

BILJANA Č. GOVEDARICA¹
VUKOSAVA V.
DORĐEVIĆ-MILIĆ¹
NATAŠA A. RADIĆ²
BRANISLAVA U.
SRĐENVIĆ¹
ALEKSANDAR N. ĐORĐEVIĆ³

¹ Medicinski fakultet,
Zavod za farmaciju,
Univerzitet u Novom Sadu,
Novi Sad

² Fakulteta za farmaciju,
Katedra za farmaceutsko
biologiju, Univerza v Ljubljani,
Ljubljana

³ Prirodno-matematički fakultet,
Departman za hemiju,
Univerzitet u Novom Sadu,
Novi Sad

NAUČNI RAD

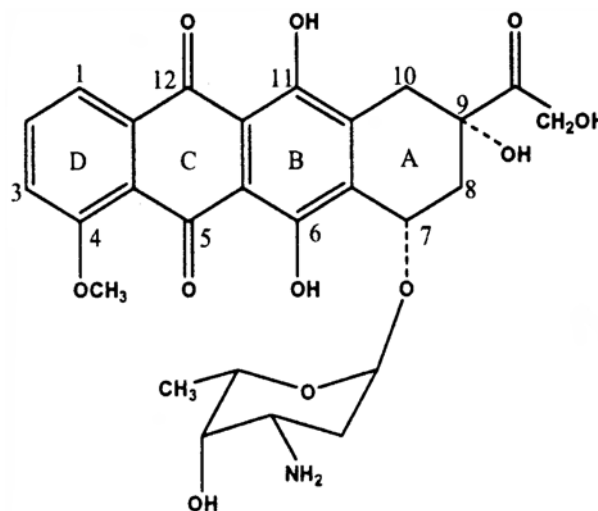
*fulerenol +577.15:616-006

UTICAJ FULERENOLA C₆₀(OH)₂₄ NA SERUMSKI ENZIMSKI STATUS PACOVA NAKON JEDNOKRATNE APLIKACIJE DOKSORUBICINA*

Cilj rada je ispitati uticaj fulerenola C₆₀(OH)₂₄ kao citoprotektora pri jedno-kratnoj aplikaciji doksorubicina, na aktivnosti serumskih enzima (CK, AST, ALT, LDH i α-HBDH) kod pacova u in vivo sistemu. Enzimske aktivnosti (CK, LDH, HBDH, AST, ALT) u serumu određivane su komercijalnim metodama. Primena fulerenola u dozi od 100 mg/kg u kombinaciji sa doksorubicinom nije dovela do promene aktivnosti serumskih enzima AST, ALT, CK, LDH i α-HBDH u poređenju sa netretiranim životinjama. Ovo ukazuje na očuvan integritet membrane kardiomiocita i fulerenol kao potencijalni protektor u terapiji. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost korišćenja fulerenola kao citoprotektora u terapiji malignih neoplazmi doksorubicinom.

Antraciklinski antibiotici su citotoksični lekovi koji se koriste u lečenju maligniteta. Doksorubicin je jedan od najaktivnijih antitumorskih lekova sa jednim od najširih indikacionih područja u onkologiji. Pokazuje izvanrednu aktivnost u lečenju akutne leukemije, Hodgkin-ove bolesti, Wilms-ovog tumora, neuroblastoma i sarkoma mekih tkiva. Vrlo je delotvoran u lečenju velikog broja karcinoma kao što su: karcinom dojke, jajnika, endometrijuma, cerviksa, testisa, pluća, štitne žlezde, mokraćne bešike, kolona i pankreasa [1,2]. Efekti delovanja doksorubicina nastaju kao rezultat više različitih biohemijskih mehanizama. Hionska struktura na prstenu C (slika 1) je potencijalni izvor slobodnih radikala i može uzrokovati početak procesa lipidne peroksidacije koji dalje dovodi do povećanja permeabilnosti ćelijske membrane i programirane ćelijske smrti [3].

