



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Јелена З. Шмигић

**Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра
лиганда (S,S)–етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил)
дипропионат дихидрохлорида (L3) и његових комплекса
са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну
циркулацију пацова**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Владимир Живковић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. година

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Јелена Шмигић
Датум и место рођења: 29.05.1986. године, Подгорица, Република Црна Гора
Садашње запослење: Aesthetic Studio Beauty Factor , Београд, Република Србија
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра лиганда (S,S)–етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) дипропионат дихидрохлорида (L3) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова
Број страница: 130
Број слика: 1 слика, 14 табела, 28 графикона
Број библиографских података: 214
Установа и место где је рад израђен: Институт за физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Србија.
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Владимир И. Живковић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 04.04.2017. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-689/23 од 05.07.2017. г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник;2. Проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, члан;3. Проф. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област Општа и неорганска хемија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник;2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, члан;3. Проф. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област Општа и неорганска хемија , члан.
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: Недостаци цисплатине и других регистрованих цитостатика (нежељена дејства, појава резистентности и висока токсичност) отворила је могућност истраживања у правцу синтезе нових једињења са истом или већом ефикасношћу и смањеном токсичношћу. Кардиотоксичност је једна од најчешћих и најозбиљнијих компликација примене хемотерапеутика у терапији карцинома. Ефекти цисплатине и нових металних антинеопластичних агенаса на срце и коронарну циркулацију су готово непознати.

Циљ: Циљ овог истраживања је био испитивање и упоређивање ефеката цисплатине (референтна супстанца) и диетил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на моделу изолованог срца пацова перфундованог по Langendorff-овом моделу.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *in vivo* и *ex vivo*. Животиње у експерименталним групама су током четири недеље добијале интраперитонеално по једну дозу (4 mg/kg телесне масе) испитиваног једињења, док су животиње у контролним групама једном недељно добијале једнаку запремину физиолошког раствора или диметил сулфоксида (DMSO). Одређивани су следећи параметри срчаног рада: срчана фреквенција - HR, максимална стопа промене притиска у левој комори - LV(dP/dt)max, минимална стопа промене притиска у левој комори - LV(dP/dt)min, систолни - SLVP и дијастолни притисак у левој комори - DLVP и коронарни проток - CF. Из узорака плазме и коронарног венског ефлуента спектрофотометријски су одређивани NO₂⁻, TBARS, O₂⁻ и H₂O₂, док су из лизата еритроцита на исти начин мерени ензими антиоксидационе заштите (SOD, CAT и GPH).

Резултати: Резултати овог истраживања показују да у примењеној дози и дужини експозиције ниједно од испитиваних једињења није оштетило функцију изолованог срца пацова тј. нису остварили кардиодепресивни ефекат, а са друге стране нови лиганд (L3) али и његови комплекси са четворовалентном платином (K3) и двовалентним паладијумом (PdL3) имају респектабилан и обећавајући потенцијал ка мобилизацији антиоксидационих ензима.

Закључак: Добијени резултати истраживања дају оригиналан и веома важан допринос разумевању развоја кардиотоксичности изазване хемотерапеутицима, као и испитивању кардиотоксичног потенцијала потенцијално нових антиканцерских лекова.

Кључне речи: цисплатина, циклохексил-једињења, кардиотоксичност, коронарни проток, оксидациони стрес, изоловано срце пацова

ABSTRACT

Introduction: Deficiencies of cisplatin and other registered cytostatics (side effects, resistance and high toxicity) have opened up the possibility of research towards the synthesis of new compounds with the same or greater efficacy and reduced toxicity. Cardiotoxicity is one of the most common and serious complications of the use of chemotherapeutics in cancer therapy. The effects of cisplatin and new metal antineoplastic agents on the heart and coronary circulation are almost unknown.

Aim: The aim of this study was to investigate and compare the effects of cisplatin (reference substance) and diethyl-ester ligand (S,S)ethylenediamine-N,N-di-2-(3-cyclohexyl)dipropanoate dihydrochloride and its complexes with Pt(IV) and Pd(II) on an isolated rat heart model perfused according to the Langendorff technique.

Material and methods: The investigation was designed as an experimental study conducted *in vivo* and *ex vivo*. Animals in the experimental groups received intraperitoneally one dose (4 mg/kg body weight) of the test compound over four weeks, whereas animals in the control groups received an equal volume of saline or dimethyl sulfoxide (DMSO) once a week. The following parameters of heart function rate were determined: heart rate - HR, maximal rate of pressure development in left ventricle - LV(dP/dt)max, minimum rate of pressure development in left ventricle - LV(dP/dt)min, systolic - SLVP and diastolic pressure in left ventricle - DLVP and coronary flow - CF. NO₂⁻, TBARS, O₂⁻ and H₂O₂ were determined spectrophotometrically from plasma and coronary venous effluent samples, while antioxidant protection enzymes (SOD, CAT and GPH) were measured on the same way from erythrocyte lysates.

Results: The results of this study show that at the administered dose and exposure length, none of the compounds tested impaired the function of the isolated rat heart, ie. have not achieved cardio-depressant effects, while on the other hand, the new ligand (L3) and also its complexes with four-valent platinum (K3) and divalent palladium (PdL3) have a respectable and promising potential for mobilizing antioxidant enzymes.

Conclusions: The findings of present research provide an original and very important contribution to understanding the development of cardiotoxicity induced by chemotherapeutics, as well as examining the cardiotoxic properties of potentially new anticancer drugs.

Key words: cisplatin, cyclohexyl compounds, cardiotoxicity, coronary flow, oxidative stress, isolated rat heart

ЗАХВАЛНИЦА

Велику захвалност дугујем:

На првом месту декану, проф. др Владимиру Јаковљевићу без чије континуиране помоћи не би било могуће ни почети ни завршити ову докторску дисертацију.

Ментору проф. др Владимиру Живковићу на подршци и помоћи у изради тезе.

Свим члановима лабораторије за кардиоваскуларна истраживања Факултета медицинских наука у Крагујевцу: доц. др Невени Јеремић, доц. др Исидори Милосављевић, доц. др Тамари Николић Турнић, доц. др Ивану Срејовићу, асс. Јовани Јеремић, асс. Јовани Брадић, асс. Аници Петковић, асс. Александри Вранић, асс. др Јасмини Сретеновић и Предрагу Равићу на помоћи коју су ми пружили и атмосфери коју су поделили са мном.

Посебну захвалност дугујем људима који су ми давали несебичну подршку:

Мужу Бојану без чијег разумевања и љубави не бих могла да замислим рад на докторату, оцу Здравку без чијег животног усмерења не бих дошла на идеју доктората, мајке Јасминке без чије помоћи у подизању деце би докторат био незамислив подвиг, сестре Милене чија је несебична помоћ омогућила да започети докторат дође до ове фазе, свекру Вулу и свекрви Миленки без чије подршке би докторат био непотпун и наравно Виктору и Викторији чија љубав је била мотивација за сваку написану реч.

Стога, мој докторат је значајним делом последица њиховог одрицања.

ХВАЛА ВАМ!

Јелена Шмигић

САДРЖАЈ:

I. УВОД	1
1.1. Појам кардиотоксичности изазване применом хемотерапеутика	2
1.2. Кардиоваскуларне компликације примене хемотерапеутика	3
1.2.1. Срчана слабост – инсуфицијенција миокарда	4
1.2.2. Ишемија миокарда	5
1.2.3. Артеријска хипертензија	6
1.2.4. Тромбоемболије	7
1.2.5. Аритмије и примена антикоагулантне терапије	9
1.2.6. Плућна хипертензија	10
1.3. Лекови за лечење малигнитета и кардиотоксичност	11
1.3.1. Антрациклини и кардиотоксићност	11
1.3.2. Инхибитори рецептора за хумани епидермални фактор раста 2 (HER2) и кардиотоксичност	16
1.3.3. Митоксантрон и кардиотоксичност	18
1.4. Цисплатина и клиничка употреба	19
1.4.1. Цисплатина и развој кардиотоксичности	22
II. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ	25
III. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	27
3.1. Испитивана популација	28
3.2. Експериментални протокол	28
3.3. Експериментални модел изолованог срца пацова	29
3.4. Биохемијске анализе	31
3.4.1. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту	31
3.4.2. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса и ензима антиоксидационе заштите у прикупљеним узорцима крви	32
3.4.3. Одређивање липидног статуса пацова	34
3.4.4. Одређивање биохемијских показатеља функције бубрега пацова	34
3.4.5. Одређивање биохемијских показатеља функције јетре пацова	34
3.5. Статистичка обрада података	35
IV. РЕЗУЛТАТИ	36
4.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину и биохемијске маркере пацова	37
4.1.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину пацова	37

4.1.2. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске маркере пацова	38
4.2. Утицај хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	41
4.2.1. Утицај хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	41
4.2.2. Утицај хроничне адиминистратије октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K ₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова ...	45
4.2.3. Утицај хроничне адиминистратије Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL ₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	49
4.2.4. Поређење ефеката хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	53
4.3. Утицај хроничне адиминистратије цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	56
4.3.1. Поређење ефеката хроничне адиминистратије цисплатине и физиолошког раствора (F) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	59
4.4. Поређење ефеката хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) са цисплатином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	60
4.5. Утицај хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту	63
4.5.1. Утицај хроничне адиминистратије лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту.....	63
4.5.2. Утицај хроничне адиминистратије октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K ₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту.....	67

4.5.3. Утицај хроничне адиминистрације Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL ₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту	71
4.5.4. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту.....	74
4.6. Утицај хроничне адиминистрације цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту	76
4.6.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту	78
4.7. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) са цисплатином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту	79
4.8. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на параметре системског оксидационог стреса у плазми	81
4.8.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре системског оксидационог стреса у плазми.....	81
4.8.2. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) на параметре системског оксидационог стреса у плазми	82
4.9. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре системског оксидационог стреса у плазми	84
4.10. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (PdL ₃) са цисплатином на параметре системског оксидационог стреса у плазми.....	85
4.11. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et ₂ eddch}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-	

Et2eddch}} (PdL ₃) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита	87
4.11.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита	87
4.11.2. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита	88
4.12. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита.....	90
4.12. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L ₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃) и двовалентним паладијумом [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) са цисплатином на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита	91
V. ДИСКУСИЈА	93
5.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину пацова	96
5.2. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске маркере пацова	98
5.3. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L ₃), његових комплекса [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃), [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	100
5.4. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L ₃), његових комплекса [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃), [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) и цисплатине на срчане и системске про-оксидационе параметре пацова	106
5.5. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L ₃), његових комплекса [PtCl ₄ {(S,S)-Et2eddch}}] (K ₃), [PdCl ₂ {(S,S)-Et2eddch}}] (PdL ₃) и цисплатине на параметре антиоксидационог система заштите пацова	110
VI. ЗАКЉУЧЦИ	111
VII. ЛИТЕРАТУРА	111

I.

УВОД

1.1. Појам кардиотоксичности изазване применом хемотерапеутика

Кардиотоксичност је једна од најчешћих и најозбиљнијих компликација примене хемотерапеутика у терапији карцинома. Поједини аутори све кардиоваскуларне компликације примене хемотерапеутика подразумевају под термином „кардиотоксичност“. Срчана слабост изазвана хемотерапијом (енгл. *Chemotherapy-Induced Heart Failure* - CИHF) или срчана дисфункција повезана са терапијом карцинома (енгл. *Cancer Therapeutics Related Cardiac Dysfunction* - CTRCD) су термини који се практично сматрају синонимима, а клинички подразумевају смањење ејекционе фракције леве коморе испод одређених граничних вредности. Важећи став Европског удружења кардиолога (European Society of Cardiology) којим се дефинише кардиоваскуларна токсичност изазвана лечењем карцинома подразумева смањење ејекционе фракције леве коморе за $\geq 10\%$ испод 50% као „кардиотоксичност“ (1). Историјски гледано, постоје два основна облика срчане слабости изазване хемотерапијом (CИHF): 1) тип 1 или тип антрациклинског оштећења; и 2) тип 2 или тип оштећења трастузумабом. Наведена класификација произилази из разлика у механизму настанка и клиничким манифестацијама оштећења миокарда која настају деловањем претходно поменутих супстанци. Претходне класификације, попут поделе оштећења на ирверзибилна тип 1 и реверзибилна тип 2, више нису валида због великог степена преклапања. Поред тога, више класичних хемотерапеутика се доводи у везу са повећаним ризиком за настајање CИHF, при чему се њихов број стално повећава, имајући у виду да се стално уводе у испитивања нови хемотерапеутици. Суочавајући се са повећаном разновршношћу хемотерапеутика поједини аутори захтевају нову класификацију кардиотоксичности која се заснива на фармакодинамским својствима и патофизиолошким механизмима, што делује разумно имајући у виду да боље сагледавање молекулских механизма може да пружи не само прецизнија очекивања клиничких компликација, већ и нове стратегије превенције и терапијских интервенција.

Кардиоонкологија је ново развојно поље кардиологије, а бави се испитивањем кардиоваскуланих оштећења код пацијената са карциномом. Базични циљеви кардиоонкологије су превенција, дијагностика и лечење кардиотоксичности изазване

хемотрапијом и/или радиотерапијом. Нешто специфичнији циљеви су дијагностика и лечење примарних и метастатских тумора срца и срчане амилоидозе.

Кардиотоксичност изазвана антрациклином је први пут забележена седамдесетих година прошлог века (2). Од тада резултати великог броја истраживања указују на повезаност између настајања кардиотоксичности и лоше прогнозе и исхода лечења (3). У новије време, када су нови, циљани и ефикаснији молекули уведени у клиничку онкологију, кардиотоксични ефекти - који нису ретки - могу потенцијално надмашити теоретску клиничку корист. Инциденција кардиотоксичности варира у зависности од врсте примењених хемотерапеутика. Доксорубицин се повезује са кардиотоксичношћу код 3–26% лечених пацијената, трастузумаб у 2–28%, а сунитиниб у 2,7–11% (4). Резултати скоро спроведеног клиничког истраживања показали су да 6,6% пацијената са карциномом дојке или хематолошким малигним обољењем који су лечени хемотерапијом разивају срчану слабост (5). Поред тога, пацијенти са карциномом такође имају већи ризик за настајање болести коронарних артерија, аритмија и тромбоемболије (6). Занимљива је чињеница да рак и болест коронарних крвних судова имају исте генетске и унутарћелијске метаболичке путеве. Лечење пацијената оболелих од карцинома је сложено и захтева мултидисциплинарни тимски приступ који укључује онкологе, хирурге, радиологе и клиничке кардиологе.

1.2. Кардиоваскуларне компликације примене хемотерапеутика

Антиканцерски лекови се доводе у везу са великим бројем компликација у кардиоваскуларном систему, укључујући: артеријску и плућну хипертензију, суправентрикуларне и вентрикуларне аритмије, систолну и дијастолну дисфункцију и коронарну болест срца. Као могући узроци настајања наведених поремећаја индукованих хемотерапијом и радиотерапијом најчешће се наводе ендотелна дисфункција, тромбогенеза и оштећење миокарда.

1.2.1. Срчана слабост – инсуфицијенција миокарда

Према недавно постигнутом консензусу стручњака за кардио-онкологију, клинички значајна кардиотоксичност након хемотерапије постоји уколико су испуњени наведени ехокардиографски критеријуми: 1) апсолутно смањење ејекционе фракције леве коморе за $\geq 10\%$ и 2) ејекциона фракција $< 50\%$. Поред тога, као рани маркер непосредне кардиотоксичности користи се параметар под називом глобална лонгитудинална напетост леве коморе (енг. *left ventricular global longitudinal strain - GLS*), при чему се смањење GLS веће од 15% током хемотерапије повезује са већом вероватноћом за скорим развојем систолне инсуфицијенције (7).

Најчешће се наводе два патофизиолошка механизма за настајање кардиотоксичности изазване хемотерапијом. Први механизам подразумева „директну“ кардиотоксичност, односно оштећење и некрозу кардиомиоцита изазвану применом хемотерапеутика, чиме се узрокује трајно, ирверзибилно оштећење и инсуфицијенција миокарда (кардиотоксичност типа I). Други механизам укључује инхибицију физиолошких функција миокарда, при чему настаје стање такозваног „омамљеног“ (енг. *stunned*), и знатна али потенцијално реверзибилна инсуфицијенција миокарда (кардиотоксичност типа II) (8). Кардиотоксичност типа I у оквиру које настаје оштећење ћелија и последична некроза и кардиотоксичност типа II која подразумева поремећај функције миофибрила могу да се посматрају као клинички одвојени ентитети (9). Ипак, ово раздвајање није стриктно и оба типа кардиотоксичности се врло често преклапају и имају адитивне или синергистичке ефекте. Наиме, директно оштећење миокарда може да буде реверзибилно уколико је умерено, а са друге стране, поремећај функције контрактилних елемената може да изрокује повећање оксидационог стреса и последичну ирверзибилну некрозу. Ипак, антиканцерогени агенси који не изазивају акутно оштећење миокарда, услед чега могу безбедно да се примењују током дужег периода, посредују у суштински другачијем облику кардиотоксичности у односу на супстанце које испољавају кумулативну, дозно-зависну токсичност (10). Објашњење механизма којима неки антиканцерски лекови испољавају кардиотоксичност ограничавајући се на миофибриле, док други оштећују органеле чиме показују тенденцију ка изазивању трајног оштећења, било је предмет великог броја истраживања, али ипак остаје доста непознаница и контроверзи (11).

Класичан пример кардиотоксичности типа I је кардиотоксичност изазвана антрациклинима, што обично зависи од дозе, док је пример за кардиотоксичност типа II она коју изазива трастузумаб и она није условљена дозом (12).

Поред директног токсичног ефекта антиканцерских лекова, било на кардиомиоците било на контрактилне елементе, поједни хемотерапеутици могу да испоље своје ефекте променом физиолошких и хемодинамских функција. На пример, хемотерапеутици могу да промене накнадно оптерећење срца (*afterload*) – повећањем вредности крвног притиска, или претходно оптерећење (*preload*) – ретенцијом течности (13, 14). Поред промена које изазивају додатни стрес у миокарду, може да настане погоршање или убрзавање стопе некрозе кардиомиоцита. На тај начин, поједини хемотерапеутици немају изражено директно токсично дејство, већ изазивају секундарне промене и оштећења која су потенцијално реверзибилна и повлаче се кориговањем хемодинамских поремећаја (15). Прецизирање механизма којима антиканцерски лекови изазивају срчану инсуфицијенцију су кључни за разумевање и примену адекватних превентивних мера у циљу минимизирања ефеката дугорочне примене ових лекова.

1.2.2. Ишемија миокарда

Неки хемотерапијски агенси (5-флуороурацил и гемцитабин) повећавају ризик за настајање коронарне атеросклерозе и акутног коронарног синдрома. Континуирана интравенска инфузија 5-флуороурацила може да изазове ишемију миокарда која се манифестује као бол у грудима и ишемијске електрокардиографске промене, обично између другог и петог дана примене. Овај ефекат не зависи од дозе, а патофизиолошки механизми укључују васкулитис, спазам и тромбозу (16). Најчешће клиничке манифестације подразумевају пекторалну ангину, инфаркт миокарда, перикардитис, диспнеу, едем плућа, кардиогени шок, изненадну срчану смрт, суправентрикуларне аритмије. Подаци у литератури који се тичу ефеката профилактичке примене нитрита и инхибитора калцијумских канала за настајање ишемијских промена миокарда код пацијената на терапији 5-флуороурацилом су опречни. Ипак резултатаи указују на чињеницу да би применом верапамила могло да се спречи настајање аритмија (16). Капецитабин је практично пролек, који се конвртује у 5-флуороурацил у туморским

ћелијама. Инциденција кардиотоксичности варира од 3% до 9%, укључујући инфаркт миокарда, поремећаје у ЕКГ налазу и вентрикулске екстрасистоле (4, 17).

Инхибитори васкуларног ендотелног фактора рста (енг. *vascular endothelial growth factor* - VEGF) као што су бевацизумаб и цисплатин такође се доводе у везу са исхемијом миокарда изазивањем ендотелне дисфункције, хиперкоагулабилности и тромбозе (18). Акутни коронарни синдром изазиван цисплатином настаје у приближно 2% пацијената лечених овим леком (7).

Радиотерапија је, такође, повезана са коронарном атеросклерозом - посебно на ушћу коронарних артерија - и већим ризиком за настајање акутног коронарног синдрома. Кумулативна учесталост коронарне артеријексе болести код пацијената лечених од Хочкиновог лимфома је доста висока, око 20%, чак и након 40 година (19). Због наведених чињеница саветује се дугорочно и детаљно кардиолошко праћење пацијената више година након радиотерапије.

Занимљива је чињеница да коронарна артеријска болест и рак имају сличне факторе ризика и патофизиолошке путеве (попут хроничног запаљења). Показало се да модификација фактора ризика спречава развој и болести коронарних артерија и карцинома, али мало су позната дејства кардиотоксичност изазвану на хемотерапијом или радиотерапијом (6).

1.2.3. Артеријска хипертензија

Хипертензија се релативно често наводи као нежељени ефекат примене више врста хемотерапеутика, пре свега инхибитора VEGF, који узрокују смањење количине азот-мооксида (NO) у зидовима артериола. Може да се развије у било ком тренутку након започињања терапије, а претходно дијагностикована хипертензија је важан фактор ризика за настајање компликација попут хипертензивне енцефалопатије и крварења у централномнервном систему. Хипертензија је чест нежељени ефекат код пацијената који су на терапији бевацизумабом, са укупном инциденцијом која се, према подацима из клиничких студија, налази у рангу између 4% и 35% (20-22). Инциденција се драматично повећава на 67% уколико се комбиновано примењују бевацизумаб и сорафениб, и чак на 92% уколико се комбиновано примењују бевацизумаб и сунитиниб (23). Хипертензија је

најчешћа манифестација кардиотоксичности код пацијената који се лече сунитинибом и настаје током прве четири недеље терапије, при чему је инциденција настајања хипертензије 21,6%, а инциденција настајања хпертензије високог степена 6,8% (24).

Инциденција настајања хипертензије код болесника који примају сорафениб варира од 16% до 42,6%, при чему је инциденција настајања хипертензије 3. и 4. степена од 2,1% до 30,7%. Поред тога, примена сорафениба се доводи у везу са настајањем синдрома постериорне леукоенцефалопатије која се манифестује главобољом, епилептичким нападима, поремећајима вида и акутном хипертензијом (25).

Имајући у виду претходно изнете чињенице, неопходно је интезивно праћење артеријског крвног притиска код пацијената чићи тераписјки протоколи укључују наведене лекове, као и примена одговарајућих лекова током и након хемотерапије. Саветује се примена инхибитора ангиотензин-конвертујућег ензима (АСЕ) и блокатора калцијумских канала, изузев у случају хипертензије изазване сорафенибом, услед интеракције која има за последицу повећање концентрације сорафениба (26).

1.2.4. Тромбоемболије

Познато је да малигне болести стварају протромботичну средину, а уз смањено кретање, срчану слабост, фибрилацију преткомора, дехидрацију и примену хемотерапијских агенаса ризик за настајање артеријске и венске тромбоемболије се знатно повећава. Инциденција настајања тромбоемболије знатно варира и зависи од великог броја фактора, пре свега стања пацијента а потом и примене антиканцерских и тромбопрофилактичких лекова (Табела 1).

Табела 1. Инциденција и тип трбоемболије у зависности од примењеног хемотерапеутика

Хемотерапеутик	Инциденција	Тип
Цисплатин	18%	Венска
Талидомид	27%	Венска
Вориностат	5-8%	Венска
Ерлотиниб	3,9-11%	Венска
Бевацизумаб	12%	Артеријска

Прилагођено из Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. Nat Rev Cardiol. 2015;12(9):547-58.

У циљу препознавања пацијената који примеју хемотерапију са високим ризиком за развој тромбоемболијских компликација *Khorana* и сарадници су развили скор за процену ризика који узима у обзир клиничке и лабораторијске параметре попут: локализација карцинома (врло висок ризик за карцином желуца и панкреаса, а висок ризик за карцином плућа, мокраћне бешике, тестиса, лимфоме и гинеколошке малигнитете), вредности тромбоцита пре хемотерапије $\geq 350.000/\text{mm}^3$, вредности хемоглобина мање од 100 g/L, вредности леукоцита пре хемотерапије $>11.000/\text{mm}^3$ и вредност индекса телесне масе већа од 35 kg/m² (27). У популацији пацијената оболелих од карцинома, препознавање пацијената са високим ризиком за настајање тромбоемболије и примена адекватне профилаксе може у великој мери да унапреди и побољша морбидите, морталитет и исход лечења пацијената са карциномом, као и квалитет живота и коришћење здравствених ресурса. Спроведено је више клиничких истраживања у циљу препознавања пацијената са високим ризиком на основу појединачних фактора ризика, попут метастазирајућег карцинома плућа или дојке, или постојања интравенских катетера (28-30), али резултати нису показали бенефите уз примену тромбоемплијске профилаксе. Због наведене чињенице било је значајно развити адекватан модел предикције ризика за настајање тромбоемболије, како би се код таквих пацијената примениле тромбопрофилактичке методе.

Резултати велике ретроспективне студије су показали да постоји знатно висок ризик за настајање тромбоемболије (18,1%) код пацијената који примају хемотерапију која се заснива на цисплатину, најчешће у првих 100 дана од почетка терапијског протокола. Као фактори ризика се наводе пол, старосна доб, раса, *Karnofsky* индекс, примена фактора који стимулишу еритропоезу, локализација карцинома, стадијум развоја карцинома, вредности леукоцита и хемоглобина и вредности *Khorana* индекса (31). Патогенеза васкуларне токсичности коју изазива цисплатин укључује хипомегнеземију, повећане вредности фон Вилебрандовог фактора и оштећење ендотела стварањем прокоагулантних ендотелних микропертикли, и вероватно захвата и венски и артеријски систем за разлику од већине осталих фактора ризика за настајање тромбозе који углавном захватају венски део васкуларног система.

Инциденција тромбоемболијских поремећаја код пацијената који први пут примају талидомид износи 27%, док се код пацијената чији терапијски протокил укључује

вориностат креће у распону од 5% до 8% (4). Примана фармаколошке тромбопрофилактике је препоручљива код пацијената који се лече талидомидом или леналидомидом уз примену високих доза дексаметазона, уколико нема онтраиндикација за примену антикоагулансе (32). Бевацизумаб се доводи у везу и са повећањем ризика за настајање венске тромбоемболије и са повећаним ризиком за настајање крварења.

1.2.5. Аритмије и примена антикоагулантне терапије

Аритмије, суправентрикуларне или вентрикуларне, су релативно чест налаз код пацијената који се лече неким од хемотерапеутских агенаса. На пример, показано је да атријална фибрилација настаје код око 3% пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије који се лече ибрутинибом (33). Насупрот томе, талидомид се доводи у везу са повећаним ризиком за настајање брадиаритмија, због чега се избегава примена бета блокатора и антагониста калцијумских канала код ових пацијената. Арсеник триоксид, који се успешно користи у лечењу релапса акутне промијлоцитне леукемије, изазива продужење QT интервала и може да изазове аритмију *torsades de pointes* (34). Имајући у виду наведену чињеницу, праћење ЕКГ налаза и QT интервала се намеће као императив код пацијената који примају арсеник триоксид пре почетка сваког циклуса терапије. Знатно ређе, и лекови који спадају у инхибиторе тирозин-киназе, инхибиторе протеазома и инхибиторе хистонске деацетилазе могу да изазову пролонгацију QT интервала (34).

Имајући у виду да аритмије повећавају ризик за настајање тромба, логична је примена антикоагулантне терапије, међутим код оболелих од малигних болести тешко је спровести овакву терапију. Као што је наведено у претходном тексту, оболевање од карцинома и примена хемотерапеутика се доводи у везу са повећањем ризика за настајање тромбоемболије, али такође постоји повећање ризика за настајање крварења као компликације. Скорови који се уобичајено користе код пацијената са атријалном фибрилацијом за процену ризика за настајање тромбоемболије и ризика за настајање крварења нису примењиви код пацијената који уз атријалну фибрилацију имају и малигнитет (7). Поред тога, не постоји довољно података о безбедности и ефикасности примене антагониста витамина К и нових оралних антикоагулантних лекова код пацијената током или након хемотерапије, поготово код пацијената са

тромбоцитопенијом. Услед тога се одлука о примени антикоагуланаса код пацијената који се лече неким од хемиотерапијских агенаса и иамју атријалну фибрилацију доноси за сваког пацијента појединачно. Примена нискомолкулских хепарина или обичног хепарина може да буде краткорочно решење када постоји потреба за примену антикоагулантне терапије (35).

1.2.6. Плућна хипертензија

Плућна хипертензија је обољење васкулатуре плућа које се класификује у пет главних етиолошких група (36). Плућна хипертензија изавана лековима и токсинима је сврстана у групу 1. Карцином може да изазове плућну хипертензију посредством опструкцијом плућне артерије организованим фиброзним тромбом услед хиперкоагулабилног стања, што се сврстава у групу 4 (37, 38). Спољашњи притисак на плућне крвне судове који врши тумор или директно ширење тумора унутар крвних судова, попут лимфома великих В ћелија, изазива плућну хипертензију која се сврстава у групу 5 (39).

Дасатиниб је први лек за који је потврђено да изазива плућну хипертензију код пацијената са хроничном мијелцитном леукемијом (40). У једном америчком истраживању показано је да се плућна хипертензија потпуно или делимично повукла по завршетку терапије дасатинибом (41). Резултати студије DASISION су показали да се плућна хипертензија развила код 5% пацијената који су примали дасатиниб и код 0,4% пацијената који су лечени имитинибом током пет година (42). Патогенетски механизам индуковања плућне хипертензије дасатинибом вероватно подразумева инхибицију SRC киназе, ензима који има улогу у регулацији пролиферације васкуларних глатких мишићних ћелија и у регулацији вазоконстрикције, тако да инхибиција овог ензима има за последицу повећање васкуларног отпора у плућним крвним судовима (43).

Трансторакална ехосонографија је метода избора за скрининг пацијената за развој плућне хипертензије, а дијагноза се потврђује анализом V/Q скена и катетеризацијом десног срца. Лечење настале плућна хипертензија подразумева искључивање дасатиниба и његову замену за неки други лек из исте групе, уз додатак силденафила, ендотелних антагониста или блокатора калцијумских канала (43). Плућна хипертензија изазвана дасатинибом има релативно добру прогнозу уколико се рано открије и адекватно лечи, а

терапија карцинома може да се настави неким другим леком из групе инхибитора тирозин киназе.

1.3. Лекови за лечење малигнитета и кардиотоксичност

1.3.1. Антрациклини и кардиотоксичност

Антрациклини су први пут уведени у клиничку праксу почетком седамдесетих година прошлог века, и до данас су остали кључни део терапијских протокола за лечење великог броја малигнитета, укључујући: карцином дојке, саркоме, лимфоме и хематолошке малигнитете код деце (44). Оштећење миокарда изазвано антрациклинима је најинтезивније изучавано, и самим тим механизам којим антрациклини испољавају кардиотоксичност најпознатији и најјаснији. Кардиотоксичност повезана са употребом антрациклина рано је препозната и била је довољно неспецифична, тако да су брзо оформљене смернице и препоруке у циљу ограничења кумулативне доза лека и смањења нежељених ефеката на срце (45). Прорачун иницијалне дозе антрациклина сведен је повећавање преживљавања оболелих уз ограничење инциденције срчане слабости испод 5% (46). Веће дозе би знатно повећале кардиотоксичност диспропорционално доданој онколошкој користи. У случају доксорубицина, најчешће коришћеног антрациклина, кумулативна доза која не изазива инциденцију срчане инсуфицијенције већу од 5% је првобитно била прорачуната на 550 mg/m^2 (47). Међутим, испитивањем ефеката доксорубицина на оштећење миокарда које се развија касније, кумулативна доза је смањена на вредности које се налазе у распону од 400 до 450 mg/m^2 , како би се одржала корелација са инциденцијом срчане слабости која није виша од 5% (48). Свакако треба имати у виду да постоје битне индивидуалне варијације сваког пацијента у погледу толеранције и ефеката терапије антрациклинима.

Имајући у виду да су патогенетски путеви којима антрациклини изазивају кардиотоксичност довољно различити од каскадних путева који посредују у остваривању антитуморских ефеката, постоји могућност смањења кардиотоксичности без утицаја на онолошку ефикасност лекова. Резултати истраживања у којима су антрациклини примењивани код мишева показали су да тежина кардиотоксичности корелира са

максималном концентрацијом лека у плазми, док је онколошка ефикасност у већој мери повезана са површином испод криве концентрације у плазми (49, 50). Наведена чињеница је омогућила развој великог броја стратегија намењених селективном смањењу кардиотоксичности, укључујући смањење дозе, продужени распоред инфузије, модификацију молекулске структуре и хемијску кардиопротекцију. Сматра се да механизам антрациклинске кардиотоксичности укључује продукцију реактивних врста кисеоника која је индукована у реакцијама са гвожђем и последично оксидативно оштећење кардиомиоцита (51). Мембране митохондрија су посебно осетљиве на оксидационо оштећење. Резултати скоријих истраживања указују на чињеницу да продукција реактивних врста кисеоника индукована антрациклинима зависи од топоизомеразе-2 β , а мишеви са делицијом овог ензима су практично заштићени од кардиомиопатије изазване доксорубицином (52). Поред наведеног механизма наведени су и други попут: директног оштећења митохондријске ДНК, поремећаја структурног саркомерског протеина титина и поремећаја регулације фактора транскрипције у срцу (53, 54).

Оштећење срца изазвано антрациклинима је дозно зависно. Оштећење кардиомиоцита вероватно почиње након прве примене лека, пошто се вредности тропонина у плазми повећавају одмах након примене прве дозе (55). Повећање кумулативне дозе лека узрокује и повећање броја оштећених кардиомиоцита, и на крају се достиже праг када се дисфункција леве коморе може клинички детектовати неинвазивним методама. Осим мерења биомаркера, једини метод дефинитивног откривања раног оштећења је ипитивање ултраструктуре кардиомиоцитамиоцита (56). Међутим, пропуст у раном откривању оштећења помоћу наведених метода и добијање негативних резултата не значи да срце није оштећено, јер чак и мале кумулативне дозе антрациклина могу да поремете функције срца и остављају срце подложним деловању стресора у каснијем периоду. Употребом новијих неинвазивних техника, укључујући *strain* ехокардиографију и магнетну резонанцу срца, уз проширење палете биомаркера који се одређују, смањен је праг детекције и омогућено је раније препознавање оштећења које, без биопсије срчаног мишића, није било могуће.

Рано откривање оштећења срца омогућава адекватну процену ризика и правовремену интервенцију у циљу спречавања даљег губитка племенитог ткива срца

(57). Резултати највећег броја истраживања на основу којих су и направљени протоколи и поделе оштећења миокарда током примене антрациклина добијени су техникама снимања као што су М-мод и дводимензионална ехокардиографија са Доплеровом сликом или вишеструко скенирање аквизиције (58, 59). Новији модалитети снимања са већом осетљивошћу за откривање срчане инсуфицијенције могу да омогуће прекидање терапије при нижим кумулативним дозама, пре настанка већег оштећења срца. За нове дијагностичке технике свакако је потребна даља валидација како би се направили водичи засновани на валидним доказима из максималну повољност за пацијента у погледу равнотеже између ризика за настајање оштећења срца и онколошког ефекта. Кардиоонколози су се дуго придржавали дефиниције да срчана слабост изазвана применом хемиотерапеутика постоји уколико се ејекциона фракција леве коморе смањи за 5% или више при чему ејекциона фракција леве коморе износи мање од 55% уз постојење симптома срчане инсуфицијенције, или уколико се ејекциона фракција леве коморе смањи за 10% или више при чему ејекциона фракција леве коморе износи мање од 55% без симптома срчане инсуфицијенције (60). Очигледно је да су потребни нови водичи у клиничкој пракси примене хемотерапеутика имајући у виду бољу предиктивну вредност нових и мољих модалитета имицинга, попут нуклеарне магентне резонанце срца и *strain* имицинг.

Бројни фактори утичу на степен оштећења срца услед примене антрациклина. Иако је то тешко квантификовати или дефинисати, генетичка варијабилност готово сигурно има улогу у индивидуалној способности толеранције високих кумулативних доза антрациклина без детектабилне или очигледне кардиотоксичности (61). Фактор који има већу предиктивну вредност у погледу препознавања појединаца који су склонији настајању оштећења миокарда током примене антрациклина су анамнестички подаци о ранијем оштећењу миокарда из било ког разлога, као и претходна стања која сведоче о смањеној способности миокарда да толерише повећање стреса или токсично оштећење (62). Педијатријски онколошки пацијенти су посебно осетљиви на кардиотоксичност изазвану антиканцерогеним средствима, имајући у виду механизме који могу да поремете развој незрелог срца, што указује на огромни значај кардиопротекције код оваквих болесника (63). Изложеност терапијским дозама зрачења је фактор ризика који је, на пример, могуће превенирати применом техника које штите срце, попут дубоког

инспиријума и задржавања даха током излагања зрачењу, при чему се избегавају оштећења која могу да остану недетектована годинама или деценијама (64). Такође, исхемични кадруомиоцити су подложнији токсичном дејству антрациклина, тако да корекција евентуалне тешке или критичне исхемије пре увођења антрациклина може да испољи кардиопротективно дејство. Слично томе, хипертензија се такође наводи као фактор ризика за кардиотоксичност изазвану антрациклинима и стога треба да се лечи пре започињања терапије антрациклинима. Сви наведени фактори ризика за настајање оштећења срца изазваног антрациклинима били су у жижи превентивних или раних интервентних стратегија за ублажавање оштећења.

Студије које су се бавиле анализом материјала добијеног ендобиопсијама миокарда показале су да се продуженим инфузијама доксорубицина могу снизити максималне концентрације лека у плазми и чиме се постиже протекција у погледу срчаног оштећења изазвано антрациклинима (65). Испитивани су ефекти инфузија доксорубицина токо 48, 72 и 96 сати. Инфузије које се примењују током 96 сати омогућавају готово двоструко више терапијских циклуса у односу на уобичајену примену уз приближно исти ниво кардиотоксичности. Инфузије које трају дуже од 96 сати нису пожељне због нежељеног дејства у виду улцерација усне дупље, али инфузије које трају 72 сата се добро подносе, а пружају знатан ниво кардиопротекције (66). Иако, су продужене инфузије још увек метода избора у стањима где се очекују високе вршне дозе антрациклина у плазми, због ризика везаних за инфузионе пумпе и могућности настајања инфекције, као и због доступности алтернативних решења, углавном се одустало од ове методе кардиопротекције (67).

Липосомални системи за испоруку за примену доксорубицина су одобрени у САД у пегилованом препарату, а у Европи у и пегилованој и непегилованој формулацији. И величина молекула лека и брзина елиминације могу се променити таквим системима. Веће димензије пегилване липосомалне формулације доксорубицина омогућавају селективно продирање у васкулатуру тумора, имајући у виду да неопластични крвни судови имју крхкије и пропусније капиларно корито (68). Поред тога, пегиловани липозомални доксорубицин има дужи полу-живот у плазми у односу на нативни препарат, чиме се такође постиже кардиопротективно својство. Степен кардиопротекције који се постиже применом липозомалних система је на сличном нивоу у односу на продужене инфузије, чиме се омогућава двоструко више терапијских циклуса уз сличан број нежељених

ефеката на срце. Са друге стране, липозомална инкапсулација може да промени онколошке карактеристике нативног једињења до те мере да се више не може да се сматра заменом за конвенционални доксорубицин, у погледу онколошке ефикасности.

Поред наведених нових метода испоруке лека, једињења настала променом молекулске структуре почетног једињења се такође анализирају у циљу смањења ефеката антрациклина на срце. Епирубицин, 4' епимер доксорубицина, је структурно измењен молекул за који се показало да има смањену кардиотоксичност када се дају еквивалентне миелосупресивне дозе. Иако се сматра да је овај агенс мање кардиотоксична алтернатива доксорубицину, ипак постоје одређене опречности у погледу са чињенице да ли штити или штеди миокард (69-71).

Показано је да дексразозан, циклични дериват етилендиаминотетрасирћетне киселине, селективно штити срце од ефеката антрациклина. Ово једињење је првобитно синтетизовано као антитуморски агенс, али неповољни онколошки профил није омогућио даља истраживања у овом смеру (72). Прелиминарни резултати указују на могућност интерференције дексразозана и доксорубицина, при чему би се смањио антитуморски ефекат доксорубицина (73), тако да би индикација за примену дексразозана била оправдана код пацијенткиња са метастатским карциномом дојке које примају најмање 300 mg/m² доксорубицина, при чему је пожељно повећање дозе доксорубицина. У почетку се сматрало да дексразозан испољава кардиопротекцију неутрализацијом слободних радикала, међутим, новији резултати наводе на закључак да дексразозан инхибира топоизомеразу-2 β , која има улогу кључног посредника кардиотоксичности изазване антрациклинима (74, 75). Наведени механизам даје објашњење на чињеницу да дексразозан има кардиопротективна својства, док неки примењени антиоксиданси немају (49). Неколико мањих клиничких студија је спроведено у циљу испитивања примене β -блокатора и АСЕ инхибитора и превенцији кардиотоксичности изазване антрациклинима, при чему су резултати показали да ови лекови у самосталној или комбиновној примени спречавају смањење ејекционе фракције леве коморе (76, 77). Мета-анализа малог броја постојећих клиничких студија је показала да примена β -блокатора смањује ризик за настајање срчане слабости или смањење ејекционе фракције леве коморе током примене антрациклина за 70%, а примена АСЕ инхибитора за 90% (78). Наведене чињенице подржавају становиште да оптимизација хемодинамике и обезбеђивање повољног

неурохормоналног миљеа пре очекиваног оштећења миокарда антрациклинима, бар делимично, ублажавају повреду кардиомиоцита, омогућавајући што раније лечење. Резултати истраживања која потврђују наведено је нестрпљиво очекују, али имајући у виду финансијску доступност и β -блокатора и АСЕ инхибитора, са једне стране, и релативну нешкодљивост, са друге стране, ови лекови су већ уведени у клиничку праксу као кардиопротективни агенси током примене антрациклина.

Са развојем нових антиканцерских агенаса, од употребе антрациклина у терапији карцинома дојке се одустаје, али ипак ови хемотерапеутици остају кључни део терапијских протокола у лечењу лимфома, саркома и тумора код деце, тако да развој нових кардиопротективних метода током њихове примене остаје императив.

1.3.2. Инхибитори рецептора за хумани епидермални фактор раста 2 (HER2) и кардиотоксичност

Трастузумаб је прво моноклонско антитело које је детаљно испитивану у циљу лечења карцинома (79). Овај молекул инхибира пут рецепторске протеинске тирозин-киназе erbB-2 (енгл. *human epidermal growth factor receptor* - HER2), један од четири епидермална фактора раста за које је показано да се експримирају у повећано мери у више врста рака, укључујући приближно 20-25% од карцинома дојке. ErbB-2 такође постоји у срчаним мишићним ћелијама и у присуству неурегулина-1 активира више сигналних путева, укључујући екстрацелуларним сигналом регулисану киназу (енгл. *extracellular signal-regulated kinase* - ERK) $\frac{1}{2}$ - митогеном-активирану протеинску киназу (МАРК) и фосфоинозитид-3-киназу (PI3K)-Akt. Наведени сигнални путеви регулишу кардиопротективне механизме који регулишу апоптозу, хипертрофични раст, митотски раст, елонгацију ћелија, адхезију ћелија-ћелија, ангиогенезу и осетљивост на адренергичке сигнализације (79). Прекид поменутих сигналних путева може бити потенцијално штетан за срце, што је показано на анималним моделима нокаутом гена за erbB-2 који имају кардиомиопатски фенотип (80, 81).

У почетку се није очекивало да трастузумаб изазове срчану дисфункцију. У испитивању које је спроведено код пацијената са метастатским карциномом дојке са који је био erbB-2-позитиван, 27% пацијената је показало одређени степен срчаног оштећења,

укључујући асимптоматско смањење систолне функције леве коморе, а 19% је имало симптоматско испољавање срчане слабости (82). Имајући у виду да је трастузумаб изузетно ефикасан лек у лечењу ербВ-2-позитивног карцинома дојке, облика болести који је претходно имао лошу прогнозом и субоптимални одговор на терапију, наведени поремећаји срчане функције изазвани трастузумабом су изазвали додатну забринутост. Након тога су спроведена су четири велике мултицентричне студије за процену терапијске ефикасности и нежељених ефеката на срце трастузумаба (83). Резултати ових испитивања, узимајући у обзир и клиничко искуство у терапији карцинома у метастатској фази и адјувантној терапији, указују на чињеницу да број нежељених ефеката трастузумаба вазано са срчану функцију није приближан вредностима које су првобитно публиковани (82), већ се налазе у распону у распону од 1 до 4% (83). Међутим, треба имати у виду да су пацијенти који су укључени у ова истраживања претходно прошли комплетна испитивања у циљу дијагностиковања поремећаја срчане функције, и уколико их је било нису укључени у студије, као и да је током извођења студије био обезбеђен комплетан мониторинг функције срца. Поред тога, настали поремећаји у функцији миокарда били су другачији у поређењу са поремећајима изазваних антрациклинима и одговарају другом типу кардиотоксичности (10) (Табела 2).

Табела 2. Кардиотоксичност изазвана хемотерапеутицима тип 1 и тип 2

Тип	Лек који изазива оштећење срца	Механизам оштећења срца	Природа оштећења срца	Налаз на биопсији	Однос доза-оштећење
Тип I	Доксорубицин Даунорубицин Епирубицин Липосомални доксорубицин Митоксантроне	Директно оштећење кардиомиоцита	Трајно оштећење миоцита, почиње са првом дозом лека	Формирање вакуола, поремећај организације миофибрила, некроза	Кумулативни дозно-зависни ефекат
Тип II	Трастузумаб Сунитиниб Иматиниб Лопатиниб	Дисфункција кардиомиоцита	Реверзибилна дисфункција миоцита са повољном прогнозом	Минималне промене, не уочава се ни једна промена наведена у типу 1	Нема дозно-зависног ефекта

Прилагођено из Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(9):547-58.

Анализом промена у срцу изазваних трастузумабом помоћу електронског микроскопа нису уочене промене које постоје код оштећења изазваних антрациклинима или митоксантроном, а промене у систолној функцији срца су биле реверзибилне и врло често

се нису опет јављале при поновној примени агенса који је изазвао промене. Као што је наведено у претходном тексту, реверзибилност промена при примени агенаса који изазивају кардиотоксичност типа 2 указује на чињеницу да не настаје примарно оштећење кардиомиоцита, међутим код појединих пацијената ипак може настати извесан степен некрозе срчаних мишићних ћелија на шта указује повећање концентрације тропонина у плазми (8, 85). Насупрот резултатима студија који потврђују став да се трастузумаб може сигурно примењивати дуги низ година, чак и код пацијената који су искусили и опоравили се од ране контрактилне дисфункције миокарда, ипак постоје докази о изолованим случајевима у којима се опоравак након трастузумаба није догодио (84). Иако је добро позната и прихваћена чињеница да постоје изразите индивидуалне варијације на токсичне ефекте антиканцерогених агенаса међу различитим пацијентима, то је само делимично објашњење енигни које окружују кардиотоксичност трастузумаба. Даље испитивање контрадикторних података који се тичу кардиотоксичних ефеката трастузумаба изводи се анализом обимних података добијених од пацијената који прво примају антрациклинске препарате, а затим примају трастузумаб.

1.3.3. Митоксантрон и кардиотоксичност

Митоксантрон је антрацен-дионски антинепластични препарат који се користи за лечење неких облика леукемије, рефрактарних облика карцинома простате и мултипле склерозе (86). Као и антрациклини, митоксантрон испољава кумулативну кардиотоксичност која је дозно-зависна. Митоксантрон изазива примарну кардиотоксичност, односно кардиотоксичност тип 1 јер изазива директно оштећење кардиомиоцита. На кардиомиоцитима који су изложени деловању митоксантрона уочавају се промене на електронском микроскопу које су сличне онима које се виде при деловању антрациклина (87). У терапијским протоколима који подразумевају митоксантрон потребно је применити ограничење дозе и друге примарне стратегије превенције које се користе за лечење кардиотоксичности изазване антрациклинима. Како и митоксантрон и антрациклини изазивају сличне кардиотоксичне ефекте, прелазак са једног на други лек не пружа заштиту од срчане дисфункције. Слично антрациклинима, при процени срчане

функције пацијената изложених митоксантрону, треба имати на уму да иницијални заштитни механизми могу да одложе настајање оштећења срца.

1.4. Цисплатина и клиничка употреба

Цисплатин (*cis-diamminedichloroplatinum* (II) – CDDP) или цисплатина или цисплатинум, је хемотерапијски лек који је у широкој употреби у оквиру терапијских протокола за лечење великог броја малигних тумора попут: карцинома тестиса, карцинома мокраћне бешике, оваријалних тумора, карцинома дојке, карцинома главе и врата, као и карцинома плућа, као ситноћелијских, тако и крупноћелијских.

