

RADE INJAC^{1,2}
ALEKSANDAR ĐORĐEVIĆ³
BORUT ŠTRUKELJ¹

¹Farmaceutski fakultet, Institut
za farmaceutsku biologiju,
Ljubljana

²Medicinski fakultet, Zavod za
farmaciju, Novi Sad

³Prirodno–matematički fakultet,
Departman za hemiju, Novi Sad

NAUČNI RAD

*fulerenol:616–006:616.12

ISPITIVANJE PROTEKTIVNOSTI FULERENOLA C₆₀(OH)₂₄ IN VIVO U AKUTNOJ KARDIOMIOPATIJI U DOKSORUBICINSKOJ TERAPIJI MALIGNIH NEOPLAZMI KOD PACOVA*

Cilj rada je proučiti efekte doksorubicina na srce pacova nakon jednokratne aplikacije, praćenjem biohemijskih i patohistoloških parametara, kao i ispitivanje uticaja doksorubicina na miokard pacova prethodno šticećenih fulerenolom. Enzimatska aktivnost (SOD, MDA, produkcija slobodnih radikala, GSH, GSSH, GPx, CAT, CK, LDH, α -HBDH, AST, ALT) u serumu i homogenatu srca, krvna slika i patohistološke karakteristike srca, rađene su klasičnim komercijalnim metodama. Preventivna primena fulerenola C₆₀(OH)₂₄ (100 mg/kg) u predtretmanu je značajno smanjila kardiotoksičnost izazvanu doksorubicinom (8 mg/kg) u terapiji malignih neoplazmi kod pacova. Jedan od kardioprotektivnih efekata fulerenola kod pacova tretiranih doksorubicinom je posledica očuvane homeostaze endogenog sistema antioksidativne odbrane. Na osnovu dosadašnjih rezultata na pacovima, fulerenol C₆₀(OH)₂₄ je pokazao, kako na zdravim tako i na jedinkama sa malignim tumorom dojki, izuzetnu antioksidativnu aktivnost koja posledično smanjuje kardiotoksičnost doksorubicina kao citostatika.

Doksorubicin (Doks) je još od samog početka primene u humanoj terapiji kao antitumorski agens pokazao izuzetnu citotoksičnost. Prva terapija kancera uz primenu Doks-a bila je izvedena 1969. godine. Citotoksičan efekat Doks-a koji je primećen kao koristan pri određenih vrsta tumora (limfomi, akutne leukemije i solidni tumori, kao što su karcinom dojke, sitnoćelijski karcinom pluća, karcinomi mokraćne bešike, tiroidee, želuca, sarkomi mekih tkiva i osteogeni sarkomi, neuroblastomi i Wilms'ov tumor), je takođe ispoljen na nekim humanim organima kao neželjeni efekat (srce, jetra, pluća, bubrezi, testisi, ćelije krvi) [1–5]. Oštećenje na nivou organa i tkiva se manifestuje promenama na nukleinskim bazama u samim ćelijama, kao i usled produkcije slobodnih radikala koji dovode do pojave lipidne peroksidacije i samim tim do oštećenja ćelijske membrane. Nakon nastanka malonildialdehida (MDA) dolazi do sekundarnog oštećenja na nivou nukleotidne replikacije i aktivnosti DNK i RNK polimeraze. Interakcija Doks-a sa topoizomerazom II daje veoma stabilan kompleks Doks/DNK/topoizomeraza II koji je zapravo najvažniji mehanizam za citostatsku aktivnost nekih antitumorskih antibiotika. S obzirom da topoizomeraza igra veoma važnu ulogu u procesu transkripcije DNK u periodu ćelijske deobe, ovaj mehanizam je ključan

lan za antitumorsku aktivnost. Ćelije tretirane Doks-om su ispoljavale karakteristične morfološke promene udružene sa apoptozom ili programiranom ćelijskom smrću. Doks-om indukovana apoptoza može biti ključan mehanizam za terapijski ili toksični efekat, ili čak za oboje [3–5].

Glavni neželjeni efekat koji ostavlja trajne posledice kod pacijenata koji su izlećeni od nekih prethodno pomenutih tumora, a tretirani su Doks-om, jeste oštećenje srčanog mišića. Kardiotoksičnost može biti akutna (aritmija, hipotenzija, aktivnost serumskih enzima, oksidativno oštećenje tkiva) ili hronična (dilatativna kardiomiopatija i kongestivna srčana insuficijencija). Dokazano je da oksidativni status kao i funkcija mitohondrija predstavljaju ključno mesto u procesu šticećenja tkiva. Indukcija oksidativnog stresa može biti objašnjena hemijskom strukturom Doks-a koji stimuliše nastanak reaktivnih oblika kiseonika (ROK). *In vitro* je dokazano da je koncentracija Doks-a intracelularno dva puta veća od ekstracelularne. Na nivou mitohondrija dolazi do reakcije između Doks-a i mitohondrijalnog enzima NADH-dehidrogenaze usled čega nastaje lančana reakcija produkcije ROK-a. Kao posledica toga dolazi do smanjenja nivoa endogenih antioksidanasa što dovodi do oksidativnog stresa i oštećenja tkiva [3–9].

Doks takođe intereaguje sa Ca²⁺ i utiče na njegovu homeostazu, što svakako dovodi do promena u kontrakciji srčanog mišića. Najnovija istraživanja su dokazala da je zapravo Doks odgovoran za blokiranje transkripcije kardio-specifičnog regulatornog proteina (*cardiac adriamycinresponsive protein*, CARP), mehanizmom redukcije ekspresije specifičnih gena, kao što su Ca²⁺-izlazeći Ca²⁺-oslobađajući kanali

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

Adresa autora: Rade Injac, Fakulteta za farmaciju, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

E-mail: injacrade@gmail.com

Rad primljen: Decembar 24, 2007.

Rad prihvaćen: Januar 22, 2008.

(rianoid receptor-2), α -aktin, miozinski laki lanac 2 i drugi [10–12].

Do sada je objavljen veliki broj radova sa različitim antioksidansima, kao što su deksrazoksan, probukol, melatonin, beli luk, vitamini (A, C, E), flavonoidi, *Centella asiatica* ekstrakt i redukujući agensi koji sadrže tiol (glutation, N-acetilcistein, S-acetilcistein, aminofostin), ali ni jedan nije bio dovoljno uspešan *in vivo* kao kardioprotektor mehanizmom sprečavanja ili smanjenja oksidativnog stresa u terapiji antraciklinima [6,8,13–20].

