

RADE INJAC¹
NATAŠA RADIĆ¹
BILJANA GOVEDARICA²
ALEKSANDAR ĐORĐEVIĆ³
BORUT ŠTRUKELJ¹

¹Fakulteta za farmaciju, Katedra za farmaceutsko biologiju, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

²Fakulteta za farmaciju, Katedra za farmaceutsko tehnologiju, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

NAUČNI RAD

UDK 615.33:616-006:59:
:661.12:546.26

DOI: 10.2298/HEMIND0903259I

ISPITIVANJE KARDIO- I HEPATO-PROTEKTIVNOSTI FULERENOLA *IN VIVO* U HRONIČNOJ DOKSORUBICINSKOJ TERAPIJI KOLOREKTALNIH TUMORA KOD PACOVA*

Cilj rada je proučiti efekte doksorubicina na srce i jetru pacova nakon višestruke aplikacije (1.5 mg kg^{-1} nedeljno, 3 nedelje), praćenjem: biohemijskih, elektrofizioloških, hematoloških i patohistoloških parametara, kao i uticaja na miokard i hepatocite pacova prethodno šticeh fulerenolom (25, 50 ili 100 mg/kg/nedeljno, 3 nedelje). Enzimski aktivnost (SOD, MDA, GSH, GSSH, GPx, CAT, CK, LDH, α -HBDH, AST, ALT) u serumu i homogenatu jetre i srca, krvna slika i patohistološke karakteristike rađene su komercijalnim metodama. Preventivna primena fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ značajno je smanjila kardiotoksičnost i hepatotoksičnost izazvanu doksorubicinom u terapiji kolorektalnih tumora. Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ nakon pretretmanske i.p. aplikacije u sve tri doze, statistički značajno smanjuje oštećenje srca i jetre kod pacova sa kolorektalnim tumorima koji su tretirani doksorubicinom.

Fulereni predstavljaju relativno novu grupu jedinjenja, sfernog oblika, koji se sastoje isključivo iz atoma ugljenika (slika 1a). Od otkrivanja 1985. godine, intenzivno se ispituju njihove fizičke i hemijske osobine i biološka upotrebljivost fulerena i njihovih derivata. Fuleren C_{60} je, nasuprot dijamantu i grafitu, hemijski veoma reaktivan [1–3]. Modifikacijom fulerena C_{60} dobijeni su brojni hidrofilni, biološki aktivni molekuli, među kojima su se kao najzanimljiviji u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima pokazali polihidroksilovani fulerenovi derivati, C_{60} -fulerenoli ($C_{60}(OH)_n$, $n = 2–28$). U dosadašnjim studijama u hemijskim i biološkim modelnim sistemima pokazali su izvanredno visoku antioksidativnu aktivnost [4–6], i potencijalno protekturno delovanje u terapijama različitih vrsta tumora, tretmanima degenerativnih cerebralnih oboljenja kao što su Alchajmerova i Parkin–sonova bolest i u terapijama hepatitisa C i HIV-a. Pored navedenog, derivati C_{60} , sintetisani vezivanjem različitih funkcionalnih grupa ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$) na fulerensko jezgro su novi kandidati sa potencijalnim antibakterijskim, imunomodulatornim, antioksidativnim i radio-protektivnim delovanjem [7–10].

Rezultati ukazuju da polihidroksilovani fuleren, $C_{60}(OH)_n$, iskazuje antioksidantni efekat na RAW 264.7 makrofagnoj ćelijskoj liniji [11], kao i da signifikantno redukuje doksorubicinsku toksičnost na humanim ćelijskim linijama raka dojke [9]. Predpostavljeni mehanizmi delovanja uključuju inaktivaciju hidroksilnog (OH^\bullet), superoksidnog ($O_2^{\bullet-}$) i azot-oksidnog (NO^\bullet) radikala [10,12].

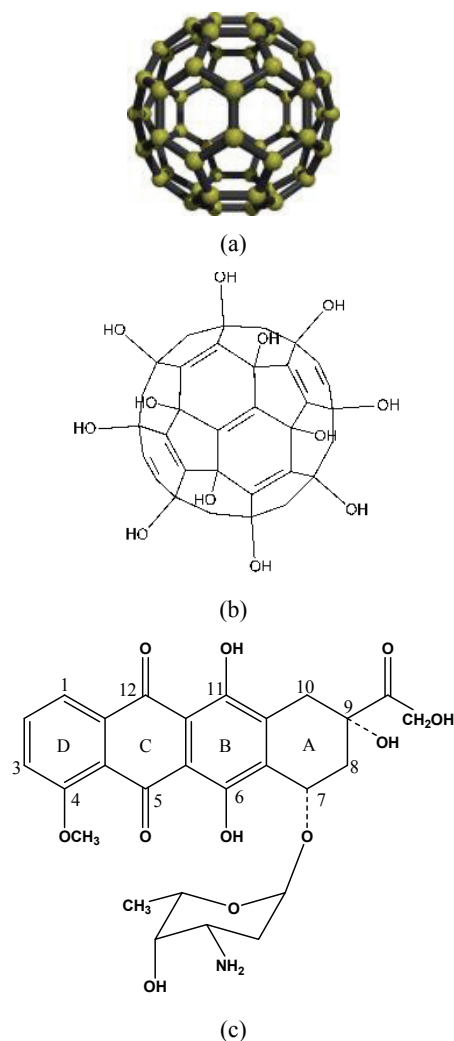
*Rad saopšten na skupu „Sedmi seminar mladih istraživača“, Beograd, 22–24. decembar 2008.

Autor za prepisku: R. Injac, Fakulteta za farmaciju, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija.

E-pošta: injacrade@gmail.com

Rad primljen: 22. decembar 2008.

Rad prihvaćen: 4. mart 2009.



Slika 1. Strukture fulerena, C_{60} , (a), fulerenola, $C_{60}(OH)_{24}$, (b) i doksorubicina (c).

Figure 1. Structures of fullerene, C_{60} , (a), fullerenol, $C_{60}(OH)_{24}$, (b) and doxorubicin (c).

Fulerenol, $C_{60}(OH)_{24}$ (Frl), je smeđa, amorfna, higroskopska praškasta supstanca (slika 1b). U vodi je slabo rastvorljiv (do 50 mg/L). Stabilan je pri dnevnoj svetlosti i sobni temperaturi. Sa metalnim jonima stvara smeđ talog. U kiselj sredini je stabilan, dok je u alkalnoj prisutan u jonizovanom obliku $C_{60}(OH)_{24-n} (ONa)_n$. Vodeni rastvor je smeđe boje i ne daje karakteristične vrhove u UV/Vis spektru. Frl reagije sa oksidujućim sredstvima, halogenima i kiselinama. Hidroksilne grupe u molekulu $C_{60}(OH)_{24}$ imaju osobine terciarnih alkoholnih grupa [4,13,14], a najreaktivnije su dvostruke veze, koje povezuju pentagonske strukture. Reaktivni radikali, prisutni u biološkom sistemu, po unosu Frl-a nekovalentno se vežu na njegovu površinu [13]. Interakcija između hidroksilnog radikala i Frl-a temelji na radikalskoj adiciji hidroksilnog radikala $(OH^{\bullet})_{2n}$ na olefinske dvostruke veze fulerenolovog obruča, pri čemu kao proizvod nastaje $C_{60}(OH)_{24} + (OH^{\bullet})_{2n}$ ($n = 1-12$). Drugi moguć mehanizam je da Frl preda svoj vodonik radikal OH^{\bullet} , pri čemu nastaje stabilan radikal $C_{60}(OH)_{23}O^{\bullet}$ [15].

Ispitivanje biodistribucije Frl-a ukazuje na brzu raspodelu u sistemskej cirkulaciji i drugim organima, izuzev mozga. Klirens Frl-a iz srca, pluća, mišića, kože i creva je jednak klirensu iz sistemske cirkulacije. Sa druge strane, akumulacija u jetri, kostima, bubrezima, slezini i želucu je signifikantno veća nego u drugima organima [16]. Uglavnom se zadržava u jetri (73–92%) od 1 do 16 časova [15]. Visok procenat ukupne aktivnosti derivata se značajno zadržava u toku 48 časova, posebno u bubrezima, kostima, slezini i jetri [17]. Dobijeni podaci o biodistribuciji Frl-a ukazuju na potencijalnu primenu Frl-a u tretmanu malignih tumora, bilo kao hemio- ili radio- protektora, ili kao terapijski agens u tretmanu leukemija, koštanih tumora ili analgezije kostiju [18].

