



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Катарина Г. Михајловић

**ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ  
ПРИМЕНЕ ЦИСПЛАТИНЕ И Ru(II)  
КОМПЛЕКСА НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ И  
ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС ПАЦОВА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Katarina G. Mihajlović

**ISPITIVANJE EFEKATA HRONIČNE  
PRIMENE CISPLATINE I Ru(II)  
KOMPLEKSA NA IZOLOVANO SRCE I  
OKSIDACIONI STRES PACOVA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Katarina G. Mihajlovic

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF  
CHRONIC ADMINISTRATION OF  
CISPLATIN AND Ru(II) COMPLEXES ON  
THE ISOLATED HEART AND OXIDATIVE  
STRESS OF RATS**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Катарина Г. Михајловић
Датум и место рођења: 17. 5. 1987. Краљево
Садашње запослење: Истраживач-приправник за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова
Број страница: 206
Број слика: 6 слика, 14 табела, 160 графикана, 9 схема
Број библиографских података: 310
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: <i>dr rer. nat.</i> Слободан Новокмет, редовни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 9. 6. 2017. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-829/41, дана 8. 9. 2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;</li><li>2. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;</li><li>3. Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1.
Датум одбране дисертације:

## IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Katarina G. Mihajlović
Datum i mesto rođenja: 17. 5. 1987. Kraljevo
Sadašnje zaposlenje: Istraživač-pripravnik za užu naučnu oblast Farmaceutska biotehnologija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Ispitivanje efekata hronične primene cisplatine i Ru(II) kompleksa na izolovano srce i oksidacioni stres pacova
Broj stranica: 206
Broj slika: 6 slika, 14 tabela, 160 grafikona, 9 shema
Broj bibliografskih podataka: 310
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Laboratorija za kardiovaskularnu fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: <i>dr rer. nat.</i> Slobodan Novokmet, redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
<b>Ocena i odbrana</b>
Datum prijave teme: 9. 6. 2017. godine
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-829/41, dana 8. 9. 2017. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik;</li><li>2. Prof. dr Marija Milovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član;</li><li>3. Prof. dr Tibor Sabo, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član</li></ol>
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: <ol style="list-style-type: none"><li>1.</li></ol>
Datum odbrane disertacije:

## DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

<b>Author</b>
Name and surname: Katarina G. Mihajlovic
Date and place of birth: 17. 5. 1987. Kraljevo
Current employment: Research Trainee for the narrow scientific field of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Investigation of the effects of chronic administration of cisplatin and Ru(II) complexes on the isolated heart and oxidative stress of rats
No. of pages: 206
No. of images: 6 pictures, 14 tables, 160 charts, 9 schemes
No. of bibliographic data: 310
Institution and place of work: Laboratory for Cardiovascular Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: <i>dr rer. nat.</i> Slobodan Novokmet, full professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 9. 6. 2017.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-829/41, 8. 9. 2017.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Prof. dr Vladimir Jakovljevic, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Physiology, president;</li><li>2. Prof. dr Marija Milovanovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and Immunology, member;</li><li>3. Prof. dr Tibor Sabo, full professor at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade for the narrow scientific field of General and Inorganic Chemistry, member;</li></ol>
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation: <ol style="list-style-type: none"><li>1.</li></ol>
Date of Dissertation Defense:

## *Захвалница*

*Посебну захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу на пруженој прилици за стручно усавшавање у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију и на безграничној подршци током израде ове докторске дисертације.*

*Ментору, проф. др Слободану Новокмету, који је руководио овим радом захваљујем на свестраној помоћи и подршци.*

*Најтоплије се захваљујем свим колегама, члановима Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, за несебичну стручну помоћ и моралну подршку током израде ове тезе, а посебну захвалност дугујем проф. др Владимиру Живковићу и проф. др Ивану Срејовићу на корисним саветима, помоћи и сарадњи.*

*Неизмерну захвалност дугујем својој породици и пријатељима на несебичној подршци и љубави коју су ми пружили.*

## САЖЕТАК

**Увод:** Комплекси рутенијума(II) су показали антитуморску активност, а њихова предност у поређењу са цисплатином огледа се у потенцијално нижој токсичности, доброј селективности и инхибицији метастаза.

**Циљ:** Циљ ове студије био је да се испитају ефекти комплекса рутенијума,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$ , на срце и упореде са цисплатином. Посебна пажња је била усмерена и ка испитивању ефеката цисплатине и комплекса рутенијума на индукцију оксидационог стреса.

**Материјал и методе:** У студију је било укључено 60 *W. albino* пацова подељених у 5 група. Животиње су 4 недеље примале 4 mg/kg/недељно комплексе рутенијума, и цисплатину у истој дози и физиолошки раствор (4 ml/kg). На крају третмана, животиње су жртвоване, а срца су перфундована према *Langendorff*-овом моделу. У крви се одређивао ниво маркера оксидационог стреса и функције срца, бубрега и јетре.

**Резултати:**  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  је испољио негативно инотропно и хипотензивно дејство и индуковао оксидациони стрес, слично као и цисплатина, док су хистопатолошка оштећења органа била блажа.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  је остварио негативно инотропно и хипотензивно дејство и снажан оксидациони стрес, и ова дејства су била слабија од цисплатине.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  је остварио сличне ефекте на срце као и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и индуковао умерени оксидациони стрес.

**Закључак:** Профил токсичности  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  смањује изгледе за потенцијалну терапијску примену, док би  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  могли бити потенцијални кандидати за даљи развој, уз хемијске модификације које би умањиле токсичност, а повећале биолошку активност.

**Кључне речи:** рутенијум(II) комплекси, цисплатина, изоловано срце, оксидациони стрес



## ABSTRACT

**Introduction:** Ruthenium(II) complexes have shown antitumor activity and their advantage compared to cisplatin is reflected in potentially lower toxicity, good selectivity and inhibition of metastases.

**Aim:** The aim of this study was to examine the effects of ruthenium complexes,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$ , on heart and compared with cisplatin. Special attention was aimed at examining the effects of cisplatin and ruthenium complexes on induction of oxidative stress.

**Material and methods:** 60 *W. albino* rats divided into 5 groups were included in study. Animals received 4 mg/kg/week of ruthenium complexes, and cisplatin in same dose and physiological solution (4 ml/kg) for 4 weeks. At the end of treatment animals were sacrificed and hearts were perfused according to *Langendorff* model. The level of markers of oxidative stress and heart, kidney and liver function was assessed in blood.

**Results:**  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  exerted negative inotropic and hypotensive effects and induced oxidative stress, similar to cisplatin, while histopathological organ damage was milder.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  exerted negative inotropic and hypotensive effects and strong oxidative stress, and these effects were weaker than cisplatin.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  exerted similar cardiac effects as  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  and induced moderate oxidative stress.

**Conclusion:** The toxicity profile of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  reduces the prospects for potential therapeutic use, while  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  could be potential candidates for further development, with chemical modifications that would reduce toxicity and increase biological activity.

**Key words:** ruthenium(II) complexes, cisplatin, isolated heart, oxidative stress

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Цисплатина .....</b>	<b>7</b>
<i>1.1.1. Историјски преглед .....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2. Клиничка примена цисплатине и њених аналога .....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3. Механизам дејства цисплатине .....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.4. Фармакокинетички профил цисплатине.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.5. Нежељена дејства цисплатине .....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.5.1. Нефротоксичност .....</i>	<i>14</i>
<i>1.1.5.2. Хепатотоксичност .....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.5.3. Кардиотоксичност.....</i>	<i>16</i>
<b>1.2. Комплексна једињења рутенијума .....</b>	<b>18</b>
<i>1.2.1. Историјски преглед .....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2. Антитуморски комплекси рутенијума(III) .....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3. Антитуморски комплекси рутенијума(II).....</i>	<i>20</i>
<i>1.2.3.1. Аренски комплекси рутенијума(II) .....</i>	<i>21</i>
<i>1.2.3.2. Полипиридилски комплекси рутенијума(II) .....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.3.3. Испитивани комплекси рутенијума(II) .....</i>	<i>22</i>
<b>1.3. Оксидациони стрес .....</b>	<b>26</b>
<i>1.3.1. Редокс равнотежа.....</i>	<i>26</i>
<i>1.3.2. Системи антиоксидационе заштите .....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.3. Улога оксидационог стреса у кардиотоксичности изазваној цисплатином .....</i>	<i>29</i>
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>33</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Етички аспекти .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Материјал.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3. Испитивани комплекси рутенијума(II).....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. Експерименталне животиње и хронични третман.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5. Експериментални протокол .....</b>	<b>36</b>
<i>3.5.1. Одређивање маркера оксидационог стреса у крви и срчаном ткиву.....</i>	<i>36</i>
<i>3.5.1.1. Одређивање супероксид анјон радикала .....</i>	<i>37</i>
<i>3.5.1.2. Одређивање водоник пероксида.....</i>	<i>37</i>
<i>3.5.1.3. Одређивање индекса липидне пероксидације.....</i>	<i>37</i>
<i>3.5.1.4. Одређивање нитрита.....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.1.5. Одређивање активности каталазе .....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.1.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе .....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.1.7. Одређивање активности глутатион пероксидазе .....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.1.8. Одређивање редукованог и оксидованог глутатиона.....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.2. Одређивање биохемијских маркера у серуму .....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.2.1. Одређивање биохемијских маркера функције срца .....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.2.2. Одређивање биохемијских маркера функције јетре.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.2.3. Одређивање биохемијских маркера функције бубрега.....</i>	<i>39</i>

3.5.2.4. Одређивање липидног профила.....	40
3.5.2.5. Одређивање протеина.....	40
<b>3.6. Експериментални модел изолованог срца пацова (<i>Langendorff</i>-ова метода)....</b>	<b>40</b>
<b>3.7. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....</b>	<b>43</b>
3.7.1. Одређивање супероксид анјон радикала.....	43
3.7.2. Одређивање водоник пероксида .....	44
3.7.3. Одређивање индекса липидне пероксидације .....	44
3.7.4. Одређивање нитрита.....	44
<b>3.8. Релативна експресија проапоптотских и антиапоптотских гена у срчаном ткиву.....</b>	<b>44</b>
<b>3.9. Хистопатолошка анализа ткива срца, јетре и бубрега.....</b>	<b>45</b>
<b>3.10. Статистичка обрада података .....</b>	<b>45</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Телесна маса .....</b>	<b>47</b>
4.1.1. Утицај примене комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора на телесну масу пацова .....	47
4.1.2. Утицај примене комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора на масу органа пацова .....	50
<b>4.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова .....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	51
4.2.2. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....	56
4.2.3. Ефекти хроничне примене рутенијум комплекса са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	60
4.2.4. Ефекти хроничне примене цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	64
4.2.5. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	68
4.2.6. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	72
4.2.7. Поређење ефеката хроничне примене свих испитиваних једињења на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	75
4.2.8. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	83
4.2.9. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....	86
4.2.10. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....	89
4.2.11. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....	92

4.2.12. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	95
4.2.13. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....	98
4.2.14. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	101
4.2.15. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	104
4.2.16. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	107
4.2.17. Поређење ефеката хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца.....	110
<b>4.3. Ефекти хроничне примене испитивних једињења на параметре оксидационог стреса .....</b>	<b>113</b>
4.3.1. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	113
4.3.2. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	116
4.3.3. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	118
4.3.4. Ефекти хроничне примене цисплатине на параметр оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	120
4.3.5. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	122
4.3.6. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.....	124
4.3.7. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметр системског оксидационог стреса у плазми .....	127
4.3.8. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметре ензима антиоксидационе заштите у еритроцитима .....	130
4.3.9. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметре оксидационог стреса у срчаном ткиву.....	132
<b>4.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере апоптозе у срчаном ткиву .....</b>	<b>135</b>
<b>4.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на биохемијске маркере у серуму .....</b>	<b>136</b>
4.5.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на липидни профил у серуму.....	136
4.5.2. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције срца у серуму.....	139
4.5.3. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције јетре у серуму.....	141
4.5.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције бубрега у серуму.....	142
4.5.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на протеине у серуму.....	144

<b>4.6. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене органа .....</b>	<b>145</b>
<i>4.6.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на хистолошке промене у ткиву срца.....</i>	<i>145</i>
<i>4.6.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене у ткиву јетре.....</i>	<i>146</i>
<i>4.6.3. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене у ткиву бубрега.....</i>	<i>148</i>
<b>4.7. Анализа корелације између свих кардиодинамских параметара свих експерименталних група са вредностима маркера оксидационог стреса .....</b>	<b>149</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>152</b>
<b>5.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на морфометријске карактеристике .....</b>	<b>152</b>
<b>5.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца .....</b>	<b>153</b>
<b>5.3. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту .....</b>	<b>158</b>
<b>5.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на системски и ткивни оксидациони стрес .....</b>	<b>160</b>
<b>5.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере апоптозе .....</b>	<b>164</b>
<b>5.6. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на биохемијске маркере у серуму .....</b>	<b>165</b>
<b>5.7. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене органа пацова .....</b>	<b>169</b>
<b>5.8. Кардиотоксичне особине и профил индукције оксидационог стреса испитиваних комплекса рутенијума.....</b>	<b>171</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>176</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>181</b>
<b>8. СКРАЋЕНИЦЕ.....</b>	<b>204</b>

**I**

**УВОД**

## 1. УВОД

Карцином је данас први или други најчешћи узрок преране смртности у већини земаља света (Сао и др, 2018). У свету је 2020. године откривено око 19,3 милиона нових случајева малигних обољења и процењено око 10 милиона смртних исхода од карцинома. Такође је установљено и да код појединаца постоји око 20% ризика за добијање малигних тумора током живота (пре 75. године) са ризиком од 10% за смртни исход. Са 2,26 милиона нових случајева у 2020. години, карцином дојке код жена постао је најчешће дијагностиковано малигно обољење широм света, а затим га следи карцином плућа (2,21 милиона нових случајева годишње). Као најчешћи узрок смрти од карцинома остаје далеко испред свих карцином плућа (1,8 милиона смртних случајева), затим карцином јетре (0,83 милиона) и карцином желуца (0,77 милиона) (Ferlay и др, 2021). Очекује се да ће на глобалном нивоу број људи оболелих од карцинома значајно расти у наредних 50 година услед снажног утицаја демографских промена, као што су раст становништва и старење, са претпоставком удвостручења учесталости свих врста карцинома (WHO, 2020). Наиме, предвиђа се да ће 2070. године бити дијагностиковано чак 34 милиона нових случајева карцинома. Највећи пораст броја болесника са карциномом очекује се у земљама у развоју које имају низак социоекономски раст и стандард. Повећање преваленције свих карцинома тиме ће додатно оптеретити здравствени систем и економију многих држава (Luengo-Fernandez и др, 2013; Soerjomataram и Bray, 2021). У последњих неколико деценија поражавајућа статистика о броју новооболелих од малигних тумора и смртности покренула је стратегије за превенцију карцинома у виду смањења фактора ризика, као и националних скрининг програма (Wild и др, 2020; GBD, 2020). Њихово успешно спровођење има значајне користи како на јавно здравље тако и на економске аспекте, спречавајући нове случајеве малигних болести и повезане смртне исходе. Тиме се такође смањују директни и индиректни трошкови неге пацијената, али и губитак националног дохотка који настаје као резултат изгубљене продуктивности (Pearce и др, 2018).

Поред многих стратегија за спречавање карцинома, велико глобално оптерећење малигним обољењима усмерило је и велику пажњу научника ка развоју ефикаснијих и безбеднијих лекова. Научна достигнућа савремене медицине и високих технологија која рапидно расту омогућавају примену нових успешних модалитета лечења различитих врста тумора. Међутим, у већини земаља широм света и даље се примењују деценијама уназад познати терапијски приступи лечења малигнитета који подразумевају хируршку ексцизију тумора, радиотерапију и хемиотерапију.

- Хируршко лечење: подразумева хируршко одстрањивање комплетног тумора или његовог дела коме се може приступити.
- Радиотерапија: се односи на примену контролисаних доза зрачења директно на туморско ткиво или на регију у којој се тумор налазио после његовог хируршког уклањања. Овај приступ се користи код солидних тумора и локализованих појединачних метастаза. Међутим, терапија зрачењем значајно оштећује здрава ткива и може изазвати озбиљна нежељена дејства (Nguyen и др, 2018).

- Хемиотерапија: подразумева системску примену хемиотерапеутика, односно цитостатика. (Figue, 2003). Цитостатици су биолошки активна једињења са значајном антитуморском активношћу. Ови лекови пре свега делују на дезоксирибонуклеинску киселину (ДНК), али и на друге биомолекуле који учествују у ћелијској деоби (Pilić и др, 2019). Након ковалентног везивања за ДНК или интеркалирања у хеликс ДНК, долази до инхибиције транскрипције молекула ДНК чиме се индукују различити молекуларни механизми који изазивају смрт туморских ћелија. (Mollaei и др, 2021). Поједини хемиотерапеутици се састоје од органских молекула (бусулфан) (Champlin, 2013), док неки садрже неорганска комплексна једињења (цисплатина, *cis*-диаминодихлоридоплатина(II), CDDP) (Ghosh, 2019).

На одабир једног од поменутих приступа, или пак комбиновање више њих, утичу најпре врста малигног тумора, његова величина и локализација, али и карактеристике самог болесника (старосна доб, коморбидитети и др.).

Металофармацеутици представљају примере сложених једињења која се дуго времена изучавају у неорганској медицинској хемији као потенцијални терапеутски агенси. Неколико металофармацеутика су испољили значајну терапијску ефикасност у клиничкој пракси, а много више њих су испитивани у различитим фазама клиничких испитивања. Хемија координационих једињења – металофармацеутика, представља платформу за дизајн нових лекова. Примена комплекса метала као ефикасних фармацеутика који испољавају антиинфламаторно, антидијабетичко, антимиembroно дејство, или њихова примена као дијагностичких агенаса, представља кључну основу за дизајн и даља испитивања.

На активност металофармацеутика може се утицати одговарајућим избором лигананда (његовог дизајна и синтезе), и посебно, валентног (оксидационог) стања централног металног јона. Комплекси платине, рутенијума, кобалта, бакра и других сличних металних јона се дуго користе у медицини, али је тек недавно постигнут напредак у разумевању молекулске основе механизма њиховог деловања. Примера ради, металофармацеутици на бази молибдена делују путем интеркалације односно цепања нуклеинских киселина и на тај начин ремете ћелијски циклус и функције ћелијске мембране. Последице, металофармацеутици који садрже молибден имају потенцијални терапијски значај код већег броја обољења, као што су тумори, Вилсонова болест, дијабетес мелитус, Хантингтонова болест, атеросклероза и анемија (Jurawska и др, 2016).

Поред евидентног напретка постоје и одређена ограничења и изазови који се морају савладати пре него што се остваре пуне предности нових металофармацеутика у медицини и фармацији (Chylewska и др, 2018). Уопште узев, развој иновативних и нових металофармацеутика иако интензиван није брз, због многих различитих и сложених аспеката које треба превазићи пре него што се досегну могућности за њихову примену у свакодневној клиничкој пракси. Због тога је удео тренутно одобрених металофармацеутика веома низак, за разлику од већине лекова доступних као органска једињења (Abid и др, 2016).

Развој металофармацеутика има дуг историјат али постоје сталне иновације које су, с једне стране условљене порастом сазнања у основним биолошким и патолошким процесима а, с друге, повећаним потребама које намеће стварна клиничка пракса. Нпр. откриће укључености азот монооксида (NO) у неколико физиолошких и патофизиолошких процеса покренуло је експоненцијални пораст публикованих студија у областима као што су хемија, биохемија и фармакологија. Један од истраживачких



изазова у овој области је била потреба за открићем донора или хватача NO који би ефикасно регулисали његову концентрацију и биорасположивост у људском организму.

Додатна истраживања су потребна и у области терапије онколошких обољења. Матичне ћелије малигнух тумора су у великој мери повезане са рецидивима болести и метастазама које претходе фаталним исходима. Конвенционалне терапије, као што су хирургија, хемиотерапија и зрачење, у знатној мери су ограничене ефикасности. Због тога су потребни веома оригинални приступи за превазилажење овог проблема, а хемијска разноврсност коју нуде метали може бити искоришћена за развој нове класе металофармацеутика који би ефикасније супримирали матичне ћелије туморског ткива (Laws и Suntharalingam, 2018).

У последњих неколико деценија, медицински хемичари су своје напоре усмерили ка рационалном дизајну металофармацеутика. Познато је да прелазни метали показују јединствене карактеристике, као што је редокс активност и реактивност према одређеним органским супстратима. Ова својства прелазних метала су омогућила синтезу комплекса метала који се могу везати за одређене биомолекуле и тиме ометати механизме пролиферације ћелија (Bergamo и др, 2012). Сходно томе, велики број комплекса прелазних метала је синтетисан и тестиран *in vitro* и *in vivo* са циљем открића металофармацеутика који би имали нижу токсичност и исту или већу потентност против тумора (Bruijninx и Sadler, 2008). Тренутно је у фокусу научника синтеза и истраживање потенцијалне антитуморске активности и токсичности комплекса рутенијума (II/III). Једињења рутенијума су показала значајне антитуморске и антиметастатске активности против различитих малигнух неоплазми, посебно оних који су резистентни на примену цисплатине (Trondl и др, 2014). Предности комплекса рутенијума у поређењу са цисплатином се огледају у нижој токсичности, доброј селективности за туморе и инхибицији прогресија метастаза. Синтеза и истраживање Ru(II) комплекса су пре свега привукли пажњу због својих цитотоксичних и антиканцерогених својстава, а посебно сазнање да се Ru(II)комплекси могу формирати (активирати) *in vivo* из њихових Ru(III) комплекса, слично као прекурсори или пролекови (Spreckelmeyer и др, 2014). Ову активацију прати редукција, а до данас добро позната цитотоксична Ru(II) једињења су Ru(II)-аренски комплекси (Levina и др, 2009; van Rijt I Sadler, 2009) који везују различите функционалне групе преко Ru(II) металног центра или аренске групе (Muhammad и Guo, 2014). Ова једињења испољавају цитотоксичне ефекте везивањем њихових аква врсти за ДНК молекула, док интеракција са редокс системом у ћелијама доводи до антиканцерогене активности (Jungwirth и др, 2011). Претпоставља се да је ниска системска токсичност комплекса Ru(II) повезана са чињеницом да рутенијум може опонашати гвожђе у везивању за два главна транспортна протеина у серуму, албумин и трансферин. Ови протеини су битни не само за испоруку комплекса рутенијума до места деловања, већ су такође и одговорни за њихове терапијске и нежељене ефекте, метаболизам и излучивање (Dobson и Kell, 2008).

Осим биогених метала, велики број неесенцијалних метала се користи у терапији и дијагностици, нпр. металофармацеутици са платином за терапију тумора, литијум за лечење биполарног поремећаја, сребро као антимицробни лек и бизмут као антибиотик широког спектра. Увођење нових металофармацеутика представља велики изазов за експерименталну медицину. Бројне су препреке које леже на путу од открића молекула, потенцијалног лека до његовог увођења у клиничку праксу. Значајне фазе су дизајн нових супстанци и проучавање њиховог механизма дејства. У оба домена, веза

металофармацеутика и оксидационог стреса представља поље великих истраживачких непознаница које захтева даље систематске студије.

Откриће и развој нових и ефикаснијих лекова базираних на органским молекулима данас укључује идентификацију циљног сигналног молекула и скрининг библиотека једињења високих перформанси. Међутим, ове методе су мање ефикасне када се доследно примењују на потенцијалне металофармацеутике. Металофармацеутици су најчешће прекурсори који у биоокружењу подлежу активацији супституцијом лиганда или редокс реакцијама, што све треба узети у обзир приликом утврђивања односа структуре и активности. Бројни су изазови у открићу металофармацеутика у раној фази, посебно у процени антитуморског дејства. Дубље разумевање дејства металофармацеутика на биолошке системе, како здравог тако и оболелог организма је од посебног значаја за савремену медицину (Allarduce и Dyson, 2016). У том смислу, нова једињења рутенијума представљају потенцијалне важне супстанце чија хемијска структура треба да буде таква да обезбеди пуну антитуморску активност, прихватљиву токсичност и повољне фармакокинетичке особине да би била погодна за клиничку употребу. Упркос знатном напретку у овој области, металофармацеутици на бази рутенијума још увек нису одобрени за клиничку употребу.

Механизми дејства једињења прелазних метала на туморска ткива су веома комплексни, међусобно испреплетани и делом познати. Међу њима се значајно истичу путеви оксидационог стреса и антиоксидационе одбране. Појачан ћелијски оксидациони стрес се заправо сматра једним од кључних фактора у патофизиолошким механизмима развоја малигнух тумора. Здраве ћелије користе неколико механизма за одржавање интрацелуларних концентрација слободних радикала и укупне редокс хомеостазе како би избегле оштећење ДНК, протеина и липида. С друге стране, ћелије тумора показују повишене нивое реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) и појачане заштитне антиоксидационе путеве. Овако појачан оксидациони стрес и побољшани антиоксидациони одбрамбени механизми у туморским ћелијама пружају прилику за развој лекова. При томе, сложеност механизма ROS и антиоксидационе одбране отвара нове могућности за увођење лекова са различитим механизмима деловања на туморске ћелије. Од значаја су, дакле, како тумор-супресивне тако и тумор-промовишуће функције ROS и две различите терапијске стратегије (повећање или смањење ROS у борби против малигнух болести). Данас већ постоје антитуморски лекови који су одобрени за клиничку примену а за које се недвосмислено зна да на туморе делују механизмима индукције оксидационог стреса, укључујући и једињења појединих прелазних метала (Azmanova и Anaïs Pitto-Barry, 2022).

