

# Utjecaj različitih formulacija doksorubicina na oksidativni stres u jetri

---

**Pavišić, Anita**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:859902>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Anita Pavišić**

**Utjecaj različitih formulacija doksorubicina na  
oksidativni stres u jetri**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Petre Turčić i suvoditeljstvom dr. sc. Blanke Tariba Lovaković u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2016-06-2436 „Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje – NanoFaceS“.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Petri Turčić i komentorici dr. sc. Blanki Tariba Lovaković na pruženoj pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Nadalje, želim se zahvaliti i svojim prijateljima na potpori te im zahvaljujem što su mi uljepšali studiranje.*

*Najveću zahvalu upućujem svojim roditeljima i braći na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. DOKSORUBICIN .....	2
1.1.1. Struktura i svojstva.....	2
1.1.2. Farmakodinamika.....	3
1.1.3. Farmakokinetika .....	4
1.1.4. Indikacije .....	5
1.1.5. Kontraindikacije.....	6
1.1.6. Interakcije .....	6
1.1.7. Nuspojave .....	7
1.1.8. Liposomalna formulacija doksorubicina Myocet .....	10
1.1.9. PLGA nanočestice doksorubicina.....	12
1.2. OKSIDATIVNI STRES.....	13
1.2.1. Mehanizam kardiotoksičnosti doksorubicina .....	16
1.2.2. Mehanizam hepatotoksičnosti doksorubicina.....	17
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
3.1. PUFERI I KOMERCIJALNI ANALITIČKI TESTOVI.....	22
3.2. KEMIKALIJE I PRIBOR.....	22
3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE.....	23
3.4. METODE ISTRAŽIVANJA .....	24
3.4.1. Priprema homogenata.....	24
3.4.2. Analiza GSH .....	24
3.4.3. Analiza ROS .....	25
3.4.4. Određivanje ukupnih proteina.....	26
3.4.5. Statistička obrada podataka .....	28
<b>4. REZULTATI</b> .....	29
Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri .....	30
Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu superoksidnog radikala u jetri.....	32
Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu peroksidnog radikala u jetri.....	34
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	42
<b>7. LITERATURA</b> .....	44
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	48
<b>POPIS KRATICA</b>	
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

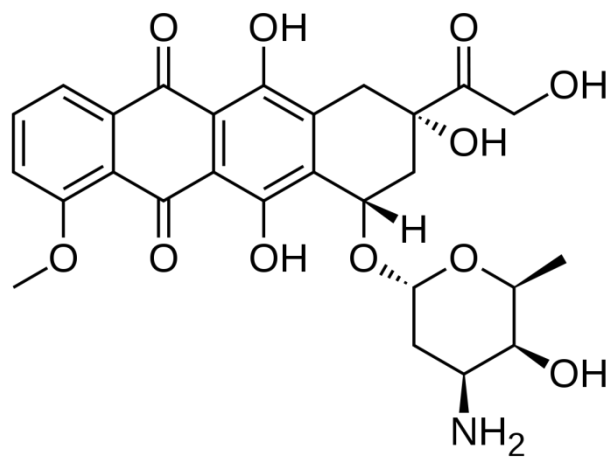
## **1. UVOD**

## 1.1. DOKSORUBICIN

### 1.1.1. Struktura i svojstva

Doksorubicin (Dox) je antraciklinski antibiotik s antineoplastičnom akitvnosti. Izoliran je iz bakterije *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Molekulska formula doksorubicina je  $C_{27}H_{29}NO_{11}$ , a molekulska masa iznosi 543.5 g/mol. Sadrži 6 veza koje su donori vodikove veze i 12 veza koje su akceptori vodikove veze te ima 5 veza oko kojih je moguća rotacija (Slika 1). Doksorubicin je crvena kristalična krutina topljiva u vodi, vodenim alkoholima, umjereno topljiva u bezvodnom metanolu i netopljiva u nepolarnim organskim otapalima ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).

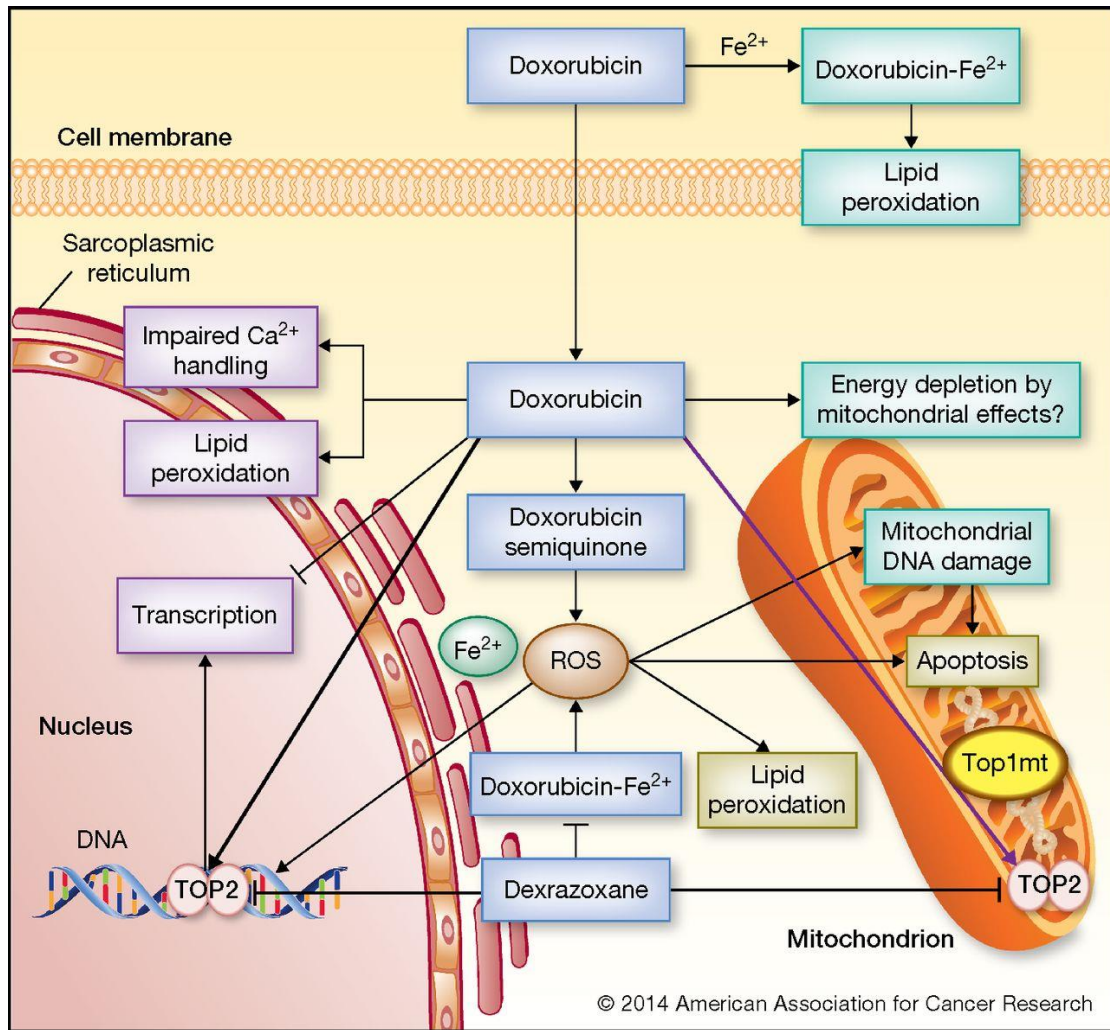
Antraciklini u strukturi imaju tetraciklinski prsten sa šećerom daunozaaminom koji je vezan glikozidnom vezom. Citotoksični agensi ove skupine imaju kinonske i hidrokinonske dijelove na susjednim prstenovima koji im omogućavaju da djeluju kao akceptori i donori elektrona (Waterhouse i sur., 2001).



**Slika 1.** Struktura doksorubicina (<https://en.wikipedia.org/>)

### 1.1.2. Farmakodinamika

Doksorubicin je antimitotički i citotoksični lijek. Točan mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da je nekoliko mehanizama odgovorno je za njegovo antitumorsko djelovanje (Slika 2). Doksorubicin interkalira između parova baza DNA što rezultira inhibicijom DNA i RNA sinteze uslijed poremećaja rasporeda baza i steričkih smetnji (Waterhouse i sur., 2001). Doksorubicin inhibira enzim topoizomerazu II. Djelovanje antraciklina je nespecifično za faze staničnog ciklusa, tj. djeluju na matične stanice tumora u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa ili u fazi mirovanja. Mehanizam koji je odgovoran za antitumorsko djelovanje doksorubicina je i stvaranje semikinonskih slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta kroz reduktivni proces ovisan o željezu koji oštećuje staničnu membranu i DNA (Katzung, 2018). Također, doksorubicin se veže na staničnu membranu i mijenja fluidnost i transport iona. Dovodi do poremećaja u natrijevim i kalcijevim kanalima, intracelularnom transportu elektrona, kelira dvovalentne katione, inhibira Na/K-ATPazu te se veže na određene dijelove stanične membrane osobito na membranske lipide, spektrin i kardiolipin (Katzung, 2018; Batist i sur., 2002; [www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).



Slika 2. Mehanizam djelovanja doksorubicina (Nitiss i Nitiss, 2014)

### 1.1.3. Farmakokinetika

Doksorubicin prolazi kroz ekstenzivan hepatički metabolizam, a kao glavni metabolit nastaje doksorubicinol (adriamicinol). Nakon intravenske primjene lijeka, krivulja nestanka doksorubicina iz plazme je trifazična, uz poluvremena od 12 minuta, 3,3 sata i 30 sati. Relativno dug terminalni poluvijek eliminacije odražava raspodjelu doksorubicina u duboka tkiva.

Doksorubicin se može metabolizirati kroz tri metabolička puta: redukcijom jednog elektrona, redukcijom dva elektrona i deglikozidacijom. Redukcija dva elektrona daje doksorubicinol (adriamicinol), sekundarni alkohol, što je aktivni citotoksični agens. Taj put se smatra primarnim metaboličkim putem. Ovu redukciju kataliziraju citoplazmatske NADPH-



ovisne aldo-keto reduktaze koje se nalaze u svim tkivima i igraju značajnu ulogu u određivanju cjelokupne farmakokinetike doksorubicina.

U redukciju jednog elektrona uključeno je nekoliko oksidoreduktaza te nastaje doksorubicin-polukinonski radikal. Ti enzimi uključuju mitohondrijske i citosolne NADPH dehidrogenaze, ksantin oksidazu i sintaze dušikovog oksida.

Deglikozidacija predstavlja mali dio metaboličkog puta (1-2% doze prolazi kroz ovaj put). Mikrosomalne glikozidaze prisutne u većini tkiva cijepaju doksorubicin i doksorubicinol u inaktivne, u vodi slabo topljive aglikone. Nastali metaboliti su doksorubicinon (adriamicinon) i 7-deoksidoksorubicinon (17-deoksiadriamicinon). Aglikoni potom prolaze kroz O-demetilaciju, nakon čega slijedi konjugacija u sulfate ili glukoronidne estere, te izlučivanje u žuč. Ostatak doksorubicina i degradacijskih produkata dugo se zadržavaju u tjelesnim tkivima.

Budući da je eliminacija doksorubicina uglavnom putem jetre, oštećenje funkcije jetre rezultirat će slabijom eliminacijom, te posljedično povećanom retencijom i akumulacijom u plazmi i tkivima.

Doksorubicin i njegov glavni metabolit, doksorubicinol, 74-76% su vezani za proteine plazme. Doksorubicin ne prelazi krvno-moždanu barijeru ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca); [www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova); [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **1.1.4. Indikacije**

Doksorubicin je jedan od najvažnijih antitumorskih lijekova u kliničkoj praksi. Indiciran je u liječenju karcinoma dojke, endometrija, jajnika, testisa, štitnjače, želudca, mokraćnog mjehura, jetre, pluća, sarkoma mekih tkiva, malignih bolesti u djece, uključujući neuroblastom, Ewingov sarkom, osteosarkom i rabdomiosarkom. Također, indiciran je i u liječenju hematoloških bolesti, uključujući akutnu limfoblastičnu leukemiju, multipli mijelom, Hodgkinove i ne-Hodgkinove limfome.

Doksorubicin se obično primjenjuje u kombiniranim kemoterapijskim režimima zajedno s drugim citotoksičnim lijekovima (npr. ciklofosamidom, cisplatinom i 5-fluorouracilom), a klinička se aktivnost poboljšava kombiniranim režimima za razliku od terapije jednim lijekom (Katzung, 2018). Doksorubicin se ne smije primjenjivati kao antibakterijski lijek ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

U kliničkoj praksi antraciklini se primjenjuju intravenski. Ukupna doza doksorubicina po ciklusu razlikuje se s obzirom na njegovu primjenu unutar određenog režima liječenja (npr. ako se primjenjuje kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim citotoksičnim lijekovima), te s obzirom na indikaciju. Kod oštećenja jetrene funkcije dozu doksorubicina treba smanjiti. U slučajevima renalne insuficijencije s GFR-om manjim od 10 mL/min, potrebno je primijeniti 75% izračunate doze. Dozu također treba smanjiti u djece, pretilih bolesnika i starijih osoba ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

### **1.1.5. Kontraindikacije**

Doksorubicin se ne smije primjenjivati kod preosjetljivosti na druge antracikline ili antracenedione, dugotrajne mijelosupresije, teškog oštećenja jetrene funkcije, teške insuficijencija miokarda, nedavnog srčanog infarkta, prethodnog liječenja maksimalnom kumulativnom dozom doksorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina i/ili drugim antraciklinima i antracenedionima. Doksorubicin se pokazao genotoksičnim i mutagenim u ispitivanjima in vitro i in vivo te ima štetne farmakološke učinke na trudnoću i/ili fetus/novorodjenče. Zbog moguće embriotoksičnosti, ovaj lijek se ne smije primjenjivati tijekom trudnoće osim ako je to prijeko potrebno. Doksorubicin se izlučuje u majčino mlijeko te zbog toga žene ne smiju dojiti tijekom terapije doksorubicinom ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

### **1.1.6. Interakcije**

Antraciklini, uključujući doksorubicin, ne smiju se primjenjivati u kombinaciji s drugim kardiotoksičnim lijekovima. Primjena doksorubicina u kombinaciji s drugim potencijalno kardiotoksičnim lijekovima u okviru kemoterapije, kao i istodobna primjena kardioaktivnih lijekova (npr. blokatora kalcijevih kanala) zahtijevaju praćenje srčane funkcije tijekom liječenja. Bolesnici koji primaju antracikline nakon obustave liječenja drugim kardiotoksičnim lijekovima, osobito onima dugog poluvijeka, poput trastuzumaba, mogu također biti izloženi povećanom riziku za razvoj kardiotoksičnosti.