U kliničkoj upotrebi doksorubicina pojavili su se ozbiljni problemi kao što su razvijanje rezistencije tumorskih ćelija i toksičnost na zdrava tkiva od kojih je najozbiljnija kardiotoksičnost [3]. Zbog sve veće incidence oboljevanja od malignih oboljenja i još uvek visoko korišćenog doksorubicina u terapiji, razvila se ideja o sintezi protektora čija bi glavna odlika bila smanjenje toksičnosti doksorubicina uz očuvanu antitumorsku aktivnost. Jedan od takvih potencijalnih protektora je korišćen u ovom istraživanju. Fuleren



Slika 1. Struktura doksorubicina
Figure 1. Structure of doxorubicin

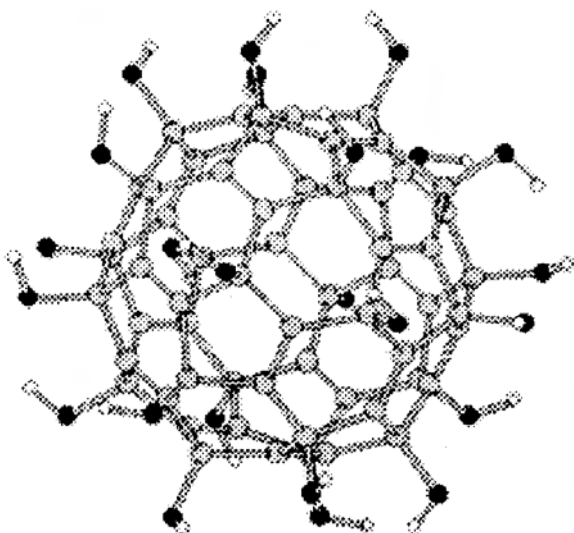
predstavlja treću alotropsku modifikaciju ugljenika koja je otkrivena 1985. godine [4]. Ime fuleren (C₆₀) dobio je po poznatom američkom arhitekti Bakminsteru Fuleru. Osobine fulerena kao što su: izrazita hidrofobnost, velika kohezijska sila između molekula fulerena, foto aktivnost [6], sposobnost da prima i otpušta elektrone [7], relativno visoka hemijska reaktivnost, omogućavaju njegove strukturne modifikacije [8].

Raznovrsnost hemijskih transformacija molekula C₆₀ i njegova reaktivnost omogućila je dobijanje različitih derivata od kojih su vodorastvorni fulereni od posebnog značaja zbog svoje potencijalne biološke aktivnosti [9]. Citotoksičnost i antioksidativnost su dva glavna pravca u istraživanju biološke aktivnosti vodorastvornih derivata. Citotoksičnost-fotocitotok-

*Rad saopšten na skupu "Šesti seminar mladih istraživača", Beograd, 24.-26. decembar 2007.

Adresa autora: Biljana Govedarica, Medicinski fakultet, Zavod za farmaciju, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
E-mail: biljana.govedarica@g.mail.com
Rad primljen: Decembar 24, 2007.
Rad prihvaćen: Januar 21, 2008.

sičnost nekih derivata fulerena je zasnovana na stvaranju singletnog kiseonika i superoksid anjon radikala, posebno pod dejstvom UV/VIS svetlosti. Antioksidativna aktivnost je izražena preko brojnih reakcija sa reaktivnim oblicima kiseonika. Hemijska modifikacija fulerena dodavanja hidroksilnih grupa, predstavlja lak i direktan način za dobijanje vodorastvornih fulerena nazvanih fuleroli ili fulerenoli, opšte formule $C_{60}(OH)_n$ [10–15]. Biološka aktivnost zasnovana je na činjenici da mogu da deluju kao fotosenzibilizatori i hvatači slobodnih radikala. U nanomolnim koncentracijama fulerenol je aktivan kao antioksidans u hemijskim i biološkim sistemima, kao i protektor kod primene citotoksičnih lekova i zračenja na ćelijskim linijama i u *in vivo* modelima [17–21]. Supstanca korišćena u ovom radu je sintetisana potpunom supstitucijom bromnih atoma iz $C_{60}Br_{24}$ [14] u alkalnoj sredini i izvršena je njena potpuna fizičko-hemijska karakterizacija. Polihidroksilni derivat fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, predstavljen je na slici 2.



Slika 2. Struktura fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$
Figure 2. Structure of fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$

Fulerenol, koga karakteriše umerena elektrofilitnost i prisustvo alilnih hidroksilnih grupa, ima izuzetan potencijal da se koristi kao vodorastvorni antioksidans u biološkim sistemima [16]. Antioksidativne osobine fulerenola ispitivane su u hemijskom model sistemu metodom ESR.

