	- 25 -
4.1 REZULTATI.....	- 25 -
4.1.1 Makroskopske spremembe.....	- 25 -
4.1.2 Hematološki parametri in aktivnost serumskih encimov.....	- 28 -
4.1.3 Oksidativni stres .....	- 40 -

4.2	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA.....	- 53 -
5	SKLEPI.....	- 56 -
6	LITERATURA .....	- 57 -
7	ŽIVLJENJEPIS.....	- 61 -

## POVZETEK

Raziskovali smo učinke peroralno in intraperitonealno apliciranega fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  na z doksorubicinom povzročeno toksičnost na tkivo jeter, pljuč, ledvic, srca in vranice pri zdravih prašičih. Uporabili smo *in vivo* model na prašičih F1 generacije, katerih starši so vrste Swedish Landrace in Large Yorkshire. Ugotavljali smo, ali je fulerenol apliciran peroralno ali intraperitonealno sposoben preprečiti poškodbe organov, ki jih povzroči doksorubicin v odmerku 10 mg/kg, ob enkratni aplikaciji. Na podlagi rezultatov makroskopskih, hematoloških in biokemijskih raziskav lahko potrdimo, da ima intraperitonealno apliciran fulerenol zaščitne učinke na organe pred toksičnostjo, povzročeno z doksorubicinom. Peroralno apliciran fulerenol ne kaže protektivnih učinkov, temveč veliko neželenih učinkov.

## ABSTRACT

We investigated the effects of orally and intraperitoneally administered fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$  on doxorubicin-induced toxicity in the tissues of liver, lung, kidney, heart and spleen in healthy pigs.

In our study we used an *in vivo* model on pigs F1 generation whose parents are of the kind of Swedish Landrace and Large Yorkshire. We examined if orally or intraperitoneally administered fullereneol could protect organs against Doxorubicin-induced (a single application of 10 mg/kg) toxicity. The macroscopic, hematological, and biochemical results we obtained confirmed that intraperitoneal administration of fullereneol has a protective influence against toxicity induced by doxorubicin. Orally administered fullereneol does not show any protective effect but shows a lot of side effects.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACE	Angiotenzin-konvertaza
ALT	Alanin-aminotransferaza
AST	Aspartat-aminotransferaza
ATP	Adenozintrifosfat
CAT	Katalaza
CK	Kreatinin-kinaza
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DOX	Doksorubicin
ECM	Ekstracelularni matriks
GSH	Reducirana oblika glutationa
GSH-Px	Glutation-peroksidaza
GSSG	Oksidirana oblika glutationa
GR	Glutation-reduktaza
Hbg	Hemoglobin
LDH	Laktat-dehidrogenaza
$\alpha$ -HBDH	Alfa-hidroksibutirat-dehidrogenaza
HCT	Hematokrit
MDA	Malondialdehid
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika)
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana oblika)
P53	Tumorje zavirajoči gen
P450	Citokrom P-450
RDS	Reaktivne dušikove spojine
RKZ	Reaktivne kisikove zvrsti
SOD	Superoksid-dismutaza
TGF- $\beta$ 1	Transformirajoči rasni dejavnik $\beta$ 1
TP	Celokupna koncentracija proteinov

## 1 UVOD

Maligna obolenja so glavni razlog za veliko smrtnost v svetu. Vrste raka, zaradi katerih je bilanca tako velika, so: rak na pljučih, želodcu, jetrih, debelem črevesju in prsih. 40 % vseh rakavih obolenj je možno preprečiti z zdravim življenjem - zdravo prehrano, fizično aktivnostjo in brez cigaret. Kajenje je največji razlog za nastanek rakavih obolenj. Ena petina obolenj je posledica kroničnih infekcij, predvsem infekcij z virusom hepatitisa B (rak na jetrih), *humanim papiloma virusom* (rak na materničnem vratu), *Helicobacter pylori* (rak na želodcu) in virusom HIV (Kaposijev sarkom in limfomi).

Rak nastane zaradi sprememb genov, odgovornih za celično rast in obnavljanje celice. Te spremembe so rezultat interakcij genetskih faktorjev in zunanjih dejavnikov [1]. Za to bolezen je značilna nenadzorovana delitev celic. Celice napadajo in uničujejo sosednja tkiva in se lahko razširijo tudi na oddaljena mesta v telesu, v obliki metastaz.

Večina rakavih obolenj je povzročena z nepravilnostjo v genetskem materialu transformirajoče celice. Te nepravilnosti so lahko posledica delovanja kancerogenov, napak pri podvojevanju deoksiribonukleinske kisline (DNA) ali so podedovane in tako prisotne v vseh celicah od rojstva. Genetske nepravilnosti vplivajo na dva tipa genov. Rak-promovirajoči onkogen se največkrat aktivira v rakavih celicah in jim da nove lastnosti, kot so hiperaktivna rast in delitev ter zaščito pred programirano celično smrtjo in zmožnost namestitve v različna tkiva. Tumor supresorski geni so pogosto inaktivirani, kar se kaže v izgubi normalnih funkcij celice, kot so natančno podvojevanje DNA, nadzor nad celičnim ciklom, orientacija in adhezija s tkivi, ter interakcija z zaščitnimi celicami imunskega sistema. Rakava obolenja se lahko zdravi, ozdravljivost pa je odvisna od vrste, mesta in stadija obolenja. Zdravljenje največkrat poteka s kombinacijo operacije, kemoterapije in radioterapije [2].

Na začetku je kemoterapijo predstavljalo jemanje ene učinkovine, ki so jo dajali kontinuirano do ozdravitve, pojava neobčutljivosti karcinoma ali do nastanka toksičnosti. Sredi 50-ih let so znanstveniki odkrili, da je kemoterapija veliko uspešnejša ob uporabi kombinacije dveh ali več učinkovin. Maligne celice se slabše obnavljajo od normalnih, vendar po uporabi citotoksičnih zdravil obstaja velika verjetnost poškodb normalnega tkiva, ki hitro proliferira, posebno celice kostnega mozga in sluznica prebavnega trakta. Rezistenca določenih celic znotraj tumorja na kemoterapevtik je razlog, da pri nekaterih



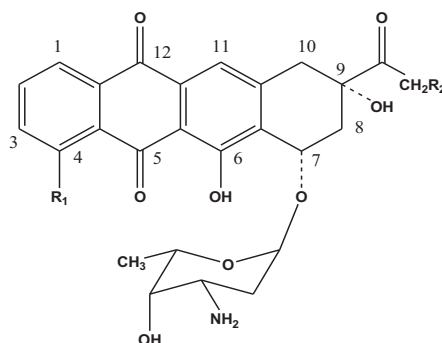
rakavih obolenjih ne dosežemo podaljšanja življenja oziroma ozdravitve. Celice lahko razvijejo sposobnost zmanjševanja znotrajcelične koncentracije citotoksičnih zdravil z membransko črpalko, p-glikoproteinom, z inaktivacijo učinkovine ali razvijejo mehanizem obnove DNA [3].

Danes je najmanj 10 vrst raka pri večini pacientov ozdravljivih s primerno kemoterapijo (akutna levkemija pri otrocih, Burkittov limfom, horiokarcinom pri ženskah, Hodgkinova bolezen in retinoblastom pri otrocih). Pri zdravljenju Hodgkinove bolezni, akutne levkemije in raka na jajčnikih, se uporabljajo tudi antraciklinski antibiotiki [2].

## 1.1 ANTRACIKLINI

Antineoplastično (citotoksično) delovanje antraciklinskih antibiotikov so odkrili že leta 1963. Prvi antraciklinski antibiotik je bil izoliran iz vrste *Streptomyces peuceticus* in poimenovan daunorubicin. Leta 1969 so iz vrste *S. peuceticus* var *caesius* izolirali doksorubicin (Adriamycin®) (DOX). Daunorubicin je zelo učinkovit v zdravljenju limfoblastne in mieloblastne levkemije. Spekter delovanja DOX je širši, saj se uporablja tudi pri zdravljenju trdnih tumorjev in zdravljenju hematoloških malignih obolenj. Čeprav je od odkritja minilo že več kot 40 let, se DOX še vedno pogosto uporablja pri kemoterapijah za zdravljenje raka dojke, sarkomov, levkemij, Hodgkinove bolezni in drugih rakavih obolenjih [2, 4, 5].

Antraciklini so po kemijski sestavi glikozidi iz skupine kinonov (Slika 1). Osnovna struktura je planarna. Sestavljena je iz tetraciklina, na katerega je na položaju C-7 z glikozidno vezjo vezan en ali več sladkorjev v L-konfiguraciji [2]. Najpogostejša sladkorna komponenta je daunosamin (3-amino-2,3,6,-trideoksi-L-fukoza).



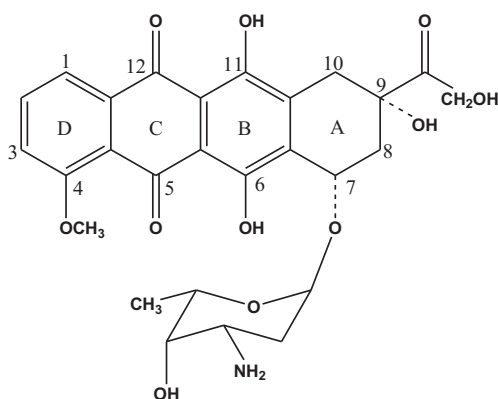
Slika 1: Osnovna struktura antraciklinskih antibiotikov

Večina predstavnikov antraciklinov se razlikuje po številu in položaju fenolnih skupin, stopnji oksidacije ogljikovodika na položaju 9 in prisotnosti karboksilnega estra na položaju 10 [2].

### 1.1.1 DOKSORUBICIN

Odkritje DOX v zgodnjih 60. letih je pomenilo velik napredek v boju proti raku. Glede na WHO (Svetovna zdravstvena organizacija), spada med 17 najpomembnejših učinkovin za zdravljenje rakavih obolenj.

Velikokrat se uporablja v kombinaciji z drugimi učinkovinami, ki imajo antineoplastično delovanje [6].



Slika 2: Struktura DOX (14-hidroksi-daunomicin)-((8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksi- $\alpha$ -L-liksoheksopiranozil)oksi]-6,8,11-trihidroksi-8-(hidroksiacetyl)-1-metoksi-7,8,9,10-tetrahidrotetracen-5,12-dion [7].

Klinična uporaba DOX (Slika 2) in daunomicina je hitro pokazala na velike probleme z razvojem rezistence tumorskih celic in na toksične učinke pri zdravih celicah, saj DOX v veliki meri povzroča kronično kardiomiopatijo in kongestivno obolenje srca [7, 8].

Njihovo neoplastično delovanje še vedno ni dokončno pojasnjeno, kljub veliki uporabi antraciklinov. Najverjetneje gre za več mehanizmov delovanja, ki so razlog za njihovo visoko učinkovitost [4]. Najnovejši izsledki, objavljeni v aprilu 2013, kažejo na pomembno vlogo izvenceličnega adenzintrifosfata (ATP), ki se sprosti po delovanju antraciklinov na rakavo celico. ATP se veže na purinergične receptorje na dendritičnih celicah, kar aktivira imunski sistem in omogoči prepoznavo in odstanitev rakavih celic [9].

### 1.1.1.1 MEHANIZEM PROTIITUMORSKEGA DELOVANJA DOKSORUBICINA

Čeprav je delovanje DOX dokazano, pa se o mehanizmu delovanja mnenja razhajajo. Delovanje DOX je rezultat različnih biokemijskih mehanizmov. Možnih je več načinov delovanja:

1. vrivanje učinkovine v DNA, kar vodi v zaviranje sinteze makromolekul;
2. nastanek radikalov, kar povzroči poškodbo DNA ali lipidno peroksidacijo;
3. vezava na DNA;
4. navzkrižno povezovanje DNA;
5. vpliv na razvijanje DNA ali ločevanje DNA koncev in helikazno aktivnost;
6. neposredni učinki na membrano;
7. zaviranje topoizomeraze II;
8. indukcija apoptoze kot posledica zaviranja topoizomeraze II;
9. posledično sproščanje izvenceličnega ATP [7, 9, 10].

Ob odkritju antraciklinov so njihovo protitumorno delovanje pripisovali njihovi interkalaciji med bazne pare DNA, kar preprečuje podvojevanje hitrorastočih rakastih celic. Novejše študije pa dokazujejo, da pri klinično uporabnih koncentracijah interkalacija ne igra pomembne vloge. Glavna tarča delovanja antraciklinov naj bi po novejših raziskavah bila topoizomeraza II. Antraciklini stabilizirajo intermediat, pri katerem se deli DNA kovalentno vežejo na tirozinske konce topoizomeraze II. Blokira se sproščanje DNA in s tem podvojevanje in transkripcija. DNA konci lahko preko poti odvisne od tumor zavirajočega gena (p53) povzročijo apoptozo [4].

### 1.1.1.2 ZAVIRANJE TOPOIZOMERAZE II Z ANTRACIKLINI

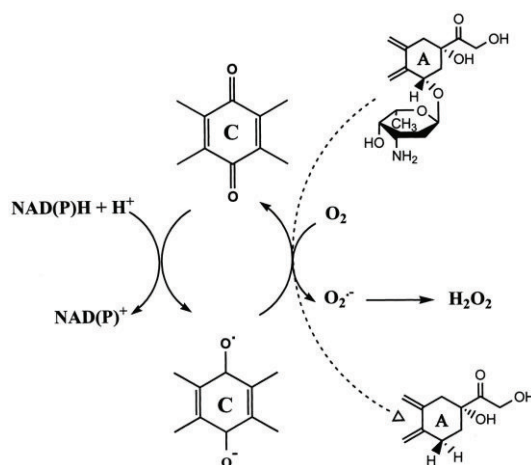
Antraciklini stabilizirajo kompleks, v katerem pride do rezanja DNA koncev in kovalentne vezave na tirozinski konec topoizomeraze II. Zaradi interakcije z DNA pride do zaviranja popravljalnih mehanizmov, njenega nepravilnega zvitja, zaviranja podvojevanja dvojne vijačnice in prepisa v informacijsko ribonukleinsko kislino. Nastanek in stabilnost kompleksa antraciklin-DNA-topoizomeraza II je odvisna od strukture antraciklina. Poškodba DNA, ki je povzročena z zaviranjem topoizomeraze II, vodi v zaustavitev celične rasti v G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub> fazi celičnega ciklusa in na koncu do programirane celične smrti.

Tumorske celice pa lahko postanejo rezistentne na antracikline zaradi spremenjene ekspresije ali aktivnosti topoizomeraze II. V kliničnih primerih stopnja indukcije apoptoze direktno korelira z odgovorom tumorja na terapijo in na stanje pacienta [7, 11, 12].

### 1.1.1.3 VLOGA RADIKALOV

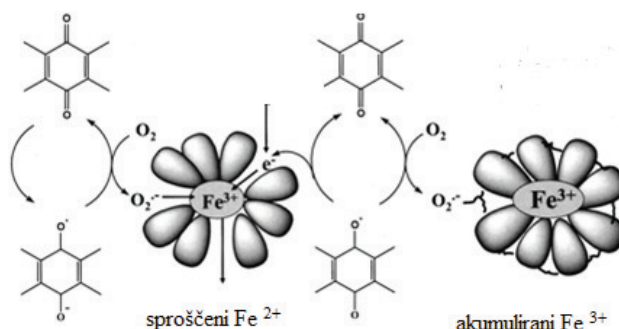
Pri terapiji z DOX radikali nastajajo po dveh poteh:

A) Dodatek elektrona kinonski strukturi (Slika 3) obroča C pri DOX in drugih antraciklinih povzroči nastanek semikinona, ki hitro ponovno preide v kinon z redukcijo kisika v superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ) in vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) [4, 6, 13, 14]. Ta cikel je podprt s številnimi NAD(P)H-oksido-reduktazami (citokrom P450 ali  $b_5$  reduktazami, mitohondrijske NADH dehidrogenaze, ksantin-dehidrogenaze, endotelne NO-sintaze). V tem ciklu lahko pride tudi do oksidacije vezi med obročem A in daunozaminom, kar privede do deglikozidacije in tvorbe 7-deoksiaglikona. Zaradi povečane topnosti v lipidih, se aglikoni vgradijo v biološke membrane in tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (RKZ) v bližini občutljivih lipidnih struktur [7, 14].



Slik 3: Enoelektronski redoks cikel antraciklina [7].

B) Radikali pri DOX nastanejo tudi z neencimskim mehanizmom, ki vključuje reakcije z železom. Enoelektronski cikel DOX je povezan s sproščanjem železa iz feritina (Slika 4). DOX s prostim železom ( $Fe^{3+}$ ) iz feritina tvori kompleks  $DOX : Fe^{3+} = 3 : 1$ . Kompleks železo - DOX lahko reducira kisik do  $H_2O_2$  in drugih RKZ, ki povzročijo oksidativne poškodbe tkiv [6, 7, 15].



Slika 4: Reakcija DOX s prostim železom [7].

Do povečanega nastanka RKZ ( $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O_2$ ) pride tudi ob prisotnosti tiolnih skupin, ki jih vsebujeta tako cistein, kot glutation (GSH). Te skupine reducirajo kompleks DOX – Fe (III) kar vodi v povečan nastanek RKZa [16].

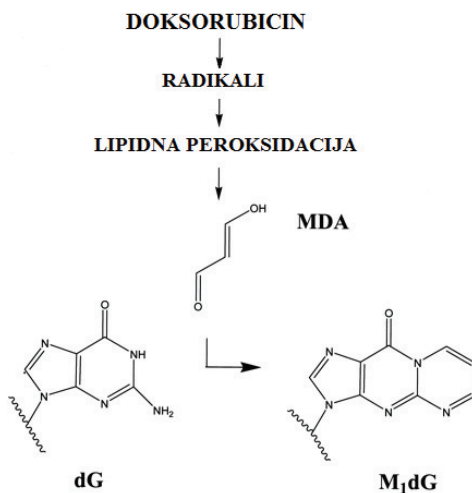
Do nastanka radikalov pride najpogosteje pri vnosu suprakritičnih koncentracij učinkovine. Pri vnosu klinično primernih koncentracij DOX je bil potreben daljši čas, preden je prišlo do nastanka  $H_2O_2$ . Ta podatek tako nakazuje možnost, da se radikali tvorijo zaradi porušenega celičnega metabolizma [17].

Radikali imajo pri aktivnosti antraciklinov vlogo signalnih molekul. RKZ lahko aktivirajo nevtralno sfingomielinazo, ki povzroči nastanek ceramida. Obenem lahko povzročijo tudi spremembe v aktivnosti kinaz ali transkripcijskih faktorjev, ki nadzorujejo celični cikel in aktivnosti, ki vodijo do apoptoze.

#### 1.1.1.4 LIPIDNA PEROKSIDACIJA IN POŠKODOVANJE DNA

Radikali povzročajo lipidno peroksidacijo celične membrane. Malondialdehid (MDA) je eden izmed produktov lipidne peroksidacije z nizko molekulsko maso (Slika 5) [18].

Tehnike masne spektrometrije so pokazale, da MDA reagira z amino skupinami deoksiganozina, deoksiadenozina in deoksicitozina, ter tvori alkilirane produkte, kot je pirimidopurinon ( $M_1dG$ ) [19].



Slika 5: Doksorubicinska lipidna peroksidacija in tvorba MDA-DNA adukta [7].

MDA je v človeških celicah mutagen. Večina mutacij induciranih z MDA se pojavi na paru baz gvanina in citozina, kjer pride do vstavljanja, uničenja ali zamenjave [20].

V proliferajočih celicah je tvorba M<sub>1</sub>dG spremljana z zastojem rasti.

Antraciklini tvorijo M<sub>1</sub>dG s povečanim nastajanjem MDA in s prenosom oksopropenilne skupine z MDA na DNA.

#### 1.1.1.5 KARDIOTOKSIČNOST DOKSORUBICINA

Že pri prvih kliničnih ocenah daunorubicina in DOX so se pokazali kardiotoksični učinki. V poznih 70. letih so bile objavljene prve retrospektive študij, ki so pokazale kardiotoksičnost po večkratni aplikaciji. Poznane so štiri vrste kardiotoksičnega delovanja. Akutna kardiotoksičnost se pojavi ob aplikaciji DOX ali takoj po njej. Najpogosteje se pojavi ob aplikaciji v obliki bolusa ali hitre intravenske infuzije, ter vključuje vazodilatacijo, hipotenzijo in srčno aritmijo. Subkronična kardiotoksičnost se pojavi le redko. Odraža se kot perikarditis-miokarditis sindrom in se pojavi od 1 do 3 dni po aplikaciji DOX. Večkrat je prišlo do pojava v začetni dobi zdravljenja, kjer so uporabljali višje odmerke učinkovine. Zgodnja kronična kardiotoksičnost se pojavi kasneje v času zdravljenja ali celo tedne ali mesece po zaključku kemoterapije. Kaže se kot razširjena kardiomiopatija in se razvije v kontraktilno disfunkcijo levega ventrikla in kongestivno odpoved srca. Zadnji tip kardiotoksičnosti pa so poimenovali »zamujena« kardiotoksičnost. Odkrili so jo šele v začetku 90. med preživelimi, ki so jih v otroštvu zdravili proti raku.

Sedaj je znano, da se kardiotoksičnost lahko pojavi celo desetletja po končanem zdravljenju raka.