Цисплатина је први пут синтетисана 1844. године а за то је заслужан *Michele Peyrone*, а њену хемијску структуру је први пут описао *Alfred Werner* 1893. године (88). Међутим, начна испитивања овог једињења отпочела су тек шездесетих година двадесетог века, при чему је иницијално саопштење о било каквим биолошким ефектима цисплатине дао *Rosenberg* са Универзитета у Мичигену, САД, који је истакао да електролитички производи са платинасте електроде спрачавају размножавање бактерије *Escherichia coli* (89). Наведена чињеница је изазвала велику пажњу и указала на могућност употребе цисплатине као антиканцерског агенса, као и испитивање других координативних комплекса са плементим металима (паладијум, злато) као могућих хемотерапијских супстанци. Значај цисплатине се огледа и у чињеници да је нашао примену у лечењу великог броја малигнитета, нарочито у лечењу карцинома герминативног епитела. Цитотоксични ефекти цисплатине су откривени средином 1960-тих година, а крајем седамдесетих година двадесетог века цисплатина је постала кључни део терапијских протокола за лечење малигнитета репродуктивног система. Наиме, Агениција за храну и лекове Сједињених Америчких Држава (енг. *United States Food and Drug Administration - USFDA* или *FDA*) је званично одобрила примену цисплатине 1978. године (90).

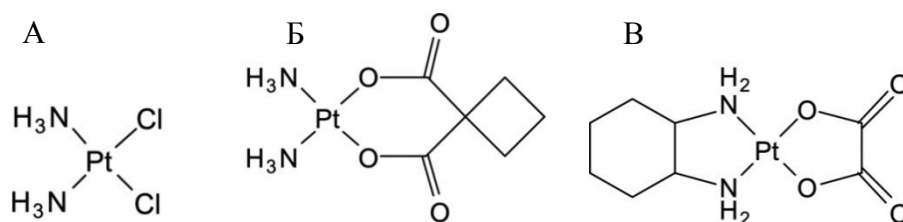
Клинички је доказана оправданост употребе цисплатине у лечењу великог броја малигнитета, укључујући саркоме, неоплазме меких ткива, костију, мишића и крвних судова. Према, наведени малигнитети у скорије време имају нешто бољу прогнозу, услед чега је и степен преживљавања већи а самим тим и опасност по живот, ипак и даље представљају знатан изазов за лечење (91). Такође, имајући у виду тераписка ограничења

у погледу развоја резистенције тумора и постојања нажељених ефеката, комбинована примена цисплатине уз друге хемотерапеутике се указала као терапијска могућност за већи број различитих малигнитета.

Од раних, почетних радова о предклиничким и клиничким испитивањима цисплатине синтетисано је и испитивано неколико хиљада различитих аналога у циљу постизања својстава која би омогућила бољу терапијску примену. Од наведеног броја само 13 аналога је уведено у клиничку фазу истраживања, а само за један од њих (карбаплатин или карбоплатина) показана је извесна предност у односу на цисплатину и ушао је у примену широм света (92, 93). Поред карбоплатине, која је у клиничку употребу уведена 1989. године, једини аналог цисплатине који се користи у клиничкој пракси је још оксалиплатина, која је у клиничку праксу уведена 2002. године (94, 95).

На молекулском нивоу, цисплатина је савршени пример који илуструје како мале промене у структури знатно мењају биолошку активност у циљним ћелијама (96). Цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина садрже јон платине у језгру који је двоструко наелектрисан и окружен са четири лиганда (Слика 1). Са аминским лигандима платина формира јаче везе, док хлоридни лиганди или карбоксилна једињења формирају слабије везе са платином чиме се омогућава везивање платине за молекул ДНК и остваривање биолошког ефекта (96, 88).

Слика 1. Хемијска структура цисплатине (А), карбоплатине (Б) и оксалиплатине (В)



Карбоплатина (*cis diammine (1,1-cyclobutanecarboxylato) platinum* (II)) је хемотерапијски агенс који се користи за лечење карцинома јајника, плућа, главе и врата. У погледу структуре, карбоплатина се разликује од цисплатине јер садржи бидентат дикарбоксилат (CBDCA) лиганд уместо два хлоридна лиганда, који се одвајају у случају цисплатине и омогућавају терапијско деловање (Слика 1). Карбоплатина је мање

реактивна у односу на цисплатину и има спорију кинетику везивања за молекулу ДНК, премда ствара исте производе реакције *in vitro* као и цисплатина при истим примењеним дозама. Резултати појединих истраживања показују да цисплатина и карбоплатина изазивају различите морфолошке промене у MCF-7 ћелијским линијама при испољавању цитотоксичног ефекта (97). Као последица смањене реактивности карбоплатине у односу на цисплатину смањује стварање комплекса карбоплатина-протеини, који се излучују, а смањено излучивање карбоплатине има за последицу дуже задржавање у организму а смањим тим и дуготрајнији ефекат (ретенциони полуживот за карбоплатину износи 30 сати а за цисплатину 1,5 до 3,6 сати). Најзначајнија позитивна страна употребе карбоплатине у односу на цисплатину је мањи број нежељених ефеката, пре свега редуковање нефротоксичности. Главни недостатак карбоплатине је мијелосупресивно дејство, што има за последицу смањење продукције уобличених елемената крви, које некада може да буде драматично, чак само 10% од уобичајене продукције (98).

Са друге стране карбоплатина има мањи терапијски потенцијал у односу на цисплатину. Процењује се да ефикасност карбоплатине, у зависности од малигнитета где се примењује, износи 1/8 до 1/45 ефикасности цисплатине (88). Стабилност карбоплатине има и позитивне и негативне стране, наиме има дуг ретенциони полуживот, али са друге стране 90% примењене карбоплатине се излучи урином (99).

У циљу превазилажења резистенције неоплазми на цисплатину током последњих година развијена су друга једињења која садрже платину и која имају антитуморски потенцијал. Прва генерација ових једињења заснива се на повезивању платине са неким флуоресцентним молекулом, попут цијанина. У последње време тежи се синтези комплекса платине који би садржали флуоресцентне молекуле који се синтетишу у организму. Комплекси платине са жучним киселинама показали су стабилност флуоресцентних особина, а флуоресцентност се задржава и након везивања за олигонуклеотиде или ДНК. Имајући у виду наведену чињеницу омогућено је анализирање начина везивања ових једињења за ДНК молекулу употребом различитих техника којима се детектује флуоресценција. Анализом резултата показано је да иако је циљно место везивања ових једињења једно и ДНК, начин повезивања са ДНК се ипак разликује у односу на цисплатину. У складу са наведеним податком комплекси платине са жучним киселинама испољавају већи цитотоксични потенцијал и способност да превазиђу

цитотоксични потенцијал у више туморских ћелијских линија. Штавише, у поређењу са цисплатином ефекат ових комплекса није стриктно ограничен на ћелије које циркулишу већ делују и на ћелије које су фиксне (100, 101).

Хемотерапија која подразумева комбинацију цисплатине и других антинеопластичних агенаса представља окосницу терапијских протокола великог броја малигнитета. Примарни терапијски одговор на цисплатину постоји код великог броја пацијената, међутим употреба само цисплатине у лечењу представља проблем од пацијената који болују од малигнитета резистентних на цисплатину, па би код оваквих пацијената у случају монотерапије цисплатином брзо настао релапс. Претпостављени механизми који су укључени у развој резистенције тумора на примену цисплатине укључују промене у преузимању цисплатине, као и у излучивању, повећање биотрансформације и детоксикације у јетри, повећање реперативних капацитета ДНК и повећање капацитета антиапоптозских механизма у туморским ћелијама (102). У циљу превазилажења резистенције, цисплатина се комбинује са другим хемотерапеутицима у терапијским протоколима за карциноме јажника, билијарног тракта, плућа, желуца, пљувачних жлезда, дојке, колоне, простате, меланома, панкреаса, сквамозних карцинома мушког репродуктивног система, карцинома који потичу од уротела мокраћне бешике и карцинома грлића материце.

1.4.1. Цисплатина и развој кардиотоксичности

Цисплатина реагује са пуринским базама у ДНК молекулу, везује се ковалентним везама, што представља основу у развоју токсичних ефеката цисплатине (103). Терапија цисплатином се доводи у везу са неколико различитих облика токсичности: нефротоксичност, хепатотоксичност и кардиотоксичност (104, 105). Према се кардиотоксичност углавном не наводи као уобичајени нежељени ефекат примене цисплатине, описано је више различитих поремаћаја срца везано за примену цисплатине попут: промена у ЕКГ запису, аритмија, миокардитиса, кардиомиопатије и конгестивне срчане слабости (103). Механизам настајања кардиотоксичности изазване цисплатином није довољно познат и крије велики број непознаница. Међутим, као кључни механизам за развој токсичности изазване цисплатином поједни аутори издвајају смањење

антиоксидационих капацитета, како ензимских, тако и неензимских, са једне стране, и повећање продукције реактивних врста изазвано применом цисплатине са друге стране (106).

Повећање концентрације лактат деидрогеназе и креатин киназе у плазми током примене цисплатине је последица изласка ових ензима из кардиомиоцита услед липидне пероксидације ћелијске мембране кардиомиоцита изазваних поремећајима у редокс-равнотежи услед примене цисплатине. Дегенерација и некроза срчаних мишићних влакана, уз реакцију фиброзног ткива и вакуолизацију цитоплазме кардиомиоцита и инфилтрацију крвних судова крвљу представљају доминантне карактеристике хистолошког налаза у препаратима срца оштећених цисплатином (107).

Важно је нагласити да континуирани кардиолошки надзор током трајања инфузије цисплатине није уобичајена пракса, као што то јесте случај рецимо током примене антрациклина. Због наведене чињенице извештај број случајева кардиотоксичности изазване цисплатином прође тихо, неприметно због чега изостаје дијагностиковање и пријављивање таквих нежељених ефеката. Штавише, платина може да се детектује у плазми пацијената који су лечени цисплатином и 20 година након завршетка лечења, тако да треба имати на уму и дугорочне ефекте и токсичност који могу да се развију годинама након завршетка терапије (108).

Најчешћа манифестација кардиотоксичности изазване цисплатином је артимија, и то тахикардија, а потом брадикардија, мада се описују и други поремећаји ритма попут вентрикулских аритмија, атријалне фибрилације, синусне брадикардије, блока гране или комплетног AV блока (109-111). У клиничким случајевима везаним за тахикардију изазвану цисплатином, код пацијената је најчешће примењивана комбинација цисплатине и етопозиде (110, 112). Код појединих пацијената тахиаритмија се јављала током првих неколико минута од почетка примене цисплатине у првом циклусу хемотерапије, док се пак, код појединих пацијената јављала другим данима током другог, трећег или шестог циклуса хемотерапије (110, 112). Ни један од пацијената чији су се налази анализирали у истраживањима у којима је праћен ефекат цисплатине на срце није имао претходно срчано обољење, а тахикардија је дијагностикована услед жалби пацијената на бол у грудима, диспнеу и осећај лупања срца, након чега је одрађен ЕКГ налази и измерене вредности електролита у серуму. Током епизода тахиаритмије из сакупљених узорака серума

одређиване су вредности урее, креатинина, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Cl^- , пре чему су поједини аутори навели само смањење концентрације Mg^{2+} до вредности од 1,2 до 1,6 mg/dl, при чему су као физиолошке вредности навели распон од 1,7 до 2,2 mg/dl (113). Ипак, хипомагнеземија је познат нежељени ефекат примене цисплатине (114, 115). Истраживања су показала да хипомагнеземија настаје као последица директног нефротексичног ефекта цисплатине и оштећења механизма реапсорпције Mg^{2+} у дисталним сабирним каналићима, који имају кључну улогу у одржавању физиолошких концентрација Mg^{2+} . Инциденција пацијената који развијају хипомагнеземију током примене цисплатине варира у зависности од дозе и учесталости примене али се наводи да износи од 40% до 100% (115). Клиничке манифестације настале хипомагнеземије подразумевају поремећај у неуромускуларној трансмисији, које узрокују настајање тремора и атаксије, психијатријске поремећаје, што се одражава кроз конфузно стање пацијента и појаву халуцинација, и кардиотоксине манифестације, које се манифестују поремећајима у ЕКГ налазу (промене QT интервала) и аритмијама (115).

II.
ЦИЉЕВИ И
ХИПОТЕЗЕ

Генерални циљ

Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине (CDDP) и диетил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида ((S,S)-Et2-eddch) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могућих механизма добијених ефеката.

Специфични циљеви

1. Испитати улогу различитих параметара оксидационог стреса: азот моноксид (NO мереног у облику нитрита (NO_2^-)), супероксид анјон радикала (O_2^-), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) у насталим променама кардиодинамских параметара срчаног рада и коронарне циркулације.
2. Утврдити хистолошке промене настале услед хроничне примене цисплатине (CDDP) и диетил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида ((S,S)-Et2-eddch) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчаном мишићу.

ХИПОТЕЗА

У поређењу са цисплатином, хронична примена етил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) могу имати мање штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

III.
МАТЕРИЈАЛ И
МЕТОДЕ

3.1. Испитивана популација

У истраживању су коришћени пацови мушког пола *Wistar albino* соја, који су у тренутку укључења у студију били старости осам недеља, просечне телесне масе око 350 g.

Животиње су биле подељене у шест група, од којих су четири (4) експерименталне и две (2) контролне групе. Животиње у експерименталним групама су током четири недеље добијале интраперитонеално по једну дозу (4 mg/kg телесне масе) испитиваног једињења, док су животиње у контролним групама једном недељно добијале једнаку запремину физиолошког раствор или диметил сулфооксида (*DMSO*). Коришћене су две различите контролне групе због употребе различитих растварача (физиолошки раствор и диметил сулфоксид) за добијање адекватног раствора испитиваног једињења погодног за интраперитонеалну употребу.

Експерименталне процедуре коришћене за израду ове студије су у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципима етике. Пре почетка студије експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.2. Експериментални протокол

У тренутку укључења у студију све животиње су биле старе 8 недеља и њих 72 је подељено у шест (6) група по дванаест (12) животиња. Свака од група је праћена и интраперитонеално третирана одговарајућим једињењем (експерименталне групе) односно једним од контролних раствора (контролне групе) током четири недеље. Коришћене су две различите контролне група како би се елиминисао потенцијални утицај растварача, јер су сва испитивана једињења осим цисплатине била растварана у диметил сулфооксиду (*DMSO*), док је цисплатина растварана у физиолошком раствору. Два различита растварача су коришћена како би се постигла оптимална растворљивост и биорасположивост сваког од испитиваних једињења.

Контролне групе:

1. Животиње третиране физиолошким раствором (F)
2. Животиње третиране диметил сулфоксидом (DMSO)

Експерименталне групе:

1. Животиње третиране цисплатином раствореном у физиолошком раствору
2. Животиње третиране О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом раствореном у DMSO-у (L₃)
3. Животиње третиране октаедралним Pt(IV) комплексом са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом раствореним у DMSO-у (PtL₃)
4. Животиње третиране Pd(II) комплексом са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом раствореним у DMSO-у (PdL₃)

Телесна тежина је животињама одређена на почетку експерименталног протокола је животињама и потом сваки пут пре новог апликовања испитиваног једињења. На основу телесне тежине прорачунавана је доза испитиваног једињења која је примењена код сваке од животиња у експерименталним групама током четири недеље. Животиње у контролним групама су третиране једнаким запреминама физиолошког раствора или диметил сулфоксида такође зависно од телесне тежине. Све животиње су примиле укупно четири дозе испитиваног једињења или контролног раствора. Након завршеног третмана животиње су анестезиране и жртвоване како би се спровела анализа функције миокарда и коронарне циркулације употребом *Langendorff*-овог модела за изоловано срце пацова. Уз то животињама је узимана и крв за анализу системског оксидационог стреса и активности ензима антиоксидационе заштите.

3.3. Експериментални модел изолованог срца пацова

Након завршеног хроничног третмана испитиваним једињењима за испитивање функције миокарда и коронарне циркулације коришћен је *Langendorff*-ов модел изолованог срца пацова (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*). Употребом комбинације анестетика кетамин (10 mg/kg) и ксилазин (5 mg/kg) животиње су уведене у

наркозу. Одмах по увођењу у наркозу животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом, отварањем грудног кош и изолована су срца. Изолована срца су одржавана у хомеостазу до постављања на апарат употребом охлађеног физиолошког раствора. Након причвршћивања асцендентне аорте концем за канилу апарата уз даљу препарацију срца омогућено је увођење сензора у леву комору срца (*Transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) како би се пратила функција срчаног мишића током промене перфузионих притисака од 40 cm до 120 cm H₂O и обратно (116). Како би препарат срца могао да функционише у спољној средини неопходна је адекватна исхрана срца која се обезбеђује употребом комплексног *Krebs-Hensenleit* перфузионог раствора. Овај раствор је по саставу сличан екстрацелуларној течности захваљујући томе се обезбеђује несметан рад срца на апарату. По постављању препарата на апарат спровођен је поступак стабилизације при константном перфузионом притиску од 60 cm H₂O. Након завршеног периода стабилизације (измерена три узастопно иста коронарна протока и стабилан срчани рад) испитиван је ауторегуларни ранг коронарне циркулације. Ауторегулаторни ранг се испитивао почевши од коронарног перфузионог притиска од 60 cm H₂O уз постепено повећање за по 20 cm H₂O до максималних 120 cm H₂O, а потом уз постепено смањење коронарног перфузионог притиска до минималних 40 cm H₂O уз још једно постепено повећање коронарног перфузионог притиска за по 20 cm H₂O до максималних 120 cm H₂O. При свакој од поменутих промена перфузионог притиска препарат је стабилизован 5 минута након чега су праћени следећи параметри леве коморе у испитиваним групама: *dp/dt max* – максимална стопа развоја притиска (mmHg/s), *dp/dt min* – минимална стопа развоја притиска (mmHg/s), *SLVP* – систолни притисак (mmHg), *DLVP* – дијастолни притисак (mmHg) и *HR* – фреквенца рада срца (bpm). Током експеримената при сваком перфузионом притиску прикупљан је коронарни венски ефлуент и мерен *CF* – коронарни проток (ml/min).

3.4. Биохемијске анализе

3.4.1. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

У прикупљеном коронарном венском ефлуенту одређивани су следећи биохемијски маркери оксидационог стреса:

1. Индекс липидне пероксидације мерен као TBARS (од енгл.- *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). За одређивање индекса липидне пероксидације користи се индиректна метода која подразумева спектрофотометријско мерење нивоа липидних пероксида насталих у реакцији малонилалдехида са тиобарбитурном киселином у присуству 0.05 М NaOH при температури од 100° С. Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у стаклену епрувету се стави 800 μ l прикупљеног ефлуента или *Krebs-Hensenleit* раствора (за слепу пробу) и 200 μ l 1% раствора тиобарбитурне киселине, након чега су се припремљени узорци петнаест минута инкубирани у воденом купатилу ($t = 100^{\circ}$ С). По завршеној инкубацији узорци су се хладили на собној температури након чега је спроведено мерење на таласној дужини $\lambda=530$ nm (117).
2. Нитрити (NO_2^-) употребом *Griess* реагенса. *Griess*-ов реагенс у реакцији са нитритима доводи до стварања диазо-комплекса карактеристичне љубичасте боје. Како би се омогућило спектрофотометријско мерење концентрације насталих комплекса неопходна је стабилизација насталих комплекса додатком амонијачног пуфера. Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епрувету се стави 1000 μ l прикупљеног ефлуента или *Krebs-Hensenleit* раствора (за слепу пробу), 250 μ l двокомпонентног *Griess*-ов реагенса (1% сулфанилна киселина и 0,1% раствор N-(1-нафтил) етилендиамин дихидрохлорид (*NEDA*)) и 125 μ l амонијачног пуфера. Мерење се спроводи на таласној дужини $\lambda=550$ nm (118).

3. Супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$) употребом нитро тетразолијум плаво хлорида *NBT* (од енгл.- *Nitro Blue Tetrazolium*). У реакцији супероксид анјон радикала и *NBT*-а настаје нитроформазан плави. Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епрувету се стави 50 μ l прикупљеног ефлуента или *Krebs-Hensenleit* раствора (за слепу пробу) и 950 μ l азотом гасиране есејне смеше (50 mM *TRIS*-HCl пуфер, 0,1 mM *EDTA*, 0,1 mg/ml желатин и 0,1 mM *NBT*). За мерење концентрације добијеног комплекса је неопходно понављање спектрофотометријског мерења на 60 секунди уз мешање пластичним штапићем испипетираног узорка до стабилизације екстинције (узастопно измерене две приближно исте екстинције) на таласној дужини $\lambda=530$ nm (119).
4. Водоник пероксид (H_2O_2) употребом фенол црвеног раствора *PRS* (од енгл.- *Phenol Red Solution*) у присуству ензима пероксидаза из коњске ротквице *HRPO* (од енгл.- *Horseshoe Radish Peroxidase*). Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епрувету се стави 200 μ l прикупљеног ефлуента или *Krebs-Hensenleit* раствора (за слепу пробу), 800 μ l *PRS* (140 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 x K_2HPO_4 , 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM *PR*-а) и 10 μ l *ex tempore* припремљеног *HRPO*. Након припреме узорка постојала је инкубација од десет минута на собној температури, након завршене инкубације подешавана је рН на око 12 употребом једномоларног раствора NaOH. Спектрофотометријском методом при таласној дужини $\lambda=610$ nm одређиване су концентрације водоник пероксида у испитиваним узорцима (120).

3.4.2. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса и ензима антиоксидационе заштите у прикупљеним узорцима крви

Непосредно након жртвовања животиња прикупљани су узорци крви за одређивање утицаја примене испитиваних једињења на нивое биохемијских маркера оксидационог стреса и ензима антиоксидационе заштите у системској циркулацији. Из прикупљених узорака крви центрифугирањем се издваја плазма у супернатанту. У узоцима плазме су одређивани нивои прооксидационих молекула (*TBARS*-а, NO_2^- , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) претходно описаним методама. Такође, из прикупљених узорака крви су се центрифугирањем у

талогу издвајали еритроцити, испирањем талога употребом охлађеног физиолошког раствора добијао се лизат еритроцита у којем су одређивани нивои параметара антиоксидационе заштите, као што су:

1. Каталаза (CAT) методом по Aebi (121). Код одређивања активности каталазе пре свега се испитивани лизат еритроцита разблажи дестилованом водом у односу 1:7. Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епрувету се стави 100 μl претходно разблаженог лизата еритроцита, једнака количина етанола, 50 μl САТ пуфера и 1000 μl 10mM водоник пероксида. Мерење активност каталазе се спроводи у секстету на таласној дужини $\lambda = 230 \text{ nm}$, употребом кварцне кивете и спектрофотометра.
2. Супероксид дисмутаза (SOD) епинефринском методом по Beutler-у (122). Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епрувету се стави 100 μl лизата еритроцита и 1000 μl карбонатног пуфера. Припремљени узорак се ставља на вортекс апарат, а потом се у тако измешан узорак додаје 100 μl адреналина. По додавању поменутих реагенаса у одговарајућу количину лизата еритроцита спектрофотометријски се у дупликату врши мерење на таласној дужини $\lambda = 470 \text{ nm}$.
3. Редуковани глутатион (GSH) методом по Beutler-у (123). За одређивање концентрације редукованог глутатиона се користи 5,5-дитио-бис (2-нитробензоева киселина) (DTNB) која се у присуству GSH преводи у 5-тио-бис (2-нитробензоеву киселину) (TNB). Припрема узорка за анализу се спроводила на следећи начин: у епендорфицу се стави 50 μl лизата еритроцита, 200 μl 0,1% EDTA и 385 μl преципитационог пуфера. Тако припремљени узорак се преноси на лед у трајању од 15 минута, након чега преноси на центрифугу (4000 rpm/10 мин). Одваја се 300 μl супернатанта и у њега се додаје 750 μl $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 100 μl DTNB. Тако припремљени узорак се даље инкубира 10 минута на собној температури, а потом се врши спектрофотометријско мерење на таласној дужини $\lambda = 420 \text{ nm}$.

3.4.3. Одређивање липидног статуса пацова

У прикупљеним узорцима плазме одређиван је липидни профил пацова након хроничног третмана испитиваним једињењима који је подразумевао одређивање нивоа: укупног холестерола, триглицерида, LDL (енгл. *Low Density Lipoprotein*) липопротеини мале густине и HDL (енгл. *High Density Lipoprotein*), липопротеини велике густине. Нивои ових молекула су одређивани колориметријски у пласми употребом комерцијално доступних китова (*Salucea Company*, Холандија) (124).

3.4.4. Одређивање биохемијских показатеља функције бубрега пацова

Као биохемијски показатељи функције бубрега коришћени су нивои урее и креатинина:

- Ниво урее је одређен у серуму коришћењем Berthelot методе (125). Овај метод се заснива на употреби ензима уреазе који катализује хидролизу урее до амонијака и угљен диоксида. Тако настали амонијак интерагује са Berthelot реагенсом стварајући једињење плаве боје чији се интензитет одређује колориметријском методом.
- Ниво креатинина је одређен у серуму коришћењем Jaffe методе (126). Овај метод се заснива на употреби пикринске киселине која у базној средини интерагује са креатинином стварајући обојен комплекс чији се интензитет одређује колориметријском методом. За ову анализу коришћен је комерцијално доступан кит (*Pars Azmoon* кит, Техеран, Иран).

3.4.5. Одређивање биохемијских показатеља функције јетре пацова

Као биохемијски показатељи функције бубрега коришћени су нивои албумина и укупних протеина:

- Ниво албумина је одређиван употребом методе коју је описао *Doumas* са сарадницима (127). Ова метода се заснива на употреби рН индикатора бромкрезол зеленог (BCG) који има способност мењања боје од жуте до плаве у зависности од рН средине, односно концентрације албумина. За анализу је потребно 10 μ L узорка и 3 mL BCG реагенса, када се помешају реагенси, садржај се добро промења и

остави на собној температури 5 минута, након тога се врши мерење апсорбанце на таласној дужини $\lambda = 580 \text{ nm}$ (127).

- Ниво укупних протеина је одређиван употребом методе коју је описао Tietz (128). 20 μL узорка се додавало у 1 ml реагенса за одређивање укупних протеина и након 30 минута инкубације на собној температури одређивала се концентрација укупних протеина на таласној дужини $\lambda = 546 \text{ nm}$ (128).

3.5. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата коришћен је статистички програм *SPSS 20.0 for Windows*:

- Параметри од значаја су представљени као средња вредност уз стандардну девијацију.
- Расподела њихове нормалности је испитана употребом *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* теста.
- За тестирање разлика између параметара у различитим тренуцима у оквиру исте групе коришћен је тест за везане узорке (Two Related Samples Test - Wilcoxon тест)
- За тестирање разлика између параметара у различитим групама у истим тренуцима коришћени су тестови за независне узорке: код постојања две групе (Two Independent Samples Test – Mann Whitney тест), код постојања већег броја група (K Independent Samples Test – Kruskal Wallis тест).

IV.

РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину и биохемијске маркере пацова

4.1.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на телесну тежину животиња приказани су у Табели 4.1. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика између измерених вредности телесне тежине током прве и наредних недеља примене испитиваних једињења приказана једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Хронична интраперитонеална примена лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и физиолошког раствора је довела до несметаног раста животиња током експерименталног протокола (Табела 1). Са друге стране, примена свих осталих испитиваних једињења је спречила нормалан прираст у телесној тежини животиња (Табела 4.1). Наиме, примена Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3) и диметил сулфоксида (DMSO) није значјно утицала на промену телесне тежине животиња током четири недеље, док је примена цисплатине и Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL_3) довела до статистички значајног смањења телесне масе животиња.

Табела 4.1. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на телесну тежину животиња

Испитивано једињење	Недеља			
	I	II	III	IV
L_3	360,14 ± 37,55	368,00 ± 18,10	404,57 ± 10,49*	420,43 ± 20,07*
K_3	429,75 ± 16,34	415,50 ± 7,05	433,25 ± 12,92	413,50 ± 3,00
PdL_3	306,13 ± 15,64	278,88 ± 20,88*	260,00 ± 25,85*	254,63 ± 15,05*
DMSO	312,67 ± 23,06	308,67 ± 21,39	310,83 ± 20,18	316,67 ± 17,40
Цисплатина	374,80 ± 47,07	377,20 ± 38,96	353,40 ± 35,23*	331,80 ± 28,81*
Физиолошки раствор	319,17 ± 37,61	343,83 ± 37,84	369,67 ± 34,98*	397,33 ± 28,70*

У табели су приказане масе животиња (g) као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) током четири недеље, колико је трајао експериментални протокол. L_3 - О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат, K_3 - Pt(IV) комплекс са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, PdL_3 - Pd(II) комплекс са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, DMSO - диметил сулфоксид. Стаистички значајне разлике између масе животиња током прве и наредних недеља су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$.

4.1.2. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске маркере пацова

4.1.2.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на липидни статус пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на липидни статус животиња приказани су у Табели 4.2. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика између измерених вредности телесне тежине током прве и наредних недеља примене испитиваних једињења приказана једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Најниже вредности липида забележене су у групи третираној физиолошким раствором, док су највише вредности ових параметара забележене у групи третираној Pt(IV) комплексом са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃). Међутим, није постојала статистички значајна разлика у биохемијским маркерима липидног статуса међу третираним животињама након хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења (Табела 4.2.).

Табела 4.2. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на липидни статус животиња

Испитивано једињење	Укупни холестерол (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Триглицериди (mg/dL)
L₃	123,7±7,45	56,78±3,90	44,81 ± 5,10	86,81±7,94
K₃	126,1±9,01	61,21±4,13	43,14 ± 4,23	93,64±9,18
PdL₃	120,1±8,34	58,04±2,87	39,71 ± 4,52	90,70±9,18
DMSO	115,4±7,12	60,71±3,64	40,02 ±4,05	84,15±8,11
Цисплатина	117,5±6,11	61,39±3,14	42,99 ± 5,02	88,70±7,23
Физиолошки раствор	110±5,77	55,28±2,82	35,99 ± 2,11	81,70±7,60

У табели су приказани биохемијски маркери липидног статуса као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) током четири недеље, колико је трајао експериментални протокол. L₃ - O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат, K₃ - Pt(IV) комплекс са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, PdL₃ - Pd(II) комплекс са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, DMSO - диметил сулфоксид. Статистички значајне разлике између масе животиња током прве и наредних недеља су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$.

4.1.2.2. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције бубрега пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције бубрега животиња приказани су у Табели 4.3. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика између измерених вредности телесне тежине током прве и наредних недеља примене испитиваних једињења приказана једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

Најниже вредности биохемијских показатеља функције бубрега (уреа и креатинина) забележене су у групи третираној физиолошким раствором, док су највише вредности уреа забележене у групи третираној Pt(IV) комплексом са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3), а пак највише вредности креатинина су забележене у групи третираној лигандом O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат (L_3). Међутим, није постојала статистички значајна разлика у биохемијским показатељима функције бубрега (уреа и креатинин) међу третираним животињама након хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења (Табела 4.3).

Табела 4.3. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције бубрега животиња

Испитивано једињење	Уреа (mg/dL)	Креатинин (mg/dL)
L_3	18,6±1,22	0,91±0,17
K_3	22,1±1,41	0,87±0,21
PdL_3	19,7±1,41	0,82±0,15
DMSO	19,1±2,04	0,71±0,11
Цисплатина	21,4±2,83	0,77±0,10
Физиолошки раствор	16,2±1,15	0,65±0,08

У табели су приказани биохемијски показатељи функције бубрега као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) током четири недеље, колико је трајао експериментални протокол. L_3 - O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат, K_3 - Pt(IV) комплекс са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, PdL_3 - Pd(II) комплекс са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, DMSO - диметил сулфоксид. Статистички значајне разлике између масе животиња током прве и наредних недеља су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$.

4.1.2.3. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције јетре пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције јетре животиња приказани су у Табели 4.4. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика између измерених вредности телесне тежине током прве и наредних недеља примене испитиваних једињења приказана једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Најниже вредности биохемијских показатеља функције јетре (укупни протеини и албумини) забележене су у групи третираној физиолошким раствором, док су највише вредности укупних протеина забележене у групи третираној цисплатином, а пак највише вредности албумина су забележене у групи третираној лигандом *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат (L_3). Међутим, није постојала статистички значајна разлика у биохемијским показатељима функције јетре (укупни протеини и албумини) међу третираним животињама након хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења (Табела 4.4).

Табела 4.4. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене испитиваних једињења на биохемијске показатеље функције јетре животиња

Испитивано једињење	Укупни протеини (g/dL)	Албумини (g/dL)
L_3	6,0±0,41	5,1±0,62
K_3	7,1±0,72	4,9±0,60
PdL_3	6,8±0,64	4,4±0,52
DMSO	6,4±1,08	4,8±0,85
Цисплатина	7,2±0,83	5,0±0,71
Физиолошки раствор	5,6±0,72	4,0±0,55

У табели су приказани биохемијски показатељи функције јетре као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) током четири недеље, колико је трајао експериментални протокол. L_3 - *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат, K_3 - $Pt(IV)$ комплекс са *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, PdL_3 - $Pd(II)$ комплекс са *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом, DMSO - диметил сулфоксид. Статистички значајне разлике између масе животиња током прве и наредних недеља су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$.

4.2. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.2.1. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима приказани су у Табели 4.5. и на Графику 1. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

Табела 4.5. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
40	1449,5±161,5	1449,5±161,5	-834,3±129,2	-834,4±129,2	38,1±7,1	38,1±7,1
60	1373,1±193,6	1583,7±245,0	-888,0±155,4	-1051,4±189,5	38,0±6,5	43,6±8,1
80	1505,9±278,0	1741,2±305,3	-1017,5±139,5	-1145,0±140,4	42,7±5,0	47,3±7,0
100	1691,9±232,7	1754,3±235,8	-1082,2±137,6	-1123,3±137,2	46,6±3,8	47,2±6,2
120	1867,3±301,8	1843,0±305,5	-1176,0±222,9	-1187,7±145,2	51,4±8,3	18,3±4,6
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
40	1,9±0,4	1,9±0,4	263,4±22,53	263,4±22,5	7,0±1,0	7,0±1,0
60	1,9±0,4	1,8±0,5	278,6±27,1	273,2±19,8	9,0±0,8	8,7±0,3
80	2,3±0,4	1,7±0,6	283,0±26,2	278,4±27,2	11,0±1,7	11,1±1,3
100	2,7±0,7	1,8±0,6	285,1±35,6	285,0±24,7	13,0±2,1	13,2±2,1
120	2,6±0,9	1,8±0,7	288,8±37,3	288,1±29,3	14,6±3,0	14,7±2,8

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (K) и експерименталним (E) условима. dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

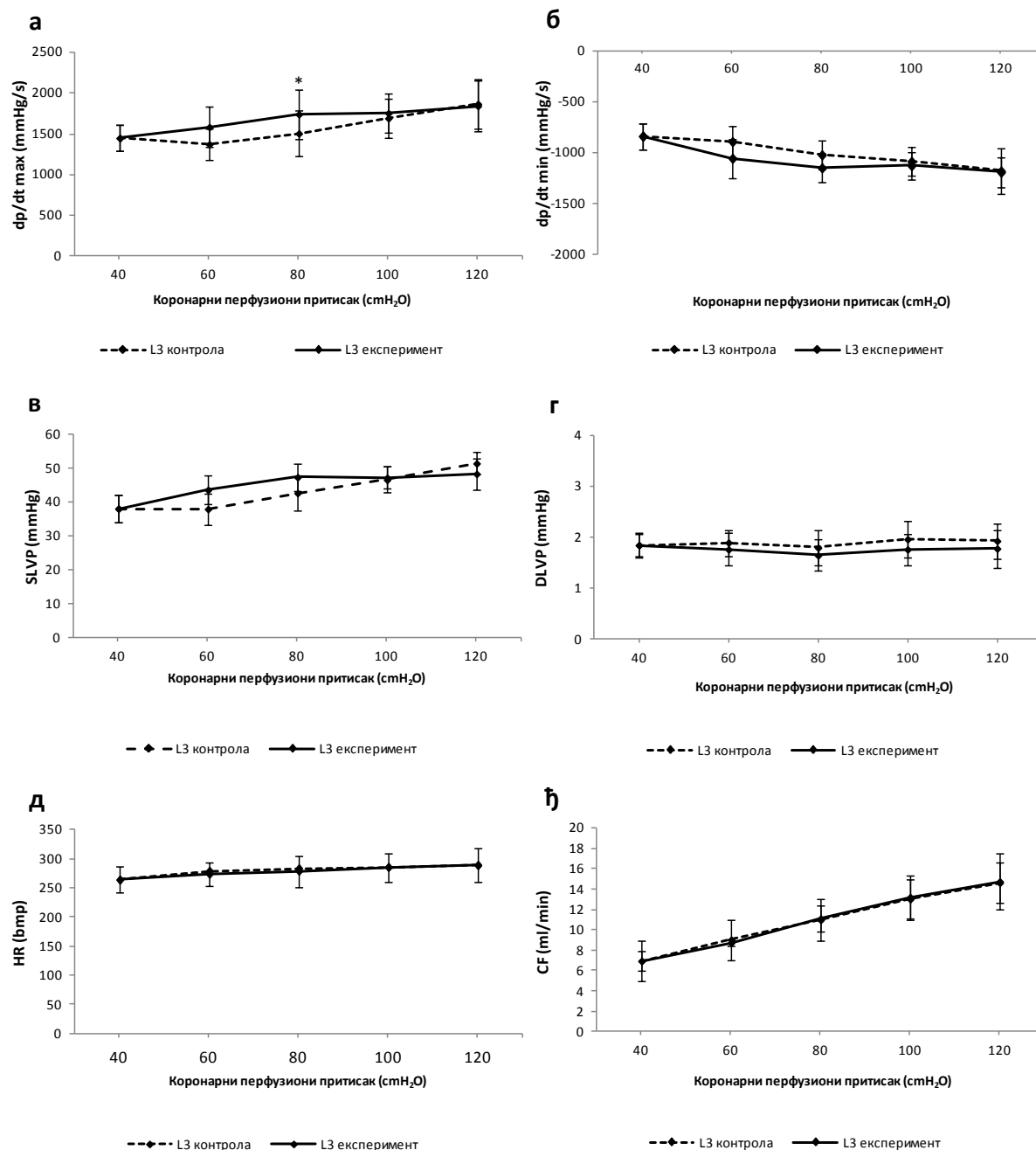


График 1. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF – коронарни проток. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездике (**) уколико је $p < 0,01$

Статистички значајне разлике након хроничне примене О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата између контролних и експерименталних услова су забележене само код максималне стопе промене притиска у левој комори и то у нормоксичним условима (CPP =80 cmH₂O) (График 1а). Остали кардиодинамски параметри као и коронарни проток се нису значајно разликовали након хроничне примене О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата током контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 1 б-ђ).

4.2.1.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L3) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

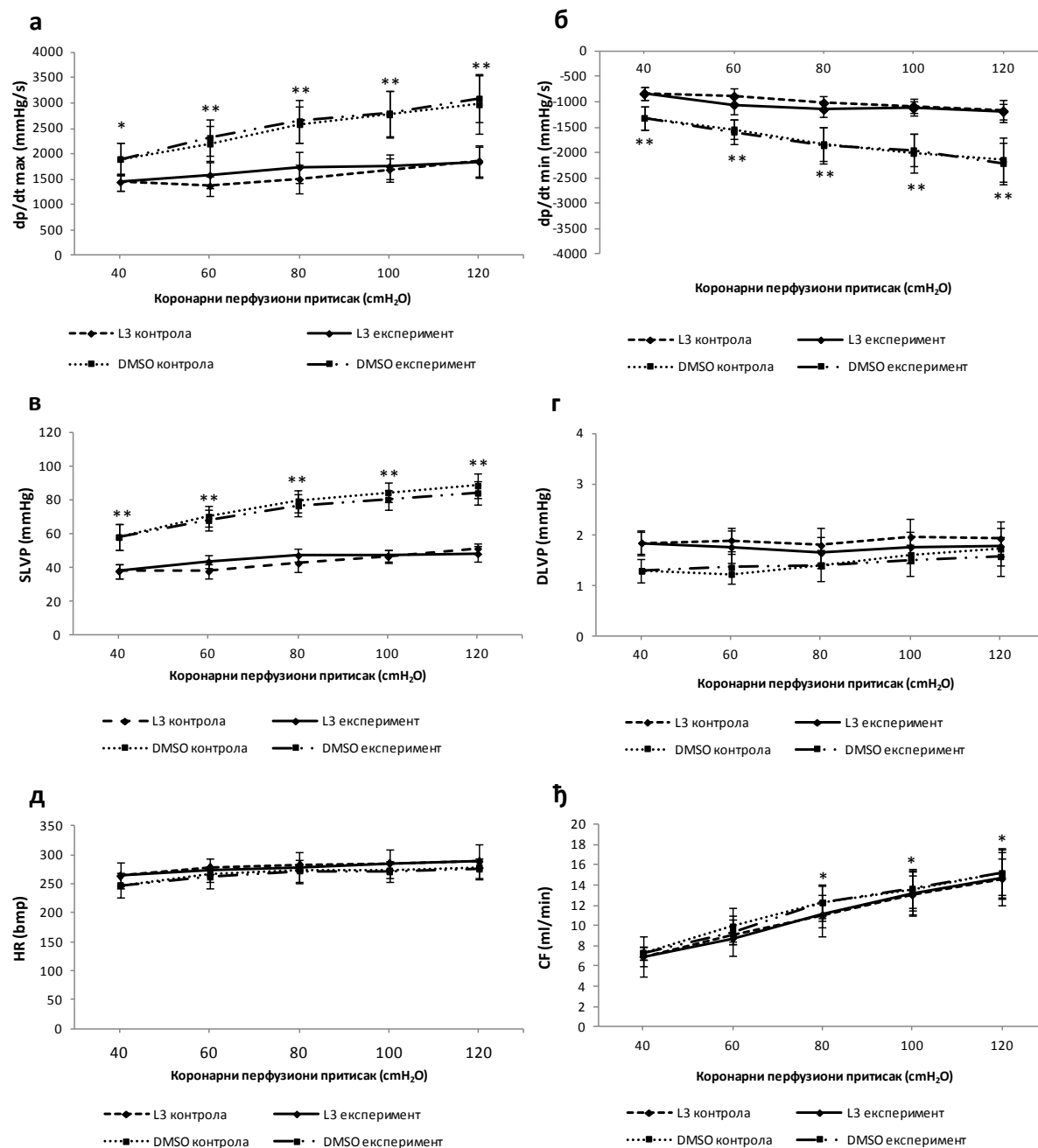


График 2. Поређење ефекта хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) $SLVP$ – систолни притисак, г) $DLVP$ – дијастолни притисак, з) HR – фреквенца рада срца, д) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група у контролним и експерименталним услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.*

Разлике у ефектима након хроничне примене лиганда O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и диметил сулфоксида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова су приказане на Графику 2 а-ђ. Статистички високо значајна разлика између поређених група је постојала при свим коронарним перфузионим притисцима ($CDDP$ 40-120 cmH_2O) код максималне и минималне стопе промене притиска и систолног притиска у левој комори како у контролним тако и у експерименталним условима (График 2а, График 2б, График 2в). Остали кардиодинамски параметри се нису значајно разликовали између поређених група без обзира на промену коронарног перфузионог притиска како у контролним тако и у експерименталним условима (График 2г и График 2д). Вредности коронарног протока су се значајно разликовале између посматраних група при нормоксичним ($CDDP=80$ cmH_2O) и хипероксичним условима ($CDDP$ 100-120 cmH_2O) како у контролним тако и у експерименталним условима (График 2ђ).

4.2.2. Утицај хроничне адиминистрације октахедралног $Pt(IV)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене октахедралног $Pt(IV)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима приказани су у Табели 4.6. и на Графику 3. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Статистички значајне разлике након хроничне примене октахедралног $Pt(IV)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат

дихидрохлоридом између контролних и експерименталних услова су забележене у хипероксичним условима (CPP =100 cmH₂O) код систолног притиска и срчане фреквенце (График 3в и График 3д) и у нормоксичним условима (CPP =80 cmH₂O) код коронарног протока (График 3ђ). Остали кардиодинамски параметри се нису значајно разликовали након хроничне примене октаедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом током контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 3а, График 3б и График 3г).