Doksorubicin (Doks) je najčešće upotrebljivani antitraciklinski antibiotik u terapiji različitih neoplazmi. Najvažnije indikacije za njegovu upotrebu su limfomi, akutne leukemije i solidni tumori kao što su karcinom dojke, mikrocelularni karcinom pluća, karcinom mokraćne bešike, štitnjače i želuca, sarkomi mekih tkiva i kostiju, neuroblastomi i Wilmsov tumor [19]. Efekti delovanja Doks-a nastaju kao rezultat više različitih biohemijskih mehanizama. Hinonska struktura na prstenu C (slika 1c) je potencijalni izvor slobodnih radikala i može uzrokovati početak procesa lipidne peroksidacije koji dalje dovodi do povećanja permeabilnosti ćelijske membrane i programirane ćelijske smrti [18].

Tokom prethodnih *in vivo* ispitivanja na životinjskom modelu, pokazano je da fulerenol ima antioksidativnu aktivnost i zaradi toga je uključen u *in vivo* istraživanja kao potencijalni organo-protektor pri doksorubicinskej terapiji [8,20–25].

Na tržištu su trenutno dostupni polihidroksilirani derivati fulerena $C_{60}(OH)_n$, proizvođača Nano-C (SAD), Alfa Aesar (Nemačka) i Mer Corporation (SAD).

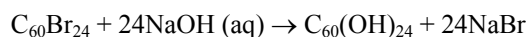
Cilj rada

Cilj rada je bio da se ispituju efekti doksorubicina na srce i jetru pacova nakon višestruke aplikacije (1.5 mg kg^{-1} nedeljno, 3 nedelje), praćenjem: biohemijskih, elektrofizioloških, hematoloških i patohistoloških parametara, kao i uticaja na miokard i hepatocite pacova prethodno šticejenih fulerenolom (25, 50 ili 100 mg kg^{-1} nedeljno, 3 nedelje).

MATERIJAL I METODE

Fulerenol, $C_{60}(OH)_{24}$, (Priridno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija) rastvoren je u sterilnom i apirogenom rastvoru (0,9% NaCl: :DMSO 80:20, m/m) u koncentraciji 10 mg/mL u laminarnoj komori neposredno pre upotrebe. Strukture fulerena i fulerenola su prikazane na slici 1.

Fulerenol se sintetiše po originalnem postupku [13]:



Iako postupak nije previše komplikovan, dobijanje produkta stepena čistoće iznad 95% veoma je teško. Sinteza se sastoji iz sledećih koraka: 150 mg $C_{60}Br_{24}$ tretirano je sa 5 mL 0,1 mol/dm³ rastvorom NaOH. Posle 30 min mešanja na sobnoj temperaturi, pH alkalnog rastvora se snižava dodavanjem 0,1 mol/dm³ HCl do pH 4,5. Rastvor se potom uparava do suva pod sniženim pritiskom na 40 °C. Reakciona smeša se ispira tri puta sa po 25 mL metanola i dva puta sa po 25 mL smeše etanol:voda (1:1). Na kraju se fulerol spira sa 50 mL destilovane vode, i zatim suši na 50 °C [13].

Doksorubicin (Doks) (Adriablastina[®], Pharmacia & Upjohn, Milano, Italija) rastvor za i.p. aplikaciju je pripremljen rastvaranjem u sterilnom i apirogenom fiziološkom rastvoru (2 mg/mL) u laminarnoj komori neposredno pre upotrebe.

Vitamin C (Vitamin C[®] ampule, Galenika a.d. Beograd, Srbija) (VitC) je pripreman tako da je 500 mg askorbinske kiseline rastvoreno u 5 mL vode za injekcije.

1,2-dimetilhidrazin (DMH) (Fluka Chemie, Švajcarska) pripremljen je standardnom metodom [25]. Rastvor je pripreman neposredno pred upotrebu rastvaranjem u 0,001 M EDTA, i podešavanjem konačnog pH rastvora na 6,8.

Pacovi vrste *Wistar*, muškog pola (Medicinski eksperimentalni centar, Ljubljana, Slovenija) tokom sedme nedelje starosti preuzeti su i raspoređeni po tri ili četiri u zajedničke kaveze. Tokom eksperimenta, životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima: sobna temperatura (22–23 °C), vlažnost vazduha 55±10%, smenjivanje svetlosti i tame u trajanju od po 12 časova, slobodan pristup hrani (Altromin, Nemačka) i vodi.

Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa propisima Evropske Konvencije za zaštitu i upotrebu životinja u laboratorijske svrhe (ETS 123) i uz dozvolu Veterinarske Uprave Republike Slovenije (licenca 34401-61/2007/7).

Životinje su na početku eksperimenta metodom slučajnog izbora podeljene u devet grupa od po 10 jedinki i tretirane na sledeći način:

- 1) zdrava kontrolna grupa – fiziološki rastvor (nedeljno),
- 2) kancer kontrolna grupa – DMH + fiziološki rastvor/DMSO (80/20, m/m; nedeljno),
- 3) doksorubicinska grupa – DMH + Doks 1.5 mg kg⁻¹ nedeljno [26–30],
- 4) fulerenol/doksorubicinska grupa – DMH + Frl 100 mg kg⁻¹ nedeljno [8,20–23] 30 min pred Doks 1.5 mg kg⁻¹ nedeljno,
- 5) fulerenol/doksorubicinska grupa – DMH + Frl 50 mg kg⁻¹ nedeljno 30 min pred Doks 1.5 mg kg⁻¹ nedeljno,
- 6) fulerenol/doksorubicinska grupa – DMH + Frl 25 mg kg⁻¹ nedeljno 30 min pred Doks 1.5 mg kg⁻¹ nedeljno,
- 7) Vitamin C/doksorubicinska grupa – DMH + VitC 100 mg kg⁻¹ nedeljno [31–33] 30 min pred Doks 1.5 mg kg⁻¹ nedeljno,
- 8) fulerenolska grupa – DMH + Frl 100 mg kg⁻¹ nedeljno,
- 9) Vitamin C grupa – DMH + VitC 100 mg kg⁻¹ nedeljno.

Eksperimentalne životinje iz 2–9 grupe su intraperitonealno tretirane 1,2-dimetilhidrazinom (DMH), jednom nedeljno, tokom 15 nedelja u cilju hemijske indukcije kolorektalnih tumora (slika 2). Pacovi su tretirani Doks-om (1.5 mg/kg), Frl-om (25, 50, 100 mg/kg) i/ili vitaminom C (100 mg/kg) u 24., 25. i 26. nedelji starosti. Doza Frl-a odabrana je na osnovu preliminarnih *in vivo* studija na zdravim odraslim Wistar pacovima [34–36] kao i studija akutne toksičnosti Doks-a na *in vivo* modelu raka dojke na pacovima [8,21,23]. Sedam dana nakon poslednje aplikacije (27 nedelja starosti) euta-

nazija je izvršena ugljenik-dioksidom. Svih 90 životinja je preživelo tretman do eutanazije.

Krv za analizu je uzeta srčanom punkcijom na otvorenoj grudnoj regiji. Podeljena je u dve porcije od čega je 200 μL stabilisano antikoagulansom i korišćeno za hematološku analizu, a preostali deo krvi je nakon 2 sata stajanja na sobnoj temperaturi centrifugiran i serum odvojen za analizu aktivnosti serumskih enzima (ALT, AST, CK, LDH, α-HBDH).

Svako srce i jetra su odvojeni od žrtvovane životinje, isečeni na komade i homogenizovani u Tris puferu (pH 7,4; masa organa/količina pufera 1:10; m/m). Grubi homogenat je podeljen na dva dela. Jedan deo je korišćen za analizu MDA, a drugi je centrifugiran na 13.000 o/min tokom 20 min na 4 °C (Beckman, Ultracentrifuga). Supernatant je korišćen za analizu ukupnih proteina (TP), glutationa (GSH, GSSG), glutation-preoksidaze (GPx), glutation-reduktaze (GR), katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD), totalnog antioksidativnog statusa (TAS), laktat dehidrogenaze (LDH) Analize su izvedene po prethodno opisanim postupcima [8,21].