Doksorubicin se uglavnom primjenjuje u kombinaciji s drugim citotoksičnim lijekovima. Aditivna toksičnost se može prije svega pojaviti u obliku hematoloških te gastrointestinalnih učinaka.

Doksorubicin može potencirati toksičnost drugih protutumorskih lijekova. Zabilježeno je pogoršanje hemoragičkog cistitisa uzrokovanog ciklofosamidom te povećanje hepatotoksičnosti 6-merkaptopurina.

Visoka doza ciklosporina povećava serumske razine i mijelotoksičnost doksorubicina. Paklitaksel može izazvati povećanje koncentracije doksorubicina i/ili njegovih metabolita u plazmi ako se primijeni prije doksorubicina. Neki podaci ukazuju na to da je povećanje manje kada se doksorubicin primijeni prije paklitaksela. U literaturi je objavljeno nekoliko izvještaja koji opisuju porast kardiotoksičnosti kada se doksorubicin istodobno primjenjuje s paklitakselom.

Induktori enzimskog sustava citokroma P-450 (npr. rifampicin i barbiturati) mogu stimulirati metabolizam doksorubicina i tako smanjiti njegovu djelotvornost. Inhibitori citokroma P-450 (npr. cimetidin) mogu smanjiti metabolizam doksorubicina i povećati toksični učinak.

Istodobna primjena doksorubicina i fenitoina smanjuje razinu doksorubicina i fenitoina u plazmi. Interakcije doksorubicina također su prijavljene za streptozocin, fenobarbital i varfarin ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova); [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **1.1.7. Nuspojave**

Klinička aktivnost doksorubicina, kao i kod drugih antraciklina, ograničena je kardiomiopatijom ovisnoj o kumulativnoj dozi koja može dovesti do kongestivnog zatajenja srca i smrti.

Kardiotoksičnost izazvana antraciklinima uključuje stvaranje metaboličkih slobodnih radikala koji uzrokuju peroksidaciju lipida i oštećenje miocita, a povezana je s ukupnom kumulativnom dozom lijeka. Nastala ozljeda u početku je subklinička, ali kontinuirani ciklusi liječenja rezultiraju progresivnim oštećenjem miocita što dovodi do kumulative srčane disfunkcije. To se može manifestirati kroz terapiju, mjesecima ili čak godinama nakon posljednje doze antraciklina. Doksorubicin povezan je s 5%-tnim rizikom od kongestivnog

zatajenja srca kod bolesnika koji su primili kumulativnu dozu doksorubicina od 400 mg/m<sup>2</sup>, a veće doze dovode do eksponencijalnog povećanja rizika, do 48% pri 700 mg/m<sup>2</sup>. Zbog kardiotoksičnosti, kumulativna doza koja prelazi 400-500 mg/m<sup>2</sup> uz 21-dnevni režim i 700 mg/m<sup>2</sup> s tjednim režimom se ne preporučuje.

Mogu se javiti dva oblika kardiotoksičnosti: akutna (rana) i kronična (odgođena) kardiotoksičnost.

Akutni oblik pojavljuje se unutar prva 2-3 dana, a karakteriziraju ga abnormalnosti u EKG-u kao što su nespecifične promjene ST-T segmenta i produljenje QT interval, aritmije, perikarditis i miokarditis. Ovaj je oblik obično prolazan i u većini slučajeva je asimptomatski te uglavnom ne zahtijeva prekid liječenja doksorubicinom.

Kasna kardiotoksičnost se obično razvija u kasnijim fazama liječenja doksorubicinom ili unutar 2 do 3 mjeseca nakon završetka liječenja, no može se pojaviti i kasnije, nekoliko mjeseci do nekoliko godina nakon završetka liječenja. Odgođena kardiomiopatija očituje se smanjenjem ejijske frakcije lijevog ventrikula (LVEF) i/ili znakovima i simptomima kongestivnog zatajivanja srca kao što je dispneja, plućni edem, edemi, kardiomegalija, hepatomegalija, pleuralni izljev. Kongestivno zatajivanje srca najteži je oblik kardiomiopatije uzrokovane antraciklinima i predstavlja oblik o dozi ovisne kumulativne toksičnosti. Kronična kardiotoksičnost rezultat je povećane proizvodnje slobodnih radikala u miokardu. Ovaj se efekt rijetko primjećuje u ukupnim dozama doksorubicina ispod 400–450 mg/m<sup>2</sup>. Iako se antraciklini obično primjenjuju svaka tri tjedna, alternativni programi poput nižih tjednih doza ili kontinuirane infuzije tijekom 72-96 sati pokazali su jednaku kliničku učinkovitost sa smanjenom učestalosti srčane toksičnosti. Pored toga, liječenje sredstvom koje kelira željezo, deksrazoksanom dobro je za sprečavanje ili smanjenje kardiotoksičnosti izazvane antraciklinima kod žena s metastatskim karcinomom dojke koje su primile ukupnu kumulativnu dozu doksorubicina od 300 mg/m<sup>2</sup>. Primjena kelatora željeza deksrazoksana smanjuje željezo raspoloživo za kompleksiranje s doksorubicinom, smanjujući tako i oksidativni stres ovisan o željezu koji dovodi do kardiotoksičnosti.

Rizični čimbenici kardiotoksičnosti uključuju postojeću kardiovaskularnu bolest, radioterapiju u području sredoprsja (medijastinuma) i osrčja (perikarda), prethodnu terapiju drugim antraciklinima ili antracenedionima, te istodobnu primjenu lijekova koji suprimiraju srčanu kontraktilnost ili kardiotoksičnih lijekova.

Prije početka liječenja doksorubicinom mora se utvrditi srčana funkcija te ju je potrebno pratiti tijekom cijelog perioda liječenja kako bi se umanjila opasnost od ozbiljnih srčanih oštećenja.

Iako je srce jedno od preferencijalnih mjesta na kojima se razvija toksičnost izazvana doksorubicinom, pokazalo se da doksorubicin štetno djeluju na brojne sistemske organe. Gotovo 30% pacijenata nakon liječenja doksorubicinom razvilo je jetrene abnormalnosti. Patofiziološke posljedice oksidativnog oštećenja jetre uključuju poremećaj regulacije metabolizma lipida (steatoza), oslabljenu funkciju jetre (degeneracija i smrt hepatocita) i aktiviranje imunološkog odgovora (upala i fibroza/ciroza).

Toksičnost koja ograničava dozu svih antraciklina je i mijelosupresija, s tim da se neutropenija češće opaža od trombocitopenije, te predstavljaju najčešći oblik akutne, o dozi ovisne toksičnosti. Hematološka toksičnost najizrazitija je 10 do 14 dana nakon primjene. Vrijednosti hematoloških pokazatelja obično se vraćaju na normalu unutar 21 dan nakon primjene. Kliničke posljedice teške mijelosupresije uključuju vrućicu, infekcije, sepsu/septikemiju, septički šok, krvarenje, hipoksiju tkiva ili smrt. Hematološki profili moraju se utvrditi prije i tijekom svakog ciklusa terapije doksorubicinom, uključujući i diferencijalnu sliku bijelih krvnih stanica.

Ostale nuspojave doksorubicina su mukozitis, alopecija koja se obično javlja 3-4 tjedna nakon početka terapije, mučnina, povraćanje, sekundarna leukemija koja može imati razdoblje mirovanja (latencije) od 1 do 3 godine. Antraciklini također mogu uzrokovati "radiation recall reaction", s eritemom i deskvamacijom kože uočenim na mjestima prethodne terapije zračenjem. Doksorubicin može izazvati hiperuricemiju zbog intenzivnog katabolizma purina koji se javlja zbog brze lize neoplastičnih stanica uzrokovane lijekom (sindrom lize tumora). Zbog toga je nakon početka liječenja nužno odrediti razine mokraćne kiseline u krvi, kalija, kalcijevog fosfata i kreatinina. Doksorubicin u žena može izazvati neplodnost i amenoreju te oligospermiju i azoospermiju u muškaraca. Rijetke nuspojave izazvane doksorubicinom uključuju ulceraciju i nekrozu debelog crijeva i neuropatiju. Glavni put izlučivanja doksorubicina je hepatobilijarni sustav, pa se zbog toga vrijednost ukupnog serumskog bilirubina treba odrediti prije početka i tijekom liječenja. U bolesnika s povišenim bilirubinom može doći do sporijeg izlučivanja lijeka iz organizma te posljedičnog povećanja ukupne toksičnosti. (Katzung, 2018; Zamorano i sur., 2016; Nagai i sur., 2015; Lamberti i

sur., 2014; Chen i sur., 2013; Batist i sur., 2002; Waterhouse i sur., 2001  
[www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova))

### **1.1.8. Liposomalna formulacija doksorubicina Myocet**

Doksorubicin, bilo pojedinačno ili u kombiniranom režimu, jedan je od najvažnijih lijekova u terapiji raka dojke. Međutim, klinička korisnost ove vrlo učinkovite terapije ograničena je kardiotsičnim učinkom i supresijom koštane srži. Zbog važnosti doksorubicina u liječenju raka dojke, poduzeta su znatna istraživanja radi poboljšanja terapijskog indeksa doksorubicina, posebno smanjenjem pridružene kardiotsičnosti. Liposomalna formulacija doksorubicina ima značajno poboljšani terapijski indeks u usporedbi s konvencionalnim doksorubicinom. Razvoj Myoceta, manje kardiotsičnog, bolje podnošljivog i jednako djelotvornog doksorubicina, proširilo je terapijske mogućnosti u cjelokupnom liječenju raka dojke (Batist i sur., 2002).

Myocet je kompleks doksorubicin-citrat inkapsuliran u liposome koji odgovara 50 mg doksorubicinklorida. Myocet, u kombinaciji s ciklofosfamidom, indiciran je kao prva linija liječenja metastatskog karcinoma dojke u odraslih žena. Kad se Myocet primjenjuje u kombinaciji s ciklofosfamidom ( $600 \text{ mg/m}^2$ ) početna preporučena doza Myoceta iznosi  $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$  svaka tri tjedna te se primjenjuje intravenskom infuzijom ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

Liposomi su fosfolipidne membranske vezikule koje mogu djelovati kao nosači lijekova kako bi ih usmjerili na specifična tkiva. Inkapsulacija lijeka unutar liposoma može rezultirati prednostima kao što su poboljšanje topljivosti i stabilnosti, sprječavanje brze razgradnje inkapsuliranog lijeka, smanjenje specifične ili sistemske toksičnosti, poboljšanje učinkovitosti lijeka. Također, liposomi mijenjaju farmakokinetiku lijeka. U usporedbi s farmakokinetikom standardnog doksorubicina, klirens ukupnog doksorubicina nakon primjene Myoceta je oko 9 puta manji i volumen raspodjele je 25 puta niži. Koncentracije doksorubicina u plazmi znatno su više s Myocetom nego sa standardnim doksorubicinom dok podaci ukazuju da su vršne plazmatske vrijednosti doksorubicina niže s Myocetom nego sa standardnom doksorubicinom. Vršne razine doksorubicinola javljaju se u plazmi kasnije kod

Myoceta nego kod standardnog doksorubicina. Myocet formulacija otpušta više od polovice doksorubicina u roku jednog sata od intravenske primjene i više od 90% u roku od 24 sata (Batist i sur., 2002; Swenson i sur., 2001; Waterhouse i sur., 2001; [www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

Myocet je razvijen kako bi se doksorubicin ciljano dostavio na mjesto tumora uz istovremeno očuvanje zdravih tkiva, posebno srca (Swenson i sur., 2001). Povećani terapijski indeks postignut je dizajniranjem liposoma koji se duže zadržavaju u cirkulaciji i ograničavaju dostupnost inkapsuliranog lijeka u normalnim tkivima. Temelj dizajna Myoceta je da intravenski ubrizgani liposomi ne napuštaju cirkulaciju kroz čvrste kapilarne spojeve koji se nalaze u zdravim tkivima kao što su srce i gastrointestinalni trakt, ali prolaze kroz oštećenu krvožilnu mrežu koja se nalazi na upalnim mjestima i u tumorima. To omogućava nakupljanje lijeka na mjestima infekcije, upale ili neoplazije zbog propusne vaskulature prisutne na tim područjima. Također, u tumorima su dokazane veće razine fosfolipaza, što bi moglo dovesti do preferiranog oslobađanja doksorubicina iz liposoma u tim područjima u usporedbi s normalnim tkivima. Stoga bi Myocet trebao usmjeriti doksorubicin dalje od mjesta potencijalne toksičnosti, ali doksorubicin učinkovito isporučiti u tumore (Batist i sur., 2002).

Analize kardiotoksičnosti u kliničkim ispitivanjima pokazale su statistički značajno smanjenje srčanih događaja u bolesnika liječenih Myocetom u usporedbi s bolesnicama liječenim standardnim doksorubicinom u istoj dozi lijeka u mg. Metaanaliza je pokazala statistički značajno nižu stopu i kliničkog zatajenja srca i kombiniranog kliničkog i subkliničkog zatajenja srca u bolesnika liječenih Myocetom naspram onih liječenih standardnim doksorubicinom ([www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova](http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova)).