Fulerenol je pokazao visoku efikasnost u inhibiciji produkcije hidroksi i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Procenat inhibicije je dozno zavisna, a efikasnost je veća pri inhibiciji hidroksi radikala (50–82%) nego DPPH radikala (28–50%) u ispitivnaom opsegu koncentracija. Ispitivanjima je, takođe, uočeno da fulerenol u nanomolnim koncentracijama ispoljava radioprotektivno delovanje. U cilju procene potencijalne biološke aktivnosti fule-

renola u *in vivo* sistemima neophodno je proučiti i njegovu apsorpciju, distribuciju i ekskreciju. Ovaj derivat brzo prolazi kroz telo, uglavnom se zadržavajući u jetri (73–92%) od 1 do 16 sati [16,22]. Značajno manja aktivnost je zabeležena u ostalim organima u toku prvih 6 časova. Biodistribucija fulerenola u miševa i zečeva pokazala je da se $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x$ distribuira u sva tkiva. Visok procenat ukupne aktivnosti derivata značajno se zadržava u toku 48 časova, posebno u bubrežima, kostima, slezini i jetri [22]. Sve studije biodistribucije fulerenola pokazuju slične puteve eliminacije, zadržavanja u tkivima i eliminaciju. Ovi podaci ukazuju na potencijalnu primenljivost fulerenola u tretmanu kancera, bilo kao hemio- ili radioprotektora, ili kao terapijski agens u tretmanu leukemija, koštanih tumora ili analgezije kostiju. Generalno, biološki efekti fulerena direktno zavise od njihove hemijske modifikacije i izloženosti UV/VIS zračenju. Pri niskim koncentracijama mogu delovati kao antioksidansi, dok više koncentracije mogu imati snažno prooksidativno dejstvo [16].

CILJ RADA

Cilj rada je da se ispita uticaj fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ kao citoprotektora u jednokratnoj aplikaciji doksorubicina na aktivnosti serumskih enzima kreatin kinaze (CK), aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) i α -hidroksibutirat-dehidrogenaze (α -HBDH) kod pacova u *in vivo* sistemu.

EKSPERIMENTALNI DEO

Doksorubicin hidrohlorid je dostupan u komercijalnom obliku Adrablastina[®] Pharmacia&Upjohn, Milano, Italija. Doksorubicin hidrohlorid je naranđasto-crvene, igličaste strukture, rastvoran u vodi i alkoholu, jakog i neprijatnog mirisa. Hemijska formula mu je $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$, molska masa iznosi 580 g/mol.

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ je sintetizovan originalnom metodom na Institutu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Za određivanje enzimske aktivnosti je korišćen Agilent 8453 UV/VIS spektrofotometar sa termostatisanim multićelijskim sistemom za pozicioniranje uzoraka i softverom za ispitivanje enzimske kinetike. Eksperiment je izvođen na odraslim Wistar pacovima, muškog pola, težine 180–220 g. Tokom eksperimenta životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima: sobna temperatura, stalna vlažnost vazduha, smenjivanje svetlosti i tame u trajanju od po 12 časova, slobodan pristup hrani i vodi.

Doksorubicin je davan i.p. u pojedinačnoj dozi od 10 mg/kg.

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ je tretiranim životinjama aplikovan i.p. u (dozama 50, 100 mg/kg) 30 minuta pre aplikacije doksorubicina.

Kontrolna grupa je primila 1 ml/kg fiziološkog rastvora.

Jedna grupa je tretirana samo fulerenolom (100 mg/kg i.p.)

Životinje su raspoređene u pet grupa od po osam individua i tretirane su na sledeći način:

I – kontrolna grupa (0,9% rastvor NaCl i.p.)

II – doksorubicin 10 mg/kg i.p.

III – fulerenol 50 mg/kg 30 minuta pre doksorubicina 10 mg/kg i.p.

IV – fulerenol 100 mg/kg 30 minuta pre doksorubicina 10 mg/kg i.p.

V – fulerenol 100 mg/kg i.p.

Životinje su žrtvovane 2. i 14. dana nakon tretmana, davanjem uretanske anestezije i.p. (25% uretan 4 ml/kg). Imobilizovane su dorzalno sa spontanom disanjem. Krv za analizu je uzeta punkcijom srca nakon otvaranja toraksa. uzorci su analizirani *ex tempore*, nakon odvajanja seruma iz pune krvi.

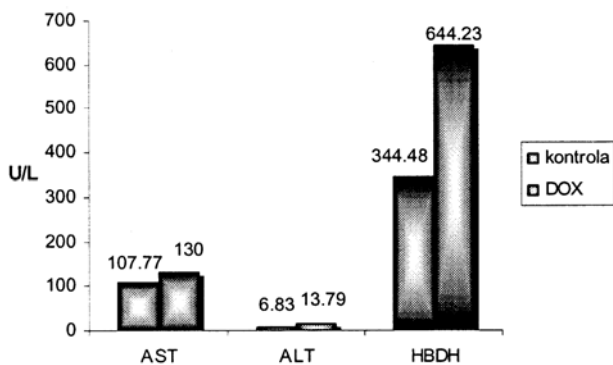
Dobijeni rezultati su obrađeni u Excel-u i predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, koristeći dvostrani Studentov T-test. Nivo značajnosti je 95% ($p < 0.05$).