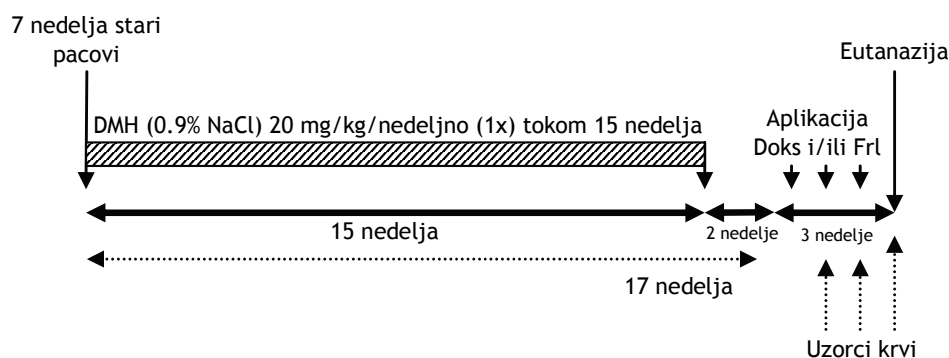
Odnos mase srca i jetre i telesne mase je računat u cilju praćenja makroskopskih promena na srcu i jetri.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Radi poređenja među grupama upotrebljena je ANOVA praćena LSD *post hoc* testom (SPSS 15.0 za Windows). Nivo značajnosti je 95% (a: p < 0,05; b: p < 0,01; c: p < 0,001).

REZULTATI I DISKUSIJA

Patohistološke promene

Tokom autopsije, srca i jetre su isečeni i izmereni. Uzorci tkiva svakog srca i jetre su fiksirani u 10% puferovanom formaldehidu i poslani na histološku analizu. Svi uzorci tkiva su potopljeni u parafin, serijsko sečeni na po 4 μm i bojeni *haematoxylin-eosin*-om. U grupama tretiranim samo Doks-om i samo Frl-om makroskopskim pregledom je primećeno oticanje jetre. U grupi tretiranoj Doks-om i 100 mg/kg Frl-a primećena je bilateralna dilatacija srca. Ove promene su u korelaciji sa



Slika 2. Eksperimentalni protokol.
Figure 2. Experimental protocol.

vrednostima koeficijena organa (tabela 1). Koeficijent organa je odnos mase organa po obdukciji (mg) i telesne mase životinje po eutanaziji (g). Najznačajnija varijacija je u vrednosti koeficijena jetre i u saglasnosti je sa već objavljenim rezultatima [8,37].

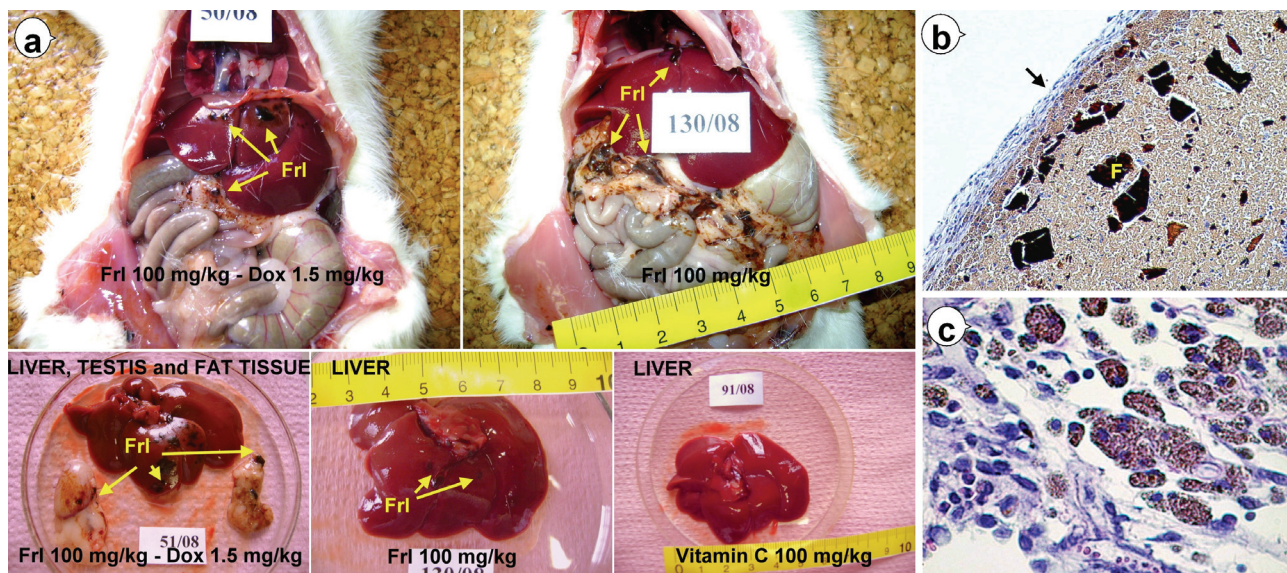
Kada je Frl aplikovan u dozi 100 mg/kg, približno 20% od primenjene količine je ostalo neapsorbirano zbog slabe rastvorljivosti i veličine čestice Frl-a. Ta količina se akumulirala na ventralnoj strani abdomena naročito na površini jetre, u abdominalnom masnom tkivu i skrotumu što uzrokuje stvaranje granuloma (inkapsulirani kristali nerastvorenog Frl-a zajedno sa makrofagima sa fagocitovanim česticama Frl-a) (slika 3). Akumulacija nerastvorenog Frl-a je bila dozno zavisna jer se količina nakupljenog Frl-a smanjivala sa smanjenjem doze od 100 do 25 mg/kg.

U dozi od 1,5 mg/kg koja odgovara terapeutskoj dozi, Doks je izazvao formiranje vakuola u srčanom tkivu, jasno ograničen gubitak miofibrila, nekrozu, umerenu infiltraciju limfoidnih ćelija u srčano tkivo (slika 4). U tkivu jetre Doks je doveo do nekroze, degeneracije parenhima i polimorfizma hepatocita (slika 4). Tretman Frl-om u sve tri doze je signifikantno smanjio srčane lezije u poređenju sa Doks grupom. Međutim, protektivni efekat Frl-a na Doks-om izazvanu vakuolizaciju kardiomiocita, infiltraciju srca limfoidnim ćelijama je detektovan samo pri dozama od 25 i 50 mg/kg. Moguće je da su više doze Frl-a citotoksične zbog veće količine aplikovanog DMSO-a [38]. Zanimljivo je to da se signifikantni protektivni efekat Frl-a na histološke poremećaje izazvane Doks-om povećava sa smanjenjem doze Frl-a. U poređenju sa oštećenjima srčanog i jetrenog tki-

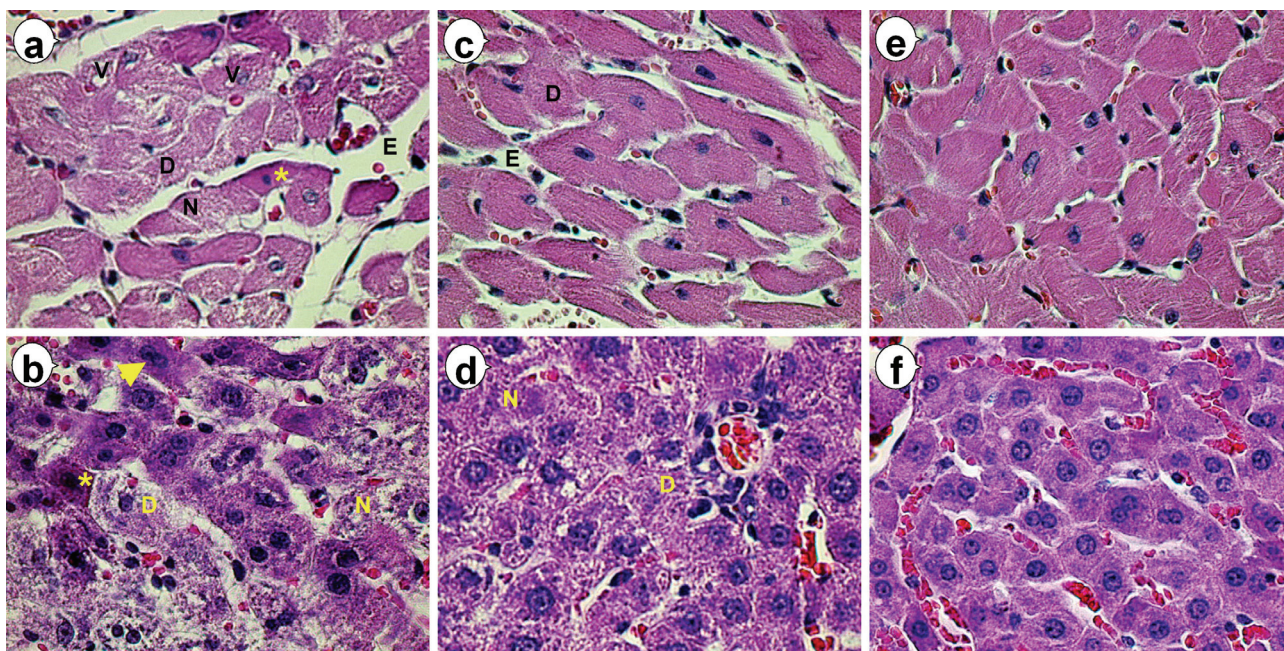
Tabela 1. Telesna masa pacova i koeficijenti srca i jetre nakon eutanazije; procena promena u EKG-u