Табела 4.6. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене октаедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (К₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
40	1478,7±214,3	1478,7±214,3	-967,4±215,0	-967,4±215,0	42,9±7,1	42,9±7,1
60	1806,6±10,0	1888,8±268,7	-1342,4±158,6	-1234,1±263,3	51,5±7,7	50,3±8,6
80	2040,4±75,3	2186,9±215,4	-1426,3±287,8	-1461,2±349,8	56,7±8,5	57,6±9,5
100	2234,0±204,0	2267,5±146,4	-1553,4±324,8	-1497,3±305,1	61,8±10,5	59,2±12,0
120	2395,3±252,7	2381,3±206,6	-1611,0±329,7	-1529,7±309,0	67,6±18,5	62,1±11,8
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
40	2,0±1,2	2,0±1,2	279,2±26,0	279,2±26,0	7,8±1,1	7,8±1,1
60	2,2±1,1	2,1±1,2	308,1±18,5	288,3±19,0	10,5±1,6	10,1±1,2
80	2,4±1,3	2,2±1,2	310,7±17,7	292,2±25,8	12,4±2,2	13,1±2,3
100	2,8±1,3	2,6±1,1	305,1±34,0	302,4±23,3	14,6±2,8	14,6±3,1
120	2,5±1,3	2,6±1,2	298,7±32,0	298,8±23,1	16,9±3,6	16,5±3,0

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

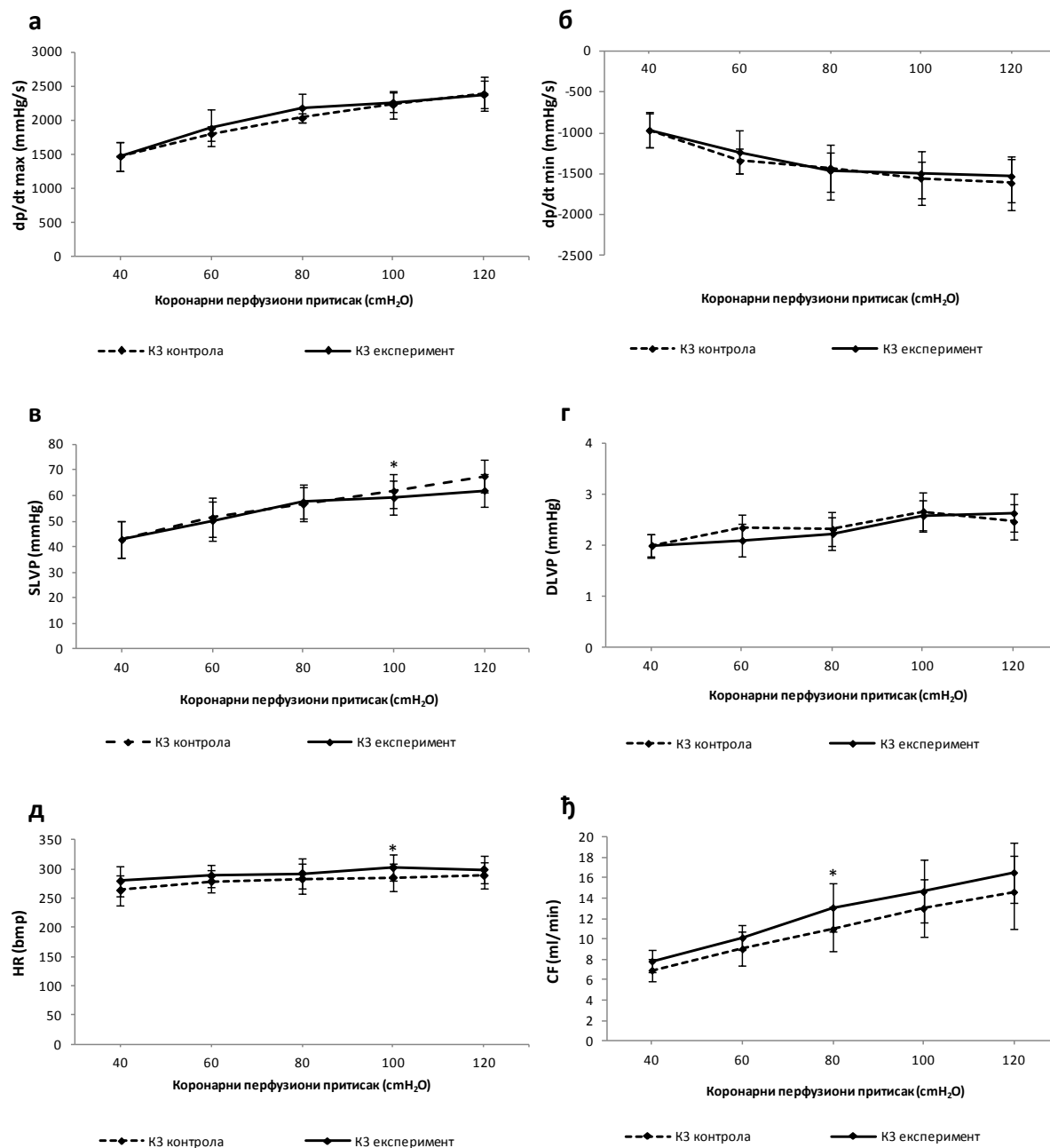


График 3. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлориом (К₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF – коронарни проток. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$

4.2.2.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

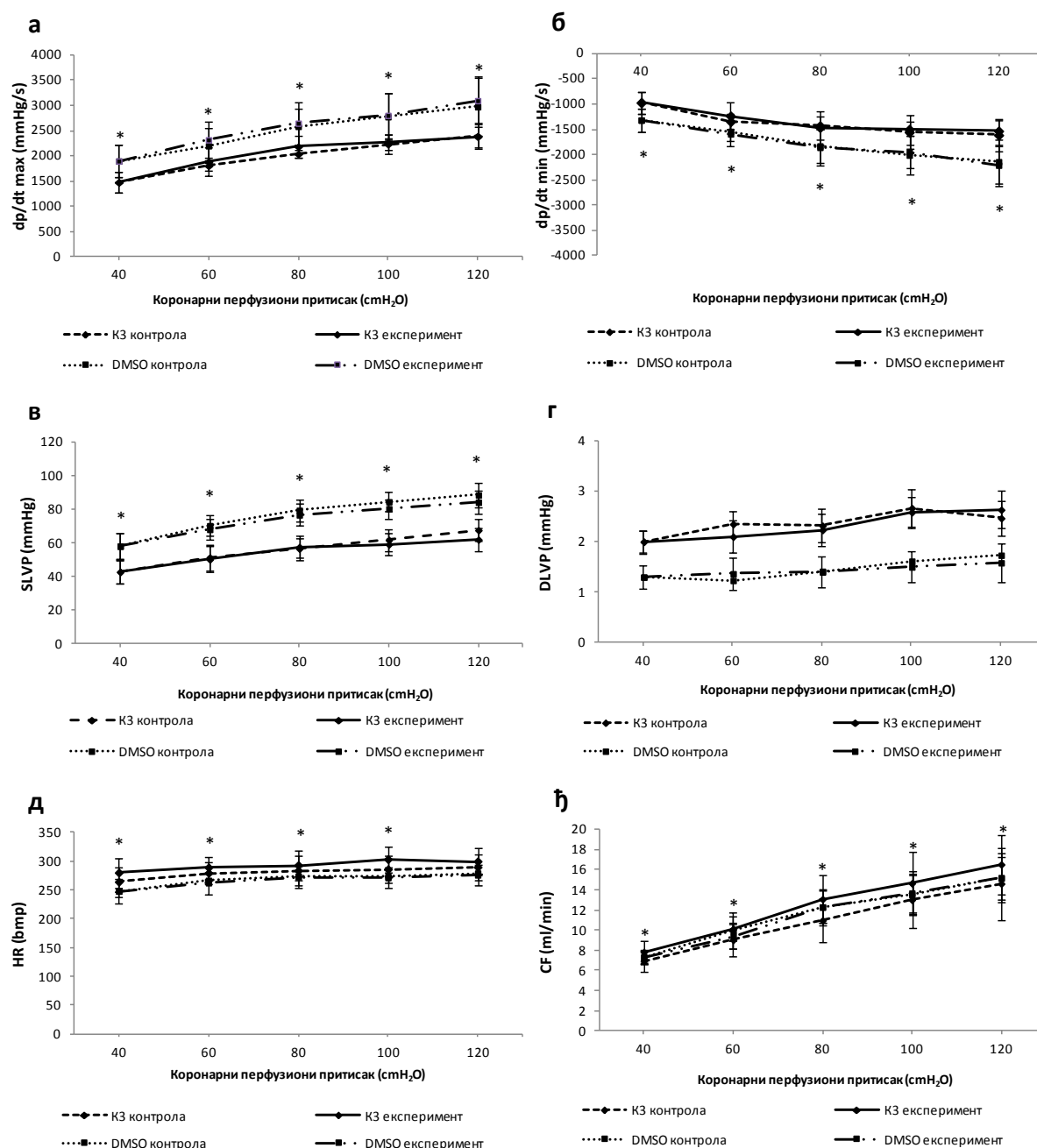


График 4. Поређење ефекта хроничне интраперитонеалне примене октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) $SLVP$ – систолни притисак, г) $DLVP$ – дијастолни притисак, з) HR – фреквенца рада срца, д) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група у контролним и експерименталним услова при различитим перфузионим притисцима су одређене $Kruskal Wallis$ -овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$*

Разлике у ефектима након хроничне примене октахедралног $Pt(IV)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом и диметил сулфоксида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова су приказане на Графику 4. Статистички значајна разлика између поређених група је постојала при свим коронарним перфузионим притисцима ($CDDP$ 40-120 cmH_2O) код максималне и минималне стопе промене притиска (График 4а и График 4б), систолног притиска у левој комори (График 4в) и коронарног протока (График 4ђ) како у контролним тако и у експерименталним условима. Срчана фреквенца се такође значајно разликовала у посматраним групама при готово свим перфузионим притисцима ($CDDP$ 40-100 cmH_2O) (График 4д).

4.2.3. Утицај хроничне адиминистрације $Pd(II)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL_3) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене $Pd(II)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима приказани су у Табели 4.7. и на Графику 5. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Статистички значајне разлике након хроничне примене $Pd(II)$ комплекса са O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом између контролних и експерименталних услова нису забележене без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 5 а-ђ).

Табела 7. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	K	E	K	E	K	E
40	951,3±252,9	951,3±252,9	-688,4±176,3	-688,4±176,3	36,4±9,1	36,4±9,1
60	935,5±257,7	1112,2±275,9	-657,1±183,3	-865,3±223,9	36,4±9,9	42,4±9,3
80	1033,5±168,6	1189,0±324,3	-727,5±148,6	-854,0±292,6	44,9±10,4	42,2±10,5
100	1153,4±252,1	1274,3±316,1	-864,7±198,9	-967,5±265,9	42,8±9,7	46,3±12,0
120	1259,2±336,2	1383,0±272,7	-919,9±230,2	-965,8±258,6	47,2±12,0	48,0±9,0
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	K	E	K	E	K	E
40	1,3±0,9	1,3±0,9	202,1±37,4	202,1±37,4	5,6±0,4	5,6±0,4
60	1,4±0,9	1,3±0,8	230,5±50,6	213,3±34,4	6,7±0,7	7,0±0,6
80	1,2±0,9	1,3±0,8	224,1±40,7	220,2±36,1	7,5±1,1	8,0±0,6
100	1,2±1,0	1,4±0,9	223,8±38,0	218,1±35,1	9,1±1,3	9,3±1,0
120	0,9±0,8	1,3±0,8	221,7±30,2	228,0±33,0	11,5±3,1	10,9±2,0

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (K) и експерименталним (E) условима. dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

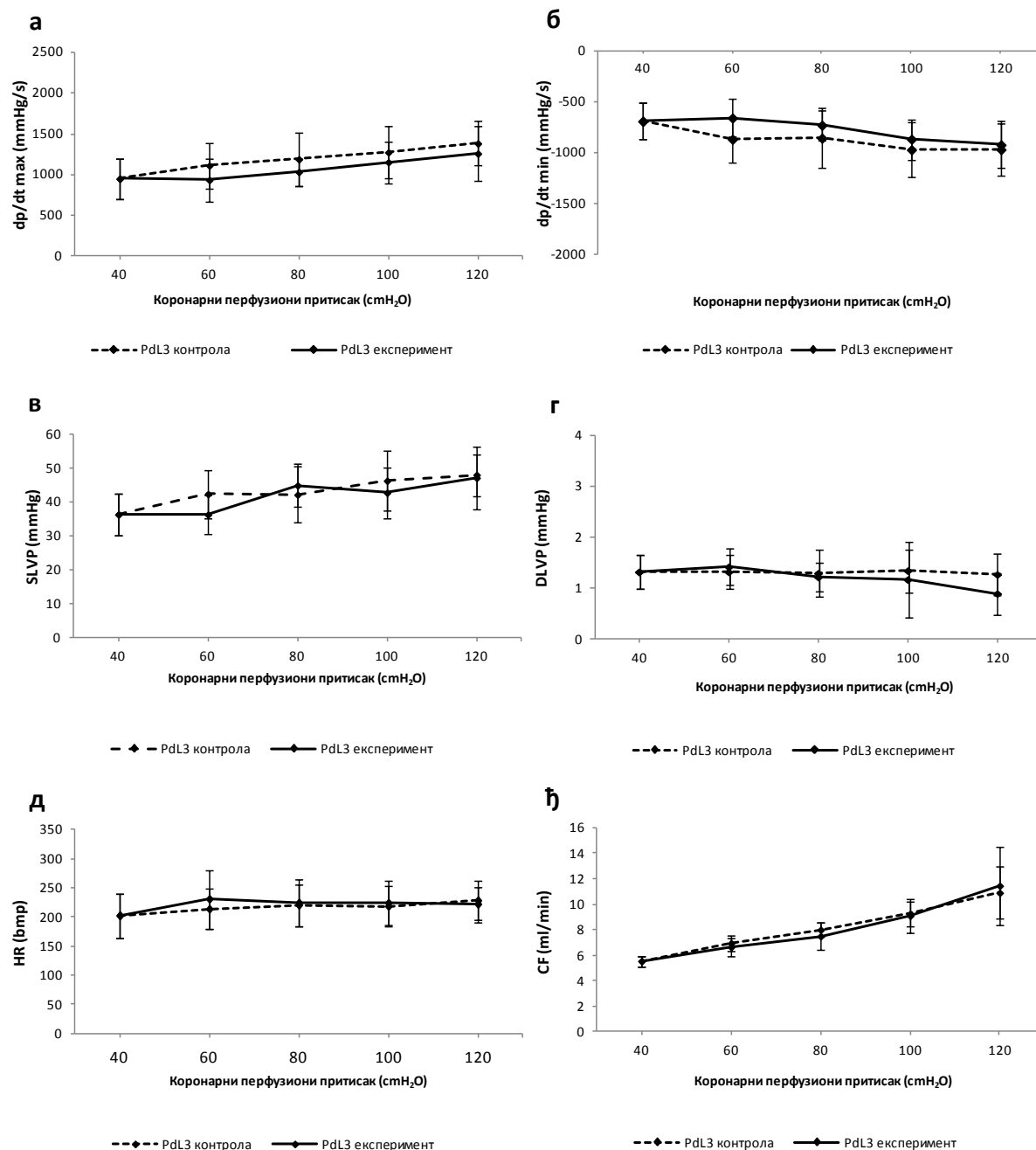


График 5. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF – коронарни проток. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездике (**) уколико је $p < 0,01$

4.2.3.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

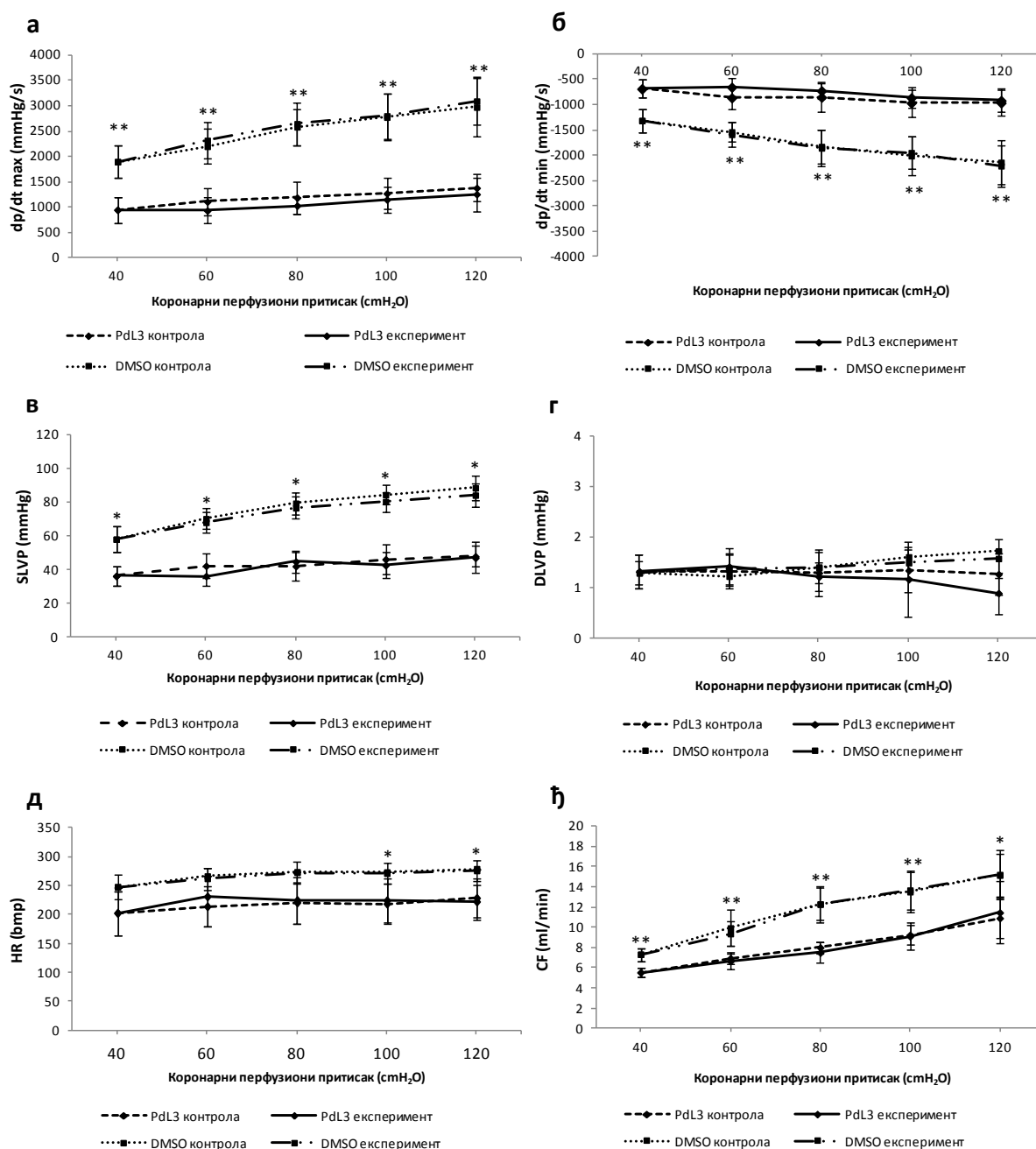


График 6. Поређење ефекта хроничне интраперитонеалне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидро-хлоридом (PdL₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

a) dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, б) dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, з) HR – фреквенца рада срца, д) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група у контролним и експерименталним услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$*

Разлике у ефектима након хроничне примене Pd(II) комплекса са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорид и диметил сулфоксида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова су приказане на Графику 6. Статистички високо значајна разлика између поређених група је постојала при свим коронарним перфузионим притисцима (CDDP 40-120 cmH₂O) код максималне и минималне стопе промене притиска (График 6а и График 6б), и коронарног протока (График 6ђ) како у контролним тако и у експерименталним условима. Са друге стране, значајна разлика је постојала у вредностима систолног притиска у левој комори између посматраних група при свим коронарним перфузионим притисцима (CDDP 40-100 cmH₂O) (График 6в). Док се срчана фреквенца између посматраних група значајно разликовала у хипероксичним условима (CDDP 100-120 cmH₂O) (График 6д).

4.2.4. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Разлике у оствареним ефектима лиганда O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова приказане су на Графику 7. Вредности максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max) су се значајно разликовала између посматраних група (График 7а). Највише вредности овог параметра остварене су у групи третираној са платинским комплексом (K₃), док су најниже вредности остварене у групи третираној паладијумовим комплексом (PdL₃) (График 7а). Вредности dp/dt max су статистички високо значајно биле веће у групи третираној платинским комплексом (K₃) у односу на групе третиране лигандом (L₃) и

паладијумовим комплексом (PdL₃) при готово свим коронарним перфузионим притисцима (CPP =60-120 cmH₂O). Док је вредност dp/dt max статистички значајно била већа у групи третираној лигандом (L₃) у односу на групу третирану паладијумовим комплексом (PdL₃) при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима (CPP =40-120 cmH₂O) (График 7а).

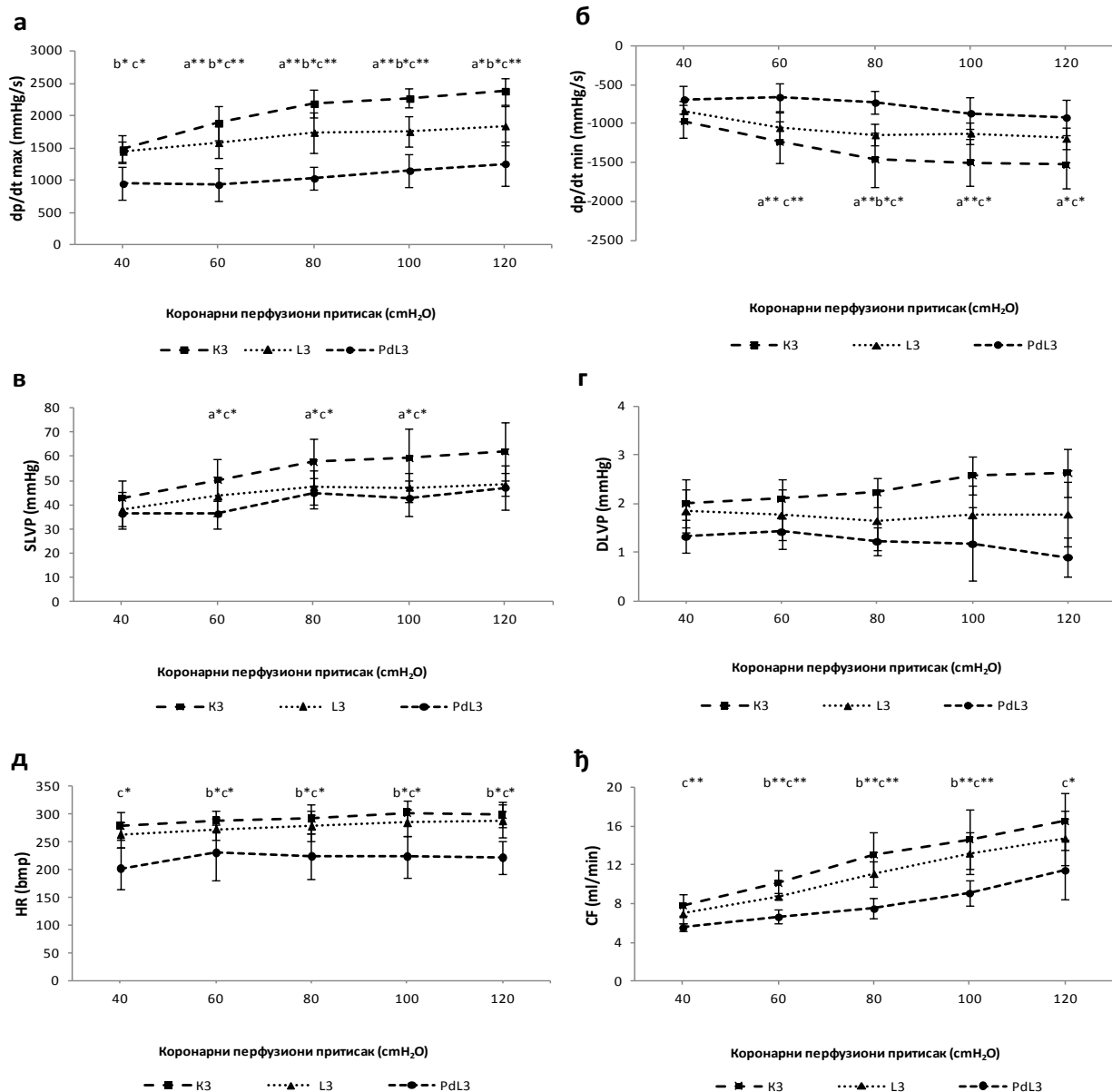


График 7. Поређење ефекта хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

а) dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, б) dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, з) HR – фреквенца рада срца, д) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (***) уколико је $p < 0,01$; а - L_3 vs. K_3 , б - L_3 vs. PdL_3 ; с - K_3 vs. PdL_3 .*

Вредности минималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt min) су биле статистички значајно веће у групи третираној платинским комплексом (K_3) у односу на групе третиране лигандом (L_3) и паладијумовим комплексом (PdL_3) при готово свим коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 60-120$ cmH₂O) (График 7б). Док је вредност dp/dt min статистички значајно била већа у групи третираној лигандом (L_3) у односу на групу третирану паладијумовим комплексом (PdL_3) само у нормоксичним условима ($CPP = 80$ cmH₂O) (График 7б). За разлику од вредности максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, вредности систолног притиска (SLVP) се нису тако значајно разликовале међу посматраним групама (График 7в). Вредности SLVP су биле статистички значајно веће у групи третираној платинским комплексом (K_3) у односу на групе третиране лигандом (L_3) и паладијумовим комплексом (PdL_3) у нормоксичним и благо хипероксичним условима ($CPP = 60-100$ cmH₂O) (График 7в). Вредности SLVP се нису статистички значајно разликовале између групе третиране лигандом (L_3) и групе третиране паладијумовим комплексом (PdL_3) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120$ cmH₂O) (График 7в). Вредности дијастолног притиска (DLVP) се нису статистички значајно разликовале након хроничне примене поменутих једињења без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120$ cmH₂O) (График 7г). Вредности срчане фреквенце (HR) су биле статистички значајно ниже у групи третираној паладијумовим комплексом (PdL_3) у односу на групе третиране лигандом (L_3) и платинским комплексом (K_3) при свим коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120$ cmH₂O) (График 7д). Са друге стране вредности срчане фреквенце (HR) се нису статистички значајно разликовале између групе третиране лигандом (L_3) и групе третиране платинским комплексом (K_3), без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120$ cmH₂O) (График 7д). Вредности коронарног протока су такође биле најниже у групи третираној паладијумовим комплексом (PdL_3). Вредности коронарног протока су у овој групи биле статистички значајно ниже него у групи третираној лигандом (L_3) при готово свим коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 60-100$ cmH₂O) (График 7ђ). Са друге стране вредности

коронарног протока су се статистички значајно разликовале при свим коронарним перфузионим притисцима (CPR =40-120 cmH₂O) између групе третиране платинским (K₃) и групе третиране паладијумовим комплексом (PdL₃) (График 7ђ). Није било статистички значајне разлике у вредностим коронарног протока између групе третиране лигандом (L₃) и групе третиране платинским комплексом (K₃), без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CPR =40-120 cmH₂O) (График 7ђ).

4.3. Утицај хроничне адиминистрације цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима приказани су у Табели 4.8. и на Графику 8. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

Статистички значајне разлике након хроничне примене цисплатине између контролних и експерименталних услова су забележене само код максималне стопе промене притиска у левој комори и то у нормоксичним условима (CPR =80 cmH₂O) (График 8а). Остали кардиодинамски параметри и коронарни проток се нису значајно разликовали након хроничне примене цисплатине током контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 8 б-ђ).

Табела 4.8. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
40	2123,8±436,0	2123,8±436,0	-1263,4±308,2	-1263,4±308,2	57,0±11,5	57,0±11,5
60	2297,9±385,4	2453,1±420,5	-1528,0±493,0	-1546,3±289,5	63,5±9,9	67,1±13,1
80	2652,5±378,6	2922,6±285,6	-1788,0±553,0	-1884,5±231,1	75,6±9,8	75,0±6,5
100	2899,5±440,8	2958,6±483,4	-1904,9±270,8	-2000,5±141,2	80,6±8,3	80,2±4,3
120	2938,7±330,9	2845,8±630,8	-1936,6±306,0	-2258,0±370,6	80,0±6,8	78,1±11,1
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
40	1,0±0,7	1,0±0,7	264,4±40,8	264,4±40,8	6,9±1,2	6,9±1,2
60	1,3±0,9	1,1±0,7	280,9±45,6	268,6±39,2	9,2±1,7	8,7±1,3
80	1,5±0,9	1,2±0,6	282,1±43,4	265,0±47,8	10,4±1,9	10,2±1,8
100	1,7±1,2	1,4±0,5	280,0±21,3	267,0±26,1	12,1±2,3	11,4±2,3
120	1,7±1,0	1,4±0,4	283,6±31,2	261,8±21,9	13,5±2,5	13,2±2,7

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max – максимална стопа развоја притиска, dp/dt min – минимална стопа развоја притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

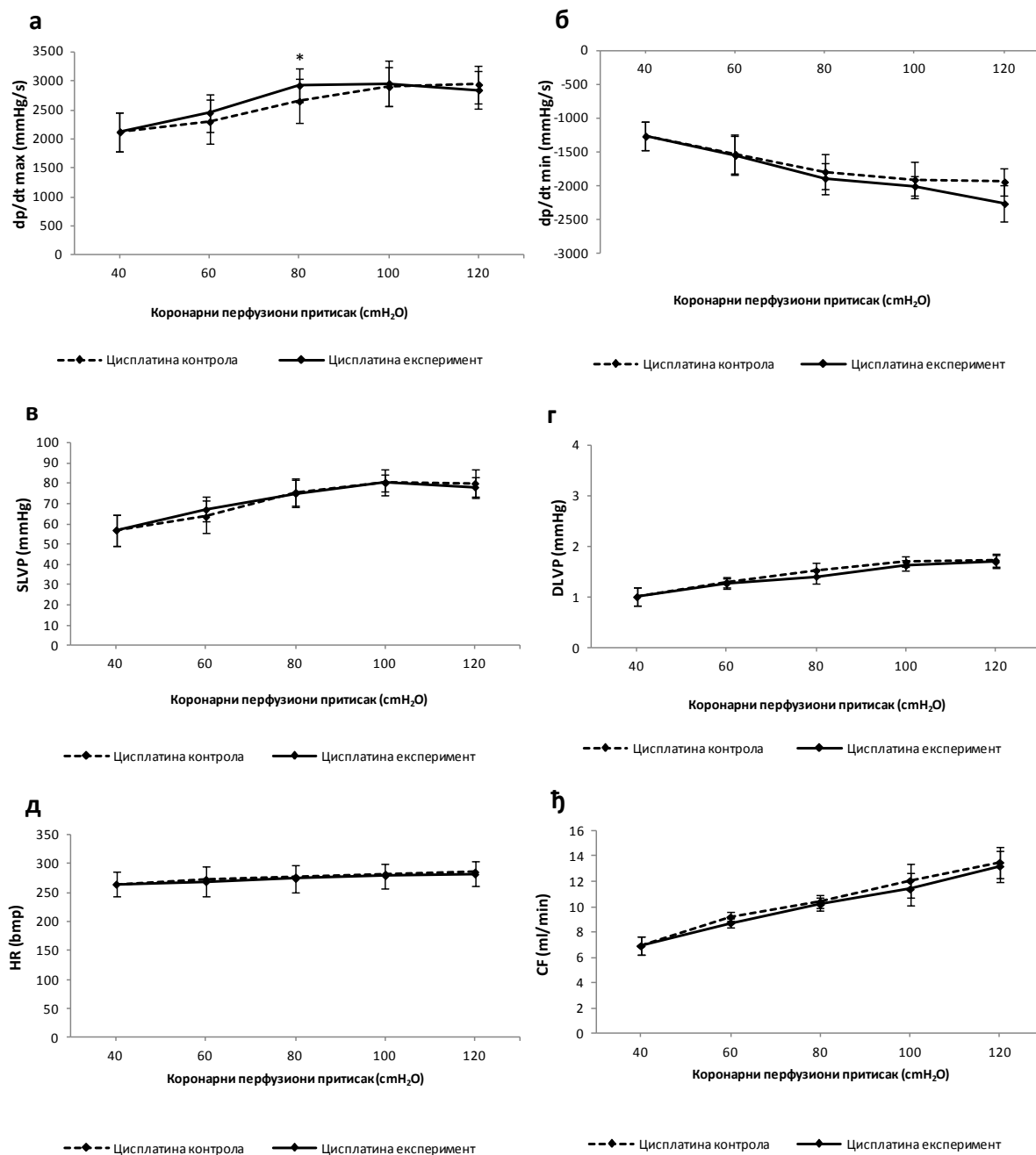


График 8. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$

4.3.1. Поређење ефекта хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

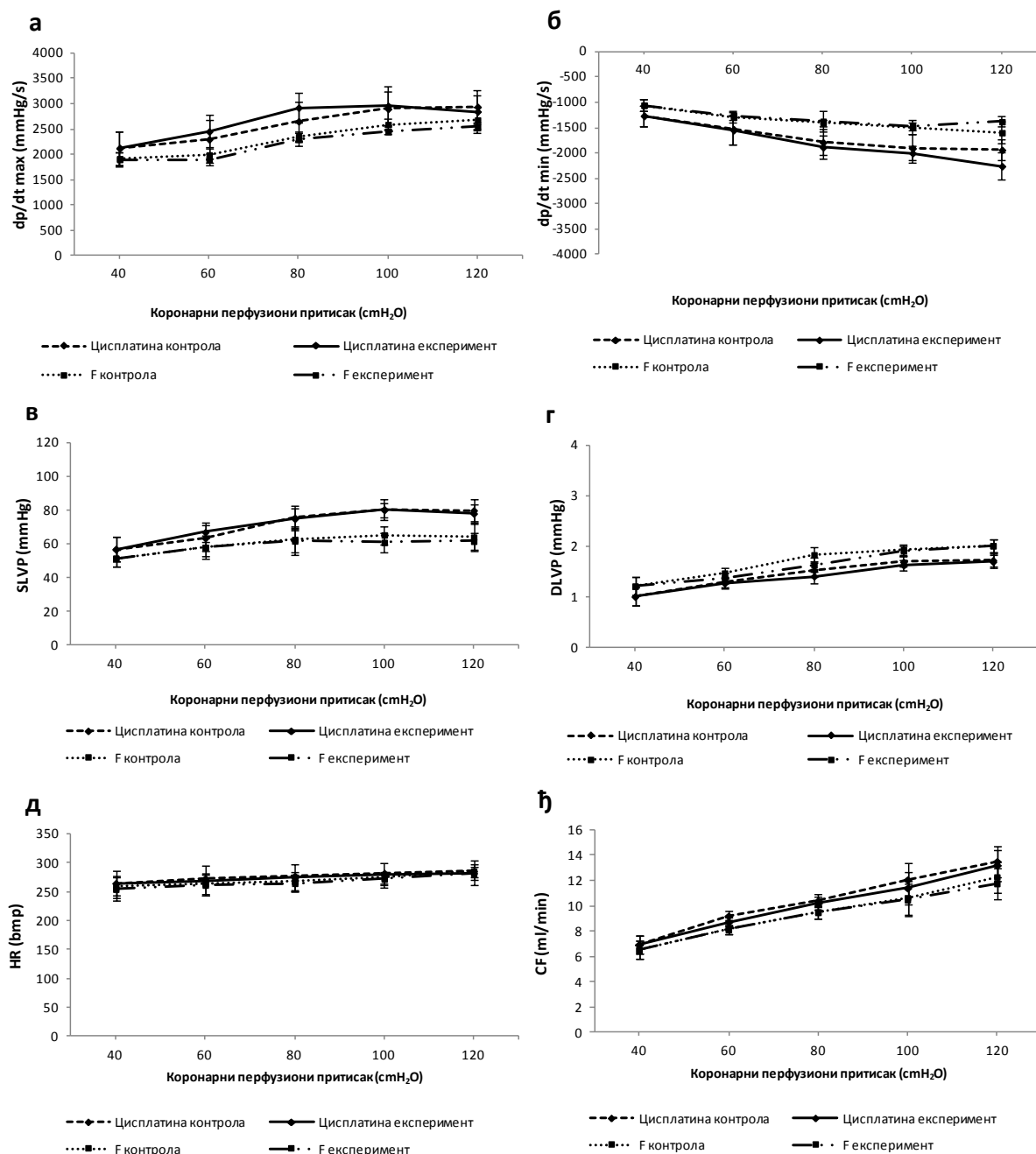


График 9. Поређење ефекта хроничне интраперитонеалне примене цисплатине и физиолошког раствора (F) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF –

коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група у контролним и експерименталним услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Разлике у ефектима након хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова су приказане на Графику 9. Статистички значајна разлика у вредностима кардиодинамских параметара и коронарног протока између поређених група није постојала без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CDDP 40-120 cmH₂O) (График 9 а-ђ).

4.4. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Разлике у оствареним ефектима на кардиодинамске параметре цисплатине, лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова приказане су на Графику 10. Вредности максималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt max) су статистички значајно биле више у групи третираној цисплатином у односу на групе третиране лигандом (L₃), платинским (K₃) и паладијумовим комплексом (PdL₃) при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP =40-120 cmH₂O) (График 10а). Вредности минималне стопе промене притиска у левој комори (dp/dt min) су статистички биле значајно веће у групи третираној цисплатином у односу на групе третиране лигандом (L₃) и паладијумовим комплексом (PdL₃) при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP =40-120 cmH₂O), док су у односу на групу третирану платинским комплексом (K₃) биле при неким коронарним перфузионим притисцима (CPP =60-100 cmH₂O) (График 10б). Систолни притисак (SLVP) је слично као и код претходна два параметра био највиши у групи третираној цисплатином при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP =40-120 cmH₂O) (График 10в). Вредности дијастолног притиска (DLVP) су биле статистички значајно ниже у групи третираној

цисплатином него у групама третираним лигандом (L₃) у хипоксичним условима (CPP =40 cmH₂O) и платинским комплексом (K₃) у нормоксичним и благо хипероксичним условима (CPP = 60 и 100 cmH₂O) (График 10г). Вредности срчане фреквенце (HR) су биле статистички значајно ниже у групи третираној цисплатином него у групи третираној платинским комплексом (K₃) у хипероксичним условима (CPP =120 cmH₂O) (CPP =100-120 cmH₂O) (График 10д).

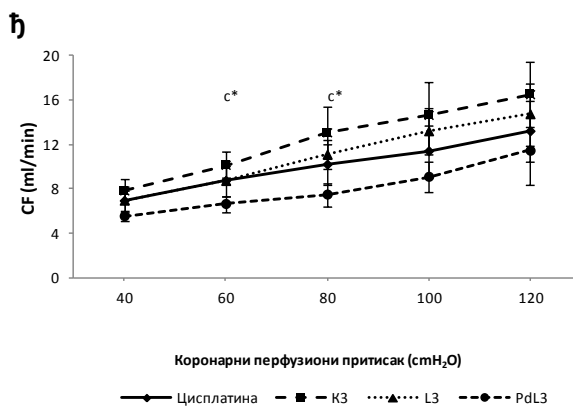
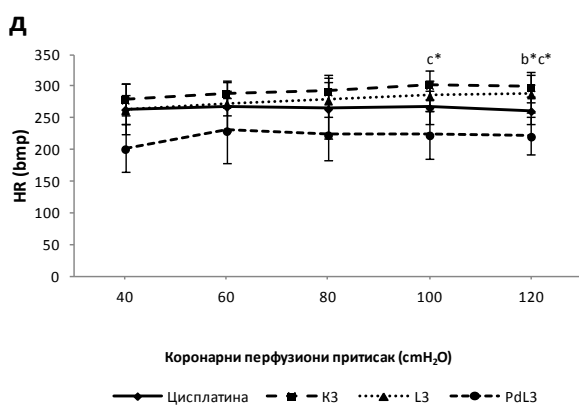
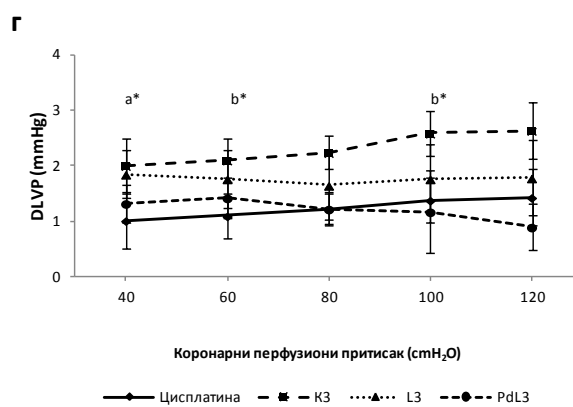
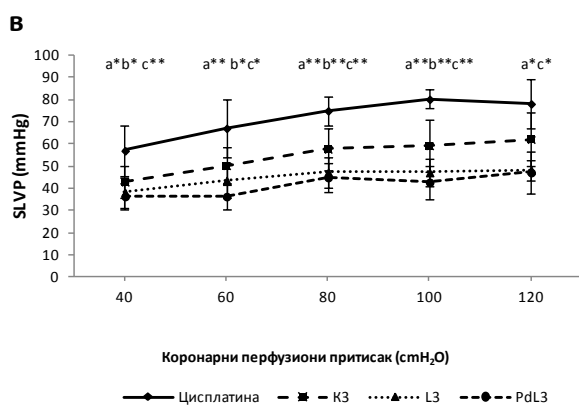
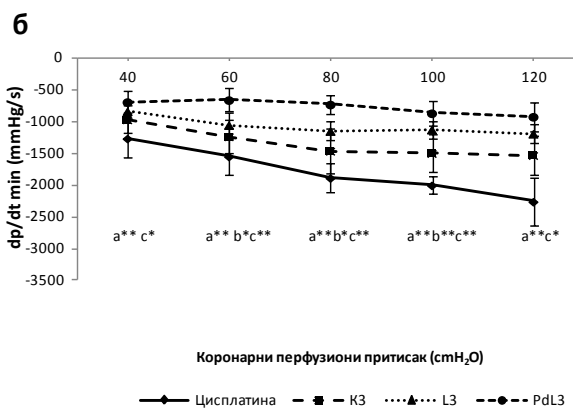
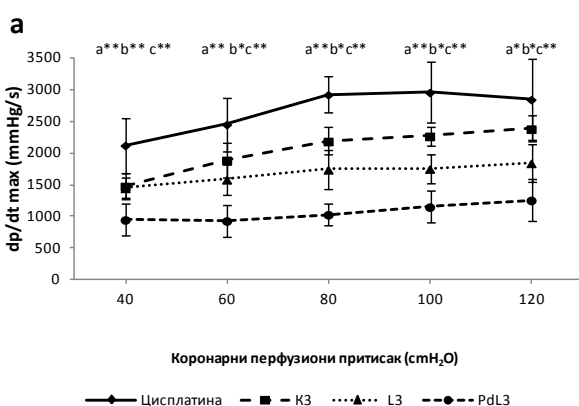


График 10. Поређење ефекта хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3) и двовалентним паладијумом $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) са цисплатином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

а) $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска, б) $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска, в) $SLVP$ – систолни притисак, г) $DLVP$ – дијастолни притисак, з) HR – фреквенца рада срца, д) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$; а – цисплатина vs. L_3 , б – цисплатина vs. K_3 ; с – цисплатина vs. PdL_3 .*

Док су са друге стране вредности HR у групи третираној цисплатином биле статистички значајно више у него у групи третираној паладијумовим комплексом (PdL_3) у хипероксичним условима ($CPP = 100-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 10д). Вредности коронарног протока (CF) су биле статистички значајно веће у групи третираној цисплатином у односу на групу третирану паладијумовим комплексом (PdL_3) у нормоксичним условима ($CPP = 60-80 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 10ђ). Вредности коронарног протока у преостале две групе се нису значајно разликовале од вредности коронарног протока у групи третираној цисплатином без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 10ђ).

4.5. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

4.5.1. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима у ефлуенту приказани су у Табели 4.9. и на Графику 11. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

Статистички значајне разлике након хроничне примене О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата између контролних и експерименталних услова су забележене само код супероксид анјон радикала и то у нормоксичним и иразито хипероксичним условима (CPP =60 и 120 cmH₂O) (График 11а). Вредности осталих параметара оксидационог стреса у ефлуенту се нису значајно разликовали након хроничне примене О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата током контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 11 б-г).

Табела 4.9. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

CPP	O ₂ ⁻ (nmol/min/gwt)		H ₂ O ₂ (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	52,66 ± 20,26	52,66 ± 20,26	25,07 ± 6,76	25,07 ± 6,76
60	24,11 ± 12,87	40,69 ± 14,07	31,81 ± 5,33	33,10 ± 1,97
80	58,08 ± 27,44	52,79 ± 20,54	39,03 ± 6,44	41,20 ± 6,83
100	48,18 ± 16,49	60,16 ± 19,44	46,04 ± 10,60	47,21 ± 6,96
120	42,86 ± 16,45	83,64 ± 29,34	55,65 ± 8,96	54,03 ± 9,36
CPP	NO ₂ ⁻ (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	77,74 ± 20,21	77,74 ± 20,21	7,41 ± 2,27	7,41 ± 2,27
60	107,72 ± 8,06	107,73 ± 16,61	11,30 ± 3,75	10,54 ± 3,87
80	132,02 ± 17,31	133,23 ± 17,13	13,41 ± 3,38	13,28 ± 3,57
100	154,78 ± 20,42	155,48 ± 24,80	13,87 ± 2,94	16,35 ± 2,26
120	162,41 ± 21,60	178,58 ± 29,06	15,92 ± 5,21	14,95 ± 3,93

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O₂⁻ - супероксид анјон радикал, H₂O₂ - водоник пероксид, NO₂⁻ - нитрити, TBARS – индекс липидне пероксидације.

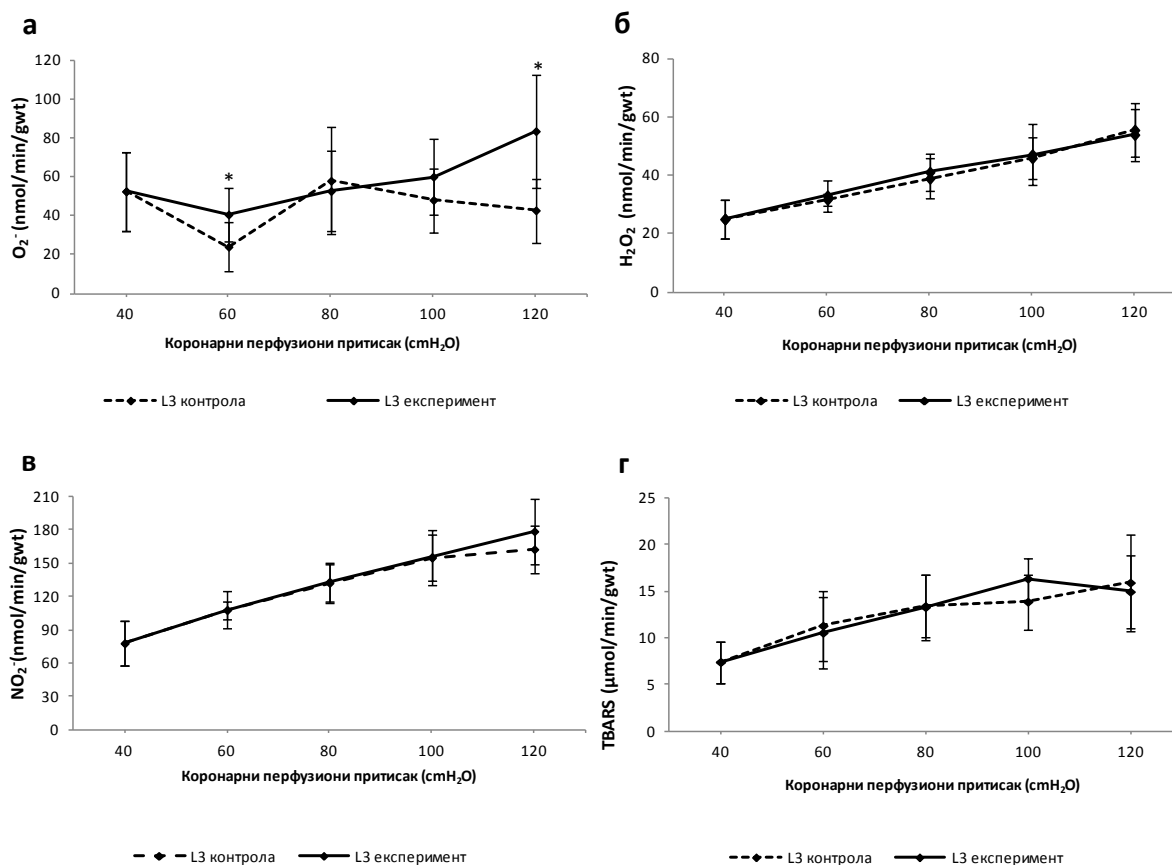


График 11. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$

4.5.1.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и диметил сулфооксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у ефектима након хроничне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и диметил сулфооксида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту су приказане на Графику 12 а-г.

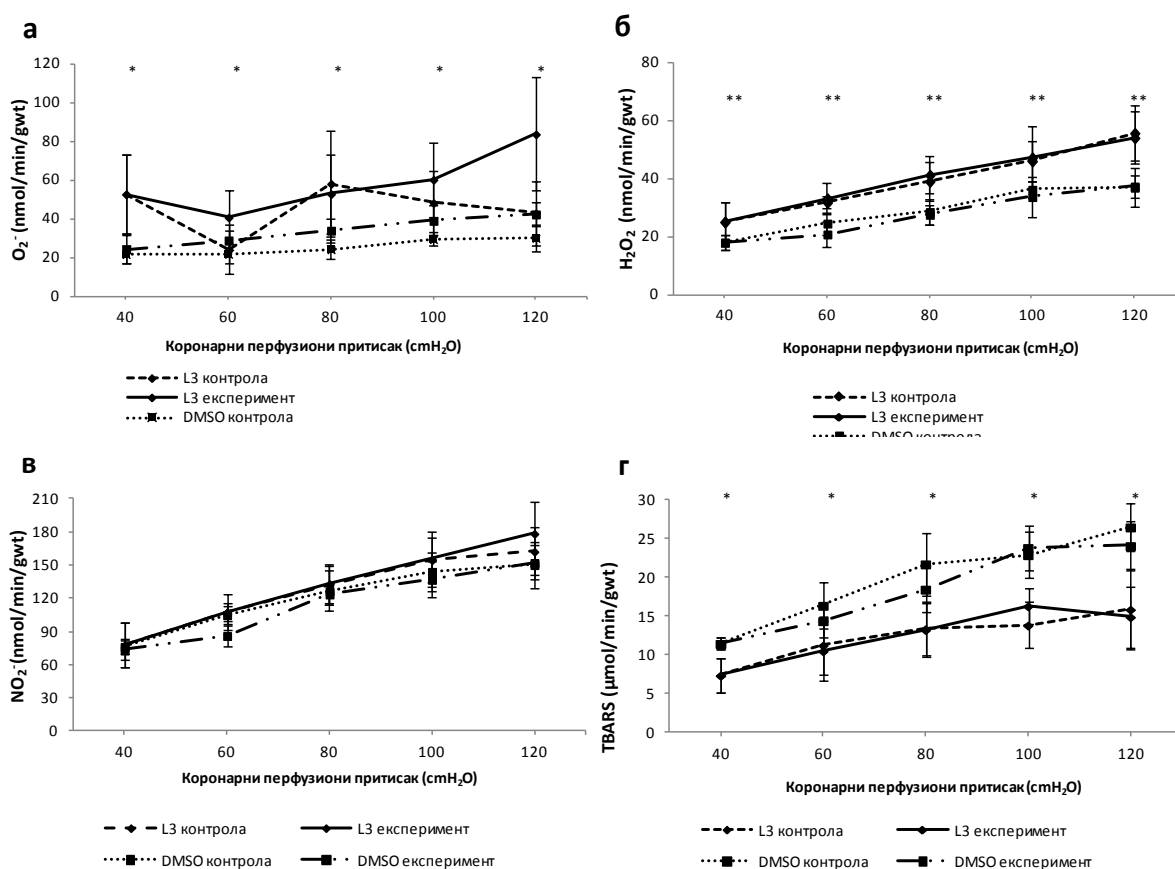


График 12. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и диметил сулфооксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O₂⁻ - супероксид ањон радикал, б) H₂O₂ - водоник пероксид, в) NO₂⁻ - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је p < 0,05, односно са две звездице (**) уколико је p < 0,01

Хронична примена лиганда (L₃) је довела до статистички значајно веће продукције супероксид ањон радикала у односу на DMSO при свим коронарним перфузионим

притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) у експерименталним условима (График 12а). Уз то, хронична примена лиганда (L₃) је довела до статистички високо значајно повећане продукције водоник пероксида у односу на DMSO при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) и то како у експерименталним тако и у контролним условима (График 12б). Насупрот томе, DMSO је довео до статистички значајно већих вредности индекса липидне пероксидације у односу на лиганд (L₃) при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 12г). Није било значајне разлике у продукцији нитрита међу посматраним групама без обзира на промену коронарнарног перфузионог притиска (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 12в).