Већина лекова из групе цитостатика нема селективно дејство само на туморске ћелије. Поред тога што доводе до смрти малигнух ћелија они изазивају и лизу многих здравих ћелија у организму, а као последица тога настају многа и озбиљна нежељена дејства. Међу озбиљним нежељеним ефектима антитуморских лекова спада и кардиотоксичност, тј. поремећај функционисања кардиоваскуларног система. Настанак кардиоваскуларних компликација код онколошких пацијената као последица примене хемиотерапеутика додатно угрожава здравље и, у крајњем, дугорочно преживљавање ових пацијената. Велика учесталост кардиотоксичности услед примене цитостатика тиме повећава оптерећеност здравственог система, који је ионако изузетно оптерећен високом преваленцијом кардиоваскуларних болести (КВБ). Наиме, КВБ су и даље водећи узрок смрти широм света, одговорне за око 17,8 милиона смртних случајева током 2017. године, од чега је више од три четвртине у земљама са ниским и средњим дохотком. То је чинило 31,8% свих смртних случајева, скоро двоструко више од

процента смртних случајева насталих услед карцинома (17,1%) (Roth и др, 2018). Иако се стопа смртности од КВБ сваке године смањује, апсолутни број умрлих од КВБ и даље расте, пре свега због старења становништва (будући да је старост сама по себи фактор ризика за КВБ) (Saglietto и др, 2021).

Хемиотерапија и циљана терапија могу утицати на кардиоваскуларни систем, како на централном нивоу погоршањем функције срца, тако и на периферији појачањем промене хемодинамског протока и настанком тромботичних догађаја. Кардиотоксичност се може јавити током или непосредно након лечења (у року од неколико дана или недеља), или пак неколико година након престанка примене антитуморске терапије. Дели се на субакутни, акутни или хронични облик. Акутна или субакутна кардиотоксичност се јавља током прве две недеље примене терапије и одликује се електрокардиографским променама (најчешће QT-интервала), суправентрикуларним и вентрикуларним аритмијама, или акутним коронарним синдромом и синдромом сличним перикардитису и/или миокардитису. Хронична кардиотоксичност се на основу симптома може разврстати у два подтипа. Први подтип се јавља рано, у току прве године након престанка хемиотерапије, а други након прве године од престанка примене терапије. Типични знак хроничне кардиотоксичности је асимптоматска систолна и/или дијастолна дисфункција леве коморе која доводи до озбиљне конгестивне кардиомиопатије и последично могућег смртог исхода (Tubbs и Nussenzweig, 2017; Pilić, 2019; Bhagat и Kleinerman, 2020). Кардиоваскуларна нежељена дејства се деле на пет врста: 1) директни цитотоксични ефекти и последична систолна дисфункција, 2) исхемија срца, 3) аритмије (нарочито типа торсаде), 4) перикардитис и 5) поремећаји реполаризације индуковани цитостатикима.

Различите компоненте кардиоваскуларног система могу бити мета цитостатика: кардиомиоцити, перикард, коагулациони систем и крвни судови. Традиционални антинеопластични агенси (антрациклини, циклофосфамид, таксани, флуороурацил, винка алкалоиди, бусульфани, цисплатина, блеомицин) имају цитостатско дејство и могу ирреверзибилно оштетити миокард због тога што изазивају смрт кардиомиоцита (оштећење I типа) (Agunbiade и др, 2019). Најчешћи кардиоваскуларни нежељени ефекти новијих цитостатика који делују механизмом измене сигналних путева су артеријска хипертензија, аритмије, дисфункција леве коморе и срчана инсуфицијенција, али је оваква кардиотоксичност реверзибилна и мање штетна, јер је повезана са хибернацијом ћелија миокарда (оштећења II типа) (Herrmann, 2020; Jain и Aronow, 2019).

## 1.1. Цисплатина

### 1.1.1. Историјски преглед

2022. године обележава се 57 година од открића антитуморског дејства цисплатине (Схема 1). Давна 1965. година, када је *Barnett Rosenberg* случајно открио антитуморска својства цисплатине, представља прекретницу у историји онкологије и приступу лечењу тумора. Цисплатина је већ '70-их година 20. века, тачније 19. децембра 1978. године, добила одобрење за употребу у клиничкој пракси од стране Америчке Агенције за храну и лекове. Од тада, па све до данас, упркос развоју нових терапија (циљане терапије, имунотерапије, итд.), цисплатина се са успехом користи у третману различитих врста карцинома, нарочито главе, врата, плућа, бешике, тестиса и јајника. Без обзира на ограничавајуће факторе, попут бројних нежељених дејстава и резистенције, цисплатина заузима посебно место унутар широког спектра хемиотерапијских лекова (Rancoule и др, 2017).

Историја цисплатине је заправо започета још у 19. веку, 1884. године, када ју је први синтетисао италијански хемичар *Michele Peyrone*, по коме је цисплатини додељен и назив Пејронов хлорид. Недуго затим, швајцарски хемичар *Alfred Werner* је 1893. године дефинисао структуру цисплатине, да би *Rosenberg* 1965. године сасвим случајно открио цитотоксичну моћ цисплатине проучавањем утицаја електричног поља на раст бактерија. Наиме, у једном од својих експеримената показао је да бактерије *Escherichia coli* престају са деобом након примене платинских електрода за генерисање електричног поља. Затим је са сарадницима доказао да платинске електроде кородирају у раствору амонијум-хлорида, при чему током електролизе настаје цисплатина која је била одговорна за престанак размножавања бактерија (Rosenberg и др, 1965). Управо је ово инхибиторно деловање цисплатине на деобу бактеријских ћелија побудило интересовање за даља истраживања комплекса платине као антитуморских агенаса. 1969. године објављена је *in vivo* студија на мишевима са леукемијом која је показала благотворно дејство цисплатине на туморе. Убрзо након претклиничких фаза испитивања, цисплатина је 1971. године почела да се примењује код људи, да би седам година касније добила и званично одобрење за клиничку примену у лечењу карцинома јајника и тестиса. Од тог тренутка, истраживања у вези ефикасности и безбедности цисплатине нису посустајала. Научници су највећу пажњу усмеравали ка расветљавању механизма цитотоксичног деловања и резистенције туморских ћелија на цисплатину, као и ка испитивању ефикасности нових комплекса платине или комбинације цисплатине са другим модалитетима лечења (хируршке интервенције, радиотерапија, циљана терапија). Од уласка цисплатине у клиничку праксу, 25 различитих агенаса заснованих на платини такође су достигли фазу клиничких испитивања, а одређени су регистровани и за клиничку примену. Карбоплатина и оксалиплатина се користе у многим земљама, док су три лека добила одобрење само у појединим: недаплатина у Јапану, лобаплатина у Кини и хептаплатина у Јужној Кореји (Wheate и др, 2010).

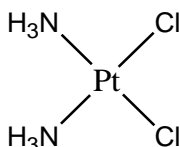


Схема 1. Хемијска структура цисплатине

### 1.1.2. Клиничка примена цисплатине и њених аналога

Цисплатина припада првој генерацији једињења платине са антинеопластичним деловањем која се са успехом користи у лечењу многих тумора: главе, врата, плућа, бешике, тестиса, јајника, материце, дојке и меланома. Литературни подаци указују да се овај лек прописује код више од 60% свих онколошких пацијената. Делотворна је код различитих врста тумора попут карцинома, лимфома и саркома, али ипак највећу ефикасност испољава у терапији карцинома тестиса, са изузетно високом стопом преживљавања пацијената на дужи временски период. Упркос високој ефикасности и потентности цисплатине као хемиотерапеутика, бројни фактори ограничавају њену терапијску примену, на првом месту резистенција и токсичност.

Развој резистенције малигних ћелија након употребе поновљених доза цисплатине представља велики проблем у лечењу пацијената. Механизми резистенције на цисплатину подразумевају измене око преузимања лека од стране ћелија и његову смањену акумулацију у ћелији, појачано уклањање лека из организма путем интеракције са различитим ендогеним протеинима који садрже донорске атоме сумпора и азота, као и услед инхибиције апоптотских догађаја и аутофагије (Zhou и др, 2020). Отпорност ћелија настаје због блокаде везивања цисплатине за молекуле ДНК или због ометања апоптозе. Од унете дозе цисплатине, веома мали проценат ступа у интеракције са молекулом ДНК, док већи део интерагује са бројним молекулима, нарочито са протеинима који садрже тиолне групе (глутатион (енгл. *Reduced Glutathione*, GSH) и металотионеини). Ови молекули могу довести до инактивације цисплатине, након везивања у цитоплазми.

У циљу смањења резистенције и бројних токсичних ефеката цисплатине (нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност, неутропенија, периферна неуропатија и гастроинтестиналне сметње), примењују се различите стратегије лечења. Једна од њих подразумева употребу комбиноване цитостатске терапије (етопозид, паклитаксел, гемцитабин и др.), уз додатно радиотерапијско лечење тумора. Поред тога, од 1980-их година интензивно се синтетишу и проучавају аналоги цисплатине новијих генерација са намером да се добију агенси који би имали исту или већу ефикасност уз мању учесталост нежељених ефеката. Такав напор научника довео је до открића два широко примењивана аналога комплекса платине: карбоплатина и оксалиплатина.

**Карбоплатина** (*cis*-диамин-циклобутилдикарбоксилато-платина(II)) је аналог цисплатине друге генерације који је 1989. године одобрен за терапију карцинома јајника, посебно код тумора резистентних на примену цисплатине (Схема 2). Изменом хлоридних лиганата цисплатине са дикарбоксилатним бидентатним лигандом постигнута је боља стабилност и растворљивост комплекса у води, уз значајно нижу токсичност, нарочито нефротоксичност. Недостатак карбоплатине је слабија ефикасност у односу на цисплатину, премда се она може надоместити применом виших доза. Механизам којим остварује активност је сличан цисплатини и огледа се у индукцији апоптозе и стварању унакрсних веза са ДНК молекулом које онемогућавају функционисање ћелијске ДНК (Ho и др, 2016; Pignata и др, 2017). Уједно се формирају и ковалентни ДНК адукти са ћелијским компонентама, као што су липиди, протеини и рибонуклеинска киселина (РНК). Структурна разлика између цисплатине и карбоплатине, која се огледа у структури одлазећих лиганата, одређује и разлике у њиховим фармакодинамичким и фармакокинетичким особинама. При физиолошким рН вредностима два хлоридна лиганда цисплатине лако "одлазе" из комплекса, док је

за дејство карбоплатине неопходно најпре цепање циклобутилдикарбоксилатног лиганда од стране ендогених естераза. Отуда постоје и разлике у концентрацији оба лека на месту туморског ткива.

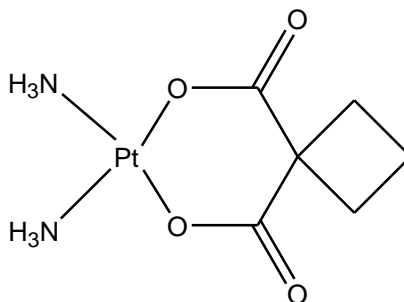


Схема 2. Хемијска структура карбоплатине

**Оксалиплатина** ([оксалато(2-)-O,O'] [1*R*,2*R*-циклохександиамин-N,N']платина(II)) је најзначајнији комплекс платине треће генерације који је регистрован 2002. године као адјувантна терапија колоректалног карцинома (Схема 3). Показала је значајно антитуморско дејство код карцинома дебелог црева који је резистентан на дејство цисплатине. Још једна предност оксалиплатине је што се може примењивати *per os*. Структурна разлика у односу на цисплатину је замена амино група цисплатине 1,2-диаминоциклохексанским лигандом (*dach*). Механизам дејства се заснива на спречавању синтезе ДНК и РНК са последичном апоптозом малигнух ћелија. Профил нежељених ефеката је сличан као и код цисплатине, с тим што се јављају са знатно нижом учесталошћу (Kang и др, 2021).

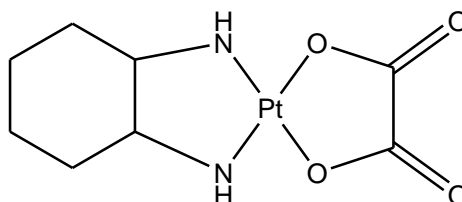


Схема 3. Хемијска структура оксалиплатине

Осим поменута два аналога цисплатине, бројни комплекси засновани на платини проучавају се у претклиничким и клиничким фазама испитивања, од којих су поједини ушли и у клиничку праксу. Такве супстанце су недаплатина, сатраплатина, пикоплатина и хептаплатина.

**Недаплатина** (*cis*-гликолатодиаминплатина(II)) је комплекс платине друге генерације одобрен за примену у Јапану 1998. године (Схема 4). Ефикасан је антитуморски агенс у терапији карцинома главе, врата, плућа, желуца и јајника, са ређом појавом нежељених дејстава попут наузеје, повраћања и нефротоксичности. Предност у односу на цисплатину је скоро десет пута боља растворљивост у води која је обезбеђена разликом у структури лиганда (Chikazawa и др, 2020).

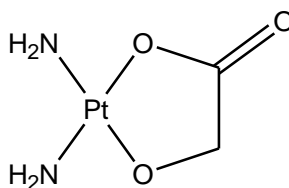


Схема 4. Хемијска структура недаплатине

**Лобаплатина** је аналог платине(II) треће генерације регистрован у Кини за лечење метастатског карцинома дојке и плућа и хроничне мијелоидне леукемије (Схема 5). Представља дијастереоизомерну смешу платина(II) комплекса која садржи 1,2-бис(аминометил)циклобутил лиганд и млечну киселину као одлазећу групу (McKeage, 2001). Испољава значајну антитуморску активност без настанка укрштене резистенције са цисплатином, а уз то није забележена појава нефротоксичности, неуротоксичности и ототоксичности. Међутим, ограничавајући фактор у терапији је појава дозно-зависне тромбоцитопеније, гранулоцитопеније и анемије.

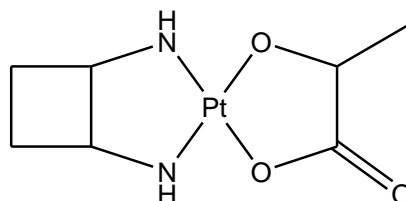


Схема 5. Хемијска структура лобаплатине

**Сатраплатина** (бис-(ацетат)-аминодихлоро(циклохексиламин)платина(IV)) је комплекс платине четврте генерације који се налази у трећој фази клиничких испитивања (Схема 6). У односу на остале аналоге издваја се по томе што је први лек из групе који је почео да се примењује перорално. Овакав начин примене је омогућен захваљујући липофилности и доброј стабилности сатраплатине. Карактерише је такође и бољи профил токсичности, као и мања вероватноћа за настанак укрштене резистенције са цисплатином (Bhargava and Vaishampayan, 2009).

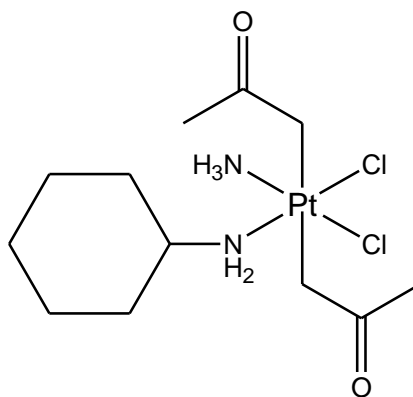


Схема 6. Хемијска структура сатраплатине

**Пикоплатина** је 2-метилпиридински аналог цисплатине за кога је у претклиничким и клиничким истраживањима показана ефикасност код цисплатина-резистентног микроцелуларног карцинома плућа (Схема 7). Значајну антитуморску активност пикоплатина је у комбинацији са гемцитабином испољила и код солидних тумора (Monneret, 2011).

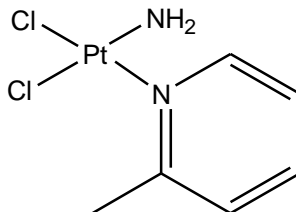


Схема 7. Хемијска структура пикоплатине

**Хептаплатина** (*cis*-малонато[(4*R*,5*R*)-4,5-бис(аминометил)-2-изопропил-1,3-диоксолан]платина(II)) је 2005. године регистрована у Јужној Кореји за терапију карцинома желуца (Схема 8). Њена предност се огледа у превазилажењу резистенције туморских ћелија која настаје након примене цисплатине. Недостаци хептаплатине су појава блажег степена хепатотоксичности и мијелосупресије, док је нефротоксичност дозно-зависна (Galanski и др, 2005).

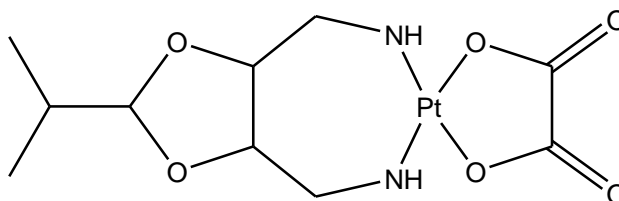


Схема 8. Хемијска структура хептаплатине

### 1.1.3. Механизам дејства цисплатине

Цисплатина је неорганско координативно једињење платине(II) које има квадрипланарну геометрију. У центру ове структуре налази се атом платине окружен са два хлоридо и два amino лиганда, при чему се хлоридни лиганди налазе у *cis*-положају. Када пасивном дифузијом доспе у ћелију, цисплатина подлеже процесу аквације при чему настају облици који показују бољу реактивност са молекулом ДНК,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  и  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ . Наиме, услед смањене концентрације хлоридних јона у цитоплазми, олакшана је замена хлоридо лиганда молекулима воде или хидроксилним групама (Wang и Lippard, 2005). Настала позитивно наелектрисана електрофилна једињења лако ступају у интеракцију са ендогеним нуклеофилним молекулима (протеини, РНК, мембрански фосфолипиди, као и молекули који садрже тиолну групу- глутатион, цистеин или метионин). Интеракција између цисплатине и ендогених нуклеофила стимулише настанак оксидационог стреса, који може имати директан цитотоксични ефекат или може оштетити молекул ДНК. С друге стране, само 1% од унете количине цисплатине реагује са молекулом ДНК туморских ћелија. Атом платине аква комплекса цисплатине се великим афинитетом ковалентно везује за



митохондријску и нуклеарну ДНК, посебно за нуклеофилни N7 атом азота на пуринским базама, што фаворизује стварање протеин-ДНК комплекса и интер- и интраланчаних ДНК производа (Sancho-Martinez и др, 2012). Цисплатина-ДНК адукти покрећу различите ћелијске одговоре, укључујући заустављање репликације и ћелијског циклуса, инхибицију транскрипције, репарацију ДНК и апоптозу. Сматра се да је мање од 1% ћелијског оштећења изазваног цисплатином повезано са настанком комплекса ДНК-протеин, док се као најчешћа оштећења наводе унакрсне везе које настају између цисплатине и ДНК. Цисплатина се чешће везује за молекулу ДНК на местима која садрже пуринске базе, нарочито два суседна гуанина, аденин и суседни гуанин, или два гуанина одвојена са једном или више база (Tchounwou и др, 2021; Rebillard и др, 2008).

Ова запажања сугеришу да дејство цисплатине на ДНК представља важан аспект њене антипролиферативне активности. Раније се веровало да ефекти цисплатине зависе од количине оштећења ДНК током S фазе ћелијског циклуса. Тренутно је познато да способност цисплатине да инхибира синтезу ДНК није једина карактеристика њеног цитотоксичног деловања. Наиме, везивање цисплатине за тиолне групе протеина представља важну улогу у стварању ћелијске енергије, регулацији трансмембранског транспорта и у формирању цитоскелета (Fuertes и др, 2003). Поменути механизми дејства цисплатине не леже само у основи њених антипролиферативних ефеката, већ и токсичних ефеката на многе системе органа, посебно на ренални и неуролошки систем.

Још један важан механизам цитотоксичности цисплатине представља њено деловање на ћелијску мембрану чиме се делимично може објаснити и настанак нежељених ефеката (Mascio и Madeddu, 2013). Наиме, цисплатина ступа у интеракцију са протеинима ћелијске мемbrane и негативно наелектрисаним фосфолипидима и смањује активност неких јонских канала и транспортера (Florea и Büsselberg, 2011). Као последица директне интеракције са фосфолипидима, активације сфингомијелина и промене у метаболизму холестерола, долази до дестабилизације мемbrane и њене повећане флуидности (Sancho-Martinez и др, 2012). Наведене промене активирају спољашњи пут апоптозе и доприносе смрти ћелија (Jensen и др, 2010).

Дакле, оштећење ДНК је само делимично укључено у процес ћелијске смрти изазване цисплатином. Један од механизма њеног антитуморског дејства је такође и индукција оксидационог стреса и настанак оксидационог оштећења ћелијских протеина. У нормалним физиолошким условима, ћелије могу контролисати ниво ROS стварањем равнотеже између настанка ROS и њихове елиминације под дејством антиоксидационог система заштите, којег чине ензимске и неензимске компоненте. Антиоксидациони ензими укључени у регулацију редокс статуса су: супероксид дисмутаза (енгл. *Superoxide dismutase*, SOD), каталаза (енгл. *Catalase*, CAT), глутатион пероксидаза (енгл. *Glutathione Peroxidase*, GSH-Px), глутатион трансфераза (енгл. *Glutathione Transferase*, GST) и глутатион редуктаза (енгл. *Glutathione Reductase*, GR). Неензимски антиоксиданси који чине саставни део система одбране од ROS су молекули мале молекулске масе, као што су редуковани глутатион, витамини Ц и Е,  $\beta$ -каротен, флавоноиди и липоинска киселина. Оксидациони стрес може изазвати оштећење не само ћелијских протеина, већ и липида и молекула ДНК, што може довести до настанка трајних оштећења ћелије и појаве карциногенезе (Dasari и Tchounwou, 2014). У туморским ћелијама се производи значајно већа количина ROS него у здравим ћелијама, вероватно због стимулације онкогена, повећане метаболичке активности и оштећења митохондрија. Међутим, осим што је укључен у етиопатогенезу тумора, оксидациони стрес може бити и важан механизам дејства антитуморских лекова.

Заиста, цисплатина индукује оксидациони стрес повећањем нивоа ROS и смањењем капацитета антиоксидационе заштите, нарочито глутатиона и антиоксидационих ензима: SOD, CAT, GSH-Px и GR. Она испољава токсични оксидациони ефекат на полинезасићене масне киселине, циркулишуће и мембранске протеине, ензиме и ДНК. Неколико механизма је укључено у прекомерну производњу ROS након примене цисплатине. Најпре настају високо реактивни аква облици цисплатине који брзо интерагују са молекулима који садрже тиолну групу, као што је глутатион. Исцрпљивање или инактивација GSH и других антиоксиданаса од стране цисплатине мења редокс статус у ћелијама, што доводи до нагомилавања ендогених ROS и настанка оксидационог стреса у ћелијама (Kadikoylu и др, 2004; Kasherman и др, 2009). Такође, цисплатина може изазвати дисфункцију митохондрија и повећати ниво ROS ометањем митохондријског респираторног ланца (Kleih и др, 2019).

#### 1.1.4. Фармакокинетички профил цисплатине

Цисплатина се у терапији примењује интравенским путем. Дистрибуција цисплатине у бубрезима, јетри и цревима је добра. Више од 90% цисплатине која остаје у крви везана је за протеине плазме. Пенетрација у цереброспиналну течност је слаба, иако се знатне количине могу детектовати код интрацеребралних тумора. Клиренс из плазме је брз током прва четири сата након интравенске примене, али се затим одвија спорије због ковалентног везивања за протеине серума. Концентрације невезане цисплатине опадају са полуживотом од 20 минута до 1 сат у зависности од брзине инфузије лека. Елиминација интактног лека и разних метаболита који настају процесом биотрансформације цисплатине се врши путем урина. Око 15-25% примењене дозе се брзо излучује у прва 2-4 сата од примене лека. Ово рано излучивање се углавном састоји од неметаболизоване цисплатине. У прва 24 сата након примене, 20-80% цисплатине се излучује, а остатак представља лек везан за ткива или протеине плазме (Nijstad и др, 2020; Farris и др, 1998).

#### 1.1.5. Нежељена дејства цисплатине

Упркос значајном успеху у лечењу онколошких пацијената, цисплатини недостаје селективност за туморско ткиво, што за последицу има настанак бројних озбиљних нежељених ефеката. Озбиљност и интензитет нежељених дејстава варирају, а нека нежељена дејства су само делимично реверзибилна након прекида примене цисплатине.

Најчешће пријављени нежељени догађаји цисплатине код болесника у клиничкој пракси (>10%) су хематолошки (леукопенија, тромбоцитопенија и анемија) и гастроинтестинални поремећаји (анорексија, мучнина, повраћање и дијареја), поремећаји чула слуха (оштећење слуха), бубрежни поремећаји (бубрежна инсуфицијенција, хиперурикемија, нефротоксичност) и грозница. Друга нежељена дејства обухватају инфекције и сепсу, метаболичке поремећаје (дехидрација, хипокалијемија, хипофосфатемија, хиперурикемија, хипокалцемија), офталмолошке поремећаје (замућен вид, пигментацију ретине), кардиотоксичност (аритмије, инфаркт

миокарда, застој срца), поремећаје нервног система (конвулзије, периферна неуропатија, хеморагични мождани удар), васкуларна обољења (венски тромбоемболизам, тромботична микроангиопатија), кожни осип и алопецију, абнормалну сперматогенезу, пирексију, астенију и замор. Учесталост ових нежељених дејства значајно варира, а за неке није тачно ни позната, тако да се процени њиховог клиничког значаја приступа сходно особитостима индивидуалних пацијената (Ghosh, 2019; Rabik и Dolan, 2007; Tang и др, 2021; Hsu и др, 2021).

Као једни од честих и потенцијално озбиљних токсичних ефеката цисплатине, јављају се нефротоксичност, хепатотоксичност и кардиотоксичност.