Table 1. Body weights of rats and coefficients of heart and liver after sacrificing; Evaluation of ECG alterations

Grupa	Telesna masa (g)	Koeficijent srca (mg/g)	Koeficijent jetre (mg/g)	QRS (ms)	aQRS (mV)	SαT (ms)	Puls (udar/min)
1	526,4 ± 21,0	2,5 ± 0,3	28,6 ± 2,7	16,3 ± 0,6	0,94 ± 0,11	16,3 ± 2,4	270,3 ± 6,5
2	410,1 ± 36,3	2,8 ± 0,2	30,1 ± 1,9	18,3 ± 2,2	1,03 ± 0,03	22,0 ± 1,2	291,5 ± 35,5
3	387,7 ± 15,6	2,7 ± 0,2	33,1 ± 1,7	22,5 ± 0,9	0,73 ± 0,29	29,3 ± 1,3	239,3 ± 31,5
4	390,4 ± 27,0	2,4 ± 0,2	33,0 ± 1,9	19,3 ± 2,9	0,93 ± 0,03	24,0 ± 6,0	221,3 ± 17,1
5	377,9 ± 26,0	2,8 ± 0,2	33,9 ± 1,7	16,7 ± 1,2	0,90 ± 0,12	22,7 ± 1,3	243,7 ± 5,0
6	368,5 ± 20,6	2,8 ± 0,2	34,2 ± 2,3	19,0 ± 0,6	1,02 ± 0,14	25,0 ± 3,6	232,3 ± 8,7
7	390,6 ± 33,2	2,6 ± 0,3	31,5 ± 2,4	20,3 ± 0,8	1,10 ± 0,12	27,7 ± 2,0	239,0 ± 12,0
8	399,0 ± 22,1	2,7 ± 0,2	36,5 ± 2,9	18,0 ± 1,2	1,13 ± 0,06	21,7 ± 1,1	241,0 ± 12,5
9	434,1 ± 24,4	2,5 ± 0,2	32,8 ± 1,1	19,0 ± 1,0	1,01 ± 0,11	21,5 ± 1,0	243,3 ± 16,9



Slika 3. Makroskopske i mikroskopske promene u abdominalnoj šupljini pacova tretiranog Frl-omCrne i smeđe čestice Frl-a vidljive su u abdomenu, naročito na površini jetre i masnom tkivu. (a). Granulomi koji sadrže Frl u kristalnom obliku (F) i makrofage ispunjene Frl-om, H&E, uvećanje 100× (b). Veliki broj makrofaga sa brojnim granulama Frl-a u citoplazmi; H&E, uvećanje 400× (c). Figure 3. Macroscopic and microscopic changes in the abdominal cavity of rats treated with Frl. Black and brown particles of Frl are seen in the abdomen, particularly on the surface of the liver and fat tissue (a). Granulomatous tissue, predominantly composed of Frl composites in crystal form (F) and macrophages filled with Frl; H&E, magnification 100× (b). Large number of macrophages with numerous brown granule of Frl in cytoplasm; H&E, magnification 400× (c).



Slika 4. Histološke promene na srcu i jetri pacova tretiranih Doks-om (a i b), Doks-om i Frl-om (25 mg/kg, i.p.) (c i d) i fiziološkim rastvorom – zdrava kontrola (e i f); H&E, uvećanje 400 \times .

Figure 4. The histologic sections of the heart and liver of the rat treated with Dox (a and b), Dox pre-treated with Frl (25mg/kg i.p.) (c and d) and saline only - healthy control (e and f); H&E, magnification 400 \times .

va zapaženim pregledom uzoraka iz kontrolne tumorske grupe, Frl-a pokazuje veću protektivnu aktivnost prema srčanom nego prema jetrenom tkivu.

Strukturne i funkcionalne promene zapažene mikroskopskim pregledom tkiva srca i jetre nakon tretmana Doks-om su slične promenama opisanim u literaturi [27, 39–43]. Tretman ili pretretman sa snažnim antioksidansima kao što su vitamin E i katehin [39], *Angelica sinensis* [40], *Lycium barbarum* [41], *Salvia miltrirrhiza* [42] i *Centella asiatica* [27] tokom nekoliko nedelja doveli su do značajnog očuvanja stukture mitohondrija. Ovi rezultati su u saglasnosti sa efektima Frl-a nakon trostruke aplikacije. Brojni rezultati u literaturi ukazuju na to da upotreba antioksidanasa u terapiji Doks-om ublažuje oštećenja srca i jetre.

Promene na EKG-u

Poznato je da hronična upotreba antraciklina doводи do promena repolarizacijske faze u EKG-u pacova kao i do infarkta i drugih patohistoloških promena srca [44]. Da bi se ispitalo efekat hronične upotrebe Doks-a na EKG, pacovi su anestezirani primenom ketamina (65 mg/kg) i ksilazina (9 mg/kg). Za procenu kardiotoksičnosti Doks-a posmatrane su promena u trajanju QRS kompleksa i S α T segmenta [29,45–47]. Tri nedelje posle aplikacije Doks-a EKG pokazao je promene u depolarizacijskoj i repolarizacijskoj fazi. Došlo je do produženja QRS i S α T intervala što je takođe objavljeno u literaturi [29,46,47]. Kao što je očekivano u poređenju sa kontrolnom grupom nije bilo signifikantnih promena

u grupama koje su primile samo Frl ili samo vitamin C kao ni u grupama koje su primile kombinaciju Frl/Doks. Međutim pretretman vitaminom C nije ublažio produženje QRS i S α T intervala izazvano Doks-om. Suprotno tome pretretman Frl-om u svim dozama je sprečio nastanak promena u depolarizacijskoj i repolarizacijskoj fazi što ukazuje na kardioprotektivno delovanje Frl-a (tabela 1).

Hematološki parametri

Rezultati merenja hematoloških parametara (broj leukocita, eritrocita, nivo hemoglobina, hematokrit, srednji korpuskularni volumen (MCV), srednji korpuskularni hemoglobin (MCH) i srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina (MCHC), kao i broj bazofila, eozinofila, neutrofila, monocita i limfocita) nakon hronične aplikacije Doks-a, Frl-a i/ili vitamina C ne pokazuju statistički značajne promene između tri analizirana vremenska perioda. Promene hematoloških parametara nisu toliko upečatljive kao promene koje smo primetili pri ispitivanju akutne Doks toksičnosti nakon jednokratne aplikacije Doks-a u dozi od 8 mg/kg [8,21]. Razlog za ovo može biti u primenjenoj dozi Doks-a, koja je u ovom eksperimentu približnija stvarnoj terapijskoj dozi (1,5 mg kg⁻¹ nedeljno) i manje toksična, kao i dužem periodu trajanja eksperimenta tokom kojeg su se životinje adaptirale na stresne uslove nakon tretmana. Tokom tri nedelje značajna varijacija u broju leukocita je primećena za Frl i VitC grupu. Najznačajnije povećanje neutrofila i limfocita se javilo na početku tretmana u Doks/VitC grupi i na kraju terapije u Frl

grupi i VitC grupi. Pri ispitivanju akutne toksičnosti procenat neutrofila je bio približno pet puta povećan u Doks grupi u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom ($57,8 \pm 13,6\%$ prema $8,7 \pm 6,5\%$), dok je nivo limfocita bio skoro dva puta niži u Doks grupi u poređenju sa obe kontrolne grupe ($38,8 \pm 12,8\%$ prema $80,0 \pm 7,4\%$ i $88,6 \pm 28,8\%$) [21]. Ovakva značajna promena se nije javila prilikom ispitivanja hronične toksičnosti [48]. Važno je naglasiti da do sada u literaturi nisu objavljeni rezultati hematoloških analiza iz *in vivo* eksperimenata pri ispitivanju hronične upotrebe nekog antioksidansa u terapiji Doks-om [26,27,29–32].

Da bi sagledali celokupnu sliku promena na *in vivo* sistemu uz već opisane hematološke, makroskopske, mikroskopske i fiziološke rezultate ispitali smo i aktivnost serumskih i antioksidativnih enzima za sve grupe.