4.5.2. Утицај хроничне адиминистрације октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима у ефлуенту приказани су у Табели 4.10. и на Графику 13. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију (X±SD), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је p<0,05, односно са две звездице (**) уколико је p<0,01.

Табела 4.10. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

CPP	O ₂ ^{•-} (nmol/min/gwt)		H ₂ O ₂ (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	65,00 ± 20,20	65,00 ± 20,20	27,74 ± 5,71	27,74 ± 5,71
60	32,97 ± 8,68	34,01 ± 10,31	38,31 ± 6,85	36,65 ± 4,96
80	51,77 ± 9,05	45,80 ± 17,63	46,60 ± 9,56	45,11 ± 7,16
100	63,03 ± 18,17	54,61 ± 12,63	55,27 ± 7,85	53,67 ± 10,07
120	50,85 ± 21,47	66,75 ± 18,66	63,96 ± 11,77	62,16 ± 9,41
CPP	NO ₂ ⁻ (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	

	К	Е	К	Е
40	94,99 ± 6,93	94,99 ± 6,93	8,65 ± 2,08	8,65 ± 2,08
60	120,46 ± 11,81	119,69 ± 7,42	11,95 ± 2,39	11,34 ± 3,40
80	141,10 ± 20,61	154,44 ± 15,90	12,38 ± 2,47	14,80 ± 3,43
100	179,24 ± 22,78	169,04 ± 17,27	15,12 ± 2,27	16,84 ± 3,25
120	204,15 ± 25,58	187,34 ± 17,07	18,87 ± 2,55	19,40 ± 3,27

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O_2^- - супероксид анијон радикал, H_2O_2 - водоник пероксид, NO_2^- - нитрити, TBARS – индекс липидне пероксидације.

Нису постојале статистички значајне разлике у вредностима испитиваних параметара оксидационог стреса након хроничне примене октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (К₃) између контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CPP = 40-120 cmH₂O) (График а-г).

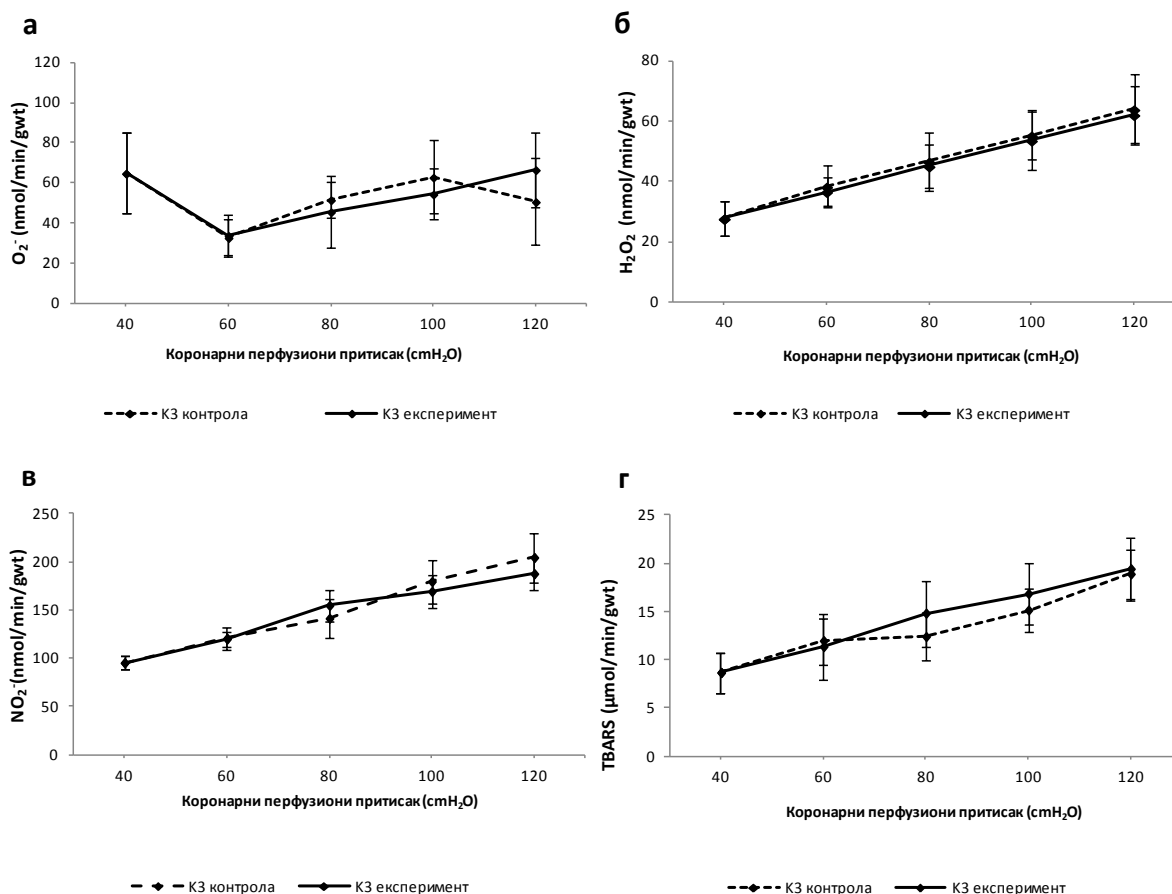


График 13. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анион радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$*

4.5.2.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације октаедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3) и диметил сулфоксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у ефектима након хроничне примене октаедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3) и диметил сулфоксида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту су приказане на Графику 14 а-г. Хронична примена платинског комплекса (K_3) је довела до статистички значајно веће продукције супероксид анион радикала у хипоксичним и хипероксичним условима (CPP = 40-60 и 100-120 cmH₂O) у односу на DMSO и то посебно у контролним условима (График 14а). Уз то, хронична примена платинског комплекса (K_3) је довела до статистички високо значајно повећане продукције водоник пероксида у односу на DMSO при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) и то како у експерименталним тако и у контролним условима (График 14б). Такође, хронична примена платинског комплекса (K_3) је довела до статистички значајно повећане продукције нитрита у односу на DMSO при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) нарочито у експерименталним условима (График 14в). Насупрот томе, DMSO је довео до статистички значајно већих вредности индекса липидне пероксидације у односу на платинског комплекса (K_3) при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) нарочито у контролним условима (График 14г).

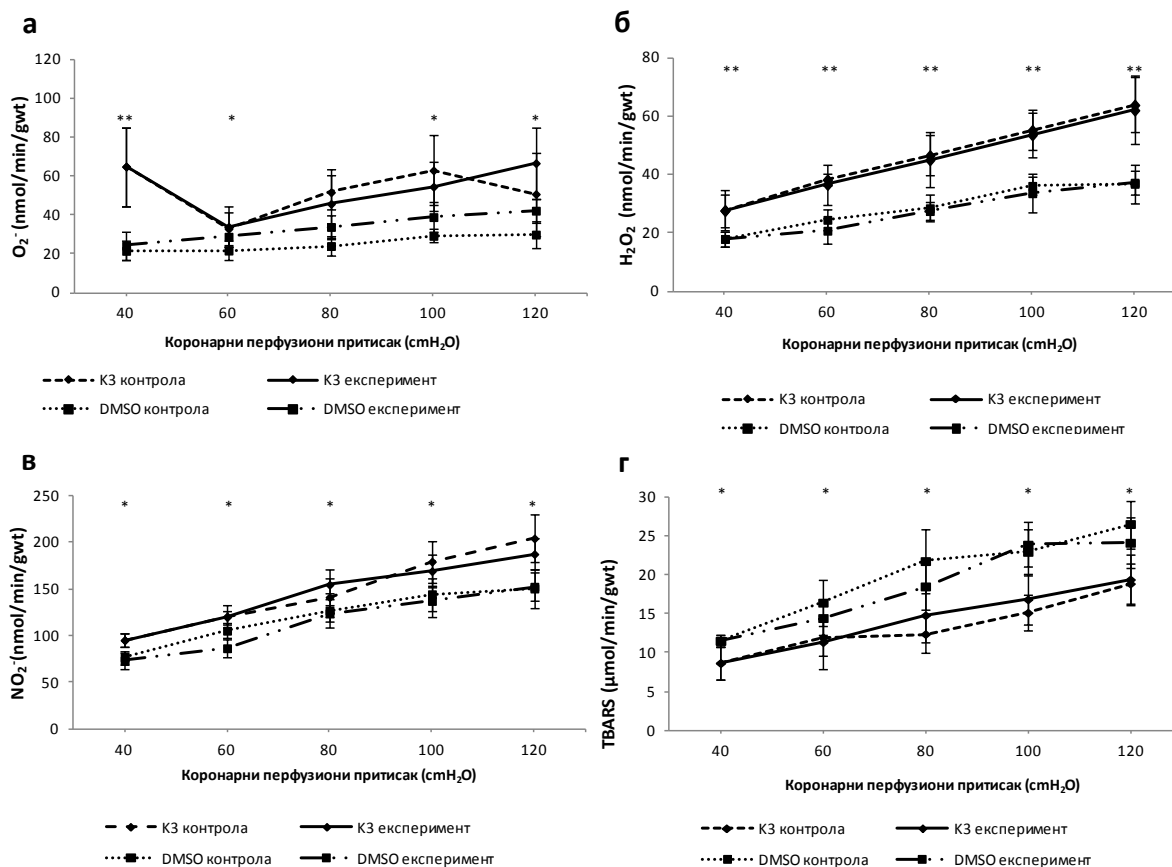


График 14. Поређење ефеката хроничне адиминистрације октахедралног Pt(IV) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлунту

а) O_2^- - супероксид анион радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездичом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездиче (**) уколико је $p < 0,01$

4.5.3. Утицај хроничне адиминистрације Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Ефекти хроничне интраперитонеалне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима у ефлуенту приказани су у Табели 4.11. и на Графику 15. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Табела 4.11. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

CPP	O ₂ ⁻ (nmol/min/gwt)		H ₂ O ₂ (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	14,05 ± 5,39	14,05 ± 5,39	16,92 ± 1,57	16,92 ± 1,57
60	20,38 ± 10,91	15,48 ± 4,12	20,53 ± 3,29	21,36 ± 1,14
80	27,75 ± 9,32	16,92 ± 7,58	23,48 ± 5,18	26,50 ± 4,47
100	24,75 ± 9,80	28,58 ± 8,15	28,64 ± 7,51	29,73 ± 7,10
120	37,23 ± 9,80	35,22 ± 7,82	35,76 ± 7,47	34,29 ± 5,88
CPP	NO ₂ ⁻ (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	71,72 ± 7,64	71,72 ± 7,64	12,99 ± 2,21	12,99 ± 2,21
60	90,65 ± 8,26	93,99 ± 9,60	17,65 ± 3,18	16,64 ± 3,15
80	108,11 ± 20,21	116,11 ± 23,06	19,78 ± 6,19	20,73 ± 3,95
100	133,48 ± 26,13	130,32 ± 21,91	22,81 ± 5,16	22,08 ± 2,24
120	162,96 ± 20,52	157,41 ± 22,26	29,58 ± 7,50	23,59 ± 4,56

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O₂⁻ - супероксид анион радикал, H₂O₂ - водоник пероксид, NO₂⁻ - нитрити, TBARS – индекс липидне пероксидације.

Нису постојале статистички значајне разлике у вредностима испитиваних параметара оксидационог стреса након хроничне примене Pd(II) комплекса са О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) између контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 15 а-г).

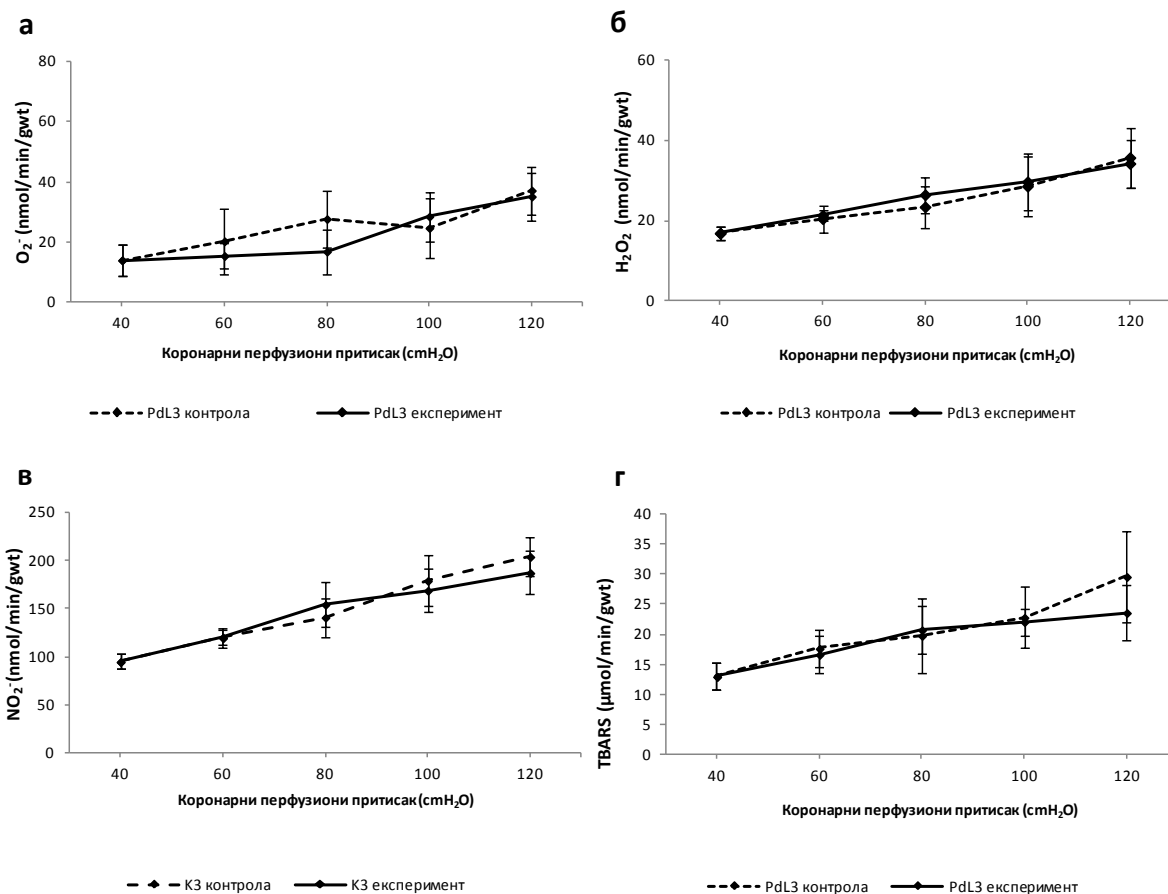


График 15. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O₂⁻ - супероксид анион радикал, б) H₂O₂ - водоник пероксид, в) NO₂⁻ - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездике (**) уколико је $p < 0,01$

4.5.3.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације Pd(II) комплекса са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) и диметил сулфооксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у ефектима након хроничне примене Pd(II) комплекса са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL₃) и диметил сулфооксида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту су приказане на Графику 16 а-г. Хронична примена паладијумског комплекса (PdL₃) је

довела до статистички значајно веће продукције супероксид анјон радикала при свим коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) у односу на DMSO и то посебно у експерименталним условима (График 16а). Није постојала статистички значајна разлика у продукцији осталих параметара оксидационог стреса без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) међу посматраним групама (График 16 б-г).

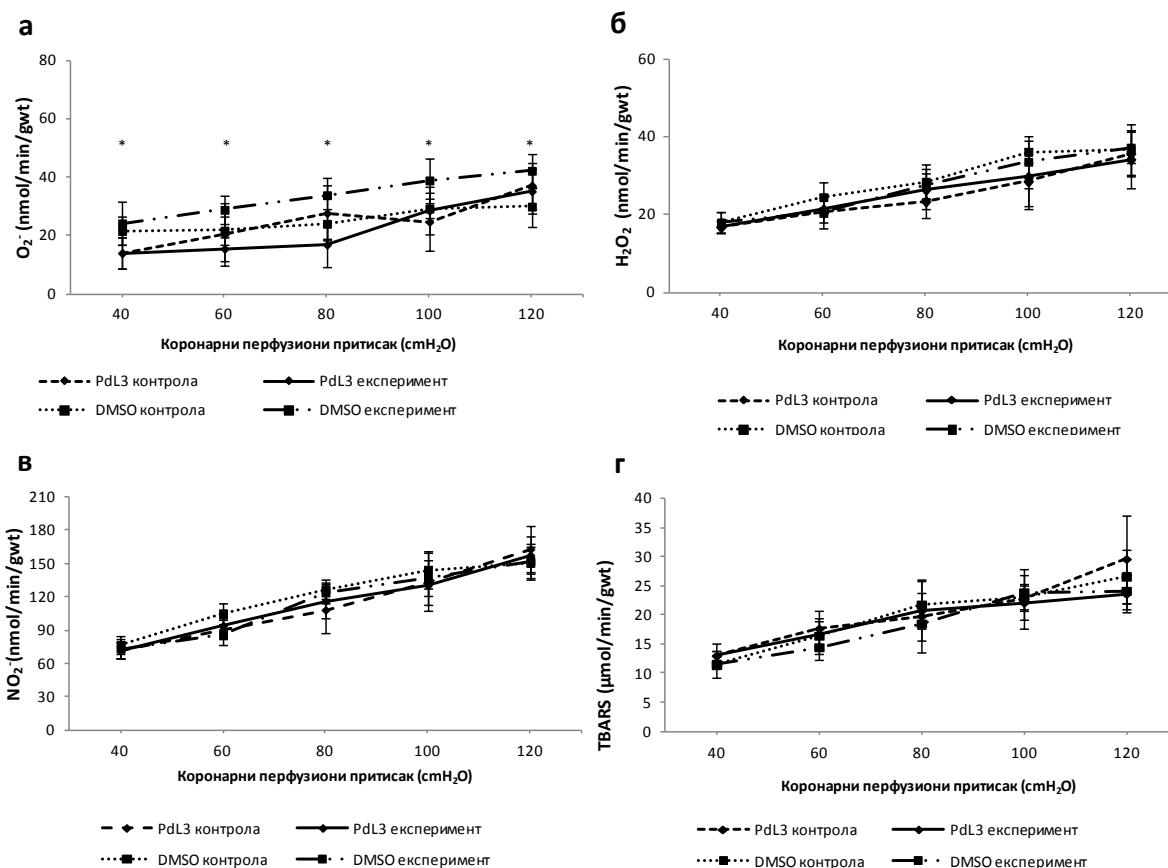


График 16. Поређење ефеката хроничне адиминистрације октахедралног Pt(IV) комплекса са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K₃) и диметил сулфоксида (DMSO) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$

4.5.4. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у оствареним ефектима лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту приказане су на Графику 17.

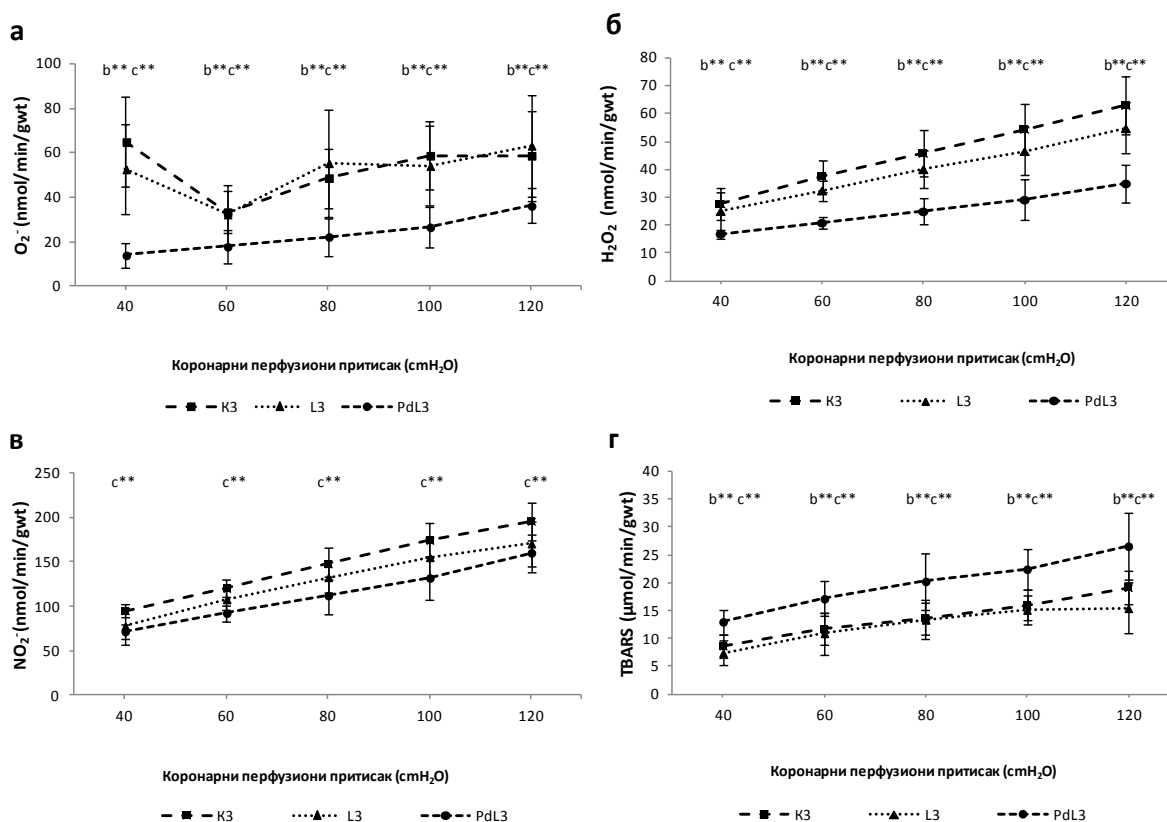


График 17. Поређење ефекта хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (***) уколико је $p < 0,01$; а - L_3 vs. K_3 , б - L_3 vs. PdL_3 ; с - K_3 vs. PdL_3 .*

Примена паладијумског комплекса (PdL_3) је довела до најмање продукције супероксид анјон радикала при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17а). Лиганд (L_3) и платински комплекс (K_3) су изазвали статистички високо значајно повећање продукције супероксид анјон радикала у поређењу са паладијумским комплексом (График 17а). Готово идентичан тренд био је присутан код вредности водоник пероксида при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17б). Са друге стране потпуно обрнут ефекат је имала хронична примена испитиваних једињења на вредности индекса липидне пероксидације у ефлуенту (График 17г). Наиме, примена паладијумског комплекса (PdL_3) је довела до статистички високо значајног пораста индекса липидне пероксидације у односу на платински комплекс (K_3) и лиганд (L_3) при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17г). Највише вредности нитрита у ефлуенту су забележене у групи третираној платинским комплексом (K_3) при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17в). Примена паладијумског комплекса је довела до статистички високо значајне смањене продукције нитрита у односу на платински комплекс при свим посматраним коронарним перфузионим притисцима ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17в). Вредности свих параметара оксидационог стреса се нису значајно разликовале у групама третираним лигандом (L_3) и платинским комплексом (K_3) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17 а-г). Такође, није било значајне разлике у вредностима нитрита након примене лиганда (L_3) и паладијумског комплекса (PdL_3) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 17в).

4.6. Утицај хроничне адиминистрације цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Ефекти хроничне интраперитонеалне цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима у ефлуенту приказани су у Табели 4.12 и на Графику 18. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$. Нису постојале статистички значајне разлике у вредностима испитиваних параметара оксидационог стреса након хроничне примене цисплатине између контролних и експерименталних услова без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 18 а-г).

Табела 4.12. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

CPP	O_2^- (nmol/min/gwt)		H_2O_2 (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	59,39 ± 26,41	59,39 ± 26,41	27,07 ± 5,30	27,07 ± 5,30
60	29,03 ± 13,30	36,86 ± 16,81	34,41 ± 7,80	35,7 ± 6,79
80	39,79 ± 15,04	57,29 ± 17,05	40,38 ± 8,20	37,44 ± 7,76
100	42,03 ± 11,36	53,44 ± 7,75	45,61 ± 9,35	43,3 ± 10,27
120	44,08 ± 8,83	49,65 ± 13,37	51,43 ± 9,81	52,9 ± 11,28
CPP	NO_2^- (nmol/min/gwt)		TBARS ($\mu\text{mol/min/gwt}$)	
	К	Е	К	Е
40	109,66 ± 12,12	109,66 ± 12,12	10,30 ± 2,90	10,30 ± 2,90
60	91,10 ± 21,35	94,94 ± 19,10	14,50 ± 4,70	13,48 ± 4,10
80	102,37 ± 22,70	105,27 ± 25,10	15,77 ± 2,11	16,25 ± 4,58
100	126,03 ± 23,78	119,30 ± 22,63	18,54 ± 3,39	18,39 ± 1,91
120	142,08 ± 28,39	135,50 ± 22,01	21,54 ± 2,76	20,00 ± 2,71

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O_2^- - супероксид анјон радикал, H_2O_2 - водоник пероксид, NO_2^- - нитрити, TBARS – индекс липидне пероксидације.

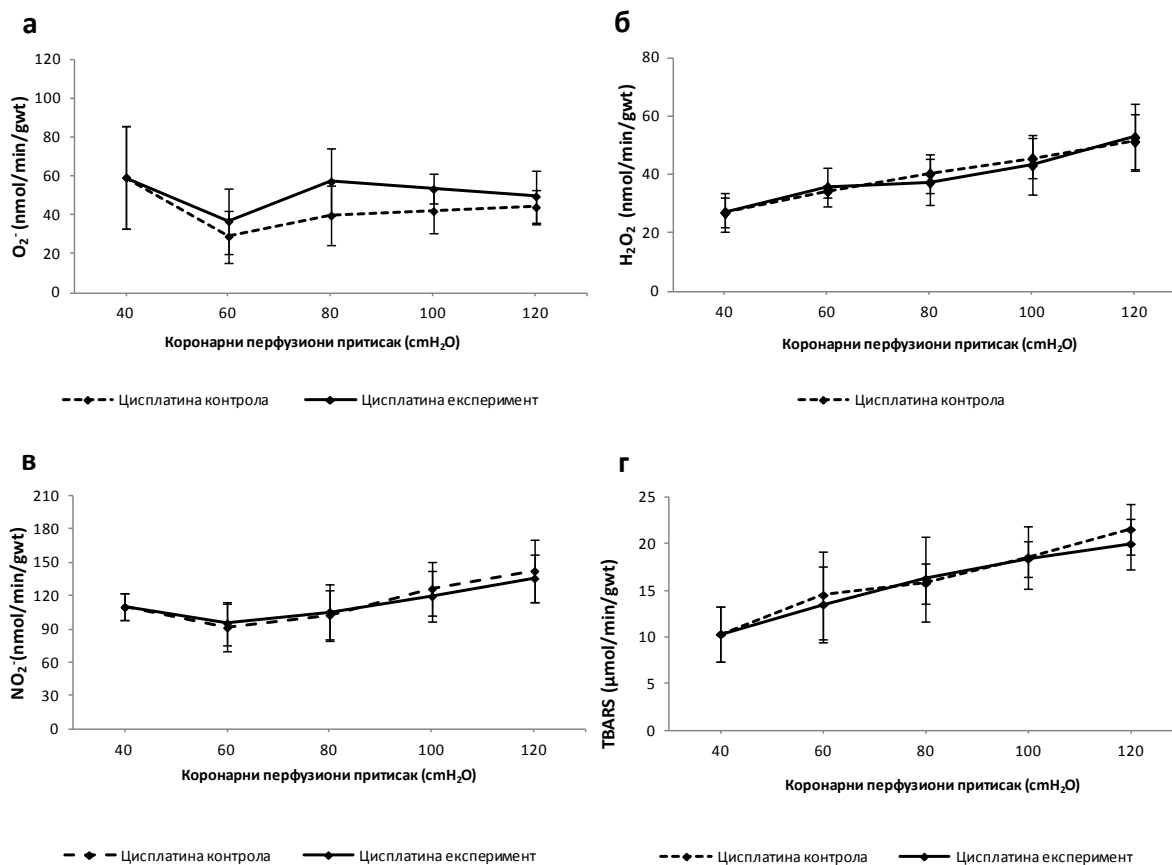


График 18. Ефекти хроничне интраперитонеалне примене лиганда O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) $TBARS$ – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$

4.6.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у ефектима након хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту су приказане на Графику 19.

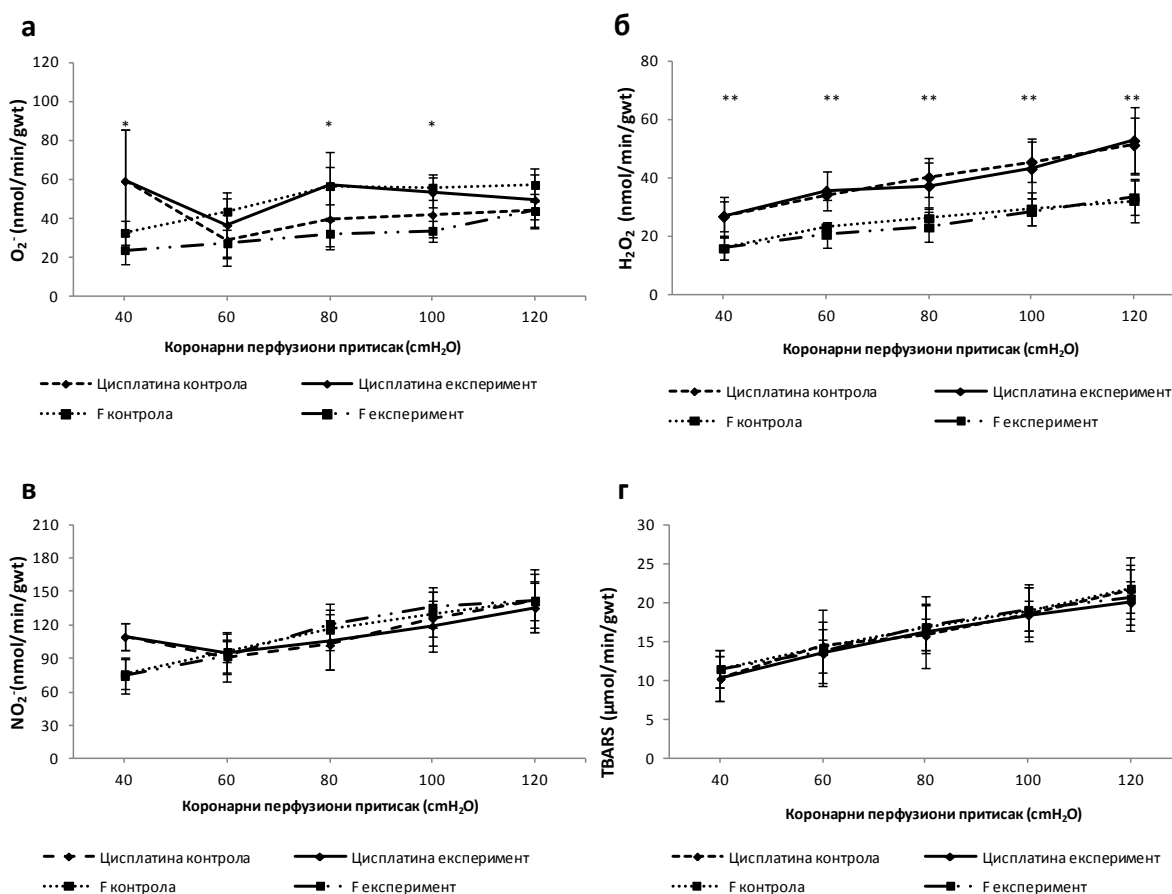


График 19. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) $O_2^{\cdot-}$ - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) $NO_2^{\cdot-}$ - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Wilcoxon-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездике (**) уколико је $p < 0,01$

Хронична примена цисплатине је довела до статистички значајног повећања у продукцији супероксид анјон радикала у односу на контролну групу при различитим коронарним перфузионим притисцима (CPR = 40 и 80-100 cmH₂O) (График 19а). Такође, примена цисплатине је довела до повећане продукције водоник пероксида у односу на контролну

групу и то при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 19б). Са друге стране није постојала статистички значајна разлика у вредностима нитрита и индекса липидне пероксидације између групе која је примала цисплатину и групе која је примала физиолошки раствор без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 19в и 19г).

4.7. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

Разлике у оствареним ефектима цисплатине, лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту су приказане на Графику 2. Примена цисплатине је довела до статистички високо значајног порста вредности супероксид анјон радикала у односу на примену паладијумског комплекса (PdL₃) при готово свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-100 cmH₂O) (График 20а). Са друге стране, вредности супероксид анјон радикала се нису значајно разликовале у групи третираној цисплатином у односу на групе третирану лигандом (L₃) и групу третирану платинским комплексом (K₃) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (График 20а). Слична разлика у ефектима између група је постојала и на вредности водоник пероксида (График 20б). Цисплатина је довела до статистички значајно већих вредности водоник пероксида у односу на паладијумски комплекс (PdL₃) при свим коронарним перфузионим притисцима (CPP = 40-1020 cmH₂O), док није било разлике у овим вредностима код примене лиганда (L₃) и платинског комплекса (K₃) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска (CPP = 40-120 cmH₂O) (График 20б). Код динамике ослобађања нитрита постојао тотално другачији тренд. Наиме, вредности нитрита су биле статистички значајно више у групама третираним платинским комплексом (K₃) (CPP = 80-120 cmH₂O) и лигандом (L₃) (CPP = 60-120 cmH₂O) у односу на

групу третирану цисплатином (График 20в). Вредности нитрита се нису разликовале у групи третираној цисплатином у односу на групу третирану паладијумским комплексом (PdL_3) без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 20в). Није посотојала статистички значајна разлика у вредностима индекса липидне пероксидације између цисплатине и преостале три групе без обзира на промену коронарног перфузионог притиска ($CPP = 40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) (График 20г).

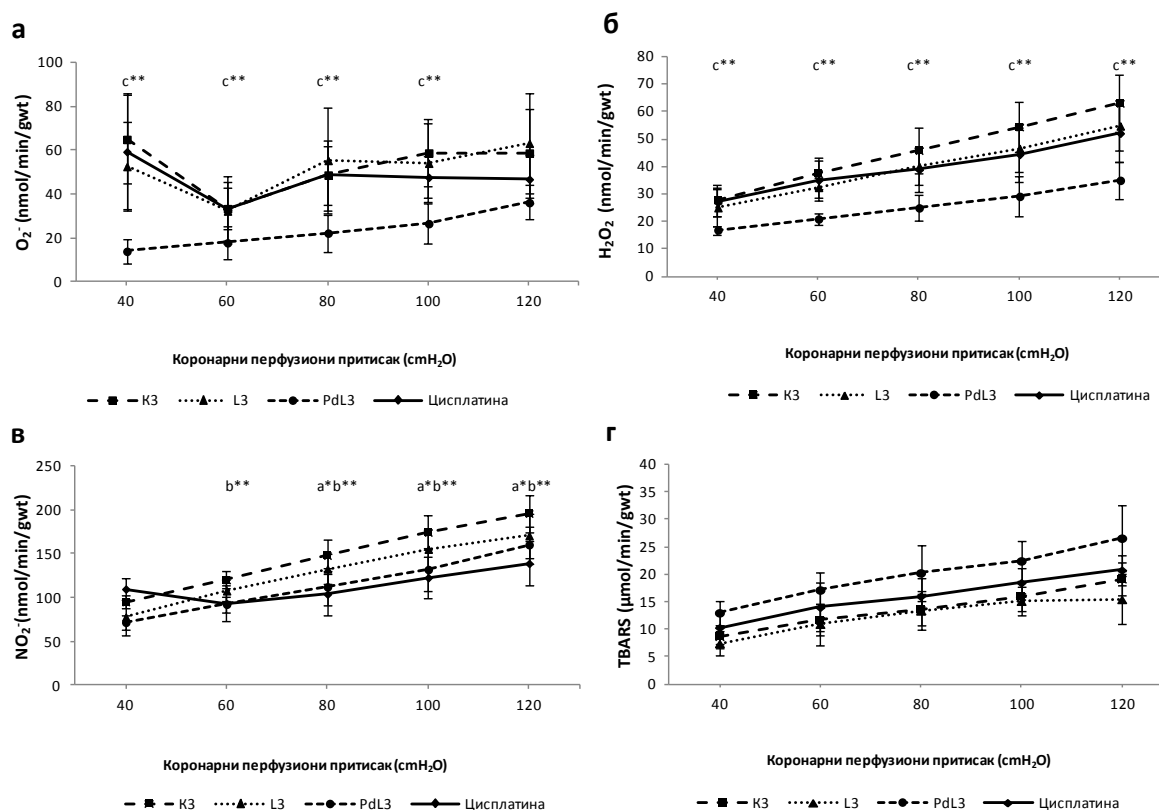


График 20. Поређење ефекта хроничне адиминистрације лиганда O,O' -диетил-(S,S)-етиленидиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином [$PtCl_4\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (K_3) и двовалентним паладијумом [$PdCl_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (PdL_3) са цисплатином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту

а) O_2^- - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације.. Стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене *Kruskal Wallis*-овим тестом, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$; а – цисплатина vs. L_3 , б – цисплатина vs. K_3 ; c – цисплатина vs. PdL_3 .

4.8. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

4.8.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре системског оксидационог стреса у плазми приказане су на Графику 21. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Вредности супероксид анјон радикала и водоник пероксида се нису статистички значајно разликовале у све три посматране групе у поређењу са одговарајућом контролном групом (DMSO) (График 21а, График 21б). Са друге стране након примене лиганда вредности нитрита и индекса липидне пероксидације су биле статистички високо значајно веће него након примене диметил сулфоксида (DMSO) (График 21в и График 21г). Примена платинског комплекса (K₃) је довела само до повећаног стварања нитрита (График 21в). Примена паладијумовог комплекса није довела до повећаног стварања праћених прооксидационих молекула у плазми (График 21 а-г).

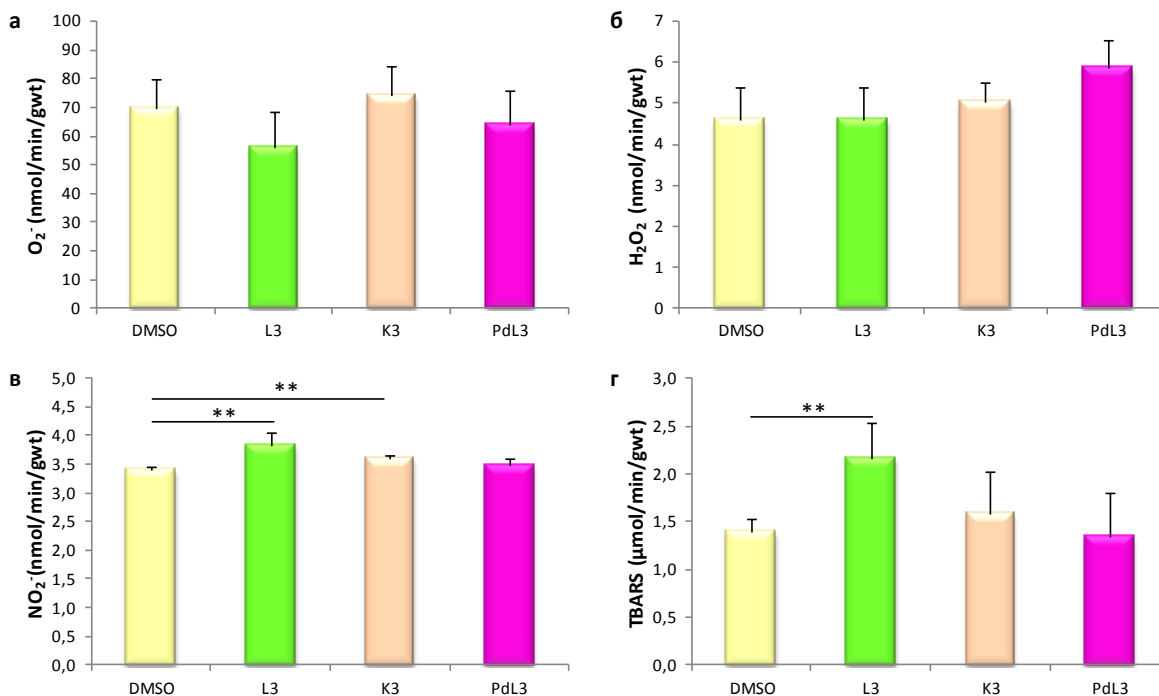


График 21. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

а) O_2^- - супероксид анион радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

4.8.2. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре системског оксидационог стреса у плазми приказане су на Графику 22. Резултати поменутих параметара су приказани као средња

вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

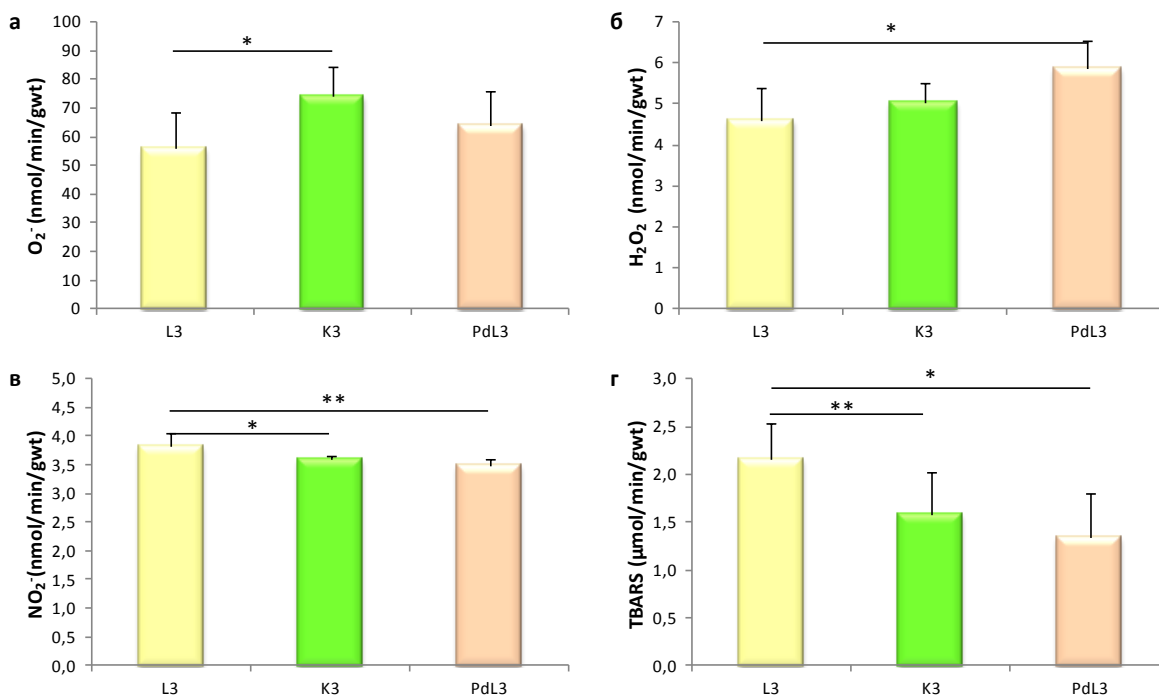


График 22. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда O,O' -диетил-(S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином [$PtCl_4\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (K_3) и двовалентним паладијумом [$PdCl_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (PdL_3) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

а) $O_2^{\cdot-}$ - супероксид анјон радикал, б) H_2O_2 – водоник пероксид, в) NO_2^{\cdot} - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

Примена платинског комплекса (K_3) је довела до повећаног стварања супероксид анјон радикала (График 22а), док је примена паладијумовог комплекса (PdL_3) довела до повећаног стварања водоник пероксида у поређењу са применом лиганда (L_3) (График 22б). Вредности нитрита и индекса липидне пероксидације су биле највише у групи третираној лигандом (L_3) и то значајно више него у преостале две групе (График 22в и График 22г). Вредности прооксидационих молекула се нису значајно разликовале када су поређене групе третиране платинским (K_3) и паладијумовим комплексом (PdL_3) (График 22 а-г).

4.9. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене цисплатине и физиолошког раствора на параметре системског оксидационог стреса у плазми приказане су на Графику 23. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Примена цисплатине није довела до значајног пораста у продукцији прооксидационих молекула у поређењу са одговарајућом контролном групом (F) (График 23 а-г).

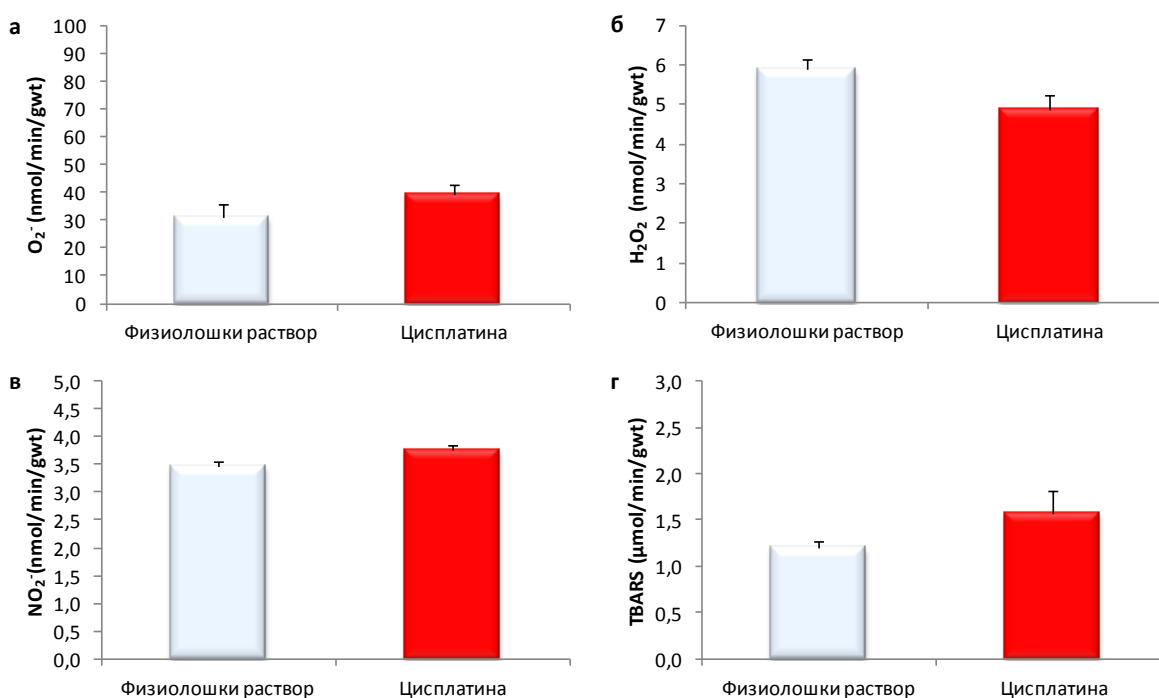


График 23. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре системског оксидационог стреса у плазми

а) O_2^- - супероксид анион радикал, б) H_2O_2 - водоник пероксид, в) NO_2^- - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

4.10. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре системског оксидационог стреса у плазми

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре системског оксидационог стреса у плазми приказане су на Графику 24. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију (X±SD), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је p<0,05, односно са две звездице (**) уколико је p<0,01.