Akutna kardiotoksičnost ne povzroča velikih kliničnih težav, saj simptomi izginejo kmalu po zaključku infuzije. Kronične oblike pa so velik problem, saj vplivajo tudi na smrtnost pri dolgotrajni terapiji [4].

Več mehanizmov je navedenih, ki bi lahko vplivali na kardiotoksičnost DOX in sicer nastanek radikalov, preobremenjenost s kalcijem ali disfunkcija mitohondrijev. Najbolje sprejeta hipoteza je povezana z radikali. Le ta je dobro dokumentirana. Mehanizem, ki naj bi bil odgovoren za kardiotoksičnost je, kot že rečeno, nastanek radikalov, ter nastanek kompleksa železo - DOX, ki povzroči poškodbo srčnih celičnih membran [12]. Povečano nastajanje radikalov povzroči lipidno peroksidacijo in oksidativne poškodbe srca [8].

Veliko truda je bilo vložena v poskuse, kako rešiti problem nastanka radikalov ob uporabi DOX. Opisani so trije pristopi: uporaba spremenjenega časovnega razporeda aplikacije, razvoj manj toksičnih analogov in aplikacija antioksidantov, ki bi zaščitili miokard pred kardiotoksičnim delovanjem. Glede na mehanizem delovanja DOX se zdi najbolj smislen tretji pristop [8].

#### 1.1.1.6 HEPATOTOKSIČNOST DOKSORUBICINA

Jetra so glavni organ za detoksifikacijo in prav zaradi tega pogosto izpostavljena visokim koncentracijam eksogenih toksinov. Poškodbe jeter so pogost neželen učinek zdravilnih učinkovin, ki imajo protitumorsko delovanje, med katere sodi tudi DOX. Je visokoučinkovit antineoplastični antibiotik, ki pa povzroči akutne in zakasnjene poškodbe zdravega jetrnega tkiva [21]. Toksičnost DOX, povzročena z radikali, je opazna v primarnih miocitih in hepatocitih [22]. DOX povzroči neravnotežje med RKZ in antioksidanti. Ta neuravnoteženost se kaže v pošodbah tkiva, ki nastane z lipidno peroksidacijo in oksidacijo proteinov v tkivu. Endogeni antioksidativni encimi, kot sta SOD in CAT, lahko omejita učinek RKZ. Poleg nastanka RKZ pa DOX povzroči tudi zmanjšano delovanje antioksidativnih encimov [23]. DOX deluje hepatotoksično tako, da povzroči vnetni proces, oksidativni stres z radikali in lipidno peroksidacijo. Dokazano je, da pride do nepopravljivih poškodb jeter, kot neželenega učinka DOX in povečane apoptoze v tkivu jeter že ob enkratni aplikaciji. Že terapevtski odmerek DOX povzroči lipidno peroksidacijo v jeternih mikrosomih in mitohondrijih, še posebno ob prisotnosti

Fe<sup>3+</sup> ionov [24]. Po aplikaciji se DOX metabolizira v jetrih. Kmalu po aplikaciji DOX lahko pride do povečanja bilirubina, povečanja plazemske alanin-aminotransferaze (ALT) in aspartat-aminotransferaze (AST). Lahko pride do poškodb hepatocitov, steatoze, poškodb žil [12, 24, 25].

Poleg oksidativnega stresa povzroči poškodbe jeter tudi vnetni proces. Dušikov oksid je eden od reaktivnih mediatorjev, ki nastajajo v jetrih, v endotelijskih celicah, makrofagih, hepatocitih, Kupfferjevih celicah kot odgovor na različne dražljaje in povzroči nastanek poškodb jeter. Najverjetneje gre za povezavo citokinov in poti dušikovega oksida kar povzroči vnetje organa. DOX povzroči povečan nastanek dušikovega oksida v jetrih. Če nastane veliko dušikovega oksida pride do reakcije s superoksidnim anionom in nastane peroksinitrit, ki je za tkivo toksična dušikova spojina [23].

Da bi zmanjšali neželene učinke DOX se optimira odmerek, uporabi njegove analoge ali pa se terapija kombinira z uporabo antioksidantov. Do sedaj je bilo preizkušeno delovanje več antioksidantov. Vitamin E s svojim delovanjem, kot lovilec radikalov, preprečuje lipidno peroksidacijo in tako zmanjša hepatotoksičnost DOX [24].

#### 1.1.1.7 NEFROTOKSIČNOST DOKSORUBICINA

Uporaba DOX je omejena zaradi njegove toksičnosti, predvsem srčne, ledvične, hematološke in testikularne [15, 26].

Spremembe na ledvicah, povzročene z DOX, vključujejo povečano permeabilnost glomerulnih kapilar in atrofijo tubulov [15, 26, 27, 28].

Podatki, o velikosti odmerka in času, ki je potreben za nastanek poškodb ledvic, se med avtorji razlikujejo. Wapstra in sodelavci [27] so pokazali, da pride do poškodb ledvic pri 3 mg/kg odmerku DOX po šestih tednih. V drugem primeru pa navajajo, da je enkratni odmerek 25 mg/kg povzročil nefrotoksičnost že po dveh dneh [27].

Na laboratorijskih živalih je DOX pokazal nefrotoksične učinke in povzročil kronično progresivno glomerularno bolezen. Pri kratkotrajnih eksperimentih na podganah, ki so imele nefropatijo, povzročeno z DOX, je prišlo do hude proteinurije, ki jo je spremljala izguba glomerularnega polianiona, zatekanje in vakuolacija epitelijskih celic. Pri dolgotrajnih študijah je prišlo do hudih poškodb ledvic, povečanih poškodb glomerulov, raztezanja tubulov in stromalne fibroze [12, 28, 29].



Tkivni encim angiotenzin-konvertaza (ACE) je vključen v kardiovaskularne in renalne poškodbe tkiv. Iz tega lahko sklepamo, da ima aktivnost ACE patogeno vlogo pri razvoju proteinurije in podobnih ledvičnih poškodb. Da bi ugotovili kako enkratno injiciranje DOX vpliva na aktivnost ACE, so Rook in sodelavci izvedli študijo na podganah [30]. Iz eksperimenta so ugotovili, da razlika v aktivnosti ledvične ACE predpostavi povečanje proteinurije in resnost intersticijskih ter glomerulnih prefibroznih sprememb na ledvicah [30].

Raziskave Li-Lin Liu in sodelavcev [15] so pokazale, da nekateri dihidropiridini (amlodipin) razširijo tako aferentne, kot eferentne arteriole, z večjim poudarkom na eferentnih, kar povzroči hiperfiltracijo. Hiperfiltracija je odgovorna za ugodno delovanje amlodipina na ledvično tkivo. Nitrendipin in nifedipin pa dilatirata aferentne arteriole z majhnim učinkom na eferentne arteriole, kar povzroči visok glomerularni pritisk, hipertransfuzijo, hiperfiltracijo. Visok glomerularni pritisk in hipertransfuzija sta škodljiva za ledvica. [15].

Da bi podali popolno diagnozo progresivne nefropatije, povzročene z DOX, potrebujemo histopatološko oceno akumulacije komponent ekstracelularnega matriksa (ECM). Te komponente akumulirane v ledvični sredici, predvsem v glomerulu imajo pomembno vlogo pri kronični progresivni nefropatiji. Manabe in sodelavci [27] so potrdili, da pri podganah, ki so jim aplicirali DOX, pride do akumulacije komponent ECM (kolagen I in IV, fibronektin in laminin) v ledvični sredici. Količina komponent se je večala tudi glede na oddaljenost odvzema vzorca od aplikacije DOX. Do povečanja ECM lahko pride zaradi povečane tvorbe ali zaradi inhibicije razgradnje. Aktivna oblika transformirajočega ravnega dejavnika  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) regulira zvečano produkcijo in zmanjšano razgradnjo ECM z zaviralnim učinkom na matriks metaloproteinaze, ki ima pomembno vlogo pri razgradni ECM. Pri podganah, ki jim je apliciran DOX, pride do progresivnega povečanja delovanja TGF-  $\beta 1$  in aktivacije v ledvični sredici in glomerulih, kar kaže na podporno delovanje TGF-  $\beta 1$  pri patološkem napredovanju fibroznih sprememb na ledvicah okarakteriziranih z akumulacijo ECM [15].

TGF-  $\beta 1$  je eden najmočnejših fibrogenih mediatorjev v telesu in regulira tako fiziološko zdravljenje, kot patološko fibrozo. V raziskavi Hahn in sodelavci [31] dokažejo, da je nivo TGF-  $\beta 1$ , pri podganah injiciranih z DOX, odvisen tudi od njihove starosti. Količina urinarnega TGF-  $\beta 1$  kaže na fibrozni proces znotraj ledvic in je bila višja pri starejših

podganah. Iz tega so zaključili, da enak odmerek DOX, glede na težo podgane, povzroči resnejšo nefropatijo pri starejših podganah [31].

## 1.2 OKSIDATIVNI STRES

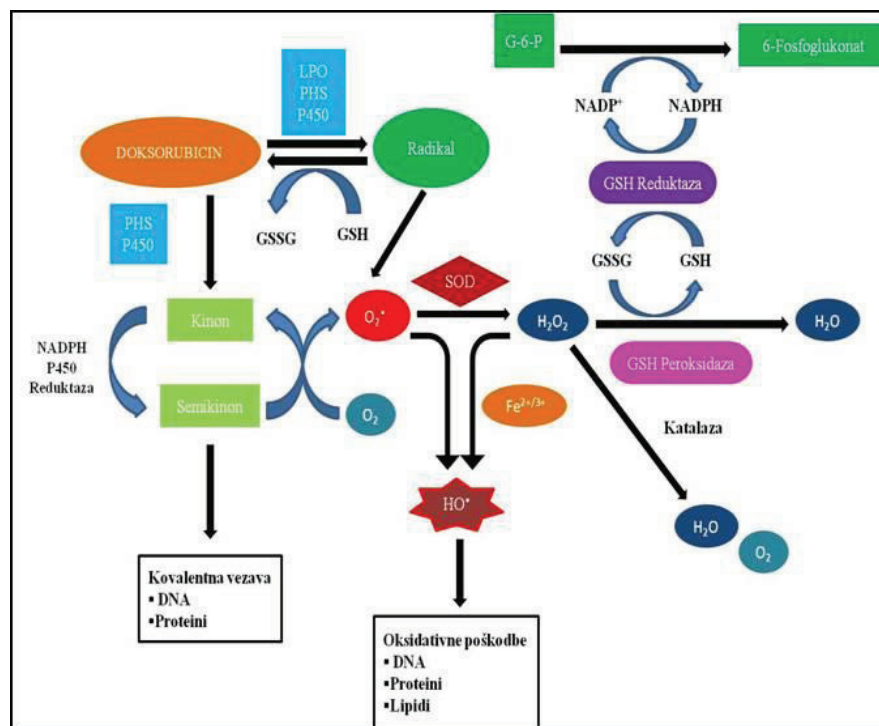
Oksidativni stres nastane kot posledica povečane tvorbe oksidantov, zmanjšanja antioksidativne zaščite ali neučinkovitega popravljanja oksidativne poškodbe. Oksidanti obsegajo RKZ, reaktivne dušikove spojine (RDS), radikale, ki vsebujejo žveplo in mnoge druge. RKZ so biološko pomembne, ker poškodujejo molekule, kot so lipidi, DNA ali proteini, in so vključene v patobiokemijo degenerativne bolezni.

Radikali so katera koli zvrst, ki je obstojna in vsebuje enega ali več nesparjenih elektronov. Ti nesparjeni elektroni povzročijo visoko reaktivnost molekul in njihovo majhno specifičnost za reaktante [16].

Tako oksidativni stres kot tvorba radikalov, sodelujeta pri delovanju DOX, tako pri protitumorskih učinkih, kot pri njegovi toksičnosti. DOX povzroči oksidativne poškodbe DNA in lipidno peroksidacijo [26].

Celična poškodba nastane z delovanjem RKZ kot so: superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), alkoksi radikal ( $RO^{\cdot}$ ), peroksi radikal ( $ROO^{\cdot}$ ) in hidroperoksilni radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ).

Glavni izvor RKZ *in vivo* je aerobno dihanje, čeprav reaktivne oblike nastajajo s peroksisomalno  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin, mikrosomalnim metabolizmom ksenobiotikov s citokromom P450, stimulacijo fagocitoze s patogeni ali lipopolisaharidi, metabolizmom arginina in tkivno specifičnimi encimi. Pri normalnih pogojih se RKZ izločajo iz celice z delovanjem superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) ali glutation-peroksidaze (GSH-Px) (Slika 6).



Slika 6: Prikaz nastanka RKZ, povzročenega z antraciklini.

## 1.2.1 ANTIOKSIDATIVNA ZAŠČITA

Sestava antioksidativne zaščite je odvisna od tkiva in se znotraj tkiva, od celice do celice, razlikuje. Zunajcelične tekočine imajo različne mehanizme zaščite v primerjavi z znotrajceličnim okoljem.

### 1.2.1.1 ENCIMSKI MEHANIZMI OKSIDATIVNE ZAŠČITE

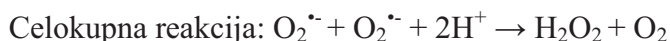
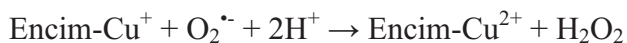
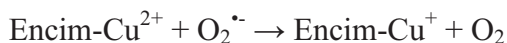
#### 1.2.1.1.1 Superoksid-dismutaza

SOD katalizira reakcijo dismutacije superoksidnih radikalov do kisika in vodikovega peroksida. Poznamo več vrst SOD:

- Baker – cinkova SOD (CuZnSOD)
- Manganova SOD (MnSOD)
- Zunajcelična SOD

CuZnSOD Ta encim se pretežno nahaja v citosolu, najdemo pa ga tudi v lizosomih, jedru in v prostoru med notranjo in zunanjo membrano mitohondrija. Encim je sestavljen iz dveh

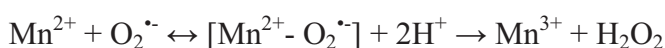
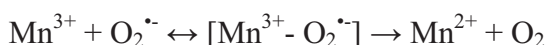
podenot, od katerih ima vsaka reaktivno mesto, saj vsebuje en ion bakra in cinka. Vse CuZnSOD katalizirajo isto reakcijo: močno pospešijo reakcijo dismutacije  $O_2^{\cdot-}$ . Hitrost nekatalizirane reakcije dismutacije je močno odvisna od pH. Katalizirana reakcija z CuZnSOD pa je praktično neodvisna od pH v območju od 5,3 – 9,5 in za faktor 1000 hitrejša.



$Zn^{2+}$  nima funkcije v katalitičnem ciklu, pomaga pa pri stabilizaciji encima.

Encim je sestavljen iz dveh podenot, ki sta sestavljeni iz 153 aminokislinskih ostankov ter enega iona bakra in cinka. Baker je vezan na reaktivno mesto preko interakcije z dušiki v imidazolskih obročih na štirih histidinskih koncih (položaj 44, 46, 61 in 118 v aminokislinskem ostanku). Cinkov ion je vezan na baker preko interakcije z imidazolom v histidinu na položaju 61, 69 in 78 ter karboksilno skupino aspartata na položaju 81. Histidin na položaju 61, ki veže oba kovinska iona, zagotavlja protone, potrebne za reakcijo dismutacije.

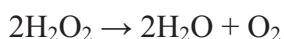
MnSOD Encim se nahaja v mitohondrijih in katalizira enako reakcijo kot CuZnSOD, le da ima v aktivnem mestu  $Mn^{3+}$ .



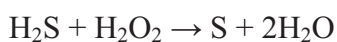
MnSOD sestavljajo štiri podenote od katerih vsaka vsebuje en ion mangana [16].

#### **1.2.1.1.2 Katalaza**

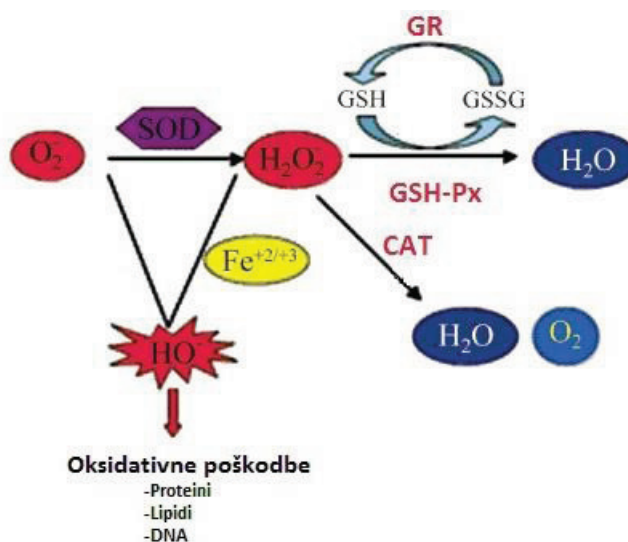
Dismutacija  $O_2^{\cdot-}$  povzroči nastanek  $H_2O_2$ . Vodikov peroksid se večinoma odstranjuje s pomočjo dveh encimov: CAT, ki pretvori vodikov peroksid do kisika in vode.



In peroksidaze, ki odstrani vodikov peroksid tako, da ga uporabi za oksidacijo drugega substrata ( $GSH \rightarrow GSSG$ ).



Nahaja se v celotnem telesu, pri čemer je njena koncentracija najvišja v jetrih in eritrocitih. Sestavljena je iz štirih proteinskih podenot, od katerih vsaka vsebuje hem v aktivnem mestu. Vsaka podenota vsebuje tudi vezano NADPH molekulo [16]. Reakcijski mehanizem katalaze prikazuje slika 7.



Slika 7: Mehanizmi oksidativne zaščite celic [33].

### 1.2.1.1.3 Glutation-peroksidaza in reduktaza

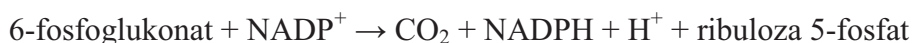
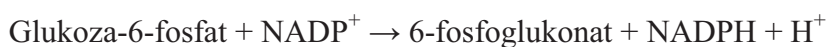
GSH-Px odstrani vodikov peroksid ali organske hidroperoksidge (ROOH) z njihovo redukcijo do vode oziroma alkoholov in hkratno oksidacijo GSH.



GSH-Px je sestavljena iz štirih podenot, od katerih vsaka vsebuje atom selena na aktivnem mestu. Razmerje med reducirano in oksidirano obliko glutationa (GSH/GSSG) je pri normalnih celicah veliko (10/1), zato mora obstajati mehanizem, ki reducira GSSG nazaj do GSH. Ta reakcija je katalizirana z glutation reduktazo (GR).



Potrebni NADPH se zagotavlja preko oksidativne poti pentoze fosfata.



### 1.2.2 MALONDIALDEHID

MDA nastaja v manjši meri pri peroksidaciji lipidov (Slika 5), v večjih količinah pa nastane pri peroksidaciji jetrnih mikrosomov, ob prisotnosti železovih ionov. MDA močno naraste pri peroksidaciji nenasičenih maščobnih kislin. Obstaja v večih oblikah glede na pH. Pri fiziološkem pH je prost MDA v obliki enolatnega iona, ki je šibko reaktiven do večine amino kislin. Z zniževanjem pH, se reaktivnost poveča. Pri fizioloških pogojih MDA hitreje reagira s proteini, kot s prostimi aminokislinami. Vezava na proteine povzroči spremembe na aminokislinskih ostankih kot je npr. lizin ter povezave znotraj proteina in med proteini.

MDA reagira tudi z bazami DNA in lahko povzroči mutagene lezije. Priljubljena tarča MDA v molekuli DNA je gvanin. V tkivih sesalcev se MDA hitro metabolizira v malonsko kislino s pomočjo aldehyd dehidrogenaze. Malonska kislina se pretvori v acetaldehyd, ta pa se oksidira do acetata s pomočjo aldehyd-dehidrogenaze [16].

### 1.2.3 GLUTATION

Glutation ima vlogo zaščitnika pred oksidativnim stresom in detoksifikacijo ksenobiotikov. Tako je njegova reducirana oblika (GSH) pomemben faktor pri vzdrževanju zdravja. Znižanje koncentracije GSH v telesu je lahko povezano s staranjem in patogenezo veliko bolezni, vključno z revmatoidnim artritismom, mišično distrofijo, AIDS, Alzheimerjevo boleznijo in drugimi. Koncentracija glutaciona v krvi je tudi pokazatelj količine GSH v drugih, manj dostopnih tkivih in indikator tveganja nastanka bolezni [35].

Določanje količine GSSG oziroma GSH v krvi je pogosto pri mnogih raziskavah, ki vključujejo oksidativni stres in patološka stanja povzročena z radikali. Nizka koncentracija GSH, visoka koncentracija GSSG in nizko razmerje GSH/GSSG, so pogosti pri različnih patoloških stanjih, povzročenih z oksidativnim stresom (kardiovaskularna obolenja, rak, kronične bolezni). V normalnih pogojih je večina znotrajceličnega glutaciona v reducirani obliki [35].

Preko konjugacije z GSH se metabolizira veliko ksenobiotikov. Reakcijo katalizira glutation-S-transferaza. Posebej bogata s tem encimom so jetra in konjugati se pogosto izločajo v žolč s pomočjo od ATP odvisne črpalke. Ista črpalka se uporablja tudi za izločanje GSSG kadar so jetra izpostavljena oksidativnemu stresu.