Myocet dopušta veću ukupnu kumulativnu dozu doksorubicina od standardnog doksorubicina bez istodobnog povećanog rizika od kardiomiopatije. U ispitivanju koje je uspoređivalo standardni doksorubicin s Myocetom u liječenju metastatskog karcinoma dojke, kardiotoksičnost je bila manja kod Myoceta i pojavila se nakon ukupne doze od  $785 \text{ mg/m}^2$  u usporedbi s  $570 \text{ mg/m}^2$  za standardni doksorubicin (Waterhouse i sur., 2001). Rezultat poboljšanja terapijskog indeksa doksorubicina čini Myocet važnim dodatkom u mogućnostima liječenja raka dojke (Batist i sur., 2002).

### 1.1.9. PLGA nanočestice doksorubicina

Doksorubicin je supstrat P-glikoproteina (P-gp), a stanice karcinoma prekomjerno ekspimiraju P-gp, što može značajno utjecati na terapijski učinak doksorubicina (Lei i sur., 2010). Također, supstrat je i multi-drug resistance (MDR) proteina i breast cancer resistant proteina (BCRP) koji ga mogu izbacivati iz tumorskih stanica i tako smanjiti njegovu unutrastaničnu koncentraciju (Chen i sur., 2016).

Jedna od strategija za razvoj djelotvornijih terapija protiv raka je uporaba transportnih sustava lijekova nano veličine koji posreduju u specifičnom nakupljanju transportiranog lijeka u tumoru. Usmjeravanje prema tumoru može se postići povećanjem učinka permeabilnosti i retencije (EPR), što je posljedica povećane propusnosti vaskulature tumora i nedostatka limfne drenaže (Pieper i sur., 2019). Akumulacija unutar tumora putem EPR efekta dovodi do povećane terapijske učinkovitosti, istovremeno značajno smanjujući toksičnost u zdravom tkivu (Verma i sur., 2018). Nanosustavi kao nosači lijekova također mogu produljiti vrijeme cirkulacije antitumorskih lijekova, zaštititi ih od razgradnje i održati terapijske koncentracije lijekova zbog produljenog/kontroliranog otpuštanja lijekova. Pored toga, nanočestice se mogu koristiti za primjenu slabo topljivih lijekova.

Drugi važan aspekt učinkovitosti nanočestica kao sustava za dostavu antitumorskih lijekova je njihov unos i transport lijeka u stanice raka. Mehanizmi unosa mogu se razlikovati između različitih vrsta nanočestica, što može utjecati na njihovu učinkovitost kao nosača lijekova protiv raka (Pieper i sur., 2019). Općenito, nanosači se endocitozom internaliziraju u stanice i na taj način u stanicama koje prekomjerno ekspimiraju P-gp kapsulirani lijekovi mogu izbjeći izbacivanje putem P-gp jer P-gp može ukloniti slobodne molekule lijeka, ali ne i nanočestice (Pereverzeva i sur., 2018).

Dizajn nanočestica kao nosača lijekova s optimiziranim antitumorskim djelovanjem na staničnoj razini važan je korak u razvoju poboljšanih pripravaka nanočestica za liječenje raka (Pieper i sur., 2019). Nanočestice proizvedene od biorazgradive poli (mliječne-ko-glikolne kiseline) (PLGA) istražene su kao sredstva za dostavu terapeutika (Ding i Zhu, 2017). Optimizirane metode pripreme rezultirale su PLGA nanočesticama karakteriziranim povećanim kapacitetom dostave lijeka, kontroliranim oslobađanjem lijeka i visokom učinkovitosti protiv raka (Pieper i sur., 2019).



Poli (mliječna-ko-glikolna kiselina) (PLGA) je biokompatibilni i biorazgradivi polimer iz porodice polilaktida koji je odobren od strane FDA i EMA-e i koji se široko koristi za pripremu nanočestica zbog svoje sposobnosti uklapanja hidrofobnih i hidrofilnih lijekova (Pereverzeva i sur., 2018; Lei i sur., 2010). Zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti i kontrolirane biorazgradivosti, PLGA nanočestice mogu zaštititi makromolekule od trenutne razgradnje in vivo, istovremeno omogućujući prilagodljivu brzinu i profil otpuštanja (Ding i Zhu, 2017).

Oslobađanje lijeka iz PLGA čestica obično se događa prvo kao rezultat desorpcije i difuzije lijeka s površine i polimerne jezgre, a zatim u kasnijem koraku, zbog degradacije (erozije) jezgre. Degradacija PLGA rezultat je hidrolize kroz više koraka koja na kraju vodi do pucanja polimernog lanca s nastajanjem produkata razgradnje - oligomera i, na kraju, monomera mliječne i glikolne kiseline. Ova dva spoja prirodno se proizvode u tijelu, metaboliziraju se kroz ciklus trikarboksilne kiseline (L-laktat i glikolat) ili se izlučuju kao takvi (D-laktat) (Pereverzeva i sur., 2018).

## 1.2. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres definiran je kao poremećaj ravnoteže između proizvodnje oksidansa, tj. reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i dostupnosti endogenih antioksidansa koji uklanjaju ROS, u korist oksidansa, što može dovesti do ozljede tkiva (Chatterjee, 2016; Betteridge, 2000).

Reaktivne kiskove vrste (ROS) je pojam koji obuhvaća slobodne radikale, ione i reaktivne vrste koje se stvaraju iz enzimskih i neenzimskih izvora u različitim tipovima stanica (Slika 3) (Chatterjee, 2016). Slobodni radikali definirani su kao vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona koji su uzrok njihove visoke reaktivnosti. Slobodni radikali mogu se stvoriti iz mnogih elemenata, ali u biološkim sustavima su najvažniji oni koji uključuju kisik i dušik (Burton i Jauniaux, 2011). Glavne ROS u biološkim sustavima su superoksidni anion ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), vrlo reaktivni hidroksilni radikal ( $HO\cdot$ ), singlet kisik ( $^1O_2$ ) i ozon ( $O_3$ ). Pored ROS, ostale fiziološki važne reaktivne vrste su reaktivne dušikove vrste koje uključuju dušikov oksid ( $NO\cdot$ ) i reaktivni radikal, peroksnitrit anion ( $ONOO^-$ ). Enzimski izvori ROS su ksantin oksidaza (XO), ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze,

mijeloperoksidaze (MPO), citokrom P450 monoooksigenaza, sintaza dušikovog oksida (NOS), peroksidaze i NADPH oksidaza (NOX), dok su nenzimatski izvori transportni lanac elektrona, slobodno željezo, ksenobiotici itd (Chatterjee, 2016). Također, proizvodnja ROS može biti potaknuta djelovanjem egzogenih čimbenika kao što su UV zračenje, ionizacijsko zračenje, toksični metali, onečišćeni okoliš, ksenobiotici itd (Valco i sur., 2006).

Reaktivne kisikove vrste kontinuirano se stvaraju u tijelu kao produkt normalnog staničnog metabolizma tijekom fizioloških i patoloških procesa (Södergren, 2000). Prevelika proizvodnja ROS može biti štetna jer ROS proizvedene u biološkim sustavima mogu lako reagirati s lipidima, proteinima i DNA. ROS su izravnim oštećenjem biomolekula ili modifikacijama proteina i gena ključne u pokretanju signalnih kaskada koje dovode do oštećenja i smrti stanica te pojave brojnih patologija (Chatterjee, 2016).

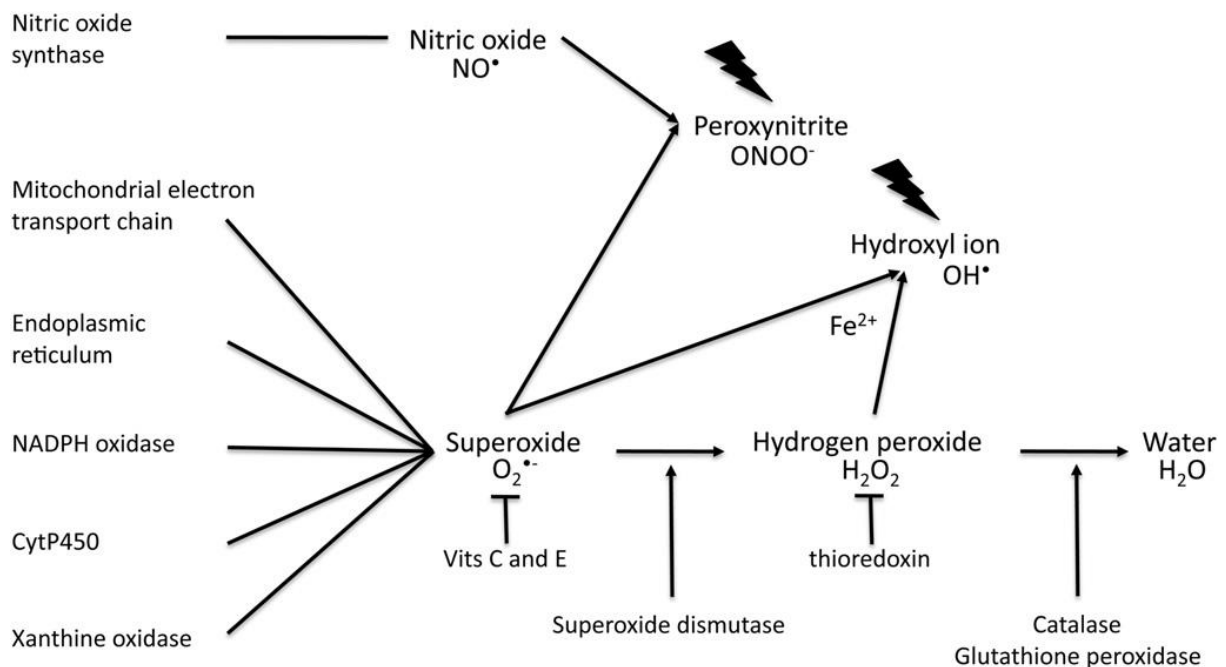
Iako ROS mogu djelovati štetno, one također igraju važnu ulogu kao sekundarni glasnici u mnogim unutarstaničnim signalnim putovima (Burton i Jauniaux, 2011). Niska razina ROS potrebna je za stanične procese poput proliferacije i diferencijacije (Pereira i sur., 2012). Također, fagocitne stanice (neutrofili, monociti, makrofagi i eozinofili) proizvode superoksidni anion i vodikov peroksid kao jedan od mehanizama za ubijanje bakterija i gljivica i inaktivaciju virusa (Södergren, 2000).

Antioksidansi su egzogeni (prirodni ili sintetički) ili endogeni spojevi koji mogu ukloniti slobodne radikale i ROS uklanjanjem ili inhibicijom njihovih prekursora ili vezanjem na ione metala koji kataliziraju stvaranje ROS. Glavni endogeni antioksidativni enzimi su glutationski redoks sustav (glutation peroksidaza i glutation-S-transferaza), superoksid dizmutaza i katalaza. Nenzimatski antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), alfa-tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi i flavonoidi (Chatterjee, 2016).

U fiziološkim uvjetima, najčešći slobodni radikal kisika je superoksidni anion ( $O_2^-$ ), a mitohondriji se smatraju glavnim izvorom. Superoksid dizmutaze u citosolu (koje sadrže bakar i cink) i mitohondrijima (koje sadrže mangan) kataliziraju pretvorbu superoksida u vodikov peroksid. Vodikov peroksid je slab oksidans i relativno je stabilan, ali za razliku od superoksida može brzo difundirati kroz stanične membrane i u prisutnosti slobodnih iona željeza može se pretvoriti u hidroksilne radikale pomoću Fentonove reakcije. Hidroksilni radikali visoko su reaktivni. Mogu reagirati s većinom bioloških molekula u svojoj neposrednoj blizini što rezultira širenjem lančanih reakcija slobodnih radikala. Vodikov peroksid se razgrađuje u vodu djelovanjem glutacion peroksidaze ili katalaze. Glutation

peroksidaze prisutne u citosolu i mitohondrijima imaju glavnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida oksidacijom glutaciona (GSH). Aktivnost glutacion peroksidaze ovisi o prisutnosti reduciranog oblika glutaciona (GSH) kao donora vodika. Glutacion je tripeptid koji se sintetizira u citosolu iz L-glutamata, L-cisteina i glicina. Sudjeluje u velikom broju detoksifikacijskih reakcija tvoreći glutacion disulfid (GSSG), koji se djelovanjem glutacion reduktaze prevodi natrag u GSH uz potrošnju NADPH. Katalaze koje su prisutne u peroksisomima u mnogim tkivima uklanjaju vodikov peroksid kada je prisutan u visokim koncentracijama.

Lipofilni alfa-tokoferol (vitamin E) vrlo je učinkovit antioksidans kada je ugrađen u lipidnu jezgru staničnih membrana. Ima sposobnost uklanjanja peroksilnih radikala i zbog toga prekida lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Tokoferol radikal mnogo je manje reaktivan i prevodi se natrag u alfa-tokoferol askorbinskom kiselinom (vitaminom C). Pored toga, tiolni spojevi, kao tioredoksin, sposobni su detoksificirati vodikov peroksid, ali tioredoksin reduktazom se moraju vratiti u reducirani oblik. Ceruloplazmin i transferin također igraju važnu ulogu vezanjem slobodnih iona željeza i tako inhibiraju Fentonovu reakciju i proizvodnju  $\text{OH}^\bullet$  (Burton i Jauniaux, 2011; Betteridge, 2000).