REZULTATI ENZIMSKOG STATUSA 48 SATI I 14 DANA NAKON TRETMANA

Aktivnosti enzima u serumu pacova nakon 48 časova od aplikacije doksorubicina pokazala su statistički značajno povećanje svih ispitivanih enzima (AST, ALT, CK, LDH i α -HBDH) u odnosu na kontrolnu grupu (slika 3 i 4).

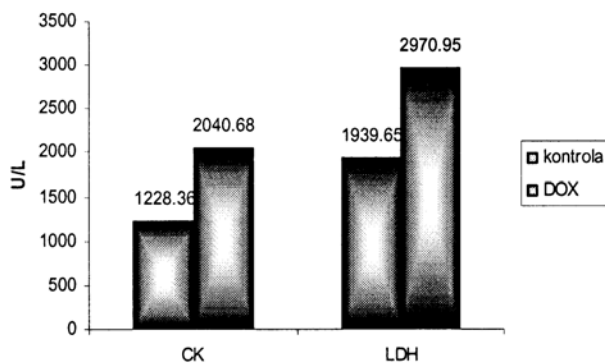
AST

Primena fulerenola pre citostatika u obema ispitivanim dozama, kao i samog fulerenola nije značajnije uticala na vrednosti ovog enzima u serumu ispitivanih životinja u odnosu na kontrolu (slika 5). Ispitivane vrednosti enzima AST 14 dana posle tre-



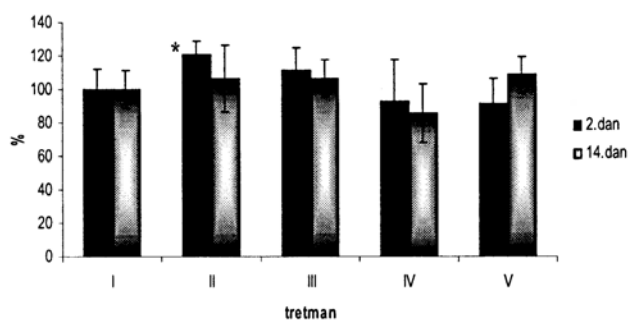
Slika 3. Aktivnosti enzima AST, ALT i α -HBDH 48 časova nakon jednokratne aplikacije doksorubicina

Figure 3. Specific activity of enzymes AST, ALT and α -HBDH two days after single dose administration of doxorubicin



Slika 4. Aktivnosti enzima CK i LDH 48 časova nakon jednokratne aplikacije doksorubicina

Figure 4. Specific activity of enzymes CK and LDH two days after single dose administration of doxorubicin



I – kontrola; II – doksorubicin 10 mg/kg; III – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 50 mg/kg; IV – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 100 mg/kg; V – fulerenol 100 mg/kg.

Slika 5. Uticaj fulerenola na serumsku aktivnost enzima AST 2 i 14 dana nakon jednokratne aplikacije doksorubicina

Figure 5. Influence of fullerene on specific activity of AST 48 hours and 14 days after single dose administration of doxorubicin

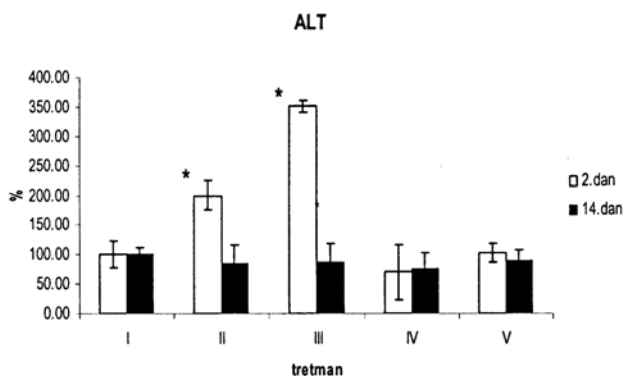
tmata ne pokazuju statistički značajnu razliku među tretiranim grupama.

ALT

Serumska aktivnost enzima ALT, dva dana posle tretmana, statistički je značajno povećana u grupi tretiranoj samo doksorubicinom (II) u odnosu na kontrolu (slika 6). Za razliku od aplikacije doze od 100 mg/kg fulerenol nije uspeo da značajno smanji aktivnost ovog enzima kada je primenjen u dozi od 50 mg/kg. Ispitivane vrednosti enzima ALT 14 dana posle tretmana ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa.