#### 1.1.5.1. Нефротоксичност

Цисплатина може изазвати оштећење бубрега у дози већој од  $50 \text{ mg/m}^2$  у одсуству одговарајуће хидратације. Подложност бубрега токсичним ефектима цисплатине је вероватно повезана са његовом физиолошком улогом као главног органа за излучивање (Masciò и Madeddu, 2013). У гломерулима бубрега цисплатина се филтрира кроз ћелијску мембрану механизмом пасивне дифузије или путем носача. Претпоставља се да излучивање цисплатине обухвата неколико фаза: прва фаза траје 14 - 37 минута, друга фаза 15 - 190 сати и, према неким студијама постоје, трећа и четврта фаза које трају месецима, односно годинама. Око 31 - 85% примењене дозе цисплатине излучује се током првих 50 дана након третмана (током прве две фазе). Преостали део дозе, око 5% или мање, елиминише се током периода од чак 7 до 10 година (трећа и четврта фаза). Међутим, остаје непознато да ли се цисплатина акумулира у одређеним ткивима (бубрежном ткиву или у мишићима) или се задржава у крви. Нефротоксичност се не уочава одмах након примене лека, већ настаје 2 - 3 дана после, као последица интеракције цисплатине са тиолним групама мембранских протеина у бубрежним тубулима. У механизму настанка цисплатином изазване нефротоксичности кључну улогу не игра стварање ДНК адуката, као што је то случај код њеног антитуморског дејства (Yao и др, 2007). Патофизиолошка основа нефротоксичности изазване цисплатином се истражује већ неколико деценија. Међутим, тек су од недавно расветљени неки основни ћелијски и молекуларни механизми (Sanchez-Gonzalez и др, 2011). Цисплатина активира сложене сигналне путеве (митогеном-активирана протеинска киназа (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), p53 и др.) у тубуларним ћелијама и индукује производњу ROS који доводе до њиховог оштећења и смрти. Нефротоксичност углавном настаје као последица индукованог оксидационог стреса и оштећења ћелијских компоненти (Fang и др, 2021). У последње време се интензивно истражује и утицај нитрозативног стреса и повећане производње реактивних азотних врста (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) на оштећење бубрега након примене цисплатине. Примена  $\text{Fe}^{3+}$  порфирин комплекса који може метаболисати пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) је показала да овај анјон доприноси *in vitro* и *in vivo* токсичности изазваној цисплатином.  $\text{ONOO}^-$  настаје у реакцији азот монооксида са супероксид анјон радикалом ( $\text{O}_2^-$ ). Познато је да промене у производњи NO након примене цисплатине изазивају токсичне ефекте (Burns и др, 2021). Пероксинитрити су укључени у регулацију транскрипције NO синтазе индуковане цисплатином. Пораст нивоа нитрита у бубрезима изазива оштећење цитоскелета и апоптозу, доприносећи на тај начин нефропатији (Ju и др, 2021). Утицај оксидационог

стреса на оштећење бубрега је доказан на животињским моделима *in vivo*. Поред тога, механизми нефротоксичности код пацова укључују и поремећај функције и интегритета митохондрија, губитак есенцијалних антиоксиданаса, промене мембранског потенцијала, активацију каспазе-3 и апоптозу. Да је оксидациони стрес повезан са развојем нефротоксичности изазване цисплатином у овим животињским моделима, потврђују и заштитни ефекти који настају након примене одређених антиоксиданаса. Штавише, примену цисплатине прати и снажан инфламаторни одговор у бубрезима, што додатно погоршава оштећење бубрежног ткива. Цисплатина може оштетити и бубрежне крвне судове, што за последицу има смањење протока крви и исхемијску повреду бубрега, као и смањење брзине гломеруларне филтрације. Ови догађаји кулминирају губитком бубрежне функције, што покреће настанак акутне бубрежне инсуфицијенције (Naushad и др, 2021). Механизми ћелијске смрти у нефротоксичности изазваној цисплатином подразумевају апоптозу или некрозу бубрежних ћелија. Некроза је претежно повезана са применом високих доза цисплатине, озбиљним оштећењем митохондрија и смањењем нивоа аденозин-трифосфата (енгл. *Adenosine triphosphate*, АТР), док је апоптоза процес зависан од АТР и због тога настаје блаже оштећење митохондрија, које се јавља након примене нижих доза цисплатине (Ueda и Shah, 2000). Дакле, механизам смрти бубрежних ћелија је строго повезан са концентрацијом цисплатине. Доказано је да ниске концентрације цисплатине (30 - 100  $\mu\text{M}$ ) у тубуларним ћелијама доводе до апоптозе тих ћелија. Апоптотски догађаји у епителним ћелијама бубрежних тубула иницирани су преко два пута: унутрашњег, којег активирају митохондрије, и спољашњег, који је посредован различитим проинфламаторним цитокинима, на првом месту фактором некрозе тумора (енгл. *Tumor Necrosis Factor*, TNF). За унутрашњи пут апоптозе је карактеристичан поремећај функције митохондрија, што изазива повећање производње ROS и активирање проапоптотских протеина (Вах и Вах). Оксидациони стрес узрокује губитак интегритета митохондријалне мембране са последичним ослобађањем цитохрома Ц и покреће путеве апоптозе посредоване ензимима каспазама. Поред тога, стрес ендоплазматског ретикулума (ER) је такође један од механизма индукције апоптозе тубуларних ћелија након примене цисплатине. Сматра се да цисплатина повећава стварање ROS у ER, што доводи до активирања каспазе-12 и апоптозе бубрежних ћелија (Ramesh и Reeves, 2003; Manohar и Leung, 2018). На животињским моделима је доказана и улога хидроксилног радикала ( $\text{OH}\cdot$ ) у покретању апоптозе бубрежних ћелија посредоване тумор супресорским геном p53 (Jiang и Dong, 2008).

Након примене цисплатине, некротичне промене су присутне у проксималним тубулима (заједно са апоптотским), док су у дисталним тубулима углавном примећене апоптотске промене. Ово се може објаснити нижом концентрацијом цисплатине која долази до дисталних тубула, док проксимални тубули реапсорбују највећи део лека и због тога су у њима присутне високе концентрације цисплатине. Наиме, показано је да концентрације цисплатине веће од 300  $\mu\text{M}$  доводе до некрозе тубуларних ћелија. Овако високе концентрације могу изазвати значајно смањење резерви АТР и инхибицију каталитичке активности извршилачких каспаза, што спречава апоптозу и последично доводи до некрозе. Некроза изазива инфламаторни и урођени имунски одговор, за које је познато да учествују у патофизиолошким механизмима нефротоксичности изазване цисплатином (Sanchez-Gonzalez и др, 2011).

### 1.1.5.2. Хепатотоксичност

Поред наведених токсичних ефеката, примена цисплатине у високим дозама узрокује и оштећење јетре (Oun и др, 2018), мада је хепатотоксичност доказана и код пацијената који су примали ниске дозе цисплатине, иако ређе. Сматра се да до овога долази због кумулативног ефекта цисплатине у јетри, а оштећење ткива се манифестује појавом фокалних инфламаторних лезија и некрозе (Qi и др, 2019; Waseem и др, 2015). Као један од механизма индукције хепатотоксичности наводи се повећана производња слободних радикала и настанак оксидационог стреса. Литературни подаци указују да примена цисплатине, с једне стране, доводи до смањења активности антиоксидационог ензима глутатион редуктазе у јетри, док с друге стране изазива пораст нивоа малонилалдехида (Mansour и др, 2006). У једној анималној студији, цисплатина примењена у дози од 45 mg/kg изазвала је значајно оштећење јетре мишева посредством индукције оксидационог стреса. Поремећај редокс хомеостазе преко покретања ћелијских сигналних путева и активације цитохром оксидазе CYP2E1 (односно његове повећане експресије) доводи до структурних оштећења у ткиву јетре (Lu и Cederbaum, 2006; Yaegashi и др, 2019). Значајан удео у изазивању патолошких промена на нивоу хепатоцита и ткива јетре приписује се и настанку липидне пероксидације. На хепатотоксичност изазвану цисплатином могу указати биохемијски параметри, попут повећане активности трансаминаза и билирубина у серуму (Contreras-Zentella и Hernández-Muñoz, 2016; Abd Rashid и др, 2021). Иако је уобичајено да се током третмана цисплатином контролише функција бубрега, не треба занемарити ни не тако ретку могућност појаве хепатотоксичних ефеката овог хемиотерапеутика.

### 1.1.5.3. Кардиотоксичност

Кардиотоксичност представља релативно честу последицу примене цисплатине која се може испољити и неколико година након примене овог лека (Al-Majed и др, 2006; Yousef и др, 2009). Цисплатина ступа у интеракцију са ДНК молекулом ковалентним везама, тачније са пуринским базама, и овај механизам лежи у основи настанка свих врста токсичности након примене цисплатине (Baruah и др, 2004). Забележени су бројни поремећаји срца (миокардитис и перикардитис, различите врсте аритмија, кардиомиопатија и срчана инсуфицијенција) (Qi и др, 2019). Међу аритмијама, присутне су тахикардије, брадикардије, коморске аритмије, атријална фибрилација, комплетни AV блок (Ma и др, 2020). Тачан механизам настанка кардиотоксичности индуковане применом цисплатине није још увек детаљно расветљен, али поједини научници указују на значајан утицај оксидационог стреса и већу производњу ROS, као и смањену антиоксидациону одбрану (Ramkumar и др, 2021). На хистопатолошким препаратима срца третираних цисплатином обично се уочавају дегенерација и некроза кардиомиоцита, као и вакуолизација цитоплазме (Bukhari и др, 2022). Повећана активност ензима лактат дехидрогеназе (енгл. *Lactate Dehydrogenase*, LDH) и креатин киназе (енгл. *Creatine Kinase*, CK) након администрације цисплатине настаје услед цурења ензима из срчаних ћелија због пероксидације липида у мембрани ћелија кардиомиоцита, до чега долази услед дисбаланса у редокс хомеостази. Управо су индукција оксидационог стреса и апоптозе

повезани са кардиотоксичношћу која ограничава клиничку употребу цисплатине као антитуморског лека (El-Awady и др, 2011). Сличним механизмом настају и кардиотоксични ефекти многих других хемиотерапијских агенаса, као што су доксорубицин, адриамицин, винкристин, циклофосфамид (Kim и Choi, 2021). Током терапије, ови лекови могу повећати производњу слободних радикала и смањити концентрацију антиоксидационих ензима у плазми. Такође, у многим клиничким студијама показано је да се цисплатина значајно акумулира у митохондријама и доводи до њиховог оштећења (Demkow и Stelmaszczyk-Emmel, 2013).

Примена цисплатине код онколошких пацијената доводи до значајног пада концентрације различитих антиоксиданаса у плазми (Mattson и др, 2009; Nakhaee и др, 2010). Претпоставља се да је оксидациони стрес изазван цисплатином повезан са смањеним нивоом GSH у ткивима (Nakhaee и др, 2010). Редуковани глутатион је главни унутарћелијски антиоксиданс, а однос редукованог и оксидованог глутатиона може бити показатељ редокс статуса у ћелијама (Mirzaei и др, 2021). Ендогени тиоли поседују способност уклањања слободних радикала, а међу њима је глутатион најраспрострањенији у ћелијама. GSH уклања слободне радикале, при чему се сам оксидује у глутатион дисулфид (енгл. *Glutathione disulfide*, GSSG). Приликом примене комбиноване цитостатске терапије која укључује и цисплатину често се уочава пораст оксидоване форме глутатиона, GSSG (El-Awady и др, 2011; Mohan и др, 2014). Међутим, овај ефекат се вероватно јавља током дуготрајне примене цисплатине или при примени већих кумулативних доза.

Чињеница је и да сам тумор изазива протромботично стање у организму због чега се сматра да је ризик од тромбозе највећи код пацијената са метастатским током болести и/или са утврђеним факторима ризика (Xu и др, 2018; Singla и др, 2020). Штавише, хемиотерапија може поспешити згрушавање крви, што за последицу има настанак тромбоемболијских догађаја. У том смислу, и цисплатина може изазвати агрегацију тромбоцита и увећати настајање тромбоксона у тромбоцитима (Saito и др, 2017).

## 1.2. Комплексна једињења рутенијума

### 1.2.1. Историјски преглед

Окриће рутенијума нас води у давну 1844. годину када је руски хемичар Карл Ернст Клаус после бројних експеримената успео да докаже постојање новог хемијског елемента изолованог из руда платине, добијених са планине Урал у Русији. Због тога је Клаус предложио да име новооткривеног елемента гласи рутенијум, по Рутенији које је било древно име Русије (Medići и др, 2015). Рутенијум, атомске масе 101,07, припада VIII групи прелазних метала периодног система елемената, тачније платинској групи метала. Има атомски број 44, односно садржи 44 електрона распоређених по атомским орбиталама, док се у његовом језгру налази 44 протона и 57 неутрона. Електронска конфигурација елемената VIII групе је таква да се два електрона налазе у њиховој последњој орбитали, док једино рутенијум има само један електрон, што је исто као и код његових суседних метала као што су ниобијум (Nb), молибден (Mo) и родијум (Rh) (Meiја и др, 2016). Рутенијум има много изотопа иако је само седам њих стабилно ( $^{96}\text{Ru}$ - $^{104}\text{Ru}$ ). Осим тога пронађено је и 34 радиоактивна изотопа рутенијума. Најстабилнији радиоактивни изотопи рутенијума су  $^{106}\text{Ru}$ ,  $^{103}\text{Ru}$  и  $^{97}\text{Ru}$ . Као и други метали из платинске групе, рутенијум је такође један од ретких метала присутних у земљиној кори. Такође се као и они добија из руда платине, али и процесом пречишћавања из минерала осмиридијума. У физиолошким условима, рутенијум се налази у три оксидациона стања (II-IV), од којих је најзаступљеније оксидационо стање III. Промена оксидационог стања Ru(III) може настати у присуству оксиданата и редуктаната у биоокружењу (Ivгу и др, 2015).

Рутенијум формира октаедарске комплексе, што омогућава присуство два додатна лиганда, у поређењу са квадратно-планарним комплексима платине(II). Поред тога, комплекси рутенијума се разликују у електронегативности и доступни су у различитим оксидационим стањима, али су са аспекта примене у терапији најинтересантнији +2 и +3. Последњих деценија синтетисан је велики број једињења заснованих на рутенијуму и тестиран против туморских ћелијских линија, како би се превазишла бројна ограничења комплекса платине (Dragutan и др, 2015). Наиме, комплекси рутенијума су карактеристични по њиховим повољним особинама, као што су ниска токсичност, повећане селективност ка туморским ћелијама и изражена антимагнетастатска активност (Valente и др, 2014). Они имају тенденцију да узрокују мање токсичних ефеката у поређењу са лековима заснованим на платини. У последње време се сматра да је разлог за њихову нижу токсичност хипотеза о активацији редукцијом. Ова теорија се заснива на томе да су комплекси рутенијума(III) инертнији од комплекса рутенијума(II) и да су ћелије тумора хипоксичне у редукционом окружењу, у односу на здраве ћелије. То заправо значи да се једињења рутенијума могу примењивати у инертном +3 оксидационом стању, узрокујући минимално оштећење здравих ћелија, док се потом у туморским ћелијама редукују у активно +2 оксидационо стање (Blunden и др, 2014). Разлике у метаболизму између здравих и малигних ћелија доприносе селективности антитуморских лекова на бази рутенијума (Pastuszko, 2013). Поједини комплекси рутенијума имају кинетику измене лиганда која се креће од неколико минута до неколико дана. Способност измене лиганда зависи од саме природе лиганда и укупног наелектрисања комплекса, а сматра се да је од есенцијалне важности за биолошку активност (Abliimov, 2014). Мада везивање за

молекул ДНК доприноси ефикасности комплекса рутенијума, ово се обично не сматра њиховим примарним механизмом деловања. Комплекси рутенијума своје антитуморско дејство остварују захваљујући способности да уведу канцерске ћелије у апоптозу, односно процес програмиране смрти ћелија који је најчешће индукован интеракцијама са протеинима и ДНК (Motswainyana и Ajibade, 2015).

Прва генерација комплекса рутенијума са потенцијално антитуморским дејством била је структурно слична цисплатини и они су садржали аминоклидо лиганде координованих са Ru(II) и Ru(III) градећи комплексе опште формуле  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_{6-x}\text{Cl}_x]^{n+}$ . За комплексе рутенијума у којима је оксидационо стање јона рутенијума било +2,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_x]^+$  и  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ , утврђено је да је њихова мета деловања био молекул ДНК, на исти начин као што цисплатина делује на овај молекул. Ипак, ове студије су на крају биле неуспешне, јер су тестови цитотоксичности показали слабу активност поменутих комплекса. Поред њих, комплекси *cis*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]^+$  и *fac*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]$  су у студијама на туморским ћелијама показали упоредиву антитуморску активност са цисплатином (Valente и др, 2014). Сматра се да се ови комплекси када доспу до ћелије, редукују до мање инертних Ru(II) врста, које се након хидролизе везују за ДНК.

### 1.2.2. Антитуморски комплекси рутенијума(III)

Након истраживања *fac*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]$  комплекса, први охрабрујући налази са аспекта потенцијалне примене комплекса рутенијума за лечење тумора, добијени су синтезом *trans*-[тетрахлоридобис(1H-имидазол)рутенат(III)] (KP418). Овај комплекс који је испољио антитуморску активност на мишијим ћелијским линијама леукемије и меланома (Motswainyana и Ajibade, 2015), и његова структура је била основа за синтезу будућих генерација једињења Ru(III) која су ушла у клиничка испитивања. То су били комплекси: имидазолијум [*trans*-тетрахлоро(DMSO)(имидазол)рутенат(III)] (NAMI-A), индазолијум [*trans*-тетрахлоробис(1H-индазол)рутенат(III)] (KP1019) и натријум *trans*-[тетрахлоридобис(1H-индазол)рутенат(III)] (NKP-1339), који је заправо у води растворна со комплекса KP1019 (Слика 1).

NAMI-A је комплекс синтетисан почетком деведесетих година прошлог века од стране Alessio, Sava и сарадника (Sava и др, 2002; Alessio, 2017). У студијама њихове ефикасности у лечењу тумора утврђено је да поседује јако и селективно деловање према туморским метастазама, претежно солидних тумора, али да нема ефикасност у смањивању примарних тумора (Bergamo и Sava, 2015; Blunden и др, 2014). Атом Ru(III) је координисан са шест лиганата (један молекул имидазола, један молекул диметил сулфоксида (DMSO) и четири хлоридна лиганда). Поменути лиганди могу бити замењени молекулима воде или хидроксидним јонима, што резултује смешом аква врсти које су управо и одговорне за активност против метастаза (Vacas и др, 2004). Слабији цитотоксични потенцијал могуће је последица NAMI-A да подлеже брзим екстрацелуларним изменама, при чему његови метаболити најпре интерагују са зидом ћелија (Cocchietto и Sava, 2000). Овај комплекс спречава главне компоненте у ширењу метастаза и процесе као што су одвајање ћелија од примарног канцера, лучење протеолитичких ензима, миграција и инвазија. Значајност NAMI-A комплекса се огледа у томе што је то био први комплекс рутенијума који је проучаван у клиничким испитивањима 1999. године. Истакао се као потенцијални кандидат за лечење



метастатских солидних тумора (дебелог црева, јајника, плућа и панкреаса) (Bergamo и др, 1999). Примењен код пацијената у највишим дозама, NAMI-A је довео до настанка изражене мучнине, повраћања, дијареје и блажег оштећења бубрега. С обзиром на то да је био ефикасан код узнапредовалог немикроцелуларног карцинома плућа уследила је и друга фаза клиничког испитивања, која је прекинута због изазивања јаке мучнине, повраћања и дијареје. Закључак је био да је, осим нежељених ефеката које је изазивао, апликација NAMI-A недовољно делотворна за даљу примену чиме су клиничке студије обустављене (Cocchietto и Sava, 2000; Sava и др, 2002).

KP1019 су 1989. године синтетисали *Keppeler* и сарадници (*Keppeler* и др, 1989). За овај комплекс је утврђено да поседује активност према мишијим туморским ћелијама карцинома колоне и да је ефикаснији од 5-флуороурацила, стандардне терапије колоректалног карцинома. Антитуморска активност KP1019 није примарно заснована на директном оштећењу молекула ДНК (*Pongratz* и др, 2004; *Heffeter* и др, 2013), већ се сматра да су директне интеракције са биомолекулима и редокс активност комплекса заслужне за њихово повољно дејство. Комплекси Ru(III) ступају у Фентонове реакције које доводе до синтезе ROS. Осим тога, везивање за GSH смањује концентрацију слободног GSH у ћелијама, што доводи до индукције оксидационог стреса. Показано је управо да комплекс KP1019 доводи до стварања интрацелуларних ROS код туморских ћелија дебелог црева (*Dömötör* и др, 2013).

Натријумова со овог једињења, NKP1339, је синтетисана као прекурсор у формулацији KP1019 за клиничка испитивања (*Trondl* и др, 2014). Овај комплекс је постао међу водећим у даљим клиничким истраживањима будући да има високу растворљивост у води, која омогућава примену већих доза лека код пацијената. Сматра се да до активације овог комплекса долази након редукције у биоокружењу (*Büchel* и др, 2017). Наиме, овај комплекс се показао као директни хватач азот монооксида, NO. Реакција са NO индукује редукцију Ru(III) и настанак [Ru(II)-NO<sup>+</sup>] врста. С обзиром на то да је азот монооксид познат сигнални гласник у многим физиолошким процесима, посебно у васкуларној хомеостази, неуротрансмисији и у инфламаторном/имуном одговору и прогресији тумора, претпоставља се да KP1019 и NKP1339 имају дејство на миграцију ендотелијалних ћелија и ангиогенезу (*Mahmud* и др, 2021). Као исход насталог оксидационог стреса, примена KP1019 и NKP1339 изазива апоптозу туморских ћелија преко митохондријског пута (*Kuhn* и др, 2015). Утврђено је и да примена комплекса NKP1339, слично као и NAMI-A, индукује заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази (*Floske* и др, 2016). За комплексе KP1019 и NKP1339 је утврђено и да показују селективност према тумору путем хуманог серумског албумина и посредованих путева заснованих на повећаној пермеабилности. Овај ефекат је приписан измењеној структури крвних судова у тумору који омогућавају комплексу лек-албумин да прође кроз пукотине у ендотелу ћелија крвних судова и нагомилавање у туморском ткиву (*Blazević* и др, 2017).

### 1.2.3. Антитуморски комплекси рутенијума(II)

Захваљујући резултатима који су проистекли испитивањем комплекса рутенијума(III) даља истраживања су усмерена на комплексе рутенијума(II), због хипотезе *Clarke* и сарадника да до активације комплекса рутенијума(III) долази редукцијом у туморским ћелијама. До ове редукције комплекса рутенијума(III) долази у киселој биосредини у којој су присутни хипоксични услови и висок ниво

редукционих биомолекула. Када настали активни комплекс рутенијума(II) доспе до здравих ћелија у нормоксичним условима, због присуства кисеоника ће се оксидовати до комплекса рутенијум(III) који је кинетички инертан. Управо се овај механизам сматра есенцијалним за селективну токсичност усмерену према неопластичним ћелијама (Bruijninx и Sadler, 2008; Abid и др, 2016). Такође, научници су закључили и да је овај механизам заслужан за већу реактивност комплекса Ru(II) према биолошким молекулима и самим тим снажнији антитуморски потенцијал. Још једна чињеница која пружа објашњење за високу селективност комплекса рутенијума(II) за туморске ћелије је и могућност рутенијума да замени функцију тровалентног јона гвожђа у биохемијским реакцијама. Наиме, рутенијум може да се веже за трансферин чиме се селективно транспортује до малигнућих ћелија, имајући у виду да ове ћелије експримирају значајно више рецептора за трансферин (2-12 пута) у односу на здраве ћелије, јер имају већу потребу за гвожђем због већих метаболичких (Luck и Mason, 2013; Daniels и др, 2012).

Механизам циљаног транспорта комплекса рутенијума(II) до ћелија тумора укључује и хумани серумски албумин, због повећане пропустљивости и задржавања у туморском ткиву (Brindell и др, 2008; Spreckelmeyer и др, 2014). Једна од првих студија која се бавила испитивањем везивања комплекса рутенијума за албумин била је студија *Kepler* и сарадника, који су показали да се два јона рутенијума из комплекса *KP1019* везују за хистидин на положају 146 и 242, унутар хидрофобних цепова албумина (Bijelic и др, 2016). Студија са комплексом *NAMI-A* је такође објавила да се он везује за трансферин и албумин, образујући стабилне адукте. Сви ови налази сугеришу на изузетно повољне карактеристике потенцијалних антитуморских лекова базираним на рутенијуму(II). Из тог разлога, многе студије су изучавале особине и активност ових комплекса, а фокус је стављен на органометалне аренске комплексе рутенијума(II) и Ru(II) полипиридинске комплексе.

### 1.2.3.1. Аренски комплекси рутенијума(II)

Међу комплексима Ru(II), велику пажњу су привукли аренски комплекси рутенијума, који су супституционо инертни у биолошком окружењу. Један од њих је и  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})Cl_2(pta)]$ , назван *RAPTA* (Singh и Pandey, 2014), који се испитује у претклиничким испитивањима због свог снажног антиметастатског деловања и умерене антиканцерогене активности на различите ћелијске линије. Слаба повезаност између везивања *RAPTA* комплекса за ДНК и његове цитотоксичности указује да овај комплекс делује преко механизма другачијег од класичних антитуморских лекова заснованим на платини (Tönnemann и др, 2014). На моделу хуманог карцинома јайника утврђено је да *RAPTA* комплекс инхибира раст тумора за 75% при апликацији дозе од 0,2 mg/kg дневно, током пет дана (Biancalana и др, 2017). Анализом третираног туморског ткива уочена је значајно смањена густина микро крвних судова, у односу на добро прокрвљено туморско ткиво у контролној групи. Такође, токсичност овог комплекса је снижена, вероватно због брзог излучивања овог метала преко бубрега, без значајног нагомилавања у виталним органима. Ови налази зато сугеришу да *RAPTA* може бити врло делотворан у редукцији примарних тумора.

Заменом *pta* лиганда из *RAPTA* комплекса са 3,5,6-бициклофосфит- $\alpha$ -D-глукофуранозид лигандом добијени су комплекс *KP1558* и његови аналози. У циљу добијања једињења високе растворљивости у води или пак хидрофобнијих комплекса,

променама у хемијској структури може се мењати липофилност ових једињења. Антитуморска активност комплекса је испитана на хуманим ћелијама карцинома дебелог црева, јајника, плућа и меланома (Sonkar и др, 2021). Механизам дејства се заснива на хидролизаци хлоридног лиганда у води која индукује хидролизаци фосфитног лиганда. Комплекси су испољили снажну активност на свим ћелијским линијама.