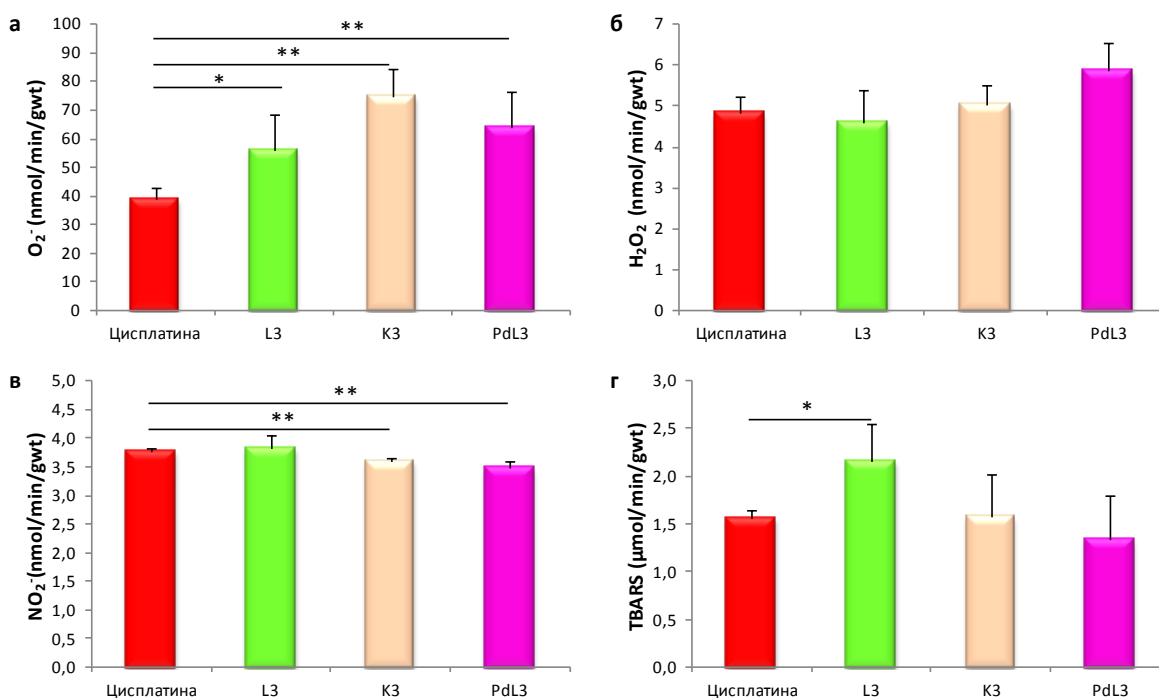


График 24. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом

[PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре системског оксидационог стреса у плазми

а) O₂⁻ - супероксид анјон радикал, б) H₂O₂ - водоник пероксид, в) NO₂⁻ - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је p<0,05, односно са две звездице (**) уколико је p<0,01.*

Хронична примена лиганда је довела до значајног повећања супероксид анјон радикала и индекса липидне пероксидације у односу на цисплатину (График 24а и График 24г). Са друге стране платински комплекс (K₃) и паладијумов комплекс (PdL₃) су довели до повећаног стварања супероксид анјон радикала (График 24а), а смањеног стварања нитрита (График 24в) у поређењу са цисплатином. У динамици стварања осталих прооксидационих молекула није било значајне разлике између посматраних група са цисплатином (График 24 а-г).

4.11. Утицај хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3) и двовалентним паладијумом $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

4.11.1. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3) и двовалентним паладијумом $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3) и двовалентним паладијумом $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита приказане су на Графику 25. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Ниједно од примењених једињења (L_3 , K_3 и PdL_3) није значајно утицало на настанак супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона у односу на контролу (DMSO) (График 25а и График 25в). Са друге стране сва једињења су довела до повећане продукције катализе у односу на контролу (DMSO) (График 25б).

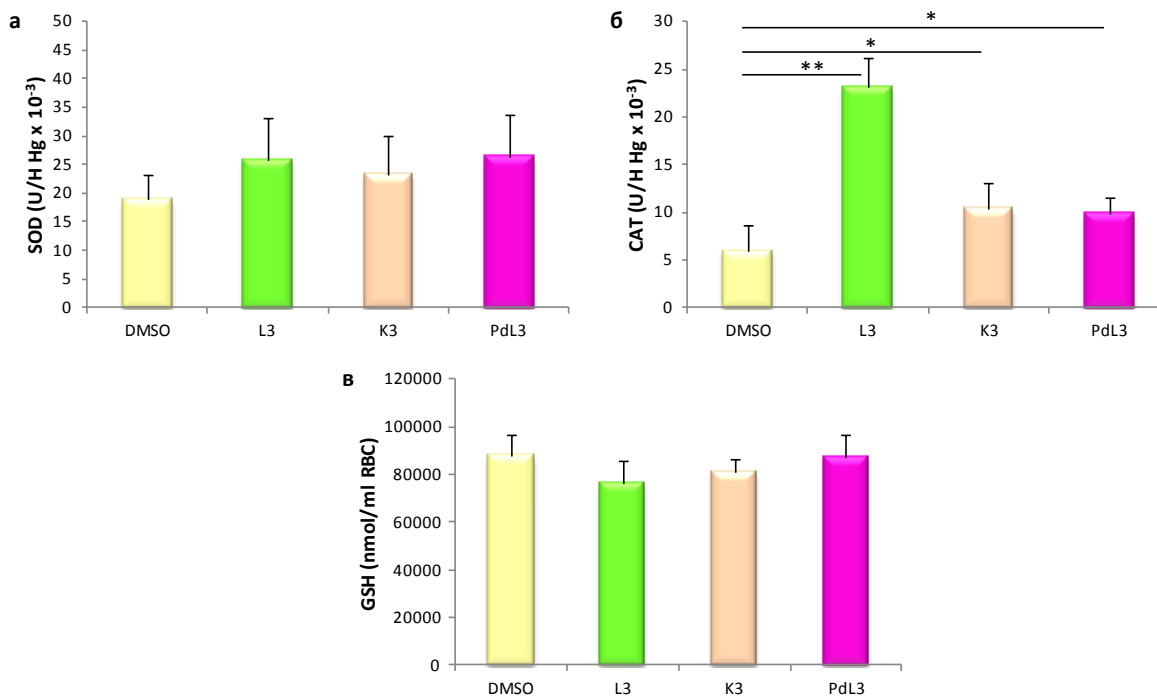


График 25. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са диметил сулфоксидом (DMSO) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

а) SOD – супероксид дисмутаза, б) CAT – каталаза, в) GSH – редуковани глутатион. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездicom (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

4.11.2. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита приказане су на Графику 26. Резултати поменутих параметара су приказани

као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.

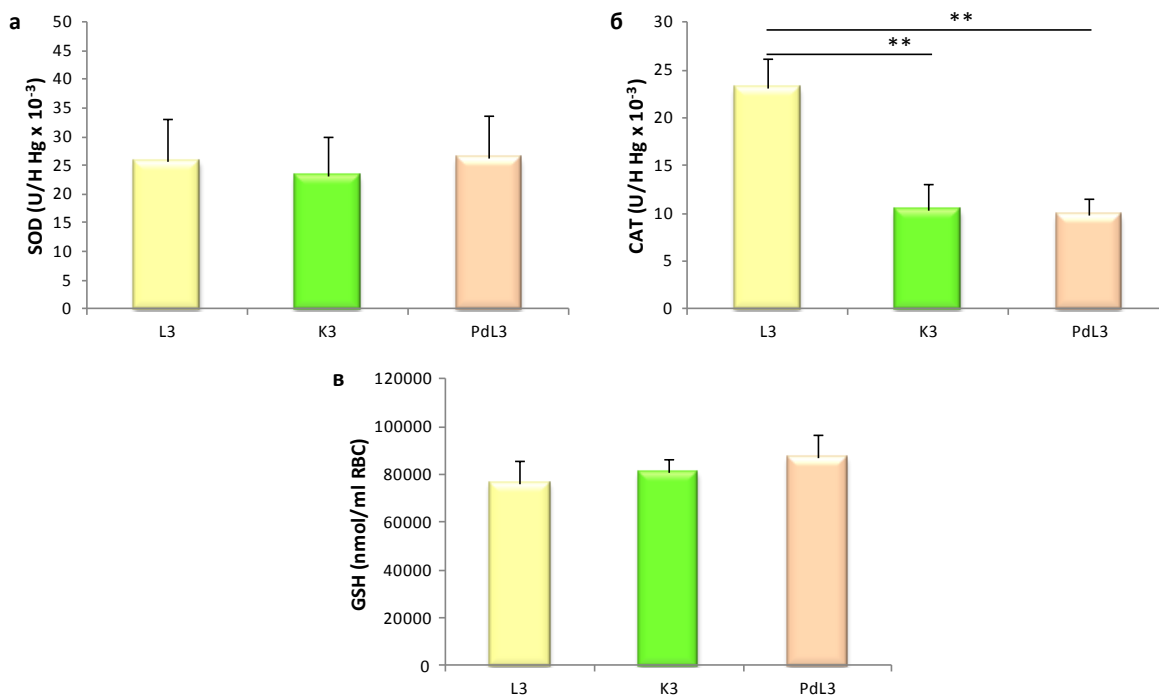


График 26. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етиленамина-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и његових комплекса са четворовалентном платином [$PtCl_4\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (K_3) и двовалентним паладијумом [$PdCl_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}$] (PdL_3) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

а) SOD – супероксид дисмутаза, б) CAT – каталаза, в) GSH – редуковани глутатион. Стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звезде (**) уколико је $p < 0,01$.*

Хронична примена лиганда је довела до значајно веће продукције каталазе у односу на платински (K_3) и паладијумов комплекс (PdL_3) (График 26б). Није било значајне разлике у вредностима супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона у ове три групе (L_3 , K_3 и PdL_3) (График 26а и График 26в).

4.12. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене цисплатине и одговарајуће контроле (F) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита приказане су на Графику 27. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију ($X \pm SD$), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

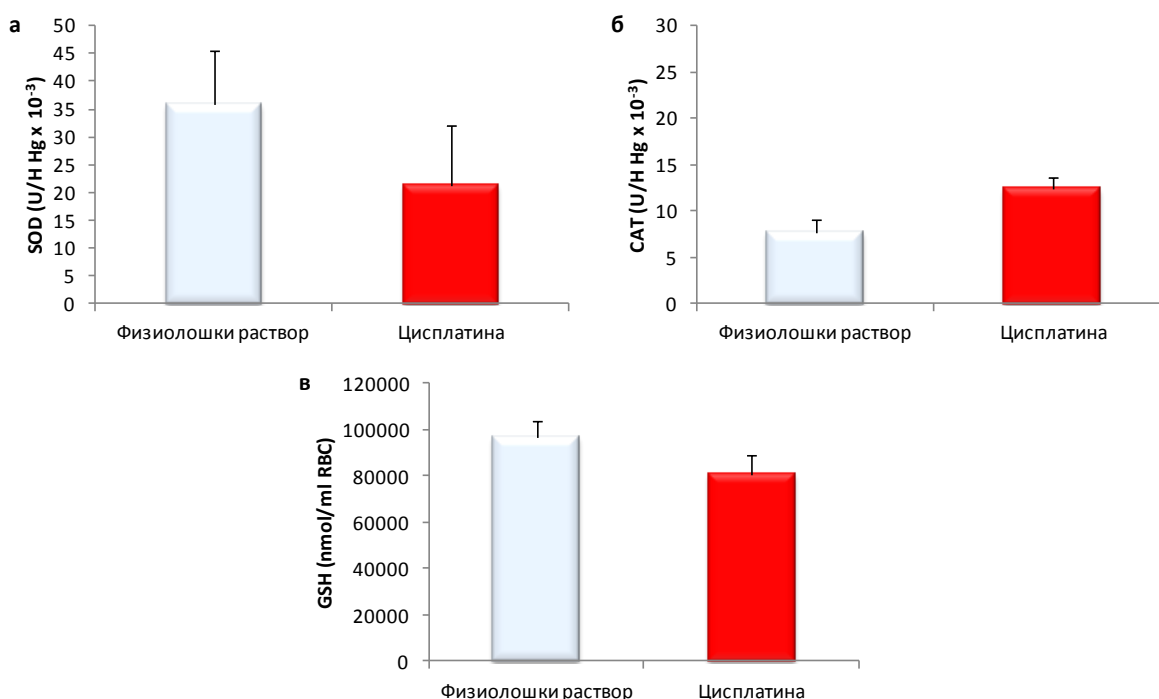


График 27. Поређење ефеката хроничне адиминистрације цисплатине и физиолошког раствора (F) на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

а) SOD – супероксид дисмутаза, б) CAT – каталаза, в) GSH – редуковани глутатион. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездом (*) уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.

Хронична примена цисплатине није довела до значајне разлике у вредностима параметара антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита у поређењу са контролном групом (F) (График 27 а-в).

4.12. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

Разлике у ефектима хроничне интраперитонеалне примене лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита приказане су на Графику 28. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну девијацију (X±SD), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (*) уколико је p<0,05, односно са две звезде (**) уколико је p<0,01.

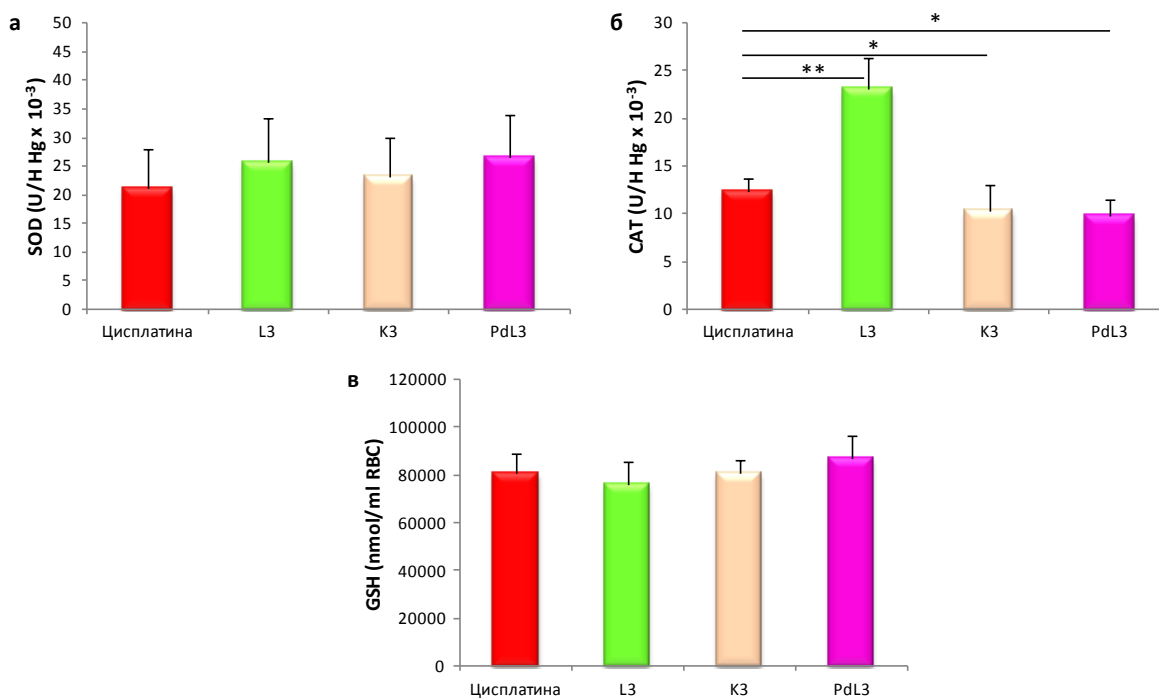


График 28. Поређење ефеката хроничне адиминистрације лиганда О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) и његових комплекса са четворовалентном платином [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃) и двовалентним паладијумом

[PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) са цисплатином на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

а) SOD – супероксид дисмутаза, б) CAT – каталаза, в) GSH – редуковани глутатион. Статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом () уколико је $p < 0,05$, односно са две звездице (**) уколико је $p < 0,01$.*

Ниједно од примењених једињења (L₃, K₃ и PdL₃) није значајно утицало на настанак супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона у односу на цисплатину (График 28а и График 28в). Са друге стране сва једињења су довела до повећане продукције катализе у односу на цисплатину (График 28б).

V.
ДИСКУСИЈА

Примарни циљ садашње студије је био да испита ефекте хроничне апликације цисплатине (CDDP) и О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L₃) односно његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на изоловано срце пацова перфундовано по Langendorff-овом моделу.

Ова идеја је произишла из потребе да се пронађе нови цитостатски агенс који би имао мање изражен кардиотоксични ефекат од цисплатине (као референтног цитостатика) уз подједнако или евентуално ефикасније антитуморско дејство.

Комплекси платине су највише проучавани комплекси метала због њихове важности у терапији карцинома. Неки од антитуморских лекова на бази платине, као што су цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина, имају неколико недостатака, укључујући нуспојаве, туморе резистентне на ове агенсе, нефро- и кардиотоксичност, ограничену растворљивост у воденом медију и тако даље (129). У том смислу, да би се постигла мања нежељена токсичност, повећана растворљивост и селективност тумора, велики број радова је у новије време посвећен припреми модификованих комплекса платине.

Један од начина да се дизајнирају нови анти-туморски агенси на бази цисплатине је да се промени природа централног јона метала. Међу комплексима метала без платине који су проучавани за лечење рака, паладијум (II) деривати су лако изабрани због њихове структурне аналогије са онима који садрже Pt(II) комплексе (129).

Цисплатина (цис-диамминедихлороплатина II) је један од најчешће коришћених антинеопластичних лекова. То је био први агенс на бази метала који је ушао у клиничка испитивања 1972. године, док је у клиничким условима употребљен први пут 1979. године (130, 131). Цисплатина се данас третира као лек "златног стандарда" у лечењу малигних болести тестиса (са стопом излечења од 90%) као и терапији канцера главе и врата, грлића материце, дојке, плућа, јајника, желуца, бешике, итд. (132-135).

Цисплатина остварује своју антитуморску активност кроз своја алкилирајућа својства. Наиме, када једном уђе у цитоплазму ћелије, где је концентрација хлорида много нижа него у крви (~20 mM vs ~ 100 mM), цисплатина спонтано и секвенцијално замењује своје хлоридне лиганде са молекулима воде (130). Резултат овог процеса представља формирање позитивно наелектрисаног бис-воденог комплекса платине који се сада може везати за молекулу ДНК (133, 134).

Цисплатина претежно формира спојнице између две суседне гуанинске нуклеобазе које су праћене гуанином и аденином. Ови адукти узрокују савијање ДНК хеликса до 60% према главном жлебу и даље одмотавање ланца које на тај начин инхибира даљу репликацију ДНК и транскрипцију, што у крајњем води до смрти ћелије (130, 133, 134).

Терапијски успех цисплатине у клиничкој пракси могу да умање односно ометају два главна ограничења: развој малигних ћелија отпорних на цисплатину и токсични ефекти цисплатине. Када ћелије постану резистентне на цисплатину, доза цисплатине која се примењује се повећава, што самим тим повећава ниво његових токсичних споредних ефеката (134). Употреба цисплатине је примарно повезивана са нефротоксичношћу, неуротоксичношћу и ототоксичношћу (130, 132).

Са друге стране, кардиотоксичност се генерално не сматра као уобичајена нуспојава коришћења цисплатине. Међутим, током протекле деценије дошло је до наглог пораста броја клиничких случајева у којима је забележен неки од кардиотоксичних манифестација који се јављају током или непосредно након инфузије цисплатине (135, 136). Међу нежељеним кардиоваскуларним догађајима се најфреквентније срећу тиха и симптоматска аритмија, ангина пекторис, миокардитис, перикардитис, дијастолни поремећаји, срчана исхемија, акутни инфаркт миокарда, тромбоемболијски догађаји, и хронична срчана инсуфицијенција. Механизми путем којих цисплатина остварује своју кардиотоксичну активност су још увек непознати и недовољно разјашњени (135, 136).

Важно је напоменути да се инфузија цисплатине рутински не одвија у условима мониторинга срчаног рада, у поређењу са другим лековима (као што су антрациклини) и на тај начин кардиотоксичност индукована цисплатином може проћи неопажено чиме ови ефекти цисплатине могу често бити занемарени и непријављени. Интересантно је да се цисплатина може наћи у плазми пацијената двадесет година након завршетка хемиотерапије што може узроковати дугорочне кардиотоксичне ефекте (137).

Због свега изнетог разјашњење кардиотоксичних манифестација цисплатине је важно питање које треба испитати и боље разумети. У том смислу, у новије време се покушава са проналажењем нових деривата цисплатине и нових комплекса метала или појединачних лиганата чији се антинеопластични ефекат са једне и кардиотоксични са друге стране компарирају са цисплатином (138, 139).

Иако се недавних година значајно повећао број истраживања која се баве овом проблематиком још увек се нису добили обећавајући резултати који би указивали да неки од агенаса поседују мања кардиотоксична својства уз очувани или евентуално бољи хемиотерапеутски потенцијал (138, 139).

Генерално узевши, ово је била једна од идеја водила за дизајнирање и спровођење ове студије. На жалост, клиничке студије које проучавају ову проблематику захтевају комплексну логистику и дизајн који је често немогуће применити у пракси због чега се последњих година пажња научне јавности усмерава ка анималним моделима истраживања.

5.1. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на телесну тежину пацова

Први подаци до којих смо дошли у студији су се односили на прираст телесне тежине животиња током четири недеље апликације испитиваних једињења. Овом приликом смо желели да утврдимо да ли и у којој мери постоји утицај цисплатине и различитих комплекса односно лиганда на телесну масу пацова тј. какве су разлике између ових агенаса. На овај начин бисмо такође могли да дођемо до важних и не толико истраживаних информација о ефектима ових цитостатика на метаболизам организма у целини.

Резултати које смо добили су показали да су ефекти испитиваних једињења различити. Наиме, уколико изузмемо групе којима је примењиван физиолошки раствор односно DMSO и код којих очекивано није било ометања у прирасту телесне тежине животиња у осталим групама су се добили интересантни налази (Табела 4.1). Тако је администрација лиганда O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3) и Pt(IV) комплекса са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (K_3) такође била повезана са неометаним растом животиња током експерименталног протокола.

За разлику од овог налаза у групама које су третиране цисплатином и Pd(II) комплексом са O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлоридом (PdL_3) је дошло до значајног смањења телесне масе животиња током четири недеље праћења.

Изразити губитак телесне тежине услед дуготрајне примене цисплатине се може окарактерисати као очекиван и добро познат резултат како из клиничке праксе тако и из експерименталних истраживања на анималним моделима (140-142). Тако је у једној од последњих студија из 2018. године доказано да три недеље апликације цисплатине у дози од 5 mg/kg код пацова изазива драстичан губитак у телесној тежини који је уз то и праћен изразитим смањењем узимања хране (141). Губитак телесне масе је у овом истраживању био у складу са редукцијом тежине испитиваних органа (јетре и бубрега) (141).

Механизми добијених ефеката могу бити различити и често удружени. У том смислу, добро је познато да цисплатина поседује јако еметичко дејство. Cabezos и сарадници наводе да овај антинеопластични агенс дозно зависно изазива застој и дистензију желуца (143). Такође, дистензија желуца може бити повезана са задржавањем хране.

Други аутору су уочили да пацови третирани цисплатином имају смањен мотилитет желуца односно настаје смањење локомоторне активности и покретљивости желуца што доприноси истим налазима (144-146).

На тај начин сазнања садашње и свих поменутих студија потпуно једногласно указују и потврђују снажан утицај цисплатине у редукцији тежине органа, телесној тежини и апетиту пацова који се одвија активацијом неког од описаних механизма.

Са друге стране, PdL3 комплекс је такође довео до значајног смањења телесне тежине наших пацова и то може бити последица сличних механизма путем којих цисплатина изазива ове исте ефекте будући да паладијумски комплекси имају структурну аналогију са комплексима који садрже платину (129).

Добијени налази указују да лиганд самостално (L_3) и у оквиру Pt(IV) комплекса не ремети метаболичке процесе у организму тј. не омета нормалан прираст телесне тежине пацова, док у комбинацији са паладијумом ови нежељени ефекти нису избегнути. Ови резултати могу бити од значаја с обзиром да показују да само одговарајућа комбинација металних јона и лиганда обезбеђује сигурну употребу ових цитостатских агенаса са поменутог аспекта.

5.2. Утицај хроничне примене испитиваних једињења на биохемијске маркере пацова

Праћењем биохемијских параметара пацова смо желели да испитамо какав је ефекат испитиваних једињења на различите органске системе пацова односно какав системски учинак остварују. Поред тога, циљ је био да се утврде разлике међу групама тј. да се компарирају добијени резултати нарочито са аспекта поређења са цисплатином.

Липидни статус пацова је процењиван одређивањем вредности стандардних параметера: укупног холестерола, HDL и LDL холестерола као и триглицерида. Наши резултати су показали да иако су најниже вредности свих липидних фракција пронађене у групи која је примала физиолошки раствор није постојала статистички значајна разлика у испитиваним параметрима између група. Ови налази сугеришу да ниједан од испитиваних цитостатских агенаса није утицао на липидни метаболизам животиња.

Из добијених резултата се уочава да су вредности маркера липидног статуса биле највише у групи која је примала цисплатину (Табела 4.2). Ипак изостанак статистичке разлике може бит последица недовољног времена експозиције односно претпоставке да би на основу добијеног тренда било за очекивати да би дужи третман цисплатином узроковао значајне промене метаболизму липида. Ови налази су у потпуности у сагласности са добро познатом чињеницом да је један од механизма путем кога цисплатина изазива кахексију управо стимулација липолизе и ензима укључених у овај процес што изазива хиперлипидемију (147, 148). Ову тврдњу су доказале бројне студије спроведене недавних година у којима је забележен пораст вредности свих фракција липидног метаболизма (VLDL, LDL и HDL- холестерола) као последица активације липолитичких процеса од стране цисплатине.

Праћењем вредности биохемијских показатеља функције бубрега (урее и креатинина) желели смо да испитивамо какав је утицај примењених једињења на овог органа пацова. Потпуно очекивано, најниже вредности урее и креатинина су уочене у контролној групи док су највише вредности овог маркера биле у групи која је примала K_3 једињење. У случају креатинина, највише вредности су забележене у групи третираној L_3 једињењем (Табела 4.3). Иако концентрације ових параметара између група варирају, одсуство статистичке значајности указује да заправо правих разлика у резултатима између

примењених агенаса није било. Осим тога, као и у случају маркера липидног профила, све вредности су се кретале у физиолошком опсегу за пацове ове старосне доби и пола (149, 150), што индикује да је апликација свих једињења у примењеним дозама и времену експозиције била потпуно безбедна и није изазвала значајнија варирања у концентрацији урее и креатинина односно пореметила функцију бубрега.

У литератури се са аспекта компарације са садашњом студијом могу наћи углавном подаци који се односе на примену цисплатине. Већина недавних студија које су проучавале ову проблематику на анималним моделима је показала да примена високих доза цисплатине (7,5 mg/kg и 8 mg/kg) у трајању од 10 дана код пацова изазива повећање вредности урее и креатинина које је било праћено хистолошки потврђеним оштећењима бубрега (151, 152). Ипак разлика у односу на наше истраживање може произаћи из чињенице да је у поменутим студијама било реч о знатно вишим дозама овог цистостатика тј. о ефектима акутног тровања.

Осим бубрега, јетра је била следећи орган од интереса кога смо проучавали. Резултати које смо добили имају идентичан тренд као приликом увида у функцију бубрега. Наиме, најниже концентрације биохемијских маркера рада јетре (укупни протеини и албумини) запажене су у групи третираној физиолошким раствором. Са друге стране, највише вредности укупних протеина су биле код пацова третираних цисплатином, а албумина у групи која је примала лиганд (L_3) (Табела 4.4). Будући да разлика између група није било и да су све забележене вредности биле у опсегу референтних вредности можемо да констатујемо да примена свих испитиваних агенаса није била повезана са поремећајем функције јетре односно нови комплекси и лиганди нису остварили супериорнији ефекат у односу на цисплатину.

Може се претпоставити да би резултати били другачији тј. да би тренд раста превазишао нормалне вредности уколико би период експозиције овим једињењима био дужи а примењена доза већа. Ово су показале и најновије студије на пацовима у којима је запажено да примена високих доза цисплатине (10 mg/kg) узрокује снажну хепатотоксичност која је биохемијски и хистопатолошки потврђена (153, 154).

Након сумације свих налаза који се односе на биохемијске маркере за процену функције јетре, бубрега и липидног статуса можемо закључити да сви испитивани агенци који су били администрирани у примењеној дози и дужини експозиције од четири недеље

нису били повезани са биохемијским променама функције јетре и бубрега односно липидног метаболизма и са овог становишта могу бити безбедни за употребу. Осим тога, нови лиганд (L_3) и његови комплекси са четворовалентном платином $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3) и двовалентним паладијумом $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) нису показали позитивнији ефекат на испитиване агенсе у односу на цисплатину.

5.3. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L_3), његових комплекса $[PtCl_4\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (K_3), $[PdCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]$ (PdL_3) и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Централни задатак садашњег истраживања се односио на процену ефеката новог лиганда односно његових комплекса са четворовалентном платином и двовалентним паладијумом као и компарацију добијених налаза са цисплатином. На овај начин смо покушали да испитамо да ли неки од потенцијално нових хемиотерапеутика може да оствари супериорнији утицај на функцију и перфузију изолованог срца пацова у односу на цисплатину.

Истраживања која су проучавала дејства новосинтетисаних комплекса платине и паладијума на кардиоваскуларни систем уопште а поготово на срчани мишић су оскудна у тек последњих година постала заступљена. У студији Мишића и коаутора је испитиван утицај тридесетоминутне перфузије више комплекса платине (дихлоро-(1,2-диаминоциклохексан)платина(II) ($Pt(II)DACHCl_2$), дихлоро-(етилендиамин)платина(II) ($Pt(II)ENCl_2$), тетраклоро-(1,2-диаминоциклохексан)платина(IV) ($Pt(IV)DACHCl_4$) и тетраклоро-(етилендиамин)платина(IV) ($Pt(IV)ENCl_4$)) у пет различитих доза (10(-8), 10(-7), 10(-6), 10(-5) и 10(-4)) на изоловано срце пацова (155). Ова студија је показала да док цисплатина свој акутни утицај на срце остварује и на миокард и на коронарни ендотел, нови комплексни платине су ограничили своје дејство само на коронарну циркулацију. Из овога се запажа да нови комплексни са платином(II) платином(IV) имају негативан утицај на функцију срца пацова у односу на цисплатину. Ипак ове налазе треба посматрати са резервом будући да је реч о акутном и директном дејству платинумских комплекса који у клиничким условима могу да буду аналогни са евентуалним токсиколошким ефектима нових цитостатика на бази платине.

Због тога је са аспекта компарације са садашњом студијом много корисније узети у обзир резултате недавне студије у којој је измеђуосталог проучаван хроничан утицај цисплатине на кардиодинамске параметре срца перфундованог по Лангендорфу (156). Аутори су показали да петонедељна примена цисплатине у дози од 5 mg/kg може бити изазвати бројне штетне ефекте на изолованом срцу пацова од поремећаја кардиодинамике до смањења коронарног протока (156).

Током последњих деценија се јако увећао број студија које су проучавале утицаје цисплатине на кардиоваскуларни систем уопште. Међутим ефекти цисплатине на функцију самог срчаног мишића и поготово на коронарну реактивност су малобројне и доносе углавном неконзистентне резултате.

Кардиоваскуларне компликације повезане са конвенционалном хемиоотерапијом су добро познати проблеми у онколошким студијама. Добро је позната срчана токсичност која је резултат третмана цисплатином (157). Кардиотоксични ефекти изазвани цисплатином се могу манифестовати кроз промене у електрокардиографском запису (158, 159) које укључују појаву вентрикуларних аритмија, суправентрикуларних тахикардија, атријалних фибрилација, повремену синусну брадикардију и комплетан атриовентрикуларни блок (160, 161). Миокардитис, перикардитис и ангина су такође забележени код срчане токсичности узроковане цисплатином (162, 163). У другим студијама је забележен чак и акутни инфаркт миокарда, аутономна кардиоваскуларна дисфункција (164, 165), хипертензија и хипотензија (166, 167). Индукција коронарног вазоспазма (која може довести до коронарне болести) и васкуларне ендотелне повреде услед повећаног вон Вилебрандовог фактора (кога ослобођају оштећене ендотелне ћелије) се такође убрајају у кардиоваскуларне догађаје повезане са кардиотоксичношћу изазваном цисплатином (160). У крајњем сви поменути кардиотоксични (и други потенцијално непознати) догађаји на крају доводе до конгестивног застоја срца и изненадне срчане смрти.

Механизми путем којих цисплатина изазива поремећаје на нивоу кардиоваскуларног система су сложени и непотпуно разумљиви. Међутим, резултати неколико експерименталних студија указују на секвенцијални пут оштећења, који укључује (1.) улогу мембранских транспортера (2.) конверзију цисплатине у токсичне метаболите; (3.) индукцију оштећења нуклеарног и митохондријског ДНК; (4.) поремећај

јонске хомеостазе (5.) улогу оксидационог стреса и митохондријске дисфункције; (6.) индукцију запаљења; и (7.) активирање апоптотских процеса.

Недавне студије су откриле постојање два различита мембранска транспортера способна за транспорт цисплатине. У бубрегу, цисплатина се транспортује у ћелије бубрежних тубула олакшаном дифузијом, што доводи до несразмерне акумулације овог цитостатика и последичне нефротоксичности. Неколико аутора је идентификовало базолатерални органски катјонски транспортер (*basolateral organic cation transporter*, *OCT*), који је повезан са уносом цисплатине у проксималне тубуларне епителне ћелије (168, 169). До сада су идентификоване три изоформе OCT-а (OCT1, OCT2 и OCT3) код људи. Ипак, сматра се да је OCT2 главни органски транспортер који транспортује цисплатину у ћелију и тиме доприноси цитотоксичности у проксималним тубулима бубрега животиња и људи (168, 169). Занимљиво, иако OCT2 није експримиран у срчаном ткиву људи, одређен број других OCT-а је идентификован приликом транспорта лекова за терапију срчаних обољења у кардиомиоците (170).

Поред OCT2, високо афинитетни транспортер бакра (*high-affinity copper transporter*) *CTR1*, такође је идентификован као посредник у транспорту цисплатине у ћелије сисара, иако у мањој мери (171). За разлику од OCT2 који се експримира само у тубуларним ћелијама бубрега, *CTR1* се експримира и у срчаном ткиву (172, 173). Иако тренутно не постоје *in vivo* подаци о специфичној улози *CTR1* у токсичности изазваној цисплатином, *in vitro* студије су показале да нисходна регулација *CTR1* доводи до смањењеног транспорта цисплатине и редукције цитотоксичности (171), што сугерише да *CTR1* игра важну улогу у уносу цисплатине у проксималне тубуларне ћелије и / или кардиомиоците.

Студије на анималним моделима указују да је цисплатина протоксин који путем метаболичке трансформације може да се конвертује у много токсичнији нефротоксин када се транспортује у епителне ћелије бубрежних тубула. Процес метаболичке трансформације цисплатине почиње када се цисплатина веже за глутатион, природни антиоксиданс у тубуларним ћелијама бубрега, и формира коњугате глутатиона, катализоване ензимом глутатион-С-трансфераза Пи (*glutathione-S-transferase Pi (GSTP)*) (173).

Коњугати глутатиона затим пролазе кроз тубуларне ћелије и цепају се у цистеинил-глицин-коњугате и цистеин-коњугате, са гама-глутамил транспептидазом и

аминотрансферазом Н, који су обилно експримирани на површини плазма мембране тубуларних ћелија проксималних тубула (173, 174). Цистеин-коњугати се транспортују у проксималне тубуларне ћелије, где се подвргавају даљој метаболичкој конверзији путем цистеин-С-коњугата бета-лијазе (cysteine-S-conjugate beta-lyase (CCBL)) у високо реактивне цистеин тиоле (173, 174). Везивање реактивног цистеин тиола за есенцијалне протеине унутар проксималних тубуларних ћелија доводи до токсичности. Иако се у срцу није проучавала појава метаболичке токсификације цисплатине помоћу гама-глутамил транспептидазом, врло је мало вероватно да овај пут игра улогу у посматраној кардиотоксичности цисплатине, јер није детектована експресија гама-глутамил транспептидазе у ткиву срца људи (173, 174).

Цисплатина формира интраланчане и интерланчане унакрсне везе са ДНК ланцима. Формирани ДНК адукт активира каскаду ћелијских догађаја што кулминира у митохондријском и нуклеарном оштећењу ДНК и смрти ћелија у бубрежним проксималним тубулима (173, 175, 176). Такође, ДНК адукт инхибира даљу синтезу ДНК, ћелијски циклус и репликацију, што доводи до нарушене репликације и транскрипције и на крају апоптозе тубуларних ћелија бубрега (173, 176, 177). На моделу срчане токсичности пацова изазване цисплатином, El-Awady и сарадници (178) уочили су значајна оштећења у нуклеарној и митохондријској ДНК. Пошто ћелије које се брзо деле, укључујући и ћелије рака, показују високу осетљивост на оштећење ДНК, неки аутори тврде да је антиканцерогено својство цисплатине у великој мери последица формирања ДНК адуката (176).

Други су предложили митохондријску ДНК или друге митохондријалне делове као најчешћа везујућа места за везивање цисплатина због њених слабих способности за поправку оштећења (177, 179). Осим нуклеарне и митохондријске ДНК, студије такође истичу ефекат цисплатина на РНК, протеине и фосфолипиде (180).

Неке студије су показале да цисплатина ремети јонску хомеостазу и транспорт воде у бубрежним тубуларним ћелијама, што доводи до смањења стопе реапсорпције јона дуж нефрона и на крају повећања нивоа ових јона у урину (181-183).

Експресија аквапорина 1 и 2, као и $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ко-транспортера и тип III Na^+/H^+ измењивача у спољашњој области медуле је смањена након третмана цисплатином (182).

У *in vitro* и *in vivo* моделима реналне токсичности под утицајем цисплатине је забележена смањена активност Na^+/K^+ АТФ-азе (α -подјединица) и тиме тубуларна дисфункција (182).

Цисплатина може такође да поремети енергетски статус кардиомиоцита дејством на митохондрије. Наиме оштећењем функције ове органеле настаје смањена производња АТФ-а и последично смањење ћелијских енергетских резерви што је инкомпатибилно са животом ћелије. Механизми којима цисплатине изазива смањену продукцију енергије у митохондријама су још увек недовољно разјашњени иако су неке *in vitro* студије показале да је овај цитостатик потентни инхибитор оксидације масних киселина који су главни ћелијски извор енергије (173, 184, 185). Исти аутори су доказали да цисплатина утиче и на рад цитохром ц оксидазе који је кључни ензим у процесу респираторног ланца митохондрија, што опет води ка смањењу концентрације АТФ-а (173, 184, 185).

Осим поменутих механизма индукција инфламаторног одговора је такође незаобилазни и свеприсутни медијум за кардиотоксичност изазвану цисплатином. Инфламацијски системи се активирају након токсичног дејства било ког агенса као одговор на ткивно оштећење (186).

Бројни докази показују да цисплатина стимулише продукцију широког спектра инфламаторних цитокина и хемокина као што је транслокација редокс-сензитивног нуклеарног капа бета В (NF- κ B) из цитосола у једро, што узрокује синтезу фактора некрозе тумора алфа (TNF- α) који је један од кључних про-инфламаторних цитокина укључених у инфламацијске догађаје кардиомиоцит (187). Истраживања на пацовима и мишевима су забележила да цисплатина изазива снажну активност миокардних мијелопероксидаза и тиме оштећује морфологију а потом и функцију срца сисара (187). Молекулски механизми цисплатином индуковане инфламације подразумевају ослобађање молекула повезаних са оштећењем (damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs) који изазивају активацију тол-лике рецептора 4 (toll-like receptor 4, TLR4) и последичну продукцију TNF- α од стране имуних ћелија (188).

Апоптоза може бити такође важан механизам у индукцији кардиотоксичности под утицајем цисплатине. Студије на *in vivo* и *in vitro* моделима цисплатином изазване кардиотоксичности управо показују укључење многобројних интрацелуларних догађаја од којих већина интерферира са митохондријама (177, 178, 189). Наиме, цисплатина узрокује активацију про-апоптотских протеина из Bcl-2 фамилије (Бах и Бах), што доводи до

отварања митохондријалних пермеабилних пора (mitochondrial permeability transition pores, MPTPs), водећи у ослобађање про-апоптотских фактора као што су цитохром ц, ендонуклеаза G, и апоптотски-индукциони фактор (apoptosis-inducing factor, AIF) из митохондрија у цитосол (189, 190). Цитохром ц потом активира каспазу 9 која активира већи број каспаза и индукцију апоптозе (189, 190).

За разлику од тога, ендонуклеаза G и AIF подлежу транслокацији и акумулацији у нуклеусу након ослобађања из митохондрија што такође доводи до апоптозе (191). Недавне студије на мишевима су указале да цисплатина може да узрокује активацију ендоплазматског стреса. Каспаза 3 која се налази у ендоплазматском ретикулуму је кључни ензим који покреће процес ендоплазматског стреса и потом последичну апоптозу (191).

Са друге стране у нашој студији су добијени занимљиви налази. Генерално посматрано, хронична апликација L_3 лиганда, K_3 и PdL_3 комплекса није била повезана са променама кардиодинамских варијабли током ауторегулаторног ранга односно није пореметила функцију и перфузију срца у периоду ауторегулације (Графици 1, 3, 5). Ови налази показују да у примењеној дози и дужини експозиције ниједно од нових једињења није оштетило функцију изолованог срца пацова тј. нису остварили кардиодепресивни ефекат. На овај начин у погледу срца и коронарне циркулације изгледа да не постоје препреке за њихову употребу.

Приликом компарације дејстава L_3 лиганда, K_3 и PdL_3 комплекса може се уочити да су два доминантна кардиодинамска параметра која описују контрактилну и релаксантну способност срца (инотропни и лузитропни потенцијал) била најочуванија у групи која је третирана платинским комплексом (K_3) у односу лиганд (L_3) и поготово паладијумов комплекс (PdL_3) у чијој су групи забележени најлошији резултати (Графици 7а – 7д). Уопштено анализирано са аспекта поређења између свих поменутих агенаса може се запазити да су ослабије вредности свих кардиодинамских маркера и коронарног протока биле забележене у групи која је третирана паладијумовим комплексом (PdL_3).

Ови налази сугеришу да је паладијум у комбинацији са испитиваним лигандом (L_3) оставрио најдепресивније дејство како на систолну и дијастолну функцију срца тако и на коронарну ауторегулацију ометајући на тај начин нормални опсег рада изолованог срца пацова.

Резултати из групе којој је апликована цисплатина показују да у примењеном експерименталном протоколу ни цисплатина није изазвала важније промене функције и перфузије срца пацова током ауторегулаторног ранга (График 8). У том смислу, може се запазити да цисплатина не оштећује физиолошки ранг рада изолованог срца пацова.

Уколико компарирамо кардиодинамске ефекте нових комплекса и лиганда и цисплатине можемо уочити да су вредности свих кардиодинамских показатеља биле боље након хроничне апликације цисплатине у односу на потенцијално нове цитостатике. Осим тога, коронарна реактивност је такође била најефикаснија приликом третмана цисплатине.

На основу ових резултата може се закључити да у примењеној дози и временском интервалу експозиције новосинтетисана једињења нису остварила супериорнији ефекат на функцију изолованог срца пацова и коронарну циркулацију од цисплатине.

5.4. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L3), његових комплекса [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K3), [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL3) и цисплатине на срчане и системске про-оксидационе параметре пацова

У литератури се као један од главних механизма кардиотоксичних ефеката цисплатине помиње индукција оксидационог стреса (156, 192-194). Ова чињеница је и нас навела да испитивамо како системски тако и оксидациони статус самог изолованог срца пацова. На овај начин смо покушали да утврдимо да ли и у којој мери постоји корелација између кардиогених дејстава цисплатине и других испитиваних једињења и редокс хомеостазе код пацова. Осим тога, желели смо да компарирамо оксидациони потенцијал цисплатине и нових комплекса и њиховог лиганда. С тим у вези, прегледом доступних база података може се уочити да је ово једна од ретких студија у којој је процењиван и срчани и системски оксидациони стрес са циљем формирања комплетне редокс слике.

Цисплатина може да промени редокс баланс ћелија активацијом процеса коњугације и тиме умањи активност главног интраћелијског антиоксидационог ензима глутатиона. Осим тога, коњугацијом се може пореметити и циклус митохондријалне респирације на начин повећане продукције слободних радикала током оксидативне фосфорилације у митохондријама. Поред цитоплазматске показана је и смањена

концентрација ензима глутатионског циклуса у плазми након хроничне употребе цисплатине код људи (195, 196).

Као последица третмана цисплатином може настати и повећан степен липидног оштећења ћелијских мембрана (липидне пероксидације) што је закључак многих студија у последње две деценије (197-199).

У нашој недавној студији смо указали да промене миокардне концентрације главних антиоксидационих ензима заштите могу настати управо као одговор на повећану продукцију индекса липидне пероксидације и осталих про-оксидационих маркера након хроничне апликације цисплатине код пацова (156). El-Awady и сарадници (178) су међутим на другом моделу показали да концентрације могу да буду и снижене у пацова третираних цисплатином.

Велики број података сугерише да акумулација цисплатине у митохондријалном матриксу узрокује функционисање респираторног ланца и ексцесивну продукцију слободних радикала (173, 175, 200, 201). Овако настали митохондријални оксидациони стрес потом индукује каскаду догађаја који воде у митохондријалну дисфункцију и активацију сигналних молекула и транскрипцију про-апоптотских гена који у крајњем подстичу смрт ћелије (173, 175, 189, 191). Завидан број митохондрија у кардиомиоцитима као и велика зависност рада ових ћелија од поменутих органела може сигурно бити одговорно за предиспозицију овог органа ка токсичним оштећењима цисплатине (175, 189, 191).

Праћењем оксидационих биомаркера у коронарном венском ефлуенту смо желели да испитамо какав је одговор срчаних про-оксиданаса на хронични третман цисплатине и других испитиваних једињења односно да стекнемо увид у интракардијални оксидациони статус. У том смислу ово је била једна од ретких студија која је проучавала динамику ослобађања различитих индикатора оксидационог оштећења директно из срчаног мишића.

У једној од ретких студија која је имала сличан дизајн са аспекта хроничне примене цисплатине и одређивања срчаних про-оксидационих маркера је између осталог проучаван утицај петонедељне примене овог цистостатика у дози од 5 mg/kg маркере срчаног оксидационог стреса (156).

Аутори су уочили да је третман пацова цисплатином узроковао повећано ослобађање и супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2) из изолованог

срца пацова што корелира са сазнањима садашње студије. У другој студији сличног протокола је доказано да једнократна примена цисплатине у високој дози од 20 mg/kg може да изазове изражену липидну пероксидацију кардиомиоцита и да умањи активност срчаних антиоксидационих ензима (SOD и CAT) (202). Истраживање на културама мишијих ћелија H9c2 је указало да цисплатина може и у овим условима да изазове велику продукцију супероксид анјон радикала и тиме покрене апоптозну каскаду (203), што може бити један од механизма кардиотоксичног ефекта.

Наши резултати су показали да је у изолованом срцу веће ослобађање најпотентнијих мерених реактивних кисеоничних врста - супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2) било повезано са хроничном применом цисплатине, лиганда (L_3) и платинским комплексом (K_3), док су у случају паладијумског комплекса (PdL_3) вредности поменутих биомаркера биле најниже (График 20).

Будући да није забележена разлика између цисплатине и платинског комплекса (K_3) можемо закључити да нови платински комплекс није остварио мањи про-оксидациони ефекат у срцу односно да не поседује нижи оксидациони потенцијал од цисплатине. Осим тога, наши налази сугеришу да у односу лиганд (L_3) и платинумски комплекс (K_3), нови паладијумски комплекс (PdL_3) може бити најбезбеднији у погледу срчаних оксидационих оштећења.

Један од потенцијалних разлога за овакав резултат може бити присуство другог метала (паладијума) у самом комплексу уместо платине. Наиме, у једном од ранијих истраживања на културама кардиомиоцита пацова је проучаван утицај комплекса паладијума и алфа-липолне киселине на респираторни ланас митохондрија и продукцију слободних радикала током овог процеса. Сугерисано је да паладијум у овом комплексу може да помогне у ефикаснијем одвијању митохондријалног дусања и тиме рационалнијој и уравнотеженој производњи слободних радикала, што може да буде повезано са мањим оксидационим оштећењима кардиомиоцита поготово током интензивних контракција и потребе за енегријом (204).

Међутим, треба имати на уму да је број студија које су се бавиле овом проблематиком изузетно оскудан и нерепрезентативан да би послужио компарацији са овим истраживањем.

Поред тога, подаци који у помињани у претходној студији се морају узети са резервом будући да су базирани на потпуно различитом дизајну у односу на нашу студију. Ове чињенице нас зато наводе на тврдњу да су за прецизније и сигурније извођење закључака поводом ове тематике потребна нова и комплекснија истраживања.

Као што је напоменуто, у садашњој студији се осим срчаног пратила динамика и маркера системског оксидационог стреса путем одређивања концентрације поменутих про-оксиданаца као и активности ензима антиоксидационе заштите. На овај начин се омогућава комплетан увид у системску редокс хомеостазу пацова.

Наши резултати су показали да је највеће системско ослобађање супероксид анјон радикала (O_2^-) било повезано са хроничном применом комплекса четворовалентне платине (K_3), док је липидна пероксидација била најизраженија након апликације самог лиганда (L_3) (График 24). С обзиром да је повећана продукција поменутих про-оксидационих биомаркера забележена након апликације лиганда (O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) пропаноата (L_3)), како самостално тако и у комплексу са Pt(IV), очигледно је да оба новосинтетисана једињења могу потенцирати настанак системског оксидационог стреса и тиме евентуална оксидациона оштећења.

Осим ових запажања из наших резултата се могу извести додатне смернице. Прво, у свим наведеним случајевима најниже вредности већине мерених про-оксиданаса су биле уочене у групи којој је администриран двовалентни паладијумски комплекс (PdL_3), што је било запажено и приликом анализе срчаних про-оксидационих параметара.