## **1.3 RAZLIČNI PRISTOPI V ZAGOTAVLJANU ZAŠČITE PROTI TOKSIČNOSTI POVZROČENI Z DOKSORUBICINOM**

### **1.3.1 Naravni produkti**

Zaradi pomembnosti DOX v terapiji rakavih obolenj se znanstveniki zelo trudijo, da bi našli zaščito pred neželenimi učinki DOX ali pa bi le-te zmanjšali. Toksičnost DOX naj bi bila v največji meri povzročena z nastankom radikalov. Začeli so proučevati učinek naravnih antioksidantov, kot so vitamini A, C, E in karotenoidi, koencim Q, flavonoidi, polifenoli, antioksidanti iz zelišč, selen in deviško oljčno olje [36].

Likopen je karotenoid, ki je prisoten v paradižnikih, deluje antioksidativno kot lovilec dveh reaktivnih oblik kisika, singletnega kisika ( $^1\text{O}_2$ ) in peroksilnega radikala. Rezultati raziskav kažejo, da likopen zmanjša toksičnost povzročeno z DOX predvsem z zmanjšanjem lipidne peroksidacije [26].

### **1.3.2 Zdravilne učinkovine**

Zaščita celic je eden od načinov za zmanjšanje citotoksičnih učinkovin sredstev uporabljenih v terapiji raka. Amifostin je analog cisteamina – aminotiola. V tkivu se defosforilira z alkalno fosfatazo do aktivnega metabolita – prostega tiola. Taka oblika učinkovine lahko prehaja celično membrano s pasivnim ali aktivnim mehanizmom. V zdravih tkivih je njegovala koncentracija zelo visoka. Do višje koncentracije prostega tiola pride zaradi velike aktivnosti membranske fosfataze zdravih celic, v primerjavi z rakavimi celicami. Mehanizem delovanja še ni dobro poznan. Dokazi govorijo o tem, da je lovilec reaktivnih oblik kisika in lahko zmanjša poškodbe DNA, ki nastanejo zaradi radikalov. Zavira tudi membranski transport DOX. Zadnje raziskave kažejo, da lahko vpliva na formiranje in akumulacijo proteina p53 in katalitskim zaviranjem DNA topoizomeraze II – alfa, kar podaljša celični cikel in tako zagotovi daljši čas za popraviljanje DNA [37].

Deksrazoksan (ICRF-187) je bil v uporabi kot kardioprotektivna učinkovina pri zdravljenju z DOX. Zima in sodelavci [38] so raziskovali njegovala nefroprotektivnost in ugotovili, da tako enkratni odmerek, kot tedenski odmerki deksrazoksana, preprečijo nastanek nefrotičnega sindroma.

### 1.3.3 Nove dostavne oblike in aplikacija doksorubicina

Nov pristop, s katerim bi povečali učinkovitost in zmanjšali neželene učinke, je vezava na nove dostavne sisteme, kot so nanodelci, liposomi in drugi sistemi, ki so usmerjeni na rakave celice. Za terapevtsko uporabo se dostavni sistemi, kot so liposomi, injicirajo intravensko in ob modifikaciji z lipidi, ki naredijo njihovo površino bolj hidrofilno se lahko njihova cirkulacija v krvi močno podaljša. Uporabljajo se predvsem za hidrofilne protitumorske učinkovine, kot je DOX. Da bi povečali specifično vezavo na tumorske celice, so na površino dodane specifične molekule (protitelesa, proteini, peptidi).

Z enkapsuliranjem učinkovine v liposome imajo antraciklini daljšo življensko dobo in se raje akumulirajo v tkivu s tumorji, kot srčnem tkivu, kar zagotavlja selektivnost. DOX v pegiliranih liposomih povzroči manj srčnih poškodb, kot prosti DOX. Liposomski pripravki z DOX kažejo enak antineoplastični učinek pri zdravljenju raka dojke, kot prosti DOX, le da imajo manj standardnih neželenih učinkov.

Ob aplikaciji DOX v obliki pegiliranih liposomov se pojavi preobčutljivostna reakcija ob začetku infuzije. Lahko vključuje spremembe v krvnem tlaku (hipotenzija ali hipertenzija), oteženo dihanje, nemir, zardevanje, srbenje, bolečine v prsnem košu. Pegilirani liposomi so zelo uspešni in popularni v moderni terapiji raka. Problem je v tem, da je njihova učinkovitost in toksičnost, v različnih sistemih, odvisna od odmerka in vrste neoplastičnega tkiva [12].

### 1.3.4 Novi antioksidanti

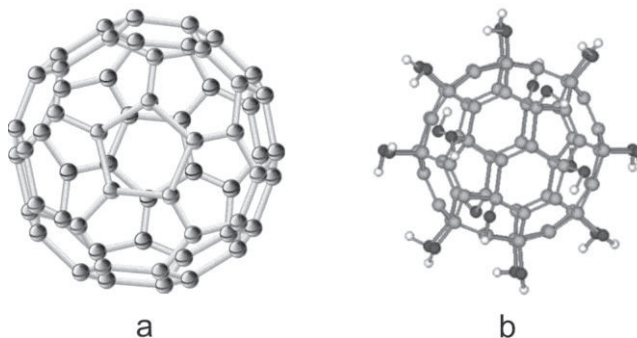
#### 1.3.4.1 FULEREN IN FULERENOL

Fulereni so nova oblika ogljika in predstavljajo tretjo alotropno modifikacijo ogljika. Ime so dobili po arhitektu Buckminsterju Fullerju, ki je v konstitucijo ameriškega paviljona leta 1967 vklopil heksagonske in pentagonske strukture. Leta 1996 so Robert F Curl, Harold W. Kroto in Richard E. Smally prejeli Nobelovo nagrado s področja kemije za odkritje in rešitev strukture najbolj znanega predstavnika fulerenov, molekule C<sub>60</sub>. Sestavljen je iz dvajset 6-členskih in dvanajst 5-členskih obročev ogljika, ki mu dajejo sferično obliko [6, 39].

Fuleren C<sub>60</sub> je v nasprotju z diamantom in grafitom kemijsko zelo reaktiven. Z njegovo modifikacijo so dobili številne vodotopne biološko aktivne molekule, med katerimi so se



kot najbolj zanimivi v *in vitro* in *in vivo* raziskavah pokazali polihidroksilirani fulereni – fulerenoli [39]. *In vitro* so pokazali primerljivo ali celo večjo antioksidativno moč, kot jo imajo biološki antioksidanti, askorbinska kislina in vitamin E. Visok antioksidativni potencial naj bi bil posledica zmožnosti reagiranja z visoko reaktivnimi kisikovimi zvrstmi, kot sta superoksidni radikal in hidroksilni radikal [40]. Zgradbi fulerena  $C_{60}$  in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  sta prikazani na Sliki 8.



Slika 8: Zgradbi fulerena  $C_{60}$  (a) in fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  (b).

Študije, ki so vključevale fizikalnokemijske lastnosti fulerenolov, so potrdile, da hidroksilirani fulereni tvorijo koloide. Husebo in sodelavci [41] so dokazali, da klastri fulerenola tvorijo velike, rahlo povezane, amorfne agregate v vodi. Nastanek agregatov je bil predstavljen v mikromolarnih koncentracijah, kar nakazuje, da fulerenol najverjetneje tvori supramolekularne klastre premera okrog 100 nm ali več, različnih oblik glede na karakteristike hidroksilnih skupin.

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  je rjava, amorfna, higroskopna praškasta spojina. V vodi je praktično netopen (do 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Ph Eur praktično netopen: več kot 10000 mL topila/1 g topljenca) [26, 42]. Pri vezavi polarnih skupin (-OH,  $-\text{NH}_2$ , -NHR, -COOH, -OCCOR, -NHCOR itd.) na molekulo fulerena dobimo derivate, ki so v vodi bolj topni. Fulerenoli so se pokazali kot odlične spojine za odstranjevanje radikalov. Antioksidativno aktivnost fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  so potrdili na kemijskem modelnem sistemu. Predpostavljeni mehanizmi delovanja vključujejo inaktivacijo hidroksilnega ( $\text{OH}^\bullet$ ) in superoksidnega radikala ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ter dušikovega oksida ( $\text{NO}^\bullet$ ) [39].

Tako *in vitro* kot *in vivo* raziskave so pokazale, da so polihidroksilirani fulereni morebitni antioksidanti in lovilci radikalov v bioloških sistemih. To se kaže tako v primerih, kjer je oksidativni stres povzročen s ksenobiotiki, kot tudi pri izpostavitvi radioaktivnemu sevanju

[42, 43, 44]. Dokazano je, da protektivni učinek na srce in jetra dosežemo, če apliciramo fulerenol 30 minut pred DOX v odmerku 100 mg/kg [43].

V molekuli fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  so najbolj reaktivne dvojne vezi, ki povezujejo posamezne pentagonske strukture. Interakcija med hidroksilnim radikalom in fulerenolom temelji na radikalski adiciji  $2n OH^{\bullet}$  radikala na olefinske dvojne vezi fulerenolovega ogrodja do proizvoda  $C_{60}(OH)_{24} + 2n OH^{\bullet}$  ( $n = 1-12$ ). Drugi možni mehanizem je, da fulerenol odda svoj vodik radikal  $OH^{\bullet}$ , pri tem pa nastane stabilni radikal  $C_{60}(OH)_{23}O^{\bullet}$  [39].

## 2 NAMEN

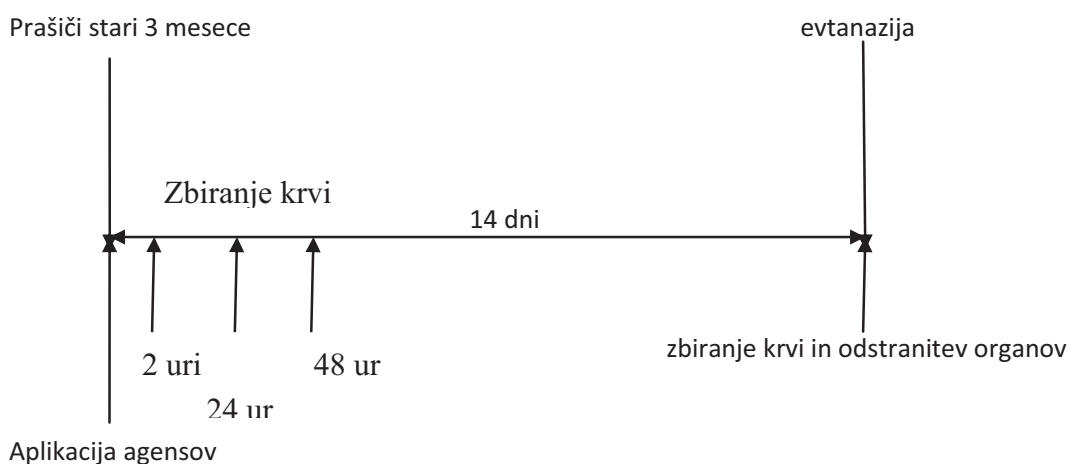
DOX kaže neželene učinke na več organov, kar omejuje njegovo terapevtsko uporabo. Oksidativni stres je glavni povzročitelj toksičnega delovanja DOX tako na srce, ledvica in jetra. Namen raziskave je preučiti potencialne zaščitne učinke antioksidanta fulerenola  $C_{60}(OH)_{24}$  ob i.p. oziroma per os aplikaciji, na kronične poškodbe jeter, ledvic, srca, pljuč in vranice povzročene z DOX. Poskuse bomo opravili *in vivo* na zdravih prašičih, starih tri mesece. Poskusne živali v študijskih skupinah bodo prašiči F1 generacije katerih starši so vrste Swedish Landrace in Large Yorkshire. Živalim bo apliciran samo DOX, samo fulerenol ali njuna kombinacija. Rezultati bodo primerjani na skupino, ki bo prejela 0,9 % raztopino NaCl. V obdobju 14 dni, kolikor naj bi poskus trajal, bodo živali opazovane s strani veterinarja in veterinarja patologa. V različnih časovnih točkah poskusa bodo odvzeti in analizirani vzorci krvi. Po evtanaziji bo obdukcijo živali opravil veterinar patolog in izdal poročilo. Primerjali bomo težo posameznega organa s celotno težo živali v posameznih skupinah. V vzorcih krvi bo določeno število krvnih celi in koncentracije serumskih proteinov. Posamezni organi bodo homogenizirani. V homogenatu bodo izmerjene koncentracije encimov in drugih snovi, ki so pokazatelji oksidativnega stresa. Rezultati bodo statistično obdelani s programom SPSS.

### 3 MATERIALI IN METODE

Vse poskusne živali v študijskih skupinah so bili prašiči F1 generacije, katerih starši so vrste Swedish Landrace in Large Yorkshire. Živali so bile stare 3 mesece in so tehtale nekaj dni pred odmerjanjem med 17 in 19 kg. Prašiči so bili krmljeni s pridelano prehrano, v skladu s priporočili za to starost. Vsi eksperimenti so bili izvedeni v skladu z Evropsko konvencijo o zaščiti vretenčarjev, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (ETS 123). Šest študijskih skupin, z dvema živalima na skupino, so bile oblikovane in obravnavane v skladu s šestimi različnimi eksperimentalnimi protokoli:

1. samo enkratna intraperitonealna aplikacija 10 mg/kg DOX;
2. enkratna intraperitonealna aplikacija vodne raztopine fulerenola v koncentraciji 25 mg/kg, 30 minut pred intraperitonealno aplikacijo enkratnega odmerka 10 mg/kg DOX;
3. kontrolna skupina, enkratna intraperitonealna aplikacija NaCl 0,9 % raztopine;
4. enkratna intraperitonealna aplikacija vodne raztopine fulerenola v koncentraciji 25 mg/kg;
5. peroralna aplikacija vodne raztopine fulerenola v koncentraciji 25 mg/kg, 6 ur pred intraperitonealno aplikacijo enkratnega odmerka 10 mg/kg DOX;
6. enkratna peroralna aplikacija vodne raztopine fulerenola v koncentraciji 25 mg/kg.

Živali so se žrtvovale v skladu z etičnimi načeli, 14 dni po uporabi DOX in/ali fulerenola.



Slika 10: Eksperimentalni protokol.

Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  (Novi Sad, Srbija) je bil pripravljen neposredno pred uporabo v aseptičnih pogojih v LAF (ang. »*laminar air flow*«) komori, in sicer smo  $C_{60}(OH)_{24}$  raztopili v sterilizirani in apirogeni raztopini NaCl (0,9 %) v koncentraciji 10 mg/mL. Pri raziskavi smo uporabili DOX (Adriablastina®) za i.v. (intravensko) aplikacijo proizvajalca Pharmacia & Upjohn (Milano, Italija). Raztopino za i.p. (intraperitonealno) aplikacijo je bila prav tako tik pred uporabo pripravljena v sterilizirani in apirogeni 0,9 % raztopini NaCl (2 mg/mL) v komori z laminarnim tokom zraka (LAF).

Kri za analizo je bila odvzeta iz orbitalnega venskega sinusa, kot tudi s punkcijo srca po torakotomiji. V krvi so bili določeni hematološki parametri: hematokrit (HCT), segmentirani in nesegmentirani nevtrofilci, limfociti, eozinofilci, monociti, bazofilci, levkociti, eritrociti in hemoglobin (Hbg).

Serum je bil uporabljen za analizo aktivnosti encimov laktat-dehidrogenaze (LDH) in alfa-hidroksibutirat-dehidrogenaze ( $\alpha$ -HBDH). Za določitev ravni LDH so bili uporabljeni komercialni reagenti Chema Diagnostica (Jesi, Italija), pri  $\alpha$ -HBDH pa komercialni reagenti Dialab (Dunaj, Avstrija).

LDH katalizira pretvorbo piruvata v laktat ob prisotnosti NADH, ki se ob poteku reakcije pretvori v  $NAD^+$ . Aktivnost LDH smo merili posredno s spektrofotometrično metodo pri 340 nm kjer določimo hitrost pretvorbe NADH v  $NAD^+$ .

Vsak organ je bil hitro odstranjen iz prašiča, ki smo ga žrtvovali in je bil postavljen v ledeno hladno raztopino. Maščobno tkivo je bilo obrezano. Na koncu smo razkosano tkivo homogenizirali v raztopini Tris-buffer (pH 7,4; organ/pufer = 1/10; m/m) in razdelili na dva dela. Prvi del smo uporabili za določitev MDA, drugega pa smo centrifugirali pri 13.000×g obratih, 20 minut pri 4 °C (hladilnik Beckman, Ultracentrifuga). Supernatant smo nato uporabili za merjenje skupne koncentracije proteinov (TP; Sentinel Diagnostics, Milano - Italija), GSH, GSSG, GSH-Px (Ransel, Crumlin, VB), GR (Crumlin, VB), CAT, LDH, SOD (Ransod, Crumlin, VB). Koncentracija prostega GSH in GSSG, ter MDA je bila izmerjena s Chromsystems Diagnostic komercialnim kompletom za analizo HPLC (München, Nemčija) in izražena v mg/L oziroma  $\mu$ g/L pri MDA. Izračunano je bilo tudi razmerje med prostim GSH/GSSG. Pri analizi smo uporabili HPLC Agilent HP 1100 sistem, opremljen z avtomatskim vzorčevalcem in fluorescenčnim detektorjem (Waldbronn, Nemčija). S to kromatografijo lahko določimo le prosti GSH zato je potrebno GSSG pretvoriti v GSH. V ta namen smo vzorcu dodali reagent za redukcijo. Ena

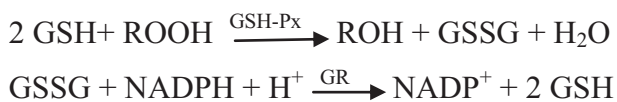
molekula GSSG reducira v dve molekuli GSH. Vzorec smo razdelili na dva dela. V enem smo določili prosti GSH. V drugem pa smo najprej reducirali GSSG in izmerili celokupni GSH. Na podlagi rezultatov smo izračunali koncentracije GSH, GSSG in njuno razmerje.

Za določitev MDA je bilo potrebno najprej izvesti precipitacijo proteinov v vzorcu. Sledila je derivatizacija. Nastali kromofor je specifičen in ga je možno detektirati pri zelo nizkih koncentracijah.

Koncentracije encimov kot so GSH-Px, GR, SOD, CAT, CK, ALT in AST smo merili s spektrofotometrom z uporabo mikrotiterskih ploščic.

Za meritve ALT, AST GSH-Px in GR uporabljamo različne komercialne komplete, pri vseh pa gre za meritev pri valovni dolžini 340 nm. Merimo znižanje absorbance, ki je posledica zmanjšanja koncentracije NADPH.

Reakcija, ki poteka v primeru določitve GSH-Px in GR:



Tudi CK določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Zvišanje koncentracije CK povzroči povečanje absorbance. Pri reakciji gre za pretvorbo NADP v NADPH.

SOD prav tako določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 550 nm. Pri reakciji, ki jo povzroči uporabljen komercialni komplet nastane formazan, ki rdeče obarva raztopino. Delovanje SOD povzroči zaviranje te reakcije. Večje znižanje absorbance pomeni večjo aktivnost SOD.

Katalazno aktivnost homogenata smo določili z metodo Aebi [46], pri kateri vodikov peroksid reagira s celičnim lizatoma. S spektrofotometrom, pri valovni dolžini 240 nm, smo merili padec absorbance, ki je proporcionalen aktivnosti CAT.

Koeficient tkiva, glede na telesno maso ob žrtvovanju, se izračuna kot razmerje med tkivom organa (mokra masa v g) glede na telesno maso (kg). Med obdukcijo se organ izreže in stehta. Vzorci vsakega organa (jetra, srce, ledvica, pljuča, vranica) in vse makroskopske spremembe, so bile določene takoj ali naknadno iz shranjenih vzorcev v 10 % pufrnem formalinu za histološko analizo.

## STATISTIČNA ANALIZA

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

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI

#### 4.1.1 Makroskopske spremembe

Živali so bile tekom celotne študije obravnavane s strani veterinarja in veterinarja patologa, ki sta po žrtvovanju tudi opravila obdukcijo.

V prvih 24 urah po aplikaciji so se pokazale največje težave pri prvi, drugi in četrti skupini, to so živali, ki so prejele DOX in i.p. fulerenol. Živali so izgubile apetit, pojavila se je slabotnost in bruhanje v prvih 6 urah. Živali iz skupin 5 in 6 so izgledale mnogo bolje in so imele manj težav z bruhanjem v prvih urah po aplikaciji. Imele so normalen apetit in obnašanje. Po 24 urah so si vse živali opomogle in med njimi ni bilo več vidnih razlik.

#### *Patološke spremembe*

Koža živali iz vseh skupin je bila brez vidnih sprememb, normalno porasla z dlako in vidne sluznice so bile rožnate. Okrog telesnih votlin ni bilo izcedka.

Do rahlo povečanih jeter je prišlo pri prvi skupini. Živali iz druge skupine so imele skupaj zraslo serozno ovojnico trebušne votline in tankega črevesja, v dolžini 10 cm. Prav tako so imele na večih mestih skupaj zraslo serozno ovojnico trebušne votline in črevesja živali iz četrte skupine.

Pri drugi in peti skupini so opazili, da so na serozni ovojnici trebušne votline in organov skupki temnejše barve in čvrste konsistence velikosti od 1 do 5 mm.

Pri živalih iz tretje skupine ni bilo vidnih sprememb v notranjosti telesa. Pri živalih iz pete in šeste skupine pa je prišlo do povečanja pljuč.