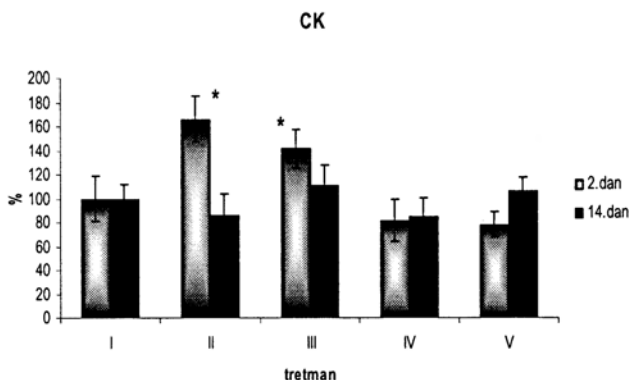
CK

Aktivnost enzima kreatin kinaze, 2 dana nakon tretmana, u serumu je statistički značajno povećana u grupi tretiranoj doksorubicinom (II) i grupi koja je prethodno primila fulerenol u dozi od 50 mg/kg (III), u odnosu na kontrolu. Grupa koja je pretretirana fulerenolom u dozi od 100 mg/kg i grupa koja je primila samo fulerenol su pokazale specifične aktivnosti ovog



I – kontrola; II – doksorubicin 10 mg/kg; III – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 50 mg/kg; IV – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 100 mg/kg; V – fulerenol 100 mg/kg).

Slika 6. Uticaj fulerenola na serumsku aktivnost enzima ALT 2 i 14 dana nakon jednokratne aplikacije doksorubicina
Figure 6. Influence of fullerene on specific activity of ALT 48 hours and 14 days after single dose administration of doxorubicin



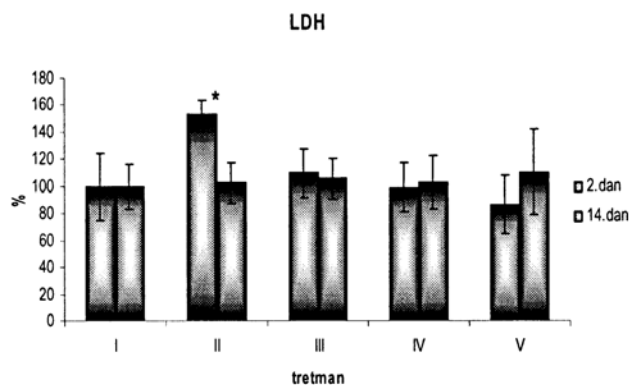
I – kontrola; II – doksorubicin 10 mg/kg; III – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 50 mg/kg; IV – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 100 mg/kg; V – fulerenol 100 mg/kg).

Slika 7. Uticaj fulerenola na serumsku aktivnost enzima CK 2 i 14 dana nakon jednokratne aplikacije doksorubicina
Figure 7. Influence of fullerene on specific activity of CK 48 hours and 14 days after single dose administration of doxorubicin

enzima u nivou kontrole (slika 7). Ispitivane vrednosti enzima CK 14 dana posle tretmana ne pokazuju statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa.

LDH

Serumska aktivnost enzima LDH se statistički značajno povećava kod pacova 2 dana nakon tretmana doksorubicinom, da bi 14 dana posle njegove primene praktično bila u nivou kontrole. Prethodna primena fulerenola, u obe ispitivane doze, je u potpunosti sprečila pomenuti porast ovog enzima izazvan citostatikom drugog dana nakon aplikacije. Četrnaestog dana nakon primene tretmana vrednosti LDH u šticećenim grupama se nisu značajno razlikovale od kontrole, kao ni kod životinja koje su dobijale samo fulerenol (slika 8).

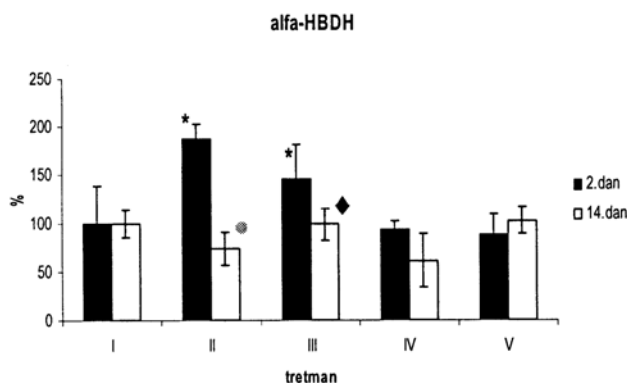


I – kontrola; II – doksorubicin 10 mg/kg; III – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 50 mg/kg; IV – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 100 mg/kg; V – fulerenol 100 mg/kg).