**Slika 3.** Glavne reaktivne kisikove vrste, njihovo potencijalno podrijetlo i putevi detoksifikacije (Burton i Jauniaux, 2011)

### 1.2.1. Mehanizam kardiotoksičnosti doksorubicina

Mehanizam kardiotoksičnosti doksorubicina nije u potpunosti razjašnjen, ali mnoga istraživanja pokazuju da su uključeni različiti mehanizmi poput oksidativnog stresa, upale i apoptoze kardiomiocita koji vode k napredovanju kardiomiopatije nakon kumulativnih doza. Kardiotoksičnost se može pojaviti čak i nakon jednokratne doze lijeka ili u dužem vremenskom razdoblju (od nekoliko tjedana do mjeseci) nakon kumulativne doze doksorubicina (Zare i sur., 2019). Citotoksični učinak antraciklina na kardiomiocite općenito se smatra da je ireverzibilan i povezan s kumulativnom dozom. Podaci o biopsiji kao i oblik krivulje doza-odgovor pružaju snažne dokaze da oštećenje nastaje od vremena početnog izlaganja, unatoč činjenici da srčane rezerve sprječavaju kliničko prepoznavanje dok se ne dogodi dovoljno oštećenja u mjeri u kojoj je kompenzacijska rezerva srca prekoračena (Rahman i sur., 2007).

Oksidativni stres izazvan doksorubicinom ima značajnu ulogu u kardiotoksičnosti ovog lijeka (Pieniżek i sur., 2013). Srčani mitohondriji su preferirana meta doksorubicina i nakupljaju lijek u relativno visokim koncentracijama. Srčani mitohondriji posebno su skloni Dox-induciranim oksidacijskim/nitracijskim oštećenjima, a istodobno su i važni izvori ROS izazvanih doksorubicinom (Carvalho i sur., 2009).

Doksorubicin može biti supstrat nekoliko oksidoreduktaza poput NADH-dehidrogenaze mitohondrijskog kompleksa I i različitih citoplazmatskih oksidoreduktaza, uključujući ksantin oksidazu. Oksidoreduktivna reakcija započinje prijenosom jednog elektrona s NADPH na doksorubicin formirajući tako polukinonski radikal koji tvori kompleks sa željezom. Taj je kompleks odgovoran za redukciju kisika, stvarajući tako superoksidni ion. Superoksidni radikali nastali u mitohondrijima imaju kardiolipin kao preferencijalnu metu. Kardiolipin je glavna fosfolipidna komponenta unutarnje mitohondrijske membrane i potreban je za aktivnost respiratornog lanca. Bogat je polinezasićenim masnim kiselinama i posebno je osjetljiv na peroksidativne ozljede (Lamberti i sur., 2014). Srce je osjetljivije na peroksidaciju lipida izazvanu doksorubicinom zbog visokih energetske potreba (Zare i sur., 2019).

Također, objavljeni su dokazi koji pokazuju jak afinitet doksorubicina prema kardiolipinu. Tvorba kompleksa između doksorubicina i fosfolipida dovodi do inhibicije mitohondrijskih enzima koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji. Oštećenje mitohondrijske membrane također može dovesti do inaktivacije ključnih transportera koji sudjeluju u ionskoj homeostazi. Stoga bi se kardiotoksičnost antraciklina mogla jednostavno objasniti s obzirom na činjenicu da je srčano tkivo bogato mitohondrijima. Međutim, u kardiotoksičnosti antraciklina uključeni su i drugi faktori, među kojima je relativno manja količina antioksidacijske obrane srca u usporedbi s drugim tkivima (Lamberti i sur., 2014). Zbog toga se slobodni radikali nakupljaju u srčanom tkivu i uzrokuju peroksidaciju lipida i uništavanje staničnih i mitohondrijskih membrana, endoplazmatskog retikuluma, nukleinskih kiselina i unutarstaničnih makromolekula (Zare i sur, 2019). Kada se razina slobodnih radikala poveća, citokrom c, koji se oslobađa iz oštećenih mitohondrija, aktivira apoptotičnu kaskadu (Lamberti i sur., 2014). Istraživanja su pokazala da apoptoza miocita ima veliku ulogu u patogenezi Dox-inducirane kardiotoksičnosti (Zare i sur, 2019). Također, doksorubicin se veže na reduktaznu domenu endotelne sintaze dušičnog oksida uzrokujući porast superoksida i smanjenje stvaranja dušičnog oksida (Lamberti i sur., 2014).

Doksorubicin kao i drugi antraciklini uzrokuju oštećenja mitohondrijske DNA, posebno u kardiomiocitima. Opaženo je da je enzim topoizomeraza I (Top1mt) važan za toleriranje oštećenja DNA u mitohondrijima, što sugerira da ovaj enzim, a možda i drugi enzimi važni za metabolizam mitohondrija, mogu biti korisni kao farmakogenomski markeri za vjerojatnost nastanka kardiomiopatija izazvanih antraciklinima (Nitiss i Nitiss, 2014).

### **1.2.2. Mehanizam hepatotoksičnosti doksorubicina**

Molekularni mehanizmi koji sudjeluju u hepatotoksičnosti uzrokovanoj doksorubicinom uglavnom su posljedica proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (ROS) od strane lijeka tijekom njegovog metabolizma u jetri što rezultira neuravnoteženim redoks potencijalom koji dovodi do oksidativnog stresa, smanjene razine antioksidacijskih enzima, apoptoze, upale i disfunkcije mitohondrija (Prasanna i sur., 2020). U jetri, oksidativni stres uzrokovan povećanom proizvodnjom ROS može proizaći iz dva različita načina. Najčešći način je kada polukinonski oblik doksorubicina reagira s  $O_2$  te nastaju  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ , a

alternativni način je putem NADPH oksidaza, glavnih izvan-mitohondrijskih proizvođača ROS u hepatocitima. NADPH oksidaze prisutne su u malim razinama, ali njihove razine se povećavaju kao odgovor na izvanstanični stimulans, poput liječenja doksorubicinom. Literatura pokazuje da proizvodnja ROS uzrokovana doksorubicinom dovodi do povećanja lipidne peroksidacije i promjene u aktivnosti SOD, CAT i glutation peroksidaze (GPx), oštećenja DNA te smanjenja razine GSH i vitamina E, što potvrđuje hepatotoksičnost doksorubicina. Proizvodnja ROS-a također može dovesti do aktivacije I $\kappa$ B kinaze (IKK) koja fosforilira I $\kappa$ B inhibitore aktivirajući I $\kappa$ B koji zauzvrat aktivira NF- $\kappa$ B što dovodi do ekspresije proupalnih citokina i stanice smrti (Carvalho i sur., 2009).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Doksorubicin je jedan od najvažnijih antitumorskih lijekova u kliničkoj praksi, međutim njegova primjena ograničena je brojnim nuspojavama koje nastaju zbog njegove neselektivnosti. Doksorubicin djeluje štetno na brojne sistemske organe, uključujući i jetru. Dokazano je da generacija oksidativnog stresa doksorubicinom ima značajnu ulogu u toksičnosti ovog lijeka. Glavni razlog na kojem se temelji hepatotoksičnost izazvana doksorubicinom je proizvodnja slobodnih radikala u tkivima koja nisu ciljana. Zbog važnosti doksorubicina u antitumorskoj terapiji, vrlo je važno istražiti strategije za smanjenje incidencije i jačine njegove toksičnosti. Primjena različitih formulacija doksorubicina istražuje se kako bi se povećala selektivnost za tumorska tkiva, poboljšala terapijska učinkovitost te smanjile nuspojave. Nanotehnologija otvara mogućnosti za razvoj djelotvornijih terapija protiv raka uporabom transportnih sustava lijekova nano veličine koji posreduju u specifičnom nakupljanju transportiranog lijeka u tumoru. Također primjena nanoformulacija uključuje nove pristupe za kontrolirano otpuštanje lijeka, povećanje bioraspoloživosti, farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, smanjenje njihove toksičnosti i nuspojava te povećanje terapijske učinkovitosti. Cilj ovog rada je ispitati kako primjena inovativne nanoformulacije doksorubicina utječe na parametre oksidativnog stresa u jetri mužjaka i ženi štakora u usporedbi s konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet koji su već odobreni za kliničku primjenu te utvrditi razlike u učinku različitih formulacija doksorubicina na životinje različitog spola.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1.PUFERI I KOMERCIJALNI ANALITIČKI TESTOVI

**Tablica 1.** Prikaz pufera i analitičkih testova korištenih u pokusima

Fosfatni pufer (PBS) 50 mM	Fosfatni pufer (50 mM, pH 7.4) pripremljen je otapanjem 1.558 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i 10.392 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u 1 L deionizirane vode. U pripremljenu otopinu postepeno se dodaje (prema potrebi) HCl (konc.) ili NaOH (konc.) uz mjerenje pH i miješanje na magnetskoj miješalici do konačnog pH 7.4
QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD):	
QuantiPro Buffer QA	Otopina natrijevog karbonata, natrijevog tartrata i natrijevog bikarbonata u 0.2 M NaOH, pH 11.25
QuantiPro BCA QB	4% (w/v) otopina bicinkoninične kiseline
Reagens QC	4% (w/v) otopina bakrova(II) sulfata pentahidrata
Standardna otopina proteina	Otopina 1.0 mg/ml govedeg serumskog albumina u 0.15 M NaCl s 0.05% natrijevim azidom kao konzervansom

### 3.2.KEMIKALIJE I PRIBOR

**Tablica 2.** Prikaz kemikalija i pribora korištenih u pokusima

Konvencionalni doksorubicin	Pliva Hrvatska (Hrvatska)
Liposomalna formulacija Myocet	Teva B.V. (Nizozemska)
Nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)	MJR PharmJet GmbH (Uberherrn, Njemačka)
2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) 0.12mM	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)
Dihidroetidium (DHE) 0.12mM	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)
Monoklorobiman (MBCl) 0.24mM	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD)
Analitička vaga	Mettler Toledo AG (Švicarska)
Homogenizator	Polytron
Spektrofotometar Victor3™	Perkin-Elmer (United Kingdom)

Klipne pipete s nastavcima	Eppendorf (Njemačka)
Automatska pipeta s promjenjivim volumenom (20-200 µL)	Eppendorf (Njemačka)
Mikrotitarske pločice	Eppendorf (Njemačka)
Vibracijska miješalica Genie 2 Vortex	Fisher Scientific (SAD)

### 3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2016-06-2436. U pokusima su korišteni mužjaci i ženke štakora soja Wistar, uzgojeni u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Životinje su uzgojene u kontroliranim uvjetima, s periodičnom izmjenom svjetla i tame svakih 12 sati i stalnoj temperaturi od  $23 \pm 2$  °C, uz slobodan pristup hrani i vodi tijekom pokusa. Ispitivanje se provodilo na zdravim, 12 tjedana starim štakorima, tjelesne težine 320-350 g za mužjake i 190-220 g za ženke.

U ispitivanju su se testirale 3 različite formulacije doksorubicina: inovativna nanoformulacija doksorubicina (PLGADox) pripravljena od strane njemačkog partnera (MJR PharmJet GmbH, Uberherrn, Njemačka), te konvencionalni doksorubicin (Pliva kompanija) i liposomalna formulacija Myocet (Teva kompanija). Svaka skupina (3 testne i jedna kontrolna) sastojala se od 8 mužjaka i 8 ženki. U pokusu je ukupno bilo 64 životinje (32 mužjaka i 32 ženke). Svaka je životinja primila ukupno 5 doza doksorubicina (3 mg/kg t.m.) u vremenskim intervalima od 5 dana. Sve formulacije su bile razrijeđene u fiziološkoj otopini. Životinje u kontrolnoj skupini dobivale su fiziološku otopinu. Doksorubicin i fiziološka otopina aplicirane su intraperitonealnim injekcijama. Tjedan dana nakon zadnjeg apliciranja životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina i ksilazina za pokusne glodavce (Narketan, Vetoquinol UK Ltd., 80 mg/kg t.m. i Xylapan, Vetoquinol UK Ltd., 12 mg/kg t.m., i.p.), žrtvovane i uzeti su uzorci biološkog materijala koji su zamrznuti na -80°C do upotrebe.

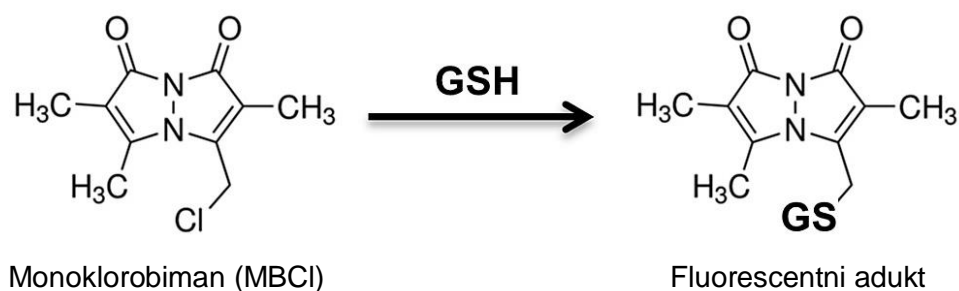
### 3.4.METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.4.1. Priprema homogenata

Od uzoraka tkiva organa pripremljeni su 10%-tni homogenati. Uzorci su odvagani i stavljani u 50 mM fosfatni pufer (pH 7.4), a zatim su homogenizirani električnim homogenizatorom 30 sekundi. Svi postupci su izvedeni na niskoj temperature (korišten je hladni pufer, epruvete pri homogenizaciji držane su u ledu). Dobiveni 10%-tni homogenati razjeđeni su na 1%-tne homogenate 50 mM fosfatnim puferom (pH 7.4). 1%-tni homogenati korišteni su u analizi ROS i GSH dok su za određivanje ukupnih proteina 1%-tni homogenati razjeđeni jos 40x.

#### 3.4.2. Analiza GSH

Monoklorobiman (MBCl) korišten je za mjerenje razine GSH u uzorcima tkiva. Reakcija MBCl sa GSH vrlo je specifična i rezultira formiranjem fluorescentnog GSH-monoklorobiman adukta (Slika 4) (Kamencic i sur., 2000).