V preglednici 1 so predstavljeni rezultati telesne mase pred aplikacijo, sedem dni po aplikaciji in štirinajst dni po aplikaciji. Statistične razlike med časovnicami so podane kot a:  $p < 0,05$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$ .



Preglednica 1: Sprememba telesne mase v kilogramih tekom eksperimentalnega časa.

Časovnica Skupina	I (pred aplikacijo)	II (7 dni po aplikaciji)	III (14 dni po aplikaciji)
1	23,90±0,14	20,85±0,21 <sup>lc</sup>	22,90±0,14 <sup>lb,lc</sup>
2	24,05±0,07	24,08±0,11	24,03±0,04
3	24,93±0,11	27,03±0,04 <sup>lc</sup>	25,05±0,07 <sup>lc</sup>
4	22,98±0,04	20,95±0,07 <sup>lc</sup>	23,03±0,04 <sup>lc</sup>
5	23,93±0,11	25,93±0,11 <sup>lc</sup>	25,95±0,07 <sup>lc</sup>
6	22,98±0,04	23,95±0,07 <sup>lc</sup>	23,03±0,04 <sup>lc</sup>

Sedem dni po aplikaciji je prišlo do statistično značilne spremembe telesne mase pri vseh skupinah, razen v drugi skupini (fulerenol i.p. in DOX). V prvi in četrti skupini je prišlo do znatnega znižanja telesne mase, medtem ko se je masa v ostalih skupinah povečala.

Štirinajst dni po aplikaciji se je v prvi skupini masa nekoliko povečala glede na sedemdnevno, vendar je bila še vedno nižja kot pred aplikacijo.

V tretji skupini se je masa znižala in se vrnila na raven pred aplikacijo. V četrti skupini se je masa ponovno statistično pomembno zvišala glede na sedemdnevno in se vrnila na raven pred aplikacijo. Pri peti skupini ni prišlo do spremembe glede na sedem dni. Pri šesti skupini pa se je masa zmanjšala in se prav tako vrnila na raven pred aplikacijo. Glede na spremembe telesne mase tekom raziskave lahko potrdimo tezo oziroma rezultate raziskovalnih skupin, ki so delale eksperimente na podganah, da aplikacija samega DOX ali i.p. aplikacija samega fulerenola povzroči padec telesne mase [24, 30, 45]. Ti rezultati se kažejo zgolj 7 dni po aplikaciji. Nuno GM in sodelavci navajajo, da lahko pride do zmanjšanja telesne mase zaradi stresa, ki nastane ob aplikaciji ter hematoloških in gastrointestinalnih sprememb, povzročenih z DOX [45]. 14 dni po enkratni aplikaciji pa se učinki zmanjšajo oziroma sploh niso več vidni.

V Preglednici 2 je prikazan koeficient jeter, pljuč, ledvic, srca in vranice. Podan je kot razmerje med maso organa in telesno maso živali. Statistične razlike med skupinami so podane kot a:  $p < 0,05$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,001$ .

Preglednica 2: Koeficient organov (razmerje med maso organa in telesno težo) po skupinah.

Skupina	Jetra g/kg	Pljuča g/kg	Ledvica g/kg	Srce g/kg	Vranica g/kg
1	23,32±0,61	13,40±0,21	3,72±0,05	7,71±0,29	2,24±0,07
2	30,94±0,48 <sup>lc</sup>	12,27±0,09 <sup>lb</sup>	3,24±0,23 <sup>lb</sup>	5,49±0,12 <sup>lc</sup>	2,26±0,08
3	25,71±0,83 <sup>lb,2c</sup>	10,95±0,11 <sup>lc,2b</sup>	4,51±0,09 <sup>lc,2c</sup>	5,71±0,08 <sup>lc</sup>	2,21±0,06
4	22,28±0,58 <sup>2c,3b</sup>	10,12±0,16 <sup>lc,2c,3a</sup>	3,23±0,06 <sup>lb,3c</sup>	4,49±0,10 <sup>lc,2b,3c</sup>	1,66±0,10 <sup>lb,2b,3b</sup>
5	31,60±0,51 <sup>lc,3c,4c</sup>	20,32±0,47 <sup>lc,2c,3c,4c</sup>	4,96±0,06 <sup>lc,2c,3b,4c</sup>	4,70±0,12 <sup>lc,2b,3c</sup>	2,27±0,14 <sup>4c</sup>
6	25,40±0,25 <sup>1a,2c,4b,5c</sup>	13,23±0,35 <sup>2a,3c,4c,5c</sup>	4,07±0,09 <sup>1a,2c,3b,4c,5c</sup>	4,37±0,03 <sup>lc,2c,3c</sup>	1,57±0,06 <sup>lc,2c,3c,5c</sup>

- jetra

Koeficient jeter je značilno manjši ( $p < 0,01$ ) pri prvi in četrti skupini, ki sta prejeli samo DOX oziroma fulerenol, glede na tretjo (kontrolno) skupino. Do značilnega povečanja ( $p < 0,001$ ) pa je prišlo v drugi in peti skupini, kjer sta bila aplicirana fulerenol in DOX. Iz rezultatov lahko zaključimo, da aplikacija fulerenola pred DOX povzroči povečanje razmerja med maso jeter in celotno maso živali. Ne moremo pa potrditi porasta koeficienta pri skupinah, ki so prejele samo DOX ali samo fulerenol, kakor so Injac in sodelavci zaključili iz raziskav na podganah [43].

- pljuča

Koeficient pljuč se je v prvi, peti in šesti skupini statistično značilno najbolj povečal ( $p < 0,001$ ) glede na kontrolno skupino. Do manj značilnega povečanja ( $p < 0,01$ ) je prišlo v drugi skupini, medtem ko je do najmanj značilne spremembe prišlo v četrti skupini, kjer je koeficient nekoliko padel. Rezultati kažejo na to, da pride do povečanja mase pljuč, v primerjavi s telesno maso, ob aplikaciji samega DOX ali v kombinaciji z peroralno apliciranim fulerenolom. Prav tako se kaže povečanje tudi ob peroralni aplikaciji samega fulerenola. O povečanem koeficientu pri živalih (podganah), ki so prejele DOX poročajo tudi Injac in sodelavci [13]. Razlog za to je znan iz literature, zaradi toksičnih učinkov DOX oziroma neraztopljenega dela fulerenola po i.p. aplikaciji pride do pljučnega edema [12, 13, 25].

- ledvica

Do značilnega zmanjšanja ( $p < 0,001$ ) koeficienta ledvic je prišlo v prvi, drugi in četrti skupini glede na kontrolno skupino. V peti in šesti skupini pa je prišlo do nekoliko manj značilnega ( $p < 0,01$ ) povečanja koeficienta. Raziskava kaže na povečanje mase ledvic v primerjavi na celotno maso živali, ob peroralni aplikaciji samega fulerenola ali v kombinaciji z DOX. Ob aplikaciji samega DOX ali i.p. aplikaciji samega fulerenola in tudi v kombinaciji z DOX se masa ledvic zmanjša. Povečanje koeficienta kaže na lipidno peroksidacijo povzročeno z oksidativnim stresom in na nastanek produktov povzročenih z RKZ. Predhodne raziskave ne kažejo sprememb v koeficientu ledvic, vendar so bile raziskave narejene le z i.p. apliciranim fulerenolom in ne per os [13, 28].

- srce

Značilno povečanje ( $p < 0,001$ ) koeficienta srca vidimo v prvi skupini, ki je prejela DOX. V četrti, peti in šesti skupini pa pride do značilnega zmanjšanja koeficienta glede na kontrolno skupino. Povečan koeficient srca v skupini, ki je prejela DOX navajajo tudi drugi raziskovalci in je posledica dilatacije srca [44].

- vranica

Do značilnega zmanjšanja koeficienta vranice je prišlo ob peroralni aplikaciji samega fulerenola ter nekoliko manj značilnega znižanja ob i.p. aplikaciji samega fulerenola. Pri ostalih skupinah ni prišlo do statistično značilnih sprememb glede na kontrolno skupino. Glede na to, da literarnih podatkov za vranico ni, posledično primerjava z drugimi viri ni možna. V naši raziskavi je vranica prvič uporabljena kot organ za ovrednotenje oksidativnega statusa in morebitnih poškodb zaradi aplikacije DOX in/ali fulerenola.

#### 4.1.2 Hematološki parametri in aktivnost serumskih encimov

Rezultati meritve hematoloških parametrov so podani v preglednicah 4 in 5. Ob določenih časovnih intervalih so se preverjali naslednji parametri: HCT, nesegmentirani nevtrofilci, segmentirani nevtrofilci, limfociti, eozinofilci, monociti, bazofilci, eritrociti, levkociti in količina Hbg. Merjenje vseh parametrov se je izvedlo pred aplikacijo, 24 ur po aplikaciji in 48 ur po aplikaciji DOX. Dodatne meritve eritrocitov, levkocitov in Hbg so bile izvedene še po 14 dneh.

Preglednica 3: Navedene so referenčne vrednosti za posamezne krvne celice pri prašičih

Parameter	Referenčne vrednosti za prašiče
Hematokrit	0,32-0,47
Nesegmentirani nevtrofilci	0,00-0,04
Segmentirani nevtrofilci	0,28-0,52
Limfociti	0,40-0,64
Eozinofilci	0,01-0,08
Monociti	0,02-0,08
Bazofilci	0,00-0,02
Eritrociti	5,00-8,00
Levkociti	10,00-20,00
Hemoglobin	100-155

Preglednica 4: Hematološki parametri v obdobju 48 ur v isti skupini (eksponenti pred vrednostmi) in v okviru istega časovnega termina 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).

Parameter	Skupina	1	2	3	4	5	6
Hematokrit	I – kontrola	0,29±0,01	0,33±0,04	0,36±0,03	0,39±0,06 <sup>1a</sup>	0,29±0,01 <sup>4a</sup>	0,34±0,06
	II – 24h	<sup>1a</sup> 0,37±0,03	0,38±0,00	0,37±0,01	0,31±0,01 <sup>1a,2a,3a</sup>	0,36±0,04	0,28±0,01 <sup>1b,2b,3b,5a</sup>
	III – 48h	0,32±0,03	0,31±0,01	0,36±0,01	0,29±0,03 <sup>3a</sup>	0,36±0,03 <sup>4a</sup>	0,28±0,01 <sup>3b,5b</sup>
Nesegment. nevtrofilci	I – kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	II – 24h	0,01±0,00	0,00±0,00 <sup>1a</sup>	0,00±0,00 <sup>1a</sup>	<sup>1b</sup> 0,06±0,01 <sup>1c,2c,3c</sup>	0,00±0,00 <sup>1a,4c</sup>	0,00±0,00 <sup>1a,4c</sup>
	III – 48h	0,01±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	<sup>1b</sup> 0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Segment. nevtrofilci	I – kontrola	0,40±0,03	0,62±0,06 <sup>1b</sup>	0,29±0,04 <sup>1a,2c</sup>	0,57±0,03 <sup>1b,3c</sup>	0,39±0,03 <sup>2b,3a,4b</sup>	0,30±0,03 <sup>1a,2c,4c</sup>
	II – 24h	<sup>1a</sup> 0,28±0,04	0,70±0,03 <sup>1c</sup>	0,37±0,03 <sup>1a,2c</sup>	<sup>1b</sup> 0,44±0,06 <sup>1b,2c</sup>	0,34±0,03 <sup>2c,4a</sup>	0,36±0,01 <sup>2c</sup>
	III – 48h	0,30±0,03	<sup>11a</sup> 0,50±0,07 <sup>1b</sup>	<sup>1a,11a</sup> 0,50±0,04 <sup>1b</sup>	<sup>1b,11a</sup> 0,27±0,03 <sup>2b,3b</sup>	<sup>1a,11a</sup> 0,50±0,03 <sup>1b,4b</sup>	0,35±0,03 <sup>2a,3a,5a</sup>
Limfociti	I – kontrola	0,52±0,03	0,32±0,03 <sup>1c</sup>	0,69±0,03 <sup>1b,2c</sup>	0,40±0,01 <sup>1b,2a,3c</sup>	0,54±0,04 <sup>2c,3b,4b</sup>	0,66±0,01 <sup>1b,2c,4c,5b</sup>
	II – 24h	<sup>1b</sup> 0,68±0,03	0,28±0,04 <sup>1c</sup>	<sup>1a</sup> 0,61±0,01 <sup>1a,2c</sup>	<sup>1a</sup> 0,47±0,01 <sup>1c,2c,3b</sup>	0,57±0,01 <sup>1b,2c,4b</sup>	0,62±0,03 <sup>2c,4b</sup>
	III – 48h	<sup>1a,11a</sup> 0,60±0,00	<sup>1a,11a</sup> 0,47±0,03 <sup>1c</sup>	<sup>1b,11b</sup> 0,44±0,01 <sup>1c</sup>	<sup>1c,11b</sup> 0,65±0,01 <sup>1a,2c,3c</sup>	<sup>11a</sup> 0,49±0,01 <sup>1b,4c</sup>	0,62±0,03 <sup>2c,3c,5c</sup>
Eozinofili	I – kontrola	0,04±0,00	0,05±0,01	0,01±0,00 <sup>1b,2b</sup>	0,01±0,01 <sup>1b,2b</sup>	0,06±0,01 <sup>1a,3b,4c</sup>	0,02±0,01 <sup>1a,2b,5b</sup>
	II – 24h	0,03±0,01	<sup>1b</sup> 0,01±0,00 <sup>1a</sup>	0,00±0,00 <sup>1a</sup>	0,01±0,00 <sup>1a</sup>	0,08±0,01 <sup>1b,2c,3c,4c</sup>	0,01±0,00 <sup>1a,5c</sup>
	III – 48h	0,02±0,01	<sup>1b</sup> 0,01±0,00	<sup>1a,11b</sup> 0,05±0,01 <sup>2a</sup>	<sup>1b,11a</sup> 0,06±0,01 <sup>1a,2b</sup>	<sup>11a</sup> 0,03±0,01	0,03±0,01
Monociti	I – kontrola	0,02±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,01
	II – 24h	0,00±0,00	0,01±0,01	0,01±0,00 <sup>1a</sup>	0,01±0,01	0,01±0,00 <sup>1a</sup>	0,01±0,00 <sup>1a</sup>
	III – 48h	<sup>1b,11b</sup> 0,07±0,01	0,02±0,01 <sup>1b</sup>	0,01±0,00 <sup>1c</sup>	0,02±0,01 <sup>1b</sup>	0,01±0,00 <sup>1c</sup>	0,01±0,00 <sup>1c</sup>
Bazofilci	I – kontrola	0,02±0,00	0,00±0,00 <sup>1c</sup>	0,00±0,00 <sup>1c</sup>	0,00±0,00 <sup>1c</sup>	0,00±0,00 <sup>1c</sup>	0,00±0,00 <sup>1c</sup>
	II – 24h	0,00±0,00	0,00±0,00	<sup>1a</sup> 0,02±0,01 <sup>1a,2a</sup>	0,01±0,01 <sup>3a</sup>	0,01±0,00 <sup>1a,2a</sup>	0,00±0,00 <sup>3a,5a</sup>
	III – 48h	0,00±0,00	0,00±0,00	<sup>11a</sup> 0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Preglednica 5: Rezultati eritrocitov, levkocitov in hemoglobina v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti pred vrednostmi) in v okviru istega časovnega termina 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).

Parameter	Skupina	1	2	3	4	5	6
Eritrociti	I - kontrola	3,21±0,04	3,50±0,28	3,65±0,07 <sup>1a</sup>	3,45±0,07	3,44±0,14	3,70±0,06 <sup>1a</sup>
	II - 24h	<sup>1b</sup> 4,10±0,07	<sup>1a</sup> 4,25±0,35	<sup>1c</sup> 6,29±0,14 <sup>1c,2c</sup>	<sup>1b</sup> 4,52±0,14 <sup>3c</sup>	<sup>1c</sup> 5,65±0,06 <sup>1c,2c,3c,4b</sup>	<sup>1b</sup> 4,14±0,08 <sup>3c,5c</sup>
	III - 48h	<sup>1c,11b</sup> 4,73±0,18	<sup>1a</sup> 4,30±0,14 <sup>1a</sup>	<sup>1c</sup> 6,08±0,11 <sup>1c,2c</sup>	<sup>1b</sup> 4,50±0,07 <sup>3c</sup>	<sup>1c</sup> 5,42±0,10 <sup>1b,2c,3b,4c</sup>	3,91±0,04 <sup>1c,2a,3c,4b,5c</sup>
	IV - 14d	<sup>11b,11c</sup> 3,05±0,07	<sup>1a,11b,11c</sup> 2,81±0,14	<sup>1b,11c,11e</sup> 4,30±0,14 <sup>1c,2c</sup>	<sup>1a,11c,11f</sup> 2,76±0,28 <sup>3c</sup>	<sup>1c,11b,11f</sup> 5,10±0,11 <sup>1c,2c,3b,4c</sup>	<sup>1c,11b,11f</sup> 5,20±0,21 <sup>1c,2c,3b,4c</sup>
Levkociti	I - kontrola	9,61±0,13	13,00±0,68 <sup>1c</sup>	15,21±0,27 <sup>1c,2b</sup>	12,07±0,25 <sup>1c,2a,3c</sup>	14,86±0,17 <sup>1c,2b,4c</sup>	14,60±0,14 <sup>1c,2b,4c</sup>
	II - 24h	<sup>1c</sup> 6,20±0,11	<sup>1c</sup> 8,15±0,21 <sup>1c</sup>	<sup>1c</sup> 8,89±0,07 <sup>1c,2b</sup>	<sup>1c</sup> 7,33±0,30 <sup>1b,2b,3c</sup>	<sup>1c</sup> 6,29±0,14 <sup>2c,3c,4b</sup>	<sup>1c</sup> 10,13±0,17 <sup>1c,2c,3c,4c,5c</sup>
	III - 48h	<sup>1c,11b</sup> 6,88±0,11	<sup>1c,11b</sup> 7,09±0,05	<sup>1c,11b</sup> 7,42±0,13	<sup>1c</sup> 7,01±0,16	<sup>1b,11b</sup> 10,37±0,51 <sup>1c,2c,3c,4c</sup>	<sup>1c,11b</sup> 9,38±0,11 <sup>1c,2c,3c,4c,5b</sup>
	IV - 14d	<sup>1c,11a</sup> 6,65±0,15	<sup>1c,11b,11c</sup> 5,58±0,14 <sup>1a</sup>	<sup>1c,11c,11e</sup> 5,62±0,08 <sup>1a</sup>	<sup>1c,11a,11b</sup> 8,11±0,10 <sup>1b,2c,3c</sup>	<sup>1c,11f</sup> 5,48±0,68 <sup>1a,4a</sup>	<sup>1c,11c,11e</sup> 5,48±0,40 <sup>1a,4c</sup>
Hemoglobin	I - kontrola	95,00±2,83	100,50±0,71	102,00±2,83	105,00±7,07	139,00±8,49 <sup>1c,2c,3b,4b</sup>	96,00±7,07 <sup>5c</sup>
	II - 24h	93,00±4,24	102,50±3,54	98,00±11,31	<sup>1b</sup> 140,00±11,31 <sup>1b,2b,3b</sup>	<sup>1a</sup> 115,00±8,49 <sup>1a,4a</sup>	99,50±3,54 <sup>4b</sup>
	III - 48h	99,50±4,95	104,00±5,66	101,50±2,12	<sup>11a</sup> 111,00±4,24 <sup>1a</sup>	<sup>1a</sup> 118,00±4,24 <sup>1b,2a,3b</sup>	103,00±4,24 <sup>3a</sup>
	IV - 14d	101,50±4,95	101,00±5,66	103,00±5,66	<sup>11b</sup> 98,00±2,83	<sup>1a</sup> 111,50±6,36 <sup>4a</sup>	113,00±4,24 <sup>1a</sup>

- Hematokrit

Pri določitvi HCT opazimo razliko že pri meritvah pred injiciranjem, ki so nižje pri prvi in peti skupini, in so pod referenčnimi vrednostmi za prašiče. Po 24 urah pride do značilnega povečanja znotraj prve skupine, ki je lahko posledica sekundarne dehidracije, ki jo je povzročilo bruhanje. Enak trend rezultatov so potrdili Injac s sodelavci pri raziskavah na podganah [42]. HCT je namreč razmerje med volumnom krvnih celic in celotnim volumnom krvi. Pri drugih skupinah znotraj 48 urnega spremljanja ni značilnih razlik. Značilno znižanje se kaže v skupinah, ki sta prejeli samo fulerenol glede na tretjo skupino, tako 24, kot tudi 48 ur po aplikaciji. Znižanja HCT lahko povzroči anemija, izguba krvi, razgradnja eritrocitov, levkemija in revmatoidni artritis [10].

- Nesegmentirani nevtrofilci

Značilna razlika se kaže samo 24 ur po aplikaciji v četrti skupini tako glede na rezultate pred aplikacijo kot med skupinami. Povečani nevtrofilci kažejo na vnetni proces, ki je lahko posledica i.p. aplikacije fulerenola, predvsem neraztopljenega dela [24, 43]

- Segmentirani nevtrofilci

Razliko opazimo že pri meritvah pred aplikacijo, in sicer pri drugi in četrti skupini, kjer so vrednosti povišane glede na ostale skupine in so nad referenčnimi vrednostmi za prašiče. Nekoliko nižje, na spodnji meji referenčnih, pa so vrednosti v tretji in šesti skupini.