Slika 8. Uticaj fulerenola na serumsku aktivnost enzima LDH 2 i 14 dana nakon jednokratne aplikacije doksorubicina
Figure 8. Influence of fullerene on specific activity of LDH 48 hours and 14 days after single dose administration of doxorubicin

α -HBDH

Aktivnost serumskog izoenzima laktat dehidrogenaze –HBDH pokazuje statistički značajan porast u grupi pacova tretiranoj samo doksorubicinom, 48 sati od tretmana (slika 9). Prethodna primena fulerenola u dozi od 50 mg/kg nije značajno smanjila aktivnost ovog enzima. Aktivnost enzima α -HBDH, kod grupe koja je šticećena fulerenolom u dozi od 100 mg/kg, bila je u nivou kontrole i statistički značajno manja nego u grupi koja je tretirana samo doksorubicinom. Ispitivane vrednosti ovog enzima 14 dana posle tretmana su statistički značajno manje u odnosu na 2 dana posle primene citostatika. U grupama životinja koje su prethodno primile obe doze fulerenola ili sam fulerenol, vrednosti α -HBDH u serumu se nisu značajnije razlikovale od kontrolnih.



I – kontrola; II – doksorubicin 10 mg/kg; III – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 50 mg/kg; IV – doksorubicin 10 mg/kg + fulerenol 100 mg/kg; V – fulerenol 100 mg/kg).

Slika 9. Uticaj fulerenola na serumsku aktivnost enzima α -HBDH 2 i 14 dana nakon jednokratne aplikacije doksorubicina
Figure 9. Influence of fullerene on specific activity of α -HBDH 48 hours and 14 days after single dose administration of doxorubicin

DISKUSIJA

Nivo aktivnosti enzima u krvi je rezultat ravnoteže ulaska enzima u cirkulaciju i brzine izlaska iz cirkulacije ili inaktiviranja. Najosetljiviji indikator oštećenja ćelija su enzimi koji se nalaze u citosolu jer oni dospevaju u krv i pri najmanjem oštećenju ćelije. Za većinu organa moguće je odabrati jedan broj specifičnih enzima i izoenzima, kao i organski nespecifičnih enzima, koji predstavljaju njihovu enzimsku sliku i mogu se koristiti u dijagnostici različitih oboljenja organa. Za to je odgovorna povećana propustljivost ćelijske membrane koja je posledica oksidativnog stresa i sledstveno tome lipidne peroksidacije. Višestruko uvećana aktivnost ovih enzima u plazmi, kao posledice oksidativnog oštećenja je uočena u mnogobrojnim eksperimentima u kojima je oksidativni stres izazvan na različite načine:

- Stanja ishemije i reperfuzije organa
- Infarkt miokarda
- Iradijacije

Povećanje serumske koncentracije AST, CK, LDH i izoenzima laktat dehidrogenaze α -HBDH, predstavlja kvantitativan indeks poremećenog integriteta kardiomiocita te može biti pokazatelj oštećenja doksorubicinom.

U našim eksperimentima, grupe životinja koje su tretirane doksorubicinom, 48 sati nakon aplikacije pokazuju statistički značajan porast aktivnosti svih ispitivanih enzima u serumu [26]. Ova činjenica ukazuje na izraženo akutno oštećenje ćelijske membrane. Ovi podaci su u saglasnosti sa literaturnim navodima, prema kojima dolazi do oštećenja ćelijske membrane usled masovne produkcije slobodnih radikala indukovane doksorubicinom [18,27,28]. Statistički značajno povećanje aktivnosti ALT ukazuje na to da doksorubicin svoje toksično dejstvo ispoljava i na jetri kao drugom ciljnom organu [26]. Aktivnosti enzima u grupama životinja koje su primale fulerenol u dozi od 100 mg/kg pre aplikacije doksorubicina, 48 sati nakon tretmana su na nivou vrednosti kontrolne grupe. Enzimski aktivnost AST i LDH, u grupama šticećenim sa 50 mg/kg fulerenola, u rangu je kontrolnih životinja. Ovo nije slučaj sa ostalim ispitivanim enzimima, gde pomenuta doza nije dovoljna da bi se ispoljio protektivni efekat. Primena fulerenola u dozi od 100 mg/kg nije izazvala promenu u enzimskom statusu ispitivanih enzima ni 48 sati, kao ni dve nedelje nakon tretmana, kada aktivnosti enzima u ispitivanim grupama međusobno ne pokazuju statistički značajne razlike. Ovo ukazuje na aktiviranje kompenzatornih mehanizama ćelije i reverzibilnost poremećaja koji dovodi do porasta serumske aktivnosti posmatranih enzima. Slični rezultati dobijeni su i kod pacova kojima je kao pretretman doksorubicinu davan amifostin [29].