Tokom dosadašnjih *in vivo* ispitivanja na životinjskom modelu, relativno novi polihidroksi derivat ugljenika C_{60} , je pokazao izuzetnu antioksidativnu aktivnost. Na osnovu eksperimetalnih dokaza fulerenol (Ful) $C_{60}(OH)_{24}$ je uključen u *in vivo* istraživanja kao potencijalni kardioprotektor pri Doks terapiji [21–28].

Cilj rada je utvrđivanje kardioprotektivnog delovanja fulerenola *in vivo* u akutnoj kardiomiopatiji u doksorubicinskoj terapiji malignih neoplazmi kod pacova.

MATERIJAL I METODE

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ je sintetisan i karakterisan u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, po originalnom postupku [29]. Ful je rastvaran u sterilnom i apirogenom rastvoru (fiziološki rastvor/Tween 80 80:20 m/m) u koncentraciji 20 mg/mL pod sterilnim uslovima u laminarnoj komori.

Doks (Adriablastina[®], Pharmacia & Upjohn, Milan, Italija) je rastvaran u sterilnom i apirogenom fiziološkom rastvoru (3 mg/mL) u laminarnoj komori neposredno pred upotrebu.

MNU (1-metil-1-nitrozourea) od proizvođača Sigma (Deisenhofen, Nemačka), je rastvaran svaki put pred neposrednu upotrebu u sterilnom i apirogenom fiziološkom rastvoru (14 mg/mL) u laminarnoj komori.

Ženke pacova vrste *Sprague-Dawley outbred* (Harlan, Italija), su preuzete tokom treće nedelje starosti i smeštene u eksperimentalnu laboratoriju po 3–4 na kavez na regulisanoj sobnoj temperaturi od 22–23 °C i vlazi od 70 ± 10%. Životinje su imale dostup uobičajenoj hrani (Altromin, Nemačka) i vodi tokom celog dana, a dnevno-noćni ciklus je regulisan sistemom 12+12 h.

Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa propisama Evropske Konvencije za zaštitu i upotrebu životinja u laboratorijske svrhe (ETS 123) i uz dozvolu Veterinarske Uprave Republike Slovenije (licenca 3440–138/2006).

32 od 40 životinja su tretirane intraperitonealno (i.p.) sa MNU (50 mg/kg) u cilju hemijske indukcije nastanka tumora dojki. Aplikacija je izvedena 50–tog i 113–tog dana starosti životinja [30]. Odabrane gru-

pe su primile jednokratne doze Doks-a i/ili Ful-a 160–tog dana starosti. Dva dana nakon aplikacije je izvršena eutanazija ugljenik–dioksidom.

Životinje su na početku eksperimenta metodom slučajnog izbora podeljene u pet grupa po osam jedinki:

- 1) Zdrava kontrolna grupa – fiziološki rastvor
- 2) Kontrolna grupa sa kancerom
– MNU aplikacija + fiziološki rastvor
- 3) Doksorubicinska grupa
– MNU aplikacija + Doks 8 mg/kg
- 4) Fulerenol/doksorubicinska grupa
– MNU aplikacija + Ful 100 mg/kg
(30 min pre Doks-a + Doks 8 mg/kg)
- 5) Fulerenolska grupa
– MNU aplikacija + Ful 100 mg/kg

Na osnovu preliminarnih istraživanja na zdravim jedinkama je izabrana doza od 100 mg/kg Ful kao najefikasnija.

Krv za analizu je uzeta srčanom punkcijom na otvorenoj grudnoj regiji. Venska krv je podeljena u dve porcije od čega je 200 μ L stabilisano antikoagulansom i korišćeno za hematološku analizu, a preostali deo krvi je nakon dva sata stajanja na sobnoj temperaturi centrifugiran i serum odvojen za analizu aktivnosti serumskih enzima.

Svako srce je odvojeno od žrtvovane životinje i preneto na suvi led. Nakon toga je masno tkivo odvojeno i narezani komadi tkiva su homogenizovani u Tris puferu (pH 7,4; masa organa/količini pufera 1:10 m/m). Grubi homogenat je podeljen na dva dela i to tako da je jedan deo korišćen za analizu MDA, a drugi je centrifugiran na 13000 obrt/min tokom 20 minuta na 4 °C (Beckman, Ultracentrifuga). Supernatant je korišten za analizu ukupnih proteina (TP), glutati-ona (GSH), glutation–peroksidaze (GSH–Px), totalnog antioksidativnog statusa (TAS), glutation reduktaze (GR), katalaze (CAT), i superoksid dizmutaze (SOD).

Odnos mase srca i telesne mase je računat u cilju praćenja makroskopskih promena na srцу.

Za elektronsku mikroskopiju uzeto je tkivo levog srca veličine 1 mm³, potom fiksirano u neutralno puferovanom formaldehidu i dodatno fiksirano sa 1% osmijum tetroksida u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7,4). Nakon dehidracije etanolom, polu tanki preparati su obojeni sa Azur II, a potom ultra tanki preparati (40–60 nm) preneti su na pločicu i kontrastirani uranil acetatom i citratom. Preparati su posmatrani Jeol 1200 Ex II transmisionim elektronskim mikroskopom.

Aktivnost enzima kreatin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH) i alfa–hidroksibutirat dehidrogenaze (α -HBDH) praćena je na spektrofotometarskom sistemu Tecan Saffire (Tecan UK, Milton Keynes, Velika Britanija). Komercijalni kitovi za CK i LDH bili su od proizvođača Chema Diagnostic (Jesi,

Italija), dok je za α -HBDH korišten kit od Dialab (Beč, Austrija). Rezultati su izraženi kao U/L.

Nivo MDA, GSH i GSSG određen je upotrebom komercijalnog kita Chromsystems Diagnostic za HPLC analizu (Minhen, Nemačka), a vrednosti su izražene kao $\mu\text{g/L}$ odnosno mg/L . Za određivanje SOD, GSH-Px, TAS i GR korišteni su Randox komercijalni sistemi (Crumlin, Velika Britanija). Ukupni proteini su mereni Sential Diagnostics (Milano, Italija) metodom.

Aktivnost CAT u homogenatu tkiva je izvena Aebi [31] metodom.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + standardna devijacija (SD). Radi poređenja među grupama, upotrebljena je ANOVA praćena Student t-testom. Statistički signifikantni rezultati su smatrani ako je $p < 0,05$.