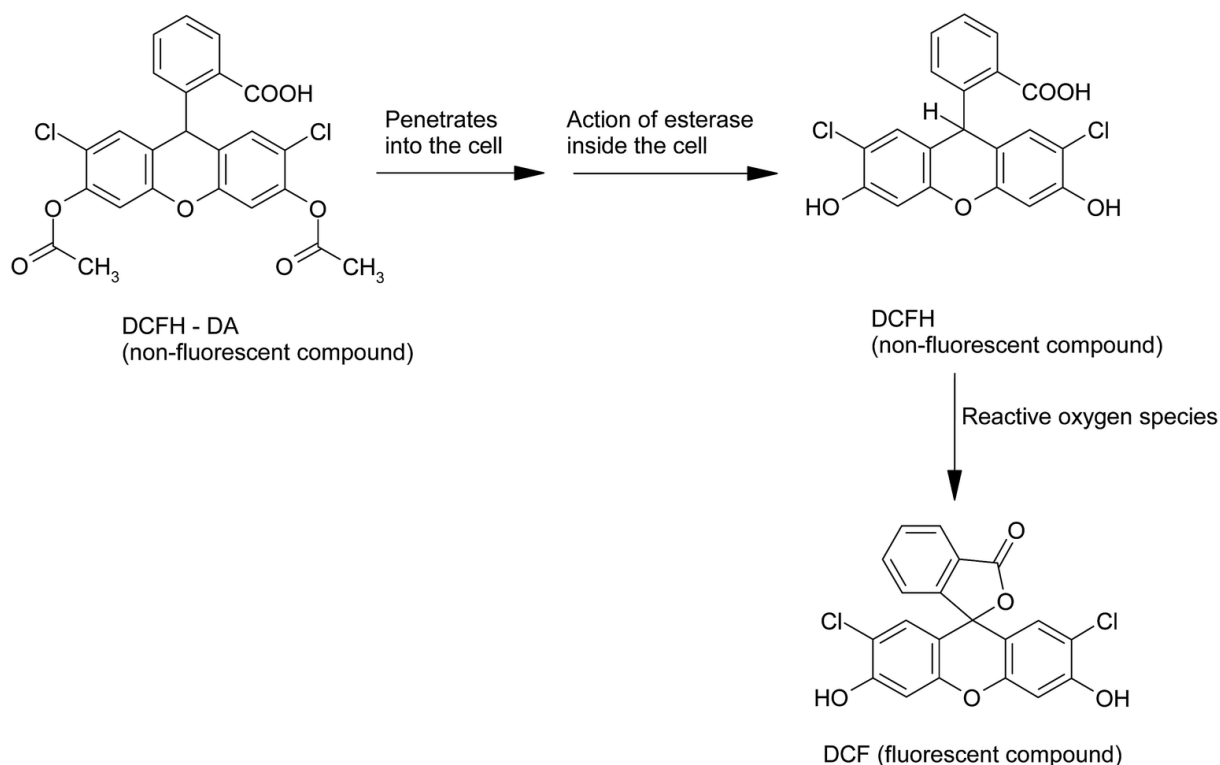
**Slika 4.** Strukturni prikaz nastanka fluorescentnog GSH-monoklorobiman adukta (preuzeto s <https://www.plos.figshare.com/> prilagođeno)

Za analizu GSH korišteni su 1%-tni homogenati koji su pripremljeni razrjeđivanjem 10%-tnih homogenata u hladnom 50 mM fosfatnom puferu (pH 7.4). U mikrotitarske pločice u triplicatima je odpipetirano 70  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 30  $\mu\text{L}$  1%-tnog homogenata i 20  $\mu\text{L}$  0.24 mM MBCl. Nakon inkubacije uzoraka 30 minuta na 37 °C, određena je fluorescencija

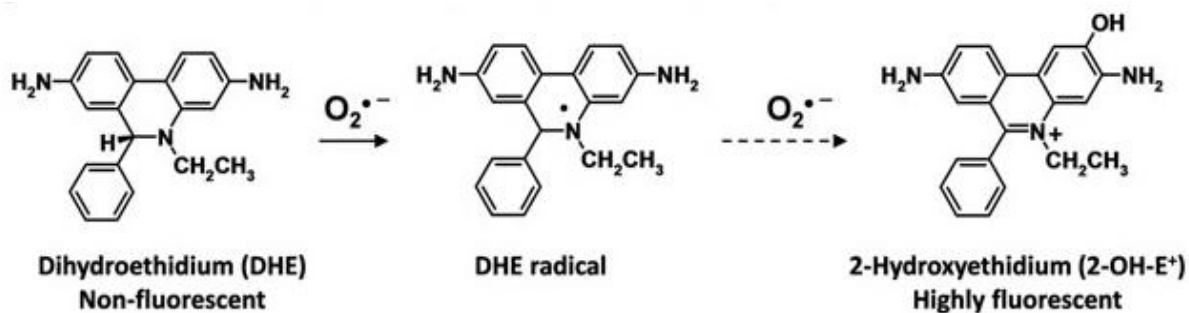
pri pobuđivanju od 355 nm i valnoj duljini emisije 460 nm upotrebom spektrofotometra Victor3™ (Perkin-Elmer).

### 3.4.3. Analiza ROS

Količina ROS u tkivnim homogenatima izmjerena je primjenom 2', 7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) i dihidroetidijuma (DHE). Pretvorba DCFH-DA u visoko fluorescentni 2', 7'-diklorofluorescein (DCF) događa se u dva koraka. Prvo se DCFH-DA staničnim esterazama pretvara u nefluorescentni 2', 7'-diklorofluorescein (DCFH) (Slika 5). Ovaj spoj se zatim oksidira u fluorescentni DCF produkt u prisutnosti ROS, posebno vodikovog peroksida. DHE se u prisutnosti superoksidnog radikala oksidira u fluorescentni 2-hidroksietidijum (EOH) koji je stabilan i omogućuje točno mjerenje fluorescencije DHE (Slika 6) (Dikalov i Harrison, 2014; Kalyanaraman i sur., 2011; Socci i sur, 1999).



**Slika 5.** Strukturni prikaz pretvorbe DCFH-DA do fluorescentnog DCF (Aula i sur., 2015)



**Slika 6.** Strukturni prikaz nastanka fluorescentnog 2-hidroksietiduma (Dikalov i Harrison, 2014)

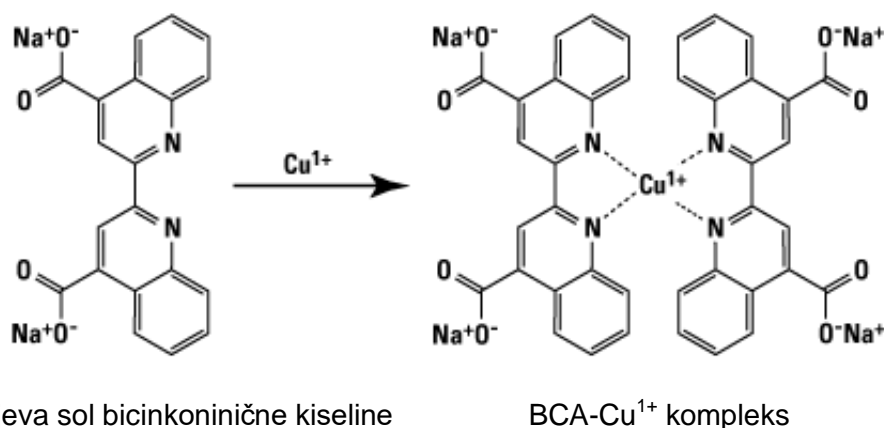
Za analizu ROS korišteni su 1%-tni homogenati koji su pripremljeni razrjeđivanjem 10%-tnih homogenata u hladnom 50 mM fosfatnom puferu (pH 7.4). U mikrotitarske pločice u triplicatima je odpipetirano 70  $\mu$ L fosfatnog pufera, 30  $\mu$ L 1%-tnog homogenata i 20  $\mu$ L 0,12 mM DCFH-DA ili 0,12 mM DHE boje. Nakon inkubacije uzoraka 30 minuta na 37 °C, određena je fluorescencija pri pobuđivanju od 488 nm i valnoj duljini emisije 525 nm upotrebom spektrofotometra Victor3™ (Perkin-Elmer).

### 3.4.4. Određivanje ukupnih proteina

Za određivanje ukupnih proteina korišten je QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich). QuantiPro BCA test temelji se na stvaranju kompleksa između  $Cu^{2+}$  iona iz otopine i proteina u alkalnim uvjetima, nakon čega slijedi redukcija  $Cu^{2+}$  do  $Cu^{1+}$  koja je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku.



Sposobnost redukcije imaju cistein, cistin, triptofan, tirozin te peptidne veze u molekulama proteina. Bicinkoninična kiselina (BCA) s  $Cu^{1+}$  ionima tvori ljubičasto-plavi kompleks čija se koncentracija određuje spektrofotometrijski (Slika 7).



**Slika 7.** Princip BCA testa. Proteini reduciraju Cu<sup>2+</sup> ione iz otopine u Cu<sup>1+</sup> u alkalnim uvjetima. Cu<sup>1+</sup> zatim stupa u interakciju s BCA i tvori ljubičasti BCA-Cu<sup>1+</sup> kompleks (preteuto s <https://www.researchgate.net/> i prilagođeno)

Za izradu baždarnog dijagrama od standardne otopine proteina koncentracije 1 mg/ml pripremljen je niz razrjeđenja (10, 20, 40 i 60 µg/ml) čija je konačna koncentracija na pločici duplo niža (5, 10, 20 i 30 µg/ml). QuantiPro BCA Assay Kit daje linearni odgovor u koncentracijskom rasponu proteina od 0,5 do 30 µg/ml.

QuantiPro radni reagens priprema se miješanjem 25 dijelova reagensa QA i 25 dijelova reagensa QB nakon čega se doda 1 dio reagensa QC i miješa dok radni reagens ne postane jednolične, svijetlo zelene boje. Za određivanje ukupnih proteina 1%-tni homogenati razjeđeni su 50 mM fosfatnim puferom (pH 7.4) 40x. Od standardne otopine proteina koncentracije 1 mg/ml pripremljeni su radni standardi koncentracije 10, 20, 40 i 60 µg/ml čija je konačna koncentracija na pločici duplo niža (5, 10, 20 i 30 µg/ml).

QuantiPro test sastoji se od miješanja 1 dijela uzorka proteina s 1 dijelom pripremljenog QuantiPro radnog reagensa. U mikrotitarsku pločicu odpipetirano je 150 µl QuantiPro radnog reagensa a zatim je u triplikatima odpipetirano 150 µl uzorka proteina. Uzorak proteina je blank (fosfatni pufer), radni standard ili tkivni homogenat. Uzorci su inkubirani 1h na 60°C ili 2h na 37 °C nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 570 nm upotrebom spektrofotometra Victor3™ (Perkin-Elmer). Koncentracija proteina u uzorcima određena je pomoću baždarnog dijagrama koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatim koncentracijama proteina.

### 3.4.5. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu rezultata korišten je računalni program Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD, verzija 13.0). Hipoteza o normalnosti distribucije ispitivanih parametara ispitana je Shapiro-Wilk-ovim testom. Rezultati mjerenja parametara oksidacijskog stresa bili su normalno distribuirani u svim ispitivanim skupinama.

Za ocjenu značajnosti dobivenih numeričkih podataka o utjecaju različitih formulacija doksorubicina na parametre oksidacijskog stresa u tkivu jetre korištena je analiza varijance (Main effects i One way ANOVA) uz *post hoc* Tukey's HSD test za usporedbu značajnosti razlike između pojedinih skupina. Razina statističke značajnosti određena je na 5 % ( $p < 0,05$ ). Rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija ili 95%-tni interval pouzdanosti (8 životinja po ispitivanoj skupini).

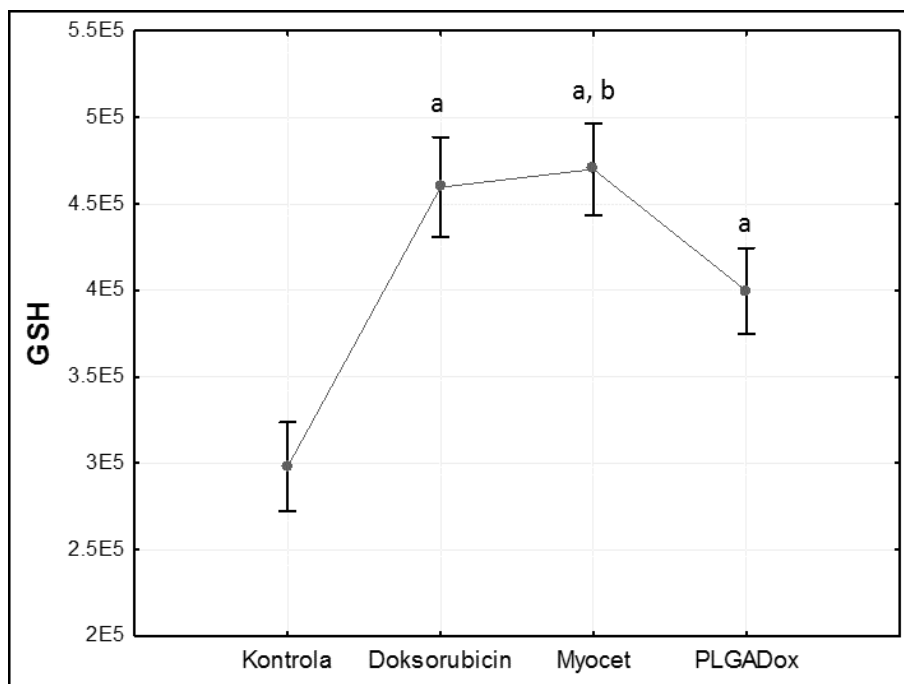


## **4. REZULTATI**

## Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri

Slika 8. prikazuje koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri kontrolne i pokusnih skupina životinja tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana.

Uz kontrolu za spol, sve tri tretirane skupine značajno se razlikuju od kontrolne skupine. Životinje tretirane liposomalnom formulacijom doksorubicina (Myocet) imale su statistički značajno različitu koncentraciju GSH u jetri od životinja tretiranih nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 35,118$ ,  $p < 0,001$ ).