Aktivnost serumskih enzima

Sedam dana nakon svake aplikacije Doks-a, Frl-a i vitamina C tokom tri nedelje uzeti su uzorci krvi za određivanje aktivnosti serumskih enzima CK, AST, ALT, LDH, α -HBDH (tabela 2). Tretman Doks-om je doveo do značajnog povećanja serumskog nivoa CK u poređenju sa svim ostalim grupama nakon prve i druge aplikacije. Životinje tretirane Frl-om u sve tri doze pokazuju značajno poboljšanje u smislu normalizacije aktivnosti CK, kao i ALT i AST [8,21]. Bertinchant i saradnici [26] ispitivali su upotrebu cTnI i cTnT kao biomarkera za dijagnozu oštećenja miokarda u eksperimentalnom modelu Doks toksičnosti na pacovima aplikacijom $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ nedeljno Doks-a tokom osam nedelja. Iako su upotrebljavali istu dozu kao i u našem eksperimentu, nisu zabeležili značajne razlike u aktivnosti CK. Značajno povećanje nivoa AST i/ili ALT je registrovano u nekoliko publikacija koje se bave hroničnim uticajem Doks-a na srce i jetru [40–42]. U našem prethodno objavljenom radu [8], ALT je dramatično opala 48 sati nakon i.p. aplikacije 8 mg/kg Doks-a bez promene u aktivnosti AST, dok sam Frl, kombinacija Frl/Doks dovodi do značajnog povećanja nivoa oba enzima u poređenju sa kontrolnom tumorskom grupom i Doks grupom. To je verovatno posledica niske rastvorljivosti Frl-a koji se akumulira na površini jetre i abdominalnom masnom tkivu [8]. Dodatkom 20% DMSO-a fiziološkom rastvoru, rastvorljivost Frl-a je ovoga puta poboljšana i kao posledica toga se nivoi AST, ALT i ALT/AST u Frl grupi nisu dramatično promenili tokom tri nedelje (tabela 2). Posle tri nedelje tretmana sa terapijskom dozom Doks-a organizam pacova je adaptirao biohemijske procese u jetri što je potvrđeno i analizom aktivnosti LDH i α -HBDH (tabela 2). Potencijalna toksičnost visoke doze Frl-a (100 mg/kg) je detaljnije opisana u našem prethodno objavljenom radu [8]. U skladu sa tim, još jednom dolazimo do zaključka da sam Frl ili u kombinaciji

sa Doks-om, primenjen u visokoj dozi *in vivo* (ili u visokoj koncentraciji *in vitro*) [8] ima negativan uticaj na pojedine serumske markere hepatičnog oštećenja. Uprkos tome, za sve ispitivane parametre, najlošija slika dobijena je za grupu tretiranu kombinacijom Doks/vitC.

Parametri oksidativnog stresa

Da bi ispitali efekte Frl-a i VitC na oksidativni stres izazvan Doks-om merili smo nivoe sledećih parametara i enzima u tkivu srca i jetre: MDA, GSH, GSSG (slika 5), LDH, SOD, GPx, GR i CAT (tabela 3).

Pokazano je da Doks izaziva degeneraciju kardiomiocita i hepatocita i uzrokuje lipidnu peroksidaciju i oksidaciju proteina u tkivu srca i jetre. Mogući mehanizam je indukcija oksidativnog stresa što je u saglasnosti sa podacima iz literature [27,28,39–41]. Tokom tri uzastopne i.p. aplikacije Doks-a u dozi $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ nedeljno došlo je do značajnog povećanja nivoa MDA i LDH u tkivu kao i u aktivnosti SOD, GR i CAT u poređenju sa kontrolnom grupom i Frl/Doks grupama. S druge strane odnos slobodni GSH/GSSG u srcu je bio značajno povišen u kontrolnoj i svim Frl/Doks grupama u poređenju sa ostalim grupama. Odnos slobodni GSH/GSSG u jetri se nije razlikovao između grupa koje su primale Frl/Doks i sam Doks s jedne strane i Frl i vitC s druge strane.

Nije zapažena razlika u aktivnosti GPx u srčanom tkivu sa izuzetkom vitC grupe. Suprotno tome aktivnost GPx u citosolu jetre je u dobroj korelaciji sa rezultatima ostalih ispitivanih parametara oksidativnog statusa. Vitamin C imao je iznenađujuće najlošiji efekat na ispitivana tkiva bez obzira na to da li je aplikovan sam ili zajedno sa Doks-om. U literaturi ne postoje podaci o i.p. aplikaciji vitamina C kao potencijalnog protektora u terapiji Doks-om tako da ne možemo upoređivati rezultate i doneti zaključak o potencijalnom mehanizmu aktivnosti koji bi bio odgovoran za ovakve ishode. Santos i saradnici [31] su ispitivali hroničnu upotrebu kreatina i vitamina (E i C zajedno *per os*) nakon Doks terapije kod pacova i primetili snažan protektivni efekat ove kombinacije vitamina. Ayyildiz i saradnici [33] koristili su intraperitonealno veoma visoke doze vitamina C (200, 400 i 800 mg/kg) ali u svom istraživanju nisu testirali parametre oksidativnog stresa. Prema tome, ne može se izvući zaključak da su u našem slučaju nepovoljni rezultati posledica neuobičajenog puta aplikacije (i.p.) ili nekog nedefinisanog celularnog mehanizma.

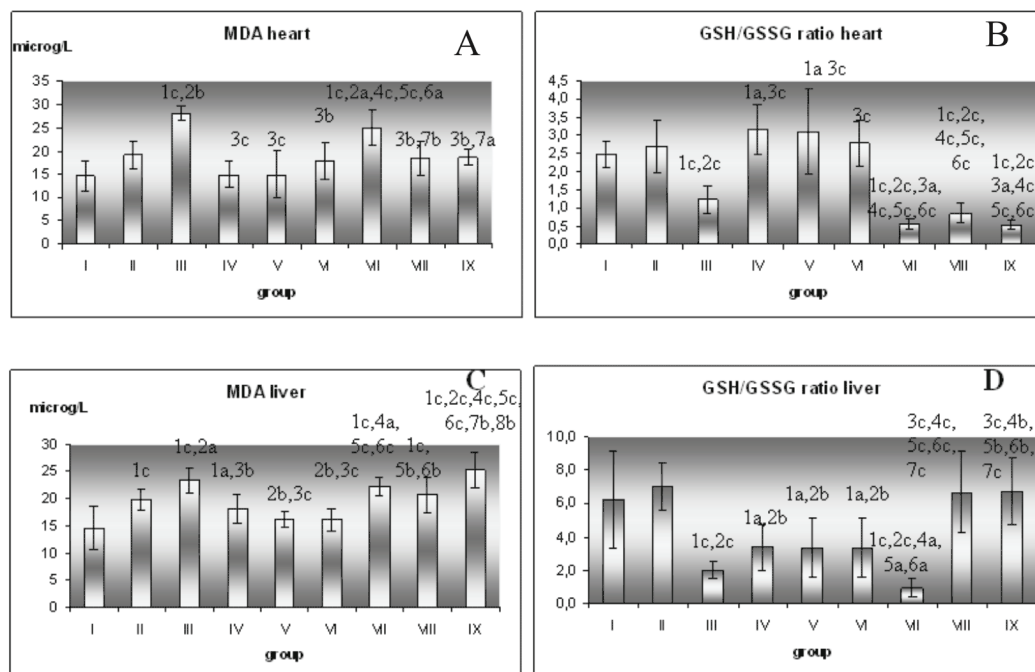
Važno je napomenuti da je srčano tkivo veoma osetljivo na prisustvo slobodnih radikala zbog slabije antioksidativne zaštite u poređenju sa drugim organima kao što je na primer jetra [49] što je takođe u saglasnosti sa našim rezultatima različitih biohemijskih markera u krvi i serumu (tabele 2 i 3).