REZULTATI I DISKUSIJA

U cilju određivanja potencijane kardioprotektivnosti Ful-a tokom Doks terapije, korišćen je model na pacovima koji su u toku pet meseci aplikacijom MNU razvili maligne oblike tumora dojki. Nakon eutanazije ustanovljeno je da su sve ženke ($n = 32$) koje su tretirane sa MNU imale razvijene tumore i to u proseku $4,9 \pm 0,6$ tumora na jedinku.

Tabela 1. Telesna masa pacova i koeficijent srca nakon eutanazije

Table 1. Body weights of rats and coefficients of heart after sacrificing

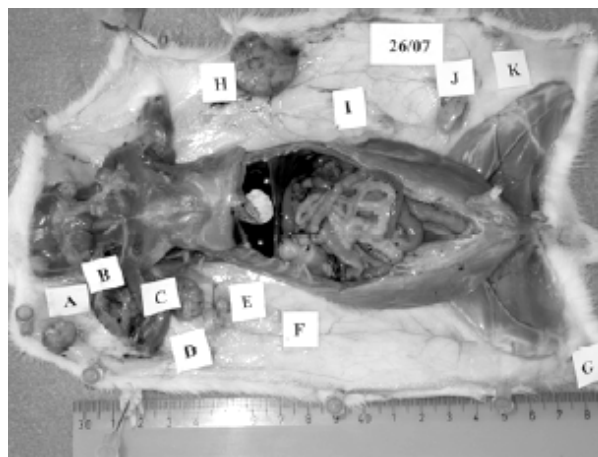
Grupa	Telesna masa (g)	Koeficijent srca (mg/g)
1	$271,2 \pm 12,8$	$3,6 \pm 0,6$
2	$262,5 \pm 22,0$	$3,4 \pm 0,4$
3	$257,0 \pm 15,8$	$3,6 \pm 0,4$
4	$262,0 \pm 13,8$	$3,2 \pm 0,1$
5	$251,5 \pm 14,4$	$3,3 \pm 0,2$

Nakon punkcije krvi, odstranjeni su organi koji su interesantni za praćenje promena zbog poznate toksičnosti Doks-a.

Najvažnije promene su zapravo oštećenja na srcu i u tu svrhu je prvo izmerena telesna masa svakog pacova po eutanaziji i potom i masa srca po obdukciji. Iz dobijenih podataka je izračunat koeficijent mase srca i ustanovljeno je da ni u jednoj grupi u toku dva dana od aplikacije nije došlo do signifikantnih promena.

Takođe su odstranjeni i svi tumori i urađena je patohistološka priprema i pregled preparata. Izgled i raspored tumora na trbušnoj strani pacova, oko marnih žlezda se jasno vidi na slici 1.

Od hematoloških parametara određeni su broj leukocita, eritrocita, nivo hemoglobina, hematokrit, srednji korpuskularni volumen (MCV), srednji korpuskularni hemoglobin (MCH) i srednja korpusku-



Slika 1. Izgled pacova nakon eutanazije (A-K su maligni tumori)
Figure 1. Rat after sacrificing (A-K malignant tumours)

Tabela 2. Hematološki rezultati*

Table 2. Haematological findings*

Grupa	Leukociti $\times 10^9/\text{L}$	Eritrociti $\times 10^{12}/\text{L}$	Hemoglobin g/dL
1	$6,9 \pm 2,4$	$6,7 \pm 2,1$	$13,2 \pm 4,6$
2	$14,1 \pm 5,3$	$5,1 \pm 1,7$	$11,0 \pm 3,3$
3	$4,3 \pm 0,7^{1,2}$	$6,8 \pm 0,4^2$	$14,7 \pm 0,2^2$
4	$4,3 \pm 1,1^{1,2}$	$6,8 \pm 0,5^2$	$14,8 \pm 1,1^2$
5	$10,6 \pm 4,3$	$7,2 \pm 1,5$	$13,9 \pm 2,9$

Grupa	Neutrofili (%)	Limfociti (%)
1	$8,7 \pm 6,5$	$88,6 \pm 28,8$
2	$17,0 \pm 3,2^1$	$80,0 \pm 7,4$
3	$57,8 \pm 13,6^{1,2}$	$38,8 \pm 12,8^{1,2}$
4	$52,7 \pm 19,1^{1,2}$	$44,7 \pm 19,7^{1,2}$
5	$41,2 \pm 8,9^{1,2,3}$	$48,7 \pm 21,7^{1,2}$

*^{1,2,3} - Predstavlja razliku u odnosu na određenu grupu ($p < 0,05$)

*^{1,2,3} - Represents significant difference from the corresponding group ($p < 0,05$)

larna koncentracija hemoglobina (MCHC), kao i broj bazofila, eozinofila, neutrofila, monocita i limfocita. Parametri za koje su primećene signifikantne razlike su navedeni u tabeli 2.

Nizak nivo leukocita sa visokim rizikom nastanka infekcije je jedan od glavnih neželjenih efekata Doks-a. Odrasle ženke pacova linije Sprague-Dawley outbred uobičajeno imaju 80% limfocita, potom 14% neutrofila, 3% eozinofila, 2% monocita i 1% bazofila [32]. Na osnovu dobijenih rezultata primećena je signifikantna razlika u odnosu broja neutrofila i leukocita u okviru Doks, Ful/Doks i Ful grupa u odnosu na obe kontrolne grupe. Redukcija broja limfocita je tipična za različita patološka stanja kao što su uremija, sistemski lupus, SIDA, hemio i radioterapija. U slučaju koji je predstavljen očigledno je da hemioterapija utičena na broj limfocita. Takođe je promena, to jest, povećanje broja neutrofila prvi

znak prisustva akutnog inflamatornog procesa. S obzirom da su obe supstance (Doks i Ful) ksenobiotici za živi organizam, očekivana je reakcija na strano telo, ali je isto tako zapažena manja promena u okviru Ful grupe u odnosu na Doks grupu. Na osnovu toga se može zaključiti da Ful ima i potencijalno antiinflamatorno dejstvo na organizam tretiran Doks-om.

Promena broja eritrocita je ispoljena anemijom, ali u akutnoj fazi nakon aplikacije visoke doze Doks-a nije ustanovljena značajna razlika. Razlika koja je primećena kod druge kancer kontrolne grupe u odnosu na 3 i 4 grupu, je zapravo posledica razvoja velikih ulcerirajućih tumora.