ZAKLJUČAK

1) Jednokratna primena doksorubicina u dozi od 10 mg/kg izaziva statistički značajan porast aktiv-

nosti enzima AST, ALT, CK, LDH i HBDH u nivou kontrolne grupe, 48 sati nakon tretmana.

2) Aktivnosti enzima u grupama životinja koje su primale fulerenol u dozi od 100 mg/kg pre aplikacije doksorubicina, 48 sati nakon tretmana su u nivou vrednosti kontrolne grupe.

3) Enzimski aktivnost AST i LDH, u grupama šticećenim sa 50 mg/kg fulerenola, je u rangu kontrolnih životinja. Ovo nije slučaj sa ostalim ispitivanim enzimima, gde pomenuta doza nije dovoljna da bi se ispoljio protektivni efekat.

4) Primena fulerenola u dozi od 100 mg/kg nije izazvala promenu u enzimskom statusu ispitivanih enzima ni 48 sati, kao ni dve nedelje nakon tretmana, kada aktivnosti enzima u ispitivanim grupama međusobno ne pokazuju statistički značajne razlike.

5) Dobijeni rezultati sersuskog statusa pacova nakon primene kombinacije doksorubicina i fulerenola ukazuju na očuvan integritet membrane kardiomiocita i fulerenol kao potencijalni protektor u terapiji doksorubicinom.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je deo naučnog projekta broj 142076, koje finansira Ministarstvo za nauku Republike Srbije. Biljana Govedarica, mag. farm. je stipendista Ministarstva za nauku Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] B.A. Chabner, C.J. Alegra, G.A. Curt, P. Calabresi, Antineoplastic Agents. In: G.J. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, (eds.), Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutic, McGraw-Hill, New York, 1996, 1233-1287.
- [2] G. Bonadonna, P. Valagudda, Primary Chemotherapy In: Operable Breast Cancer. Semin. Oncol. **23** (1996) 464-474.
- [3] M. Binashi, M. Bagioni, A. Cipollone, C. Rossi, C. Goso, C.A. Maggi, G. Capranico, F. Animati, Anthracyclines: selected new developments. Cur. Med. Chem. **1** (2001) 113-130.
- [4] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.F. Smalley, Nature **318** (1985) 162.
- [5] C. Dollery, Therapeutic Drugs, 2nd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
- [6] S. Deguchi, R.G. Alargova, K. Tsujii, Stable dispersions of fullerenes C₆₀ and C₇₀ in water: Preparation and characterization, Langmuir **17** (2000) 6013-6017.
- [7] D.M. Guldi, M. Prato, Excited state properties of C₆₀ fullerene derivatives, Acc. Chem. Res. **33** (2000) 695-703.
- [8] E.E.B. Cambell (ed), Fullerene collision reaction, Kluwer Academic Publishers, Boston, 2003.
- [9] K. Prassides (ed), Fullerene based materials, Springer, Berlin, 2004.
- [10] G. Xing, J. Zhang, Y. Zhao, J. Tang, B. Zhang, X. Gao, H. Yuan, L. Qu, W. Cao, Z. Chai, K. Ibrahim, R. Su, Influences of structural properties on stability of fullerenols. J. Phys. Chem. **B 108** (2004) 11473-11479.
- [11] L.Y. Chiang, J.B. Bhonsle, L. Wang, Efficient one-flask synthesis of water soluble Š60Cfullerenols, Tetrahedron **52** (1996) 4963-4972.
- [12] Z. Jian Min, Y. Wen, H. Ping, Z. Shi-Zheng, Efficient and convenient preparation of water soluble fullerenol, Chin J. Chem. **22** (2004) 1008-1011.