Tabela 2. Aktivnost serumskih enzima
Table 2. Serum enzyme activities

Parametar	Nedelja	Grupa								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
ALT (U/L)	I	5,2±1,0	7,5±0,8	10,1±1,6	6,7±0,4 ^{3a}	7,9±1,3 ^{3b4a}	7,7±0,9 ^{1a}	8,9±1,8 ^{1b}	10,3±3,5 ^{1ca3b4a}	9,8±1,2 ^{1b4a}
	II	7,0±0,6	8,3±2,1 ^{1a}	7,8±1,3	1 ⁸ 8,2±0,5	9,5±1,6 ^{1b3a}	9,6±1,5 ^{1b3a}	7,0±1,0 ^{2a5b6b}	8,1±1,4	8,7±1,4
	III	6,5±1,8	8,5±2,3 ^{1a}	11,3,6±3,0 ^{1b}	1 ⁸ 7,0±0,9 ^{3a}	7,9±2,8	9,2±2,2	7,8±1,9 ^{2ab}	11,1,8±3,5 ^{1ca3b4a5b6a7c}	1 ⁸ 6,7±1,7 ^{3a8c}
AST (U/L)	I	22,6±4,3	8,1±2,2 ^{1c}	24,1±3,2 ^{2c}	27,7±5,1 ^{2c}	21,1±2,5 ^{2a4a}	19,1±2,0 ^{2ca3ab}	23,6±3,8 ^{2c}	25,8±4,7 ^{2ab}	20,6±1,6 ^{2ca4a8a}
	II	17,8±3,5	1 ⁸ 18,8±3,3	1 ⁸ 20,5±1,9	1 ⁸ 16,9±1,9 ^{3a}	18,5±3,4	18,9±2,0	1 ⁸ 11,5±1,6 ^{1b2a3ca4a5a6c}	1 ⁸ 15,3±3,2 ^{3b6a7a}	1 ⁸ 15,4±1,9 ^{3b6a7a}
	III	1 ⁸ 14,4±3,4	1 ⁸ 14,4±1,8	1 ⁸ 13,4±2,0	1 ⁸ 11,9±0,9	1 ⁸ 12,5±3,2	1 ⁸ 13,4±2,5	1 ⁸ 18,7±5,7 ^{1b2ca3ca4a5a6c}	1 ⁸ 12,8±3,1 ^{7b}	1 ⁸ 10,7±1,2 ^{1ca3a7a8a}
ALT/AST	I	0,23±0,05	0,96±0,17 ^{1c}	0,38±0,09 ^{1a2c}	0,29±0,08 ^{2c}	0,46±0,10 ^{1b2c4b}	0,41±0,04 ^{1b2c4a}	0,39±0,11 ^{1a2c}	0,40±0,12 ^{1a2c4a}	0,44±0,06 ^{1b2c4b}
	II	1 ⁸ 0,40±0,08	1 ⁸ 0,50±0,04	0,38±0,04	1 ⁸ 0,48±0,03	0,52±0,09 ^{1a4b}	0,51±0,09 ^{3a}	1 ⁸ 0,60±0,06 ^{1b3c4a}	0,54±0,10 ^{1a3b}	0,58±0,14 ^{1b3b}
	III	1 ⁸ 0,46±0,11	1 ⁸ 0,69±0,18 ^{1a}	1 ⁸ 0,81±0,19 ^{1b}	1 ⁸ 0,61±0,10 ^{3a}	1 ⁸ 0,85±0,17 ^{1c4a}	1 ⁸ 0,75±0,19 ^{1b}	1 ⁸ 0,30±0,10 ^{2ca3b5a6c}	1 ⁸ 0,97±0,27 ^{1ca3b4a6a7c}	1 ⁸ 0,70±0,12 ^{1a7c8b}
CK (U/L)	I	66,0±10,1	52,3±10,3	252,0±7,5 ^{1ca2c}	122,4±38,0 ^{1a2a3c}	67,7±20,8 ^{3ca4a}	64,6±6,1 ^{3ca4a}	127,1±20,1 ^{1a2b3c5a6a}	107,2±24,5 ^{2a3c}	131,7±41,3 ^{1a2b3c5a6a}
	II	48,3±13,2	59,8±10,3	1 ⁸ 118,2±17,6 ^{1ca2c}	1 ⁸ 71,2±10,3 ^{3c}	60,2±21,3 ^{3c}	1 ⁸ 89,4±17,5 ^{1b2a3a5a}	1 ⁸ 56,6±23,0 ^{3ca4a}	1 ⁸ 41,6±7,0 ^{3cb6c}	1 ⁸ 32,3±9,1 ^{2a3ca4b5a6c}
	III	42,4±20,3	42,3±13,5	1 ⁸ 132,0±6,00	1 ⁸ 18,1±3,5 ^{1ca2a3a}	1 ⁸ 20,5±5,9 ^{1b2b}	1 ⁸ 14,3±4,3 ^{1ca2a3a}	1 ⁸ 50,4±16,9 ^{3b4c5a6c}	1 ⁸ 10,4±4,4 ^{1ca3b7c}	1 ⁸ 15,6±4,4 ^{1ca3b7c}
LDH (U/L)	I	1048±278	429±93 ^{1b}	962±68 ^{2a}	1558±302 ^{1a2c3b}	1239±318 ^{2b4a}	1006±152 ^{2b4b}	1502±431 ^{1a2b3c5a6b}	1093±274 ^{2b4a7b}	1054±393 ^{2b4a7b}
	II	829±104	1 ⁸ 1190±333 ^{1a}	1 ⁸ 1311±291 ^{1b}	1 ⁸ 1086±152	977±327 ^{2a2b}	1083±307 ^{1b3a}	1 ⁸ 545±316 ^{1b2ca3ca5b6c}	1 ⁸ 658±169 ^{2ca3b4c6c}	1 ⁸ 631±246 ^{2ca3b4c5a6c}
	III	1 ⁸ 295±79	1 ⁸ 426±154 ^{1a}	1 ⁸ 322±81	1 ⁸ 262±62 ^{2b}	1 ⁸ 246±66 ^{2b}	1 ⁸ 210±46 ^{2ca3a}	1 ⁸ 529±215 ^{1b3ca4c5a6c}	1 ⁸ 269±58 ^{2b3a7c}	1 ⁸ 407±116 ^{4a5a6b7a8b}
α-HBDH (U/L)	I	513±182	238±47 ^{1b}	322±40	529±116 ^{2ab}	294±76 ^{1a4b}	298±58 ^{1a4b}	538±104 ^{2ca3b5b6b}	288±59 ^{1a4c7c}	303±110 ^{1a4b7b}
	II	361±96	1 ⁸ 377±74	1 ⁸ 451±93	1 ⁸ 344±49 ^{3a}	303±68 ^{3b}	344±43 ^{3a}	1 ⁸ 156±56 ^{1ca3ca4c5b6c}	1 ⁸ 180±43 ^{1b2ca3b4a5a6b}	1 ⁸ 151±25 ^{1ca3ca4c5b6c}
	III	1 ⁸ 176±45	1 ⁸ 151±57	1 ⁸ 134±23 ^{1a}	1 ⁸ 103±13 ^{1ca2a}	1 ⁸ 103±23 ^{1ca2a}	1 ⁸ 102±29 ^{1ca3a}	1 ⁸ 214±63 ^{2b3b4c5a6c}	1 ⁸ 71±19 ^{1ca3b7c}	1 ⁸ 103±25 ^{1ca4a7c}
α-HBDH/LDH	I	0,44±0,18	0,58±0,14 ^{1a}	0,33±0,04 ^{2c}	0,34±0,03 ^{2c}	0,26±0,03 ^{1b2c}	0,28±0,01 ^{1b2c}	0,33±0,02 ^{2c}	0,27±0,04 ^{1b2c}	0,33±0,05 ^{1a2c}
	II	0,43±0,07	1 ⁸ 0,34±0,05 ^{1b}	0,35±0,04 ^{1a}	0,32±0,02 ^{1b}	1 ⁸ 0,35±0,04 ^{1a}	0,29±0,02 ^{1c}	0,37±0,03 ^{6a}	0,31±0,07 ^{1b}	0,28±0,07 ^{1b7a}
	III	1 ⁸ 0,67±0,10	1 ⁸ 0,33±0,06 ^{1c}	0,34±0,08 ^{1c}	0,37±0,09 ^{1c}	1 ⁸ 0,35±0,05 ^{1c}	1 ⁸ 0,44±0,11 ^{1ca2a}	0,39±0,08 ^{1c}	0,33±0,06 ^{1c}	0,41±0,15 ^{1c}

Tabela 3. Aktivnost antioksidativnih enzima u uzorcima tkiva srca i jetre
Table 3. Antioxidant enzymes activities in heart and liver tissue