CK, LDH i α -HBDH su serumski enzimi čija se aktivnost prati sa željom da se utvrde promene na srcu i jetri [17,33,34]. CK je enzim koji je značajan marker za bolesti srca, mozga i skeletne muskulature. Posledično povećana aktivnost CK enzima u serumu je prisutna kod infarkta miokarda, akutne cerebrovaskularne bolesti i traume odnosno bolesti skeletne muskulature. Kao što se vidi iz tabele 3, nivo CK je povećan u okviru Doks grupe u poređenju sa kancer kontrolnom grupom. Nasuprot tome je nivo CK kod Ful/Doks i Ful grupa na nivou kontrolne kancer grupe. Takav rezultat potvrđuje da na *in vivo* modelu sa malignim tumorima Ful blokira nastanak infarkta miokarda u akutnoj fazi aplikacije visoke doze Doks-a.

Tabela 3. Aktivnost serumskih enzima*
Table 3. Serum enzymatic findings*

Grupa	CK	LDH	α -HBDH
1	206 ± 28	862 ± 132	266 ± 27
2	154 ± 20 ¹	817 ± 254	207 ± 45 ¹
3	201 ± 39 ²	1128 ± 107 ^{1,2}	243 ± 48
4	154 ± 46 ³	819 ± 224 ³	272 ± 90
5	146 ± 45 ^{1,3}	790 ± 155 ³	255 ± 75

*^{1,2,3} – Predstavlja razliku u odnosu na određenu grupu ($p < 0,05$)

*^{1,2,3} – Represents significant difference from the corresponding group ($p < 0.05$)

LDH i α -HBDH u kombinaciji, kao i njihov odnos, jesu dobri markeri i pokazatelji promena na srcu. Povećanje njihove aktivnosti jeste signal oštećenja na nivou srca. Sam odnos oba markera isključuje promene na drugim organima za koje su manje specifični, ali značajni. Nivo LDH u cirkulaciji je povećan pri infarktu miokarda, bunbrežnom oštećenju, hepatitisu, anemiji, malignitetu, i oštećenju skeletne muskulature. U okviru predstavljenih eksperimentalnih rezultata primećena je promena i povećanje LDH aktivnosti samo u okviru Doks grupe, dok ostale grupe imaju približno jednake vrednosti, što još jednom potvrđuje šticećenje srca od strane Ful-a. Slični rezultati za markere infarkta miokarda dobijeni su sa ekstraktom *Centella asiatica* [17].

Aktivnost α -HBDH u serumu u okviru svih grupa nije značajno različita, osim što je nešto niža kod kontrolne kancer grupe. U okviru istraživanja, Bjelogrić i saradnici [35] dokazali su da je za većinu markera oštećenja srca optimalno vreme za identifikaciju promene u toku 48 sati, što je i urađeno u ovom istraživanju. Za razliku od ostalih markera α -HBDH aktivnost već u toku dva dana padne na normalan nivo i nije značajna za anлізу, ali sa proračunom za odnos α -HBDH/LDH može se zaključiti koji organ je u patološkom stanju. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da je pored oštećenja na srcu kod Doks grupe prisutno i oštećenje na parenhimu jetre.

Ultra strukturne promene praćene mikroskopskom metodom u okviru Doks grupe (slika 2b), su slične podacima iz literature [36]. Ful je pokazao značajan uticaj na očuvanje ultra strukture ćelija uključujući oštećenje fine strukture mitohondrija (slika 2c). Na osnovu tih rezultata potvrđeno je da Ful sistemom "lovljenja" slobodnih radikala smanjuje oštećenje ćelije i promene na membrani. Balanehru i Nagarajan su dokazali pre petnaest godina da antioksidanti mogu sprečiti Doks-om izazvano oštećenje miokarda [37]. Srčani miociti su meta za ROK napad u procesu koji dovode do patoloških promena na srcu. Kao posledica napada ćelijskih struktura od strane ROK-a dolazi i do promena na mitohondrijama [38]. Samim tim dolazi do smanjenja aktivnosti mitohondrijalnih enzima i do remećenja balansa pro-oksiant-antioksidant, što rezultuje oksidativnim stresom i konačnim oštećenjem ćelije [39].

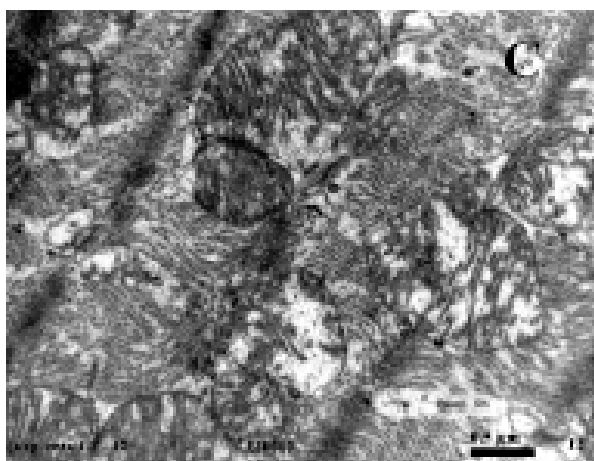
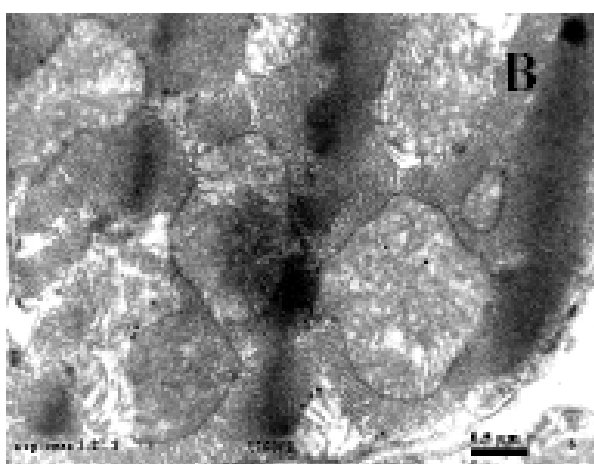
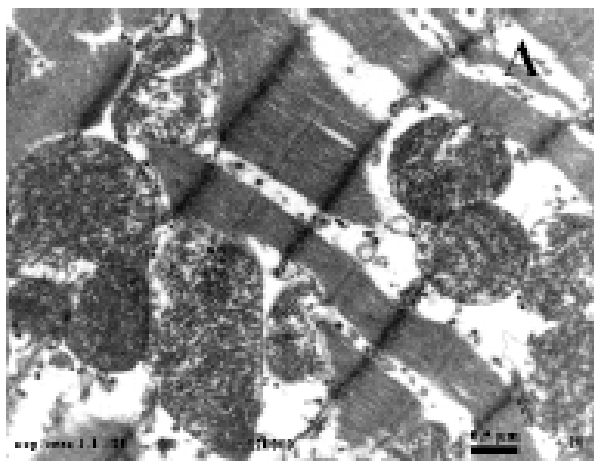
Ultra strukturne promene u okviru zdrave grupe, Doks i Ful/Doks grupa su prikazane na slici 2.