Ови налази индикују да нови паладијумски комплекс (PdL_3) остварује најмањи про-оксидациони потенцијал који може бити последица приуства паладијума уместо платине (205). На овај начин би се и могло објаснити како у једном комплексу (PdL_3) нови лиганд (L_3) стимулише веће а у другом комплексу (K_3) стимулише мање ослобађање реактивних кисеоничних врста и њихових индикатора.

Друго, интересантно је да у поређењу са цисплатином ниједно од поменутих новосинтетисаних једињења није показало мањи про-оксидациони потенцијал, на основу чега можемо да закључимо да у погледу системског про-оксидационог одговора цисплатина (у овој дози и дужини експозиције) и даље има пожељнији ефекат од новог испитиваног лиганда и његових комплекса са платином и паладијумом.

Са аспекта компарације ових резултата са биомаркерима оксидационог стреса пореклом из изолованог срца може се уочити да цисплатина остварује супротна оксидациона дејства у срцу и организму у целини, док паладијумски комплекс (PdL₃) у оба случаја има конзистентно мање штетан утицај у односу на лиганд (L₃) и платински комплекс (K₃). У том смислу чини се да се оксидациони ефекти металних анти-неопластичних једињења морају посматрати и изоловано и системски будући да не морају обавезно имати идентичан учинак на нивоу појединачног органа и целокупног организма.

5.5. Утицај хроничне адиминистрације лиганда (L₃), његових комплекса [PtCl₄{(S,S)-Et₂eddch}] (K₃), [PdCl₂{(S,S)-Et₂eddch}] (PdL₃) и цисплатине на параметре антиоксидационог система заштите пацова

У циљу формирања комплетне редокс слике и процене системског редокс баланса пацова након апликације испитиваних једињења, поред про-оксидационих индикатора код пацова смо одређивали и активност главних антиоксидационих ензима заштите (SOD – супероксид дисмутаза, CAT – каталаза и GSH – редукованог глутатиона).

Као што је познато цитостатици осим појачане продукције реактивних кисеоничних и азотних врста могу изазвати и депресију активности антиоксидационог система заштите (192-194, 202, 203). На тај начин се умањује способност одржавања оксидационе контроле односно неутрализација акумулураних слободних радикала и других поменутих молекула што додатно потенцира настанак оксидационог стреса и тиме оштећења ћелија. Управо је ово један од главних механизма кардиотоксичног дејства цисплатине и сличних једињења (175, 189, 191).

У претходно спроведеном истраживању је измеђуосталог испитиван утицај цисплатине примењене у дози од 7 mg/kg на ензиме антиоксидационе заштите у срцу пацова. Забележено је да је активност свих одређиваних антиоксидационих ензима (редукованог глутатиона GSH, глутатион пероксидазе GPx и каталазе CAT) била драстично снижена у ткиву срца што је било у корелацији са патохистолошким оштећењима срчаног мишића (206).

Busari и сарадници су у недавно публикованој студији проучавали ефекат цисплатине на серумске концентрације SOD, CAT, и GSH и указали да је шестодневни третман овим цитостатиком био повезан са смањеном концентрацијом поменутих ензима и повећаном продукцијом системских маркера функције различитих органа (207).

Са друге стране поред повезаност цисплатине и антиоксидационих ензима не мора увек да има један смер односно да цисплатина утиче односно мења ензимску активност као што је доказано у великом броју студија. Наиме, последња истраживања су сугерисала и да антиоксидативни ензими тј. њихови доноси примењени егзогено могу да делују на овај цитостатик. Тако је уочено да Темпол као миметик супероксид дизмутазе примењен током седам дана у дози од 50 mg/kg може да ублажи нефротоксично дејство цисплатине и да снажно мобилише активност ендогених ензима у бубрегу SOD и GSH (208). Сва ова сазнања указују да је интеракција цисплатине и ензимских антиоксиданаса веома заступљена, може се одвијати у оба правца и као таква јесте јако важна у оксидационим ефектима цисплатине и умањењу штетених ефеката исте.

За разлику од добро проучених утицаја цисплатине на антиоксидациони систем заштите, утицаји других металних цитостатских агенаса је много мање познат док су истраживања на ову тему веома ретка. Раније студије су показале да паладијумски јони могу да инхибирају активност већине интраћелијских ензима, док је његова метална форма нетоксична, што може бити корисно у објашњењу и наших резултата (209-212).

Поред тога, постоје индикације да је паладијум у облику органских једињења не само нетоксичан, већ може да испољи и антиоксидациона својства (204, 213). Најбоњи пример за ову тврдњу је алфа-липоична киселина чији су антиоксидациони ефекти пет пута јачи у комплексу са паладијумом (213).

У једној од ретких студија која се односила на ову проблематику је испитиван ефекат комплекса паладијума и алфа-липоичне киселине на хипергликемију и антиоксидациони статус дијабетичних пацова (214). Након 5 дана примене комплекса у дози од 0,5 ml/kg аутори су уочили да су активности супероксид дизмутазе, редукованог глутатиона, глутатион пероксидазе и каталазе биле значајно повећане. Са аспекта компарације са нашом студијом важно је напоменути да је паладијум у овом случају био везан за алфа-липоичну киселину која поседује изразита антиоксидациона својства те се и у томе може потражити објашњење за овакав ефекат паладијума.

Са друге стране, наши резултати су показали да је третман новосинтетисаним једињењима (L_3 , K_3 и PdL_3), иако не статистички, био повезан са већим вредностима супероксид дизмутазе и редукованог глутатиона док је активност каталазе била изразито већа након апликације лиганда (L_3) у компарацији са цисплатином (График 28). На овај начин изгледа да нова испитивана једињења могу бити ефикаснија у стимулацији антиоксидационе ензимске заштите у односу на цисплатину.

Може се претпоставити да би након дуже експозиције испитиваним једињењима ова разлика у односу на цисплатину била сигнификантна и евидентнија. Осим тога, ови налази сугеришу да пре свега нови лиганд (L_3) али и његови комплекси са четворовалентном платином (K_3) и двовалентним паладијумом (PdL_3) имају респектабилан и обећавајући потенцијал ка мобилизацији антиоксидационих ензима. Узевши у обзир овај њихов ефекат чини се да би са овог аспекта требало да завреде већу пажњу будућих истраживања.

VI.
ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата добијених у овој студији можемо извести следеће закључке:

1. За разлику од цисплатине, лиганд самостално (L_3) и у оквиру $Pt(IV)$ комплекса не ремети метаболичке процесе у организму тј. не омета нормалан прираст телесне тежине пацова, док у комбинацији са паладијумом ови нежељени ефекти нису избегнути. Ови резултати могу бити од значаја с обзиром да показују да само одређена комбинација металних јона и лиганда обезбеђује сигурну употребу ових цитостатских агенаса са поменутог аспекта.
2. Након сумације свих налаза који се односе на биохемијске маркере за процену функције јетре, бубрега и липидног статуса можемо закључити да сви испитивани агенси који су били администрирани у примењеној дози и дужини експозиције нису били повезани са биохемијским променама функције јетре и бубрега односно липидног метаболизма и са овог становишта могу бити безбедни за употребу.
3. Генерално посматрано, хронична апликација цисплатине, L_3 лиганда и K_3 и PdL_3 комплекса није била повезана са променама кардиодинамских варијабли током ауторегулаторног ранга односно није пореметила функцију и перфузију срца у периоду ауторегулације (Графици 1, 3, 5). Ови налази показују да у примењеној дози и дужини експозиције ниједно од испитиваних једињења није оштетило функцију изолованог срца пацова тј. нису остварили кардиодепресивни ефекат.
4. Наши резултати су показали да је у изолованом срцу веће ослобађање најпотентнијих мерених реактивних кисеоничних врста - супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2) било повезано са хроничном применом цисплатине, лиганда (L_3) и платинским комплексом (K_3), док су у случају паладијумског комплекса (PdL_3) вредности поменутих биомаркера биле најниже.
5. Најниже вредности већине системских про-оксиданаса су биле уочене у групи којој је администриран двовалентни паладијумски комплекс (PdL_3), што је било запажено и приликом анализе срчаних про-оксидационих параметара. У поређењу са цисплатином ниједно од поменутих новосинтетисаних једињења није показало мањи про-оксидациони потенцијал.

6. Третман новосинтетисаним једињењима (L_3 , K_3 и PdL_3) је био повезан са (несигнификантно) већим вредностима супероксид дизмутазе и редукованог глутатиона док је активност каталазе била изразито већа након апликације лиганда (L_3) у компарацији са цисплатином. На овај начин изгледа да нова испитивана једињења могу бити ефикаснија у стимулацији антиоксидационе ензимске заштите у односу на цисплатину.
7. Ови резултати сугеришу да пре свега нови лиганд (L_3) али и његови комплекси са четворовалентном платином (K_3) и двовалентним паладијумом (PdL_3) имају респектабилан и обећавајући потенцијал ка мобилизацији антиоксидационих ензима. Узевши у обзир овај њихов ефекат чини се да би са овог аспекта требало да завреде већу пажњу будућих истраживања.

VII.
ЛИТЕРАТУРА

1. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, Habib G, Lenihan DJ, Lip GY, Lyon AR, Lopez Fernandez T, Mohty D, Piepoli MF, Tamargo J, Torbicki A, Suter TM, Zamorano JL, Aboyans V, Achenbach S, Agewall S, Badimon L, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Carerj S, Dean V, Erol Ç, Fitzsimons D, Gaemperli O, Kirchhof P, Kolh P, Lancellotti P, Lip GY, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Roffi M, Torbicki A, Vaz Carneiro A, Windecker S; Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); Document Reviewers. 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 J Heart Fail.* 2017;19(1):9-42.
2. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979;91(5):710-7.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-403.
4. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(24):2231-47.
5. Clark RA, Berry NM, Chowdhury MH, McCarthy AL, Ullah S, Versace VL, Atherton JJ, Koczwara B, Roder D. Heart failure following cancer treatment: characteristics, survival and mortality of a linked health data analysis. *Intern Med J.* 2016;46(11):1297-1306.
6. Raschi E, De Ponti F. Cardiovascular toxicity of anticancer-targeted therapy: emerging issues in the era of cardio-oncology. *Intern Emerg Med.* 2012;7(2):113-31.
7. 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; ESC Scientific Document Group. 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(36):2768-2801.
8. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(9):547-58.
9. Kerkela R, Woulfe KC, Durand JB, Vagnozzi R, Kramer D, Chu TF, Beahm C, Chen MH, Force T. Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase. *Clin Transl Sci.* 2009;2(1):15-25.
10. Ewer MS, Lippman SM. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol.* 2005;23(13):2900-2.
11. Shelburne N, Adhikari B, Brell J, Davis M, Desvigne-Nickens P, Freedman A, Minasian L, Force T, Remick SC. Cancer treatment-related cardiotoxicity: current state of knowledge and future research priorities. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9). pii: dju232.
12. Todaro MC, Oreto L, Qamar R, Paterick TE, Carerj S, Khandheria BK. Cardioncology: state of the heart. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):680-7.
13. Hall PS, Harshman LC, Srinivas S, Witteles RM. The frequency and severity of cardiovascular toxicity from targeted therapy in advanced renal cell carcinoma patients. *JACC Heart Fail.* 2013;1(1):72-8.

14. Kim KW, Shinagare AB, Krajewski KM, Pyo J, Tirumani SH, Jagannathan JP, Ramaiya NH. Fluid retention associated with imatinib treatment in patients with gastrointestinal stromal tumor: quantitative radiologic assessment and implications for management. *Korean J Radiol.* 2015;16(2):304-13.
15. Ewer MS, Suter TM, Lenihan DJ, Niculescu L, Breazna A, Demetri GD, Motzer RJ. Cardiovascular events among 1090 cancer patients treated with sunitinib, interferon, or placebo: a comprehensive adjudicated database analysis demonstrating clinically meaningful reversibility of cardiac events. *Eur J Cancer.* 2014;50(12):2162-70.
16. Kosmas C, Kallistratos MS, Kopterides P, Syrios J, Skopelitis H, Mylonakis N, Karabelis A, Tsavaris N. Cardiotoxicity of fluoropyrimidines in different schedules of administration: a prospective study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(1):75-82.
17. Lestuzzi C, Crivellari D, Rigo F, Viel E, Meneguzzo N. Capecitabine cardiac toxicity presenting as effort angina: a case report. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2010;11(9):700-3.
18. Fukuda A, Tahara K, Hane Y, Matsui T, Sasaoka S, Hatahira H, Motooka Y, Hasegawa S, Naganuma M, Abe J, Nakao S, Takeuchi H, Nakamura M. Comparison of the adverse event profiles of conventional and liposomal formulations of doxorubicin using the FDA adverse event reporting system. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185654.
19. Bloom MW, Hamo CE, Cardinale D, Ky B, Nohria A, Baer L, Skopicki H, Lenihan DJ, Gheorghiane M, Lyon AR, Butler J. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure: Part 1: Definitions, Pathophysiology, Risk Factors, and Imaging. *Circ Heart Fail.* 2016;9(1):e002661.
20. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(26):2666-76.
21. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(4):792-9.
22. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(5):427-34.
23. Raschi E, De Ponti F. Cardiovascular toxicity of anticancer-targeted therapy: emerging issues in the era of cardio-oncology. *Intern Emerg Med.* 2012;7(2):113-31.
24. Gupta R, Maitland ML. Sunitinib, hypertension, and heart failure: a model for kinase inhibitor-mediated cardiotoxicity. *Curr Hypertens Rep.* 2011;13(6):430-5.
25. Wu S, Chen JJ, Kudelka A, Lu J, Zhu X. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2008;9(2):117-23.
26. Herrmann J, Yang EH, Iliescu CA, Cilingiroglu M, Charitakis K, Hakeem A, Toutouzas K, Leeser MA, Grines CL, Marmagkiolis K. Vascular Toxicities of Cancer Therapies: The Old and the New--An Evolving Avenue. *Circulation.* 2016;133(13):1272-89.
27. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood.* 2008;111(10):4902-7.

28. Levine M, Hirsh J, Gent M, et al. Double-blind randomised trial of a very-low-dose warfarin for prevention of thromboembolism in stage IV breast cancer. *Lancet*. 1994;343:886–889.
29. Couban S, Goodyear M, Burnell M, et al. Randomized placebo-controlled study of low-dose warfarin for the prevention of central venous catheter-associated thrombosis in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:4063–4069.
30. Verso M, Agnelli G, Bertoglio S, et al. Enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism associated with central vein catheter: a double-blind, placebo-controlled, randomized study in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23:4057–4062.
31. Moore RA, Adel N, Riedel E, Bhutani M, Feldman DR, Tabbara NE, Soff G, Parameswaran R, Hassoun H. High incidence of thromboembolic events in patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a large retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2011;29(25):3466-73.
32. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Richardson PG, San Miguel J, Barlogie B, Harousseau J, Zonder JA, Cavo M, Zangari M, Attal M, Belch A, Knop S, Joshua D, Sezer O, Ludwig H, Vesole D, Bladé J, Kyle R, Westin J, Weber D, Bringhen S, Niesvizky R, Waage A, von Lilienfeld-Toal M, Lonial S, Morgan GJ, Orlowski RZ, Shimizu K, Anderson KC, Boccadoro M, Durie BG, Sonneveld P, Hussein MA; International Myeloma Working Group. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia*. 2008;22(2):414-23.
33. Wiczer TE, Levine LB, Brumbaugh J, Coggins J, Zhao Q, Ruppert AS, Rogers K, McCoy A, Mousa L, Guha A, Heerema NA, Maddocks K, Christian B, Andritsos LA, Jaglowski S, Devine S, Baiocchi R, Woyach J, Jones J, Grever M, Blum KA, Byrd JC, Awan FT. Cumulative incidence, risk factors, and management of atrial fibrillation in patients receiving ibrutinib. *Blood Adv*. 2017;1(20):1739-1748.
34. Setteyova L, Bacharova L, Mladosevicova B. QT prolongation due to targeted anticancer therapy. *Oncoreview* 2016;6:A103-112.
35. Chang HM, Moudgil R, Scarabelli T, Okwuosa TM, Yeh ETH. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:2536-51.
36. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
37. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, et al. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009; 33:325–31.
38. Ballout FA, Manshad AS, Okwuosa TM. Pulmonary Hypertension and Cancer: Etiology, Diagnosis, and Management. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2017; 19:44.
39. Galie N, Simonneau G. The Fifth World Symposium on Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62:D1–3.
40. Rasheed W, Flaim B, Seymour JF. Reversible severe pulmonary hypertension secondary to dasatinib in a patient with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2009; 33:861–4.
41. Shah NP, Wallis N, Farber HW, et al. Clinical features of pulmonary arterial hypertension in patients receiving dasatinib. *Am J Hematol*. 2015; 90:1060–4.
42. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016; 34:2333–40.

43. Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, Bouvaist H, Canuet M, Pison C, Macro M, Poubeau P, Girerd B, Natali D, Guignabert C, Perros F, O'Callaghan DS, Jaïs X, Tubert-Bitter P, Zalcman G, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation*. 2012;125(17):2128-37.
44. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991;324(12):808-15.
45. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*. 1979;91(5):710-7.
46. Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, Daniels JR. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep*. 1978 Jun;62(6):873-9.
47. Chlebowski RT. Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *West J Med*. 1979;131(5):364-8.
48. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003;97(11):2869-79.
49. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(9):938-45.
50. Pacciarini MA, Barbieri B, Colombo T, Broggin M, Garattini S, Donelli MG. Distribution and antitumor activity of adriamycin given in a high-dose and a repeated low-dose schedule to mice. *Cancer Treat Rep*. 1978;62(5):791-800.
51. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*. 1983;43(2):460-72.
52. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-42.
53. Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, Sawyer DB. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(9):8290-9.
54. Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005;131(5):561-78.
55. Colombo A, Cardinale D. Using cardiac biomarkers and treating cardiotoxicity in cancer. *Future Cardiol*. 2013;9(1):105-18.
56. Ewer MS, Ali MK, Mackay B, Wallace S, Valdivieso M, Legha SS, Benjamin RS, Haynie TP. A comparison of cardiac biopsy grades and ejection fraction estimations in patients receiving Adriamycin. *J Clin Oncol*. 1984;2(2):112-7.
57. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, Ganame J, Sebag IA, Agler DA, Badano LP, Banchs J, Cardinale D, Carver J, Cerqueira M, DeCara JM, Edvardsen T, Flamm SD, Force T, Griffin BP, Jerusalem G, Liu JE, Magalhães A, Marwick T, Sanchez LY, Sicari R, Villarraga HR, Lancellotti P. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2014;27(9):911-39.
58. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco

- F, Bee V, Buysse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1273-83.
59. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Sledge GW, Kaufman PA, Hudis CA, Martino S, Gralow JR, Dakhil SR, Ingle JN, Winer EP, Gelmon KA, Gersh BJ, Jaffe AS, Rodeheffer RJ. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1231-8.
60. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE Jr, Ewer M, Keefe D, Shannon RP, Swain SM, Brown A, Fehrenbacher L, Vogel VG, Seay TE, Rastogi P, Mamounas EP, Wolmark N, Bryant J. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7811-9.
61. Fan L, Goh BC, Wong CI, Sukri N, Lim SE, Tan SH, Guo JY, Lim R, Yap HL, Khoo YM, Iau P, Lee HS, Lee SC. Genotype of human carbonyl reductase CBR3 correlates with doxorubicin disposition and toxicity. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(7):621-31.
62. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(10):564-75.
63. Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Miller TL, Barry EV, Asselin BL, Athale U, Clavell LA, Larsen E, Moghrabi A, Samson Y, Michon B, Schorin MA, Cohen HJ, Neuberg DS, Orav EJ, Colan SD. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(10):950-61.
64. Register S, Takita C, Reis I, Zhao W, Amestoy W, Wright J. Deep inspiration breath-hold technique for left-sided breast cancer: An analysis of predictors for organ-at-risk sparing. *Med Dosim*. 2015 Spring;40(1):89-95.
65. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Yap HY, Wallace S, Ewer M, Blumenschein GR, Freireich EJ. Adriamycin therapy by continuous intravenous infusion in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*. 1982;49(9):1762-6.
66. Buzdar AU, Hortobagyi GN, Kau SW, Smith TL, Fraschini G, Holmes FA, Gutterman JU, Hug VM, Singletary SE, Ames FC, et al. Adjuvant therapy with escalating doses of doxorubicin and cyclophosphamide with or without leukocyte alpha-interferon for stage II or III breast cancer. *J Clin Oncol*. 1992;10(10):1540-6.
67. Lipshultz SE, Miller TL, Lipsitz SR, Neuberg DS, Dahlberg SE, Colan SD, Silverman LB, Henkel JM, Franco VI, Cushman LL, Asselin BL, Clavell LA, Athale U, Michon B, Laverdière C, Schorin MA, Larsen E, Usmani N, Sallan SE; Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium. Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-term Cardiac Outcomes. *Pediatrics*. 2012;130(6):1003-11.
68. Pisano C, Cecere SC, Di Napoli M, Cavaliere C, Tambaro R, Facchini G, Scaffa C, Losito S, Pizzolorusso A, Pignata S. Clinical trials with pegylated liposomal Doxorubicin in the treatment of ovarian cancer. *J Drug Deliv*. 2013;2013:898146.

69. Hortobagyi GN, Yap HY, Kau SW, Frascini G, Ewer MS, Chawla SP, Benjamin RS. A comparative study of doxorubicin and epirubicin in patients with metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1989;12(1):57-62.
70. van Dalen EC, Michiels EM, Caron HN, Kremer LC. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(4):CD005006.
71. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-42.
72. Sparano JA, Speyer J, Gradishar WJ, Liebes L, Sridhara R, Mendoza S, Fry D, Egorin MJ. Phase I trial of escalating doses of paclitaxel plus doxorubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(3):880-6.
73. Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchine JR, Gams RA. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997;15(4):1318-32..
74. Hochster H, Liebes L, Wadler S, Oratz R, Wernz JC, Meyers M, Green M, Blum RH, Speyer JL. Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(22):1725-30.
75. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, Martinelli G, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 2006;114(23):2474-81.
76. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, Inanc T, Oguzhan A, Eryol NK, Topsakal R, Ergin A. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2258-62.
77. Bosch X, Rovira M, Sitges M, Domènech A, Ortiz-Pérez JT, de Caralt TM, Morales-Ruiz M, Perea RJ, Monzó M, Esteve J. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (preventiOn of left Ventricular dysfunction with Enalapril and caRvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(23):2355-62.
78. Kalam K, Marwick TH. Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013;49(13):2900-9.
79. De Keulenaer GW, Doggen K, Lemmens K. The vulnerability of the heart as a pluricellular paracrine organ: lessons from unexpected triggers of heart failure in targeted ErbB2 anticancer therapy. *Circ Res*. 2010;106(1):35-46.
80. Ozelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hübner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8880-5.
81. Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J Jr, Chien KR, Lee KF. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med*. 2002;8(5):459-65.
82. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a

- monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.
83. Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(9):938-45.
 84. Guarneri V, Lenihan DJ, Valero V, Durand JB, Broglio K, Hess KR, Michaud LB, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Long-term cardiac tolerability of trastuzumab in metastatic breast cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol.* 2006;24(25):4107-15.
 85. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):7820-6.
 86. Weiss RB. Mitoxantrone: its development and role in clinical practice. *Oncology (Williston Park).* 1989;3(6):135-41.
 87. Benjamin RS, Chawla SP, Ewer MS, Carrasco CH, Mackay B, Holmes F. Evaluation of mitoxantrone cardiac toxicity by nuclear angiography and endomyocardial biopsy: an update. *Invest New Drugs.* 1985;3(2):117-21.
 88. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
 89. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965;205:698-9.
 90. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
 91. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;42(3):317-25.
 92. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs.* 1993 Sep;46(3):360-377.
 93. Ho GY, Woodward N, Coward JJ. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;102:37-46.
 94. O'Dwyer PJ, Johnson SW. Current status of oxaliplatin in colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2003;30(3 Suppl 6):78-87.
 95. Jacobs SS, Fox E, Dennie C, Morgan LB, McCully CL, Balis FM. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin in nonhuman primates. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1669-74.
 96. Goodsell DS. The molecular perspective: cisplatin. *Oncologist.* 2006;11(3):316-7.
 97. Natarajan G, Malathi R, Holler E. Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(10):1625-9.
 98. Rozenzweig M, Canetta R, Carter SK. Carboplatin: the clinical evaluation strategy. *Cancer Treat Rev.* 1985;12 Suppl A:137-44.
 99. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol.* 1999;17(1):409-22.
 100. Rodríguez-Fernández E, Manzano JL, Alonso A, Almendral MJ, Pérez-Andrés M, Orfao A, Criado JJ. Fluorescent cisplatin analogues and cytotoxic activity. *Curr Med Chem.* 2009;16(32):4314-27.

101. Sánchez-Paradinas S, Pérez-Andrés M, Almendral-Parra MJ, Rodríguez-Fernández E, Millán A, Palacio F, Orfao A, Criado JJ, Fuentes M. Enhanced cytotoxic activity of bile acid cisplatin derivatives by conjugation with gold nanoparticles. *J Inorg Biochem.* 2014;131:8-11.
102. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):48-58.
103. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(6):1176-1183.
104. de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg ME, van den Bent MJ, Planting AS, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer.* 2003;88(8):1199-206.
105. Al-Majed AA. Carnitine deficiency provokes cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100(3):145-50.
106. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol.* 2010;62(1):45-52.
107. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res.* 2006;53(3):278-86.
108. Gerl A, Schierl R. Urinary excretion of platinum in chemotherapy-treated long-term survivors of testicular cancer. *Acta Oncol.* 2000;39(4):519-22.
109. Oun R, Rowan E. Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disturbance of the SA node? *Eur J Pharmacol.* 2017;811:125-128.
110. Raja W, Mir MH, Dar I, Banday MA, Ahmad I. Cisplatin induced paroxysmal supraventricular tachycardia. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2013;34(4):330-2.
111. Canobbio L, Fassio T, Gasparini G, Caruso G, Barzan L, Comoretto R, Brema F, Villani F. Cardiac arrhythmia: possible complication from treatment with cisplatin. *Tumori.* 1986;72(2):201-4.
112. Fassio T, Canobbio L, Gasparini G, Villani F. Paroxysmal supraventricular tachycardia during treatment with cisplatin and etoposide combination. *Oncology.* 1986;43(4):219-20.
113. Tassinari D, Sartori S, Drudi G, Panzini I, Gianni L, Pasquini E, Abbasciano V, Ravaioli A, Iorio D. Cardiac arrhythmias after cisplatin infusion: three case reports and a review of the literature. *Ann Oncol.* 1997;8(12):1263-7.
114. Glaudemans B, Knoers NV, Hoenderop JG, Bindels RJ. New molecular players facilitating Mg(2+) reabsorption in the distal convoluted tubule. *Kidney Int.* 2010;77(1):17-22.
115. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev.* 1999;25(1):47-58.
116. Ma H, Jones KR, Guo R et al. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 460-5
117. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8

118. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26: 131-8
119. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton (FL, USA): CRC Press, 1985, pp. 177-80
120. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38: 161-70
121. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-6
122. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA; 1984, pp. 83-5
123. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-8
124. Ebaid H, Bashandy SAE, Alhazza IM, Hassan I, Al-Tamimi J. Efficacy of a Methanolic Extract of *Adansonia digitata* Leaf in Alleviating Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Oxidative Stress of Diabetic Rats. *Biomed Res Int*. 2019; 2019:2835152.
125. Newman DJ, Price CP. Renal function and nitrogen metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz. Textbook of Clinical Chemistry* third ed. WB Saunders; Philadelphia: 1999. pp. 1204-1264.
126. Brouwers B, Pruniau VP, Cauwelier EJ, et al. Phlorizin pretreatment reduces acute renal toxicity in a mouse model for diabetic nephropathy. *J Biol Chem*. 2013;288(38):27200-7.
127. Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971;31:87-96.
128. Tietz NW, *Fundamental of clinical chemistry*. 3rd ed. Carl AB, Edward RA (ed.). W. B. Saunders, Co, 1999.
129. Jahromi ZE, Divsalar E, Saboury A, Khaleghizadeh A, Mansouri-Torshizi S, Kostova I. Palladium complexes: New candidates for anti-cancer drugs. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2016; 13(5): 967-989.
130. Wheate, N., Walker, S., Craig, G., Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*. 2010; 39: 8113-8127.
131. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-based Cancer Chemotherapy. 2007; 7: 573-584.
132. Jamieson, E., Lippard, S.J. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev*. 1999; 99: 2467-2498.
133. Dasari, S., Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol*. 2014; 11: 364-378.
134. Siddik, H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279.
135. Patane, S. Cardiotoxicity: cisplatin and long-term cancer survivors. *Int. J. Cardiol*. 2014; 175: 201-201.
136. El-Awady, S., Moustafa, M., Abo-Elmatty, M., Radwan, A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: mechanisms and cardioprotective strategies. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2011; 650, 335-341.
137. Gerl, A., Schierl, R. Urinary excretion of platinum in chemotherapy-treated long term survivors of testicular cancer. *Acta Oncol*. 2000; 39, 519-522.

138. Stojic IM, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic JN, Jeremic NS, Djuric DM, Radonjic KG, Labudovic-Borovic M, Bugarcic ZD, Bogojeski J, Novokmet SS. The perfusion of cisplatin and cisplatin structural analogues through the isolated rat heart: The effects on coronary flow and cardiodynamic parameters. *Gen Physiol Biophys*. 2018 Sep;37(5):515-525.
139. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, Radonjic KG, Bugarcic ZD, Jakovljevic VLJ, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem*. 2018 Feb;439(1-2):19-33.
140. Alhadeff AL, Holland RA, Zheng H, Rinaman L, Grill HJ, De Jonghe BC. Excitatory Hindbrain-Forebrain Communication Is Required for Cisplatin-Induced Anorexia and Weight Loss. *J Neurosci*. 2017 Jan 11;37(2):362-370. doi:
141. Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VL. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. *Mol Cell Biochem*. 2019 Apr 15. doi: 10.1007/s11010-019-03533-8.
142. Lin MT, Ko JL, Liu TC, Chao PT, Ou CC. Protective Effect of Methionine on Body Weight Loss, Anorexia, and Nephrotoxicity in Cisplatin-Induced Chronic Toxicity in Rats. *Integr Cancer Ther*. 2018 Sep;17(3):813-824.
143. Cabezas PA, Vera G, Castillo M, Fernández-Pujol R, Martín MI, Abalo R. Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Auton Neurosci*. 2008;141:54-65.
144. Gong Y, Liu Y, Liu F, et al. Ghrelin fibers from lateral hypothalamus project to nucleus tractus solitaries and are involved in gastric motility regulation in cisplatin-treated rats. *Brain Res*. 2017;1659:29-40.
145. Takeda H, Sadakane C, Hattori T, et al. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology*. 2008;134:2004-2013.
146. Vera G, Chiarlone A, Martín MI, Abalo R. Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats. *Auton Neurosci*. 2006;126-127:81-92.
147. Garcia JM, Scherer T, Chen JA, et al. Inhibition of cisplatin-induced lipid catabolism and weight loss by ghrelin in male mice. *Endocrinology*. 2013;154(9):3118–3129. doi:10.1210/en.2013-1179.
148. Abdel-Gayoum AA, El-Jenjan KB, Ghwarsha KA. Hyperlipidaemia in cisplatin-induced nephrotic rats. *Hum Exp Toxicol*. 1999 Jul;18(7):454-9.
149. Aberare OL, Okuonghae P, Mukoro N, et al. Triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in rats exposed to premium motor spirit fumes. *N Am J Med Sci*. 2011;3(6):277–280.
150. Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem*. 2007 May;388(5):547-54.
151. Bakır S, Yazgan ÜC, İbiloğlu İ, Elbey B, Kızıl M, Kelle M. The protective effect of pomegranate extract against cisplatin toxicity in rat liver and kidney tissue. *Arch Physiol Biochem*. 2015;121(4):152-6.
152. Katanić J, Matic S, Pferschy-Wenzig EM, Kretschmer N, Boroja T, Mihailović V, Stanković V, Stanković N, Mladenović M, Stanić S, Mihailović M, Bauer R. Filipendula

- ulmaria extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: In vivo investigation and LC-MS analysis. *Food Chem Toxicol.* 2017 Jan;99:86-102.
153. Fulco BCW, Jung JTK, Chagas PM, Quines CB, Nogueira CW, Zeni GR. Pattern differences between newborn and adult rats in cisplatin-induced hepatorenal toxicity. *Chem Biol Interact.* 2018 Oct 1;294:65-73.
154. Bishr A, Sallam N, Nour El-Din M, Awad AS, Kenawy SA. Ambroxol attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via inhibition of p-JNK/p-ERK. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019 Jan;97(1):55-64.
155. Mistic MM, Jakovljevic VL, Bugarcic ZD, Zivkovic VI, Srejovic IM, Barudzic NS, Djuric DM, Novokmet SS. Platinum Complexes-Induced Cardiotoxicity of Isolated, Perfused Rat Heart: Comparison of Pt(II) and Pt(IV) Analogues Versus Cisplatin. *Cardiovasc Toxicol.* 2015 Jul;15(3):261-8.
156. Rosic G, Srejovic I, Zivkovic V, Selakovic D, Joksimovic J, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced cardiotoxicity on isolated rat hearts after short-term global ischemia. *Toxicol Rep.* 2015;2:996–1006.
157. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* 2000; 22:263–302.
158. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa MA, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-Carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res.* 2006; 53:278–286.
159. Raja W, Mir MH, Dar I, Banday MA, Ahmad I. cisplatin induced paroxysmal supraventricular tachycardia. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2013; 34:330–2.
160. Guglin M, Aljayeh M, Saiyad S, Ali R, Curtis AB. Introducing a new entity: chemotherapy-induced arrhythmia. *Europace.* 2009; 11:1579–1586.
161. Ozcan T, Cirit A, Kiykim A. Recurrent complete atrioventricular block during cisplatin infusion: a case report. *J Clin Exp Cardiol.* 2011; 2:151.
162. Khan S, Chen CL, Brady MS, et al. Unstable angina associated with cisplatin and carboplatin in a patient with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30:e163–4.
163. Bano N, Najam R, Qazi F. Adverse cardiac manifestations of cisplatin- a review. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013; 18:80–85.
164. Moore RA, Adel N, Riedel E, et al. High incidence of thromboembolic events in patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a large retrospective analysis. *J Clin Oncol.* 2011; 29:3466–3473.
165. Ryberg M. Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2012; 32:555–559.
166. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-based cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130:688–695.
167. Amit L, Ben-Aharon I, Tichler T, Inbar E, Sulkes A, Stemmer S. Cisplatin-induced posterior reversible encephalopathy syndrome – a brief report and review of the literature. *J Behav Brain Sci.* 2012; 2:97–101.
168. Kolb R, Ghazi M, Barfuss D. Inhibition of basolateral transport and cellular accumulation of cDDP and N-acetyl-L-cysteine-cDDP by TEA and PAH in the renal proximal tubule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2003; 51:132–138.
169. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via human organ cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005; 167:1477–84.

170. Grube M, Ameling S, Noutsias M, et al. Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2011; 178:2547–59.
171. Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctrl contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296:F505–F511.
172. Kim BE, Turski ML, Nose Y, Casad M, Rockman HA, Thiele DJ. Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs. *Cell Metab.* 2010; 11:353–363.
173. Townsend DM, Tew KD, Lin H, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione-S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed & Pharmacother.* 2009; 63:79–85.
174. Paolicchi A, Sotiropoulou M, Perego P, et al. γ -Glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. *Eur J Cancer.* 2002; 39:996–1003.
175. Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 387:78–84.
176. Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, Liedert B, et al. Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J Neuro.* 2007; 27:9451–9457.
177. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-acute renal injury. *Kid Int.* 2001; 60:2118–2128.
178. El-Awady, el-SE., Moustafa, YM., Abo-Elmatty, DM., Radwan, A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2011; 650:335–41.
179. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. Mitochondria as a critical target of the therapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39:43–50.
180. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:307320.
181. Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. *Med Ped Oncol.* 2003; 41:186–189.
182. Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Nielsen S, et al. Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56:535–542.
183. Ali BH, Al-Moundhri M, Tageldin M, et al. Ontogenic aspects of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46:3355–3359.
184. Chang BJ, Nishikawa M, Sato E, Utsumi K, Inoue M. L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 405:55–64.
185. Portilla D, Dai G, McClure T, Bates L, et al. Alterations of PPAR α and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2002; 62:1208–19.
186. Khan SA, McLean MK. Toxicology of frequently encountered nonsteroid anti-inflammatory drugs in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012; 42:289–306.

187. Ramesh G, Reeves WB. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 2002; 110:835–842.
188. Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF- α production by renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 2007; 292:812–819.
189. Jiang M, Wang CY, Huang S, Yang T, Dong Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009:F983–F993.
190. Lee RH, Song JM, Park MY, et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62:1013–1023.
191. Yin X, Apostolov EO, Shah SV, et al. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:2544–2553.
192. Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitors STI571. *Chem Biol Interact.* 2004; 147:309–318.
193. Karthikeyan K, Saralabai-Bai BR, Niranjali-Devaraj S. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int J Cardiol.* 2007; 115:326–333.
194. Demkow, U., Bialas-Chromiec, B., Stelmaszczyk-Emmel, et al. The cardiac markers and oxidative stress parameters in advanced non-small cell lung cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *eJIFCC.* 2011.
www.ifcc.org/media/58796/ejifcc_v22_01_02.pdf
195. Mattson DM, Ahmad IM, Dayal D, et al. Cisplatin combined with zidovudine enhances cytotoxicity and oxidative stress in human head and neck cancer cells via a thiol-dependent mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46:232–237.
196. Nakhaee A, Bokaeian M, Noori S, Mahboob T. Antioxidant effect of carnosine pretreatment on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Indian J Clin Biochem.* 2010; 25:86–91.
197. Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi MLP. Protective effects of Vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res.* 2000; 41:405–411.
198. Chirino YI, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology.* 2008; 245:18–23.
199. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lip peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol.* 2004; 23:29–34.
200. Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280:638–649.
201. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:2683–2690.
202. Soliman F, anees LM, Ibrahim DM. Cardioprotective effect of zingerone against oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by cisplatin or gamma radiation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2018; 391(8): 819-832.

203. Zhang P, Yi LH, Meng GY, Zhang HY, Sun HH, Cui LQ. Appelin-13 attenuates cisplatin-induced cardiotoxicity through inhibition of ROS-mediated DNA damage and regulation of MARKs and AKT pathways. *Free Radic Res* 2017; 51(5): 449-459.
204. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Palladium alpha-lipoic acid complex formulation enhances activities of Krebs cycle dehydrogenases and respiratory complexes I-IV in the heart of aged rats. *Food Chem Toxicol* 2009;47:2124-2128.
205. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy* 2017;11 599–616.
206. Yuce A, Atessahin A, Ceribasi AO, Aksakal M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissues of rats. *Bas Clin Pharm Toxicol* 2007;101(5):345-349.
207. Bussari AA, Adejare AA, Shodipe AF, Oduniyi OA et al. Protective but non-synergistic effects of *Nigella Sativa* and vitamin E against cisplatin-induced renal toxicity and oxidative stress in Wistar rats. *Drug Res (Stuttg)*. 2018;68(12):696-703.
208. Ewees MG, Messiha BAS, Abdel-Bakky MS et al. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2018;1:1-8.
209. Bünger J, Stork J, Stalder K. Cyto- and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1996;69:33-38.
210. Christensen GM. Effects of metal cations and other chemicals upon the in vitro activity of two enzymes in the blood plasma of the white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède). *Chem-Biol. Interact.*, 1971/72, 4, 351-361.
211. Higgins JD, Neely L, Fricker S. Synthesis and cytotoxicity of some cyclometallated palladium complexes. *J. Inorg. Biochem* 1993;49:149-156.
212. Peric T, Jakovljevic VLj, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrovic ZD, Simijonovic D, Novokmet S, Djuric DM, Jankovic SM. Toxic Effects of Palladium Compounds on the Isolated Rat Heart. *Med Chem* 2012;8(1):9-13.
213. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Effect of POLY-MVA, a palladium alpha-lipoic acid complex formulation against declined mitochondrial antioxidant status in the myocardium of aged rats. *Food Chem. Toxicol* 2010;4:1858-1862.
214. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Palladium alpha-lipoic acid complex attenuates alloxan-induced hyperglycemia and enhances the declined blood antioxidant status in diabetic rats. *J Diabetes* 2011;3(4):293-300.

VIII. ПРИЛОЗИ

БИОГРАФИЈА

Јелена З. Шмигић је рођена 29.05.1986. године у Подгорици, где је завршила основну школу и гимназију.

Фармацеутски факултет је завршила у Београду 2011. године.

Стаж у апотеци “HOLOS“ је започела јула 2011. године а завршила јула 2012. године.

Радила је као сарадник у настави на смеру Козметологија на Фармацеутском факултету у Подгорици од септембра 2011. године до фебруара 2012.године.

Од јуна 2012. године до децембра 2015. године радила је у Агенцији за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС).

Након тога оснива своју фирму Aesthetic Studio Beauty Factor у којој и данас ради.

Уписала је докторске студије у октобру 2011. године на Фармацеутском факултету у Београду на смеру Фармацеутска технологија, а у новембру 2015. године се уписала на другу годину докторских академских студија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Smigic J**, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VL. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. *Mol Cell Biochem.* 2019 Apr 15. doi: 10.1007/s11010-019-03533-8. [Epub ahead of print].
2. **Smigic J**, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V. The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2018; 19(1): 11-16.
3. Pusica I, Srejovic I, Bradic J, **Smigic J**, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V, Djordjevic D. The effects of direct Red Bull administration to isolated hearts of trained and untrained rats who regularly did or did not consume energy drink: focus on cardiodynamics and oxidative stress. *Ser J Exp Clin Res* 2019; DOI: 10.2478/sjecr-2019-0022.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Јелена Шмигић

Ментор/коментор – МН: проф. др Владимир Живковић

Наслов рада – НР: Утицај хроничне примене цисплатине и диетил-естра лиганда (S,S)– етилендиамин-N,N'-ди-2-(3-циклохексил) дипропионат дихидрохлорида (L3) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија

Година – ГО: 2019. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада – ФО: 130 страна, а слика, 14 табела, 28 графикана

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ: Физиологија

Предметна одредница/кључне речи – ПО: цисплатина, циклохексил-једињења, кардиотоксичност, коронарни проток, оксидациони стрес, изоловано срце пацова

Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: Недостаци цисплатине и других регистрованих цитостатика (нежељена дејства, појава резистентности и висока токсичност) отворила је могућност истраживања у правцу синтезе нових једињења са истом или већом ефикасношћу и смањеном токсичношћу. Кардиотоксичност је једна од најчешћих и најозбиљнијих компликација примене хемотерапеутика у терапији карцинома. Ефекти цисплатине и нових металних антинеопластичних агенаса на срце и коронарну циркулацију су готово непознати.

Циљ: Циљ овог истраживања је био испитивање и упоређивање ефеката цисплатине (референтна супстанца) и диетил-естра лиганда (S,S)етилендиамин-N,N-ди-2-(3-циклохексил)дипропаноат-дихидрохлорида и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на моделу изолованог срца пацова перфундованог по Langendorff-овом моделу.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *in vivo* и *ex vivo*. Животиње у експерименталним групама су током четири недеље добијале интраперитонеално по једну дозу (4 mg/kg телесне масе) испитиваног једињења, док су животиње у контролним групама једном недељно добијале једнаку запремину физиолошког раствора или диметил сулфоксида (DMSO). Одређивани су следећи параметри срчаног рада: срчана фреквенција - HR, максимална стопа промене притиска у левој комори - LV(dP/dt)max, минимална стопа промене притиска у левој комори - LV(dP/dt)min, систолни - SLVP и дијастолни притисак у левој комори - DLVP и коронарни проток – CF. Из узорака плазме и коронарног венског ефлуента спектрофотометријски су одређивани NO₂⁻, TBARS, O₂⁻ и H₂O₂, док су из лизата еритроцита на исти начин мерени ензими антиоксидационе заштите (SOD, CAT и GPH).

Резултати: Резултати овог истраживања показују да у примењеној дози и дужини експозиције ниједно од испитиваних једињења није оштетило функцију изолованог срца пацова тј. нису остварили кардиодепресивни ефекат, а са друге стране нови лиганд (L3) али и његови комплекси са четворовалентном платином (K3) и двовалентним паладијумом (PdL3) имају респектабилан и обећавајући потенцијал ка мобилизацији антиоксидационих ензима.

Закључак: Добијени резултати истраживања дају оригиналан и веома важан допринос разумевању развоја кардиотоксичности изазване хемотерапеутицима, као и испитивању кардиотоксичног потенцијала потенцијално нових антиканцерских лекова.

Кључне речи: цисплатина, циклохексил-једињења, кардиотоксичност, коронарни проток, оксидациони стрес, изоловано срце пацова

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 27.06.2017.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област Општа и неорганска хемија, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Jelena Šmigić

Menthor/co-mentor – MN: Associate professor Vladimir Živković, M.D. Ph.D.

Title – TI: The effect of chronic administration of cisplatin and diethyl ester ligand (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl) dipropionate dihydrochloride (L3) and its complexes with Pt (IV) and Pd (II) on rat cardiac muscle and coronary circulation

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Central Serbia

Publication year – PY: 2019

Publisher – PU: Author reprint

Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description – PD: 130 pages, 1 picture, 14 tables, 28 charts

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD: Physiology

Subject/key words – SKW: cisplatin, cyclohexyl compounds, cardiotoxicity, coronary flow, oxidative stress, isolated rat heart

UDC:

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: Deficiencies of cisplatin and other registered cytostatics (side effects, resistance and high toxicity) have opened up the possibility of research towards the synthesis of new compounds with the same or greater efficacy and reduced toxicity. Cardiotoxicity is one of the most common and serious complications of the use of chemotherapeutics in cancer therapy. The effects of cisplatin and new metal antineoplastic agents on the heart and coronary circulation are almost unknown.

Aim: The aim of this study was to investigate and compare the effects of cisplatin (reference substance) and diethyl-ester ligand (S,S)ethylenediamine-N,N-di-2-(3-cyclohexyl)dipropanoate dihydrochloride and its complexes with Pt(IV) and Pd(II) on an isolated rat heart model perfused according to the Langendorff technique.

Material and methods: The investigation was designed as an experimental study conducted *in vivo* and *ex vivo*. Animals in the experimental groups received intraperitoneally one dose (4 mg/kg body weight) of the test compound over four weeks, whereas animals in the control groups received an equal volume of saline or dimethyl sulfoxide (DMSO) once a week. The following parameters of heart function rate were determined: heart rate - HR, maximal rate of pressure development in left ventricle - LV(dP/dt)max, minimum rate of pressure development in left ventricle - LV(dP/dt)min, systolic - SLVP and diastolic pressure in left ventricle - DLVP and coronary flow - CF. NO₂⁻, TBARS, O₂⁻ and H₂O₂ were determined spectrophotometrically from plasma and coronary venous effluent samples, while antioxidant protection enzymes (SOD, CAT and GPH) were measured on the same way from erythrocyte lysates.

Results: The results of this study show that at the administered dose and exposure length, none of the compounds tested impaired the function of the isolated rat heart, ie. have not achieved cardio-depressant effects, while on the other hand, the new ligand (L3) and also its complexes with four-valent platinum (K3) and divalent palladium (PdL3) have a respectable and promising potential for mobilizing antioxidant enzymes.

Conclusions: The findings of present research provide an original and very important contribution to understanding the development of cardiotoxicity induced by chemotherapeutics, as well as examining the cardiotoxic properties of potentially new anticancer drugs.