### 1.2.3.2. Полипиридилски комплекси рутенијума(II)

Међу интересантним једињењима са аспекта антитуморског дејства налазе се и Ru(II) полипиридински комплекси (Corral и др, 2009). Рутенијум(II)-tris-бипиридински комплекс је детаљно проучаван последњих 30 година, као резултат његове изузетне хемијске стабилности и фотофизичких својстава. Дакле, једињења која имају 2,2'-бипиридин лиганд су препозната, не само као потенцијални лекови, већ и као веома разноврсни фотохемијски и редокс системи, због јединствене комбинације (електро)хемијских особина (Zhang и др, 2014). Полипиридински лиганди дају комплексима рутенијума облик и хиралност, и то су волуминозни, ригидни и мултидентатни лиганди. Утврђено је да се могу интеркалирати у ДНК, али и координативно везати за нуклеотидне базе слично као и цисплатина. Комплекси рутенијума који поседују фенилазопиридинске (*azpy*) лиганде, као што је  $[Ru(azpy)_2Cl_2]$  имају значајно цитотоксично дејство која је зависно од њихове структуре (Dougan и др, 2007). Такође су синтетисани многи Ru(II) комплекси типа *mer*- $[Ru(tpy)(N-N)Cl]^+$  (*tpy*-терпиридин) који имају N-донорске хелатне лиганде, као што су бипиридински и фенантролински деривати. Ови хелатни лиганди не граде јаке водоничне везе, већ се везују ковалентно за ДНК при чему настају монофункционални адукти (Chen и др, 2020).

### 1.2.3.3. Испитивани комплекси рутенијума(II)

Недавно је извршена синтеза комплекса рутенијума опште формуле *mer*- $[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$  (Cl-*tpy*-4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин; N-N -1,2-етилендиамин (*en*), 1,2-диаминоциклохексан (*dach*) или 2,2'-бипиридин (*bpy*)) (Rilak и др, 2014) које смо одабрали за истраживање њихових токсичних ефеката, пре свега на срце (Схема 9).

Последњих година су се темељно изучавале интеракције ових комплекса са различитим аминокиселинама и протеинима. Комплекси су детаљно хемијски окарактерисани и објављени су подаци о њиховој реактивности и о значају ових интеракција у медијуму ћелијских култура, али и у биолошком систему, пре него што доспу до њихове биолошке мете (Rilak Simović и др, 2019). Ови комплекси су показали високу растворљивост у води ( $>25$  mg/ml), што је нама било од значаја са аспекта примене код пацова и адекватног фармакокинетичког профила. У претходним студијама је установљено да хелатни бидентатни лиганди *en* и *dach* поменутих комплекса могу градити водоничне везе, као и Cl-*tpy* дериват терпиридина чији хлор може бити акцептор водоничних веза насталих са доносним атомима биолошких молекула. Након растварања у води, долази до хидролизаци хлоридног лиганда и образовања аква врста. Брзина хидролизаци зависи од природе бидентатног лиганда и

износи неколико минута за *en* и *dach* лиганде, односно неколико сати за *bpy*. Чини се да су ове карактеристике предуслов за антипролиферативну активност.

У студији која је проучавала везивање ових комплекса за деривате гуанина, 9-метилгуанин и 5'-гуанозин монофосфат, утврђено је да се након инкубације стварају монофункционални адукти преко N7 атома, при чему су брзине реакције зависне од врсте хелатног лиганда, *en* и *dach* лиганди ступају много брже у односу на *bpy*. Ови резултати указали су на то да испитивани комплекси вероватно делују цитотоксично преко интеракције са молекулом ДНК у туморским ћелијама. У истој студији ова једињења су показала и умерену цитотоксичну активност према хуманим ћелијским линијама карцинома плућа и колона, као и мишјим ћелијским линијама карцинома колона (Lazić и др, 2016), али ипак слабију у односу на цисплатину. Снажнију цитотоксичност испољио је комплекс рутенијума са етилендиамином, са претпоставком да је овај ефекат био јачи због веће липофилности овог комплекса у поређењу са оним који садржи *dach* лиганд, што може олакшати његово ћелијско преузимање. Ови аутори су утврдили да се комплекси снажно везују за ДНК и да ову интеракцију остварују интеркалацијом, уметањем планарног терпиридинског прстена између парова ДНК база, као и ковалентним везивањем за гуанин преко N7 атома. На основу добијених резултата можемо установити да испитивани комплекси рутенијума показују мању цитотоксичну активност у поређењу са цисплатином и да њихова активност вероватно зависи од природе хелатног лиганда. Комплекси са *en* и *dach* лигандима, који могу да граде водоничне везе, су се показали ефикаснијим. С обзиром на то да комплекс са *en* лигандом поседује јачи цитотоксични потенцијал, вероватно је и да величина хелатног лиганда има утицаја на саму цитотоксичност, те да је мања величина етилендиаминског лиганда у односу на диаминоциклохексански лиганд, одговорна за нешто веће цитотоксично дејство.

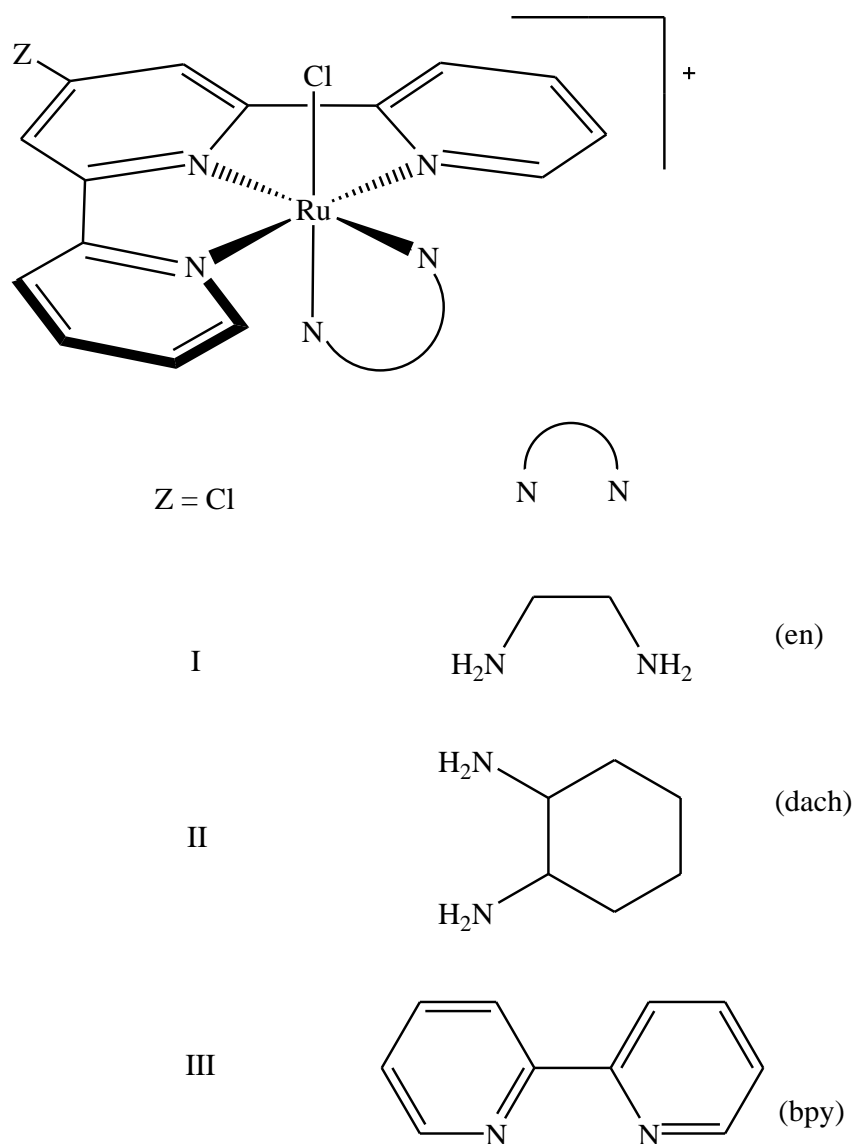


Схема 9. Хемијске структуре испитиваних рутенијум(II) комплекса

На биолошку активност потенцијалних металофармацеутика утиче и јачина интеракције коју остварују са транспортним протеинима серума. Испитивани комплекси су показали висок афинитет везивања за серумске протеине, албумин и трансферин (Nišavić и др, 2016), при чему јачи афинитет везивања остварују за албумин. Претпоставља се да се механизам везивања заснива на ослобађању хлоридо лиганда и његовој измени са молекулом воде и даљој координацији са електрондонорским остатком хистидина и аспарагинске киселине (Nišavić и др, 2018). Комплекс са *dach* лигандом је показао највећи везивни капацитет, док је комплекс са *en* лигандом показао нешто мањи везивни капацитет. Комплекс са *bpy* лигандом је показао најмањи везивни афинитет према албумину, а могуће објашњење за то може бити због саме природе овог лиганда који, за разлику од *en* и *dach* лиганда који поседују амино групе, не може да гради водоничне везе са аминокиселинским остацима на албумину. Биридиински лиганд може остварити интеракције  $\pi$ -типа које су иначе слабије од водоничних веза, па је и везивање овог комплекса за албумин слабије. Чињеница да је серумски албумин главни протеин одговоран за транспорт

лека и његово преузимање и сазнање да се поменути комплекси везују високим афинитетом за албумин, указују на значај адекватног допремања ових комплекса до циљних туморских ћелија. Утврђено је да постоји позитивна корелација између ове особине бидентатних лиганата и цитотоксичне активности (комплекси са *en* и *dach* лигандима су цитотоксичнији од *bpu* комплекса). С обзиром на то да се поменути комплекси везују и за трансферин, који се у високом проценту експримира на површини малигних ћелија, може се закључити да ови комплекси поседују донекле и селективност дејства.

Још једна недавно публикована студија је показала умерену цитотоксичност против хуманих ћелијских линија карцинома колона (HCT116 и SV480) и мишијих ћелијских линија карцинома колона (CT26), али и умерену антитуморску активност у *in vivo* експериментима на мишевима којима је индукован тумор (Savic и др, 2020). Ова активност је била упоредива са антитуморском активношћу оксалиплатине. Такође је установљено да су комплекси рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном изазивали умерену апоптозу у ћелијама карцинома дебелог црева, али да су код мишева изазвали значајну некротичну смрт. Поред тога, оба комплекса су изазвала заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази, али ови ефекти су били специфични само за ћелијску линију. Испитивање токсичних ефеката ових комплекса код мишева је показало да комплекс рутенијума са етилендиамином индукује блаже оштећење бубрега у поређењу са мишевима третираним оксалиплатином, али да је оштећење јетре било израженије него код примене оксалиплатине. Дакле, истраживање Savic и сарадника је потврдило значајну антитуморску активност ових комплекса како *in vitro*, тако и *in vivo*, као и ниску токсичност на мишјем моделу. Међутим, до наше студије, није било детаљног изучавања системске токсичности испитиваних комплекса рутенијума на моделу пацова, са посебним освртом на кардиотоксичност, али и хепатотоксичност и нефротоксичност.

### 1.3. Оксидациони стрес

#### 1.3.1. Редокс равнотежа

Регулисање редокс хомеостазе је важно за одржавање нормалних функција ћелија и њихов опстанак. Туморске ћелије се карактеришу повећаном аеробном гликолизмом и високим нивоом ROS који се јавља и као последица промена неколико сигналних путева који утичу на ћелијски метаболизам (Gottini и др, 2013). Поред високог нивоа слободних радикала, у малигним ћелијама су значајно активирани и антиоксидациони одбрамбени механизми. ROS се дефинишу као врло реактивне хемијске супстанце које садрже кисеоник. То су слободни радикали: синглтни кисеоник ( $^1\text{O}_2^-$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ), хидроксиил радикал ( $\text{OH}^\bullet$ ), хидроксил анјон ( $\text{OH}^-$ ), пероксил радикал ( $\text{ROO}^\bullet$ ), хидропероксил радикал ( $\text{HOO}^\bullet$ ), азот моноксид радикал ( $\text{NO}$ ), азот диоксид радикал ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), као и молекули који нису радикалског типа, нпр. водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), озон, пероксинитрит анјон ( $\text{ONOO}^-$ ) и алкил пероксинитрит ( $\text{ROONO}$ ) (Табела 1) (Gebicka и Didik, 2010). Ови молекули углавном настају из кисеоника који се користи у разним метаболичким реакцијама у митохондријама, пероксизомима и ендоплазматском ретикулуму. Процењује се да се око 2% кисеоника које троше митохондрије редукује до супероксид анјон радикала. Из овог разлога се митохондрије сматрају главним извором ROS. Пероксизоми имају улогу и у производњи ROS (преко  $\beta$ -оксидације масних киселина и активности флавин оксидазе) и у њиховом уклањању (преко разградње водоник пероксида под дејством каталазе). Ендоплазматски ретикулум представља оксидационо окружење које погодује стварању дисулфидних веза и савијању протеина и повећава ниво ROS преко оксидације протеина (Ron и Walter, 2007; Burton и Jauniaux, 2011; Jones, 2008; Senoner и Dichtl, 2019). ROS се непрестано производе у ензимским и неензимским реакцијама. Осим ROS, у организму могу настати и реактивне врсте азота (RNS) које поседују висок оксидациони потенцијал. Најважнији RNS је азот моноксид ( $\text{NO}$ ), чијим метаболизмом између осталих настају и пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) и азот диоксид ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) (Sies, 2015).

Табела 1. Најважнији прооксиданси

	ROS	RNS
<b>Радикалски тип</b>	синглтни кисеоник, $^1\text{O}_2^-$ супероксид анјон радикал, $\text{O}_2^-$ хидрокси радикал, $\text{OH}^\bullet$ хидроксил анјон, $\text{OH}^-$ пероксил радикал, $\text{ROO}^\bullet$ хидропероксил радикал, $\text{HOO}^\bullet$	азот моноксид радикал, $\text{NO}$ азот диоксид радикал, $\text{NO}_2^\bullet$
<b>Нерадикалски тип</b>	водоник пероксид, $\text{H}_2\text{O}_2$ озон, $\text{O}_3$	пероксинитрит анјон, $\text{ONOO}^-$ алкил пероксинитрит, $\text{ROONO}$

Ензимски катализоване реакције које производе слободне радикале подразумевају оне које укључују ензиме: никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидазу (енгл. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphat oxidase*, NADPH оксидаза), ксантин оксидазу, ендотелну азот-оксид синтазу (енгл. *Endothelial Nitric Oxide Synthase*, eNOS), арахидонску киселину и метаболичке ензиме (цитохром P450, липооксигеназу и циклооксигеназу). Неензимски извор реактивних врста представља митохондријални респираторни ланац. Промена нивоа слободних радикала у ћелијама је кључна за ћелијску хомеостазу, имајући у виду да различити нивои ROS могу изазвати различите биолошке одговоре (Georgiou и Margaritis, 2021). Ниски до благо повишени нивои слободних радикала делују као сигнални молекули који одржавају ћелијску пролиферацију и диференцијацију и активирају путеве преживљавања који реагују на стрес (Klaunig, 2018). На пример, водоник пероксид може бити сигнални молекул за пролиферацију, диференцијацију и миграцију (Sajadimajd и Khazaei, 2018). ROS такође могу деловати као молекули за пренос сигнала који индукују про-инфламаторне цитокине (Kim и др, 2016) и пут нуклеарног фактора κB (енгл. *Nuclear Factor κB*, NF-κB) (Bellezza и др, 2018). Међутим, прекомерна производња ROS оштећује ћелијске компоненте, као што су ДНК, протеини и липиди. Из тог разлога је потребна строга регулација путева који производе ROS и оних који обављају њихову детоксикацију. Високи нивои ROS доводе до оштећења ћелија и њихове смрти. С обзиром на то да је повећана концентрација слободних радикала штетна за ћелије, оксидациони стрес има тумор супресивни ефекат. Једињења на бази платине индукују оксидациони стрес и прекомерну производњу ROS који коначно изазивају апоптозу ћелија (Tolan и др, 2016).

Један од механизма оштећења ћелија подразумева и настанак липидне пероксидације мембрана, услед појаве оксидационог стреса. Липидне компоненте ћелијске мембране се могу оксидовати слободним радикалима, превасходно хидроксилним и перхидроксилним, при чему настају вода и липидни радикали. Важни производи процеса липидне пероксидације су липидни хидропероксиди, али у индукцији оштећења ћелија не треба занемарити ни значај токсичних и мутагених производа, као што је малондиалдехид (енгл. *Malondialdehyde*, MDA). MDA изазива оштећење протеина и може градити производе са нуклеинским киселинама и липидима у мембрани. С обзиром на то да се мембрана ћелија углавном састоји од полинезасићених масних киселина, јасно је да су ћелије веома подложне липидној пероксидацији (Del Rio и др, 2005; Islam, 2017).

### 1.3.2. Системи антиоксидационе заштите

Антиоксидациони систем заштите укључује бројне ензиме, али и ненезимске компоненте, односно молекуле мале масе (Sies, 1997). Одбрамбени систем омогућава заштиту ћелија од изузетно токсичног дејства слободних радикала који изазивају стање оксидационог стрес. До њега долази када настане поремећај равнотеже између нивоа слободних радикала и система заштите (Czerska и др, 2015). Ензими примарног система антиоксидационе заштите су супероксид дисмутаза, каталаза, ензими укључени у глутатионски редокс циклус (глутаатион пероксидаза, глутатон S-трансфераза, глутатион редуктаза) и цитохром оксидзе. Ови ензими спречавају настанак ланчаних реакција и синтезе ROS, а тиме и липидну пероксидацију ћелијских мембрана (Cohen, 1994) (Табела 2).



Супероксид дисмутаза припада групи металоензима и постоји у три изоформе (Marklund, 1982): цитосоолна (Cu, Zn-SOD), митохондрјална (Mn-SOD) и екстрацеелуларна (EC-SOD). За испољавање активности SOD обавезно је присуство јона метала (Cu, Zn, Mn) као кофактора. Најпотентнији је интрацелуларни антиоксиданс и заслужан је за дисмутацју супероксид анјон радикала до молекулког кисеоника и водоник пероксида. Делује као прва линије заштитног система против слободних радикала.

Каталаза разграђује настали водоник пероксид из реакције дисмутације, до воде и молекулског кисеоника. Налази се у пероксизоима, док његово присуство није забележено у митохондријама, изузев у митохондријама присутних у срчаном ткиву пацова (Whittaker, 2012). Недовољно присуство ензима каталазе може бити узрок многих обољења, попут тумора и дегенеративних болести (Brioukhanov и Netrusov, 2004). Након каталитичког дејства каталазе, биохемијска реакција се затим наставља дејством глутатион пероксидазе која водоник пероксид конвертује у воду и оксидовану форму глутатиона, тј. глутатион дисулфид (GSSG) (Lu и Holmgren, 2014), који се дејством глутатион редуктазе преводи у редуковани глутатион. Померање односа GSH/GSSG ка оксидованом стању доводи до активације сигналних путева који инхибирају ћелијску пролиферацију ћелија и индукују процес апоптозе (Zalewska-Ziob и др, 2019). Улога глутатион пероксидазе је и у елиминацији хидропероксида и липидних пероксида, чиме штити ћелије од штетног дејства ROS. Глутатион S-трансфераза омогућава везивање глутатиона за цитостатике и пероксилне радикале, чиме олакшава њихову елиминацију из ћелија (Cheng и др, 2018).

Неензимске компоненте антиоксидационог система заштите могу бити липосолубилне (витамиин Е-  $\alpha$ -токоферол, провитамин А-  $\beta$ -каротн, коензим Q-убихинон) и хидросолубилне (редуковани глутатион, витамин Ц- аскоорбинска киселина, мокраћна киселина, албумин, трансферин, феритин, билирубин и други). Неензимски антиоксиданси су и меланин, естрогени, липоинска киселина, пируват, карнозин и други (Chan, 1993; Pisoschi и Pop, 2015). Витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) има способност елиминације ROS и зауставља ланчану реакцију липидне пероксидације мембрана, будући да брже реагује са пероксидима него што они ступају у интеракције са незасићеним мастима и протеинима мембране (Ali и др, 2020; Blokhina и др, 2003).  $\beta$ -каротен блокира настанак реактивних кисеоничних врста и може везати синглетни кисеоник (Zhang и др, 2014; Rinnerthaler и др, 2015). Редуковани глутатион учествује у уклањању водоник пероксида и хидропероксида, као и хидроксил и пероксил радикала (Ali и др, 2020; Diaz de Barboza и др, 2017). Такође, сматра се да штити ћелије од слободних радикала насталих применом хемиотерапијских агенаса. Витамин Ц је редукујући агенс који може спречити ланчане реакције липидне пероксидације. Такође, ступа у интеракције са  $O_2^-$ ,  $OH^-$  и хипохлорастом киселином и елиминише их. Убихинон уклања  $O_2^-$  и спречава пероксидацију липида (Alho и др, 1994).

Табела 2. Најважнији антиоксиданси

Антиоксиданси	
Ензимске врсте	супероксид дисмутаза, SOD
	каталаза, CAT
	глутатион пероксидаза, GSH-Px
	глутатион редуктаза, GR
Неензимске врсте	глутатион, GSH
	витамин Ц
	β-каротен
	α-токоферол

### 1.3.3. Улога оксидационог стреса у кардиотоксичности изазваној цисплатином

Оксидациони стрес се доводи у везу са многим токсичним ефектима ксенобиотика, па тако и хемиотерапеутика, међу којима велики део представљају и оштећења функционалних способности миокарда. Аритмије и атеросклеротичне промене, као чести кардиотоксични ефекти цисплатине, доводе се у везу са оксидационим стресом, тј. са метаболизмом липопротеина ниске густине (енгл. *Low Density Lipoprotein*, LDL) (Cullen и др, 2007; Songbo и др, 2019; Fabiani и др, 2021). Синтеза и уклањање ROS у миокарду зависи од ензима који су укључени у њихову производњу и од компоненти антиоксидативног система. Ови процеси се најпре одвијају у митохондријама и саркоплазматском ретикулуму (Varga и др, 2015). Познато је да се у митохондријама кардиомиоцита стварају слободни радикали током оксидативне фосфорилације, тј. производње АТФ. У кардиомиоцитима митохондрије чине 30-40% запремине и стварају преко 90% АТФ. Будући да се у митохондријама налази мноштво антиоксиданаса (попут SOD), већина ROS се конвертује у водоник пероксид који се затим дејством пероксидаза редукује до воде (Muraoka и Miura T, 2003; Pereira и др, 2019). Водоник пероксид из митохондрија може прелазити у цитоплазму, где учествује у сигналној трансдукцији зависној од ROS. Уколико дође до значајне синтезе слободних радикала у митохондријама, део водоник пероксида се преводи у реактивни хидроксил радикал. ROS настају и у саркоплазматском ретикулуму и сарколеми. Супероксид анион радикал синтетисан у сарколеми интерагује са NO, при чему се ствара ONOO<sup>-</sup>, односно услед деловања супероксид дисмутаза, Cu, Zn-SOD, настаје водоник пероксид. Изузев неуронске азот оксид синтазе (енгл. *Neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS), у миокарду се налази и ензим ендотелна азот-моноксид синтаза (eNOS), и ови ензими се налазе најпре у сарколеми и саркоплазматском ретикулуму (Muhammad и др, 2020). Настанак хипертензије код пацијената са тумором лечених антиангиогеним лековима (бевацизумаб, сорафениб, сунитиниб) је чест нежељени догађај и није у потпуности разјашњен, али се претпоставља да је повезан са инхибицијом васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), а то изазива смањење производње NO у зидовима артериола и другим крвним судовима, преко смањене активности NO-синтазе (Herrmann, 2019; Tewari и др, 2014). NO је природни вазодилататор, тако да ће

спречавање производње NO довести до вазоконстрикције и повећане периферне васкуларне резистенције и крвног притиска (Catanzaro и др, 2019; Udagawa и др, 2018). Штавише, смањена активност ендотелне NO-синтазе може стимулирати експресију плазминоген активатор инхибитора-1, што доводи до повећаног ризика од настанка хипертензије (Ку и др, 2021).

Слободни радикали могу директно оштетити протеине, липиде и ДНК молекула и изазвати апоптозу миоцита, што је вероватно повезано са повећаним оксидационим стресом (Zhang и др, 2012; Cheng и Li, 2020). Постоје и други механизми за које се претпоставља да изазивају кардиотоксичност, а то су транскрипционе промене у производњи АТР у кардиомиоцитима и смањење регулације експресије мРНК за калцијум-АТРазу саркоплазматског ретикулума. Поменути механизми смањују срчану контрактилност, продужавају смањење активности глутатион пероксидазе у срцу, које је првобитно индуковано лековима, и респираторну функцију митохондрија повезану са оштећењем митохондријске ДНК (Tsutsui и др, 2011).

Кардиотоксичност може настати и као последица значајне липидне пероксидације мембрана кардиомиоцита која изазива иреверзибилне промене у структури мембрана и функцији ових ћелија са последичним ослобађањем срчаних ензима, као што је кардиотропонин (El-Awady и др, 2011). Примена цисплатине може довести до повећања активности ензима у срцу, попут креатин киназе, и то изоформе MB (Pai и Nahata, 2000). Настала кардиотоксичност је углавном последица апоптозе или некрозе кардиомиоцита, с тим да је у смрти ћелија изазваној применом цитостатика из групе металофармацеутика укључен превасходно процес апоптозе.

Апоптоза је вид програмиране ћелијске смрти који може контролирати раст ћелија. Овим механизмом се уклањају оштећене ћелије из ткива чиме се регулише ћелијска хомеостаза. Бројни ензими каспазе врше разградњу протеина ћелија што доводи до деградације ћелија у току процеса апоптозе (Elmore, 2007; Ху и др, 2019). Спољашњи пут активације каспаза укључује стимулацију каспазе-8 и -10, чиме се индукује фрагментација једра и лиза ћелије, што најзад активира унутрашњи, митохондријални апоптотски пут (Fan и др, 2005; Shi, 2002). Унутрашњи пут се покреће разним цитотоксичним догађајима који изазивају оштећење молекула ДНК, као и под дејством хемиотерапеутика или радиотерапије. Све ово индукује повећану пермеабилност мембране митохондрија и ослобађање њених протеина, као што је цитохром С (Kalpage и др, 2019). Цитохром С у присуству АТР стимулише ензим каспазу-9, а она потом каспазу-3 и -7, што индукује ћелијску смрт (Santucci и др, 2019; Israels ED и Israels LG, 2001; Русси и др, 2000). Ослобађање овог протеина је контролисано од стране Bcl-2 фамилије протеина (енгл. *B cell lymphoma-2*, Bcl-2). Bcl-2 фамилија протеина се дели на разне групе зависно од проапоптотског или антиапоптотског дејства. Антиапоптотски протеини, као што је и сам Bcl-2, омогућавају опстанак ћелија очувањем интегритета мембране митохондрија. Проапоптотски протеини, Вах (енгл. *Bcl-2-associated-x protein*, Вах) и Вак (енгл. *Bcl-2 homologous agonist killer*, Вак), с друге стране, обезбеђују процес апоптозе образовањем пора на митохондријалној мембрани (Kim и др, 2018).