U toku preliminarnih istraživanja proučene su fiziološke promene u srčanom radu na osnovu EKG snimka. EKG je rađen drugi, sedmi i četrnaesti dan nakon aplikacije visoke doze Doks-a zdravim jedinkama i ustanovljeno je da tek posle 7 dana dolazi to pojave bradikardije, tako da u okviru dvodnevnog praćenja promena kod pacova sa tumorima, nije imalo smisla životinje dodatno mučiti, s obzirom da promene nisu signifikantne i uočljive u tako kratkom periodu od palikacije do pred eutanaziju.

S ciljem da se upotpuni celokupna slika promena na *in vivo* sistemu uz već opisane hematološke, serumske, makroskopske, mikroskopske i fiziološke rezultate, određen je i oksidativni status za sve grupe.

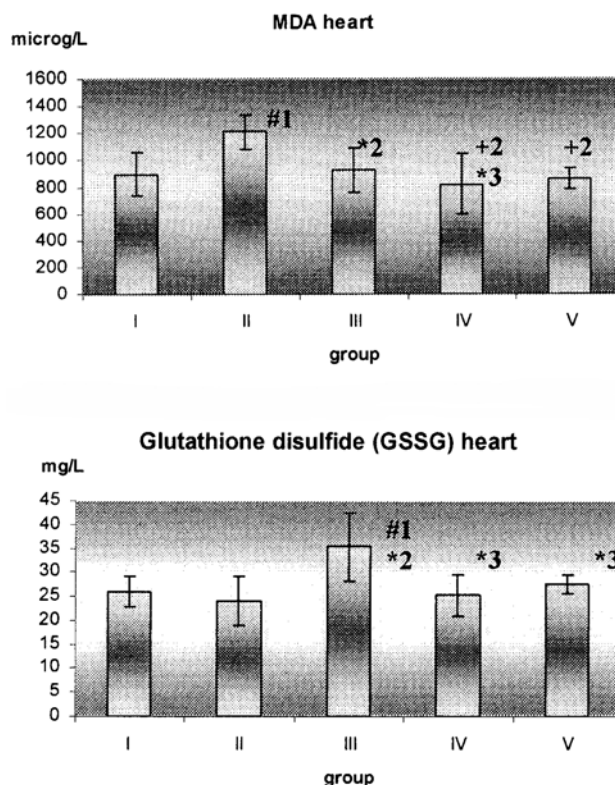
Kako bi se dokazao potencijalni kardioprotektni efekat fulerenola C₆₀(OH)₂₄ u toku Doks terapije na pacovima sa malignim tumorima dojki, određeni su lipidna peroksidacija, moć anioksidantnog sistema i proteinska oksidacija prema postupcima opisanim u delu Material i metode.

Kao što je prikazano na slici 3, nivo MDA i GSSG značajno je različit među određenim grupama. MDA drastično raste u kontrolnoj grupi sa tumorima, ali ujedno je i razlika primetna između Doks i Ful/Doks grupe. S druge strane, nivo GSSG signifi-



Slika 2. Izgled mitohondija: (A) normalna morfologija; dvo-sjorna membrana sa laminarnim kristama u okviru zdrave kontrolne grupe, (B) nepravilan oblik sa prozornim matriksom i dezorganizovanim kristama u okviru Doksi grupe pacova, i (C) amorfan materijal sa delimično dezorganizovanim kristama u Ful/Doksi grupi pacova.

Figure 2. Mitochondria showing (A) normal morphology, the double membrane envelope and lamellar cristae in the control rats; (B) irregular shape with lucent matrix and disorganised cristae in the Doksi rats and (C) amorphous material and rare disintegrated cristae in the Doksi/Ful rats.



Slika 3. Nivo MDA u GSSG u uzorcima srca. Značajna razlika u poređenju sa kontrolnom (1) zdravom grupom¹, kontrolnom (2) tumorskom grupom² i Doksi (3) tretiranom grupom³ (* $p < 0,05$; # $p < 0,01$; + $p < 0,001$).

Figure 3. Level of MDA, and GSSG in heart samples. Significant difference from the control (1) healthy group¹, control (2) cancer group² and Doksi (3) treated group³ (* $p < 0.05$; # $p < 0.01$; + $p < 0.001$).

kantno je viši u Doksi grupi u poređenju sa svim ostalim grupama.

MDA je poznati sekundarni produkt lipidne peroksidacije, i kao takav se koristi u svrhu biomarkera kod različitih ćelijskih oštećenja. Nivo MDA u Ful/Doksi grupi je značajno različit samo u odnosu sa Doksi grupom što potvrđuje hipotezu da Ful smanjuje lipidnu peroksidaciju i samim tim oštećenje srca. Takav rezultat je u skladu sa već opisanim rezultatima u literaturi [21–24,27]. Mehanizam inhibicije lipidne peroksidacije od strane Ful verovatno je uzrok "lovljenja" inicijalnih radikala kao što su $\cdot\text{OH}$ i ONOO^- .

Mereni nivo slobodnog GSH i odnos slobodnog-GSH/GSSG nije dao nikakve značajne razlike među ispitivanim grupama. Nasuprot tome, količina GSSG izrazito je veća u Doksi grupi dok je u Ful grupama na nivou kontrole. Nivo GSSG u tkivima i biološkim tečnostima bitan je pokazatelj oksidativnog stresa koji nastaje u toku različitih fizioloških i patoloških stanja organizma [40]. Povećanje GSSG posledica je povećanja GSH i njegove promene usled poremećenog balansa antioksidativne aktivnosti.