Značilno znižanje se kaže znotraj četrte skupine. Do povišanja pa pride v tretji in peti skupini. Pri meritvah, opravljenih 24 ur po aplikaciji, je v drugi skupini v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami opaziti značilno višje vrednosti. Povišane vrednosti nevtrofilcev pri aplikaciji DOX v kombinaciji s fulerenolom so opazili tudi že pri raziskavah na podganah [24]. Po 48 urah pa so druga, tretja in peta skupina med seboj primerljive, medtem, ko so pri ostalih skupinah vrednosti nižje.

Povišanje nevtrofilcev se kaže pri akutni toksičnosti DOX [43]. Nevtrofilci so obrambni mehanizem v začetni stopnji akutne vnetne reakcije, ki jo lahko povzročijo bakterije, okoljski dejavniki in nekatere vrste rakavih obolenj. Navadno so prvi odziv na mikrobnno infekcijo ali tujek.

- Limfociti

V času trajanja eksperimenta je prišlo do znižanja vrednosti v tretji in peti skupini. Do porasta pa je prišlo v prvi, drugi in četrti skupini. V šesti skupini ni značilnih razlik. Med skupinami so velike razlike že pri določitvi limfocitov v krvi, pred aplikacijo. Kljub veliki variabilnosti med skupinami pa je zaznati, da je v četrti skupini, ki je prejela fulerenol i.p. prišlo po 48 urah do povečanja, ki je značilno večje v primerjavi z drugimi skupinami, o čemer so poročali že pri raziskavah na podganah [33].

- Eozinofilci

Pri meritvah pred aplikacijo so rezultati v prvi, drugi in peti skupini značilno višji od ostalih skupin. Tekom testiranja se število v prvi in šesti skupini ne spremeni. V drugi skupini število pade po 24 urah in ostane na enaki ravni tudi po 48 urah. V tretji in četrti skupini število po 48 urah naraste. V peti skupini pa število po 24 urah naraste, nato pa znatno pade.

- Monociti

Značilno povečanje se kaže v prvi skupini 48 ur po aplikaciji. Med ostalimi skupinami ni značilnih razlik v vseh časovnih točkah.

- Bazofilci

Pri meritvah bazofilcev ni značilnih razlik.

- Eritrociti

Do značilnega povečanja, znotraj 48 ur, pride v vseh skupinah. Število eritrocitov je v vseh skupinah, tako po 24 urah, kot po 48 urah značilno nižje kot pri tretji (kontrolni) skupini. Po 14 dneh je zaznati padec v vseh skupinah. Število eritrocitov v peti in šesti skupini je značilno večje ( $p < 0,01$ ) v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je v prvi, drugi in četrti značilno manjše ( $p < 0,001$ ). Zmanjšanje eritrocitov v skupinah, ki so prejele DOX in i.p. fulerenol, navajajo tudi avtorji, ki so izvedli raziskave na podganah [43]. Veliko raziskav priča o pomembni vlogi železa pri pojavu toksičnih učinkov DOX. Antraciklini zavirajo mobilizacijo železa iz feritina. Pride do akumulacije kompleksa feritin-železo. Zaradi nastanka tega kompleksa so lahko vrednosti za železo normalne, ostali biooznačevalci pa kažejo na potencialno anemijo [42].

- Levkociti

Pri vseh skupinah je zaznati znaten padec števila levkocitov. Po dveh dneh je najnižja vrednost levkocitov v skupini, ki je prejela DOX, o čemer so poročali že drugi avtorji [5, 42]. Po 14 dnevih, je število še vedno nekoliko povečano pri skupini, ki je prejela DOX in pri skupini, ki je prejela i.p. fulerenol. Povečano število levkocitov kaže na imuski odziv živali, ki so prejele DOX oziroma i.p. fulerenol [43].

- Hemoglobin

Pri peti skupini je bila začetna vrednost višja v primerjavi s kontrolno skupino.

V četrti skupini je znotraj eksperimentalnega časa zaznati najprej znaten porast, nato pa padec Hbg. Znaten padec je zaznati tudi znotraj pete skupine.

V preglednicah 6 - 11 so predstavljeni rezultati analiz serumskih encimov, ki so bile prav tako narejene 2 uri, 24 ur, 48 ur in 14 dni po aplikaciji.

Pred aplikacijo so bile pri vseh skupinah opravljene analize, ki niso kazale značilnih razlik med skupinami.



Preglednica 6: Rezultati kreatinin-kinaze (CK) v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Časovnica Skupina	CK enot/L			
	I 2 uri po aplikaciji	II 24 ur po aplikaciji	III 48 ur po aplikaciji	IV 14 dni po aplikaciji
1	19,32±1,16	16,05±1,50	7,46±1,12	350,15±37,00 <sup>1c,1lc,1llc</sup>
2	<sup>1c</sup> 571,62±30,31	15,04±0,23 <sup>1c</sup>	<sup>1a</sup> 13,40±0,69 <sup>1c</sup>	<sup>1c</sup> 110,53±13,63 <sup>1c,1lb,1llb</sup>
3	<sup>2c</sup> 6,92±0,45	<sup>1c,2c</sup> 9,61±0,81 <sup>1a</sup>	<sup>2a</sup> 7,82±1,12	<sup>1c,2b</sup> 5,81±0,61 <sup>1la</sup>
4	<sup>1b,2c,3c</sup> 96,09±5,94	<sup>1c,2c</sup> 9,86±0,03 <sup>1c</sup>	<sup>2a</sup> 8,92±0,23 <sup>1c</sup>	<sup>1c,2b</sup> 3,41±1,61 <sup>1c</sup>
5	<sup>2c,4b</sup> 19,86±1,24	<sup>1c,2c,3b,4c</sup> 4,79±0,25 <sup>1c</sup>	<sup>1b,3a,4a</sup> 14,27±0,43 <sup>1b,1lc</sup>	<sup>1c,2b</sup> 9,43±0,77 <sup>1c,1lb,1llb</sup>
6	<sup>2c,4c</sup> 5,11±0,32	<sup>1c,2c,3a,4a,5b</sup> 7,46±0,14	<sup>1c,2c,3c,4c,5c</sup> 53,49±3,92 <sup>1c,1lc</sup>	<sup>1c,2b</sup> 5,17±0,79 <sup>1llc</sup>

Dve uri po aplikaciji pride do znatnega povečanja pri drugi in četrti skupini, po 24 urah pa je pri obeh skupinah zaznati drastičen padec. Značilen padec je tudi v peti skupini. Po 24 urah je vsebnost CK v prvi in drugi skupini značilno večja v primerjavi z ostalimi skupinami, v peti in šesti, pa značilno manjša. 48 ur po aplikaciji koncentracija v peti in šesti skupini močno naraste, medtem, ko v ostalih skupinah nekoliko pade glede na 24 ur. Med skupinami je najvišja koncentracija pri šesti skupini. Po 14 dneh koncentracija močno naraste v prvi skupini. Do porasta pride tudi v drugi skupini. V ostalih skupinah se vrednosti glede na 48 ur znižajo. Po 14 dneh je največja koncentracija v prvi skupini in nekoliko manjša v drugi skupini glede na kontrolno.

CK je encim, katerega povečanje kaže na bolezn srca. Povišane vrednosti tega encima so prisotne ob miokardnem infarktu, akutni cerebrovaskularni bolezn in boleznih skeletne miškulature [42]. Rezultati potrjujejo kardiotoksičnost DOX in protektivni učinek fulerenola tako ob i.p. kot peroralni aplikaciji.

Preglednica 7: Rezultati ALT v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Časovnica Skupina	ALT enot/L			
	I 2 uri po aplikaciji	II 24 ur po aplikaciji	III 48 ur po aplikaciji	IV 14 dni po aplikaciji
1	4,83±0,08	10,36±0,28 <sup>lc</sup>	3,10±0,13 <sup>lb,IIc</sup>	7,34±0,40 <sup>lb,IIc,IIIc</sup>
2	<sup>1c</sup> 33,51±3,19	<sup>1b</sup> 12,37±0,57 <sup>lc</sup>	<sup>1a</sup> 7,51±0,54 <sup>lc,IIa</sup>	7,26±0,35 <sup>lc,IIa</sup>
3	<sup>2c</sup> 6,43±0,49	<sup>1c,2b</sup> 7,44±0,42 <sup>la</sup>	<sup>1b</sup> 8,12±0,04 <sup>lb</sup>	8,23±0,26 <sup>lb</sup>
4	<sup>1b,2c,3a</sup> 10,00±0,23	<sup>1c,2c</sup> 8,03±0,13 <sup>lb</sup>	<sup>3a</sup> 4,59±0,64 <sup>lc,IIb</sup>	8,53±0,42 <sup>la,IIIb</sup>
5	<sup>1b,2c,3a</sup> 11,32±0,70	<sup>1c,2c,4a</sup> 7,08±0,25 <sup>la</sup>	<sup>1c,2c,3c,4c</sup> 34,31±1,73 <sup>lc,IIc</sup>	<sup>1c,2c,3b,4b</sup> 11,72±1,03 <sup>IIb,IIIc</sup>
6	<sup>2c,5a</sup> 7,46±0,21	<sup>1c,2c,3b,4b,5a</sup> 6,10±0,16	<sup>1c,2c,3c,4c,5c</sup> 57,06±2,61 <sup>lc,IIc</sup>	<sup>1a,2a,3b,4b,5c</sup> 5,48±0,32 <sup>IIIc</sup>

Dve uri po aplikaciji pride do znatnega povečanja ALT v drugi skupini. Po 24 urah pride do porasta v prvi skupini in do padca v drugi. V ostalih skupinah ni značilnih razlik. Med skupinami, znotraj 24 ur, je nekoliko povečana vsebnost v prvi in drugi skupini, v šesti pa znižana v primerjavi s kontrolno. Velik porast se po 48 urah kaže v peti in šesti skupini, v prvi, drugi in četrti skupini pa je prišlo do padca. Vrednosti pete in šeste skupine so značilno višje v primerjavi s tretjo, vrednosti prve in četrte pa nekoliko nižje. Po 14 dneh ostane nivo v drugi in tretji skupini primerljiv z nivojem po 48 urah, v prvi in četrti nekoliko naraste, v peti in šesti pa znatno pade. Koncentracija v peti skupini je znatno višja, v šesti pa znatno nižja v primerjavi z ostalimi skupinami.

ALT je indikator poškodb hepatocitov. Ob poškodbah pride do njegovega porasta. ALT v začetni fazi (do 24 ur) najbolj poraste ob i.p. aplikaciji samega DOX ali v kombinaciji s fulerenolom medtem, ko ima peroralno apliciran fulerenol pozitiven učinek in zmanjša koncentracijo ALT. Kot kažejo rezultati po 48 urah, ni več zaznati učinka tako DOX kot fulerenola, ki sta bila aplicirana i.p.. Kaže pa se povečanje vrednosti ALT ob peroralni aplikaciji fulerenola kot tudi v kombinaciji z DOX. Po 14 dneh je koncentracija, pri peroralno apliciranem fulerenolu v kombinaciji z DOX, še vedno povečana, pri skupini, ki je prejela samo peroralno fulerenol, pa se koncentracija zniža.

Preglednica 8: Rezultati AST v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Časovnica Skupina	AST enot/L			
	I 2 uri po aplikaciji	II 24 ur po aplikaciji	III 48 ur po aplikaciji	IV 14 dni po aplikaciji
1	12,27±0,35	15,46±0,57 <sup>lb</sup>	13,02±0,14 <sup>llb</sup>	13,22±0,29 <sup>llb</sup>
2	<sup>1c</sup> 18,03±0,19	14,62±0,50 <sup>lc</sup>	12,26±0,16 <sup>lc, llb</sup>	<sup>1b</sup> 11,01±0,20 <sup>lc, llc, IIIa</sup>
3	<sup>2b</sup> 13,22±0,24	15,90±0,23 <sup>lb</sup>	14,82±0,21 <sup>la, IIIa</sup>	<sup>2b</sup> 13,39±0,57 <sup>llb, IIIa</sup>
4	<sup>1c, 2c, 3c</sup> 32,25±1,56	<sup>1c, 2c, 3c</sup> 24,71±1,77 <sup>lb</sup>	<sup>2a</sup> 16,07±0,69 <sup>lc, llb</sup>	<sup>1c, 2c, 3c</sup> 25,57±0,83 <sup>lb, IIIb</sup>
5	<sup>1c, 2b, 3c, 4c</sup> 20,88±0,47	<sup>1b, 2b, 3b, 4c</sup> 11,24±0,25 <sup>lb</sup>	<sup>1c, 2c, 3c, 4c</sup> 58,06±3,29 <sup>lc, llc</sup>	<sup>1c, 2c, 3c, 4c</sup> 19,87±0,22 <sup>llb, IIIc</sup>
6	<sup>2c, 4c, 5c</sup> 12,56±0,40	<sup>1b, 2a, 3b, 4c</sup> 11,52±0,58	<sup>1c, 2c, 3c, 4c, 5b</sup> 51,55±1,09 <sup>lc, llc</sup>	<sup>1c, 2a, 3c, 4c, 5c</sup> 9,51±0,54 <sup>la, IIIa, IIIc</sup>

Dve uri po aplikaciji je značilno višja koncentracija AST opazna v drugi, četrti in peti skupini glede na ostale skupine, med katerimi ni značilnih razlik. Po 24 urah je najbolj značilen padec pri drugi, četrti in peti skupini, medtem ko pride v prvi in tretji skupini do zvišanja koncentracije. Med skupinami je statistično pomembna razlika v četrti skupini, kjer je koncentracija višja, ter v peti in šesti, kjer je koncentracija nižja glede na ostale skupine. Po 48 urah je opazen porast v peti in šesti skupini, ter nekoliko manj značilen padec pri ostalih skupinah. Koncentracija v peti in šesti skupini je značilno večja glede na ostale skupine. 14 dni po aplikaciji opazimo padec pri peti in šesti skupini ter nekoliko manj značilno povišanje pri četrti skupini. Najvišji koncentraciji sta v skupinah štiri in pet. Skupini dve in šest pa imata nekoliko nižjo vrednost v primerjavi s kontrolno skupino. Tudi AST je indikator poškodb hepatocitov kot tudi poškodb srca.

Preglednica 9: Razmerje ALT/AST v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Časovnica Skupina	ALT/AST			
	I 2 uri po aplikaciji	II 24 ur po aplikaciji	III 48 ur po aplikaciji	IV 14 dni po aplikaciji
1	0,37±0,02	0,67±0,04 <sup>lb</sup>	0,27±0,06 <sup>llb</sup>	0,59±0,03 <sup>lb, IIIb</sup>
2	<sup>1c</sup> 1,94±0,04	<sup>1b</sup> 0,85±0,07 <sup>lc</sup>	<sup>1c</sup> 0,66±0,03 <sup>lc, IIIa</sup>	0,67±0,05 <sup>lc, IIIa</sup>
3	<sup>1a, 2c</sup> 0,47±0,03	<sup>1b, 2c</sup> 0,49±0,01	<sup>1b, 2a</sup> 0,53±0,04	0,66±0,06 <sup>la, IIIa, IIIa</sup>
4	<sup>2c, 3b</sup> 0,33±0,04	<sup>1c, 2c, 3b</sup> 0,31±0,01	<sup>2c, 3b</sup> 0,23±0,04 <sup>la</sup>	<sup>1b, 2b, 3b</sup> 0,38±0,05 <sup>IIIa</sup>
5	<sup>1b, 2c, 3a, 4c</sup> 0,57±0,01	<sup>2b, 4b</sup> 0,58±0,04	<sup>1c, 4c</sup> 0,60±0,01	<sup>4b</sup> 0,60±0,03
6	<sup>1c, 2c, 3b, 4c, 5a</sup> 0,66±0,06	<sup>1b, 2c, 4b, 5a</sup> 0,47±0,04 <sup>la</sup>	<sup>1c, 2c, 3c, 4c, 5c</sup> 1,07±0,08 <sup>lb, llc</sup>	<sup>4b</sup> 0,57±0,02 <sup>IIIb</sup>

Dve uri po aplikaciji pride do povišanega razmerja ALT/AST v drugi, peti in šesti skupini. Zmanjšanje pa je opaziti pri prvi in četrti. Po 24 urah se razmerje v drugi skupini glede na 2 uri zniža, vendar je še vedno značilno večje v primerjavi s kontrolno skupino. Tudi razmerje v šesti skupini se zniža in ni značilno drugačno od kontrolne skupine. Razmerje v četrti skupini, ki je prejela fulerenol i.p., je tekom celotnega eksperimenta znižano glede na kontrolno skupino. Po 48 urah se značilno poveča razmerje v šesti skupini, ki je prejela fulerenol peroralno kar kaže na neugodno delovanje peroralno apliciranega fulerenola po 48 urah na jetra. Po 14 dneh ni značilnih razlik med skupinami z izjemo četrte skupine.

Povečanje, tako ALT, kot AST kaže na poškodbe jeter, medtem, ko samo povečanje AST, brez sprememb v ALT, kaže na poškodbe srca. Razmerje med ALT in AST je normalno pod ena. Vrednosti nad ena pa kažejo na vnetni proces v jetrih [24, 42].

Razmerje nad ena se kaže dve uri po aplikaciji v skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred DOX in 48 ur po peroralni aplikaciji fulerenola. Povišano razmerje v šesti skupini šele po 48 urah kaže na počasno absorpcijo peroralno apliciranega fulerenola, kar povzroči zamik v njegovih učinkih na jetra.

Preglednica 10: Rezultati LDH v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

		LDH U/L			
Časovnica		I	II	III	IV
Skupina		2 uri po aplikaciji	24 ur po aplikaciji	48 ur po aplikaciji	14 dni po aplikaciji
1		665,93±48,19	1014,63±136,29 <sup>1a</sup>	612,80±17,26 <sup>11b</sup>	457,19±54,89 <sup>11b</sup>
2	<sup>1c</sup>	1112,92±18,27	<sup>1b</sup> 600,41±16,13 <sup>1c</sup>	743,08±25,57 <sup>1c,11b</sup>	442,14±19,61 <sup>1c,11b,111c</sup>
3	<sup>2c</sup>	579,97±42,38	<sup>1b</sup> 626,25±38,53	827,73±324,88	<sup>2a</sup> 536,47±43,08
4	<sup>1c,3c</sup>	1059,86±58,19	<sup>2b,3b</sup> 901,39±30,56 <sup>1a</sup>	762,28±53,34 <sup>1b,11a</sup>	<sup>1b,2b</sup> 597,21±17,26 <sup>1c,11b,111a</sup>
5	<sup>1b,2b,3b,4b</sup>	855,13±64,88	<sup>1b,4b</sup> 685,90±22,78 <sup>1a</sup>	<sup>1a</sup> 1012,86±13,94 <sup>1a,11b</sup>	<sup>1b,2b,3a</sup> 621,20±21,49 <sup>1b,111c</sup>
6	<sup>1c,3c,5b</sup>	1063,76±7,42	<sup>1a,2a,3a</sup> 787,89±24,20 <sup>1c</sup>	<sup>1b,2b,3a,4b</sup> 1334,34±23,57 <sup>1c,11c</sup>	<sup>1c,2c,3c,4b,5b</sup> 767,60±19,23 <sup>1c,111c</sup>

Dve uri po aplikaciji je značilno povečanje LDH v drugi, četrti in šesti skupini glede na kontrolno. Po 24 urah pride do porasta v prvi skupini in do padca v drugi ter četrti, peti in šesti skupini, vendar je ta manj značilen. Koncentracija v prvi in četrti skupini je močno povečana glede na kontrolno skupino. Po 48 urah zaznamo padec v prvi skupini in porast v peti, ter še značilnejši v šesti skupini. Po 14 dneh pride v vseh skupinah do padca. Najvišja koncentracija je v šesti skupini, najnižja pa pri drugi.

Povečanje se kaže po 2 urah v vseh skupinah, razen v skupini, ki je prejela samo DOX. V tej skupini pride do povečanja šele po 24 urah. Po 24 urah se opazi pozitiven učinek delovanja fulerenola v kombinaciji z DOX, saj se koncentracija LDH v primerjavi s skupino, ki je prejela samo DOX, močno zniža.

Po 48 urah je zaznati povečano količino LDH pri skupinah, ki sta peroralno prejeli fulerenol, kar kaže na neželene učinke na srce in jetra, ob peroralni aplikaciji fulerenola.

Povečana količina LDH znotraj 24 ur pri skupini, ki je prejela DOX in znižane vrednosti pri skupini, ki je pred DOX prejela fulerenol, so bile pričakovane in potrjene že s prejšnjimi raziskavami, ki so jih Injac in sodelavci opravili na podganah [44].

Največje vrednosti se kažejo v skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred aplikacijo DOX in v skupini, ki je prejela peroralno fulerenol po 48 urah. Rezultati nakazujejo, da enake posledice povzroči i.p. aplikacija fulerenola pred DOX, kakor tudi peroralna aplikacija fulerenola le, da te nastanejo kasneje zaradi počasne absorpcije in s tem povezanega kasnejšega učinka. Povečana količina LDH kaže na miokardni infarkt, odpoved ledvic, hepatitis, anemijo, maligna obolenja in okvare skeletnih mišic.