Администрација антитуморских лекова, попут цисплатине и металофармацеутика заснованих на рутенијуму(II), може иницирати процес апоптозе, и то преко два главна апоптотска пута, унутрашњег митохондријалног и спољашњег пута посредованог рецепторима смрти. Познато је да се у митохондријама могу акумулирати комплекси рутенијума, јер снижавају њихов мембрански потенцијал чиме изазивају дисфункцију и покрећу апоптозу. Иницијаторске каспазе активирају оба пута апоптозе након чега се активирају извршилачке каспазе чиме се завршава процес

апоптозе (Goldar и др, 2015; Sun и др, 2021). Оксидациони стрес може бити окидач за покретање апоптозе, када протеин Bid активира Вах и Ваk молекуле, након чега се активира иницијаторска каспаза-9, а затим и извршилачка каспаза-3 (Mortezaee и др, 2019; Galadari и др, 2017). Дакле, поремећај редокс хомеостазе покреће апоптозу захваљујући активацији гена укључених у програмирану ћелијску смрт (Cui и др, 2018). У срцу, липидна пероксидација мембране кардиомиоцита може изазвати апоптозу повећањем активације гена за Вах и каспазу-3. Повећана синтеза водоник пероксида у срчаном ткиву може повећати киселост у ћелији и тиме покренути апоптозу, али и довести до превођења у хидроксил радикал који има директно штетно дејство на митохондрије и молекул ДНК (Sinha и др, 2013; Shi и др, 2021).

**II**

**ЦИЉ**

**ИСТРАЖИВАЊА**

## 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања је да се испитају ефекти хроничне примене цисплатине и Ru(II) терпиридин комплекса: [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] и [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитати утицај хроничне примене цисплатине и Ru(II) терпиридин комплекса: [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] и [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] на оксидациони стрес путем испитивања различитих параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, плазми и срчаном ткиву: супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ), индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS) и азот монооксида (NO, мереног у облику нитрита ( $NO_2^-$ )), као и компоненти антиоксидационе заштите у лизату еритроцита: ензима супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT) и глутатион пероксидазе (GSH-Px), и неензимских антиоксиданаса, редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG), и њихов GSH/GSSG.
2. Утврдити корелацију између добијених кардиодинамских ефеката цисплатине и примењених комплекса рутенијума, као и вредности поменутих маркера оксидационог стреса.
3. Утврдити патохистолошке промене настале услед хроничне администрације цисплатине и Ru(II) терпиридин комплекса на срчаном мишићу, јетри и бубрезима.
4. Испитати утицај примењених супстанци на вредности: укупних липида и холестерола, срчаног тропонина (сTnT), као и ензима лактат дехидрогеназе (LDH) и креатин киназе (СК и СК-МВ), трансaminaза (AST и ALT), урее и креатинина и укупних протеина и албумина.
5. Испитати утицај примењених супстанци на вредности показатеља апоптозе у срцу: Вах, Bcl-2 и каспазе-3.

# III

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Етички аспекти

Све експерименталне процедуре коришћене у овом истраживању су одобрене од стране Етичког комитета за експерименталну добробит животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Универзитета у Крагујевцу, (одлука бр. 01-8461/1) и спроведене у складу са Европском директивом о добробити лабораторијских животиња (2010/63/ЕУ и Европском директивом о заштити животиња коришћених у експерименталне и друге научне сврхе 86/609/ЕЕС, као и принципима етике.

#### 3.2. Материјал

Цисплатина и све остале супстанце коришћене у овој студији биле су *pro analysis* квалитета (*Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany*).

#### 3.3. Испитивани комплекси рутенијума(II)

Комплекси рутенијума(II) које смо испитивали у нашој студији: комплекс рутенијума са етилендиаминским лигандом ( $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (I), комплекс рутенијума са диаминоциклохексанским лигандом  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (II) и комплекс рутенијума са биридиинским лигандом  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (III), синтетисани су од стране поч. професора др Живадина Бугарчића и његових сарадника на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Ови комплекси су детаљно хемијски окарактерисани (Rilak и др, 2014; Nišavić и др, 2016), а у *in vitro* и *in vivo* експериментима потврђена је и њихова антитуморска активност (Lazić и др, 2016; Savic и др, 2020).

#### 3.4. Експерименталне животиње и хронични третман

У студију смо укључили 60 здравих одраслих пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старосне доби 8 недеља, телесне масе око  $250 \pm 30$  g. Животиње су добијене са Војномедицинске академије у Београду, које су након допремања у нашу лабораторију смештене у одвојене чисте пластичне кавезе и чуване под строго контролисаним условима температуре ( $23 \pm 1$  °C) и светлости (циклус 12/12 сати светло/мрак). Вода и стандардна храна су били доступни у довољној количини током целог третмана како би их животиње узимале према потреби (*ad libitum*), осим током дана жртвовања када



су се прикупљала крв и ткива, како не би имале утицаја на вредности биохемијских маркера.

После седам дана прилагођавања контролираним условима животиње су насумично подељене у пет група, са по 12 животиња у свакој, од којих су три биле експерименталне и две контролне групе. Животиње у експерименталним групама су интраперитонеално (и.п.) примале појединачну дозу испитиваних комплекса (4 mg/kg телесне масе) једном недељно током четири недеље (укупно четири дозе), док су животиње у контролним групама и.п. примале цисплатину у дози од 4 mg/kg телесне масе (позитивна контрола) и физиолошки раствор 4 ml/kg телесне масе и.п. (негативна контрола), такође једном недељно током хроничног третмана у трајању у четири недеље. Непосредно пре и.п. администрације животињама, испитивани комплекси рутенијума су се, као и цисплатина, растварали у физиолошком раствору (0,9% NaCl).

Групе:

1. група (**I**): животиње које су примале  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$
2. група (**II**): животиње које су примале  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$
3. група (**III**): животиње које су примале  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$
4. група (**cisPt**): животиње које су примале цисплатину (позитивна контрола)
5. група (**ctrl**): животиње које су примале физиолошки раствор (негативна контрола)

Претходне студије су показале да цисплатина изазива кардиотоксичност и друге системске токсичне ефекте када се примењује у дози од 4 mg/kg телесне масе једном недељно током четири недеље третмана (Carozzi и др, 2009; Saleh и др, 2015), па смо из тог разлога изабрали исту дозу за наше истраживање. С обзиром на то да доза наших испитиваних комплекса рутенијума(II) на моделу пацова није објављена, користили смо исти режим дозирања као и за цисплатину (Ciftci и др, 2011b).

На почетку експерименталног периода пацовима је мерена телесна тежина, а онда и сваки пут пре интраперитонеалне примене испитиваних супстанци, једном недељно. Дозу супстанци смо израчунавали на основу измерене телесне тежине сваке животиње понаособ. Пацови у позитивној контролној групи су примали једнаке запремине физиолошког раствора у зависности од телесне тежине. Животињама је укупно апликовано четири дозе испитиваних супстанци или физиолошког раствора.

### 3.5. Експериментални протокол

#### 3.5.1. Одређивање маркера оксидационог стреса у крви и срчаном ткиву

Индукција оксидационог стреса је један од механизма антитуморске активности металофармацеутика, али настанка системске токсичности. Из тог разлога смо урадили евалуацију утицаја хроничне примене комплекса рутенијума и цисплатине на редокс статус.

Прикупљени узорци крви у тренутку жртвовања животиња су центрифугирани како би се одвојили плазма и лизат еритроцита, у којима смо потом одређивали:

- ниво прооксидационих маркера ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TBARS,  $\text{NO}_2^-$ ) у плазми,

- ниво маркера антиоксидационе заштите (активност ензима CAT, SOD и GSH-Px, и концентрације неензимских антиоксиданаса GSH и GSSG) у лизату еритроцита.

Такође, након спроведеног *ex vivo* експеримента на изолованом срцу, срца пацова су замрзнута на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а затим је 0,5 g ткива сваког срца хомогенизовано у 5 ml фосфатног пуфера (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PBS; pH 7,4) помоћу електричног хомогенизатора, на леду. Хомогенати ткива су центрифугирани на 1200 g током 20 минута на  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Добијени супернатанти су се чували на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до момента одређивања биохемијских параметара спектрофотометријском методом. У узорцима супернатанта одређивала се концентрација TBARS и GSH, као и активност ензима CAT и SOD, истим протоколима које смо користили за одређивање нивоа ових маркера у плазми, односно лизату еритроцита.

Поменути биомаркери оксидационог стреса у свим узорцима мерени су спектрофотометријски (*UV-1800 Shimadzu UV spectrophotometer, Japan*).

#### 3.5.1.1. Одређивање супероксид анјон радикала

Ниво супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) се одређивао на основу реакције нитро тетразолијум плавог у ТРИС пуферу са узорком плазме, и мерен на 530 nm. Као слепа проба се користила дестилована вода (Auclair и Voisin, 1985).

#### 3.5.1.2. Одређивање водоник пероксида

Евалуација нивоа водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) је извршена на основу оксидације фенол црвеног са  $\text{H}_2\text{O}_2$  у реакцији катализованој пероксидазом (енгл. *Horseshoe Radish Peroxidase*, HRPO). Узорак плазме од 200  $\mu\text{l}$  је преципитиран са 800  $\mu\text{l}$  раствора фенол црвеног, са додатим 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO (направљен *ex tempore*). Одговарајућа запремина Krebs-Henseleit-овог раствора је коришћена као слепа проба. Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  је мерена на таласној дужини од 610 nm (Pick и Keisari, 1980).

#### 3.5.1.3. Одређивање индекса липидне пероксидације

Концентрација индекса липидне пероксидације израженог као TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, реактивне супстанце тиобарбитурне киселине) у плазми се процењивала коришћењем 1% тиобарбитурне киселине у 0,05 NaOH, што је инкубирано са 0,8 ml узорка плазме на  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 15 минута, а мерење је извршено на 530 nm (Ohkawa и др, 1979).

#### 3.5.1.4. Одређивање нитрита

Концентрација нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у плазми је одражавала ниво азот монооксида. Нитрите смо одређивали методом по *Green*-у (*Green* и др, 1982). Узорак плазме од 0,5 ml је преципитиран са 200  $\mu\text{l}$  30% сулфосалицилне киселине и вортексиран, а затим центрифугиран на 3000 g. Добијени супернатант је помешан са једнаком запремином Грисовог реагенса и инкубиран 10 минута у мраку и измерен на 550 nm.

#### 3.5.1.5. Одређивање активности каталазе

Активност каталазе (CAT) је евалуирана протоколом по *Aebi*-у (*Aebi*, 1984). Хемолизат еритроцита смо разблажили дестилованом водом у односу 1:7. Узорак разблажених еритроцита у запремини од 100  $\mu\text{l}$  се помеша са једнаком количином етанола, 50  $\mu\text{l}$  пуфера за CAT и 1000  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Активност каталазе смо на спектрофотометру мерили у секстету на  $\lambda = 230$  nm, коришћењем кварчне кивете.

#### 3.5.1.6. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Активност супероксид дисмутазе (SOD) смо одређивали епинефринском методом по *Beutler*-у (*Beutler*, 1984). У епрувети смо помешали 100  $\mu\text{l}$  еритроцита и 1 ml карбонтог пуфера, узрак вортексирани, а затим додали 100  $\mu\text{l}$  адреналина. Мерење смо обавили у дупликату на  $\lambda = 470$  nm.

#### 3.5.1.7. Одређивање активности глутатион пероксидазе

Активност глутатион пероксидазе (GSH-Px) се одређивала након оксидације никотинамид аденин динуклеотид фосфата са *tert*-бутил хидропероксидом као супстратом. У ове сврхе смо користили методу *Maral*-а (*Maral* и др, 1977), док је мерење обављено на  $\lambda = 340$  nm.

#### 3.5.1.8. Одређивање редукованог и оксидованог глутатиона

Концентрација редукованог глутатиона (GSH) је процењена на основу оксидације GSH са 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензојеве киселине применом методе *Beutler*-а (*Beutler*, 1975b). Мерење је извршено на таласној дужини  $\lambda = 412$  nm.

Концентрација оксидованог глутатиона (GSSG) се одређивала након ензимске реакције са GR, применом методе *Beutler*-а (Beutler, 1975a), након инхибиције оксидације GSH помоћу N-етилмалеимида. Детекција је изведена на таласној дужини  $\lambda=340$  nm.

### 3.5.2. Одређивање биохемијских маркера у серуму

Након жртвовања пацова прикупили смо узорке крви из које смо центрифугирањем у трајању од 20 минута на 3000 rpm такође издвојили и серум, у којем смо потом одређивали бројне параметре функције срца, јетре и бубрега како бисмо утврдили и упоредили потенцијалну системску токсичност испитиваних супстанци (кардиотоксичност, хепатотоксичност и нефротоксичност). Такође, у серуму третираних пацова смо евалуирали и липидни статус и ниво укупних протеина и албумина.

#### 3.5.2.1. Одређивање биохемијских маркера функције срца

Као показатељи функције срца, активности ензима LDH, СК и СК-MB, као и концентрација срчаног тропонина Т (енгл. *cardiac Troponin T*, cTnT) у серуму, одређени су спектрофотометријски коришћењем стандардних комерцијалних комплета на анализатору *Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Switzerland)*, према протоколу произвођача.

#### 3.5.2.2. Одређивање биохемијских маркера функције јетре

У серуму смо одређивали и активност ензима аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT), с обзиром да они служе као маркери функције јетре. Евалуација активности ових ензима у серуму је извршена применом стандардног кита на програмираном биохемијском анализатору *Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Switzerland)*.

#### 3.5.2.3. Одређивање биохемијских маркера функције бубрега

Нефротоксичност испитиваних супстанци смо утврђивали праћењем нивоа урее и креатинина. Концентрацију урее смо одређивали применом *Berthelot* методе (Newman и Price, 1999) која се базира на ензиму уреазу. Овај ензим каталише реакцију хидролизе урее до амонијака и угљен-диоксида. Амонијак затим интерагује са *Berthelot* реагентом при чему настаје супстанца плаве боје, а њен интензитет смо одређивали колориметријским тестом.

С друге стране, концентрацију креатинина смо одређивали коришћењем *Jaffe* методе (Brouwers и др, 2013) која се заснива на примени пикринске киселине. Ова киселина ступа у интеракцију са креатинином у алкалној средини при чему настаје обојени комплекс, а чији интензитет смо одредили колориметријском методом.

#### 3.5.2.4. Одређивање липидног профила

Липидни профил пацова након примене испитиваних супстанци смо процењивали одређивањем концентрације укупног холестерола, липопротеина високе густине (HDL) (енгл. *High Density Lipoprotein*) и липопротеина ниске густине (LDL), као и триглицерида у серуму, коришћењем стандардног дијагностичког комплета (*Salucea Company, Netherlands*) колориметријском методом.

#### 3.5.2.5. Одређивање протеина

Концентрација укупних протеина у серуму се процењивала применом методе описане од стране *Tietz*-а (Tietz, 1999). У 1 ml реагенса за евалуацију укупних протеина додато је 20  $\mu$ l узорка, након чега је уследила инкубација на собној температури у трајању од 30 минута, после чега смо мерили ниво укупних протеина на  $\lambda = 546$  nm.

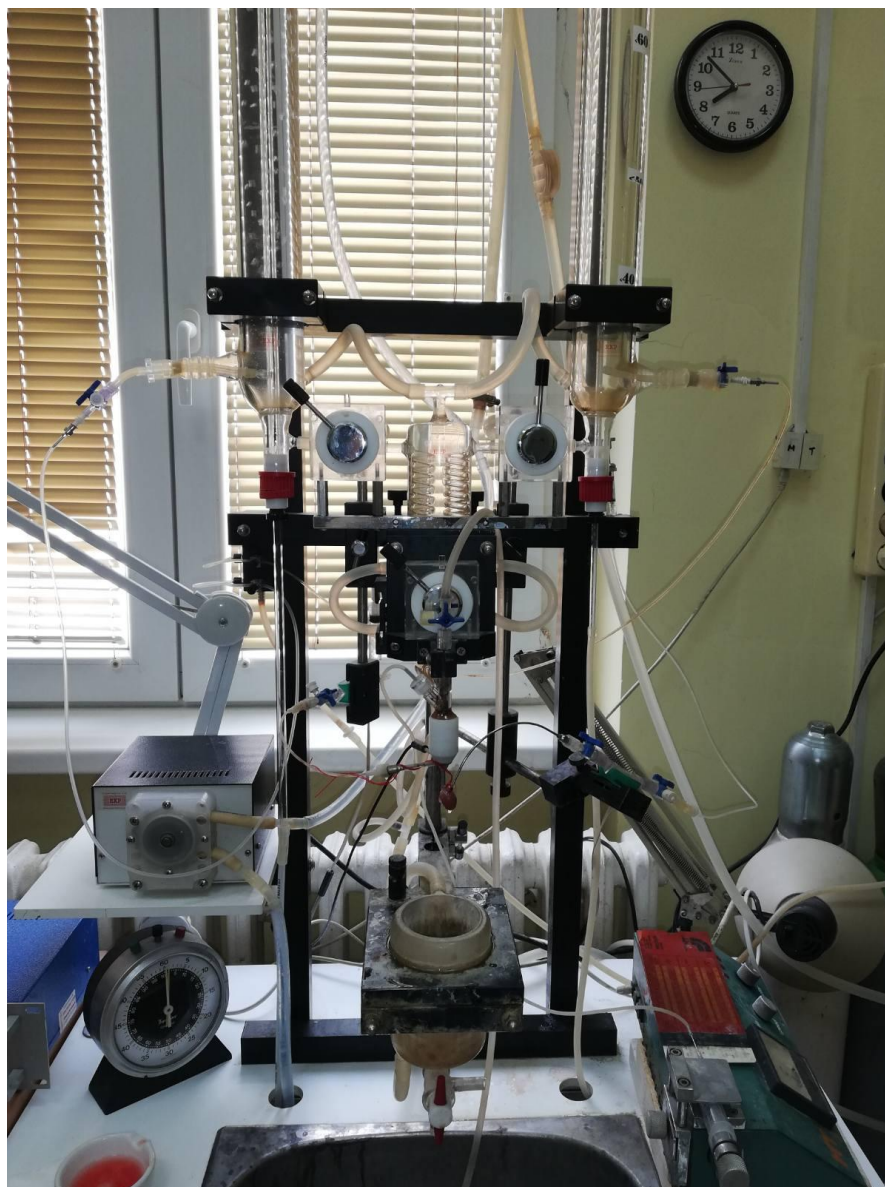
Ниво албумина смо евалуирали коришћењем методе описане од стране *Doumas*-а и сарадника (Doumas и др, 1971) која се базира на примени рН индикатора бромкрезол зеленог (BCG) који може мењати боје од жууте до плаве а зависно од рН, тј. нивоа протеина албумина. Након мешања 10  $\mu$ l узорка и 3 ml реагенса BCG следи инкубација на собној температури у трајању од 5 минута. Потом се на таласној дужини  $\lambda = 580$  nm мери апсорбанца.

### 3.6. Експериментални модел изолованог срца пацова (*Langendorff*-ова метода)

На крају хроничног третмана, животиње су анестезиране краткотрајном наркозом изазваном и.п. применом кетамина (10 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg), а затим жртвоване декапитацијом, како би се сакупила крв потребна за даље анализе. Након жртвовања животиња приступили смо главном делу нашег истраживања који се односио на одређивање кардиотоксичних ефеката испитиваних једињења, на основу евалуације функције срца и коронарне циркулације, применом *Langendorff*-овог модела за изоловано срце.

За испитивање функције срца и коронарне циркулације праћењем параметара кардиодинамике користили смо *Langendorff*-ов модел ретроградне перфузије изолованог срца пацова (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) (Слика 1). Одмах након жртвовања пацова, приступило се хируршкој интервенцији изолације срца отварањем грудног коша. Како бисмо одржали срце у хомеостази и свели његове метаболичке потребе на минимум, до постављања срца на

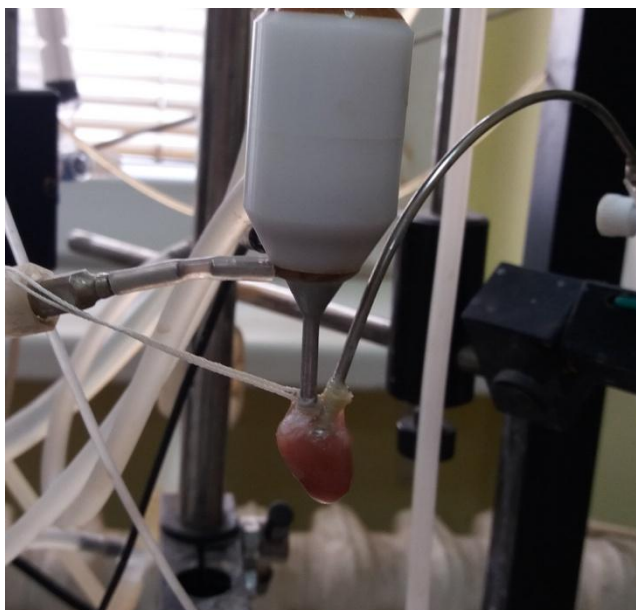
*Langendorff*-ов апарат, срца смо остављали у ледено хладан физиолошки раствор температуре од  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Након иницијалне препарације срца, преко асцентне аорте, срца смо причвршћивали концем за канилу *Langendorff*-овог апарата, након чега је уследила још једна препарација срца са циљем увођења сензора у леву комору (*Transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*). Сензор је омогућавао праћење кардиодинамских параметара, тј. функције миокарда током промене коронарних перфузионих притисака (КПП) од 40-120 cm H<sub>2</sub>O и обрнуто (Zimmer, 1998).



Слика 1. Оригинална фотографија *Langendorff* апарата

За адекватну исхрану срца током трајања овог *ex vivo* експеримента користили смо претходно припремљен перфузиони Krebs-Hensenleit-ов раствор, који је врло сличан ванћелијској течности. Овај комплексни раствор се састоји од: NaCl (118mmol/l), KCl (4,7 mmol/l), MgSO<sub>4</sub> (1,66 mmol/l), NaHCO<sub>3</sub> (24,88 mmol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,18 mmol/l), глукозе, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (5,55 mmol/l) и CaCl<sub>2</sub> (2,52 mmol/l). Раствор, који је све

време пролазио кроз стаклене цеви *Langendorff*-овог апарата и доспевао до самог изолованог срца, је гасиран смешом гасова (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>), загреван на температури од 37 °C, а његова pH вредност је износила 7,4.

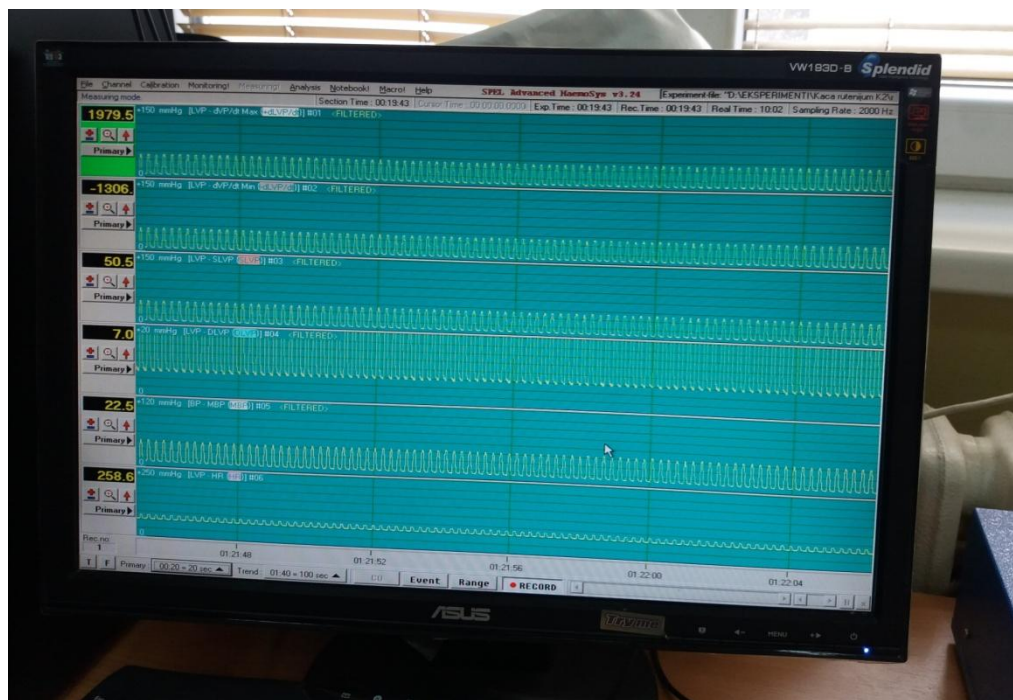


Слика 2. Оригинална фотографија изолованог срца пацова на *Langendorff* апарату

Након постављања срца на *Langendorff*-ов апарат уследио је период стабилизације срца, при константном КПП од 60 cm H<sub>2</sub>O (Слика 2). Сматрало се да је срчани рад стабилизован уколико су три пута узастопно измерене исте вредности коронарног протока. После тога смо испитивали ауторегулаторни ранг коронарне циркулације, почевши од КПП 60 cm H<sub>2</sub>O уз сукцесивно повећање за 20 cm H<sub>2</sub>O, све до 120 cm H<sub>2</sub>O, након чега смо смањивали постепено КПП до 40 cm H<sub>2</sub>O, уз још једно постепено повећање КПП опет до 120 cm H<sub>2</sub>O. При свакој промени КПП чекало се на стабилизацију срца у трајању од 5 минута. На овај начин смо преко сензора постављеног у леву комору срца пратили следеће кардиодинамске параметре:

- 1) dp/dt max – максимална стопа развоја притиска у левој комори (mmHg/s),
- 2) dp/dt min – минимална стопа развоја притиска у левој комори (mmHg/s),
- 3) SLVP – систолни притисак у левој комори (mmHg),
- 4) DLVP – дијастолни притисак у левој комори (mmHg),
- 5) HR – срчана фреквенца (bpm).