Aktivnost mitohondrijalnih antioksidativnih enzima (GR, CAT, GSH-Px i SOD) prikazana je na slici 4. Značajno povećanje GR, CAT i SOD kao i smanjenje aktivnosti GSH-Px primećeno je u Doks grupi. Nasuprot tome, za GR, CAT i SOD primećeno je da Ful/Doks i Ful grupe imaju nivo aktivnosti enzima u mitohondrijama na nivou zdrave kontrolne grupe.

SOD predstavlja prvi i glavni pokazatelj antioksidantne odbrane sistema protiv ROK-a, a posebno protiv superoksid anjona. Aktivnost SOD-a se može povećati iz više razloga. Gotovo da nema literaturnog podatka koji se bavi problemom oksidativnog statusa, a da SOD nije korištena kao marker promena.

Snižena aktivnost GSH-Px kao enzima koji je uključen u detoksikaciju od H_2O_2 , već je dokumentovana [17,33]. Nizak nivo enzima u svim grupama sa tumorima je potencijalno posledica nedostatka selen, koji je veoma važan za normalnu aktivnost ovog enzima. S druge strane, takođe je moguća inaktivacija GSH-Px izazvana sa $\cdot OH$ ili superoksidnim radikalom [41].

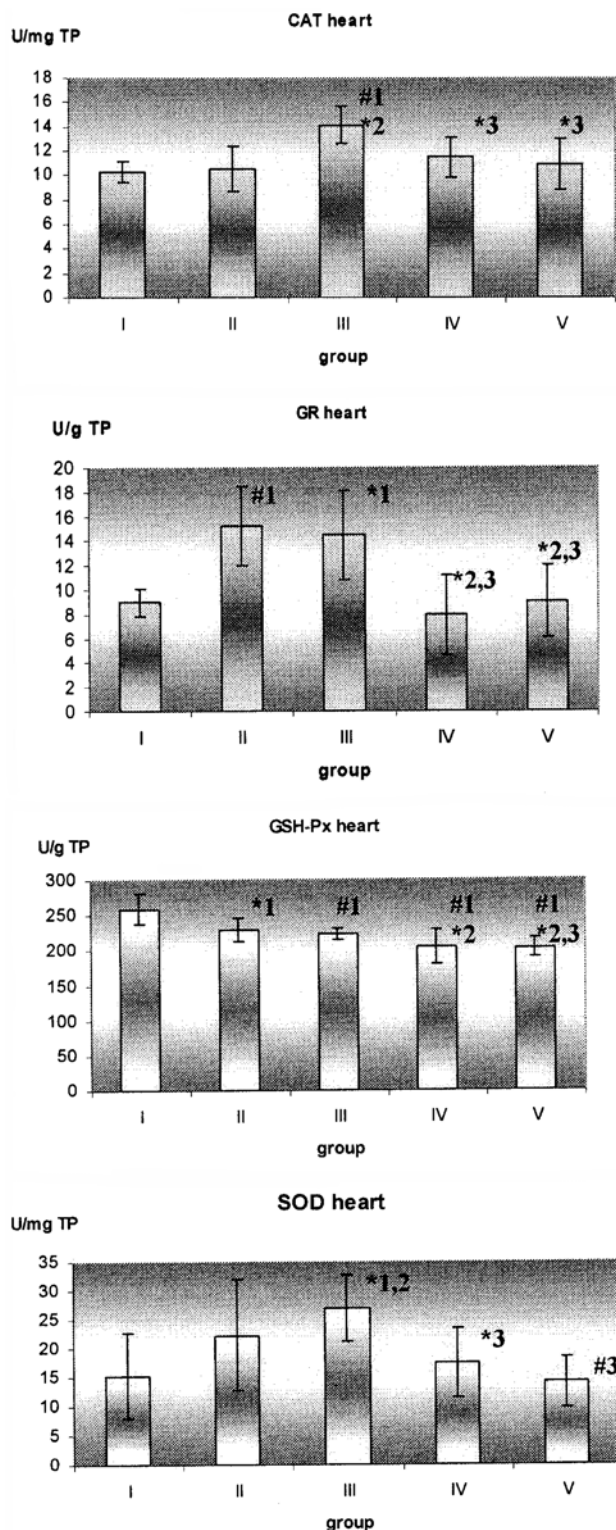
GSH-Px je ključna za uklanjanje toksičnih produkata lipidne peroksidacije i H_2O_2 . Smanjenje aktivnosti ovog enzima je već opisano i povezano sa Doks-indukovanom kardiotoksičnošću [3-5].

Mills i saradnici [40] jesu dokazali da je aktivnost CAT, GSSG i GR povećana u plućima pacova koji su izloženi 100%-tnom kiseoniku. Takvo stanje je potvrđeno kao oksidativni stres. Slični rezultati su dobijeni i u okviru eksperimenata za Doks grupu. Pored povećanja u okviru Doks grupe, značajno je i to da je i pomoću ovih parametara dokazano šticeenje srca pomoću Ful, jer je nivo parametara veoma sličan kontrolnim grupama.

Slobodni radikali su prisutni u mnogim patološkim stanjima kao što su maligni tumori, oboljenja srca, bolesti pluća, oštećenja vida, inflamatorne promene, reumatoidni artritis, i drugo. Slobodni radikali nastaju u normalnim metaboličkim procesima u organizmu ili pod uticajem spoljašnjih faktora kao što su UV zračenje, gama radijacija, zagađenje (teški metali, ksenobiotici) i dim cigarete. Antioksidantni sistem je sposoban da do određene mere ukloni slobodne radikale kao što su $RO\cdot$, $ROO\cdot$ i $O_2\cdot$.

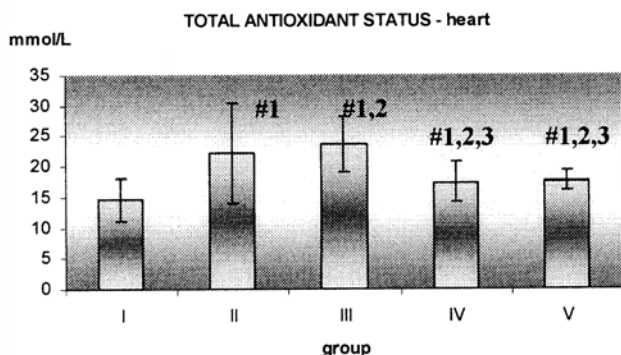
Postoje tri grupe antioksidanasa koji su deo antioksidantnog sistema i to su primarni (SOD, GSH-Px, metal-vezujući proteini), sekundarni (vitamini A, C, E, bilirubin, proteini) i tercijarni (biomolekule oštećene slobodnim radikalima). TAS se koristi za merenje sve tri grupe antioksidanata u cirkulaciji.