Preglednica 11: Rezultati  $\alpha$ -HBDH v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

		$\alpha$ -HBDH U/L			
Časovnica		I	II	III	IV
Skupina		2 uri po aplikaciji	24 ur po aplikaciji	48 ur po aplikaciji	14 dni po aplikaciji
1		478,70±30,13	558,07±11,41	575,13±70,53	603,24±4,57 <sup>1a</sup>
2		<sup>1c</sup> 1842,43±60,01	<sup>1b</sup> 474,80±14,42 <sup>1c</sup>	541,35±8,97 <sup>1c</sup>	<sup>1b</sup> 525,01±28,30 <sup>1c</sup>
3		<sup>2c</sup> 424,98±35,39	<sup>1c</sup> 444,38±6,53	<sup>1a,2a</sup> 768,73±160,83 <sup>1a,11a</sup>	<sup>1c</sup> 488,62±14,69 <sup>11a</sup>
4		<sup>2c,3a</sup> 545,17±15,32	<sup>1a,2a,3b</sup> 513,70±18,81	<sup>3a</sup> 484,61±26,01 <sup>1a</sup>	<sup>1b</sup> 506,95±6,99
5		<sup>2c,3b</sup> 547,10±15,41	<sup>1c,2a,4b</sup> 429,56±21,84 <sup>1a</sup>	<sup>1b,2b,3a,4b</sup> 991,67±47,14 <sup>1c,11c</sup>	<sup>1c</sup> 484,78±18,70 <sup>11c</sup>
6		<sup>1c,2c,3c,4b,5b</sup> 706,77±8,15	<sup>2b,3b,5c</sup> 544,00±15,56 <sup>1b</sup>	<sup>1c,2c,3c,4c,5b</sup> 1476,89±57,82 <sup>1c,11c</sup>	<sup>1c</sup> 488,67±15,08 <sup>1b,11c</sup>

Največja razlika v koncentraciji  $\alpha$ -HBDH glede na ostale skupine se kaže v drugi skupini, dve uri po aplikaciji in v peti, ter šesti skupini po 48 urah. Povečana koncentracija  $\alpha$ -HBDH v šesti skupini se ponovno kaže z zamikom, ki ga povzroči počasna absorpcija peroralno apliciranega fulerenola, medtem ko se povečana koncentracija v drugi skupini, kaže že po 2 urah.

Povečano količino  $\alpha$ -HBDH pri skupinah, ki sta peroralno prejeli fulerenol ter pri skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred DOX, kaže na neželene učinke na srce ali jetra ob peroralni aplikaciji fulerenola ter i.p. aplikaciji fulerenola in DOX.

Preglednica 12: Razmerje  $\alpha$ -HBDH/LDH v obdobju 14 dni v isti skupini (eksponenti po vrednostih) in v okviru istega časovnega termina med skupinami (eksponenti pred vrednostmi). Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Časovnica	$\alpha$ -HBDH/LDH			
	I	II	III	IV
Skupina	2 uri po aplikaciji	24 ur po aplikaciji	48 ur po aplikaciji	14 dni po aplikaciji
1	0,71±0,01	0,61±0,01	0,84±0,05 <sup>1a,11b</sup>	1,41±0,06 <sup>1c,11c,11c</sup>
2	0,62±0,04	<sup>1a</sup> 0,73±0,04	0,76±0,06 <sup>1a</sup>	<sup>1a</sup> 1,30±0,04 <sup>1c,11c,11c</sup>
3	0,63±0,04	0,69±0,02	0,82±0,02 <sup>1b,11a</sup>	<sup>1c,2c</sup> 0,87±0,04 <sup>1b,11b</sup>
4	<sup>1a</sup> 0,56±0,06	<sup>2b,3a</sup> 0,59±0,02	<sup>1a,3a</sup> 0,67±0,04	<sup>1c,2c</sup> 0,88±0,06 <sup>1b,11b,11a</sup>
5	0,63±0,04	<sup>2a</sup> 0,61±0,01	<sup>1a,2b,3a,4b</sup> 0,97±0,04 <sup>1b,11b</sup>	<sup>1c,2c,4a</sup> 0,77±0,04 <sup>1a,11a,111b</sup>
6	0,64±0,05	<sup>2a</sup> 0,65±0,06	<sup>1b,2c,3b,4c,5a</sup> 1,10±0,07 <sup>1b,11b</sup>	<sup>1c,2c,3b,4b</sup> 0,67±0,04 <sup>111b</sup>

Dve uri po aplikaciji je nekoliko znižano razmerje v četrti skupini kar se kaže tudi po 24 urah. Po 48 urah se razmerje v vseh skupinah poveča. Najbolj značilno v prvi, peti in šesti skupini. Glede na kontrolno skupino je razmerje povečano v peti in šesti skupini, ter znižano v četrti skupini. 14 dni po aplikaciji se razmerje znatno poveča v prvi in drugi skupini in značilno zmanjša v peti in šesti skupini. Razmerje v prvi in drugi skupini je znatno večje, kot v kontrolni skupini ter nekoliko manj značilno znižano v šesti skupini.

Največje spremembe v razmerju je zaznati 48 ur po peroralni aplikaciji fulerenola. Razmerje se je v primerjavi z drugimi skupinami in prejšnjimi intervali močno povečalo tako pri skupini, ki je prejela samo fulerenol, kot tudi pri drugi skupini, ki je poleg fulerenola prejela še DOX. Po 14 dneh pa je povečano razmerje opaziti pri skupini, ki je prejela samo DOX oz. DOX v kombinaciji z i.p. fulerenolom. Razmerje je v drugi skupini nekoliko nižje kar kaže na antioksidativni učinek fulerenola.

Glede na razmerje med  $\alpha$ -HBDH/LDH lahko določimo ali gre za poškodbe srca, ali za poškodbe jeter. Znižano razmerje kaže na poškodbe jeter [24].

Povišano razmerje v peti in šesti skupini po 48 urah nakazuje na poškodbe srca ali ledvic [25, 28]. Glede na rezultate pa je zaznati poškodbe srca/ledvic po 14 dneh v skupini, ki je prejela sam DOX in v kombinaciji z i.p. aplikacijo fulerenola [25, 28].

#### 4.1.3 Oksidativni stres

- Jetra

Preglednica 13: Parametri oksidativnega stresa v jetrih. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Skupina	LDH (U/L)	TP g/L	GR U/g TP	GSH-Px U/g TP	SOD U/mg TP	CAT U/mg TP
1	1298,2±216,5	6,5±1,2	16,4±3,6	93,5±27,3	4,6±0,2	0,0035±0,0003
2	1577,1±23,0	6,5±0,5	15,6±1,8	147,4±7,5 <sup>1a</sup>	4,2±0,1	0,0087±0,0012 <sup>1c</sup>
3	1407,4±36,3	9,4±0,7 <sup>1a,2a</sup>	10,8±1,3	109,7±10,5 <sup>2a</sup>	2,5±0,3 <sup>1c,2c</sup>	0,0034±0,0004 <sup>2c</sup>
4	1786,8±34,0 <sup>1b,3a</sup>	7,3±0,3	13,7±0,2	142,9±20,2 <sup>1a</sup>	3,3±0,3 <sup>1c,2b,3a</sup>	0,0022±0,0004 <sup>2c</sup>
5	1688,2±167,4 <sup>1a</sup>	7,8±2,2	13,9±6,3	85,0±3,3 <sup>2b,4b</sup>	3,3±0,2 <sup>1c,2b,3a</sup>	0,0046±0,0006 <sup>2b,4b</sup>
6	1762,2±65,0 <sup>1b,3a</sup>	8,1±0,4	11,6±1,6	151,7±6,9 <sup>1b,3a,5b</sup>	2,9±0,2 <sup>1c,2c</sup>	0,0060±0,0003 <sup>1b,2b,3b,4b</sup>

Do značilnega povečanja LDH je prišlo v četrti in šesti skupini. Pri ostalih skupinah ni statistično značilnih razlik glede na kontrolno skupino. Koncentracija celokupnih proteinov (TP) je v prvi in drugi skupini nekoliko znižana glede na kontrolno skupino. Pri koncentraciji GR med skupinami ni razlik, se pa kaže značilno povečanje koncentracije GSH-Px v drugi in šesti skupini.

Prva in druga skupina kažeta znatno povečanje SOD ( $p < 0,001$ ), četrta in peta pa nekoliko manjše povečanje ( $p < 0,05$ ), glede na kontrolno skupino. Povečana koncentracija SOD kaže na oksidativni stres, povzročen z DOX. Koncentracija SOD je v drugi skupini nekoliko nižja kot v prvi, kar kaže na antioksidativni učinek i.p. apliciranega fulerenol pred aplikacijo DOX. Do enakih zaključkov so prišli pri raziskavah na podganah [24].

Prišlo je tudi do značilnega povečanja CAT pri drugi skupini ( $p < 0,001$ ) in do manj značilnega povečanja pri šesti skupini ( $p < 0,01$ ) glede na kontrolno skupino.

Predstavljeni rezultati pa ne potrjujejo predhodno objavljenih rezultatov raziskav opravljenih na podganah, razen rezultati za SOD [43]. Koncentracije encimov, katerih povečana koncentracija je pokazatelj oksidativnega stresa, pri naših rezultatih ni povečana, razen koncentracije SOD. Ostali pokazatelji oksidativnega stresa ne kažejo povečanih koncentracij v skupini, ki je prejela DOX, glede na kontrolno skupino. Pri navedenih

rezultatih prev tako nismo uspeli potrditi antioksidativnega učinka predhodno apliciranega fulerenola. Se pa v rezultatih nakazuje oksidativni učinek peroralno apliciranega fulerenola.

- Pljuča

Preglednica 14: Parametri oksidativnega stresa v pljučih. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Skupina	LDH (U/L)	TP g/L	GR U/g TP	GSH-Px U/g TP	SOD U/mg TP	CAT U/mg TP
1	590,4±235,0	3,2±2,0	25,8±17,6	15,5±15,5	10,2±0,5	0,0071±0,0004
2	1517,8±26,8 <sup>1c</sup>	3,5±0,6	15,3±1,6	97,9±14,5 <sup>1a</sup>	8,1±0,0 <sup>1b</sup>	0,0235±0,0025 <sup>1c</sup>
3	1552,8±48,4 <sup>1c</sup>	2,9±1,8	25,2±15,5	107,5±46,9 <sup>1a</sup>	10,5±0,7 <sup>2c</sup>	0,0139±0,0019 <sup>1b,2c</sup>
4	1600,3±45,3 <sup>1c</sup>	5,4±1,3	8,2±2,1	36,3±1,6	5,3±0,4 <sup>1c,2c,3c</sup>	0,0108±0,0005 <sup>1a,2c</sup>
5	1646,0±49,5 <sup>1c</sup>	8,8±3,0 <sup>1a,2a,3a</sup>	6,1±0,7	28,2±12,2	3,1±0,1 <sup>1c,2c,3c,4b</sup>	0,0079±0,0006 <sup>2c,3b</sup>
6	1745,7±61,2 <sup>1c</sup>	3,9±1,5 <sup>3a</sup>	17,5±6,9	141,6±62,8 <sup>1b,4a,5a</sup>	8,1±0,2 <sup>1b,3b,4c,5c</sup>	0,0151±0,0008 <sup>1b,2b,4a,5b</sup>

Znatno znižanje LDH, GSH-Px in CAT se vidi v prvi skupini, ki je prejela DOX. Znižanje CAT se kaže tudi v peti skupini, do povišanja pa je prišlo v drugi skupini glede na kontrolno. Rezultati meritev GR ne kažejo razlik med skupinami. Povečanje TP se kaže pri peti skupini (p < 0,05). SOD je statistično značilno zmanjšana pri drugi, četrti in peti skupini (p < 0,001) in nekoliko manj značilno pri šesti skupini (p < 0,01).

V našem primeru ne moremo potrditi predhodnih študij na podganah, kjer je pri aplikaciji DOX prišlo do znatnega povečanja LDH, ki je najpogosteje uporabljen pokazatelj oksidativnega stresa [23]. Se pa tudi pri nas zazna znižanje GSH-Px, ki ga navajajo, v prej omenjeni študiji. Znižanje GSH-Px je verjetno posledica nižje vsebnosti GSH, ki je kofaktor tega encima. Pomanjkanje GSH in posledično manjša aktivnost GSH-Px še dodatno povečata verjetnost poškodb zaradi oksidativnega stresa [13].

Ostali rezultati ne potrjujejo oksidativnega stresa povzročenega z DOX oziroma antioksidativnega učinka fulerenola.



- Ledvica

Preglednica 15: Parametri oksidativnega stresa v ledvicah. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Skupina	LDH (U/L)	TP g/L	GR U/g TP	GSH-Px U/g TP	SOD U/mg TP	CAT U/mg TP
1	447,8±47,6	6,7±3,6	15,6±8,9	137,2±69,2	4,3±0,7	0,0046±0,0003
2	799,9±140,5 <sup>1a</sup>	8,6±1,6	11,7±1,5	116,8±26,1	3,0±0,1 <sup>1a</sup>	0,0089±0,0009 <sup>1c</sup>
3	222,8±160,2 <sup>2b</sup>	5,5±1,1	18,9±3,0	177,7±3,9	4,4±0,3 <sup>2b</sup>	0,0084±0,0003 <sup>1b</sup>
4	736,3±0,2 <sup>1a,3b</sup>	6,6±3,4	12,1±7,8	179,9±68,9	4,4±0,4 <sup>2b</sup>	0,0117±0,0006 <sup>1c,2b,3b</sup>
5	574,4±111,1 <sup>3a</sup>	11,9±6,9	9,0±4,6	75,2±45,9	2,2±0,2 <sup>1b,3b,4b</sup>	0,0058±0,0004 <sup>2b,3b,4c</sup>
6	346,0±130,4 <sup>2b,4a</sup>	8,0±0,8	10,1±0,3	149,5±1,2	3,7±0,3 <sup>5b</sup>	0,0076±0,0006 <sup>1b,4c,5a</sup>

Pri koncentracijah TP, GR in GSH-PX ni značilnih razlik med skupinami. Znatno povečanje LDH se kaže v drugi in četrti skupini, ter nekoliko manjše pri peti skupini. Ostale skupine so primerljive s kontrolno. V peti skupini zaznamo znižanje, tako SOD, kot CAT. SOD je znižana tudi v drugi skupini, CAT pa v prvi. Do povečanja CAT pa je prišlo v četrti skupini.

Yagmurca in sodelavci navajajo, da pride ob enkratni aplikaciji DOX do znižanja CAT in GSH-Px. Navajajo raziskavo, pri kateri je enkratna aplikacija DOX povzročila proteinurijo in glomerulosklerozo, aktivnost CAT, SOD in nivo GSH pa se je znižal [27].

Znatno znižanje SOD pri skupinah, ki sta pred aplikacijo DOX prejeli fulerenol, potrjuje njegovo antioksidativno delovanje. Tudi predhodni rezultati eksperimentov izvedenih na podganah navajajo povzročitev oksidativnega stresa z DOX in antioksidativno delovanje fulerenola [28].

- Srce

Preglednica 16: Parametri oksidativnega stresa v srcu. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Skupina	LDH (U/L)	TP g/L	GR U/g TP	GSH-Px U/g TP	SOD U/mg TP	CAT U/mg TP
1	6,4±1,5	2,1±0,2	10,4±1,2	37,3±6,2	15,3±1,0	0,0009±0,0001
2	4,55±1,9	4,7±0,3	5,5±0,6	30,4±1,3	6,7±0,4 <sup>1c</sup>	0,0032±0,0002 <sup>1c</sup>
3	1,1±0,1 <sup>1a</sup>	3,8±0,1	5,6±0,2	33,7±10,6	8,4±0,3 <sup>1c,2b</sup>	0,0001±0,0000 <sup>1b,2c</sup>
4	3,5±3,0	16,5±17,6	3,6±4,2	45,6±8,8	2,5±1,0 <sup>1c,2b,3c</sup>	0,0007±0,0001 <sup>2c,3a</sup>
5	2,7±0,8	4,4±2,2	6,5±4,4	36,1±22,3	6,5±0,5 <sup>1c,3a,4b</sup>	0,0001±0,0000 <sup>1b,2c,4a</sup>
6	2,2±1,5	4,6±3,1	8,4±8,7	52,3±29,9	6,8±0,2 <sup>1c,4c</sup>	0,0053±0,0004 <sup>1c,2c,3c,4c,5c</sup>

V prvi skupini, ki je prejela DOX, se kaže povečanje LDH, SOD in CAT. Pri drugi, četrti in peti skupini je prišlo do znižanja SOD, ki je najbolj značilno pri četrti skupini, nekoliko manj značilno pri drugi skupini, in najmanj značilno pri peti skupini glede na kontrolno skupino. CAT pa se je najbolj značilno povečala pri drugi in šesti, ter nekoliko manj značilno pri četrti skupini. Med skupinami nismo opazili statistično značilnih razlik pri merjenju TP, GR in GSH-Px.

Povečanje LDH, SOD in CAT kaže na oksidativni stres povzročen z DOX. Znižanje SOD v drugi skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred aplikacijo DOX, glede na prvo (doksorubicinsko), kaže na antioksidativno delovanje fulerenola [42].

Nekoliko povišani rezultati pri vseh encimih nakazujejo na neželene učinke peroralno apliciranega fulerenola.

- Vranica

Preglednica 17: Parametri oksidativnega stresa v vranici. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

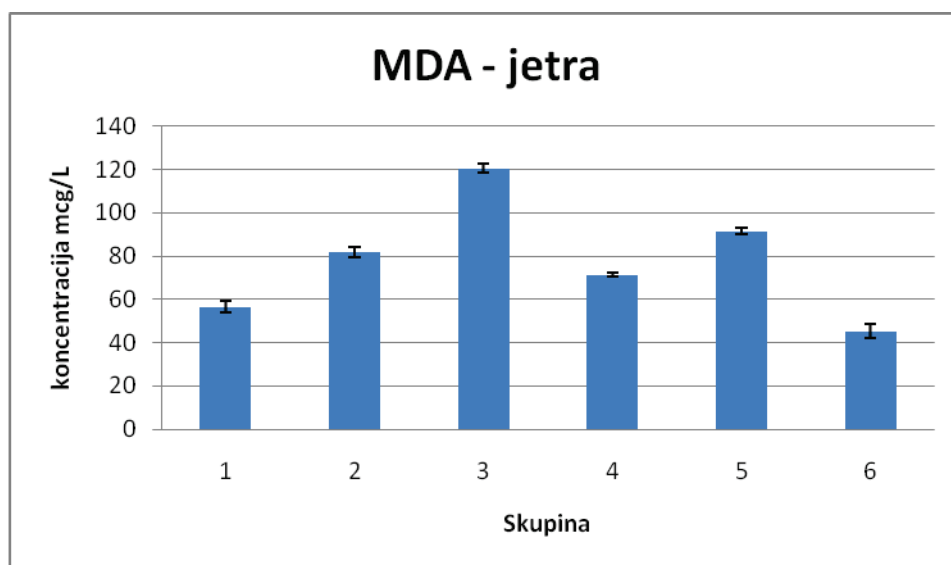
Skupina	LDH (U/L)	TP g/L	GR U/g TP	GSH-Px U/g TP	SOD U/mg TP	CAT U/mg TP
1	1082,3±61,6	7,4±0,2	9,1±0,1	22,2±1,5	3,0±0,1	0,0004±0,0001
2	436,3±4,2 <sup>1c</sup>	6,5±3,9	16,5±11,7	89,2±40,4 <sup>1a</sup>	4,1±0,1 <sup>1c</sup>	0,0018±0,0004 <sup>1b</sup>
3	255,7±73,7 <sup>1c</sup>	10,0±3,8	9,6±2,4	79,8±23,6 <sup>1a</sup>	3,1±0,1 <sup>2c</sup>	0,0002±0,0001 <sup>2b</sup>
4	537,5±134,5 <sup>1c,3a</sup>	10,2±2,0	6,9±2,1	42,9±8,8	3,2±0,1 <sup>1a,2c</sup>	0,0026±0,0004 <sup>1b,3b</sup>
5	344,1±30,2 <sup>1c</sup>	7,5±2,5	10,4±6,3	16,5±7,3 <sup>2a,3a</sup>	4,0±0,1 <sup>1c,3c,4b</sup>	0,0037±0,0004 <sup>1c,2b,3c,4a</sup>
6	905,4±137,9 <sup>2b,3c,4b,5c</sup>	5,6±3,9	18,8±14,5	18,4±17,5 <sup>2a,3a</sup>	5,1±0,1 <sup>1c,2c,3c,4c,5c</sup>	0,0047±0,0005 <sup>1c,2c,3c,4b,5a</sup>

Znatno povečan LDH se kaže tako v skupini, ki je prejela DOX, kot v skupini, ki je prejela peroralno fulerenol. Nekoliko manjše povečanje se kaže v skupinah, ki sta prejeli DOX v kombinaciji s fulerenolom. Skupini, ki sta prejeli peroralno apliciran fulerenol, kažeta povečanje SOD, CAT in znižanje GSH-Px. Znižanje GSH-Px se kaže tudi v doksorubicinski skupini. Nekoliko manjši porast, tako SOD, kot CAT, se kaže v drugi skupini. Med rezultati za TP in GR ni bistvenih razlik med skupinami.

O znižanju LDH v skupini, ki je prejela i.p. apliciran fulerenol pred DOX glede na doksorubicinsko poročajo avtorji pri raziskavah na drugih organih in živalskih modelih [13, 28] kar kaže na antioksidativno delovanje i.p. apliciranega fulerenola.