Уједно смо при сваком КПП скупљали узорке коронарног венског ефлуента и флоуметријски (flowmetrically) мерили параметар CF – коронарни проток (ml/min). У узорцима коронарног венског ефлуента смо касније одређивали ниво маркера оксидационог стреса. Сви поменути кардиодинамски параметри су се током експеримента пратили и снимали на монитору рачунара (Слика 3).



Слика 3. Оригинална фотографија која приказује снимање параметара кардиодинамике

Када су *ex vivo* експерименти на *Langendorff*-овом апарату завршени, срца су чувана ради спровођења даљих анализа.

### 3.7. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента током перфузије срца, одређивали смо следеће биомаркере оксидационог стреса:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , TBARS и  $NO_2^-$ . Ови параметри измерени у ефлуенту представљају редокс статус у ендокардијуму и коронарном ендотелу. Протоколи за евалуацију ових биомаркера у ефлуенту донекле су различити од оних које смо користили за њихово одређивање у узорцима плазме.

#### 3.7.1. Одређивање супероксид анјон радикала

Мерење нивоа супероксид анјон радикала се базира на реакцији  $O_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (Auclair и Voisin, 1985). У узорак ефлуента у запремини од 50  $\mu$ l додавала се смеша сачињена од пуфера TRIS-HCl + EDTA, као и 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT, у запремини од 950  $\mu$ l. За слепу пробу смо користили Krebs-Henseleit-ов раствор и мерили на 550 nm.



### 3.7.2. Одређивање водоник пероксида

Евалуација нивоа водоник пероксида је базирана на оксидацији фенол црвеног уз помоћу пероксидазе из коњске ротквице (HRPO) (Pick и Keisari, 1980). У епрувету се испипетира 200 микролитара ефлуента и 0,8 ml фенол црвеног раствор, а потом дода 10 микролитара (у односу 1:20) HRPO. Сви узорци су се остављали десет мин на собној температури. Мерење апсорбанце се вршило  $\lambda=610$  nm.

### 3.7.3. Одређивање индекса липидне пероксидације

Ниво индекса липидне пероксидације се мерио на основу концентрације липидних пероксида (малонилдиалдехида (MDA)) са тиобарбитурном киселином (ТВА) (Ohkawa и др, 1979). У епрувете смо додали ефлуент у запремини од 0,8 ml и 0,2 ml 1% ТВА у 0,05 моларном натријум хидроксиду, а затим се вршила инкубација у трајању од 15 минута на 100 °C у воденом купатилу. Мерење се обављало спектрофотометријски на  $\lambda=530$  nm.

### 3.7.4. Одређивање нитрита

Ниво нитрита се евалуирао спектрофотометријски при чему се правила смеша 1 милилитра ефлуента, 250 микролитара Griess-овг реагенса и 125 микролитара амоонијачног пуфера (Green и др, 1982). Детерминација је изведена на  $\lambda=550$  nm.

## 3.8. Релативна експресија проапоптотских и антиапоптотских гена у срчаном ткиву

Након завршеног експеримента на изолованом срцу *Langendorff*-овом техником, срца су замрзнута на -80 °C ради спровођења квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (енгл. *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR). Овом методом смо квантификовали експресију гена укључених у путеве апоптозе, у левој комори срчаног ткива. Укупна РНК је изолована коришћењем TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) према упутству произвођача. Потом је 2  $\mu$ g РНК реверзно транскрибовано у комплементарну ДНК (енгл. *complementary DNA*, cDNA) помоћу комплета (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, California, USA*). qRT-PCR је спроведена коришћењем *Power SYBR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)* и мРНК специфичних прајмера за Bcl-2, Вах и каспазу-3, као и  $\beta$ -актин као *housekeeping* гена (Табела 3). Реакције qRT-PCR су подразумевале инкубацију у трајању од 10 минута на 95 °C, затим 40 циклуса у трајању од 15 секунди на 95 °C, и 60 секунди на 60 °C у *Mastercycler ep realplex-у (Eppendorf, Hamburg, Germany)*. Релативна експресија гена је израчуната према *Schmittgen-у* и *Livak-у* (Schmittgen и Livak, 2008).

Табела 3. Секвенце прајмера коришћене за реакције qRT-PCR

	Леви прајмер	Десни прајмер
<b>β-актин</b>	CGTGCGTGACATTAAGAG	TTGCCGATAGTGATGACCT
<b>Bcl-2</b>	GACTGAGTACCTGAACCGGC	AGTTCCACAAAGGCATCCAG
<b>Bax</b>	AAACTGGTGCTCAAGGCC	GGGTCGCGAAGTAGGAAAGG
<b>Каспаза-3</b>	GGTATTGAGACAGACAGTGG	CATGGGATCTGTTTCTTTGC

### 3.9. Хистопатолошка анализа ткива срца, јетре и бубрега

На крају експерименталног периода узорци ткива срца, јетре и бубрега пацова су фиксирани у 4% формалину, рутински обрађени и уграђени у парафин. Хистолошко оштећење се анализирано на секцијама дебљине 5  $\mu\text{m}$  које су бојене стандардном бојом хематоксилин/еозин, по *Mayer*-овом протоколу. Најпре је извршена депарафинизација у ксилолу, а потом су ткива рехидратисана у опадајућим концентрацијама алкохола. Пресеке ткива смо затим бојили *Mayer*-овим хематоксилином у трајању од 5 минута, а потом их испирали водом и бојили еозином. За дехидратацију су се користиле растуће концентрације етанола (96% и 100%), а потом су пресеци ткива потопљени у ксилол ради просветљења. Најзад су секције ткива премазане канада балзамом и прекривене покровним стаклом. Након једнодневне сушења, добијени препарати су снимани светлосним микроскопом (*Olympus BX51, Japan*) на увећању 400 (Kiernan, 2008).

### 3.10. Статистичка обрада података

Сви резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Након утврђивања нормалне расподеле коришћењем *Shapiro-Wilk* теста и хомогености варијансе са Левеновим тестом, рађене су статистичке анализе за све измерене параметре. За тестирање разлика унутар групе користили смо Студентов *t* тест, док се за упоређивање међу групама користио тест једнофакторске анализе варијанси, *ANOVA* (*Scheffe's* тест). Разлике су се сматрале статистички значајним при  $p$  вредностима  $< 0,05$ . Статистичке анализе су се примењивале у оквиру статистичког програма *SPSS*, верзије 21 (*IBM SPSS Statistics 21*).

**IV**

**РЕЗУЛТАТИ**

## 4. РЕЗУЛТАТИ

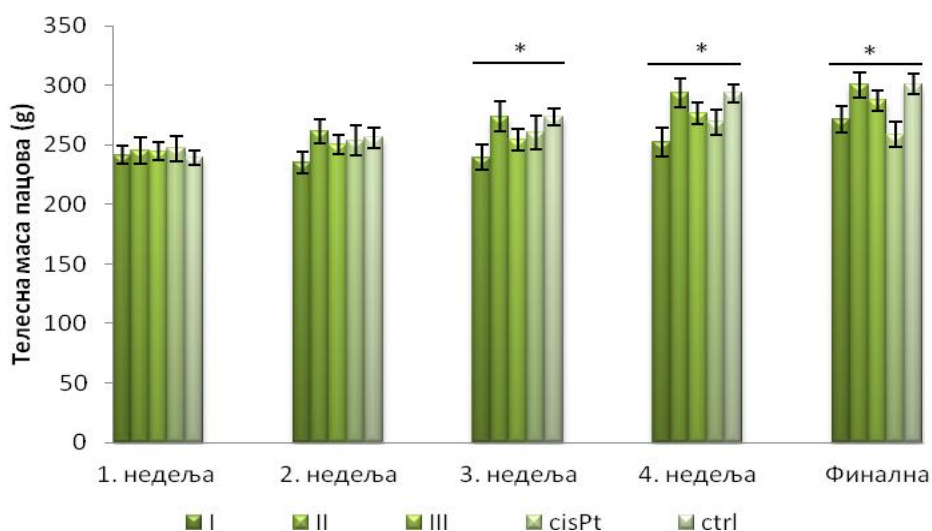
### 4.1. Телесна маса

Током четворонедељне хроничне интраперитонеалне примене комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора праћена је телесна маса пацова по седмицама. Прво мерење телесне масе изведено је у првој седмици примене поменутих супстанци, друго мерење у другој експерименталној седмици, треће мерење у трећој седмици примене супстанци, четврто мерење у четвртој седмици примене супстанци, док је последње мерење телесне масе обављено у тренутку жртвовања пацова (финална телесна маса).

#### 4.1.1. Утицај примене комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора на телесну масу пацова

Морфометријске промене телесне масе пацова током примене хроничног третмана приказане су на Графиконима 1, 2, 3, као и у Табели 4.

Током праћења телесне масе за време трајања експерименталног третмана испитиваним једињењима, приметили смо да је највећи пораст телесне масе остварен у контролној групи и II групи, а најмањи у групи која је примала цисплатину. Вредности телесне масе експерименталних животиња између група нису биле статистички значајно различите у првој и другој недељи примене испитиваних супстанци ( $p > 0,05$ ). Статистичка значајност разлике телесних маса је установљена у трећој и четвртој недељи хроничног третмана, када је дошло до статистички значајног повећања масе у II групи и контролној групи у односу на телесну масу пацова у I групи ( $p < 0,05$ ). Финална телесна маса животиња се статистички значајно разликовала међу групама, наиме дошло је до статистички значајног повећања ( $p < 0,05$ ) телесне масе у II групи и контролној групи у односу на телесну масу пацова у I групи и групи третираној цисплатином (Графикон 1).



Графикон 1. Просечна телесна маса пацова праћена по недељама у току хроничног третмана. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајна разлика између група се одређивала параметријским тестом *ANOVA*. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

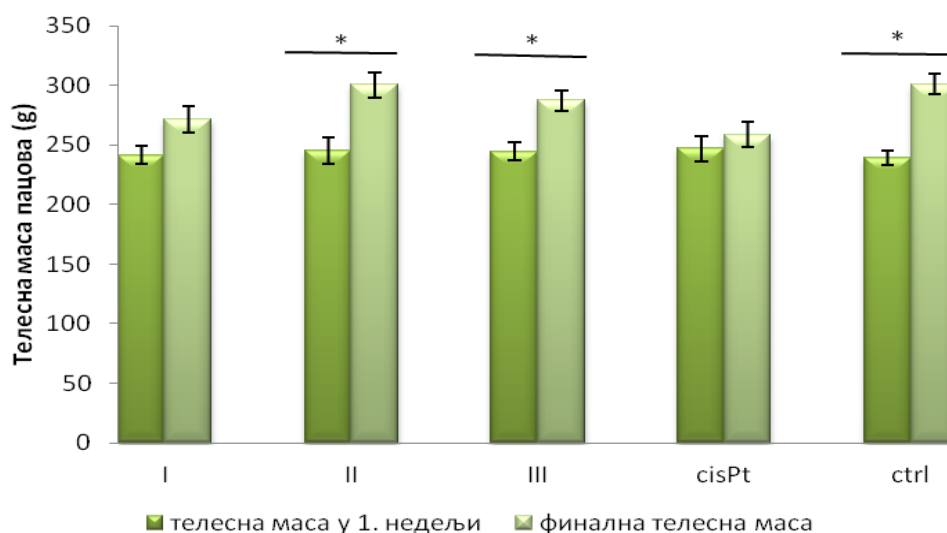
Процент промене телесних маса пацова разликовао се од недеље до недеље (Табела 4), па се тако телесна маса пацова од прве до друге недеље хроничног третмана смањила за 2,64% у групи третираној Ru(en) комплексом, док се за сличан проценат повећала у групама третираним Ru(bpy) комплексом и цисплатином, а телесна маса је највише порасла у групи третираној Ru(dach) комплексом (6,79%) и у контролној групи (6,97%). Најмањи проценат раста телесне масе између друге и треће недеље третмана уочен је у групи животиња које су примале Ru(bpy) и Ru(en) комплексе, док је највећи проценат раста забележен у контролној групи. Телесна маса пацова у четвртој недељи третмана порасла је у односу на трећу недељу за чак 8,70% у групи третираној Ru(bpy) комплексом, док је најмањи раст масе уочен у групи третираној цисплатином (3,54%). Финална телесна маса се знатно разликовала међу групама, па је тако у групи пацова који су примали цисплатину дошло чак до смањења телесне масе за 3,93% у односу на масу измерену у четвртој недељи третмана. Благ пораст финалне телесне масе у односу на ону мерену у четвртој недељи забележен је у групама третираним Ru(dach) и Ru(bpy) комплексима, као и у контролној групи, док је највећи проценат пораста финалне телесне масе у односу на четврту недељу примећен у групи пацова третираним Ru(en) комплексом.

Табела 4. Промене телесне масе животиња изражене у процентима по недељама током експерименталног периода

	I	II	III	cisPt	ctrl
2. недеља vs 1.недеља (%)	-2,64	6,79	2,5	2,59	6,97
3.недеља vs 2.недеља (%)	1,81	4,78	1,60	2,68	6,91
4.недеља vs 3.недеља (%)	5,27	7,21	8,70	3,54	7,31
финална телесна маса vs 4.недеља (%)	7,74	2,25	3,84	-3,93	2,56

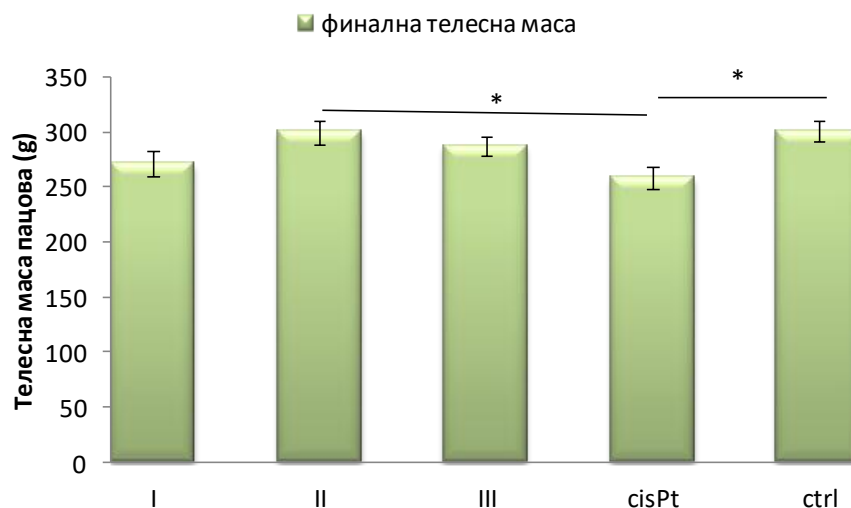
Почетне и крајње вредности телесне масе пацова разликовале су се између група. У свим експерименталним групама дошло је до статистички значајног ( $p < 0,05$ ) пораста телесне масе током четворонедељног третмана, изузев у групама третираним Ru(en) комплексом и цисплатином (Графикон 2). Највећи пораст телесне масе животиња уочен је код група третираних Ru(dach) и Ru(bpy) комплексом, као и у контролној групи.

У групи пацова који су интраперитонеално примали Ru(en) комплекс пораст телесне масе на крају експерименталног периода износио је 12,42% ( $p > 0,05$ ), у Ru(dach) групи пораст телесне масе износио је 22,68% ( $p < 0,05$ ), у Ru(bpy) групи пораст телесне масе био је 17,54% ( $p < 0,05$ ), у групи која је примала цисплатину пораст телесне масе био је 4,78% ( $p > 0,05$ ), док је пораст телесне масе у контролној групи износио 25,85% ( $p < 0,05$ ) (Графикон 2).



Графикон 2. Просечна телесна маса пацова измерена у првој недељи хроничног третмана и пред жртвовање. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

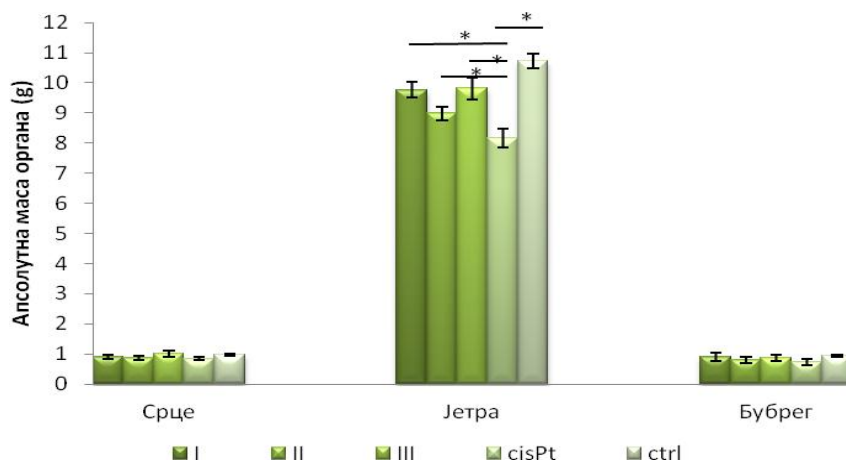
Просечна финална телесна маса пацова се разликовала између група. Најнижа финална телесна маса измерена је код пацова третираних цисплатином и она је била статистички значајно нижа ( $p < 0,05$ ) у односу на финалну телесну масу пацова у контролној групи и оних третираних Ru(dach) комплексом. Највише финалне телесне масе пацова измерене су у групи која је примала Ru(dach) комплекс и у контролној групи (Графикон 3).



Графикон 3. Просечна финална телесна маса пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајна разлика између група се одређивала параметријским тестом ANOVA. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

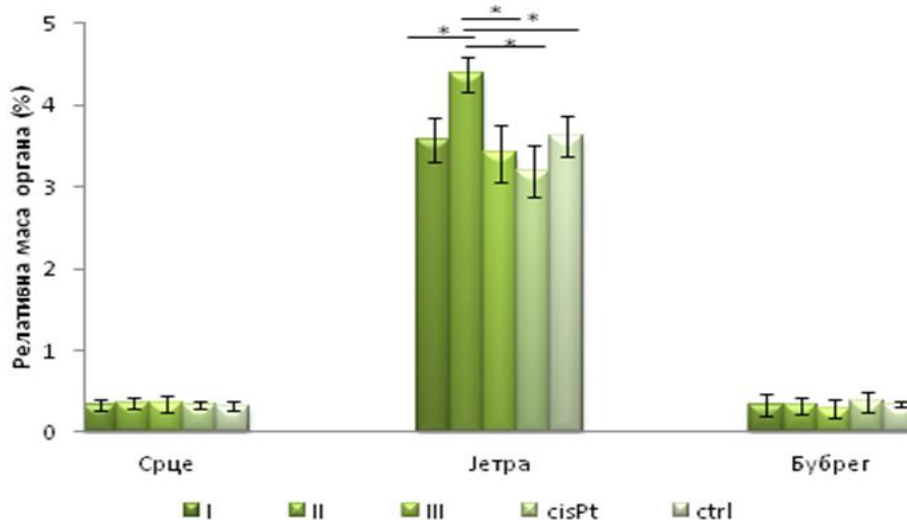
#### 4.1.2. Утицај примене комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора на масу органа пацова

Апсолутна маса органа (срце, јетра и бубрег) пацова мерена је након жртвовања пацова (Графикон 4). Апсолутна маса срца и бубрега није се статистички значајно разликовала међу групама ( $p > 0,05$ ), док је међу третираним групама примећена статистичка значајност у апсолутној маси јетре ( $p < 0,05$ ). Најмања маса јетре измерена је у групи пацова која је примала цисплатину, док је највећа апсолутна маса јетре забележена у контролној групи. Маса јетре је била значајно већа у оним групама које су примале комплексе рутенијума у односу на групу којој је апликована цисплатина ( $p < 0,05$ ).



Графикон 4. Апсолутна маса органа пацова изражена у грамима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајна разлика између група се одређивала параметријским тестом ANOVA. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

Релативна маса органа је израчуната као проценат телесне масе. Релативан однос између масе органа и телесне масе животиња приказан је на Графикону 5. Релативне масе срца и бубрега нису се значајно разликовале међу групама ( $p > 0,05$ ). Највећа релативна маса јетре уочена је у групи пацова који су примали Ru(dach) комплекс и она је била значајно већа у поређењу са свим осталим групама, док је најмања измерена у групи третираној цисплатином.



Графикон 5. Релативна маса органа пацова изражена у процентима. Статистички значајна разлика између група се одређивала параметријским тестом ANOVA. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

#### 4.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Промене параметара кардиодинамике ( $dp/dt$  max,  $dp/dt$  min, SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока (CF) изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима ретроградне перфузије по техници *Langendorff* праћене су методом ауторегулације на коронарним перфузионим притисцима (КПП) у опсегу 40-120  $cmH_2O$ . Поменути параметри су приказани табеларно и графички у виду средњих вредности и стандардних девијација, са статистичком значајношћу 0,05 ( $*p < 0,05$ ).

##### 4.2.1. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

У Табели 5 дате су средње вредности  $\pm$  стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног протока изолованог срца у контролном и експерименталном периоду након интраперитонеалне примене



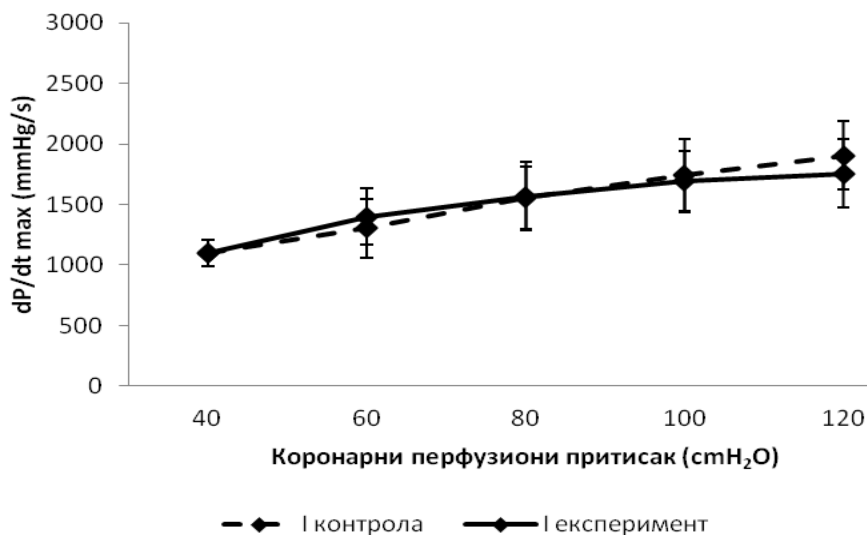
комплекса рутенијума са етилендиамином. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.

Табела 5. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на параметре кардиодинамике и коронарни проток у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездом \*.