- [13] N. Schnider, A. Derwish, H. Kroto, R. Taylor, D. Walton, Formation of fullerenols via hydroboration of fullerene C₆₀, *J. Chem. Soc. Commun.* (1994) 463–464.
- [14] A. Djordjevic, M. Vojinovic–Miloradov, N. Petranovic, A. Devcerski, D. Lajar, B. Ribar, Catalytic preparation and characterization of C₆₀Br₂₄, *Fullerene Sci. Technol.* **6** (1998) 689–694.
- [15] A. Djordjevic, J. Canadanovic–Brunet, M. Vojinovic–Miloradov, G. Bogdanovic, Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullereneol C₆₀(OH)₂₄, *Oxid Commun* **27** (2005) 806–812.
- [16] A. Djordjevic, G. Bogdanovic, S. Dobric, Fullerenes in biomedicine, *J. BUON* (2006) 391–404.
- [17] S. Mirkov, A. Djordjevic, N. Andric, S. Andric, T. Kostic, G. Bogdanovic, M. Vojinovic–Miloradov, R. Kovacevic, Nitric oxide–scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* **11** (2004) 201–207.
- [18] V. Kojić, D. Jakimov, G. Bogdanović, A. Djordjević, Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines, *Mater. Sci. Forum*, **494** (2005) 543–548.
- [19] G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Djordjevic, J. Canadanovic–Brunet, M. Vojinovic–Miloradov, V. Baltic, Modulating activity of fullereneol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin induced cytotoxicity, *Toxicol. in Vitro* **18** (2004) 629–637.
- [20] S. Trajkovic, S. Dobric, V. Jacevic, V. Dragojevic–Simic, Z. Milovanovic, A. Djordjevic, Tissue–protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine, *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **58** (2007) 39–43.
- [21] S. Trajkovic, S. Dobric, A. Djordjevic, V. Dragojevic–Simic, V. Milovanovic, Radioprotective efficiency of fullereneol in irradiated mice, *Mater Sci Forum* **494** (2005) 549–554.
- [22] L. Quingnuan, X. Yan, Z. Xiaodong, L. RuiLi, D. Qieqie, S. Xiaoguang, C. Shaoliang, L. Wenxin, Preparation of ^{99m}Tc–C₆₀(OH)_x and its biodistribution studies, *Nucl. Med. Biol* **29** (2002) 707–710.
- [23] A. Gnanaprasam, S. Yogeeta, R. Subhashini, K.K. Ebenezer, V. Sathish, T. Devaki, Adriamycin induced myocardial failure in rats: protective role of *Centella Asiatica*, *Mol. Cell. Biochem.* **294** (2006) 55–63.
- [24] P.R. Deepa, P. Varalakshmi, Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin induced cardiac and hepatic toxicity, *Chem. –Biol. Interact* **146** (2003) 201–210.
- [25] M. Dardir, E.H. Herman, V.J. Ferrans., Effects of ICRF–187 on the cardiac and renal toxicity of epirubicin in spontaneously hypertensive rats, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **23** (1989) 267–275.
- [26] V. Dordević–Milić, Ispitivanje kardioprotektivne efikasnosti i mehanizma zaštitnog dejstva fulerenola kod pacova tretiranih doksorubicinom, *Doktorska disertacija*, decembar 2007.
- [27] J.E.F Raynolds (ed.) *Martindale The Extra Pharmacopeia*, Pharmaceutical Press, London, 1996.
- [28] L.P. Zakharenko, I.K. Zakharov, E.A. Vasiunina, T.V. Karamysheva, A.M. Danilenko, A.A. Nikiiforov, Determination of the genotoxicity of fullerene C₆₀ and fullerol using the method of somatic mosaics on cells of *Drosophila melanogaster* wing and SOS–chromatetest, *Genetika* **33** (1997) 405–407.
- [29] A.K. Conklin, Coenzyme Q 10 for prevention of anthracycline Induced Cardiotoxicity, *Cancer Ther* **4** (2005) 110–130.

SUMMARY

INFLUENCE OF FULLERENOL C₆₀(OH)₂₄ ON ENZYME STATUS IN SERUM OF RATS AFTER SINGLE DOSE ADMINISTRATION OF DOXORUBICINE

(Scientific paper)

Biljana Govedarica¹, Vukosava Djordjević–Milić¹, Nataša Radić², Branislava Srdjenović¹, Aleksandar Djordjević³

¹Medical Faculty, Institute of Pharmacy, University of Novi Sad

²Faculty of Pharmacy, Department for Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana

³Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Novi Sad

The anthracycline antibiotics have one of the widest areas of use in oncology. The most investigated mechanisms of their antineoplastic activity include: interactions of these antibiotics with DNA, inhibition of topoisomerase II and production of free radicals. However, the side effects of doxorubicin, especially cardiotoxicity, are the limiting factor of its use in cancer therapy. The aim of this research was to investigate the influence of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ as a cytoprotector in single dose administration of doxorubicin on the activity of enzymes in serum (CK, AST, ALT, LDH and α–HBDH) in rats in *in vivo* system.

Activity of enzymes (CK, LDH, HBDH, AST, and ALT) in serum was measured with standard commercial methods. The results of analysis of the samples treated with the combination of fullereneol and doxorubicin show no difference in enzyme activity in comparison with the control group. The results indicate the possibility of using fullereneol as a protector in the therapy with doxorubicin in malign neoplasm.

Key words: Cardioprotection • Doxorubicin • Fullereneol •

Ključne reči: Fulerenol • Doksorubicin • Citoprotektor •