Key words: cisplatin, cyclohexyl compounds, cardiotoxicity, coronary flow, oxidative stress, isolated rat heart

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 27th June 2017.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. **Full Professor Gvozden Rosić**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, chairman;
2. **Full Professor Vladimir Jakovljević**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, member;
3. **Full Professor Tibor J. Sabo**, Ph.D, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, scientific field General and inorganic chemistry, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Шмитић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај хроничне примене цисластин и диетил-естра лиганда (SS)-етименакин - 1,1'-ди-2-(3-циклохексил)дипропионат дихлорохлорида (L3) и његових комплекса са Pt(IV) и Pd(II) на срчани ритам и коронарну циркулацију пацијената

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 23.09.2019 године,

Јелена Шмитић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Шкунџић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај хроничне примарне цикластичке и диетил-естра лиганда (SS)-епиметаланин-
1,1'-ди-2-(3-циклохексил) диметилонат дихидрохлорида (L3) и његових комплекса
са Pd(IV) и Pd(II) на срчану митот и коронарну циркулацију мишића

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу, 23.09.2019 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

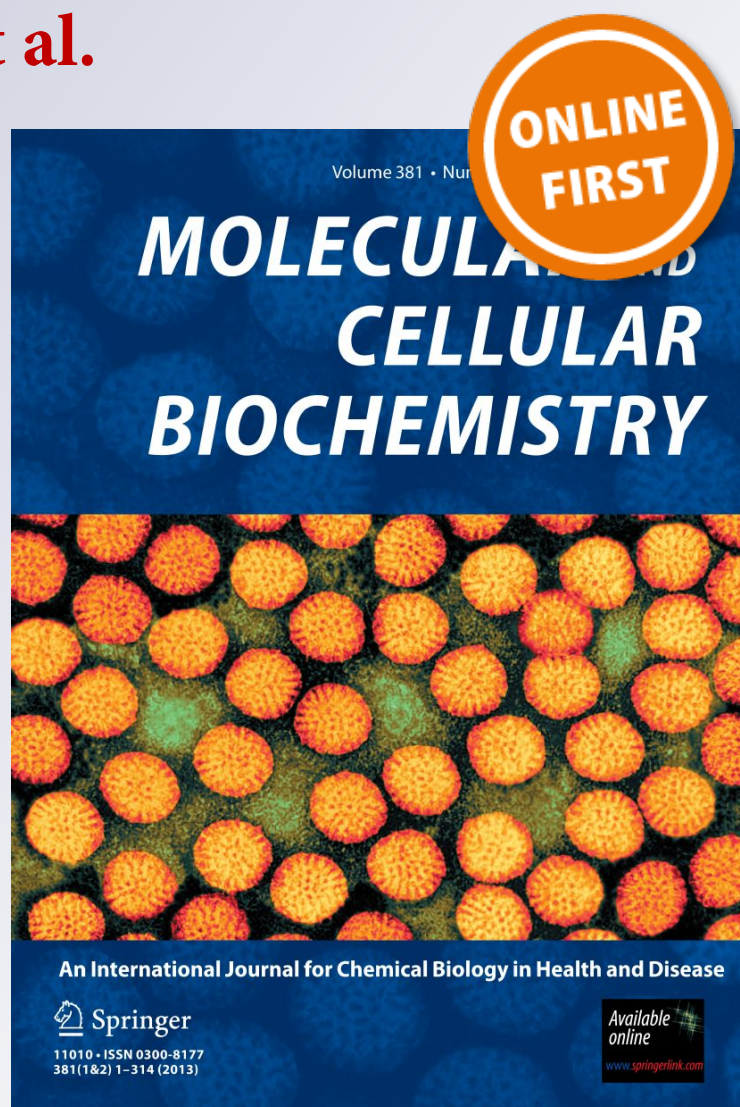
*Chronic effects of platinum(IV) complex
and its diamine ligand on rat heart
function: comparison with cisplatin*

**Jelena Smigic, Tibor Sabo, Aleksandra
Vranic, Vladimir Zivkovic, Ivan
Srejovic, Tamara Nikolic Turnic, Isidora
Milosavljevic, et al.**

Molecular and Cellular Biochemistry
An International Journal for Chemical
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177


Mol Cell Biochem
DOI 10.1007/s11010-019-03533-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin

Jelena Smigic¹ · Tibor Sabo² · Aleksandra Vranic³ · Vladimir Zivkovic¹ · Ivan Srejovic¹ · Tamara Nikolic Turnic³ · Isidora Milosavljevic³ · Jelena Poljarevic² · Milos Krivokapic⁴ · Sergey Bolevich⁵ · Vladimir Lj. Jakovljevic^{1,5} 

Received: 24 December 2018 / Accepted: 10 April 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The aim of the present study was to compare the cardiodynamic parameters in the isolated rat heart in animals chronically treated with cisplatin, platinum(IV) complex and its diamine ligand. Sixty *Wistar albino* rats (8 weeks old) were divided into five groups: three experimental and two control groups. Animals in all groups were treated with a dose of 4 mg/kg body weight once a week for 4 weeks with different substances; experimental groups received cisplatin, ligand and octahedral platinum(IV) complex, and control groups received saline and dimethyl sulfoxide. After sacrificing the animals, hearts were isolated and perfused according to the Langendorff technique at gradually increased coronary perfusion pressures (40–120 cmH₂O). The following parameters of cardiac function were continuously recorded: maximum and minimum rate of change of pressure in the left ventricle, systolic and diastolic left ventricular pressure, heart rate and coronary flow. The results showed statistically significant differences between all experimental groups in maximum and minimum rate of pressure development as well as in systolic pressure of the left ventricle, whereas cisplatin, ligand and the platinum(IV) complex had effects on heart contractility without significant influences on coronary circulation. The findings of the present study could be important for a better understanding of anticancer drug cardiac side effects. Our results indicate that compared to cisplatin as a “gold standard”, novel platinum complexes and ligands do not possess fewer negative effects on the heart, indicating insufficient safety for their usage in terms of affecting cardiac function, a result that can be of great interest for further investigations.

Keywords Cisplatin · Ligand · Platinum(IV) complex · Rat · Cardiodynamics

Introduction

In general, platinum-based drugs are the most commonly used drugs in the treatment of various types of cancer [1]. One of the most frequently used complexes for chemotherapy is cisplatin (cis-diamminedichloridoplatinum(II)). It can be used either in different combinations with radiotherapy or other cytotoxic drugs or as a monotherapy [2]. Cisplatin has a wide spectrum of indications in the therapy of different cancer types, such as ovarian, cervical, bladder and testicular cancer. It can also be used in the treatment of head and neck cancers, respiratory system cancers and solid tumours resistant to other treatment regimens [1–3]. The cytotoxic effect of cisplatin can result from different interactions with DNA molecules. These interactions consequently lead to DNA damage followed by different pathological conditions, such as mitochondrial dysfunction, oxidative stress, DNA replication inhibition and apoptosis of tumour cells [4–6]. In addition, platinum (Pt) has other

✉ Vladimir Lj. Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

- ¹ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ² Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, Belgrade 11000, Serbia
- ³ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ⁴ Agency for Medicines and Medical Devices of Montenegro, Bulevar Ivana Crnojevića 64a, 81000 Podgorica, Montenegro
- ⁵ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, str. 2, 119991 Moscow, Russia

targets, such as RNA, peptides, enzymes included in replication and proteins with nucleophilic sites [7, 8].

Previous data have shown that cisplatin covalently binds 5–10% of DNA [7], while 75–85% of platinum drugs interact with non-DNA molecules such as glutathione [5]. Despite its wide use and high activity, treatment with cisplatin is limited [9]. This is due to a number of adverse effects, such as neuro-, nephro- and ototoxicity. Furthermore, there are other limitations, such as resistance, mutagenic and secondary carcinogenic activities [9–11]. Earlier studies have also indicated that cisplatin therapy is usually associated with cardiotoxicity [12]. There are different manifestations of this adverse effect, such as myocarditis, disturbance of heart rhythm and heart failure [13]. Although there is a good understanding of the antitumour effects of cisplatin, the mechanisms involved in the toxic side effects of cisplatin remain unknown [14]. There is some evidence that oxidative stress can be included in cisplatin-induced toxicity due to increased lipid peroxidation and generation of reactive oxygen species, such as superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical (OH^-) [15], and to decreased plasma concentrations of various antioxidants [16] after drug administration. This can lead to failure of the antioxidative defence mechanism against free radical-mediated organ damage secondary malignancies in normal tissues [15].

On the other hand, there has been an increase in the interest of platinum complexes in recent years, because the different binding modes and increased affinity of the platinum complex for the DNA molecule can lead to a reduction of side effects in comparison to cisplatin [17]. In the last 30 years, many platinum complexes were synthesized in an attempt to overcome all of the previously mentioned limitations of cisplatin [18]. With few exceptions, platinum(IV) complexes, designed as anticancer prodrugs, are based on the octahedral $[PtA_2L_2X_2]$ motif with different axial ligands [19]. The main reason for the anticancer activity of Pt(IV) complexes could be the incorporation of their organic ligands into the ethylenediamine group, which has a positive effect on cytotoxicity. Indeed, it has been shown that organic ligands alone significantly increased in vitro toxicity towards melanoma, glioma and fibrosarcoma cell lines, but the mechanisms of their cytotoxic activity are still not fully known [4].

In our experimental model of an isolated, perfused rat heart, we estimated cardiac functional parameters and coronary flow following the perfusion of cisplatin (the reference compound), the ethylenediamine moiety ligand and a Pt(IV) complex containing the ethylenediamine moiety. The aim of the present study was to compare the cardiodynamic parameters in the isolated rat heart in animals chronically treated with cisplatin, the Pt(IV) complex and the ligand.

Materials and methods

Experimental protocol

This was a chronic experimental study conducted on male *Wistar albino* rats (body weight 250 ± 50 g) aged 8 weeks. The animals were divided into five groups (12 animals per group), two control and three experimental groups, treated intraperitoneally once a week for 4 weeks with the following compounds [20]:

1. Saline (4 ml/kg body weight)—control for cisplatin;
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (4 ml/kg body weight)—control for the ligand and the Pt(IV) complex;
3. Cisplatin (the “golden standard”)—(4 mg/kg body weight);
4. O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride—ligand (4 mg/kg body weight);
5. Octahedral Pt(IV) complex with O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride $[PtCl_4\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}]$ —Pt(IV) complex (4 mg/kg body weight).

Ethical approval

The study was performed in the Laboratory for the Cardiovascular Physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. It was approved by the Ethical Committee of the Faculty and performed according to the Faculty's rules for the welfare of laboratory animals, which are in consent with Good laboratory practice and European Council Directive (86/609/EEC).

Isolated rat heart preparation

After the 4 weeks of the experimental protocol, the animals were anaesthetized with ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and then euthanized via cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Following a quick thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were promptly excised and attached to a Langendorff apparatus (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) via aortic cannulation and then perfused with Krebs–Henseleit solution to provide retrograde perfusion under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP) (40 cmH_2O to 120 cmH_2O). Krebs–Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5,

MgSO₄ × 7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11 and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O₂ and 5% CO₂, with a pH value of 7.4 and a temperature of 37 °C.

Perfusion of the isolated rat heart

Following the establishment of heart perfusion, the preparations were stabilized within 30 min with a basal CPP of 70 cmH₂O. Following the stabilization period, the perfusion pressure was reduced to 50 and 40 cmH₂O and then gradually increased to 60, 80, 100 and 120 cmH₂O to establish coronary autoregulation. Testing started immediately after the control experiment to avoid unwanted time-dependent consequences. After placing the sensor (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) into the left ventricle, the following cardiodynamic parameters were continuously registered: maximum and minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max, dp/dt min), systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP and DLVP, respectively), heart rate (HR) and coronary flow (CF) on each of predetermined values of perfusion pressure (40, 60, 80, 100 and 120 cmH₂O). CF was measured by flowmetry.

Substances

All substances necessary for the preparation of Krebs–Henseleit buffer as well as cisplatin were purchased from the company Sigma-Aldrich GmbH, Germany. For the treatment of the control group and the dissolution of cisplatin, saline (0.9% NaCl, Hemofarhospital Logica) was used. The Pt(IV) complex and ligand were obtained from the Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean value (X) ± standard deviation (SD). The Wilcoxon signed rank test and the Mann–Whitney U test were used in the statistical analysis. p values less than 0.05 were considered statistically significant, and p values less than 0.01 were considered highly statistically significant. The Wilcoxon signed rank test was used to analyse the difference between related samples, while the Mann–Whitney U test was used to analyse the difference between cardiodynamic parameters in different groups. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows.

Results

Maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max)

The maximum rate of pressure development was significantly different between all compared groups at all CPPs except between groups treated chronically with ligand and Pt(IV) complex at CPP 40 cmH₂O. The CPP value linearly increased from 40 to 120 cmH₂O, a trend that was present in all compared groups. The greatest depression of contractility was caused by the ligand, while contractility was least affected by cisplatin (Fig. 4a). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2a, 3a). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1a).

Minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min)

The minimum rate of pressure development in the left ventricle was highly significantly different ($p < 0.01$) at all CPPs between groups that were chronically treated with cisplatin and ligand. Comparing results between groups treated with cisplatin and Pt(IV) complex, CPP values were significantly different in the group treated with cisplatin at 60–100 cmH₂O. CPP values were significantly different in the group treated with the Pt(IV) complex compared to the ligand at 60–120 cmH₂O. The CPP value linearly increased from 40 to 120 cmH₂O, a trend that was present in all compared groups. The greatest depression of contractility measured as dp/dt min was caused by the ligand, while contractility was least affected by cisplatin (Fig. 4b). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2b, 3b). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1b).

Systolic pressure of the left ventricle (SLVP)

The systolic pressure of the left ventricle was the highest after chronic administration of cisplatin. Lower values were observed in the Pt(IV) complex group, and the lowest values were observed after chronic ligand administration. SLVP was significantly higher in cisplatin compared to the ligand group at all CPPs. Comparing the chronic administration of cisplatin to the chronic administration of the Pt(IV) complex, the same trend was observed in previous

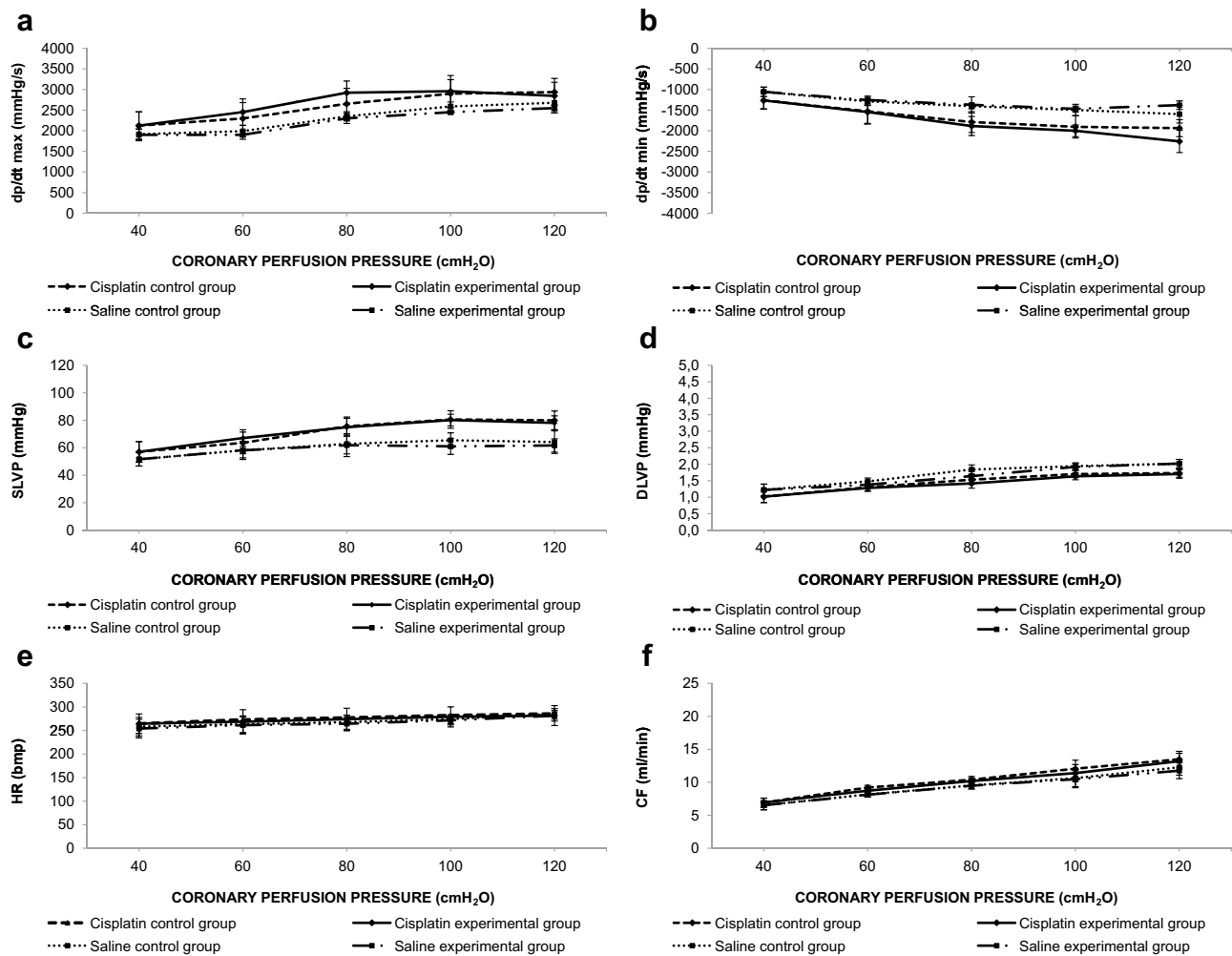


Fig. 1 Comparison between the saline and cisplatin groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt

min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD

groups. Cisplatin increased SLVP at CPP values from 40 to 100 cmH₂O compared to the Pt(IV) complex. The Pt(IV) complex increased SLVP compared to the ligand group at CPP values from 60 to 100 cmH₂O (Fig. 4c). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2c, 3c). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1c).

Diastolic pressure of the left ventricle (DLVP)

Compared to prior analysed results, diastolic pressure of the left ventricle does not have the same trend as previously described cardiodynamic parameters. The highest DLVP value was observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the ligand

group, and the lowest values were observed after chronic cisplatin administration. The diastolic pressure of the left ventricle was significantly higher after chronic ligand administration compared to the cisplatin group at CPP 40 cmH₂O. Chronic administration of the Pt(IV) complex increased DLVP values compared to cisplatin at all CPPs but was only statistically significant at 60 and 100 cmH₂O (Fig. 4d). There was no statistical significance either in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1d) or after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex compared to their controls (DMSO) (Figs. 2d, 3d).

Heart rate (HR)

In addition to DLVP, the same trend has been observed after chronic administration of cisplatin, Pt(IV) complex and ligand on the heart rate. The highest heart rate value was

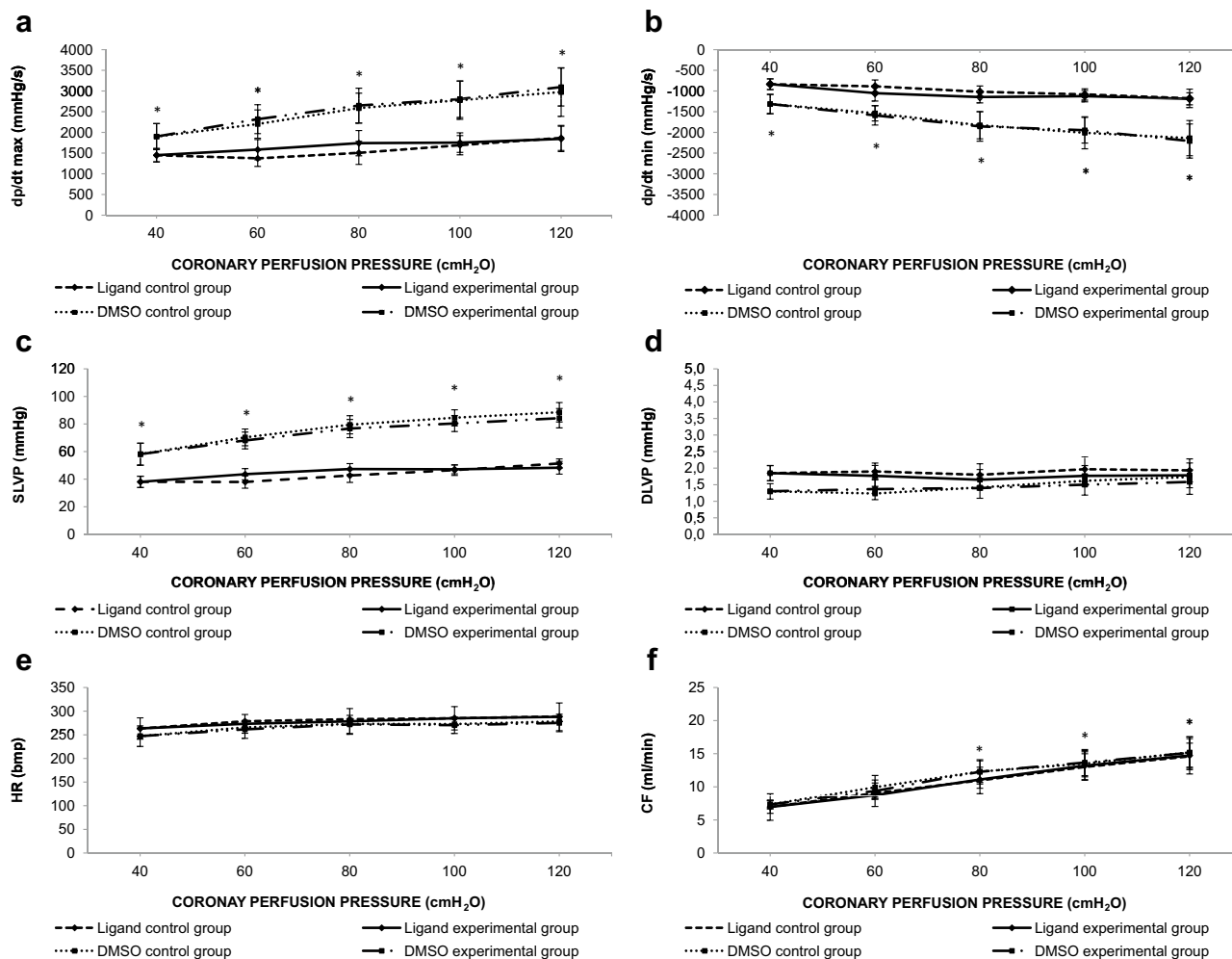


Fig. 2 Comparison between DMSO and ligand groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c**

Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD. *statistical significance ($p < 0.05$)

observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the group chronically treated with ligand, and the lowest heart rate was observed after chronic cisplatin administration. The only significant difference was in comparing the cisplatin group compared to the Pt(IV) complex, whereby the Pt(IV) complex had a significantly greater the heart rate at 120 cmH₂O CPP (Fig. 4e). Cisplatin and ligand did not show any statistical significance compared to their controls (saline and DMSO, respectively) (Figs. 1e, 2e), while comparison of the Pt(IV) complex with its control (DMSO) showed higher values in the experimental group (Fig. 3e).

Coronary flow (CF)

The highest coronary flow value was observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the ligand group, and the lowest values were

observed after chronic cisplatin administration. All administered compounds had the same influence on coronary flow, DLVP and heart rate but were not significantly different (Fig. 4f). Chronic treatment with ligand decreased CF (Fig. 2f), while Pt(IV) complex increased the values of this parameter (Fig. 3f) compared with their controls (DMSO). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1f).

There is no statistical significance between saline and DMSO (data not presented).

Discussion

The present study aimed to examine the effects of different antineoplastic compounds—cisplatin, ligand and Pt(IV) complex—on cardiodynamic parameters and to

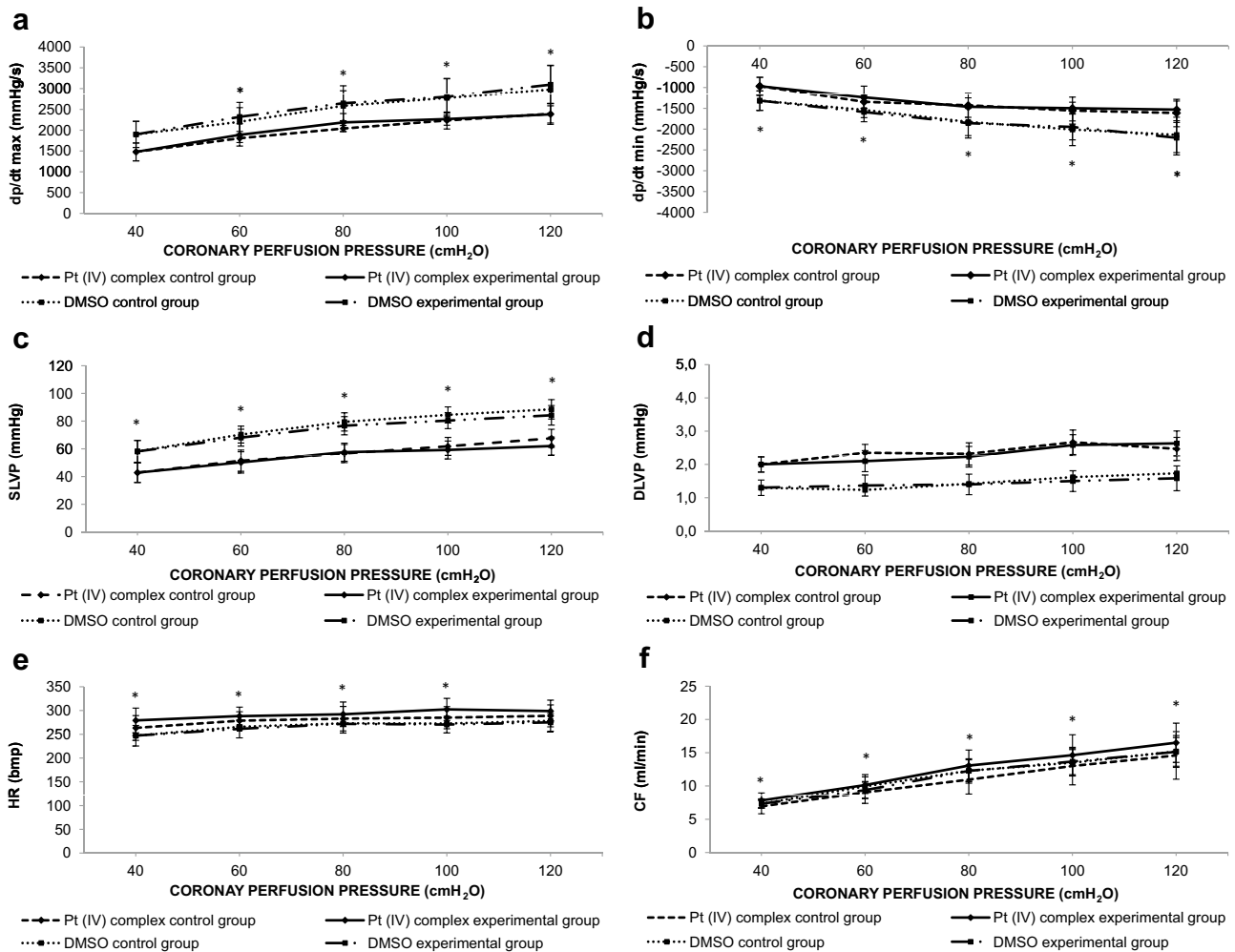


Fig. 3 Comparison between DMSO and Pt(IV) complex groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d**

left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD. *statistical significance ($p < 0.05$)

compare their influence on heart contractility and coronary circulation.

The cardiotoxic effects of neoplastic drugs can manifest in three forms: acute, subacute and chronic. Abnormalities in heart rhythm and electrocardiographic QT-interval changes are the main manifestations of acute or subacute cardiotoxicity (CTX) that developed from the beginning of therapy to 2 weeks after the end of therapy. The third form, chronic CTX, has two subtypes: early, within 1 year after termination of chemotherapy, or late, more than 1 year after chemotherapy. Chronic CTX manifests as asymptomatic systolic and/or diastolic LV dysfunction, which could lead to dilated cardiomyopathy [21].

According to previous studies, cisplatin has a wide spectrum of antineoplastic activity, but cardiotoxicity is a limiting factor [21] presenting different abnormalities, such as

acute myocardial infarction, pressure changes, heart rhythm disorders and an increased risk of thrombotic events [22–24].

In contrast to the well-known mechanisms of antitumour activity, the mechanisms involved in cisplatin cardiotoxicity remain unclear [25]. Cisplatin CTX can be induced directly through toxic effects on cardiac myocytes followed by extracellular matrix and coronary endothelium damage [26] or indirectly from overproduction of reactive oxygen species and increased oxidative stress with morphological and functional changes of tissue [20]. Moreover, cisplatin can enhance platelet aggregation and thromboxane formation and activate arachidonic acid pathways that can lead to thrombotic events in patients treated with this drug [27].

The aim of cisplatin analogue development was to obtain drugs with increased efficacy and decreased toxicity [28]. Accordingly, new platinum(IV) complexes showed positive

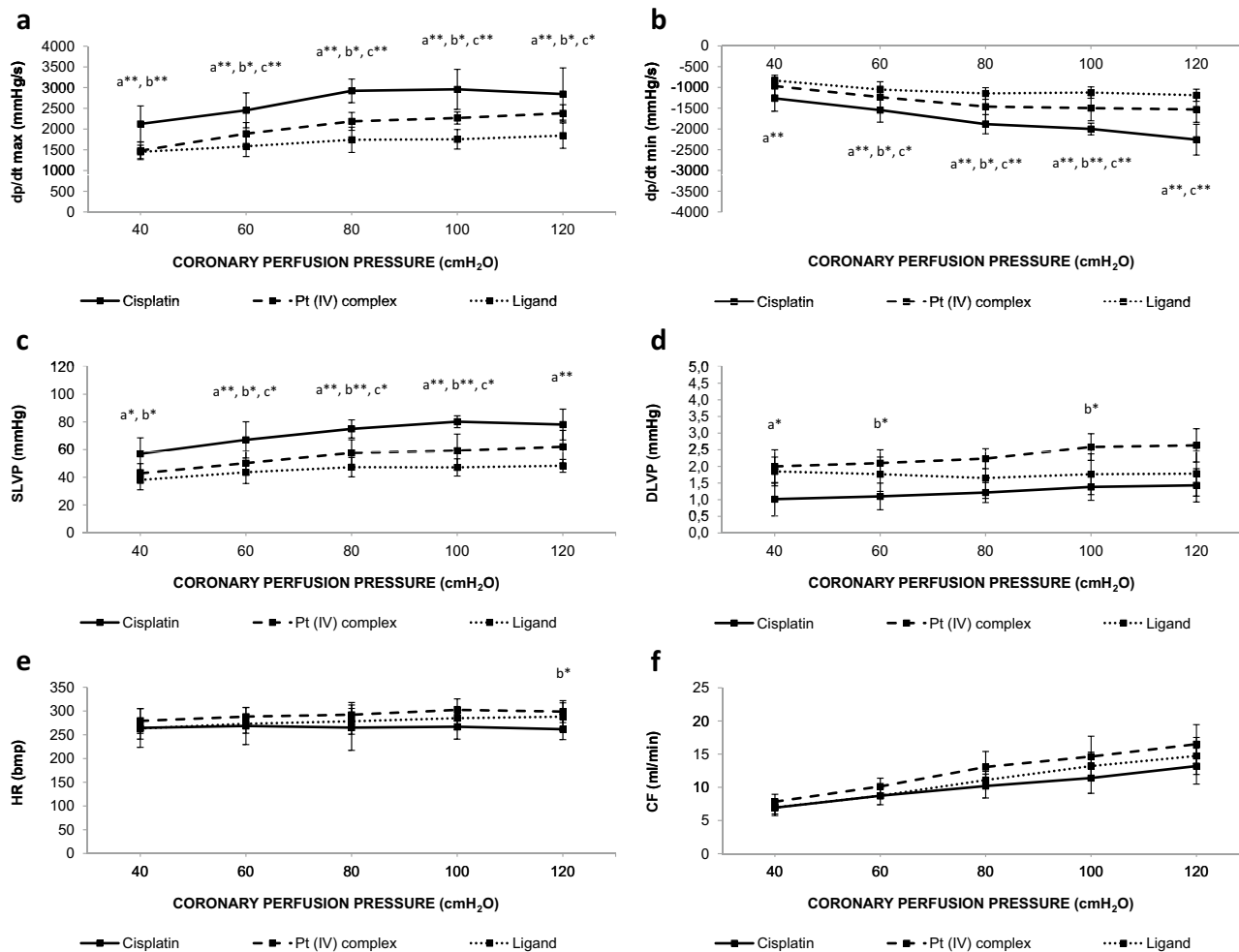


Fig. 4 Comparison between cisplatin, ligand and Pt(IV) complex groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coro-

nary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD. *statistical significance ($p < 0.05$); **statistical significance ($p < 0.01$). **a** cisplatin compared to ligand; **b** cisplatin compared to Pt(IV) complex; **c** ligand compared to Pt(IV) complex

results regarding antitumour activity and cardiotoxicity [29, 30].

Orally available platinum(IV) complexes with octahedral structures are more resistant to hydrolysis, and they bind readily to DNA compared to platinum(II) compounds, which leads to fewer side effects. Moreover, there is less possibility of gastrointestinal tract degradation [28]. In our study, we used the octahedral platinum(IV) complex, which showed reduced heart contractility compared to cisplatin, but these values were still higher compared to the ligand group (Fig. 4a, b). Additionally, heart rate had the highest values in the Pt(IV) complex group compared to the other groups but was only statistically higher relative to cisplatin at 120 cmH₂O (Fig. 4e). In accordance with these results, previous in vitro studies found that Pt(IV) complexes with edda-type ligands are generally less efficient than cisplatin [31]. In

contrast to our results, other studies on different structures of Pt(IV) complexes with esterified edda-type ligands indicate that anticancer activity is increased relative to cisplatin. Namely, this can be the result of rapid necrotic cell death in some cancer cell lines, contrary to the slower generation of apoptosis induced by cisplatin [32]. Compared to these data, our Pt(IV) complex did not improve heart contractility (Fig. 4a, b), but coronary circulation increased linearly in all groups from 40 to 120 cmH₂O. In the cisplatin group, the values were the lowest, and the Pt(IV) complex group had the highest values, which is in accordance with previous results [20].

Furthermore, there is a lack of data on the effects of Pt(IV) complexes on myocardium and coronary circulation. A previous study indicated that platinum(IV) complexes containing the ethylenediamine moiety showed cytotoxic

effects [33]. These results somewhat correlate with ours because we also used the ethylenediamine motif, which showed depression in heart contractility relative to cisplatin (Fig. 4a, b). Despite these results, another study showed that cytotoxicity can be decreased due to ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionate (eddp) substitution with ethylenediamine-*N,N'*-diacetate (edda) [30]. In accordance with this, previous findings showed a less negative impact of novel Pt(IV) analogues containing ethylenediamine and the 1,2-diaminocyclohexane moiety (compared to cisplatin) [34]. Considering that, in the present study, we used the ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionate motif, in future studies, we can consider the use of ethylenediamine-*N,N'*-diacetate, which, as previously mentioned, can indicate better cardiovascular performance [30].

Another animal study showed that, as a non-anthracycline agent, cisplatin might lead to different pathological conditions, such as LV dysfunction and cardiomyocyte contraction depression. This can be the result of abnormalities, such as changes in mitochondrial structure, which can lead to the stress response of the endoplasmic reticulum and subsequently to apoptosis [14]. Nonetheless, it can induce acute injuries such as ischaemia, which can occur within hours or days after the start of treatment [21, 35], and it can be associated with a CTX risk throughout the life of the patient [36]. In our study, cisplatin had the least negative effects on contractility, but it induced depression of DLVP (Fig. 4d) and heart rate (Fig. 4e) compared to the two other administered compounds. The higher level of contractility depression caused by the ligand and Pt(IV) complex (compared to cisplatin) found in the present study can be a consequence of ligand-induced, mitochondria-derived superoxide hyperproduction and increased oxidative stress [37], which leads to cardiomyocyte damage [38].

In general, the results regarding the comparison of all three compounds with their controls indicate that, contrary to cisplatin, which had not changed cardiac function compared to its control (saline), both the ligand and the Pt(IV) complex caused cardio-depressive effects relative to their controls (DMSO). These findings are in accordance with the other results in our study, which highlight the more prominent negative effects of the ligand and the Pt(IV) complex compared to cisplatin. In addition to cisplatin, the influence of the ligand and the Pt(IV) complex was demonstrated on heart contractility without significant influence on coronary circulation.

Conclusion

The findings of the present study could be important for a better understanding of anticancer drug cardiac side effects. Our results indicate that compared to the “gold standard”,

the novel platinum complex and the ligand do not possess fewer negative effects on the heart, indicating insufficient safety for its usage in terms of affecting cardiac function. The findings of this study may be of great interest for further investigations concerning the effects of novel platinum compounds on the heart.

Acknowledgements This work was supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Junior Project No. 09/2011).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest None of the authors of the present study has any actual or potential conflicts of interest to disclose, including financial, personal, or other relationships with specific persons or organizations.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Research procedures were carried out in accordance with European Directive for the Welfare of Laboratory Animals (86/609/EEC) and Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, number: 01-4583.

References

1. Ahmad S (2010) Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 7:543–566. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800340>
2. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD (2017) Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem* 142:8–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>
3. El-Awady ESE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A (2011) Cisplatin-induced cardiotoxicity: mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 650:335–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.085>
4. Misirlic Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovich U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, Markovic I (2012) Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropionic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol* 25:931–939. <https://doi.org/10.1021/tx3000329>
5. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 10:257–266. <https://doi.org/10.2174/0929867033368484>
6. Jung Y, Lippard SJ (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 107:1387–1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>
7. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM (2003) Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103:645–662. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>
8. Timerbaev AR, Hartinger CG, Alekseenko SS, Keppler BK (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern

- analytical methodology. *Chem Rev* 106:2224–2248. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>
9. Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
 10. Wang X (2010) Fresh platinum complexes with promising anti-tumor activity. *Anticancer Agents Med Chem* 10:396–411. <https://doi.org/10.2174/1871520611009050396>
 11. Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol* 60:59–75. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.02.003>
 12. Pai VB, Nahata MC (2000) Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22:263–302. <https://doi.org/10.2165/00002018-200022040-00002>
 13. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA (2006) Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res* 53:278–286. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.12.005>
 14. Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J (2010) Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05323.x>
 15. Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J (2004) Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chem Biol Interact* 147:309–318. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.03.001>
 16. Weijl NI, Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ, Osanto S (1998) Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol* 9:1331–1337. <https://doi.org/10.1023/A:1008407014084>
 17. Wang XY, Guo ZJ (2008) Towards the rational design of platinum(II) and gold(III) complexes as antitumor agents. *Dalton Trans* 28:1521–1532. <https://doi.org/10.1039/b715903j>
 18. Montaña ÁM, Batalla C (2009) The rational design of anticancer platinum complexes: the importance of the structure-activity relationship. *Curr Med Chem* 16:2235–2260. <https://doi.org/10.2174/092986709788453087>
 19. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK (2003) Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des* 9:2078–2089. <https://doi.org/10.2174/1381612033454180>
 20. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejsovic I, Zivkovic V, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V (2016) The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 242:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.028>
 21. Madeddu C, Deidda M, Piras A, Cadeddu C, Demurtas L, Puzzone M, Piscopo G, Scartozzi M, Mercurio G (2016) Pathophysiology of cardiotoxicity induced by nonanthracycline chemotherapy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 17(Suppl 1):S12–S18. <https://doi.org/10.2459/JCM.00000000000000376>
 22. Bano N, Najam R, Qazi F (2013) Adverse cardiac manifestations of cisplatin—a review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 18:80–85
 23. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M (2008) Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol* 130:688–695. <https://doi.org/10.1309/AJCPB66LRIIVMQDR>
 24. Ryberg M (2012) Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 32:555–559. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2012.32.555
 25. Smigic J, Stojic I, Zivkovic V, Srejsovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V (2017) The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *SJECR*. <https://doi.org/10.1515/SJECR-2017-0003>
 26. Altena R, Hummel YM, Nuver J, Smit AJ, Lefrandt JD, de Boer RA, Voors AA, van den Berg MP, de Vries EG, Boezen HM, Gietema JA (2011) Longitudinal changes in cardiac function after cisplatin-based chemotherapy for testicular cancer. *Ann Oncol* 22:2286–2293. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr408>
 27. Schimmel KJ, Richel DJ, Van den Brink RB, Guchelaar HJ (2004) Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 30:181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.003>
 28. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK (2003) Tumor—inhibiting platinum complexes—state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:1–53. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0001-x>
 29. Shi Y, Liu SA, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC (2012) Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin. *J Inorg Biochem* 107:6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.10.012>
 30. Sabo TJ, Kaluderović GN, Poleti D, Karanović L, Boccarelli A, Cannito F, Natile G (2004) Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N, N'-di-3-propionato ligand. *J Inorg Biochem* 98:1378–1384. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.023>
 31. Kaluderović GN, Đinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ (2005) Activity of some platinum(II/IV) complexes with O, O-n-butyl- and O, O-n-pentyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propanoate and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC. *J Inorg Biochem* 99:488–496. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.10.025>
 32. Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ (2010) Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N, N'-diacetate-type ligands. *Chem Med Chem* 5:881–889. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000058>
 33. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB (2001) Synthesis and antitumor activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL4Cl2]H2O where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem* 83(2–3):91–100. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00190-2](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00190-2)
 34. Misić MM, Jakovljević VL, Bugarcic ZD, Zivkovic VI, Srejsovic IM, Barudzic NS, Djuric DM, Novokmet SS (2015) Platinum complexes-induced cardiotoxicity of isolated, perfused rat heart: comparison of Pt(II) and Pt(IV) analogues versus cisplatin. *Cardiovasc Toxicol* 15(3):261–268. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9293-8>
 35. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G (2008) Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 21:978–989. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9293-8>
 36. Carver JR, Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, Hagerty KL, Somerfield MR, Vaughn DJ (2007) ASCO Cancer Survivorship Expert Panel. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol* 25:3991–4008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.9777>
 37. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S (2017) Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: comparison of the representative

- novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. Chem Biol Drug Des 90:262–271. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12945>
38. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S (2012) Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. Drug Discov Ther 6:147–156. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.3.147>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

THE EFFECTS OF CHRONIC ADMINISTRATION OF CISPLATIN ON OXIDATIVE STRESS IN THE ISOLATED RAT HEART

Jelena Smigic¹, Isidora Stojic², Vladimir Zivkovic¹, Ivan Srejavic¹, Tamara Nikolic², Jovana Jeremic², Tibor Sabo³, Vladimir Jakovljevic¹

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

²Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

³Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Serbia

EFEKTI HRONIČNE PRIMENE CISPLATINE NA OKSIDACIONI STRES IZOLOVANOG SRCA PACOVA

Jelena Šmigic¹, Isidora Stojic², Vladimir Živković¹, Ivan Srejavic¹, Tamara Nikolic², Jovana Jeremic², Tibor Sabo³, Vladimir Jakovljevic¹

¹Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

²Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

³Katedra za opštu i neorgansku hemiju, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Received / Priljen: 23. 01. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 26. 01. 2017.

ABSTRACT

Taken into consideration that molecular and cellular mechanisms involved in cardiotoxicity are still not clear the aim of this study was to compare the production of oxidative stress parameters in the isolated rat heart between animals chronically treated with cisplatin and saline. The hearts of male Wistar albino rats ($n = 24$, 12 per group, age 8 weeks, body mass 250 ± 50 g) were excised and perfused according to the Langendorff technique at gradually increased coronary perfusion pressures (40-120 cmH₂O). We followed the production of superoxide anion radicals, hydrogen peroxide, and nitrites and also index of lipid peroxidation during the changes of coronary perfusion pressure (CPP) (from 40 to 120 cm H₂O) in coronary venous effluent. Modifications CPP were performed in order to determine if oxidative stress is involved in coronary endothelium response in conditions of hypoxia (lower than 60 cm H₂O) and hyperoxia (higher than 80 cm H₂O).

Based on the results of this research we can conclude that with enhancement of CPP the values of oxidative stress statistically increased. However, this increment is more prominent in control group as a result of preserved endothelium and its more powerful response to hyperoxia. On the other hand, damaged endothelium of cisplatin-treated animals had weaker response to hyperoxia, and also lower antioxidant capacity.

Keywords: cisplatin, change of coronary perfusion pressure, isolated rat heart, oxidative stress

SAŽETAK

Uzimajući u obzir činjenicu da molekularni i ćelijski mehanizmi nastanka kardiotoksičnosti nisu u potpunosti poznati cilj ovog istraživanja bio je da se uporedi nastajanje i oslobađanje parametara oksidacionog stresa kod izolovanog srca pacova između grupa tretiranih cisplatinom i fiziološkim rastvorom. Srca Wistar albino pacova ($n = 24$, 12 po grupi, starosti 8 nedelja, telesne mase 250 ± 50 g) su izolovana i perfundovana po Langendorff tehnici pri rastućem koronarnom perfuzionom pritisku. Praćena je produkcija superoksid anjon radikala, vodonik-peroksida, nitrita i indeksa lipidne peroksidacije pri promeni koronarnog perfuzionog pritiska (CPP) (od 40 do 120 cm H₂O). Promena CPP je sprovedena sa ciljem da se utvrdi da li je oksidacioni stress uključen u odgovor koronarnog endotela u uslovima hipoksije (pritisci niži od 60 cm H₂O) i hiperoksije (pritisci viši od 80 cm H₂O).

Na osnovu rezultata ove studije možemo zaključiti da sa porastom vrednosti CPP vrednosti oksidacionog stresa statistički značajno rastu. Međutim ovo povećanje je izraženije u kontrolnoj grupi usled bolje očuvanosti endotela i njegovog jačeg odgovora na hiperoksiju. Sa druge strane endotel kod životinja tretiranih cisplatinom je oštećen i ima lošiju sposobnost da odgovori na hiperoksiju kao i smanjen antioksidacioni kapacitet.

Ključne reči: cisplatin, promena koronarnog perfuzionog pritiska, izolovano srce pacova, oksidacioni stress

ABBREVIATIONS

CK - creatine kinaze	NO - nitric oxide
CPP - coronary perfusion pressure	NO ₂ ⁻ - nitrites
cTnI - Cardiac Troponin I	Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2
GSH - glutathione	O ₂ ⁻ - superoxide anion radical
H ₂ O ₂ - hydrogen peroxide	ROS - Reactive oxygen species
NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen	SOD - superoxide dismutase
	TBARS - thiobarbituric acid reactive substances

UDK: 615.38.035.2:616.1 / Ser J Exp Clin Res 2018; 19 (1): 11-16

DOI:10.1515/SJECR-2017-0003

Corresponding author: Isidora Stojic

Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
Telephone: 381-34-306-800, ext 221, fax: 381-34-306-800 ext 112, e-mail: isidora.stojic@medf.kg.ac.rs



INTRODUCTION

Platinum chemotherapeutic agents are the principal therapeutics in the treatment of various cancers, including ovarian, testicular, and bladder cancer. Cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin), as the parent compound, is one of the most-used and the most effective platinum-derived agents in treatment of malignancies. Cisplatin binds to DNA, forming inter and intra-strand cross-links, resulting in defective DNA templates, arrest of DNA synthesis in rapidly dividing cancer cells (1). However, its therapeutic use is limited by cellular resistance and severe side-effects in normal tissues (2-4). In the literature the most commonly mentioned side-effects are nephrotoxicity, ototoxicity and peripheral neuropathy (5-7). Although not often cardiotoxicity is very serious and difficult side effect associated with cisplatin use. Acute vascular events were recorded during the drug administration, and may be associated with an increased long-term cardiovascular risk (8, 9). According to literature data cardiovascular events associated with cisplatin treatment are electrocardiographic changes, arrhythmias, myocarditis, cardiomyopathy and congestive heart failure (10). Toxic effects of cisplatin may be due to inhibition of protein synthesis, DNA damage, peroxidation of the cell membrane, mitochondrial dysfunction (11).

The mechanism of antitumor effects of cisplatin is almost fully known, but molecular and cellular mechanisms involved in cardiotoxicity are still not clear. Some experimental and clinical studies support the opinion that an increase of biomarkers of oxidative stress is involved in cisplatin's cardiotoxicity (12). It's well known that toxicity in numerous tissues and organ system such as liver, kidney, ear, and cardiovascular and nervous systems, induced by drugs is mediated with oxidative stress. There are a lot of evidences that oxidative stress had important role in acute kidney injury induced by cisplatin usage. Reactive oxygen species (ROS) directly act on cell components, including lipids, proteins and DNA, destroying their structure (13, 14).

The aim of this study was to compare the production of oxidative stress parameters in the isolated rat heart in animals chronically treated with cisplatin. On this way, we wanted to assess the influence of this antitumor drug on ROS generation and potential oxidative damages. Modifications of coronary perfusion pressure were performed in order to determined if oxidative stress is involved in coronary endothelium response in conditions of hypoxia (lower than 60 cm H₂O) and hyperoxia (higher than 80 cm H₂O).

MATERIAL AND METHODS

Experimental protocol

This was chronic experimental study, conducted on male Wistar albino rats, (body weight 250±50g) aged 8 weeks. The animals were divided into two groups (12 ani-

mals per group): experimental and control. Experimental group was treated with cisplatin for 4 weeks (4mg/kg body weight, once a week, intra-peritoneally). Control group was treated with saline for 4 weeks, once week, intra-peritoneally. After the four weeks of experimental protocol, the animals were anesthetized with ketamine (10mg/kg) and xylazine (5mg/kg) and then euthanized via cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK).

All research procedures were carried out in accordance with European Directive for welfare of Laboratory animals N°86/609 EEC and principles of Good Laboratory Practice (GLP), and approved by Ethical committee of the Faculty of Medical Science.