КПП	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>		<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>		<i>SLVP (mmHg)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	1101,83±108,21	1101,83±108,21	-956,25±188,21	-956,25±188,21	31,52±6,09	31,52±6,09
<b>60</b>	1303,00±240,74	1400,12±235,43	-1087,33±242,87	-1159,33±254,02	32,87±5,34	33,23±6,79
<b>80</b>	1554,67±259,86	1567,50±280,60	-1315,50±254,55	-1325,17±266,12	36,13±5,46	34,83±7,38
<b>100</b>	1741,83±294,21	1690,67±252,72	-1377,83±253,13	-1384,60±250,95	38,17±6,95	37,80±8,18
<b>120</b>	1904,50±284,65	1757,17±280,28	-1491,17±247,58	-1385,33±25,23	40,02±8,22	40,05±7,95
КПП	<i>DLVP (mmHg)</i>		<i>HR (bpm)</i>		<i>CF (ml/min)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	2,92±0,88	2,92±0,88	261,62±22,88	261,62±22,88	5,57±0,75	5,57±0,75
<b>60</b>	3,25±1,25	2,85±0,95	269,55±17,37	274,30±23,72	6,83±1,12	6,80±0,94
<b>80</b>	3,37±1,22	3,20±1,25	278,77±27,29	275,08±19,16	8,33±1,11	7,97±1,05
<b>100</b>	3,77±0,98	3,25±1,30	283,05±23,78	286,12±11,28	9,40±1,54	9,27±1,40
<b>120</b>	4,30±1,23	<b>3,37±1,34*</b>	286,33±22,16	286,22±15,46	10,20±1,90	10,20±1,61

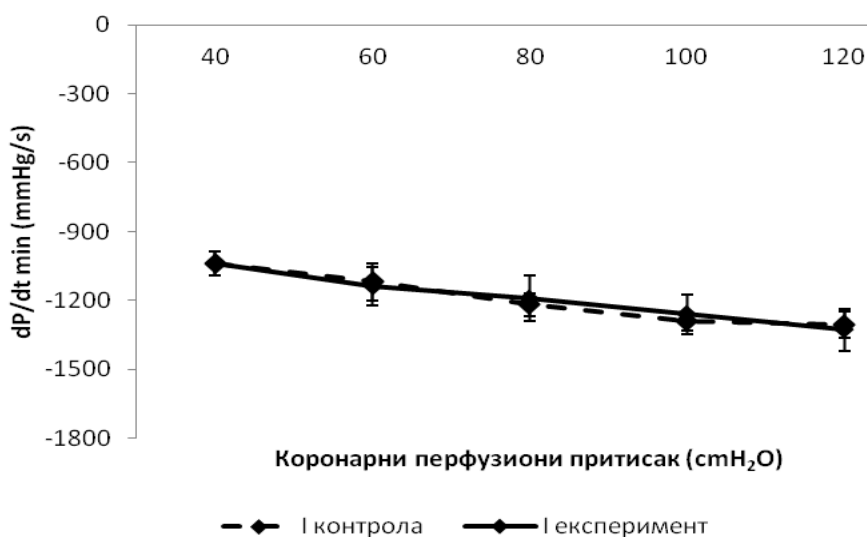
Параметри кардиодинамике нису се статистички значајно разликовали ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима унутар I групе приликом промене коронарног перфузионог притиска, осим параметра дијастолни притисак у левој комори при притиску 120 cmH<sub>2</sub>O (\* $p < 0,05$ ).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 6. Мааксимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



Графикон 6. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

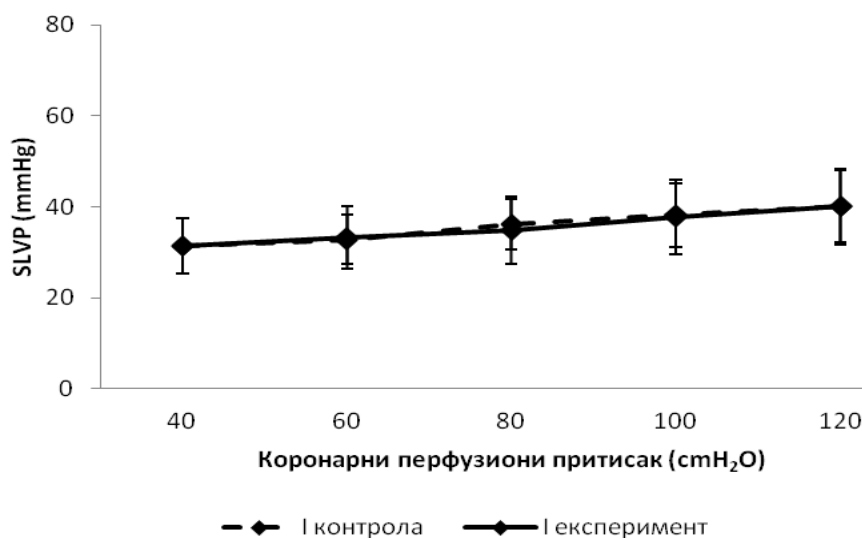
Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори у коонтролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 7. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



Графикон 7. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

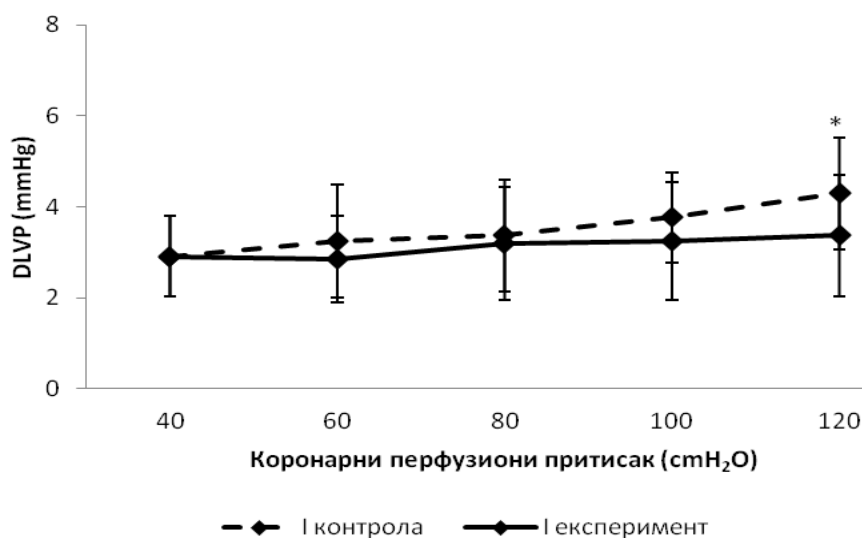
Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на SLVP – систолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 8. Систолни притисак у левој комори се није

статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



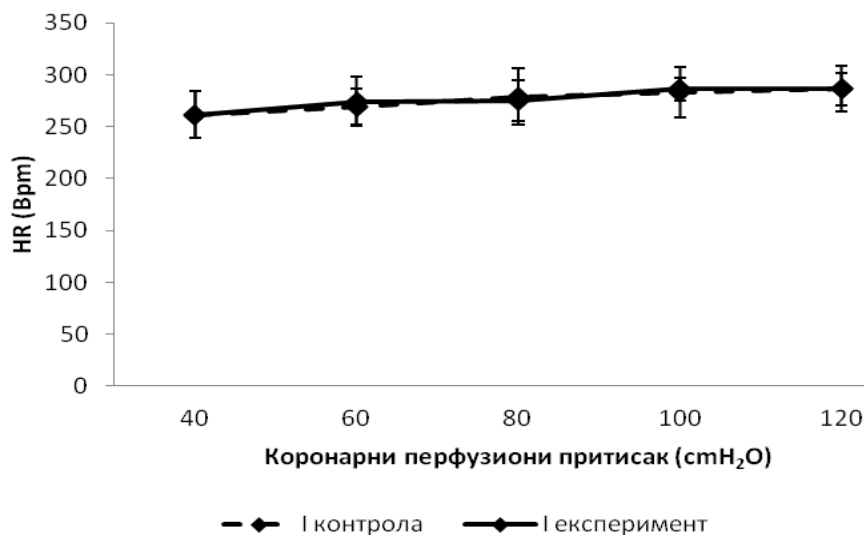
Графикон 8. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на SLVP – систолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на DLVP – дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 9. Дијастолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима на коронарним перфузионим притисцима 40-100 cmH<sub>2</sub>O, док је DLVP статистички значајно промењен при притиску од 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ).



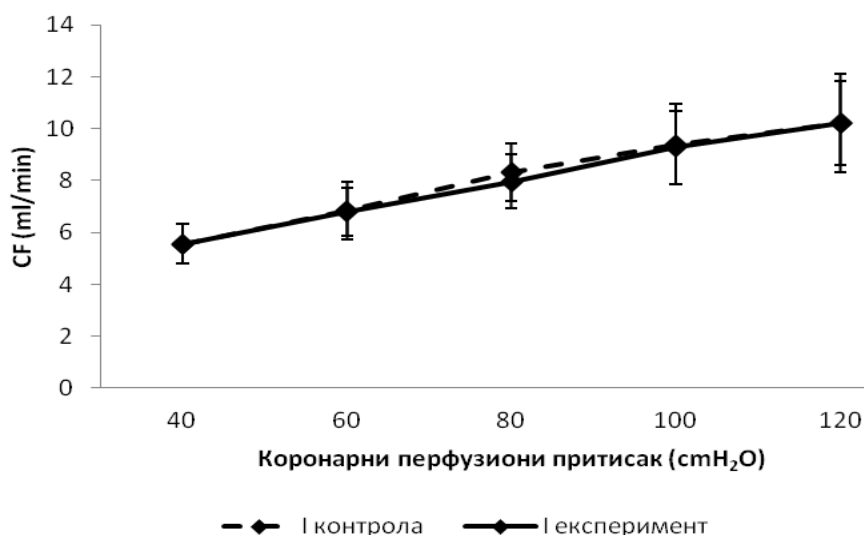
Графикон 9. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на DLVP – дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између контролних и експерименталних услова одређене су Студентовим t тестом и приказане звездicom \*.

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на HR – срчану фреквенцу у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 10. Срчана фреквенца се није статистички значајно разликовала ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 10. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на HR – срчану фреквенцу у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на CF – коронарни проток у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 11. Коронарни проток се није статистички значајно разликовао ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 11. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на CF – коронарни проток у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.2. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на кардиодинамске параметре и коронарни протоок изолованог срца

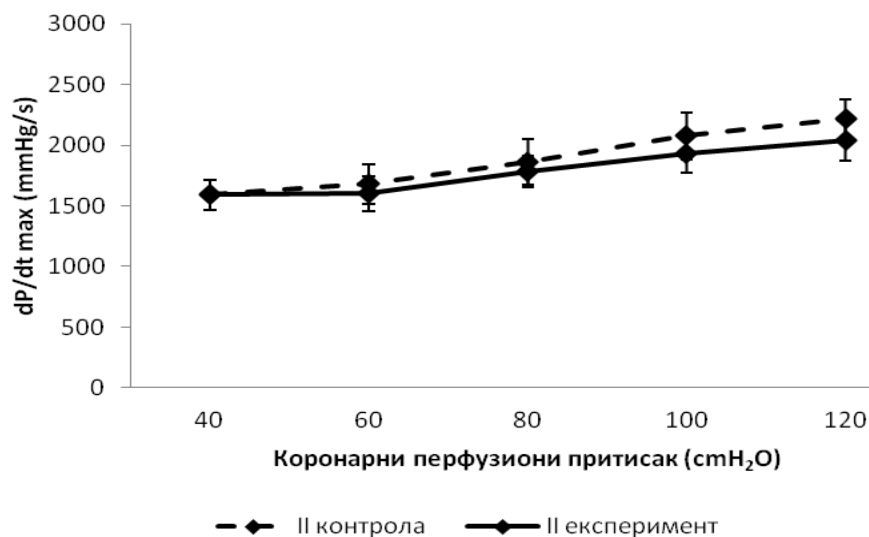
У Табели 6 дате су средње вредности±стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног протока изолованог срца пацова у контролним и експерименталном периоду након интраперитонеалне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.

Табела 6. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на параметре кардиодинамике и коронарни проток у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова одређене су Студентовим t тестом.

<b>КПП</b>	<b><i>dp/dt max (mmHg/s)</i></b>		<b><i>dp/dt min (mmHg/s)</i></b>		<b><i>SLVP (mmHg)</i></b>	
	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>
<b>40</b>	1590,37±127,52	1590,37±127,52	-1058,88±131,44	-1058,88±131,44	41,00±4,21	41,00±4,21
<b>60</b>	1679,85±167,08	1599,45±145,92	-1124,45±151,03	-1171,92±143,35	45,85±4,89	44,28±3,47
<b>80</b>	1862,40±189,93	1781,85±127,65	-1226,32±145,96	-1211,92±168,45	50,15±6,35	49,05±4,49
<b>100</b>	2076,15±189,87	1933,25±164,48	-1384,77±136,98	-1307,92±157,02	53,42±6,55	50,97±7,70
<b>120</b>	2215,48±157,45	2038,68±169,29	-1481,33±93,35	-1368,07±130,80	55,72±7,39	51,45±7,19
<b>КПП</b>	<b><i>DLVP (mmHg)</i></b>		<b><i>HR (bpm)</i></b>		<b><i>CF (ml/min)</i></b>	
	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>E</i></b>
<b>40</b>	4,70±0,52	4,70±0,52	248,95±17,73	248,95±17,73	6,03±0,50	6,03±0,50
<b>60</b>	4,90±0,49	5,25±0,52	257,62±24,63	257,27±24,54	7,80±0,93	7,13±0,71
<b>80</b>	5,43±0,46	5,73±0,79	271,48±23,43	263,78±26,97	9,37±1,20	8,93±1,31
<b>100</b>	5,27±0,35	5,92±0,55	275,70±24,35	278,32±23,34	10,43±1,28	10,70±1,63
<b>120</b>	5,78±0,53	5,83±0,56	281,83±25,60	276,18±27,95	11,40±1,62	11,50±1,88

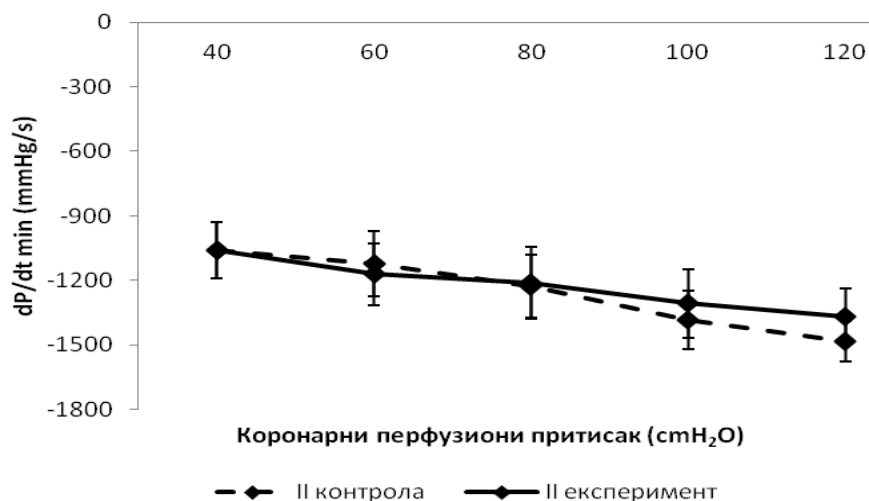
Параметри кардиодинамике нису се статистички значајно разликовали ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима унутар II групе приликом промене коронарног перфузионог притиска.

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 12. Максимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



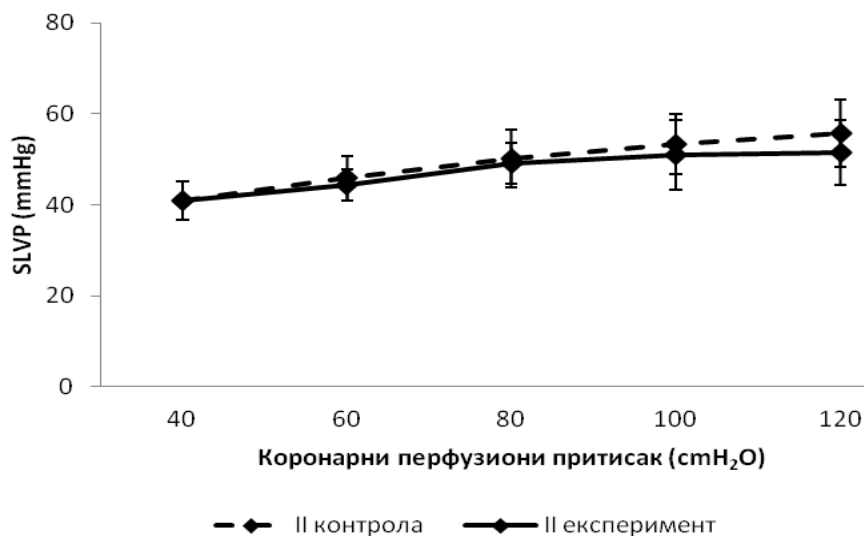
Графикон 12. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 13. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



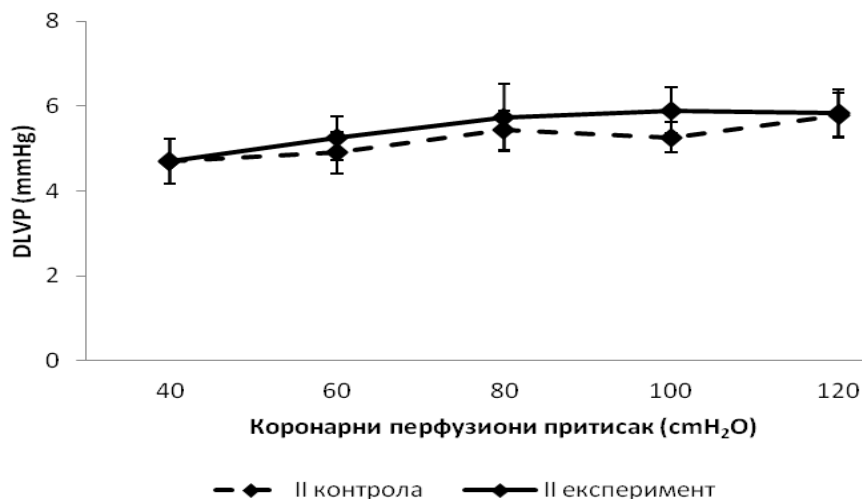
Графикон 13. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 14. Систолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузног притиска.



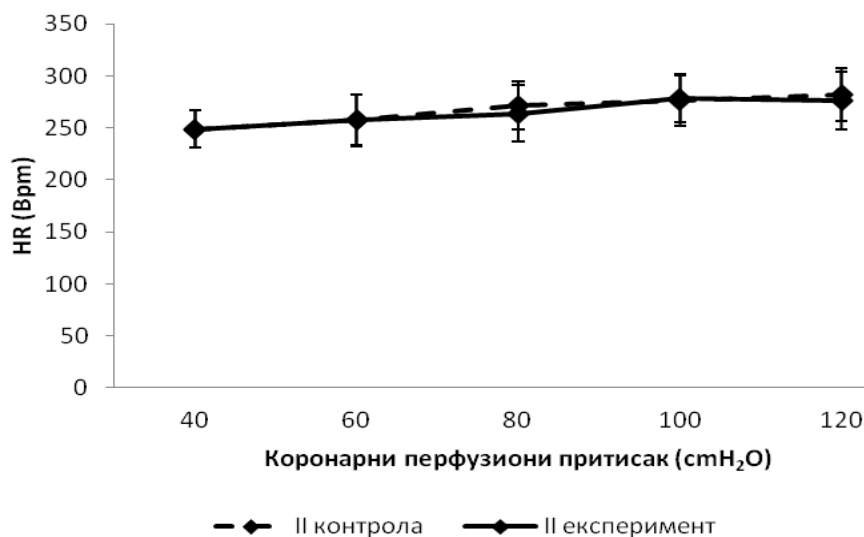
Графикон 14. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на SLVP – систолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на DLVP – дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 15. Дијастолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузног притиска.



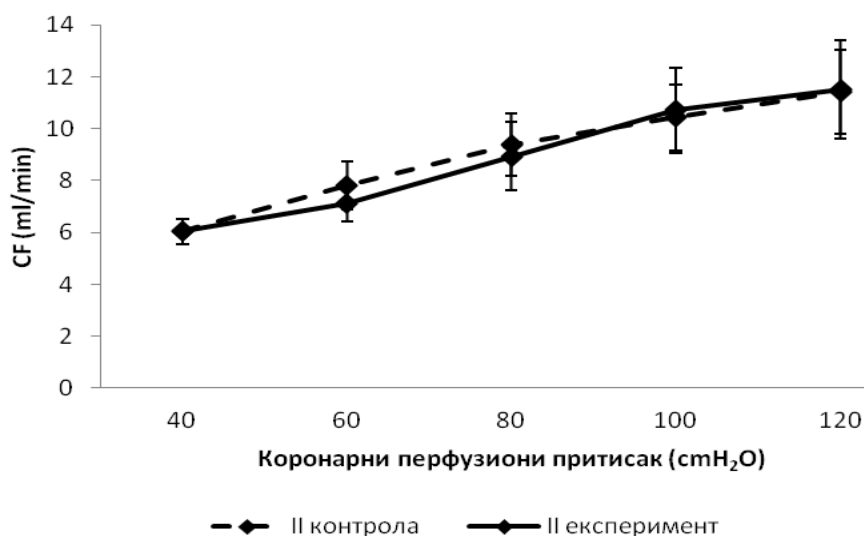
Графикон 15. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на DLVP – дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на HR – срчану фреквенцу у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 16. Срчана фреквенца се није статистички значајно разликовала ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 16. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на HR – срчану фреквенцу у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на CF – коронарни проток у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 17. Коронарни проток се није статистички значајно разликовао ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.





Графикон 17. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на CF – коронарни проток у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.3. Ефекти хроничне примене рутенијум комплекса са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

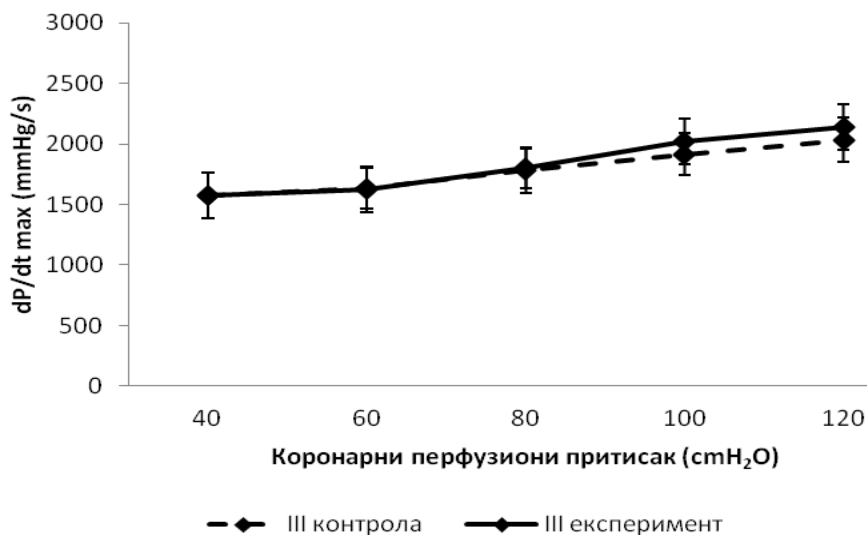
У Табели 7 дате су средње вредности±стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног протока изолованог срца у контролном и експерименталном периоду након интраперитонеалне примене комплекса рутенијума са бипиридином. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.

Табела 7. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на параметре кардиодинамике и коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова одређене су Студентовим t тестом.

КПП	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>		<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>		<i>SLVP (mmHg)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	1570,52±188,28	1570,52±188,28	-981,95±107,37	-981,95±107,37	44,08±7,81	44,08±7,81
<b>60</b>	1631,02±168,56	1624,07±189,98	-1069,70±166,64	-1156,30±163,91	47,33±7,02	50,48±9,14
<b>80</b>	1777,70±182,67	1800,87±171,87	-1319,12±144,72	-1390,63±151,08	54,12±7,44	58,15±7,42
<b>100</b>	1914,77±175,71	2016,68±188,12	-1434,28±172,50	-1480,52±161,25	61,83±7,29	64,28±9,03
<b>120</b>	2032,68±181,07	2141,67±190,76	-1506,17±189,98	-1588,33±172,09	63,92±5,47	67,23±8,15
КПП	<i>DLVP (mmHg)</i>		<i>HR (bpm)</i>		<i>CF (ml/min)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	2,72±0,93	2,72±0,93	252,00±18,45	252,00±18,45	6,43±0,80	6,43±0,80
<b>60</b>	2,68±0,98	2,32±1,08	272,62±24,34	252,15±26,11	8,60±0,51	7,60±0,88
<b>80</b>	2,92±0,88	2,43±1,09	278,40±23,48	267,37±20,71	9,23±0,65	8,67±0,64
<b>100</b>	3,28±1,07	3,03±1,03	261,83±16,23	269,93±19,60	10,03±0,93	9,73±0,69
<b>120</b>	3,63±1,01	3,53±0,93	267,93±5,46	270,13±22,26	11,03±1,01	11,53±0,85

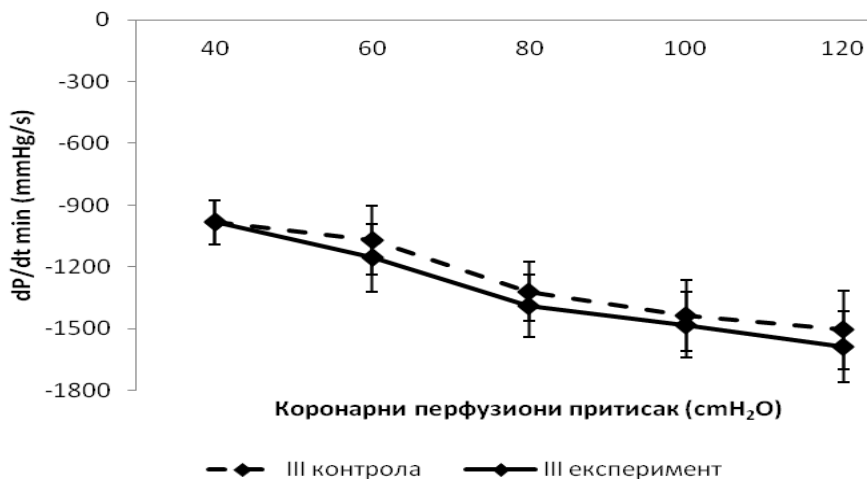
Параметри кардиодинамике нису се статистички значајно разликовали ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима унутар III групе приликом промене коронарног перфузионог притиска.