O znižanih vrednostih GSH-Px poročajo rezultati eksperimentov, kjer so bila obravnavana pljuča. Znižanje GSH-Px je verjetno posledica nižje vsebnosti GSH, ki je kofaktor tega encima. Pomanjkanje GSH in posledično manjša aktivnost GSH-Px še dodatno povečata verjetnost poškodb zaradi oksidativnega stresa [13].

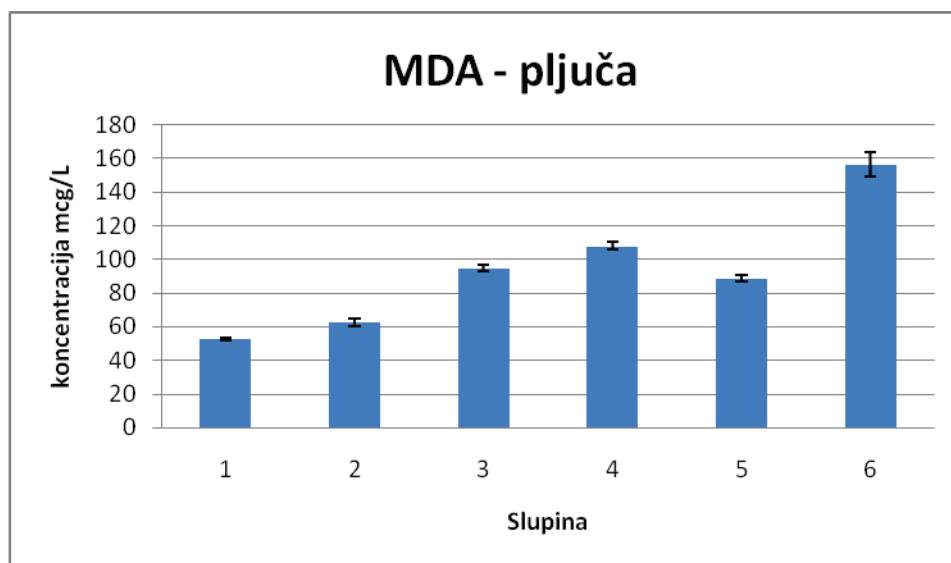
Rezultati kažejo, da oksidativni stres v vranici, povzročen tako z DOX, kot peroralno apliciranim fulerenolom.



Graf št.1: Pregled koncentracij MDA v jetrih. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika jetra: 2 – 1c; 3 – 1c,2c; 4 – 1b,2b,3c; 5 – 1c,2b,3c,4c; 6 – 1b,2c,3c,4c,5c

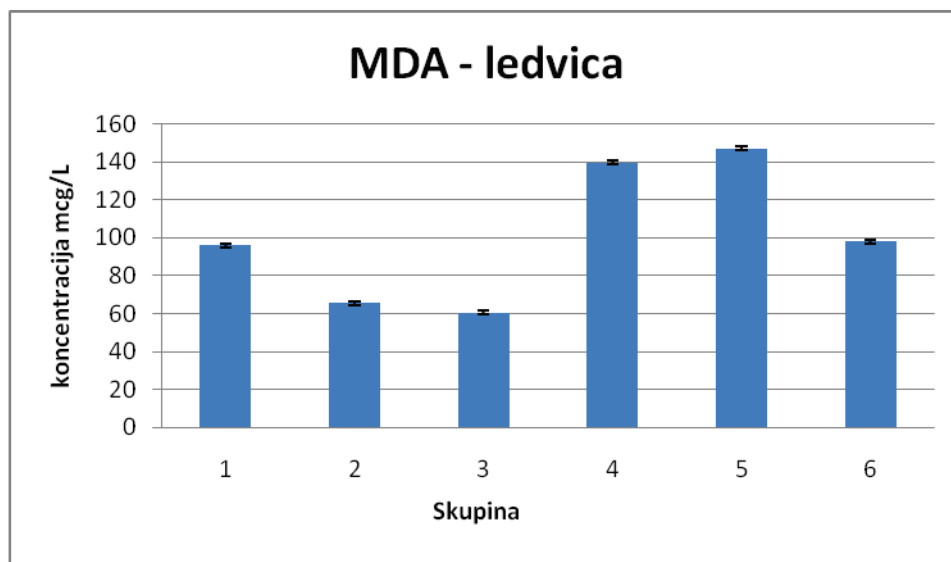
Pri vseh skupinah je prišlo do statistično značilnega znižanja koncentracije MDA glede na kontrolno skupino, kar ni v skladu s pričakovanji. Predhodne raziskave navajajo povečano koncentracijo MDA v skupini, ki je prejela DOX ali fulerenol ter znižanje koncentracije v skupini, ki je prejela fulerenol i.p. pred DOX [43].



Graf št.2: Pregled koncentracij MDA v pljučih. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika pljuča: 2- 1a 3 – 1c,2c 4 – 1c,2c,3b 5 – 1c,2c,4b 6 – 1c,2c,3c,4c,5c

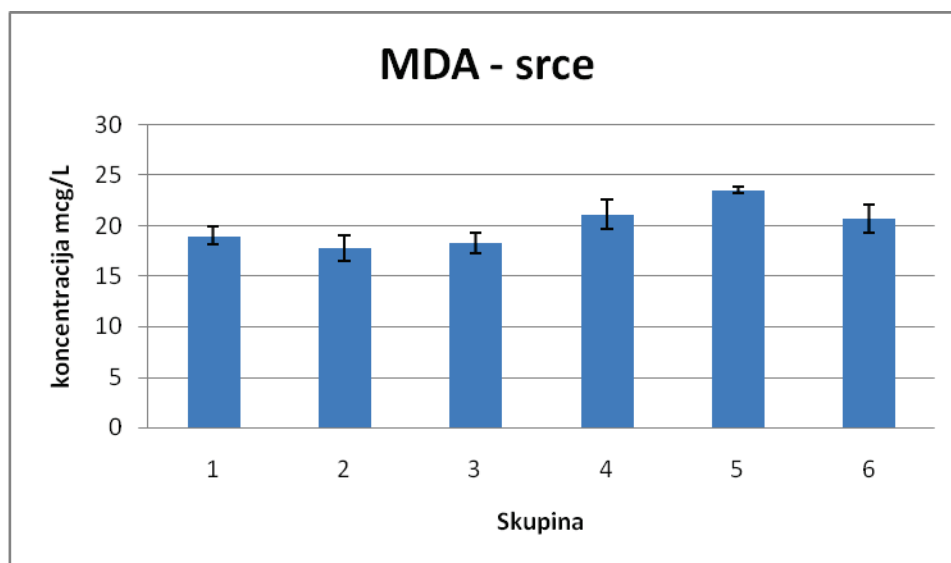
Pri raziskavah, ki so bile izvedene na pljučnih podgan, avtorji navajajo povečano koncentracijo MDA po enkratni aplikaciji DOX. Koncentracija MDA pri omenjeni raziskavi je bila narejena v pljučnem tkivu živali, ki so bile žrtvovane dva dni po aplikaciji [13]. Meritve koncentracij, šele 14 dni po aplikaciji, so lahko razlog za znižane vrednosti MDA. V tem času se MDA lahko metabolizira s pomočjo aldehyd-dehidrogenaze. V skupini, ki je prejela fulerenol peroralno, je prišlo do povzročitve oksidativnega stresa kasneje zaradi počasne absorpcije, zato je tu MDA še vedno povišan.



Graf št.3: Pregled koncentracij MDA v ledvicah. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika ledvica: 2 – 1c    3 – 1c    4 – 1c,2c,3c    5 – 1c,2c,3c,4a    6 – 2c,3c,4c,5c

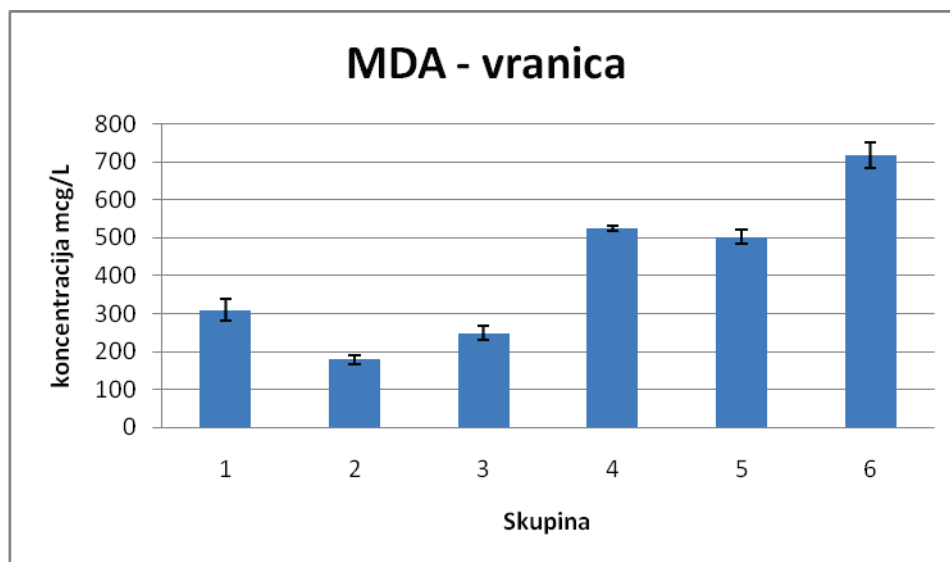
Do porasta MDA pride v vseh skupinah, razen v kontrolni skupini in skupini, ki je pred aplikacijo DOX prejela fulerenol i.p.. Največje povečanje zaznamo v skupini, ki je prejela DOX v kombinaciji s peroralno apliciranim fulerenolom, kar kaže na to, da na povečanje MDA vpliva tako DOX, kot peroralna aplikacija fulerenola. Značilno je povečana tudi koncentracija ob aplikaciji samega fulerenola i.p. in peroralno, ter samega DOX. O povečani koncentraciji MDA ob aplikaciji DOX poročajo tudi avtorji, ki so delali raziskave na podganah [15, 27, 28]. Avtorji navajajo tudi zmanjšanje koncentracije MDA ob i.p. aplikaciji fulerenola pred DOX glede na skupino, ki je prejela samo DOX [28], kar potrjujejo tudi naši rezultati.



Graf št.4: Pregled koncentracij MDA v srcu. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika srce: 2 - / 3 - / 4 – 2a,3a 5 – 1b,2b,3b 6 – 2a,5a

Do porasta MDA pride v vseh skupinah razen v kontrolni skupini in skupini, ki je pred aplikacijo DOX prejela fulerenol i.p. ali sam DOX. Povečanje v skupini, ki je prejela samo i.p. fulerenol pa je statistično značilno. Največje povečanje zaznamo v skupini, ki je prejela DOX in peroralno fulerenol, kar kaže na to, da na povečanje MDA vpliva tako DOX, kot peroralna aplikacija fulerenola. Ena od predhodnih raziskave na podganah navaja statistično značilno povečanje MDA v skupini, ki je prejela DOX. V skupinah, ki so prejele sam fulerenol i.p. ali v kombinaciji z DOX pa je nivo MDA primerljiv glede na kontrolno skupino [43].



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

Statistika vranica: 2 – 1b 3 – 1a,2a 4 – 1c,2c,3c 5 – 1c,2c,3c 6 – 1c,2c,3c,4c,5c

Največje povečanje, glede na kontrolno skupino se kaže v skupinah, ki so prejele peroralno apliciran sam fulerenol ali v kombinaciji z DOX in tudi ob i.p. aplikaciji samega fulerenola. Nekaj manjše povečanje, vendar še vedno statistično značilno, se kaže v skupini, ki je prejela DOX. V skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred DOX se kaže znižanje v primerjavi z DOX skupino.

Glede na to, da drugih literarnih podatkov s katerimi bi primerjali rezultate ni na voljo, lahko zaključimo, da rezultati kažejo na antioksidativno delovanje i.p. apliciranega fulerenola pred DOX, medtem ko aplikacija samega fulerenola ali peroralna aplikacija fulerenola z DOX pospeši lipidno peroksidacijo.

Preglednica 18: Parametri oksidativnega stresa GSH v organih. Številke kažejo na pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Skupina	Prosti GSH				
	Jetra	Pljuča	Ledvica	Srce	Vranica
1	189,72±4,73	198,52±22,23	303,44±49,12	543,48±47,14	339,91±97,28
2	635,68±16,63 <sup>1c</sup>	396,78±96,38 <sup>1a</sup>	283,40±43,98	279,49±69,58 <sup>1b</sup>	381,52±106,44
3	60,26±8,85 <sup>1b,2c</sup>	348,34±92,49	274,03±28,53	344,09±99,87 <sup>1a</sup>	230,56±31,02
4	662,10±39,27 <sup>1c,3c</sup>	323,78±84,49	185,00±41,93 <sup>1a,2a</sup>	317,05±51,24 <sup>1a</sup>	456,08±136,69 <sup>3a</sup>
5	262,17±10,60 <sup>1b,2c,3c,4c</sup>	295,73±77,31	214,20±36,34	201,95±27,36 <sup>1b</sup>	300,47±89,02
6	310,33±13,24 <sup>1b,2c,3c,4c,5a</sup>	241,16±45,66	205,68±15,20 <sup>1a</sup>	347,82±93,76 <sup>1a</sup>	612,83±43,36 <sup>1a,2a,3b,5a</sup>

Pri jetrih je prišlo do značilnega povišanja prostega GSH v vseh skupinah v primerjavi z kontrolno skupino. Največje povečanje opazimo pri drugi in četrti skupini, ki sta i.p. prejeli

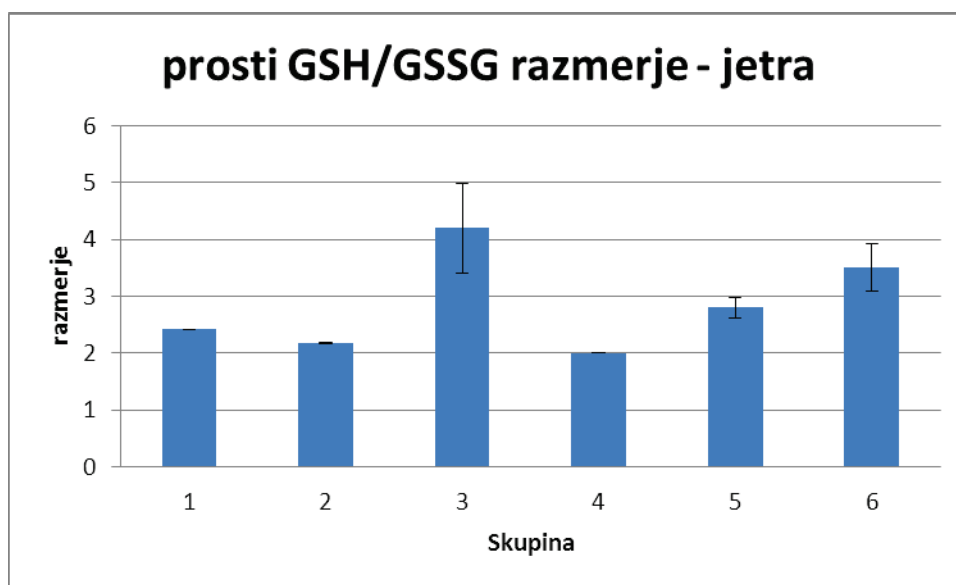
fulerenol. Pri pljučih je statistično značilno povečanje opaziti pri skupini, ki je prejela i.p. fulerenol pred DOX v primerjavi z doksorubicinsko skupino. Med ostalimi skupinami ni opaznih razlik.

V ledvicah je koncentracija v skupinah, ki sta p.o. prejeli fulerenol (četrti in šesta) nižja glede na prvo, doksorubicinsko skupino. Ob primerjavi rezultatov vseh skupin na kontrolno skupino, med njimi ni razlik.

Močno povišano koncentracijo GSH v srcu zaznamo v doksorubicinski skupini. Med ostalimi skupinami ni razlik.

Pri vranici je koncentracija GSH povišana v četrti in šesti skupini, ki sta prejeli p.o. fulerenol.

Rezultati ne kažejo pričakovanega znižanja GSH v skupini, ki je prejela samo DOX, glede na kontrolno skupino [13].



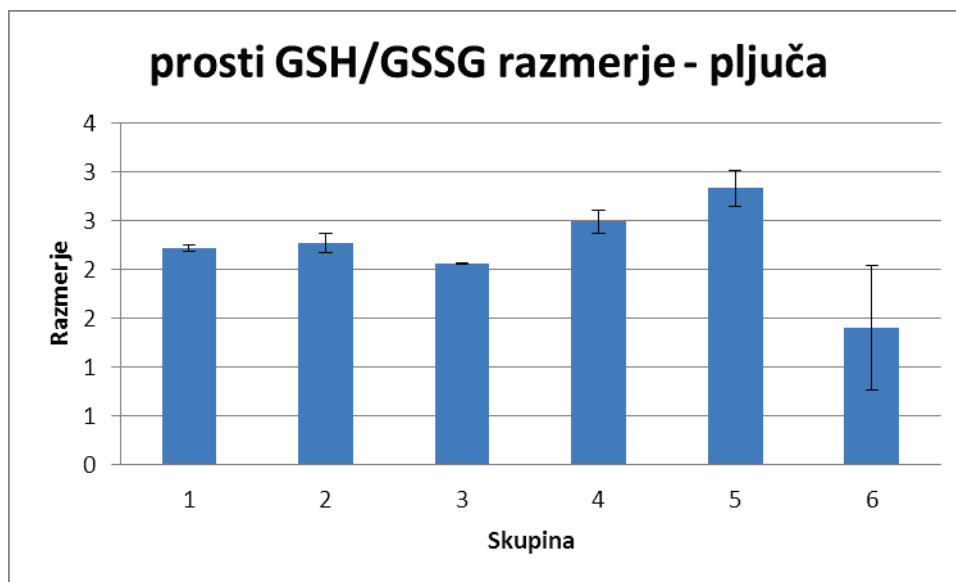
Graf št. 6: Prikaz razmerja GSH/GSSG v jetrih. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika jetra: 2 - / 3 – 1b,2b 4 – 3b 5 – 3b 6 – 1a,2a,4b

Razmerje je v vseh skupinah znatno manjše glede na kontrolno skupino razen v skupini, ki je prejela peroralno fulerenol. O razmerju, ki je precej nižje v skupini, ki je prejela DOX kot tudi pri skupini, ki je prejela i.p. fulerenol z DOX glede na kontrolno, poročajo tudi drugi avtorji. Prav tako pri njihovih rezultatih ni značilnih sprememb med skupino, ki je prejela samo DOX in skupino, ki je pred tem prejela i.p. fulerenol [43]. Nizka



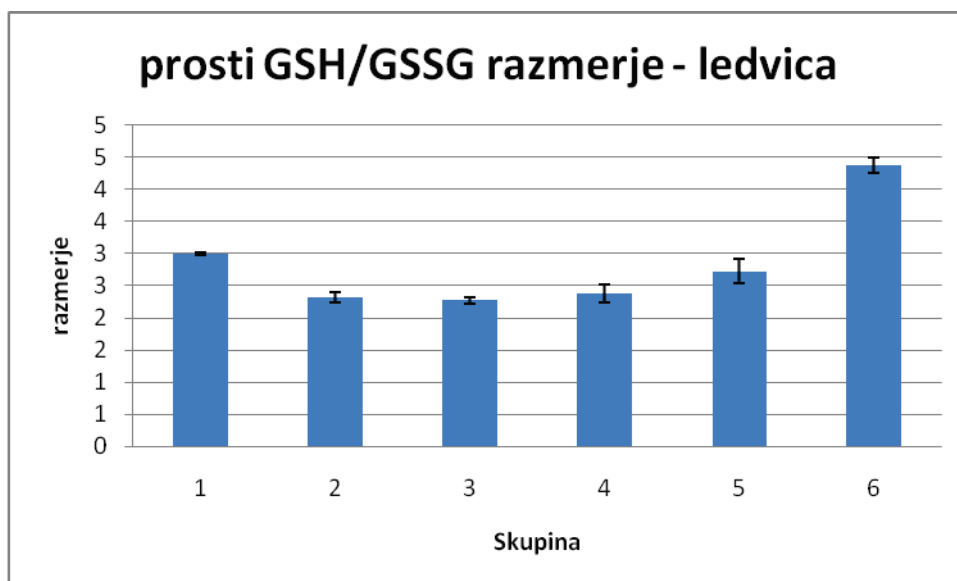
koncentracija GSH, visoka koncentracija GSSG in nizko razmerje GSH/GSSG so pogosti pri različnih patoloških stanjih [35].