TAS je meren u svrhu celokupnog oksidativnog stanja na nivou srčanog homogenata. S obzirom da korišćena komercijalna metoda meri nivo antioksidanata odnosno promenu koncentracije reaktanta sa antioksidantima, zaključuje se da visok nivo za TAS predstavlja zapravo nisku antioksidativnu moć. S tog aspekta vidi se da je u okviru Doks grupe, nivo antioksidanata veoma nizak zbog potrošenih endogenih kapaciteta koji imaju ulogu da smanje oštećenja pro-



Slika 4. Nivo CAT, GR, GSH-Px i SOD u uzorcima srca. Značajna razlika u poređenju sa kontrolnom (1) zdravom grupom¹, kontrolnom (2) tumorskom grupom² i Doks (3) tretiranom grupom³ (* $p < 0,05$; # $p < 0,01$; + $p < 0,001$).

Figure 4. Level of CAT, GR, GSH-Px and SOD in heart samples. Significant difference from the control (1) healthy group¹, control (2) cancer group² and Doks (3) treated group³ (* $p < 0.05$; # $p < 0.01$; + $p < 0.001$).



Slika 5. Totalni antioksidantni status u uzorcima srca. Značajna razlika u poređenju sa kontrolnom (1) zdravom grupom¹, kontrolnom (2) tumorskom grupom² i Doks (3) tretiranom grupom³ (* $p < 0,05$; # $p < 0,01$; + $p < 0,001$).

Figure 5. Total antioxidant status in heart samples. Significant difference from the control (1) healthy group¹, control (2) cancer group² and Doks (3) treated group³ (* $p < 0,05$; # $p < 0,01$; + $p < 0,001$).

uzrokovana Doks-om (slika 5). S druge strane u grupe sa fulerenolom pokazale antioksidativnu sposobnost koja je na nivou kapaciteta zdravih jedinki.

Rezultati za TAS samo su potvrdili već opisane promene i kardioprotektivni efekat Ful-a na srce pacova sa malignim tumorima dojki koji su tretirani Doks-om.

ZAKLJUČAK

Fulerenol C₆₀(OH)₂₄ nakon pretretmanske i.p. aplikacije u dozi od 100 mg/kg, statistički značajno smanjuje oštećenje srca kod pacova sa malignim tumorima dojki koji su tretirani doksorubicinom. Rezultati dobijeni dva dana nakon aplikacije 8 mg/kg doksorubicina pokazuju veoma izraženo oštećenje srčanog mišića. U okviru grupe koja je primila samo fulerenol, većina merenih parametara je na nivou kontrolne grupe. Prema svim pokazateljima aktivnosti serumskih enzima, makroskopskim promenama, patohistološkim rezultatima i oksidativnim statusom može se zaključiti da je fulerenol potencijalni kardioprotektor za humanu upotrebu pri terapiji kancera doksorubicinom. Da bi se dobila celokupna slika protektivnog efekta, potrebno je u daljem istraživanju pratiti hroničan tok u dozama koje se aplikuju tokom dužih vremenskih intervala, baš kao što je to i u realnoj kliničkoj aplikaciji.

ZAHVALNICA

Istraživanja predstavljena u ovom radu realizovana su u okviru naučnih projekata broj 142076 Ministarstva za nauku Republike Srbije i P4-0127 Agencije za istraživačku delatnost Republike Slovenije. Posebnu zahvalnost dugujemo kolegama Martini Perše, profesoru Antonu Ceraru, Mariji Bošković, Anastaziji Hvala i Vukosavi Đorđević-Milić za tehničku i stručnu pomoć.

LITERATURA

- [1] R.B. Weiss, Semin Oncol. **19** (1992) 670–686.
- [2] P.K. Singal, N. Iliskovic, N. Engl. J. Med. **339** (1998) 900–905.
- [3] P. Menna, G. Minotti, E. Salvatorelli, Cell. Biol. Tox. **23** (2007) 49–62.
- [4] G. Takemura, H. Fujiwara, Prog. Cardiovasc. Dis. **49** (2007) 330–352.
- [5] K.J. Davis, J.H. Doroshow, J. Biol. Chem. **261** (1986) 3060–3067.
- [6] N. Siveski-Iliskovic, M. Hill, D.A. Chow M. Hill, P.K. Singal, Circulation **91** (1995) 10–15.
- [7] T. Li, I. Danelisen, P.K. Singal, Mol. Cell. Biochem. **232** (2002) 19–26.
- [8] C. Myers, R. Bonow, S. Palmeri et al. Semin. Oncol. **10** (1983) 53–55.
- [9] P.K. Singal, G.N. Pierce, Am. J. Physiol. **250** (1986) H419–H425.
- [10] R. Jeyaseelan, C. Poizat, R.K. Baker, S. Abdishoo, L.B. Isterabadi, G.E. Lyons, L. Kedes, J. Biol. Chem. **272** (1997) 22800–22808.
- [11] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Pharmacol. Rev. **56** (2004) 185–229.
- [12] S. Zhou, A. Starkov, M.K. Froberg, R.L. Leino, K.B. Wallace, Cancer Res. **61** (2001) 771–777.
- [13] P.K. Singal, N. Iliskovic, T. Li, D. Kumar, FASEB J. **11** (1997) 931–936.
- [14] P.K. Singal, T. Li, D. Kumar, I. Danelisen, N. Iliskovic, Mol. Cell. Biochem. **207** (2000) 77–85.
- [15] H.H. Ahmed, F. Mannaa, G.A. Elmegeed, S.H. Doss, Bioorg. Med. Chem. **13** (2005) 1847–1857.
- [16] S. Mukherjee, S.K. Banerjee, M. Maulik, A.K. Dinda, K.K. Talwar, S.K. Maulik, BMC Pharmacol. **3** (2003) 16–24.
- [17] A. Gnanapragasam, S. Yogeeta, R. Subhashini, K.K. Ebenezar, V. Sathish, T. Devaki, Mol. Cell. Biochem. **294** (2007) 55–63.
- [18] G. Minotti, G. Cairo, E. Monti, FASEBJ. **13** (1993) 199–212.
- [19] R. Zucchi, R. Danesi, Curr. Med. Chem. **3** (2003) 151–171.
- [20] E.J. Ladas, J.S. Jacobson, D.D. Kennedy, K. Teel, A. Fleischauer, K.M. Kelly, J. Clin. Oncol. **22** (2004) 517–528.
- [21] G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Djordjevic, J. Canadanovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, V. Baltic, Toxicol. in Vitro **18** (2004) 629–637.
- [22] S. Mirkov, A. Djordjevic, N. Andric, S. Andric, T. Kostic, G. Bogdanovic, M. Vojinovic-Miloradov, R. Kovacevic, Nitric Oxide **11** (2004) 201–207.
- [23] S. Trajkovic, S. Dobric, A. Djordjevic, V. Dragojevic-Simic, V. Milovanovic, Mater. Sci. Forum **494** (2005) 549–554.
- [24] A. Djordjevic, J. Canadanovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, G. Bogdanovic, Oxi. Comm. **27** (2005) 806–812.
- [25] A. Djordjevic, G. Bogdanovic, S. Dobric, J. BUON **11** (2006) 391–404.
- [26] V. Djordjevic-Milic, A. Djordjevic, S. Dobric, R. Injac, D. Vuckovic, K. Stankov, V. Dragojevic-Simic, Lj. Suvajdzic, Mater. Sci. Forum **518** (2006) 525–529.
- [27] S. Trajkovic, S. Dobric, V. Jacevic, V. Dragojevic-Simic, Z. Milovanovic, A. Djordjevic, Colloids Surf., **B** **58** (2007) 39–43.
- [28] V. Bogdanovic, K. Stankov, I. Icevic, D. Zikic, A. Nikolic, S. Solajic, A. Djordjevic, G. Bogdanovic, J. Radiat. Res. In press.
- [29] A. Djordjevic, M. Vojinovic-Miloradov, N. Petranovic, A. Devecerski, D. Lazar, B. Ribar, Fullerene Sci. Technol. **6** (1998) 689–694.