Grupa	LDH (U/L)		SOD (U/mg proteina)		GSH-Px (U/g proteina)		GR (U/g proteina)		CAT (U/mg proteina)	
	Srce	Jetra	Srce	Jetra	Srce	Jetra	Srce	Jetra	Srce	Jetra
1	6,5±3,1	6,8±3,8	28,9±5,9	124±35	170±24	9,2±3,5	0,93±0,38	16,32±3,79	3,36±1,24	2,01±0,97
2	6,4±2,8	10,5±6,4	25,9±7,8	86±39	194±46	4,3±1,9 ^{1a}	2,47±0,44 ^{1c}	7,93±1,70 ^{1b}	1,82±0,49 ^{1b}	3,01±0,84
3	17,9±3,6 ^{1ca2c}	18,0±5,9 ^{1a2a}	45,8±9,1 ^{1ca2c}	193±55 ^{1b2c}	140±8 ^{1a}	1,6±0,5 ^{1c}	5,13±1,10 ^{1ca2c}	22,40±3,59 ^{1b2c}	7,16±1,64 ^{1ca2c}	5,24±1,87 ^{1a}
4	3,6±1,8 ^{3c}	15,5±6,6 ^{1a}	21,2±4,7 ^{1a2a3c}	156±60 ^{2a3a}	171±22	17,7±6,7 ^{1ca2c}	1,43±0,49 ^{2b3c}	17,23±5,79 ^{3a}	0,57±0,29 ^{1ca2c}	11,92±2,37 ^{1ca2c}
5	7,3±1,4 ^{3c}	10,0±2,9 ^{3a}	20,3±7,9 ^{1a2a3c}	139±29 ^{2a3a}	219±55 ^{3b}	11,4±2,5 ^{2ca3b}	1,34±0,35 ^{2b3c}	15,23±2,29 ^{2b3b}	1,26±0,21 ^{1b3c}	2,66±1,20 ^{3c}
6	5,5±1,3 ^{3c}	4,5±1,2 ^{3b4b}	15,9±6,9 ^{1b2a3c}	93±22 ^{3a4a5a}	128±35 ^{1a2b3b}	2,9±1,8 ^{1b4c5c}	1,43±0,39 ^{2b3c}	14,36±1,72 ^{2b3b}	5,21±1,11 ^{1b2ca3b4c5c}	1,08±0,32 ^{3b4c}
7	15,1±5,9 ^{1ca3b4c5b6c}	24,2±7,9 ^{1ca3b4c5b6b}	38,3±6,8 ^{1a2a3a4c5a6c}	171±41 ^{1ca2c}	171±46	6,1±3,2 ^{3a4a5a}	2,60±0,76 ^{1ca3b4c5b6b}	17,10±4,23 ^{2ca3b}	8,85±1,93 ^{1ca3b4c5a6c}	13,31±2,1 ^{1ca3b4c5a6c}
8	5,2±2,9 ^{3c7c}	19,3±5,9 ^{1b2a3b6b}	20,1±4,9 ^{1a2a3c7c}	130±40 ^{3b7a}	159±15 ^{5a}	7,9±2,1 ^{3b4a6a}	1,19±0,48 ^{2b3c7c}	12,65±3,81 ^{1a2b3a4a7a}	2,21±0,85 ^{1a2b3a4a6c7c}	7,23±2,96 ^{1b2b4b5b6c7c}
9	5,2±1,9 ^{3c7c}	13,8±5,4 ^{6a7b}	22,9±3,8 ^{3c7c}	103±36 ^{3b7b}	229±54 ^{1b3ca4c5a6b7b}	15,8±4,5 ^{1b2ca3ca4c5a6b7b}	2,21±0,66 ^{1ca3ca4c5a6b7b}	9,78±3,04 ^{1b3ca4c5a6b7b}	4,17±1,32 ^{2ca3ca4c5a6b7b}	2,94±1,37 ^{4c7c8b}



Slika 5. Nivo MDA i odnos slobodni GSH/GSSG u tkivima srce (A i B) i jetre (C i D).
Figure 5. MDA levels and GSH/GSSG ratios in heart (A and B) and liver tissue (C and D).

ZAKLJUČAK

Svi prethodno objavljeni radovi o upotrebi fulerenola kao organo-protectora u doxorubicinskoj terapiji bavili su se ispitivanjem akutne toksičnosti visoke jednokratne doze doxorubicina. Na osnovu sadašnjih rezultata predlažemo upotrebu još niže doze Frl-a od 25 mg/kg (koja i dalje ima protektivno delovanje) uz neophodno smanjenje veličine čestica Frl-a i poboljšanje njegove rastvorljivosti. Ovo istraživanje je veliki korak napred u ispitivanju i karakterizaciji Frl-a kao potencijalnog organo-protectora u radio- i hemo- terapiji. U daljem istraživanju neophodne su *ex vivo* studije da bi došli do konačnog cilja, a to je klinična studija.

Zahvalnica

Ovaj rad je deo naučnog projekta broj 142076, kojeg finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i P4-0127 Agencije za istraživačku delatnost Republike Slovenije.

LITERATURA

- [1] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, C₆₀: Buckminsterfullerene, *Nature* **318** (1985) 162–163.
- [2] A. Hirsch, *The Chemistry of the Fullerenes*, Wiley, New York, 1993.
- [3] M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P.C. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, San Diego, 1996, p. 292–325.

- [4] L.Y. Chaing, F.J. Lu, J.T. Lin, Free radical scavenging activity of water soluble fullerenols, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **24** (1995) 1283–1284.
- [5] L.L. Dugan, J.K. Gabrielsen, S.P. Yu, T-S. Lin, D.W. Choi, Buckminsterfullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons, *Neurobiol. Dis.* **3** (1996) 129–135.
- [6] N. Tagmatarchis, H. Shinohara, Fullerenes in medicinal chemistry and their biological applications, *Mini-Rev. Med. Chem.* **1** (2001) 339–348.
- [7] R. Injac, B. Strukelj, Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity, *Technol. Cancer Res. Treat.* **7** (2008) 497–516.
- [8] R. Injac, M. Perse, N. Obermajer, V. Djordjevic-Milic, M. Prijatelj, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Potential hepatoprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas, *Biomaterials* **29** (2008) 3451–3460.
- [9] G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Djordjevic, J. Canadovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, V.V. Baltic, Modulating activity of fullereneol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin-induced cytotoxicity, *Toxicol. in Vitro* **18** (2004) 629–637.
- [10] S. Mirkov, A. Djordjevic, N. Andric, A. Andric, T. Kostic, G. Bogdanovic, M. Vojinovic-Miloradov, R. Kovacevic, Nitric oxide – scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C₆₀(OH)₂₄, *Nitric Oxide-Biol. Ch.* **11** (2004) 201–207.
- [11] Y.W. Chen, K.C. Hwang, C.C. Yen, Y.L. Lai, Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287** (2004) R21–26.
- [12] A. Djordjevic, J. Canadovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, G. Bogdanovic, Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullereneol C₆₀(OH)₂₄, *Oxi Commun.* **27** (2005) 213–218.