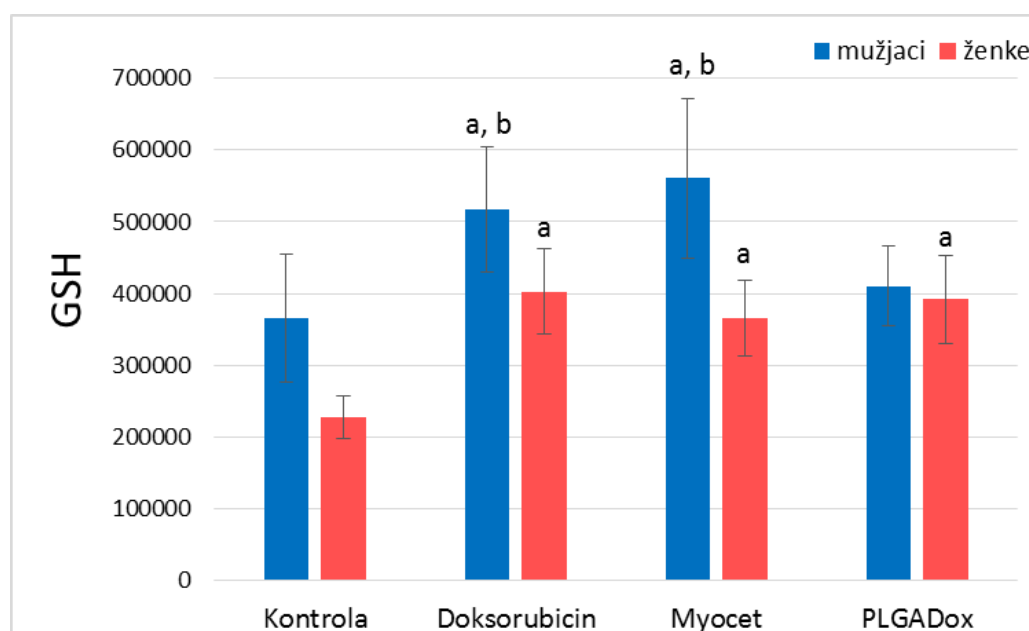


**Slika 8.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri odraslih štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i 95%-tni interval pouzdanosti (a - statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane PLGADox-om; Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 35,118$ ,  $p < 0,001$ ). Vrijednosti GSH izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

Slika 9. prikazuje koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri kontrolne i pokusnih skupina mužjaka i ženki štakora tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana. Koncentracija GSH veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina osim PLGADox te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između ženki i mužjaka (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 70.857, p < 0,001$ ).

Mušjaci tretirani konvencionalnom i liposomalnom formulacijom doksorubicina (Myocet) imali su statistički značajno višu razinu GSH u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom i mužjacima tretiranim nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 20.767, p < 0.001$ ).

Sve tri tretirane skupine ženki štakora statistički se značajno razlikuju od kontrolne skupine. Nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih tretiranih skupina (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 40.639, p < 0.001$ ).

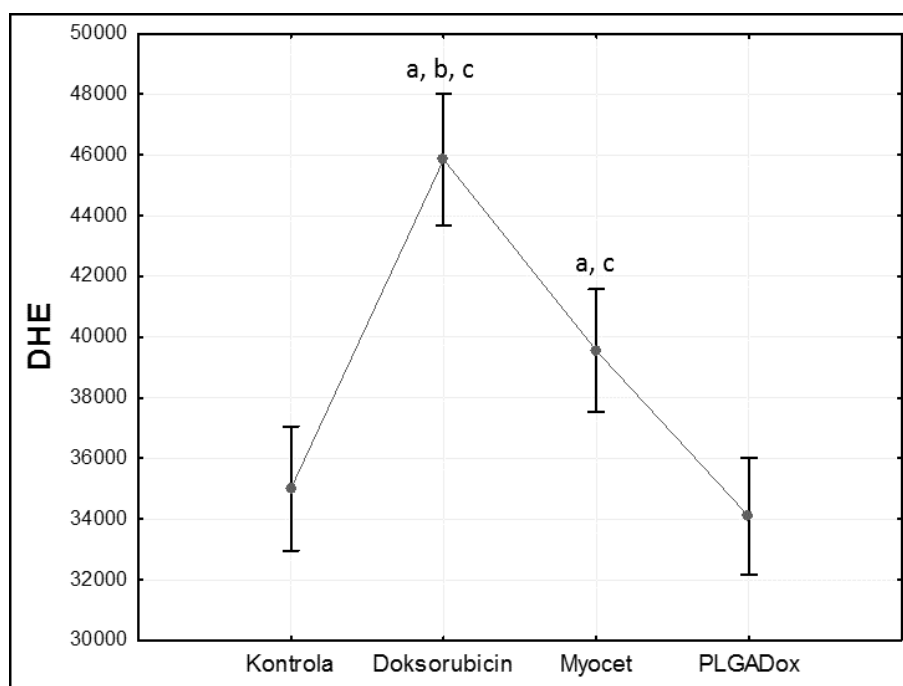


**Slika 9.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u jetri mužjaka i ženki štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (a - statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane PLGADox-om). Vrijednosti GSH izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

## Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu superoksidnog radikala u jetri

Slika 10. prikazuje razinu superoksidnog radikala u jetri kontrolne i pokusnih skupina životinja tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana.

Uz kontrolu za spol, skupine tretirane konvencionalnom i liposomalnom formulacijom doksorubicina (Myocet) imaju značajno višu razinu superoksidnog radikala u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom. Životinje tretirane konvencionalnim doksorubicinom imale su statistički značajno veću razinu superoksidnog radikala u jetri u usporedbi sa životinjama tretiranim liposomalnom (Myocet) i nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox), a statistički značajna razlika uočena je i između skupina životinja tretiranih liposomalnom formulacijom (Myocet) u odnosu na nanoformulaciju doksorubicina (PLGADox) (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 25,863$ ,  $p < 0,001$ ).

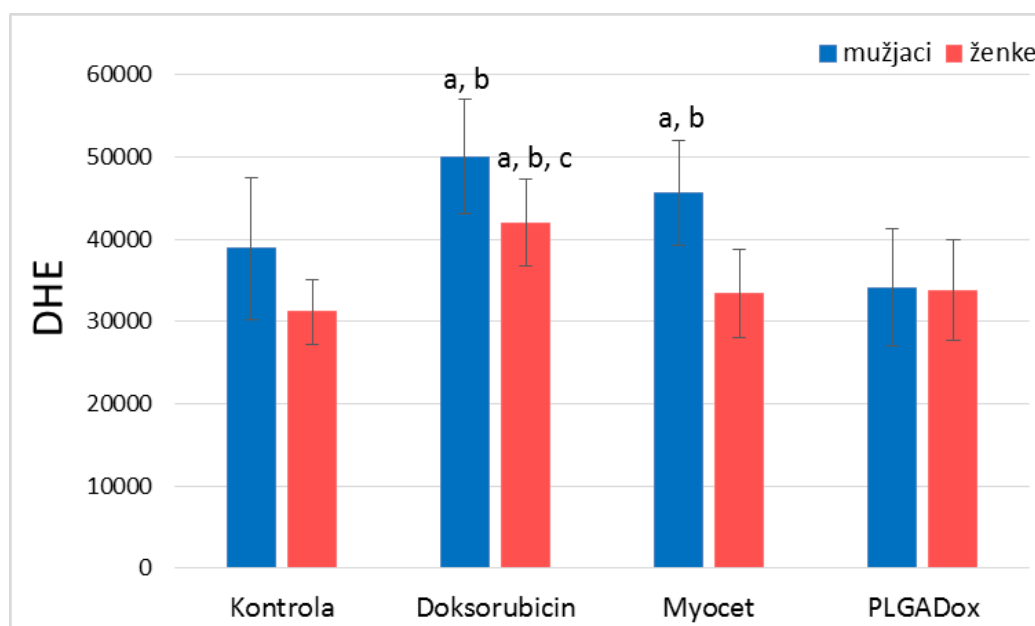


**Slika 10.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu superoksidnog radikala u jetri odraslih štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i 95%-tni interval pouzdanosti (a - statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane Myocetom; c – statistički različito od skupine tretirane PLGADox-om; Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 25,863$ ,  $p < 0,001$ ). Vrijednosti DHE izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

Slika 11. prikazuje razinu superoksidnog radikala u jetri kontrolne i pokusnih skupina mužjaka i ženki štakora tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana. Razina superoksidnog radikala veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina osim PLGADox te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između ženki i mužjaka (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 43,290$ ,  $p < 0,001$ ).

Mušjaci tretirani konvencionalnom i liposomalnom formulacijom doksorubicina (Myocet) imali su statistički značajno višu razinu superoksidnog radikala u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom i mužjacima tretiranim nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 16.500$ ,  $p < 0.001$ ).

Ženke tretirane konvencionalnim doksorubicinom imale su statistički značajno višu razinu superoksidnog radikala u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom, ženkama tretiranim liposomalnom formulacijom (Myocet) te ženkama tretiranim nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 18.687$ ,  $p < 0.001$ ).

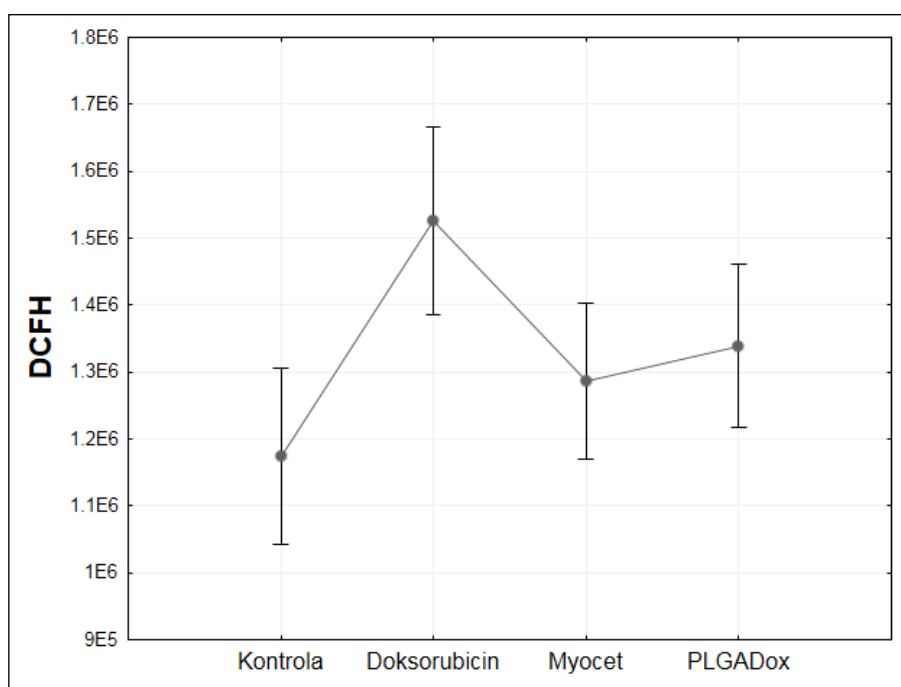


**Slika 11.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu superoksidnog radikala u jetri mužjaka i ženki štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (a - statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane PLGADox-om; c – statistički različito od skupine tretirane Myocetom). Vrijednosti DHE izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

## Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu peroksidnog radikala u jetri

Slika 12. prikazuje razinu peroksidnog radikala u jetri kontrolne i pokusnih skupina životinja tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana.

Uz kontrolu za spol, tretman različitim formulacijama doksorubicina značajno utječe na razine DCFH u jetri (Main effects ANOVA;  $F = 4,5293$ ,  $p < 0,005$ ), iako prema rezultatima *post hoc* testa nema značajne razlike između pojedinih pokusnih skupina životinja.



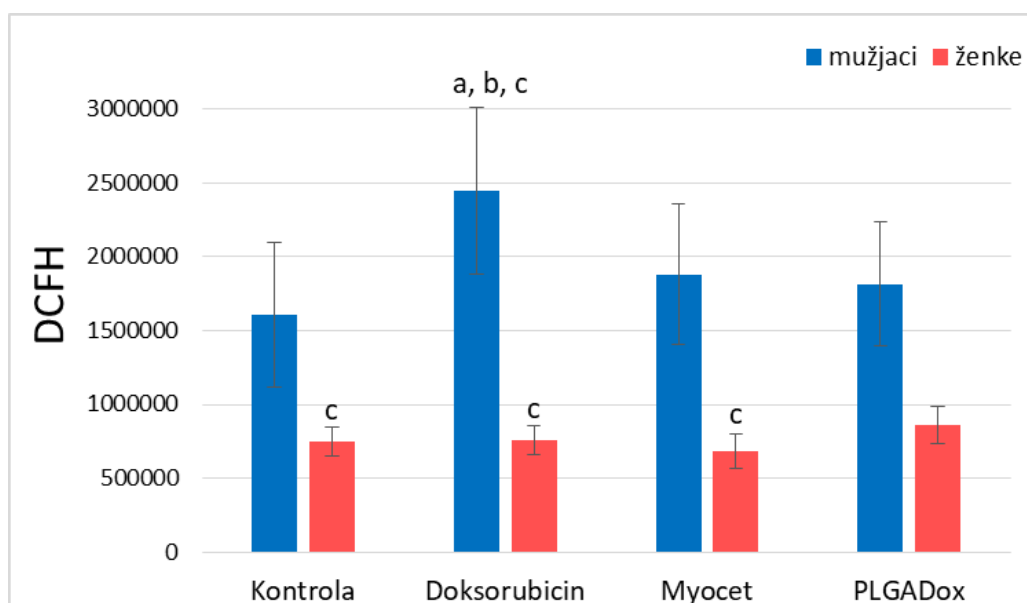
**Slika 12.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu peroksidnog radikala u jetri odraslih štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i 95%-tni interval pouzdanosti (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 4,5293$ ,  $p < 0,005$ ). Vrijednosti DCFH izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

Slika 13. prikazuje razinu peroksidnog radikala u jetri kontrolne i pokusnih skupina mužjaka i ženki štakora tretiranih različitim formulacijama doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) intraperitonealnim injekcijama tijekom 28 dana. Razina

peroksidnog radikala veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između ženki i mužjaka (Main effects ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 317,102$ ,  $p < 0,001$ ).