Isolated rat heart preparation

Following a quick thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were promptly excised and attached to the Langendorff apparatus via aortic cannulation and then were retrogradely perfused under a constant perfusion pressure of 70 cmH₂O with complex Krebs-Henseleit solution. The composition of the Krebs-Henseleit buffer (perfusion medium) was as follows (in mmol/l): NaCl (118); KCl (4.7); CaCl₂ × 2H₂O (2.5); MgSO₄ × 7H₂O (1.7); NaHCO₃ (25); KH₂PO₄ (1.2); glucose (5.5). It was equilibrated with gas mixture (5% CO₂-95% O₂) at 37°C, (pH 7.4).

Perfusion of the isolated rat heart

After 30 minutes period of stabilization at constant CPP of 70 cm H₂O experimental protocol was conducted. The experimental protocol implied changing of perfusion pressure from 40 cm to 120 cm. The isolated hearts were stabilized at each perfusion pressure and then the samples of coronary venous effluent were collected for biochemical analyses. The recorded values during the first measure at each perfusion pressure (40, 60, 80, 100 and 120 cm H₂O) were marked as values of control conditions, while the second measure of parameters at each coronary perfusion pressure were marked as experimental conditions.

Biochemical assays

Index of lipid peroxidation (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – TBARS)

The degree of lipid peroxidation in coronary venous effluent was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using 1 % thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 sodium hydroxide (NaOH) incubated with coronary effluent at 100 °C for 15 minutes and read at 530 nm. Krebs-Hensenleit solution was used as a blank probe (15).

Nitrite determination

Nitric oxide was assessed as nitrite and quantified by the spectrophotometric method using the *Griess*-reagent. 0.5 ml of perfusate was precipitated with 200 µl of 30%

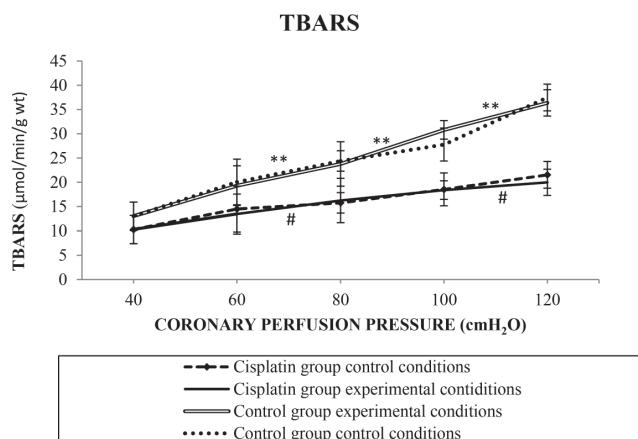


Figure 1 The effects of chronic administration of cisplatin and saline on index of lipid peroxidation in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

All values are expressed as mean \pm SD. Wilcoxon signed rank test were used in statistical analysis, p values less than 0.05 (marked with * or # depending on groups) were considered to be statistically significant and p values less than 0.01 (marked with ** or ## depending on groups) were considered to be statistically high significant.

sulfosalicylic acid, vortexed for 30 min and centrifuged at 3000 x g. Equal volumes of the supernatant and Griess's reagent, containing 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine-dihydrochloride was added and incubated for 10 min in the dark and read at 543 nmol/l. The nitrite levels were calculated by using sodium nitrite as a standard (16).

Superoxide determination

The level of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) was measured using Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer with coronary venous effluent and read at 530 nm. Krebs-Henseleit solution was used as a blank probe (17).

Hydrogen peroxide determination

The level of hydrogen peroxide (H_2O_2) was measured using phenol red oxidation with H_2O_2 from coronary venous effluent in the presence of horse-radish peroxidase and read at 610 nm (18).

Substances

All substances necessary for the preparation of Krebs-Henseleit buffer as well as Cisplatin were purchased from the company Sigma-Aldrich GmbH, Germany. For treatment of control group and dissolution of cisplatin was used saline (0.9% NaCl, Hemofarhospital Logica) commercially purchased.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm SD. Wilcoxon signed rank test and Mann Whitney test were used in statistical analysis, p values less than 0.05 were considered to be sta-

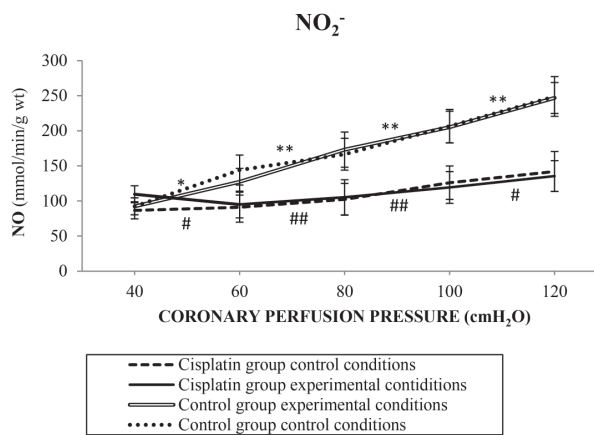


Figure 2 The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of nitrites in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

All values are expressed as mean \pm SD. Wilcoxon signed rank test were used in statistical analysis, p values less than 0.05 (marked with * or # depending on groups) were considered to be statistically significant and p values less than 0.01 (marked with ** or ## depending on groups) were considered to be statistically high significant.

tistically significant and p values less than 0.01 were considered to be statistically high significant. Wilcoxon signed rank test (for difference between related samples) was used for analyzed the difference between biochemical parameter at different coronary perfusion pressure. The Mann Whitney test was used for analyzed the difference between biochemical parameter in different groups at same coronary perfusion pressure. The statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows.

RESULTS

The effects of chronic administration of cisplatin and saline on TBARS values in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

In a group treated with cisplatin with increase of CPP TBARS values increased, but that changes were statistically significant between 60 cm and 80 cm and also between 100 cm and 120 cm. On the other hand, in control group that increase was greater and statistically high significant (Figure 1). Comparing the effects between the groups it can be observed statistically high significant difference at higher CPP (from 80 to 120 cm, Table 1).

The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of nitrites in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

In the both tested groups comparing the effects of changing CPP at production of nitrites there are statistically high significant differences (Figure 2). Also there were statistically high significant differences in production of nitrites at all examined CPP except at 40 cm between groups (Table 1).

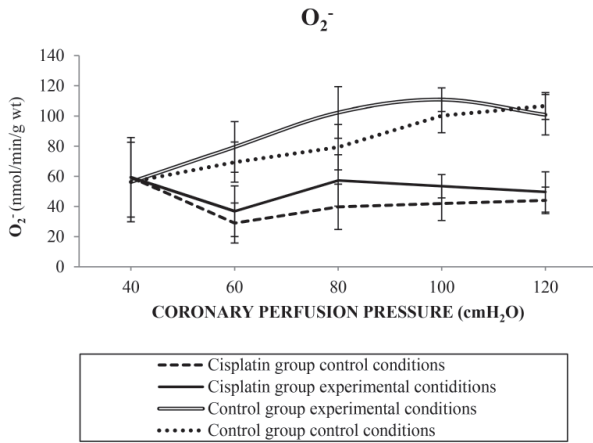


Figure 3 The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of superoxide anion radical in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure. All values are expressed as mean \pm SD.

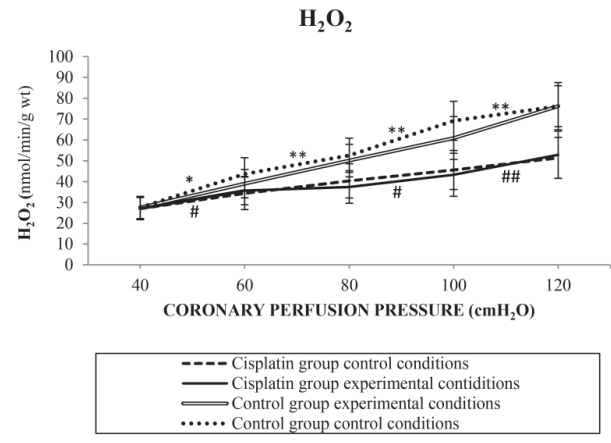


Figure 4 The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of hydrogen peroxide in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure. All values are expressed as mean \pm SD. Wilcoxon signed rank test were used in statistical analysis, p values less than 0.05 (marked with * or # depending on groups) were considered to be statistically significant and p values less than 0.01 (marked with ** or ## depending on groups) were considered to be statistically high significant.

The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of superoxide anion radical in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

There were no statistically significant changes in production of superoxide anion radical during the CPP changes in both groups (Figure 3). Also there was no statistically significant difference in production of superoxide anion radical between groups at same CPP values (Table 1).

The effects of chronic administration of cisplatin and saline on production of hydrogen peroxide in coronary venous effluent throughout changing the coronary perfusion pressure

In a group chronically treated with cisplatin statistically significant changes in production of hydrogen peroxide were existed. With an increase of CPP the production of hydrogen peroxide rised. On the other hand, in control group, statistically high significant changes in production of hydrogen peroxide were recorded with increase of CPP (Figure 4). Comparing the effects of changing of coronary perfusion pressure in these groups, we can notice that there were statistically high significant differences in pro-

duction of hydrogen peroxide at higher CPP (from 80 to 120 cm, Table 1).

DISCUSSION

Previously was mentioned that cisplatin usage is associated with a numerous side effects, whereby one of the most commonly and detail characterized is nephrotoxicity. Cisplatin activates glucose-6-phosphate dehydrogenase and hemoxinase, which increase free radical production and decrease the production of antioxidative enzymes. It increases concentrations of calcium into cells, which leads to activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase and stimulating of ROS production. There are evidence that cisplatin-treated animals have increased levels of superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) (19). Free radicals, formed in this way, induced the damaging of lipid components in cell membrane by peroxidation and mitochondrial dysfunction (20, 21). Beside the increment of ROS production, the achievement of reactive nitrogen species was observed in

Table 1. Comparison of oxidative stress between cisplatin and control groups at different coronary perfusion pressure

Control group vs. Cisplatin group					
	40 CPP	60 CPP	80 CPP	100 CPP	120 CPP
Index of lipid peroxidation	> 0.05	0.020	0.004	0.001	0.000
Nitric oxide	> 0.05	0.000	0.000	0.000	0.000
Superoxide anion radical	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Hydrogen peroxide	> 0.05	> 0.05	0.001	0.000	0.000

Mann Whitney test were used in statistical analysis, p values less than 0.05 were considered to be statistically significant and p values less than 0.01 were considered to be statistically high significant.



cisplatin-induced nephrotoxicity. Concentration of nitric oxide and peroxynitrite in kidney were increased in animals treated with cisplatin. Peroxynitrite, which is generated by the reaction of nitric oxide (NO) with superoxide, is a strong oxidant that can damage subcellular organelles, membranes. Peroxynitrite induced changing of protein structure and function, lipid peroxidation, chemical cleavage of DNA and reduction in cellular defenses by oxidation of thiol pools. Aforementioned claims can serve as evidence that peroxynitrites are involved in cisplatin-induced nephrotoxicity. On the other hand it is still controversial if nitric oxide had toxic role in kidney injury (22, 23).

The fact that production of ROS is fundamental mechanism in nephrotoxicity, were rised attention of scientists to correlate production of ROS with occurrence of cardiotoxicity. There are a few papers which describe that concomitant use of antioxidants with cisplatin can reduce cardiotoxicity (24-26). Rosic and colleagues assessed the protective effects of N-acetylcysteine (NAC) on cisplatin-induced changes in myocardium (27). Results of their study showed that NAC coadministration with cisplatin mitigated cisplatin-induced disturbances of cardiodynamic and oxidative stress parameters, as well as morphological changes in myocardium and coronary blood vessels, by reduction of oxidative stress. As a results of increase production of ROS transcription and translocation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) into the nucleus occurred. Activation of this factor induces the expression of many genes involved in synthesis of different antioxidative enzymes and heme oxygenase-1, which are important to protect the cells against oxidative stress and inflammation. Increased production of ROS can lead to increment in the expression of nuclear factor kappa B and production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha, chemokines such as monocyte chemoattractant protein-1. All these factors induce apoptosis and consequently myocardial injury (28, 29).

Results of our study showed that in both groups increment of coronary perfusion pressure values causes increase in production of oxidative stress biomarkers (Figure 1-4). The values of superoxide anion radical enhanced with increase of CPP, but that changes between two different CPP were not statistically significant (Figure 3). Also when we compare the values of superoxide anion radical between control and cisplatin group we didn't get any statistically significant difference (Table 1). On the other hand, the values of all other examined biomarkers of oxidative stress have statistically significant increased with enhancement of CPP (Figure 1, 2, 4) in both groups. Likewise, there was statistically significant difference in these parameters between groups. Based on the results of this study (Table 1) we can observe that there is no difference in production of oxidative stress biomarkers in conditions of hypoxia between groups.

Two groups of authors showed that animals treated with saline had greater levels of reduced glutathione and superoxide dismutase in heart tissue, than animals treated with cisplatin. These results demonstrated that animals

treated with cisplatin had lower antioxidant capacity than animals treated with saline. In accordance to this we can assume that in our study animals treated for 4 weeks with cisplatin had relieved capacity for struggle with free radicals. So despite the fact that in coronary effluent of control group levels of free radical were higher, antioxidant capacity of these isolated hearts is preserved, and damages induced by changes of CPP will be lower than in cisplatin group. Also these authors confirm that administration of single dose of cisplatin induced increase of markers of heart injury, such as: levels of LDH and creatine kinaze (CK), cardiac troponin I (cTnI) in serum, as well as cardiac CK-MB index and CK-MB activities (24, 30). El-Sawalhi and coworkers also compare the effects of administration of cisplatin and saline on antioxidant capacity. These researchers found that administration of cisplatin induced a significant decrease of catalase and glutathione peroxidase activity in postmitochondrial and mitochondrial fractions of heart tissue (25). Cardiac tissue generally had very low level of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase. Additional decreased of SOD activity in cisplatin-treated group can be explained by losing of copper and zinc which are essential for activity of this enzyme (31). On the other hand cisplatin had a great affinity to sulfur contained into glutathione (GSH), so conjugation of GSH by cisplatin caused depletion of GSH and decrease of redox state. Also the reduction of GSH may be explained by decrease activity of glutathione reductase induced by direct attack of cisplatin (32, 33). El-Sawalhi with coworkers in their research also showed that treatment with cisplatin induced increase of NADPH oxidase activity (25). NADPH oxidase is a major source of endoplasmic reticulum stress, and it be reported that plays an essential role in cisplatin-mediated ROS generation. So NADPH could initiate oxidative stress at early stages of cardiotoxicity and together with other enzymes acts synergistically to augment of oxidative stress (34).

Based on the results of this research we can conclude that with enhancement of coronary perfusion pressure the values of oxidative stress statistically significant increase. However, this increment is more present in control group as a result of preserved endothelium and its more powerful response to hyperoxia. On the other hand damaged endothelium of cisplatin-treated animals had weaker response to hyperoxia, and also lower antioxidant capacity. Finding of present study help in understanding of connection between oxidative stress and cisplatin usage, and thus elucidate molecular interactions involved in its mechanisms of action.

REFERENCES

1. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:307–20.
2. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007; 9-23.



3. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 2000; 59: 9-38.
4. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478(1-2):23-43.
5. Miller PR, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*. 2010; 2490-518.
6. Mc Whinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* 2009; 10-16.
7. Ding D, Allman BL, Salvi R. Review: Ototoxic Characteristics of Platinum Antitumor Drugs. *Anat Rec (Hoboken)* 2012; 1851-67.
8. Herrmann J, Yang EH, Iliescu CA et al. Vascular Toxicities of Cancer Therapies: The Old and the New-An Evolving Avenue. *Circulation*. 2016; 133:1272-89.
9. Yeh ETH, Tong AT, Lenihan DJ et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: Diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*. 2004; 109:3122-31.
10. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf*. 2000; 22:263-302.
11. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 2009; 61(3):223-42.
12. Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shan Y, Ran J. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2010; 460-5.
13. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*. 2006; 100(1):65-72.
14. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007; 334(2):115-24.
15. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 351-8.
16. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 131-8.
17. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald Ra Hadnbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Une, Boca Raton, 1985; 123-32.
18. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 161-70.
19. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, et al. The effects of erdos-teine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004; 50(3):287-90.
20. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(12):2683-90.
21. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23(1):29-34.
22. Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol*. 2004; 4:20-9.
23. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, et al. Oral erdos-teine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res*. 2003; 47(2):149-56.
24. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol*. 2011; 650:335-41.
25. El-Sawalhi MM, Ahmed LA. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chem Biol Interact*. 2014; 207:58-66.
26. Chowdhury S, Sinha K, Banerjee S, Sil PC. Taurine protects cisplatin induced cardiotoxicity by modulating inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Biofactors*. 2016; 42(6):647-64.
27. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, et al. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett*. 2016; 242:34-46.
28. Francescato HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology*. 2007; 230:64-75.
29. Wang R P, Yao Q, Xiao Y B, et al. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in myocardial injury in a rat chronic stress model. *Stress*. 2011; 14:567-75.
30. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther*. 2012; 6(3):147-56.
31. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*. 2005; 76(18):2125-35.
32. Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS. Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci*. 1981; 29(14):1393-401.
33. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003; 1:47-61.
34. Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci*. 2010; 30(11):3933-46.



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бр. 06-6233 /



Поштовани аутори,

17.05. 2019. год.

КРАГУЈЕВАЦ

Обавештавамо вас да је рад под насловом: "THE EFFECTS OF DIRECT RED BULL ADMINISTRATION TO ISOLATED HEARTS OF TRAINED AND UNTRAINED RATS WHO REGULARLY DID OR DID NOT CONSUME ENERGY DRINK: FOCUS ON CARDIODYNAMICS AND OXIDATIVE STRESS", чији су аутори: Irena Pušica, Ivan Srejić, Jovana Bradić, Jelena Šmigić, Stefani Bolevich, Sergey Bolevich, Vladimir Jakovljević i Dušica Đorđević, који је у евиденцији редакције часописа SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH, former title MEDICUS заведен под бројем SJECR-D-19-00035, након достављених стручних рецензија од компетентних рецензента, а које је одредило Уредништво часописа SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH, поштујући принцип «слепе рецензије», **ПРИХВАЋЕН ЗА ШТАМПУ** и биће штампан у једном од наредних бројева Часописа.

DOI: 10.2478 /sjecr-2019-0022

Надамо се да ћете и даље наставити сарадњу са Часописом.

С поштовањем,

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК ЧАСОПИСА
SERBIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL
AND CLINICAL RESEARCH

Проф. др Владимир Јаковљевић

THE EFFECTS OF DIRECT RED BULL ADMINISTRATION TO ISOLATED HEARTS OF TRAINED AND UNTRAINED RATS WHO REGULARLY DID OR DID NOT CONSUME ENERGY DRINK: FOCUS ON CARDIODYNAMICS AND OXIDATIVE STRESS

Irena Pusica¹, Ivan Srejovic², Jovana Bradic², Jelena Smigic², Stefani Bolevich³, Sergey Bolevich⁴,
Vladimir Jakovljević^{2,4}, Dusica Djordjevic²

¹Primary Health Centre New Belgrade, Belgrade, Serbia

²Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Pathophysiology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Russian Federation

⁴Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Russian Federation

EFEKTI DIREKTNE ADMINISTRACIJE RED BULL-a U IZOLOVANA SRCA TRENIRANIH I NETRENIRANIH PACOVA KOJI SU REDOVNO KONZUMIRALI ILI NISU KONZUMIRALI ENERGETSKO PIĆE: FOKUS NA KARDIODINAMIKU I OKSIDATIVNI STRES

Irena Pušica¹, Ivan Srejović², Jovana Bradić², Jelena Šmigić², Stefani Bolevich³, Sergey Bolevich⁴,
Vladimir Jakovljević^{2,4}, Dušica Đorđević²

¹Dom zdravlja Novi Beograd, Beograd, Srbija

²Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

³Katedra za Patofiziologiju, Prvi moskovski državni medicinski univerzitet IM Sečenov, Ruska federacija

⁴Katedra za Humanu patologiju, Prvi moskovski državni medicinski univerzitet IM Sečenov, Ruska federacija

Corresponding author: Irena Pušica, Primary Health Centre New Belgrade, Bulevar maršala Tolbuhina 30, 11 070 New Belgrade, Serbia. Tel.: +381 11 2222 100; +381 63 620 976; Fax: +381 11 2222 190. E-mail: irenapetrovic83@yahoo.com

ABSTRACT

Energy drinks (EDs) contain caffeine and other active ingredients which affect cardiovascular system. The aims of this study were to examine direct effects of Red Bull (RB) on cardiodynamics and oxidative stress in isolated hearts of rats. The rats were divided into four groups: untrained rats who never consumed ED (dED-UT); untrained rats who consumed ED 5 days a week during 4 weeks (ch+dED-UT); rats that trained 5 times a week for 4 weeks, but did not consume ED (dED-T); rats that trained and consumed ED 5 times a week for 4 weeks (ch+dED-T). After sacrificing, hearts were isolated and perfused according to Langendorff technique. Through the isolated heart of all rats in each group, RB was administered. The parameters of cardiac function were recorded, and the levels of prooxidants were measured in the coronary effluent during coronary autoregulation. Rats in ch+dED-UT group had significantly lower rates of myocardial contraction and relaxation compared to rats in dED-UT group. The same effect was recorded in the dED-T group compared to dED-UT group. The levels of hydrogen peroxide were significantly higher in trained rats. Rats in ch+dED-T group also had significantly higher levels of superoxide anion radical and index of lipid peroxidation, as well as lower levels of nitrites when compared to ch+dED-UT group, while opposite effect was recorded in rats in dED-T group compared to dED-UT group. The RB could have a potentially negative inotropic effect in chronic consumers. Prooxidative effect of RB was most pronounced in trained chronic consumers.

Key words: *cardiovascular system, energy drinks, oxidative stress, rats, swimming*

ABBREVIATIONS: **ED** - energy drink, **RB** - Red Bull, **CPP** - coronary perfusion pressure, **dp/dt max** - maximum rate of left ventricular pressure development, **dp/dt min** - minimum rate of left ventricular pressure development, **SLVP** - systolic left ventricular pressure, **DLVP** - diastolic left ventricular pressure, **HR** - heart rate, **CF** - coronary flow, **O₂⁻** - superoxide anion radical, **H₂O₂** - hydrogen peroxide, **NO** - nitrogen monoxide, **TBARS** - thiobarbituric acid reactive substances

SAŽETAK

Energetska pića (EP-a) sadrže kofein i druge aktivne sastojke koji utiču na kardiovaskularni sistem. Ciljevi ovog istraživanja bili su da se utvrde direktni efekti Red Bull-a (RB) na kardiodinamiku i oksidativni stres u izolovanim srcima pacova. Pacovi su bili podeljeni u četiri grupe: netrenirani pacovi koji nikada nisu konzumirali EP-e (dED-UT); netrenirani pacovi koji su konzumirali EP-e, 5 dana nedeljno tokom 4 nedelje (ch+dED-UT); pacovi koji su trenirali 5 puta nedeljno, tokom 4 nedelje, ali nisu konzumirali EP-e (dED-T); pacovi koji su trenirali i konzumirali EP-e, 5 puta nedeljno tokom 4 nedelje (ch+dED-T). Nakon žrtvovanja, srca pacova su izolovana i perfundovana prema tehnici po Langendorff-u. Kroz izolovana srca svih pacova u svakoj grupi, administriran je RB. Određivani su parametri funkcije srca, kao i nivo prooksidativnih vrsta u koronarnom efluentu tokom koronarne autoregulacije. Pacovi u grupi ch+dED-UT imali su značajno niže stope kontrakcije i relaksacije miokarda u poređenju sa pacovima u grupi dED-UT. Isti efekat zabeležen je u grupi dED-T u odnosu na grupu dED-UT. Nivoi vodonik peroksida bili su značajno viši u grupi treniranih pacova. Pacovi u grupi ch + dED-T, imali su takođe značajno više nivoe superoksid anjon radikala i indeksa lipidne peroksidacije, kao i niže nivoe nitrita u poređenju sa grupom ch + dED-UT, dok je suprotan efekat zabeležen kod pacova u dED-T grupi u poređenju sa dED-UT grupom. RB bi mogao da ima potencijalno negativan inotropan efekat kod hroničnih konzumera. Prooksidativni efekat RB-a bio je najizraženiji kod treniranih hroničnih konzumera.

Ključne reči:

kardiovaskularni sistem, energetska pića, oksidativni stres, pacovi, plivanje

INTRODUCTION

The term "energy drink" (ED) is used for caffeinated beverages, which are consumed in order to improve physical and mental performance (1). Extensive advertising, the colourful packaging and noted short-term improvement in performance after consumption have resulted in the high popularity of EDs. They are most popular among athletes, drivers and young people (2).

The effects of EDs are associated with the frequency and amount of consumption, as well as with the concentration and interaction of ingredients (3). The health hazard data on EDs are found to be limited; therefore the assessment of their safety is based on the impact of individual ingredients. Red Bull (RB) is one of the most commonly consumed EDs (4). The ingredients of the original RB are as follows: caffeine, taurine, glucuronolactone, carbohydrates, and B-group vitamins (5). Caffeine, a methylxanthine, increases sympathetic nerve activity (6). Taurine, a derivative of the amino acid cysteine (6), increases muscle strength, improves endurance, reduces physical exercise-induced DNA damage, and accelerates recovery after training (7). The consumption of glucose or other carbohydrates before and during physical activity delays the onset of fatigue, conserves muscle glycogen and improves performance (8). Glucuronolactone is a naturally occurring substance (5), which is formed from glucose in the liver (5, 9), and it is added to EDs to fight fatigue and provide a sense of wellbeing (10). The B-group vitamins belong to a group of water-soluble vitamins, that have the role of coenzyme and are important for the proper function of cells, especially mitochondrial function and energy production (11).

EDs exhibit a maximum effect of 30-60 minutes after ingestion (12). It is assumed that most of the biological effects of EDs are mediated by a positive inotropic effect, which implies increase in heart rate, cardiac output, myocardial contractility, stroke volume, and arterial blood pressure (13). Particularly important is the effect of the ED on the changes in ventricular repolarization (14). The results of meta-analysis have shown that acute consumption of EDs significantly raises systolic and diastolic arterial pressure, while there is no significant effect on the heart rate (15). In athletes, acute consumption of RB had a positive inotropic effect (enhancement of left ventricular and left atrial contractility) in the recovery period after physical exercise (16). But also, the case series of ED-associated acute adverse cardiovascular events were described (17). ED consumption may lead to the increased cardiomyocytes apoptosis, which could be the cause of cardiovascular disorders in the ED consumers (2). The chronic ED consumption may be the cause of hypertensive heart disease, coronary artery disease, cerebrovascular disease, and peripheral arterial disease (18). EDs affect the increase in blood glucose level, total cholesterol, triglycerides and low-density lipoprotein cholesterol, which all contribute to an increase in cardiovascular risk (19, 13). Endothelial dysfunction and increased risk of myocardial ischaemia, which may occur due to the loss of nitrogen monoxide (NO) activity in the blood vessel wall, were also linked to ED consumption (20). However, it has also been demonstrated that acute RB consumption may exhibit a positive effect on the endothelial function (21, 22). Furthermore, results of previous studies have shown that acute ED administration induced lipid peroxidation and oxidative stress in the liver and brain of rats (23), and that the chronic use of energy drinks led to toxicity, an inflammatory response and oxidative stress (24-30). However, it was shown in rats that RB applications for 14 days caused the acceleration of soft tissue healing and that was explained by the antioxidant effects of the RB ingredients (31).

Previous studies have shown various results regarding the effects of EDs on heart and cardiovascular system, depending on the dose, population, existence of risk factors, and other protocol variables. To our knowledge there is currently no published research examining the direct effect of ED on the heart. Thus, the main aim of this study was to examine direct effects of RB on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat hearts. Furthermore, the aims of the study were to examine if regular training or daily ED consumption change the effects that direct ED administration has on previously mentioned parameters.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the Laboratory for Cardiovascular Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. It was approved by the Ethics Committee of the Faculty. The conception, design and performance of the study were followed by Good Laboratory Practice criteria and the European Council Directive (86/609EEC).

Subjects

The Wistar albino rats were used in this study. The sample size calculation, based on a study published by Barcelos et al. (32), revealed that 24 rats were required to perform the study. At the beginning of the study rats were eight weeks old and their weight was 200-250g. They were housed in conventional cages in groups of 8 animals per cage. They fed with commercial rat food (20% protein food, Veterinary Institute Subotica) and water ad libitum. Room temperature was set to 25 °C and 12 hours of light were provided.

ED consumption and training protocol

The study lasted 4 weeks. The rats were divided into four groups (six rats in each group) depending on chronic ED consumption during the study period (rats who did and did not consume ED every day) and depending on whether they were subjected to the training protocol or not. After sacrificing animals, ED was administered to the isolated heart of all rats in each group (all hearts were perfused with ED, as explained bellow).

Thus, groups were as follows:

- 1) dED-UT group: untrained (sedentary) rats who never consumed ED,
- 2) ch+dED-UT group: untrained rats who consumed ED 5 days a week during 4 weeks,
- 3) dED-T group: rats that trained 5 times a week for 4 weeks, but did not consume ED,
- 4) ch+dED-T group: rats that trained and consumed ED 5 times a week for 4 weeks.

The rats of two groups were subjected to a swimming practice (1h per day, 5 days a week) in a 80x60x100cm pool for experimental animals. An electric heater was used to keep the water temperature at 34 C°. During swimming, the pump installed in the pool made constant waves, in order to prevent the rats from floating. Rats were monitored the whole time during swimming. The rats of other two groups were untrained (they were not subjected to a swimming practice).

The ED was administered to rats in two groups by an intragastric gavage (p.o.). RB was used in the amount of 3.75 ml/kg, as determined on the basis of the previously published studies (32, 33). The indicated dose corresponds to a dose of caffeine close to the maximum recommended (about 6 mg /kg). A standard can of 250 ml RB contains: 80 mg of caffeine, 1000 mg of taurine 21.5 g of sucrose, 5.25 g of glucose, 600 mg of glucuronolactone, 20 mg of vitamin B3 (niacinamide), 5 mg of vitamin B5 (calcium pantothenate), 5 mg of vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride), 50 mg of inositol, 5 µg of vitamin B12 (cyanocobalamin), 100 mg of sodium citrate, as well as natural and artificial flavors and colors (caramel, riboflavin)(34,11,35).

After one month, rats were sacrificed by short ketamine/xylazine narcosis. After that, their hearts were excised and attached to the Langendorff apparatus via aortic cannula. Krebs–Henseleit buffer was used during performance of retrograde perfusion according to the Langendorff technique. First, an equilibration period, during which coronary perfusion pressure (CPP) was kept at 70 cmH₂O, was performed. After that, CPP was changed in the following order: 1) 60 cmH₂O, 2) 80 cmH₂O, 3) 100 cmH₂O, 4) 120 cmH₂O, and 5) 40 cmH₂O. Through the isolated heart of all rats in each group, Krebs–Henseleit buffer, in which 150 µmol of ED was dissolved, was perfused by the Langendorff retrograde perfusion method.

Cardiodynamic parameters

Parameters of myocardial function were measured using the pressure sensor (transducer BS4 73-0184, Experimentria Ltd, Hungary) which was attached to the latex balloon, filled with bubble-free saline, which was inserted into the left chamber (36). Cardiodynamic parameters were continuously measured. The following parameters of myocardial function were recorded: 1) maximum and minimum rate of pressure development in LV (dp/dt max and dp/dt min), 2) systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP and DLVP) and 3) heart rate (HR). Furthermore, coronary flow (CF) was measured flowmetrically.

Oxidative stress

Coronary flow, which was collected during each CPP, was used to measure the levels of oxidative stress in coronary venous effluent. Spectrophotometer (Analytic Jena Specord S 600, UK) was used to determine the levels of 1) superoxide anion radical (O₂⁻), 2) hydrogen peroxide (H₂O₂), 3) nitrogen monoxide (NO), and 4) index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS). The exact protocols for measurement of those prooxidative species may be found in our previously published papers (37) or in the original sources (38-41).

Statistics

SPSS 23.0 was used to perform the statistical analysis. Comparison of groups was performed using the parametric (t-test for independent samples) or nonparametric test (Mann-Whitney U test), depending on the results of the Shapiro-Wilk test for data distribution. The results on the figures are shown as the mean ± standard error of the mean (X ± SE).

RESULTS

Cardiodynamic parameters of isolated rat hearts in four groups (dED-T, ch+dED-T, dED-UT, ch+dED-UT) are shown in Figures 1-6. Prooxidative parameters in the effluent during coronary autoregulation of isolated rat hearts in four groups (dED-T, ch+dED-T, dED-UT, ch+dED-UT) are shown in Figures 7-10.

1) The direct effect of the ED on the heart of untrained rats who chronically consumed the ED and those who did not consume ED

Cardiodynamics

In relation to the dED-UT group, the following were recorded in the ch+dED-UT group: 1) at all CPPs, level of dp/dt max was lower, but statistically significant only at CPP 60-100 cmH₂O ($p < 0.05$); 2) at all CPPs, level of dp/dt min was lower (more positive), but statistically significant only at CPP 60-120 cmH₂O ($p < 0.05$); 3) at all CPPs, level of CF was higher, but statistically significant only at CPP 80-120 cmH₂O ($p < 0.05$); at all CPPs, statistically significantly lower level of SLVP ($p < 0.05$) and statistically significantly higher level of DLVP ($p < 0.05$); 4) at all CPPs, higher level of HR, but only statistically significantly higher at CPP 60-80 cmH₂O ($p < 0.05$).

Oxidative stress

In relation to the dED-UT group, the following were recorded in the ch+dED-UT group: 1) at all CPPs, level of O₂⁻ was lower, but statistically significantly only at CPP 40, 80-120 cmH₂O ($p < 0.05$); 2) at all CPPs, level of TBARS was statistically significantly lower ($p < 0.05$); 3) at all CPPs, levels of nitrites (NO) were higher, but statistically significant only at CPP 80-120 cmH₂O ($p < 0.05$); 4) at all CPPs, level of H₂O₂ was higher, but without statistical significance ($p > 0.05$).

2) The direct effect of the ED on the heart of trained rats who chronically consumed the ED and those who did not consume ED

Cardiodynamics

Although at all CPP levels dp/dt max, dp/dt min, CF and SLVP were lower in ch+dED-T than in dED-T group, and levels of DLVP higher, no statistical significance was observed in any cardiodynamic parameter between the groups ($p > 0.05$). Also, there was no statistically significant difference in the level of HR between these two groups ($p > 0.05$).

Oxidative stress

Levels of H₂O₂ at CPP 60, 100-120 cmH₂O were significantly higher in ch+dED-T when compared to dED-T group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between those two groups in levels of other prooxidative species.

3) The direct effect of the ED on the heart of trained and untrained rats who did not consume ED

Cardiodynamics

In relation to the dED-UT group, the following were recorded in the dED-T group: 1) at all CPPs, statistically significantly lower level of dp/dt max, dp/dt min and SLVP ($p < 0.05$); 2) at all CPPs, level of HR was lower, but statistically significant only at CPP 40, 60 and 100 cmH₂O ($p < 0.05$); 3) at all CPPs, level of CF was higher, but statistically significant only at CPP 60-120 cmH₂O ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the level of DLVP between these two groups ($p > 0.05$).

Oxidative stress

In relation to the dED-UT group, the following were recorded in the dED-T group: 1) at all CPPs, higher level of O₂⁻, but without statistical significance ($p > 0.05$); 2) at all CPPs, level of H₂O₂ was higher, but statistically significant only at CPP 60-120 cmH₂O ($p < 0.05$); 3) at all CPPs, level of TBARS was lower, but statistically significant only at CPP 40-80 cmH₂O ($p < 0.05$); 4) at all CPPs, levels of nitrites (NO) were higher, but statistically significant only at CPP 80-120 cmH₂O ($p < 0.05$).

4) The direct effect of the ED on the heart of trained and untrained rats who chronically consumed the ED

Cardiodynamics

In relation to the group ch+dED-UT, the following were recorded in the group ch + dED-T: 1) at all CPPs, lower level of dp/dt max, CF and SLVP but without statistical significance ($p > 0.05$); 2) at all CPPs, level of dp/dt min was lower, but statistically significant only at CPP 40-100 cmH₂O ($p < 0.05$); 3) at all CPPs, level of DLVP was lower, but statistically significant only at CPP 40, 80-120 cmH₂O ($p < 0.05$); at all CPPs, statistically significantly lower level of HR ($p < 0.05$).

Oxidative stress

In relation to the group ch+dED-UT, the following were recorded in the group ch + dED-T: at all CPPs, level of O₂⁻ was higher, but statistically significant only at CPP 40, 100-120 cmH₂O ($p < 0.05$); at all CPPs, statistically significantly higher level of H₂O₂ and TBARS ($p < 0.05$); at all CPPs, levels of nitrites (NO) were lower, but statistically significant only at CPP 60-100 cmH₂O ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In this research, we studied the direct effects of RB on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated hearts of trained and untrained rats, who chronically consumed RB in comparison with those who did not consume RB.

The results of our study showed that, after direct RB administration to the heart, untrained rats who chronically consumed RB had statistically significantly lower levels of dp/dt max, dp/dt min and SLVP, while levels of DLVP were significantly higher, compared to untrained rats who never consumed RB. The same was observed

when trained rats regular RB consumers were compared to trained rats nonconsumers of RB, except that no statistically significant difference between groups was found. This could be interpreted as either a potentially harmful effect of RB on the myocardial contraction and relaxation in chronic consumers, or their decreased reactivity to RB ingredients due to adaptation induced by daily consumption. Trained rats that never consumed RB had statistically significantly lower levels of dp/dt max, dp/dt min and SLVP when compared to untrained rats that never consumed RB, while trained rats that chronically consumed RB had only statistically significantly lower levels of dp/dt min when compared to untrained chronic RB consumers. This might suggest that trained rats respond less to direct RB administration, as well as that chronic RB consumption decreases the effects that acute/direct consumption has on heart, both in trained and untrained rats. In chronic untrained RB consumers DLVP significantly increased after direct RB administration to the heart when compared to untrained non consumers, while this change was not so pronounced in trained rats. Regarding the HR, untrained rats that chronically consumed RB responded to direct RB administration with higher HR than those who did not use to consume RB, while both trained groups, chronic RB consumers and non consumers of RB, had lower levels of HR when compared to their untrained matched controls. Trained rats also had higher CF than untrained rats. This also suggests that regular training depresses the effects of direct RB on the heart cardiodynamics, while CF is preserved.

As we have previously mentioned, there are no other studies that included administration of ED directly to the isolated rat heart, except the study that has been recently published by our team (42). In that paper, we have shown that, in trained rats, acute consumption of the RB had a positive inotropic effect (manifested as significantly higher level of dp/dt max and dp/dt min compared to the levels measured in control rats), while chronic administration affected the isolated increase in SLVP, which could be considered the potentially negative impact chronic ED consumption (42). There were no significant differences in cardiodynamic parameters after acute RB consumption (30min before sacrificing) between trained rats that regularly drank RB and those who did not (42), which is in consent with the results presented in this paper (direct instead of acute RB administration). Those results suggest that acute/direct RB administration affects cardiodynamics to the greater extent in untrained, than in trained rats, i.e. that regular training affects the effects of both acute and chronic ED consumption.

The results regarding the levels of prooxidant species in the coronary effluent showed that, after direct RB administration to the isolated heart, levels of H₂O₂ were the highest in trained rats: both trained chronic RB consumers and nonconsumers had higher H₂O₂ levels than their untrained matched controls, and trained chronic consumers had higher levels of H₂O₂ in comparison to trained nonconsumers. Prooxidative effect of direct RB administration was most prominent in trained chronic RB consumers, since they had significantly higher levels of O₂ H₂O₂, TBARS and lower levels of NO when compared to untrained chronic RB consumers. Except in the case of H₂O₂, opposite was observed when trained nonconsumers of RB were compared to untrained nonconsumers of RB: levels of TBARS were lower and levels of NO higher in trained rats. This suggests that positive effects of regular training on redox state (43) may be diminished by chronic ED consumption. Pusica et al. (42) have shown that both rats who chronically consumed RB, and rats who consumed RB acutely, had significantly increased levels of lipid peroxidation in coronary effluent when compared to control rats, as well as that acute RB consumption increased the levels of TBARS to the greater extent in rats who chronically consumed RB than in those who consumed it

never before, which suggests that in chronic consumers acute ED consumption continues to deteriorate redox status. Interestingly, in this research, untrained rats who consumed RB on a daily basis had lower levels of O₂, TBARS and higher levels of NO in coronary effluent after direct RB administration to the isolated rat heart than untrained rats who did not use to consume RB. Thus, in untrained rats, chronic RB consumption did not negatively affect cardiac oxidative state, which is opposite than the results related to the cardiodynamics. Finally, the relationship between cardiodynamics and oxidative stress in coronary effluent in our study may be discussed in terms of the relationship between NO levels and CF: in groups that had increased levels of CF levels of NO in coronary effluent were also significantly higher than in their matched controls. This supports the role of NO in endothelial function and vasodilatation (44).

CONCLUSIONS

The conclusion of this study is that the RB could have a potentially negative inotropic effect in chronic consumers. However, it may also be considered as their decreased reactivity to RB ingredients due to adaptation induced by daily consumption. It seems that trained rats respond less to direct RB administration, as well as that chronic RB consumption decreases the effects that direct administration has on heart, both in trained and untrained rats. Our results suggest that cardiac prooxidative effect of direct RB administration was the most pronounced in trained chronic RB consumers, while the chronic RB consumption did not deteriorate oxidative status in isolated hearts of untrained rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant No. 175043 from the Ministry of Science and Technical Development of the Republic of Serbia and Junior project 01/15 by Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. Benson S, Tiplady B, Scholey A. Attentional and working memory performance following alcohol and energy drink: A randomised, double-blind, placebo-controlled, factorial design laboratory study. *PLoS One*. 2019; 14(1): e0209239.
2. Slawinski M, Wawryk-Gawda E, Zarobkiewicz M, Halczuk P, Jodlowska-Jedrych B. Apoptosis of rats' cardiomyocytes after chronic energy drinks consumption. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2018; 31(1): 25-28.

3. Ishak WW, Ugochukwu C, Bagot K, Khalili D, Zaky C. Energy drinks: psychological effects and impact on well-being and quality of life-a literature review. *Innov Clin Neurosci*. 2012; 9(1): 25-34.
4. Franks AM, Schmidt JM, McCain KR, Fraer M. Comparison of the effects of energy drink versus caffeine supplementation on indices of 24-hour ambulatory blood pressure. *Ann Pharmacother*. 2012; 46(2): 192-9.
5. Mora-Rodriguez R, Pallarés JG. Performance outcomes and unwanted side effects associated with energy drinks. *Nutr Rev*. 2014; 72 Suppl 1: 108-20.
6. Wassef B, Kohansieh M, Makaryus AN. Effects of energy drinks on the cardiovascular system. *World J Cardiol*. 2017; 9(11): 796-806.
7. Eudy AE, Gordon LL, Hockaday BC, et al. Efficacy and safety of ingredients found in preworkout supplements. *Am J Health Syst Pharm*. 2013; 70(7): 577-88.
8. el-Sayed MS, MacLaren D, Rattu AJ. Exogenous carbohydrate utilisation: effects on metabolism and exercise performance. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1997; 118(3): 789-803.
9. McLellan TM, Lieberman HR. Do energy drinks contain active components other than caffeine? *Nutr Rev*. 2012; 70(12): 730-44.
10. De Sanctis V, Soliman N, Soliman AT, et al. Caffeinated energy drink consumption among adolescents and potential health consequences associated with their use: a significant public health hazard. *Acta Biomed*. 2017; 88(2): 222-31.
11. Higgins JP, Tuttle TD, Higgins CL. Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin Proc*. 2010; 85(11): 1033-41.
12. Smit HJ, Cotton JR, Hughes SC, Rogers PJ. Mood and cognitive performance effects of "energy" drink constituents: caffeine, glucose and carbonation. *Nutr Neurosci*. 2004; 7(3): 127-39.
13. Lippi G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F. Energy Drinks and Myocardial Ischemia: A Review of Case Reports. *Cardiovasc Toxicol* 2016; 16(3): 207-12.
14. Shah SA, Dargush AE, Potts V, et al. Effects of Single and Multiple Energy Shots on Blood Pressure and Electrocardiographic Parameters. *Am J Cardiol*. 2016a; 117(3): 465-8.
15. Shah SA, Chu BW, Lacey CS, Riddock IC, Lee M, Dargush AE. Impact of Acute Energy Drink Consumption on Blood Pressure Parameters: A Meta-analysis. *Ann Pharmacother*. 2016; 50(10): 808-15.
16. Baum M, Weiss M. The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids*; 2001; 20(1): 75-82.
17. Goldfarb M, Tellier C, Thanassoulis G. Review of published cases of adverse cardiovascular events after ingestion of energy drinks. *Am J Cardiol*. 2014 ;113(1): 168-72.

18. Higgins JP, Yarlagadda S, Yang B. Cardiovascular complications of energy drinks. *Beverages*. 2015; 1: 104-26.
19. Ebuehi OA, Ajayi OE, Onyeulor AL, Awelimobor D. Effects of oral administration of energy drinks on blood chemistry, tissue histology and brain acetylcholine in rabbits. *Nig Q J Hosp Med*. 2011; 21(1): 29-34.
20. Higgins JP, Ortiz BL. Energy drink ingredients and their effect on endothelial function: A Review. *Int J Clin Cardiol*. 2014; 1:1-6.
21. Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP. Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr*. 2014; 53(7): 1561-71.
22. Molnar J, Somberg JC. Evaluation of the Effects of Different Energy Drinks and Coffee on Endothelial Function. *Am J Cardiol*. 2015; 116(9): 1457-60.
23. Reis R, Charehsaz M, Sipahi H, et al. Energy Drink Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Damage in Rat Liver and Brain When Used Alone or Combined with Alcohol. *J Food Sci*. 2017; 82(4):1037-43.
24. Mubarak R. Effect of red bull energy drink on Rat's submandibular salivary glands (Light and Electron microscopic study). *J Amer Sci*. 2012; 8(1): 366-72.
25. Khayyat L, Essawy A, Sorour J, Al Rawi M. Impact of Some Energy Drinks on the Structure and Function of the Kidney in Wistar Albino Rats. *Life Sci J*. 2014; 11(10): 1131-8.
26. Khayyat L, Rawi ML, Essawy A. Histological, Ultrastructural and Physiological Studies on the Effect of Different Kinds of Energy Drinks on the Liver of Wistar albino Rat. *J Amer Sci*. 2012; 8(8): 688-97.
27. Ayuob N, ElBeshbeishy R. Impact of an Energy Drink on the Structure of Stomach and Pancreas of Albino Rat: Can Omega-3 Provide a Protection? *PLoS One*. 2016; 11(2): e0149191.
28. Valle MTC, Couto-Pereira NS, Lampert C, et al.. Energy drinks and their component modulate attention, memory, and antioxidant defences in rats. *Eur J Nutr*. 2018; 57(7): 2501-11.
29. Díaz A, Treviño S, Guevara J, et al. Energy Drink Administration in Combination with Alcohol Causes an Inflammatory Response and Oxidative Stress in the Hippocampus and Temporal Cortex of Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 8725354.
30. Kassab A, Tawfik S. Effect of a caffeinated energy drink and its withdrawal on the submandibular salivary gland of adult male albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology*. 2018; 41(1): 11-26.
31. Tek M, Toptas O, Akkas I, Kazancioglu HO, Firat T, Ezirganli S, Ozan F. Effects of energy drinks on soft tissue healing. *J Craniofac Surg*. 2014; 25(6): 2084-8.
32. Barcelos RP, Souza MA, Amaral GP, et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sci*. 2014; 96(1-2): 40-5.

33. Ugwuja EI. Biochemical effects of energy drinks alone or in combination with alcohol in normal albino rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2014; 4(1): 69–74.
34. Miles-Chan JL, Charriere N, Grasser EK, Montani JP, Dulloo AG. The blood pressure-elevating effect of Red Bull energy drink is mimicked by caffeine but through different hemodynamic pathways. *Physiol Rep*. 2015; 3(2): e12290.
35. Alford C, Cox H, Wescott R. The effects of red bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acids*. 2001; 21(2): 139-50.
36. Nikolic TR, Zivkovic VI, Srejovic IM, et al. Acute effects of nandrolone decanoate on cardiodynamic parameters in isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016; 94(10): 1048-57.
37. Stanojevic D, Jakovljevic V, Barudzic N, et al. Overtraining does not induce oxidative stress and inflammation in blood and heart of rats. *Physiol Res*. 2016; 65(1): 81-90.
38. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, 1985, pp 123-32.
39. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38(1-2): 161-70.
40. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1): 131-8.
41. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95(2): 351-8.
42. Pusica I, Djordjevic D, Bradic J et al. The effects of acute and chronic Red Bull consumption on cardiodynamics and oxidative stress in coronary effluent of trained rats. *Vojnosanitetski pregled*. 2019; 40-40. 10.2298/VSP190119040P.
- 43 Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009;8:1-25.
44. Schelbert HR. Anatomy and physiology of coronary blood flow. *J Nucl Cardiol*. 2010; 17(4):545-54.