- [13] A. Djordjevic, Biological Active Derivatives of fullerene C₆₀, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2002.
- [14] C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, Y.J. Tao, B. Sitharaman, L.J. Wilson, J.B. Hughes, J.L. West, V.L. Colvin, The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes, *Nano Lett.* **4** (2004) 1881–1887.
- [15] A. Djordjevic, G. Bogdanovic, S. Dobric, Fullerenes in Biomedicine, *J. BUON* **11** (2006) 391–404.
- [16] J.Z. Qiang, H. Sun, H. Wang, Q. Xie, Y. Lui, Z. Wang, Biodistribution and tumor uptake of C₆₀(OH)_x in mice, *J. Nanopart. Res.* **8** (2006) 53–63.
- [17] L. Quingnuan, X. Yan, Z. Xiaodong, L. Ruili, D. Qieqie, S. Xiaoguang, C. Shaoliang, L. Wenxin, Preparation of 99mTc-C₆₀(OH)_x and its biodistribution studies, *Nucl. Med. Biol.* **29** (2002) 707–710.
- [18] B. Govedarica, V. Djordjevic-Milic, N. Radic, B. Srdjenovic, A. Djordjevic, Influence of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on enzyme status in serum of rats after single dose administration of doxorubicin, *Hem. Ind.* **62** (2008) 191–196.
- [19] T. V. De Vita, J. R. S. Hellman, A. S. Rosenberg, *Cancer principles and practice of oncology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 375–512.
- [20] V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, S. Dobric, R. Injac, D. Vuckovic, K. Stankov, V. Dragojevic-Simic, Lj. Suvajdzic, Influence of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on doxorubicin induced cardiotoxicity in rats, *Mater. Sci. Forum* **518** (2006) 525–529.
- [21] R. Injac, M. Perse, M. Boskovic, V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, A. Hvala, A. Cerar, B. Strukelj, Cardioprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm, *Technol. Cancer. Res. Treat.* **7** (2008) 15–26.
- [22] V. Jacevic, V. Djordjevic-Milic, V. Dragojevic-Simic, N. Radic, B. Govedarica, S. Dobric, B. Srdjenovic, R. Injac, A. Dordjevic, V. Vasovic, Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats pathohistological study, *Toxicol. Lett.* **172S** (2007) S146.
- [23] R. Injac, M. Boskovic, M. Perse, E. Koprivec-Furlan, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress, *Pharmacol. Rep.* **60** (2008) 742–749.
- [24] R. Injac, N. Radic, B. Govedarica, M. Perse, A. Cerar, A. Djordjevic, B. Strukelj, Acute Doxorubicin Pulmotoxicity in Rats with Malignant Neoplasm is Effectively Treated with Fullereneol C₆₀(OH)₂₄ Through Inhibition of Oxidative Stress, *Pharmacol. Rep.* **61** (2009) 335–342.
- [25] A.P. Maskens, Histogenesis and growth-pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma, *Cancer. Res.* **36** (1976) 1585–1592.
- [26] J.P. Bertinchant, A. Polge, J.M. Juan, M.C. Oliva-Lauraire, I. Giuliani, C. Marty-Double, J.Y. Burdy, P. Fabbro-Peray, M. Laprade, J.P. Bali, C. Granier, J. E. de la Cousse, M. Dauzat, Evaluation of cardiac troponin I, T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings, *Clin. Chim. Acta* **329** (2003) 39–51.
- [27] A. Gnanapragasam, 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** (2007) 55–63.
- [28] X. J. Qin, W. He, C.X. Hai, X. Liang, R.J. Liu, Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy, *Appl. Toxicol.* **28** (2008) 27–282.
- [29] R.B. Kelishomi, S. Ejtemaemehr, S.M. Tavangar, R. Rahimian, J.I. Mobarakeh, A. R. Dehpour, Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat, *Toxicology* **243** (2008) 9–104.
- [30] X. Chen, Y. Chen, Y. Bi, N. Fu, C. Shan, S. Wang, S. Aslam, P. Wang, J. Xu, Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Cardiovasc. Drugs Ther.* **21** (2007) 367–374.
- [31] R.V.T. Santos, M.L. Batista, E.C. Caperuto, R.L.F.B.P. Costa, Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after doxorubicin treatment in rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34** (2007) 1294–1299.
- [32] L.M.G. Antunes, C.S. Takahashi, Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells, *Mutat. Res.* **419** (1998) 137–143.
- [33] M. Ayyildiz, S. Coskun, M. Yildirim, E. Agar, The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats, *Epilepsia* **48** (2007) 1388–1395.
- [34] C.C. Chou, H.Y. Hsiao, Q.S. Hong, C.H. Chen, Y.W. Peng, H.W. Chen, P.C. Yang, Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model, *Nano Lett.* **8** (2008) 437–445.
- [35] M.P. Gelderman, O. Simakova, J.D. Clogston, A.K. Patri, S.F. Siddiqui, A.C. Vostal, J. Simak, Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullereneol C₆₀(OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-I membrane expression and apoptosis *in vitro*, *Int. J. Nanomed.* **3** (2008) 59–68.
- [36] B.S. Harrison, A. Atala, Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials* **28** (2007) 344–353.
- [37] N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S.R. Wilson, F. Moussa, [60] fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity, *Nano Lett.* **5** (2005) 2578–2585.
- [38] DMSO – Dimethyl sulfoxide; A polar aprotic solvent with virtually no toxicity constraints. Arkema report [internet] Available from: <http://www.arkema.com>; Accessed: 2008 August 01.
- [39] Y. Kalender, M. Yel, S. Kalender, Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: The effects of vitamin E and catechin, *Toxicology* **209** (2005) 39–45.
- [40] Y.F. Xin, G.L. Zhou, M. Shen, Y.X. Chen, S.P. Liu, G.C. Chen, H. Chen, Z.Q. You, Y.X. Xuan, *Angelica sinensis*: A novel adjunct to prevent doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101** (2007) 421–426.
- [41] Y.F. Xin, G.L. Zhou, Z.Y. Deng, Y.X. Chen, Y.G. Wu, P.S. Xu, Y.X. Xuan, Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Phytother. Res.* **21** (2007) 1020–1024.
- [42] J.S. You, T.L. Pan, Y.S. Lee, Protective Effects of *Dan-shen* (*Salvia Miltiorrhiza*) on Adriamycin-induced Cardiac and Hepatic Toxicity in Rats, *Phytother. Res.* **21** (2007) 1146–1152.

- [43] A. Gokcimen, A. Cim, H.T. Tola, D. Bayram, A. Kocak, F. Ozguner, A. Ayata, Protective effect of *N*-acetyl-cysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity, *Hum. Exp. Toxicol.* **26** (2007) 519–525.
- [44] G. Sacco, M. Bigioni, S. Evangelista, C. Goso, S. Manzini, C.A. Maggi, Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat, *Eur. J. Pharmacol.* **414** (2001) 71-78.
- [45] R. Danesi, M. Del Tacca, G. Soldani, Measurement of the S-alpha-T segment as the most reliable ecetrocardiogram parameter for the assessment of adriamycin-induced cardiotoxicity in the rat, *J. Pharmacol. Methods* **16** (1986) 251–259.
- [46] G.J. M. den Hartog, G.R.M.M. Haenen, E. Boven, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, Lecithinized copper, zinc-superoxide dismutase as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, *Toxicol. Pharmacol.* **194** (2004) 180–188.
- [47] B. Jiang, L. Zhang, M. Li, W. Wu, M. Yang, J. Wang, D. A. Guo, Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress, *Food Chem. Toxicol.* **46** (2008) 1510–1515.
- [48] R. Injac, M. Perse, M. Cerne, N. Potocnik, N. Radic, B. Govedarica, A. Djoredjevic, A. Cerar, B. Stukelj, Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer, *Biomaterials* **30** (2009) 1184–1196.
- [49] E.H. Herman, J. Zhang, D.P. Chadwick, V.J. Ferrans, Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45** (2000) 329–334.

SUMMARY

PROTECTIVE EFFECTS OF FULLERENOL AGAINST CHRONIC DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY AND HEPATOTOXICITY IN RATS WITH COLORECTAL CANCER

Rade Injac¹, Nataša Radić¹, Biljana Govedarica², Aleksandar Đorđević³, Borut Štrukelj¹

¹Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

²Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

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

(Scientific paper)

Since the introduction of Doxorubicin (Dox) for the treatment of cancer in 1969, this compound has demonstrated high antitumor efficacy. Dox's use in chemotherapy has been limited largely due to its diverse toxicities, including cardiac, liver, renal, pulmonary, hematological and testicular toxicity. Various attempts have been made to reduce Dox-induced toxicity. These include dosage optimization, synthesis and use of analogues. Moreover, a number of agents have been investigated as protective agents during Dox therapy. Polyhydroxylated derivatives of fullerene, named fullereneols C₆₀(OH)_n, are being extensively studied due to their great potential as antioxidants. It is proposed that they might act as free radical scavengers in biological systems, in xenobiotics-induced oxidative stress as well as against radioactive irradiation. We have investigated the effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ (Frl) at doses of 25, 50 and 100 mg kg⁻¹ week (for a time-span of three weeks) on heart and liver tissue after Doxorubicin (Dox)-induced toxicity in rats with colorectal cancer. In the present study, *in vivo* Wistar male rat model was used to explore whether Frl could protect against Dox-induced (1.5 mg/kg/week for three weeks) chronic cardio- and hepato- toxicity and compared the effect with a well-known antioxidant, vitamin C (100 mg/kg/week for three weeks). Commercially available methods were used for blood and pathohistological analysis and for the measurement of enzyme activity (SOD, MDA, GSH, GSSH, GPx, GR, CAT, CK, LDH, α-HBDH, AST, ALT) in serum and homogenate samples of heart and liver tissues. According to macroscopic, microscopic, hematological, biochemical, physiological, pharmacological, and pharmacokinetic results, we confirmed that, at all examined doses, Frl exhibits a protective influence on the heart and liver tissue against chronic toxicity induced by Dox.

Ključne reči: Fullerenol • Doksorubicin • Kardioprotektivnost • Hepatoprotektivnost • Kolorektalni tumor
Key words: Fullereneol • Doxorubicin • Cardioprotectivity • Hepatoprotectivity • Colorectal tumor