Mužjaci tretirani konvencionalnim doksorubicinom imali su statistički značajno višu razinu peroksidnog radikala u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom, mužjacima tretiranim liposomalnim doksorubicinom (Myocet) te mužjacima tretiranim nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 6.4231$ ,  $p < 0.001$ ).

Ženke tretirane nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) imale su statistički značajno višu razinu peroksidnog radikala u jetri u usporedbi s kontrolnom skupinom, ženkama tretiranim konvencionalnim doksorubicinom te ženkama tretiranim liposomalnom formulacijom doksorubicina (Myocet) (One-way ANOVA uz *post hoc* Tukey's HSD test;  $F = 7.8226$ ,  $p < 0.001$ ).



**Slika 13.** Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na razinu peroksidnog radikala u jetri mužjaka i ženki štakora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (a - statistički različito od kontrolne skupine, b – statistički različito od skupine tretirane Myocetom; c – statistički različito od skupine tretirane PLGADox-om). Vrijednosti DCFH izražene su kao % fluorescencije/g proteina.

## **5. RASPRAVA**



Tijekom terapije doksorubicinom, jetra prima, skuplja i metabolizira visoke koncentracije doksorubicina, stoga je za očekivati da je jetra jedan od najugroženijih organa Dox terapijom (Carvalho i sur., 2009). Gotovo 30% pacijenata koji su primali doksorubicin razvili su jetrene abnormalnosti, a hepatotoksičnost doksorubicina također je potvrđena u temeljnim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama. Pojava jetrenih poremećaja povremeno zahtijeva povlačenje ili prilagođavanje doze ne samo doksorubicina, već i istodobno primijenjivanih lijekova koji se koriste za liječenje komplikacija bolesti i poboljšanje neugodnih simptoma, čime se povećava rizik od neuspjeha kemoterapije. Stoga se smatra da je od presudnog značaja istražiti strategije za smanjenje incidencije i jačine hepatotoksičnosti izazvane antraciklinima (Nagai i sur., 2015). S obzirom da se oksidativni stres smatra glavnim uzrokom Dox hepatotoksičnosti, u našem istraživanju ispitani su parametri oksidativnog stresa u tkivu jetre mužjaka i ženki štakora kako bi se istražio utjecaj različitih formulacija doksorubicina na razinu oksidativnog stresa u jetri.

Utjecaj tretmana različitim formulacijama doksorubicina na parametre oksidativnog stresa ispitan je u tkivu jetre mužjaka i ženki štakora soja Wistar kojima su intraperitonealnim injekcijama davane različite formulacije doksorubicina (konvencionalni doksorubicin, liposomalna formulacija doksorubicina (Myocet), nanoformulacija doksorubicina (PLGADox)) tijekom 28 dana. U uzorcima tkiva, kao mjera oksidativnog stresa, mjerena je razina reduciranog glutationa (GSH) te razina superoksidnog i peroksidnog radikala.

Razina superoksidnog radikala veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina osim PLGADox te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između mužjaka i ženki. Kod mužjaka su se od kontrolne skupine statistički značajno razlikovale skupine tretirane konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet, tj. kod tih je skupina uočen statistički značajan porast razine superoksinog radikala u odnosu na kontrolnu skupinu. To znači da je u skupinama tretiranim konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet došlo do porasta razine oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod skupine tretirane nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu što znači da tretman nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) nije doveo do povećanja razine oksidativnog stresa. Kod ženki je statistički značajan porast razine oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu skupinu uzrokovao tretman konvencionalnim doksorubicinom. Kod skupina

tretiranih liposomalnom formulacijom Myocet i nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) nije došlo do porasta razine oksidativnog stresa.

Wided i sur. (2015) u istraživanju koje je provedeno na ženka štakora soja Wistar kojima je intraperitonealno dana jedna doza doksorubicina od 10 mg/kg navode statistički značajno povećanje koncentracije superoksidnog radikala kod skupine tretirane konvencionalnim doksorubicinom u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s našim rezultatima u kojima je u skupinama mužjaka i ženki tretiranih konvencionalnim doksorubicinom uočeno statistički značajno povećanje koncentracije superoksidnog radikala u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, poznato je i da se doksorubicin veže na reduktaznu domenu endotelne sintaze dušičnog oksida uzrokujući porast superoksida i smanjenje stvaranja dušičnog oksida (Lamberti i sur., 2014).

Razina peroksidnog radikala veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između ženki i mužjaka. Skupina mužjaka tretiranih konvencionalnim doksorubicinom statistički se značajno razlikovala od kontrolne skupine. Tretman konvencionalnim doksorubicinom uzrokovao je porast razine peroksidnog radikala, a samim time i porast razine oksidativnog stresa. Tretman liposomalnom formulacijom Myocet i nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) nije doveo do povećanja razine oksidativnog stresa. Kod ženki tretiranih nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) došlo je do statistički značajnog porasta razine oksidativnog stresa u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod skupina tretiranih konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet nije došlo do porasta razine oksidativnog stresa.

Doksorubicin povećava razinu reaktivnih kisikovih vrsta u jetri (Nagai i sur., 2015) stoga je porast razine oksidativnog stresa u jetri uslijed terapije doksorubicinom u skladu s literaturnim podacima. Međutim, nema dostupnih znanstvenih radova koji uspoređuju utjecaj različitih formulacija doksorubicina (konvencionalna, liposomalna i nanoformulacija) na razinu oksidativnog stresa u jetri stoga se naši rezultati dobiveni za različite formulacije ne mogu usporediti s drugim istraživanjima.

Patofiziološke posljedice oksidativnog oštećenja jetre uključuju poremećaj regulacije metabolizma lipida (steatoza), oslabljenu funkciju jetre (degeneracija i smrt hepatocita) i aktiviranje imunološkog odgovora (upala i fibroza/ciroza). U fiziološkim uvjetima jetra je zaštićena od oksidativnog stresa sposobnošću svojih hepatocita da sintetiziraju GSH (Chen i

sur., 2013). GSH je jedan od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa u organizmu koji sudjeluje u velikom broju detoksifikacijskih reakcija tvoreći glutathion disulfid (GSSG) koji se djelovanjem glutathion reduktaze prevodi natrag u GSH uz potrošnju NADPH (Wided i sur., 2015; Burton i Jauniaux, 2011). GSH izravno uklanja hidroksilni i superoksidni radikal i služi kao kofaktor enzima glutathion peroksidaza (GPx) u metaboliziranju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i lipidnih peroksida. Djelovanjem enzima glutathion-S-transferaze (GST), GSH se može konjugirati s raznim elektrofilnim endogenim spojevima i ksenobioticima, a to rezultira njihovim sigurnim i učinkovitim uklanjanjem iz tijela. Također, GSH može obnoviti druge važne antioksidanse, poput vitamina C i E, u njihove aktivne oblike. Osim što je važan kao glavni antioksidans, GSH sudjeluje i u drugim fiziološkim procesima, uključujući nukleotidni metabolizam, stvaranje lipidnih sekundarnih glasnika, regulaciju homeostaze dušičnog oksida i modulaciju funkcije proteina redoks modifikacijom (Chen i sur., 2013).

U uzorcima tkiva mjerena je koncentracija reduciranog glutathiona kao mjera oksidativnog stresa. Koncentracija GSH veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina osim PLGADox te se, uz kontrolu za tretman, značajno razlikuje između ženki i mužjaka. Kod mužjaka su se od kontrolne skupine statistički značajno razlikovale skupine tretirane konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet. Kod skupine tretirane nanoformulacijom doksorubicina (PLGADox) nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod ženki sve tri tretirane skupine su se statistički značajno razlikovale od kontrolne skupine.

Nagai i sur. (2015) u istraživanju koje je provedeno na mužjacima B6D2F1 miševa kojima je intraperitonealno dana jedna doza doksorubicina od 20 mg/kg navode statistički značajno smanjenje koncentracije GSH i smanjenje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu. Wided i sur. (2015) u istraživanju koje je provedeno na ženkama štakora soja Wistar kojima je intraperitonealno dana jedna doza doksorubicina od 10 mg/kg također navode statistički značajno smanjenje koncentracije GSH i smanjenje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolnu skupinu. U istom istraživanju uočeno je i statistički značajno smanjenje aktivnosti katalaze (CAT) te povećanje lipidne peroksidacije. Povećanje lipidne peroksidacije pripisano je povećanoj proizvodnji superoksidnog aniona u mitohondrijima jetre, što je također zabilježeno u ovom istraživanju, jer superoksid izravno pokreće lipidnu peroksidaciju. Statistički značajno smanjenje GSH kod skupina tretiranih doksorubicinom u odnosu na kontrolnu skupinu u rezultatima navode i Shen i sur. (2018) za tretman BALB/c miševa od 2 mg/kg doksorubicina i.p. svaki drugi dan tijekom 2 tjedna te

Singla i sur. (2014) za tretman mužjaka S.D. štakora kumulativnog dozom doksorubicina od 25 mg/kg i.p.. Singla i sur. (2014) navode i statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD, CAT, glutation peroksidaze (GPx), glutation-S-transferaze (GST) i glutation reduktaze (GR) te povećanje lipidne peroksidacije kod skupina tretiranih DOX-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

Istraživanja provedena na odraslim mužjacima Wistar štakora tetranim intraperitonealnim injekcijama doksorubicina od 10 mg/kg tijekom 14 dana (Pieniżek i sur., 2013) te jednom dozom doksorubicina od 2.5 mg/kg (Koćkar i sur., 2010) navode da nema statistički značajne razlike u koncentraciji GSH kod skupine tretirane doksorubicinom u odnosu na kontrolnu skupinu. Pieniżek i sur. (2013) navode da tretman doksorubicinom nije utjecao na promjenu aktivnosti SOD, CAT niti na razinu lipidne peroksidacije. U istraživanju koje su proveli Koćkar i sur. (2010) tretman doksorubicinom nije utjecao na aktivnost GPx kao ni na koncentraciju vitamina A i  $\beta$ -karotena, ali je uzrokovao statistički značajno smanjenje koncentracije vitamina C i vitamin E te porast lipidne peroksidacije.

Oksidativni stres smatra se glavnim uzrokom Dox hepatotoksičnosti (Nagai i sur., 2015). Doksorubicin smanjuje razinu antioksidansa kao što su glutation (GSH), SOD, GPx i CAT zbog snažne generacije ROS i tako inhibira aktivnost obrambenog mehanizma. Doksorubicin ne samo da igra glavnu ulogu u poticanju proizvodnje slobodnih radikala, već također suzbija detoksifikacijsku sposobnost jetrenog tkiva (Prasanna i sur., 2020). Razlog smanjenja koncentracije GSH u skupinama tretiranih doksorubicinom u odnosu na kontrolnu skupinu u navedenim istraživanjima može biti taj da se GSH troši za uklanjanje slobodnih radikala i metabolita doksorubicina (Wided i sur., 2015), pa smanjena koncentracija GSH ukazuje na povećanu razinu oksidativnog stresa.

Suprotno rezultatima navedenih studija, naši rezultati pokazuju povećanu koncentraciju GSH u pojedinim skupinama tretiranim različitim formulacijama doksorubicina u odnosu na kontrolnu skupinu. Unutarstanična koncentracija GSH ovisi o okolišnim čimbenicima i funkcionira kao ravnoteža između sinteze novog GSH i njegova iskorištenja. Izloženost ROS ili spojevima koji mogu stvoriti ROS može povećati sadržaj GSH povećanjem sinteze GSH (Valco i sur., 2006). Porast koncentracije GSH koji je u našem istraživanju uoćen kod skupina mužjaka štakora tretiranih konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom (Myocet) te kod skupina ženki tretiranih konvencionalnim doksorubicinom, liposomalnom formulacijom (Myocet) i nanoformulacijom doksorubicina

(PLGADox) može se objasniti time da doksorubicin inducira oksidativni stres, pa kao rezultat adaptivnog odgovora na to dolazi do povećane sinteze GSH.

## **6. ZAKLJUČCI**

Uz kontrolu za spol, tretman konvencionalnim doksorubicinom uzrokovao je najveći porast razine mjenjenih parametara oksidativnog stresa u usporedbi s liposomalnom i nanoformulacijom doksorubicina.

Tretman konvencionalnim doksorubicinom kod mužjaka uzrokovao je porast razine GSH te superoksidnog i peroksidnog radikala, dok je kod ženki uzrokovao porast razine GSH te superoksidnog radikala.

Tretman liposomalnom formulacijom Myocet kod mužjaka uzrokovao je porast razine GSH te superoksidnog radikala, dok je kod ženki uzrokovao porast razine GSH.

Tretman nanoformulacijom doksorubicina PLGADox kod mužjaka nije uzokovao porast parametara oksidativnog stresa, dok je kod ženki uzrokovao porast razine GSH te peroksidnog radikala.

Koncentracija reduciranog glutaciona te superoksidnog i peroksidnog radikala, uz kontrolu za tretman, značajno se razlikovala između mužjaka i ženki. Razina peroksidnog radikala veća je u mužjaka kod svih pokusnih skupina, dok je koncentracija reduciranog glutaciona i superoksidnog radikala veća u mužjaka kod svih pokusih skupina osim skupina tretiranih PLGADox-om

## **7. LITERATURA**



- Aula S, Lakkireddy S, Jamil K, Kapley A, Swamy AVN, Lakkireddy HR. *Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles*. *RSC Advances*, 2015, 5, 1-84.
- Batist G, Barton J, Chaikin P, Swenson C, Welles L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, 3, 1739-1751.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism*, 2000, 49, 3-8.
- Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011, 25, 287-299.
- Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos SM, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, 2009, 16, 3267-3285.
- Chatterjee S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. U: Oxidative Stress and Biomaterials. Dziubla T, Butterfield DA, urednici, Academic Press, 2016, str. 35–58.
- Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60, 38-44.
- Chen Y, Zhang W, Huang Y, Gao F, Fang X. In Vivo Biodistribution and Anti-Tumor Efficacy Evaluation of Doxorubicin and Paclitaxel-Loaded Pluronic Micelles Decorated with c(RGDyK) Peptide. *PLoS One*, 2016, 11, 1-18.
- Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20, 372-382.
- Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 92, 1041-1060.
- Doksorubicin DB00997, <https://www.drugbank.ca/>, pristupljeno 21.5.2020.
- Doksorubicin, Compound Summary, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 21.5. 2020.
- Doxorubicin Pliva 2 mg/ml otopina za injekciju/infuziju, sažetak opisa svojstava lijeka, HALMED, [http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC\\_UP-I-530-09-17-02-431.pdf](http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-17-02-431.pdf), pristupljeno 22.5.2020.
- Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52, 1-6.

- Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem*, 2000, 286, 35-37.
- Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. New York, Mc Graw-Hill, 2018, str. 984-965.
- Koçkar MC, Nazıroğlu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A. N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct*, 2010, 28, 673-677.
- Lamberti M, Giovane G, Garzillo EM, Avino F, Feola A, Porto S, Tombolini V, Di Domenico M. Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antineoplastic drugs in patients and occupational exposed workers. *Biomed Res Int*, 2014, 1-8.
- Lei T, Srinivasan S, Tang Y, Manchanda R, Fernandez-Fernandez A, Mcgoron AJ. Targeted Delivery of Doxorubicin by PLGA Nanoparticles Increases Drug Uptake in Cancer Cell Lines. 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC, Maryland, 2010, 224–227.
- Myocet, sažetak opisa svojstava lijeka, HALMED, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/myocet-liposomal-previously-myocet-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/myocet-liposomal-previously-myocet-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 22.5.2020.
- Nagai K, Fukuno S, Oda A, Konishi H. Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses. *Anticancer Drugs*, 2016, 27, 17-23.
- Nitiss KC, Nitiss JL. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res*, 2014, 20, 4737-4739.
- Pereira CV, Nadanaciva S, Oliveira PJ, Will Y. The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8, 219-237.
- Pereverzeva E, Treschalin I, Treschalin M, Arantseva D, Ermolenko Y, Kumskova N, Maksimenko O, Balabanyan V, Kreuter J, Gelperina S. Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *Int J Pharm*, 2019, 554, 161-178.
- Pieniżek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyła A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci*, 2013, 58, 104-111.
- Pieper S, Onafuye H, Mulac D, Cinatl J, Wass MN, Michaelis M, Langer K. Incorporation of doxorubicin in different polymer nanoparticles and their anticancer activity. *Beilstein J Nanotechnol*, 2019, 10, 2062-2072.
- Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci*, 2020, 250, 1-9.

- Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*, 2007, 2, 567-583.
- Shen BY, Chen C, Xu YF, Shen JJ, Guo HM, Li HF, Li XN, Kang D, Shao YH, Zhu ZP, Yin XX, Xie L, Wang GJ, Liang Y. Is the combinational administration of doxorubicin and glutathione a reasonable proposal?. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 40, 699-709.
- Singla S, Kumar NR, Kaur J. In vivo Studies on the Protective Effect of Propolis on Doxorubicin-Induced Toxicity in Liver of Male Rats. *Toxicol Int*, 2014, 21, 191-195.
- Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol*, 1999, 155, 109-117.
- Södergren E. Lipid peroxidation *in vivo*: Evaluation and application of methods for measurement. Disertacija, Sveučilište u Uppsali, Medicinski fakultet, 2000, <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:160811/FULLTEXT01.pdf>, pristupljeno 30.6.2020.
- Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of Myocet™ (liposomal doxorubicin citrate). *The Breast*, 2001, 10, 1-7.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160, 1-40.
- Verma AK, Leekha A, Kumar V, Moin I, Kumar S. Biodistribution and In-vivo Efficacy of Doxorubicin Loaded Chitosan Nanoparticles in Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) Bearing Balb/c Mice. *J Nanomed Nanotechnol*, 2018, 9, 1-6.
- Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf*, 2001, 24, 903-920.
- Wided K, Hassiba R, Mesbah L. *Quercetin* Protects Liver Cells and Mitochondria Against Doxorubicin Induced Oxidative Stress in Albinos' Rats. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2015, 5, 331–338.
- Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, Habib G, Lenihan DJ, Lip GYH, Lyon AR, Lopez Fernandez T, Mohty D, Piepoli MF, Tamargo J, Torbicki A, Suter TM. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2016, 37, 2768-2801.
- Zare MFR, Rakhshan K, Aboutaleb N, Nikbakht F, Naderi N, Bakhshesh M, Azizi Y. Apigenin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity via reducing oxidative stress and apoptosis in male rats. *Life Sci*, 2019, 232, 1-8.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

Doksorubicin je široko korišteni kemoterapeutik i jedan je od najvažnijih antitumorskih lijekova u kliničkoj praksi, međutim njegova primjena ograničena je brojnim nuspojavama koje nastaju zbog njegove neselektivnosti. Osim što uzrokuje kardiomiopatije, doksorubicin štetno djeluje na brojne druge organe, uključujući jetru. Oksidativni stres ima značajnu ulogu u toksičnosti doksorubicina. Zbog važnosti doksorubicina u antitumorskoj terapiji, vrlo je važno istražiti strategije za poboljšanje terapijskog indeksa, posebno smanjenjem incidencije i jačine njegove toksičnosti. Razvoj inovativnih formulacija jedna je od strategija za razvoj djelotvornijih terapija protiv raka. Primjena nanoformulacija ima veliki potencijal za učinkovitiju isporuku lijekova, poboljšanje terapijske učinkovitosti te smanjenje nuspojava. U ovom radu ispitano je kako primjena inovativne nanoformulacije doksorubicina utječe na parametre oksidativnog stresa u jetri mužjaka i ženki štakora u usporedbi s konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet koji su već odobreni za kliničku primjenu te su ispitane razlike u učinku različitih formulacija doksorubicina na životinje različitog spola. Uz kontrolu za spol, tretman konvencionalnim doksorubicinom uzrokovao je najveći porast razine mjenjenih parametara oksidativnog stresa u usporedbi s liposomalnom i nanoformulacijom doksorubicina te je kod svih ispitivanih parametara oksidativnog stresa, uz kontrolu za tretman, uočena je značajna razlika između mužjaka i ženki. Mušjaci su, u odnosu na ženke, imali višu razinu svih ispitivanih parametara kod svih pokusnih skupina, osim razine reduciranog glutationa i superoksidnog radikala za skupine tretirane PLGADox-om.

Doxorubicin is a widely used chemotherapeutic agent and is one of the most important antitumor drugs in clinical practice, but owing to its number of side effects, caused mainly by its low selectivity, its clinical use has been limited. In addition to causing cardiomyopathies, doxorubicin is harmful to many other organs, including the liver. Oxidative stress plays a significant role in doxorubicin toxicity. Due to the importance of doxorubicin in antitumor therapy, it is very important to investigate strategies to improve the therapeutic index, especially by reducing the incidence and severity of its toxicity. The development of innovative formulations is one of the strategies for developing more effective cancer therapies. Use of nanoformulations has great potential for more efficient drug delivery, improvement of therapeutic efficacy and reduction of side effects. In this study, it was investigated how the application of the innovative nanoformulation of doxorubicin affects the parameters of oxidative stress in the liver of male and female rats compared with conventional doxorubicin and liposomal formulation Myocet that have already been approved for clinical

use and differences in the effect of different doxorubicin formulations on animals of different sexes were examined. In addition to gender control, treatment with conventional doxorubicin caused the highest increase in the level of measured oxidative stress parameters compared to liposomal and nanoformulation of doxorubicin and in all examined parameters of oxidative stress, in addition to control for treatment, a significant difference was observed between males and females. Males, compared to females, had higher levels of all examined parameters in all experimental groups, except the level of reduced glutathione and superoxide radical for the groups treated with PLGADox.

# POPIS KRATICA

BCA	bicinkoninična kiselina ( <i>engl.</i> bicinchoninic acid)
CAT	katalaza ( <i>engl.</i> catalase)
COX	ciklooksigenaza ( <i>engl.</i> cyclooxygenase)
DCF	2', 7'-diklorofluorescein ( <i>engl.</i> 2', 7'-dichlorofluorescein)
DCFH-DA	diklorodihidrofluorescein diacetat ( <i>engl.</i> dichlorodihydrofluorescein diacetate)
DHE	dihidroetidium ( <i>engl.</i> dihydroethidium)
Dox	doksorubicin ( <i>engl.</i> Doxorubicin)
EPR	učinak permeabilnosti i retencije ( <i>engl.</i> permeability and retention effect)
GFR	brzina glomerularne filtracije ( <i>engl.</i> glomerular filtration rate)
GPx	glutation peroksidaza ( <i>engl.</i> glutathione peroxidase)
GR	glutation reduktaze ( <i>engl.</i> glutathione reductase)
GSH	glutation ( <i>engl.</i> glutathione)
GST	glutation-S-transferaza ( <i>engl.</i> glutathione S-transferase)
MBCl	monoklorobiman ( <i>engl.</i> monochlorobimane)
MPO	mijeloperoksidaza ( <i>engl.</i> myeloperoxidases)
NOS	sintaza dušikovog oksida ( <i>engl.</i> nitric oxide synthase)
NOX	NADPH oksidaza ( <i>engl.</i> NADPH oxidase)
PLGA	poli (mliječna-ko-glikolna kiselina) ( <i>engl.</i> Poly (lactic-co-glycolic acid))
SOD	superoksid dizmutaza ( <i>engl.</i> superoxide dismutase)
XO	ksantin oksidaza ( <i>engl.</i> xanthine oxidase)

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /  
BASIC DOCUMENTATION CARD**



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ RAZLIČITIH FORMULACIJA DOKSORUBICINA NA OKSIDATIVNI STRES U JETRI

Anita Pavišić

#### SAŽETAK

Doksorubicin je široko korišten kemoterapeutik i jedan je od najvažnijih antitumorskih lijekova u kliničkoj praksi, međutim njegova primjena ograničena je brojnim nuspojavama koje nastaju zbog njegove neselektivnosti. Osim što uzrokuje kardiomiopatije, doksorubicin štetno djeluje na brojne druge organe, uključujući jetru. Oksidativni stres ima značajnu ulogu u toksičnosti doksorubicina. Zbog važnosti doksorubicina u antitumorskoj terapiji, vrlo je važno istražiti strategije za poboljšanje terapijskog indeksa, posebno smanjenjem incidencije i jačine njegove toksičnosti. Razvoj inovativnih formulacija jedna je od strategija za razvoj djelotvornijih terapija protiv raka. Primjena nanoformulacija ima veliki potencijal za učinkovitiju isporuku lijekova, poboljšanje terapijske učinkovitosti te smanjenje nuspojava. U ovom radu ispitano je kako primjena inovativne nanoformulacije doksorubicina utječe na parametre oksidativnog stresa u jetri mužjaka i ženki štakora u usporedbi s konvencionalnim doksorubicinom i liposomalnom formulacijom Myocet koji su već odobreni za kliničku primjenu te su ispitane razlike u učinku različitih formulacija doksorubicina na životinje različitog spola. Uz kontrolu za spol, tretman konvencionalnim doksorubicinom uzrokovao je najveći porast razine mjenjenih parametara oksidativnog stresa u usporedbi s liposomalnom i nanoformulacijom doksorubicina te je kod svih ispitivanih parametara oksidativnog stresa, uz kontrolu za tretman, uočena je značajna razlika između mužjaka i ženki. Mužjaci su, u odnosu na ženke, imali višu razinu svih ispitivanih parametara kod svih pokusnih skupina, osim razine reduciranog glutationa i superoksidnog radikala za skupine tretirane PLGADox-om.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 52 stranica, 13 slika, 2 tablica i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: doksorubicin, oksidativni stres, jetra

Mentor: **Dr. sc. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr.sc. Blanka Tariba Lovaković**, *znanstvena suradnica Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr.sc. Blanka Tariba Lovaković**, *znanstvena suradnica Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada*

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### EFFECT OF DIFFERENT DOXORUBICIN FORMULATION ON OXIDATIVE STRESS IN LIVER

Anita Pavišić

#### SUMMARY

Doxorubicin is a widely used chemotherapeutic agent and is one of the most important antitumor drugs in clinical practice, but owing to its number of side effects, caused mainly by its low selectivity, its clinical use has been limited. In addition to causing cardiomyopathies, doxorubicin is harmful to many other organs, including the liver. Oxidative stress plays a significant role in doxorubicin toxicity. Due to the importance of doxorubicin in antitumor therapy, it is very important to investigate strategies to improve the therapeutic index, especially by reducing the incidence and severity of its toxicity. The development of innovative formulations is one of the strategies for developing more effective cancer therapies. Use of nanoformulations has great potential for more efficient drug delivery, improvement of therapeutic efficacy and reduction of side effects. In this study, it was investigated how the application of the innovative nanoformulation of doxorubicin affects the parameters of oxidative stress in the liver of male and female rats compared with conventional doxorubicin and liposomal formulation Myocet that have already been approved for clinical use and differences in the effect of different doxorubicin formulations on animals of different sexes were examined. In addition to gender control, treatment with conventional doxorubicin caused the highest increase in the level of measured oxidative stress parameters compared to liposomal and nanoformulation of doxorubicin and in all examined parameters of oxidative stress, in addition to control for treatment, a significant difference was observed between males and females. Males, compared to females, had higher levels of all examined parameters in all experimental groups, except the level of reduced glutathione and superoxide radical for the groups treated with PLGADox.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 52 pages, 13 figures, 2 table and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: doxorubicin, oxidative stress, liver

Mentor: **Petra Turčić, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Co-mentor: **Blanka Tariba Lovaković, PhD.** *Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health*

Reviewers: **Petra Turčić, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

**Blanka Tariba Lovaković, PhD.** *Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health*

**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2020.