Graf št. 7: Prikaz razmerja GSH/GSSG v pljučih. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

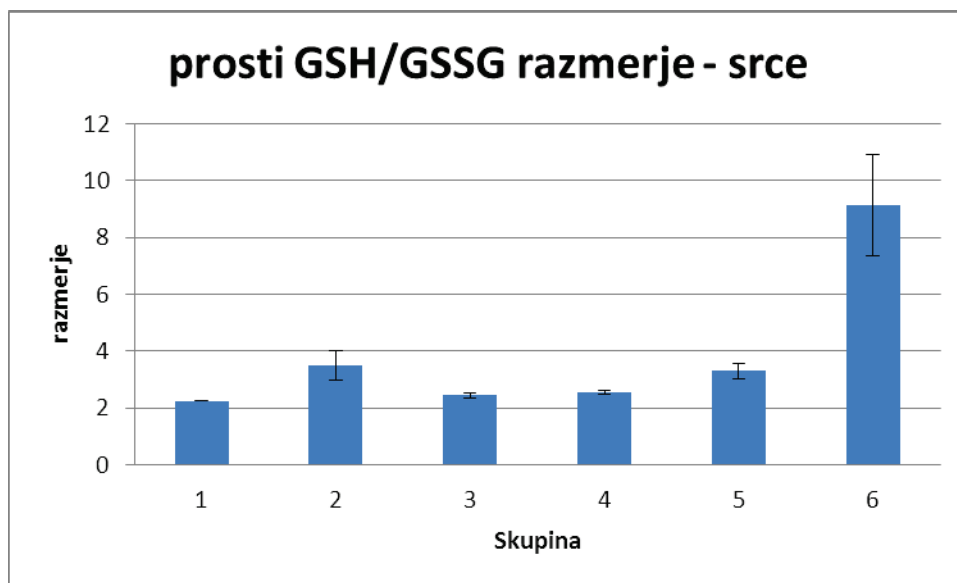
Statistika pljuča: 2 - / 3 - / 4 - / 5 - / 6 – 1a,2a,4b,5b

Najnižje razmerje zaznamo v šesti skupini, ki ji je bil peroralno apliciran fulerenol. Iz rezultatov lahko zaključimo, da peroralna aplikacija fulerenola povzroči nastanek oksidativnega stresa v pljučih. Med ostalimi skupinami ni značilnih razlik. Machado in sodelavci [45] v svoji raziskavi navajajo, da se razmerji med skupino, ki je prejela 0,9 % raztopino NaCl in skupino, ki je prejela DOX, ne razlikujeta bistveno. Kot prvo možno razlago navajajo, da aplikacija DOX ni povzročila izpraznitve zaloge GSH v pljučih. Druga možna razlaga pa je, da je zmanjšano sintezo GSH spremljalo povečano izločanje GSSG, da bi preprečili lipidno peroksidacijo [45].



Graf št. 8: Prikaz razmerja GSH/GSSG v ledvicah. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001). Statistika ledvica: 2 – 1b 3 – 1b 4 – 1b 5 – 1a,2b,3b,4a 6 – 1c,2c,3c,4c,5c

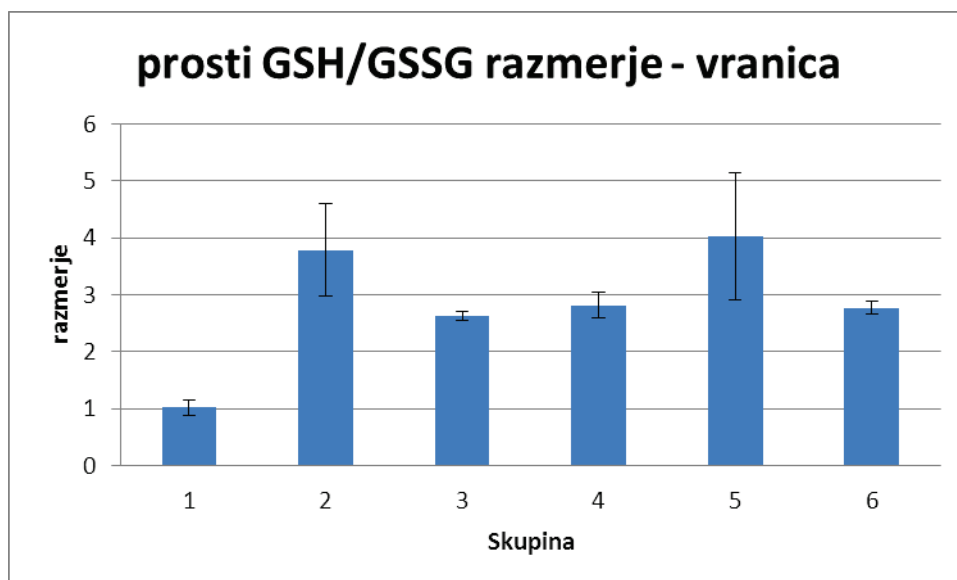
Značilno povečanje razmerja se kaže ob peroralni aplikaciji fulerenola in nekoliko manj značilno povečanje ob aplikaciji samega DOX. Predhodne raziskave kažejo na močno znižano koncentracijo GSH in primerljivo koncentracijo GSSG v skupini, ki je prejela DOX, glede na kontrolno skupino, kar kaže na znižano razmerje GSH/GSSG. Pri i.p. aplikaciji fulerenola pred DOX, pa se kaže nekoliko višja koncentracija GSH in nekoliko nižja koncentracija GSSG kar kaže na povečano razmerje glede na doksorubicinsko skupino [28]. Rezultati naše raziskave ne potrjujejo predhodnih rezultatov na podganah.



Graf št. 9: Prikaz razmerja GSH/GSS v srcu. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika srce: 2 - / 3 - / 4 - / 5 - / 6 – 1c,2c,3c,4c,5c

Značilno povečanje razmerja se kaže v skupini, ki je prejela fulerenol peroralno. Med ostalimi skupinami ni značilnih razlik. Enake zaključke navajajo tudi pri eksperimentu, izvedenem na podganah [42].



Graf št. 10: Prikaz razmerja GSH/GSSG v vranici. Številke označujejo statistično pomembne razlike glede na ustrezno skupino (a:p < 0,05; b:p < 0,01; c:p < 0,001).

Statistika vranica: 2 – 1b 3 – 1b 4 – 1b 5 – 1b 6 – 1b

Razmerje GSH/GSSG je statistično značilno nižje v skupini, ki je prejela DOX glede na vse ostale skupine, med katerimi ni statistično značilnih razlik. Značilno povečanje razmerja v skupinah, ki sta prejeli fulerenol pred DOX, v primerjavi z doksorubicinsko skupino, kaže na antioksidativno delovanje fulerenola. Nizko razmerje GSH/GSSG je pogosto pri različnih patoloških stanjih [35].

#### ***4.2 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI FULERENOLA IN DRUGIH ANTIOKSIDANTOV PRI TOKSIČNEM UČINKU DOKSORUBICINA***

DOX je zelo pomembna učinkovina pri zdravljenju rak, dobro poznani pa so tudi njegovi neželeni učinki. Raziskave so potrdile, da DOX povzroči povečan oksidativni stres v organizmu. Veliko raziskav je bilo opravljenih, da bi zmanjšali neželene učinke. Uporabljen je bil spremenjen terminski plan aplikacije, hkratna uporaba drugih učinkovin s protitumorskim delovanjem in sočasna uporaba antioksidantov. V Preglednici 19 je podan pregled podatkov raziskav o vplivu antioksidantov na toksično delovanje DOX.

Preglednica 19: Primerjava vpliva na toksičnost doksorubicina različnih antioksidantov/učinkovin glede na enostavno oceno vrednosti (višje ↑ oz. nižje ↓ ali normalo =) LDH, MDA, SOD, GSH-Px, GR in CAT v primerjavi s doksorubicinsko skupino. Znak x pomeni, da podatka ni.

Uporabljeni antioksidant	Organ	Uporabljeni model <i>in vivo</i>	Ocena vrednosti glede na doksorubicinsko skupino						
			LDH	MDA	SOD	GSH-Px	GR	CAT	Referenca
i.p. fulerenol	jetra	prašiči	=	↑	=	↑	=	↑	naša raziskava
	pljuča		↑	↑	↓	↑	=	↑	naša raziskava
	ledvica		↑	↓	↓	=	=	↑	naša raziskava
	srce		=	=	↓	=	=	↑	naša raziskava
	vranica		↓	↓	↑	↑	=	↑	naša raziskava
p.o. fulerenol	jetra	prašiči	↑	↑	↓	=	=	=	naša raziskava
	pljuča		↑	↑	↓	=	=	=	naša raziskava
	ledvica		=	↑	↓	=	=	=	naša raziskava
	srce		=	↑	↓	=	=	↓	naša raziskava
	vranica		↓	↑	↑	=	=	↑	naša raziskava
i.p. fulerenol	srce	podgane	↓	x	↓	=	↓	↓	42
	jetra		↓	x	↓	=	↓	↑	42
i.p. fulerenol	pljuča	podgane	↓	↓	↓	↑	↓	↓	12
i.p. fulerenol	ledvica	podgane	↓	↓	↓	↑	↓	↓	27
i.p. fulerenol	pljuča	podgane	↓	↓	↓	=	↓	X	32
vit. C	pljuča	podgane	↑	=	↓	=	↓	x	32
vit. C	srce	podgane	↓	x	↓	=	↓	↑	42
vit. C	jetra	podgane	=	x	=	↑	↓	↑	42
vit. C	plazma	Pacientke z rakom dojke	↓	x	↑	x	↑	↑	48

Rezultati naše raziskave v večini primerov ne potrjuje predhodnih raziskav. Do zvišanja glavnega označevalca celičnih poškodb (LDH) po aplikaciji DOX je prišlo le v srcu in vranici. Ob aplikaciji antioksidanta se le pri vranici pokaže njegovo delovanje saj se nivo LDH zniža. Znižanje GSH-Px, ki ga navajajo tudi drugi avtorji [13, 24] se je pokazalo v pljučih in vranici. Aplikacija antioksidanta dvigne njen nivo. Do povišanja SOD, ob aplikaciji DOX, je prišlo v jetrih in srcu, CAT pa je povišana le v srcu. Antioksidativno delovanje i.p. apliciranega fulerenola se je pokazalo le v znižanju SOD v srcu. V pljučih in ledvicah smo opazili znižane vrednosti CAT, ob aplikaciji DOX, o čemer poročajo tudi

Yagmurca in sodelavci [27]. Fulerenol je v obeh primerih povzročil povišanje koncentracije. Peroralna aplikacija fulerenola v večini primerov ni pokazala antioksidativnega delovanja oziroma je celo povzročila povišanje MDA kar kaže na toksični učinek.

Raziskave drugih avtorjev kažejo na antioksidativni učinek i.p. apliciranega fulerenola kar se kaže v znižanju LDH, MDA in SOD [13, 28, 33, 43]. O znižani vrednosti LDH in SOD ob aplikaciji vitamina C pred aplikacijo DOX poročajo tudi Injac in sodelavci.

Znižanje glavnega označevalca celičnih poškodb (LDH) so zaznali tudi ob aplikaciji vitamina C pred aplikacijo DOX v plazmi pacientk z rakom dojke [47].

Pri naši raziskavi je ob aplikaciji DOX prišlo do povišanja LDH le v srcu in vranici. Ob i.p. aplikaciji fulerenola pred DOX je prišlo do značilnega znižanja LDH v vranici medtem, ko znižanje v srcu ni bilo značilno.

Kljub temu, da večina naših rezultatov ne potrjuje rezultatov predhodnih raziskav, lahko na podlagi znižanja koncentracije LDH v srcu in vranici, ob i.p. aplikaciji fulerenola, potegnemo vzporednico z aplikacijo znanega antioksidanta (vitamina C) in njegovega pozitivnega učinka na pacienke z rakom dojke zdravljene z DOX. Znižan LDH pri pacientkah z rakom dojke in v naši raziskavi nakazuje na možnost pozitivnega delovanja fulerenola tudi ob morebitni aplikaciji na pacientih.

## 5 SKLEPI

Na podlagi poročil veterinarja o obnašanju živali tekom eksperimenta in veterinarja patologa, lahko opazimo neželene učinke ob aplikaciji samega DOX in peroralno apliciranega fulerenola, ki povzročita povečanje jeter oziroma pljuč. Glede na rezultate spremembe telesne mase, lahko potrdimo predhodne raziskave, ki so pokazale znižanje telesne mase ob aplikaciji samega DOX in i.p. fulerenola.

Povečan tkivni koeficient, smo zaznali pri jetrih ob aplikaciji fulerenola 30 minut pred DOX. Povečan koeficient pljuč in ledvic se kaže pri aplikaciji samega DOX, peroralni aplikaciji fulerenola in njuni kombinaciji. Povečanje koeficienta srca pa povzroči DOX.

Iz rezultatov lahko tudi zaključimo, da se enake spremembe v koncentraciji serumskih encimov, ki jih povzroči i.p. apliciran fulerenol po 2 urah, kažejo 48 ur po p.o. aplikaciji fulerenola, zaradi zakasnjene absorpcije. Raziskava tokrat ni potrdila pričakovanega antioksidativnega delovanja peroralno apliciranega fulerenola temveč kaže na njegove neželene učinke, povzročene predvsem na pljuča, srce in ledvica.

Rezultati oksidativnega stresa večinoma ne sovpadajo z rezultati drugih raziskovalnih skupin. Ker gre za pregled aktivnosti encimov oksidativnega stresa v času 14 dni po aplikaciji, je najverjetneje v večini primerov prišlo do normalizacije koncentracije encimov oziroma razlike med skupinami niso bile več statistično značilne.

Zaradi različnega odziva posameznih organov na oksidativni stres oziroma antioksidativno delovanje ne moremo potegniti zaključkov, ki bi veljali za celotno skupino.

Iz raziskave lahko zaključimo, da rezultati kažejo na morebitno antioksidativno delovanje i.p. apliciranega fulerenola. Ravno nasprotni učinek pa je opaziti pri njegovi peroralni aplikaciji. Za nadaljne raziskave je potrebno optimirati koncentracijo i.p. apliciranega fulerenola. Peroralna aplikacija v obliki, kot smo jo imeli, verjetno ni ustrezna, zato bodo potrebne nadaljne raziskave s spremenjenim načinom aplikacije in tudi farmacevtske oblike fulerenola.

## 6 LITERATURA

1. Radić, N. Efekat fulerenola na antioksidativni status srca pacova nakon jednokratne aplikacije doxorubicina. Diplomaska naloga (besedilo v srbskem jeziku), Fakulteta za medicino, Univerza v Novem Sadu, Novi Sad (2007)
2. Jaime N. Delgado, Ph.D.: Wilson and Grisvold's Textbook of organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, tenth edition 1998, 370-377.
3. Roger Walker, Clive Edwards: Klinička farmacija i terapija, Školska knjiga, Zagreb 2004.
4. Šimuněk, T., Šterba, M., Popelova, O., et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, 61, 154-171 (2009)
5. Milic Torres, V., Srdjenovic, B., Jacevic, V. et al.: Fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Reports* 62,707-718 (2010)
6. Milic Torres, V., Dragojevic Simic, V. Doxorubicin-induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes – Do We Have Right Strategy for Prevention?, *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments*, ISBN: 978-953-51-0273-1 (2012)
7. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., et al. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments an Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185 – 229 (2004)
8. Djordjević Milić, V., Djordjević, A., Dobrić, S., et al.: Influence of Fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Rats. *Materials Science Forum*, 518, 525 – 530 (2006)
9. Ma Y., Adjemiani S., Mattarollo S. R., e tal. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 38 (4), 729 – 741 (2013)
10. Djordjevic Milic, V., Stankov, K., Injac, R., et al. Activity of Antioxidative Enzymes in Erythrocytes after a Single Dose Administration of Doxorubicin in Rtas Pretreated with Fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19, 24-28 (2009)
11. Nelson, D.L., Cox, M.M. *Lehninger Principles of biochemistry*, fifth edition, W.H.Freeman and company, New York (2008)



12. Injac, R., Štrukelj, B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 7, 497-516 (2008)
13. Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., et al. Acute Doxorubicin Pulmotoxicity in Rats with Malignant Neoplasm is Effectively Treated with Fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> Through Inhibition of Oxidative Stress. *Pharmacological Reports* 61, 335 – 342 (2009)
14. Gille, L. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 775 – 782 (1997)
15. Liu, L.-L., Li, Q.-X., Xia, L., et al. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 231, 81-90 (2007)
16. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine*, third edition (1999)
17. Gewirtz, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanism of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57, 728 – 734 (1999)
18. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9, 515 – 540 (1990)
19. Marnett, L. J., Riggins, J. N., West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reaction with DNA and protein. *Journal of Clinical Investigation* 111, 583 – 593 (2003)
20. Niedernhofer, L. J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., et al. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cell, *Journal of Biological Chemistry* 278, 31426 – 31433 (2003)
21. Henninifer, C., Huelnesbeck, J., Huelnesbeck, S., et al. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 261, 66 – 73 (2012)
22. Kimura, T., Fujita, I., Itoh, N., et al. Metallothionein Acts as a Cytoprotectant against Doxorubicin Toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292, 299 – 302 (2000)
23. Yagmurca, M., Bas, O., Mollaoglu, H., et.al. Protective Effects of Erdosteine on Doxorubicin-induced Hepatotoxicity in Rats. *Archives of Medicinal Research* 38, 380 – 385 (2007)

24. Injac, R., Perse, M., Obermajer, N., et al. Potential hepatoprotective effects of fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials* 29, 3451 – 3460 (2008)
25. Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., et al. Bioapplication and activity of fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>. *African Journal of Biotechnology* 7(25), 4940 – 4050 (2008)
26. Yilmaz, S., Atessahin, A., Sahna, E., et al. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology* 218, 164-171 (2006)
27. Yagmurca, M., Erdogan, H., Iraz, M, et al. Caffeic acid phenethyl eter as protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats, *Clinica Chimica Acta* 348, 27 – 34 (2004)
28. Injac, R., Boskovic, M., Perse, M., et al. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be succesfully treated with fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> via suppression of oxidative stress. *Pharmacological Reports* 60, 742 – 749 (2008)
29. Manabe, N., Kinoshita, A., Yamaguchi, A., et al. Vhanges in Quantitative Profile of Extracellular Matrix Components in the Kidneys of Rats with Adriamycin-induced Nephropathy, *The Journal of Veterinary Medicinal Science* 63(2), 125 – 133 (2001)
30. Rook, M., Lely, A.T., Kramer, A.B., ez al. Individual differences in renal ACE activity in healethy rats pedoct susceptibility to adriamycin-induced damage, *Nephrology Dialysis Transplant* 20, 59 – 64 (2005)
31. Hahn, H., Park, Y.S., Ha, I.S., et al. Age-related differences in Adriamycin-induced nephroparhy, *Pediatric Nephrology* 19, 761-766 (2004)
32. Chattopadhyay, A., Bandyopadhyy, D. Vitamin E in the prevention of ischemic heart disease. *Pharmacological Reports* 58, 179 – 187 (2006)
33. Ličen, B. Ugotavljanje protektivnosti fulerenola *in vivo* pri terapiji malignih neoplazem z doksorubicinom na pluča pri podganah. *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani (2011)
34. Singh, R., Leuratti, C., Josyula, S., et al. Lobe-specific increase in malondialdehyde DNA adduct formation in the livers of mice following infection with *Helicobacter hepaticus*. *Oxford Journals, Life Science and Medicine, Carcinogenesis*, 22 (8), 1281 – 1287 (2001)
35. Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., e tal. Blood Glutathione Disulfide: In vivo factor or in vitro artifact? *Clinical Chemistry*, 48 (5), 742-753 (2002)
36. Quiles, J.L., Huertas, J.R., Battiono, M., et al. Antioksidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180, 79-95 (2002).

37. Stolarska, M., Mlynarski, W., Talewska – Szewczyk, B., et al. Cytoprotective effect of amifostine in the treatment of childhood neoplastic diseases – a clinical study including the pharmacoeconomic analysis. *Pharmacological Report* 58, 30-34 (2006).
38. Zima, T., Tesar, V., Crkovska, J., et al. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13, 1975-1979 (1998)
39. Injac, R., Kočevar, N., Štrukelj, B. Fulerenol  $C_{60}(OH)_{24}$  kot potencialna učinkovina. *Farmacevtski vestnik* 59, 257-262 (2008)
40. Trajković, S., Dobrić, S., Dragojević-Simić, V., et al. Tissue-protective effects of fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$  and amifostine in irradiated rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58, 39-43 (2007)
41. Husebo, L. O., Sitharaman, B., Furukawa, K. Fullerenols revisited as stable radical anions, *Journal of American Chemical Society*, 126 (38), 12055 – 12064 (2004)
42. Injac, R., Perse, M., Boskovic, M. et al. Cardioprotective effects of fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$  on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 7, 15-26 (2008)
43. Injac, R., Perse, M., Cerne, M., et al. Protective Effects of Fullereneol  $C_{60}(OH)_{24}$  against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats with Colorectal Cancer: A Chronic Investigation, *Biomaterials* 30, 1184 – 1196 (2009)
44. Bogdanović, V., Stankov, K., Ičević, I., et al. Fullereneol effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line. *Journal of Radiation Research*, 49 (3), 321-327 (2008)
45. Machado, G.M., Baldeiras, I., Pereira, G.C., et al. Sub-chronic administration of doxorubicin to Wistar rats results in oxidative stress and unaltered apoptotic signalin in the lung. *Chemico-Biological Interactions*, 188, 478 – 486 (2010)
46. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105, 121 – 126
47. Suhail, N., Bilal, N., Khan, H. Y. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 37, 22 – 26, 2012

## 7 ŽIVLJENJEPIS

Rodila sem se 25.3.1977 v Ljubljani, kjer sem tudi obiskovala osnovno šolo. Šolanje sem nadaljevala na gimnaziji Ledina v Ljubljani, 1995 sem uspešno opravila maturo in se vpisala na Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Študij sem uspešno zaključila 2002 in se zaposlila. Leta 2004 sem se vpisala na podiplomski študij Biomedicine.