- [30] J. Liska, S. Galbavy, D. Macejova, J. Zlatos, J. Brtko, *Endocr. Regul.* **34** (2000) 91–96.
- [31] H. Aebi, *Methods Enzymol.* **105** (1984) 121–126.
- [32] R.W. Bellhom, G.E. Korte, D. Abrutyn, *Lab. Anim. Sci.* **38** (1988) 46–50.
- [33] F.A.A. van Acker, J.W. Hulshof, G.R.M.M. Haenen, W.M.P.B. Menge, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, *Free Radical Biol. Med.* **31** (2001) 31–37.
- [34] M. Khan, S. Varadharaj, J.C. Shobha, M.U. Naidu et al. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **47** (2006) 9–20.
- [35] S.K. Bjelogrić, J. Radic, V. Jovic, S. Radulovic, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97** (2005) 311–319.
- [36] P.J. Oliveira, A.J. Bjork, S.M. Santos, R.L. Leino, M.K. Froberg, A.J. Moreno, K.B. Wallace, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **200** (2) (2004) 159–168.
- [37] S. Balanehru, B. Nagarajan, *Biochem. Int.* **28** (1992) 735–744.
- [38] E.R. Stadtman, *Science* **257** (1992) 1220–1224.
- [39] E.G. Mimnaugh, M.A. Trush, F.E. M. Bhatnagar, T.E. Gram, *Biochem. Pharmacol.* **34** (1985) 847–856.
- [40] B.J. Mills, J.P. Richie, C.A. Jr. Lang, *Anal. Biochem.* **222** (1994) 95–101.
- [41] J. Blum, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.* **249** (1985) 500–508.

SUMMARY

DOXORUBICIN-INDUCED MYOCARDIAL FAILURE IN RATS WITH MALIGNANT NEOPLASM: PROTECTIVE ROLE OF FULLERENOL C₆₀(OH)₂₄

(Scientific paper)

Rade Injac^{1,2}, Aleksandar Đorđević³, Borut Strukelj¹

¹Faculty of Pharmacy, The Chair of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Slovenia

²Medical Faculty, Department of Pharmacy, University of Novi Sad, Serbia

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

The therapeutic utility of the anthracycline antibiotic doxorubicin is limited due to its cardiotoxicity. Our aim was to investigate the efficacy of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in preventing single, high-dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that fullereneol C₆₀(OH)₂₄ has strong antioxidative potential. Experiment was performed on adult female Sprague Dawley rats with chemically induced mammary carcinomas. All 32 rats (2–5 groups) received *i.p.* applications of 1-methyl-1-nitrosourea (MNU; 50 mg/kg body weight) on the 50th and 113th day of age. Animals were randomly divided into five groups as follows: (1) Untreated control group – rats received saline only; (2) Cancer control group – rats received MNU and saline; (3) Dox group – rats received MNU and Dox 8 mg/kg; (4) Full/Dox group – rats received MNU and Full 100 mg/kg 30 min before Dox 8 mg/kg; (5) Full group – rats received MNU and Full 100 mg/kg.

Tumour incidence was 4.94 ± 0.576 per rat. The animals were sacrificed 2 days after the application of doxorubicin and/or fullereneol, and the serum activities of CK, LDH and α-HBDH, as well as the levels of MDA, GSH, GSSG, GSH-Px, SOD, CAT, GR and TAS in the heart, were determined. The results obtained from the enzymatic activity in the serum show that the administration of a single dose of 8 mg/kg in all treated groups induces statistically significant damage. There are significant changes in the enzymes of LDH and CK (*p* < 0.05), after an *i.p.* administration of doxorubicin/fullereneol and fullereneol. Comparing all groups with untreated control group, point to the conclusion that in the case of a lower α-HBDH/LDH ratio, results in more serious the liver parenchymal damage. The results revealed that doxorubicin induced oxidative damage and that the fullereneol antioxidative influence caused significant changes in MDA, GSH, GSSG, GSH-Px, SOD, CAT, GR and TAS level in the heart (*p* < 0.05). Ultra structural analysis of heart tissues from rats treated with doxorubicin and indicated that the hearts of the rats were protected from doxorubicin-induced subcellular damage. Doxorubicin/fullereneol rats did not appear to show significant cardiac damage although occasional focal loss of cristae in the mitochondria was observed.

Therefore, it is suggested that fullereneol might be a potential cardioprotector in doxorubicin-treated individuals.

Key words: Cardioprotection • Doxorubicin • Fullereneol • Oxidative stress • Heart • Rats • Mammary carcinomas •

Ključne reči: Kardioprotektivnost • Fulerenol • Oksidativni stress • Srce • Pacovi • Karcinom dojke •