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комри изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 18. Максимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



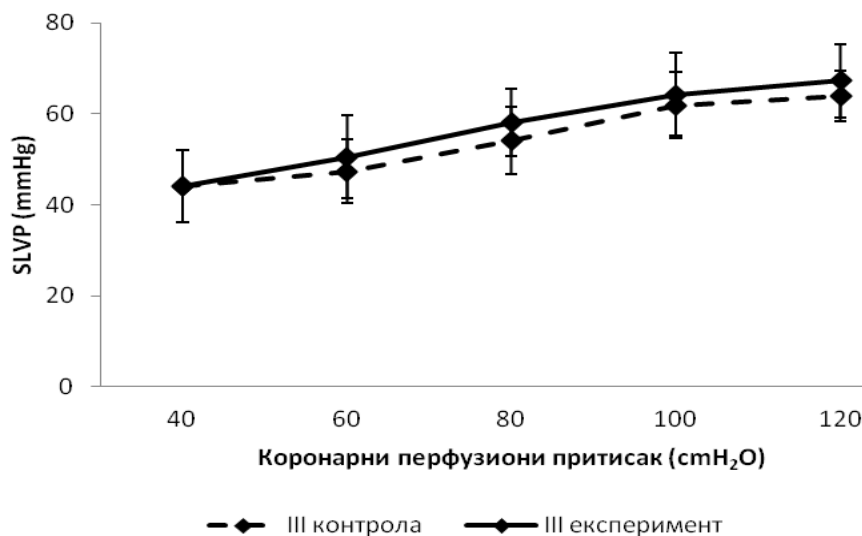
Графикон 18. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 19. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



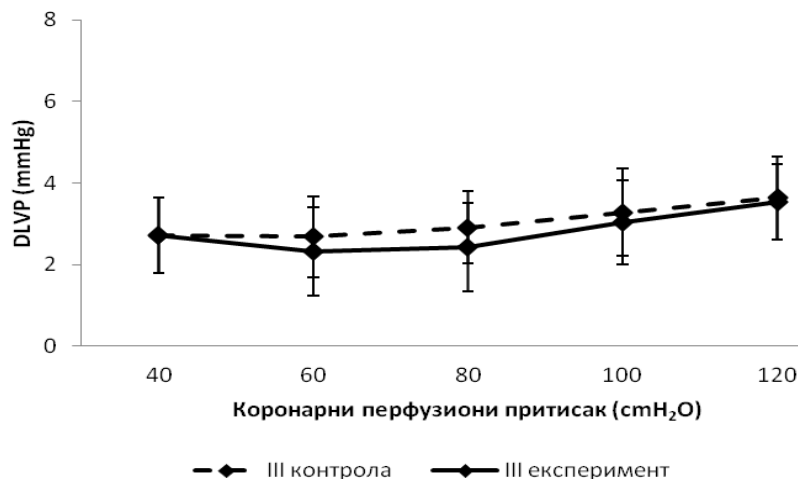
Графикон 19. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на SLVP – систолни притисак у левој комори изоолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 20. Систолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



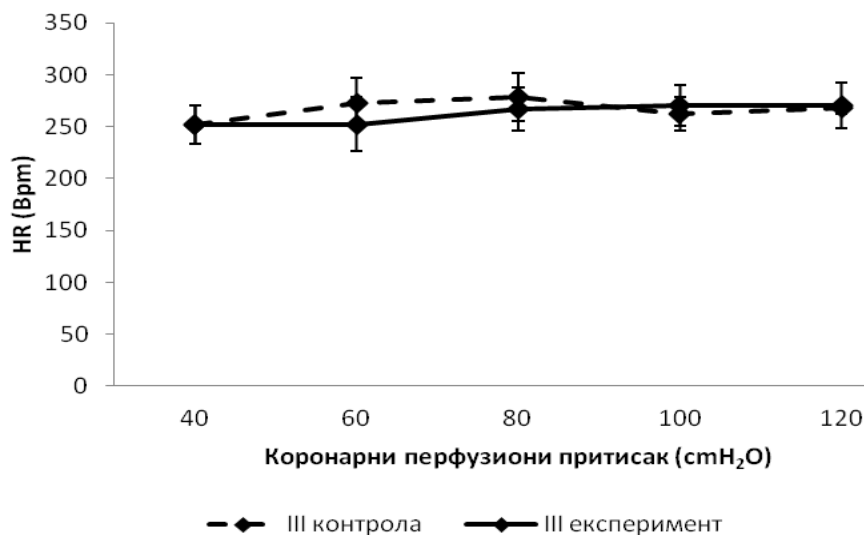
Графикон 20. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на DLVP – дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 21. Дијастолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



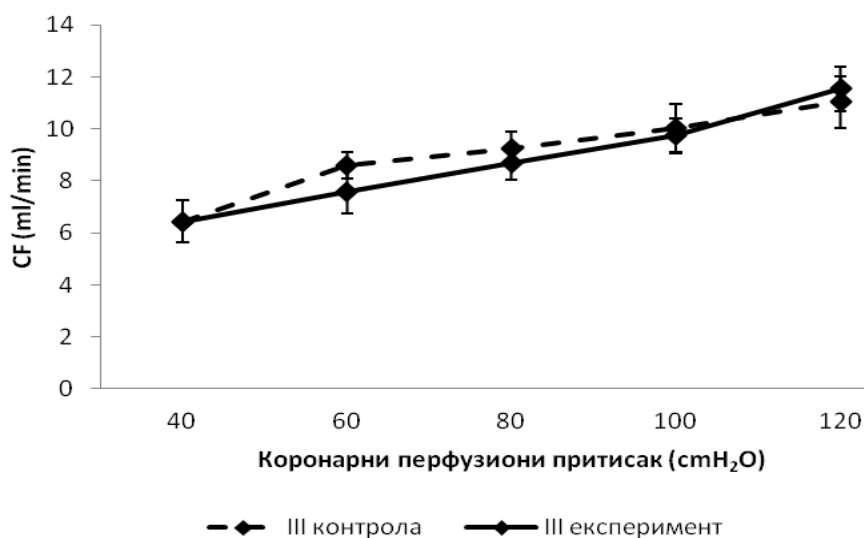
Графикон 21. Ефекти хроничне примене рутенијум комплекса са бипиридином на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца у коонтролним и експирменталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на HR – срчану фреквенцу изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 22. Срчану фреквенцу се није статистички значајно разликовала ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 22. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на HR – срчану фреквенцу изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на CF – коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 23. Коронарни проток се није статистички значајно разликовао ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 23. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на CF – коронари проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.4. Ефекти хроничне примене цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

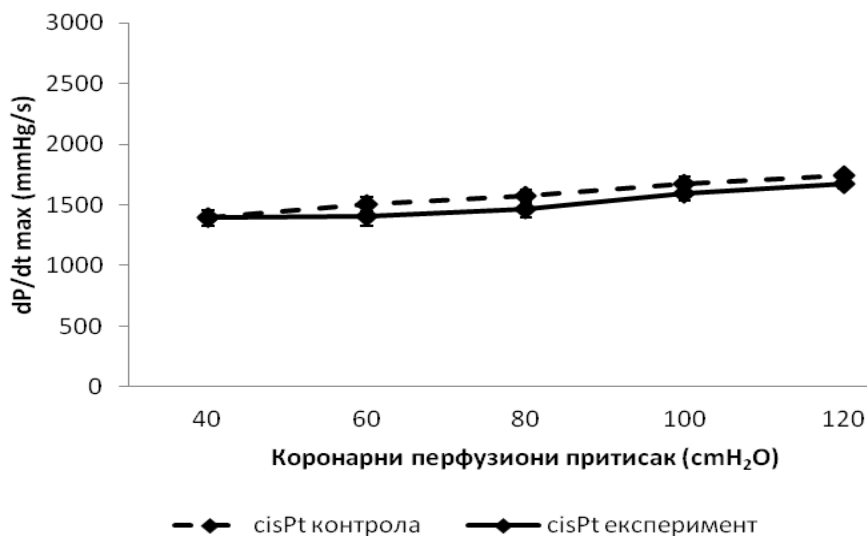
У Табели 8 дате су средње вредности±стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног протока изолованог срца у контролном и експерименталном периоду након интраперитонеалне примене цисплатине. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.

Табела 8. Ефекти хроничне примене цисплатине на параметре кардиодинамике и коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су Студентовим *t* тестом и приказане звездом \*.

КПП	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>		<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>		<i>SLVP (mmHg)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	1395,02±63,35	1395,02±63,35	-1037,62±51,18	-1037,62±51,18	32,43±2,46	32,43±2,46
<b>60</b>	1506,88±62,46	1405,18±74,13	-1069,70±166,64	-1139,00±82,72	34,53±3,99	34,23±3,46
<b>80</b>	1570,07±56,11	1467,43±68,23	-1202,93±132,94	<b>-1069,7±166,64*</b>	35,12±3,01	37,32±3,08
<b>100</b>	1677,65±54,44	1594,57±59,15	-1324,45±74,52	<b>-1171,92±96,14*</b>	34,62±3,35	36,45±3,98
<b>120</b>	1739,88±28,16	1673,62±34,94	-1435,78±83,28	<b>-1260,97±84,58*</b>	36,70±2,33	39,08±2,63
КПП	<i>DLVP (mmHg)</i>		<i>HR (bpm)</i>		<i>CF (ml/min)</i>	
	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<b>40</b>	3,73±0,80	3,73±0,80	250,78±10,34	250,78±10,34	6,97±0,75	6,97±0,75
<b>60</b>	4,05±0,78	3,93±0,82	257,00±8,65	242,08±14,15	7,27±0,76	7,27±0,63
<b>80</b>	4,43±1,01	4,05±0,90	262,23±5,78	248,22±8,49	7,77±0,70	7,63±0,56
<b>100</b>	4,83±0,79	4,13±0,83	266,90±7,34	254,38±6,77	8,23±0,73	7,93±0,50
<b>120</b>	4,42±0,57	4,12±0,87	270,42±5,13	264,68±4,78	8,73±0,55	8,27±0,52

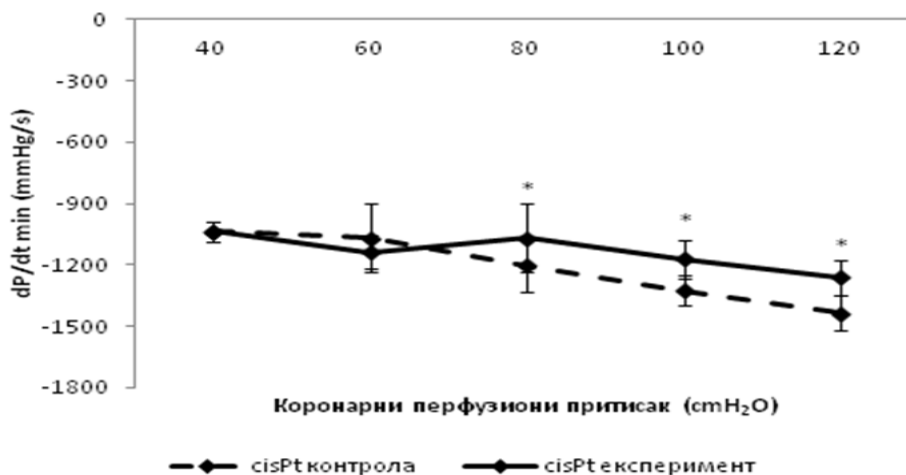
Параметри кардиодинамике нису се статистички значајно разликовали ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима унутар групе која је третирана цисплатином приликом промене коронарног перфузионог притиска, осим параметра  $dp/dt \min$  на коронарним притисцима од 80 до 120  $\text{cm H}_2\text{O}$  ( $*p < 0,05$ ).

Ефекти хроничне примене цисплатине на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развја притиска у левој комори изоловног срца у контролним и експерименталним условима представљени на Графикону 24. Максимална стопа развја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



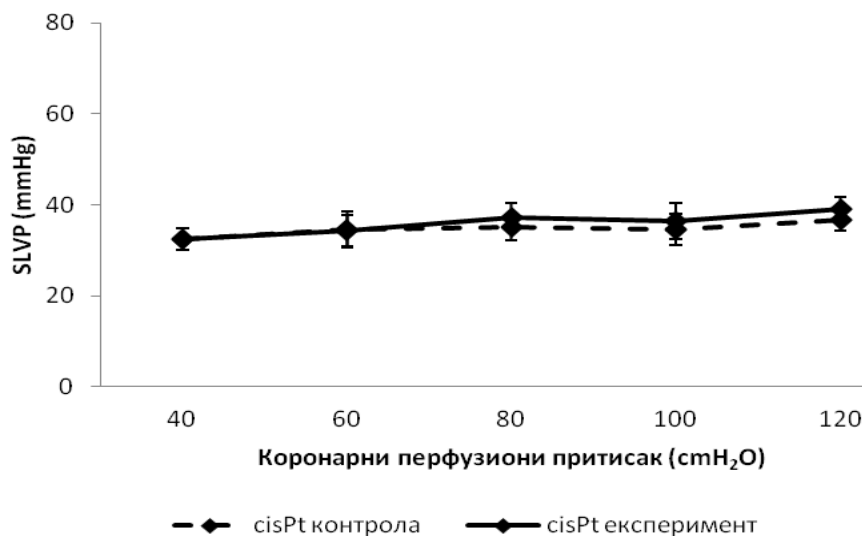
Графикон 24. Ефекти хроничне примене цисплатине на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене цисплатине на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 25. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима на притисцима 40-60  $\text{cmH}_2\text{O}$ , док је статистичка значајност забележена на коронарним притисцима од 80 до 120  $\text{cm H}_2\text{O}$  ( $*p < 0,05$ ).



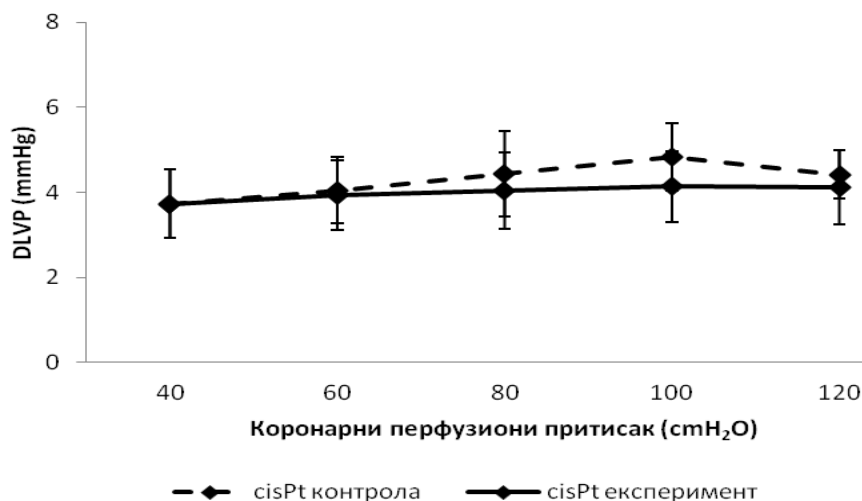
Графикон 25. Ефекти хроничне примене цисплатине на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између контролних и експерименталних услова одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Ефекти хроничне примене цисплатине на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 26. Систолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



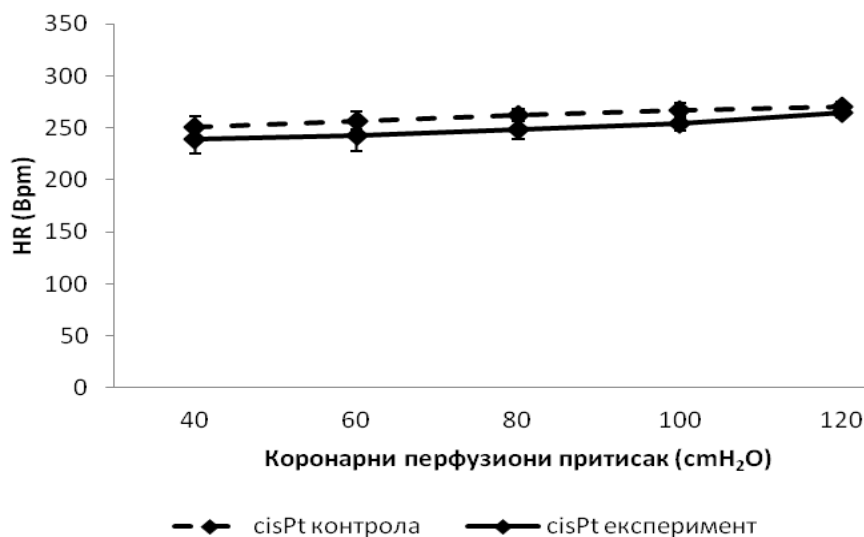
Графикон 26. Ефекти хроничне примене цисплатине на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене цисплатине на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 27. Дијастолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



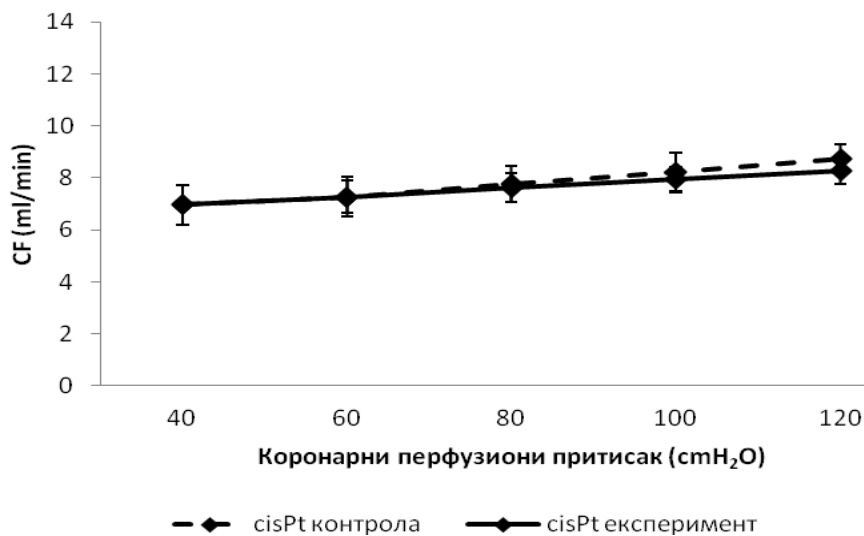
Графикон 27. Ефекти хроничне примене цисплатине на DLVP – дијастолни притисак у левој комори срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене цисплатине на HR – срчану фреквенцу изолоаног срца у котролним и екперименталним услвима представљени су на Графикону 28. Срчана фреквенца се није статистички значајно разликовала ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условим иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 28. Ефекти хроничне примене цисплатине на HR – срчану фреквенцу изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне администрације цисплатине на CF – коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 29. Коронарни проток се није статистички значајно разликовао ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.





Графикон 29. Ефекти хроничне примене цисплатне на CF – коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.5. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

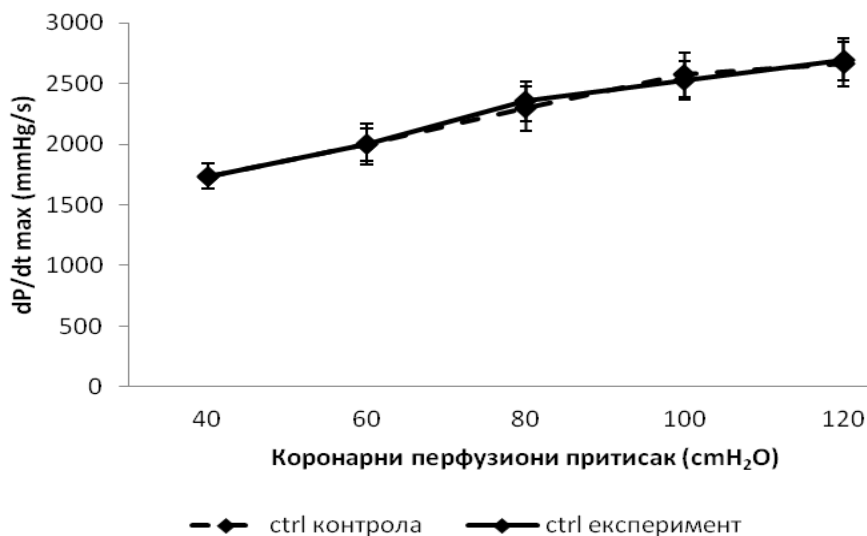
У Табели 9 дате су средње вредности±стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног протока изолованог срца у контролном и експерименталном периоду након интраперитонеалне примене физиолошког раствора. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.

Табела 9. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на параметре кардиодинамике и коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова одређене су Студентовим t тестом.

<i>КПП</i>	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>		<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>		<i>SLVP (mmHg)</i>	
	<i>К</i>	<i>Е</i>	<i>К</i>	<i>Е</i>	<i>К</i>	<i>Е</i>
<b>40</b>	1736,82±102,58	1736,82±102,58	-1114,57±71,06	-1114,57±71,06	54,00±4,06	54,00±4,06
<b>60</b>	2000,27±137,05	1997,05±166,28	-1333,92±90,53	-1358,52±127,53	58,62±2,72	60,83±5,09
<b>80</b>	2293,87±162,75	2354,05±186,65	-1528,62±106,22	-1476,52±99,00	62,52±4,22	65,00±5,47
<b>100</b>	2571,97±157,29	2523,73±183,02	-1650,67±85,99	-1580,58±131,30	68,22±5,05	69,70±6,25
<b>120</b>	2660,75±169,96	2699,02±185,01	-1694,08±74,94	-1728,12±119,32	71,92±5,40	72,43±3,84
<i>КПП</i>	<i>DLVP (mmHg)</i>		<i>HR (bpm)</i>		<i>CF (ml/min)</i>	
	<i>К</i>	<i>Е</i>	<i>К</i>	<i>Е</i>	<i>К</i>	<i>Е</i>
<b>40</b>	4,95±0,59	4,95±0,59	271,95±2,83	271,95±2,83	6,17±0,66	6,17±0,66
<b>60</b>	5,10±0,38	5,13±0,31	285,72±4,95	284,17±6,45	7,07±0,50	7,57±0,65
<b>80</b>	5,32±0,31	5,82±0,33	290,05±6,14	288,35±7,33	8,37±0,60	9,03±0,84
<b>100</b>	5,72±0,58	5,93±0,42	297,87±9,78	295,92±4,43	9,70±0,86	10,27±0,73
<b>120</b>	6,02±0,77	6,22±0,62	304,72±5,57	308,40±4,90	11,23±0,95	11,67±0,83

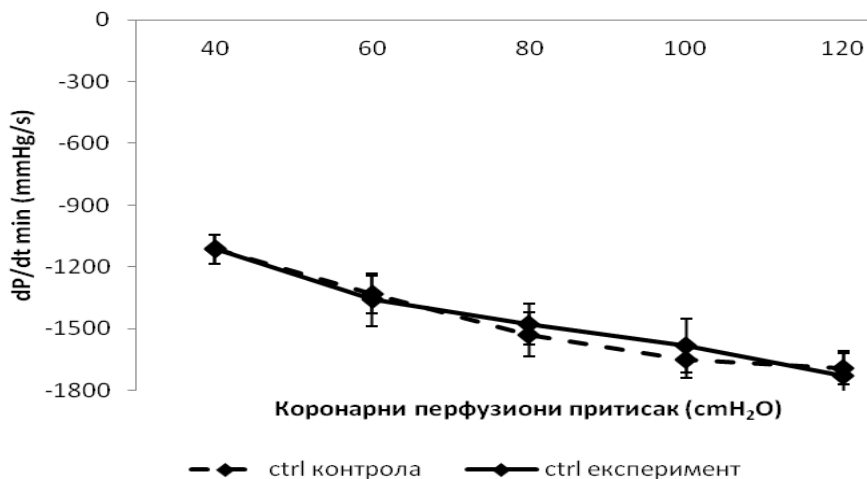
Параметри кардиодинамике нису се статистички значајно разликовали ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима унутар контролне групе приликом промене коронарног перфузионог притиска.

Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 30. Максимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



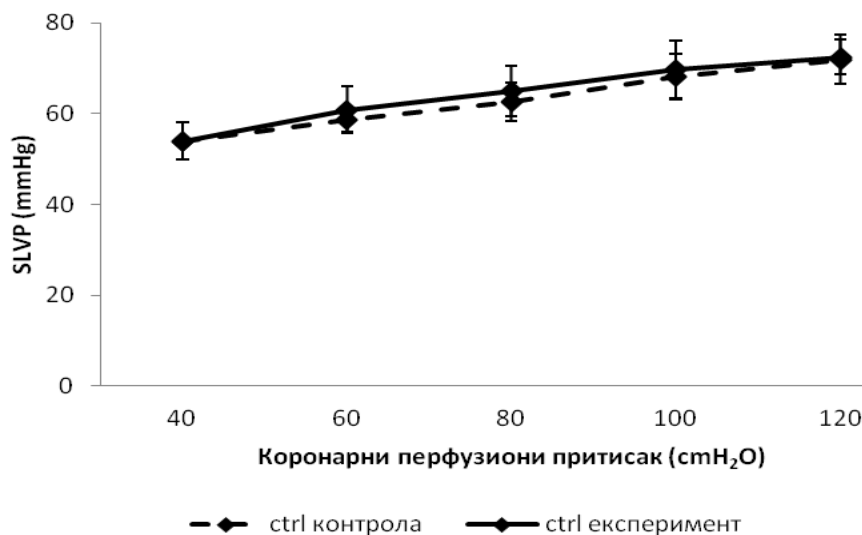
Графикон 30. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца пацова у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 31. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



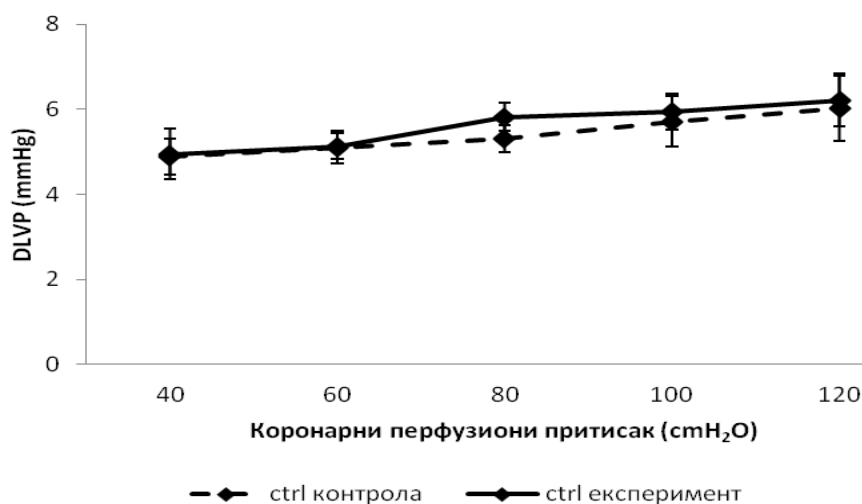
Графикон 31. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолоаног срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 32. Систолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



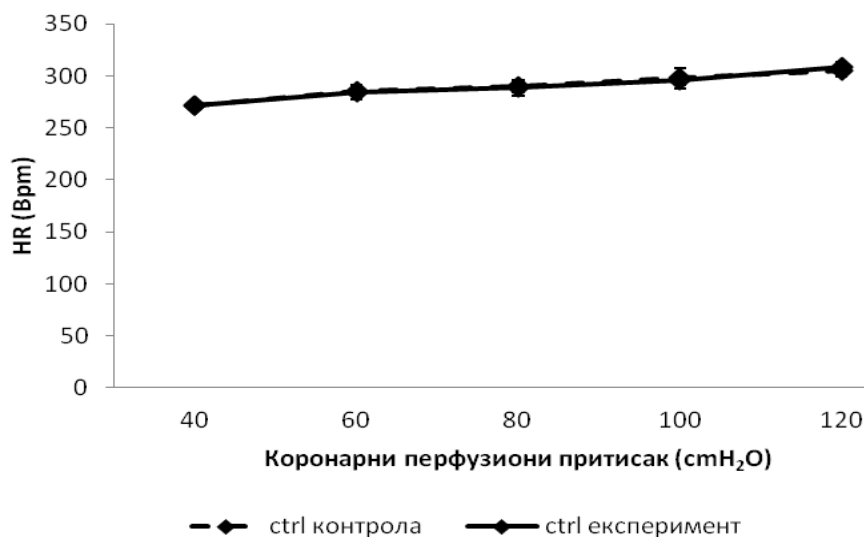
Графикон 32. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на DLVP – дијастолни притисак у левој комори срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 33. Дијастолни притисак у левој комори се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима без обзира на промене вредности коронарног перфузионог притиска.



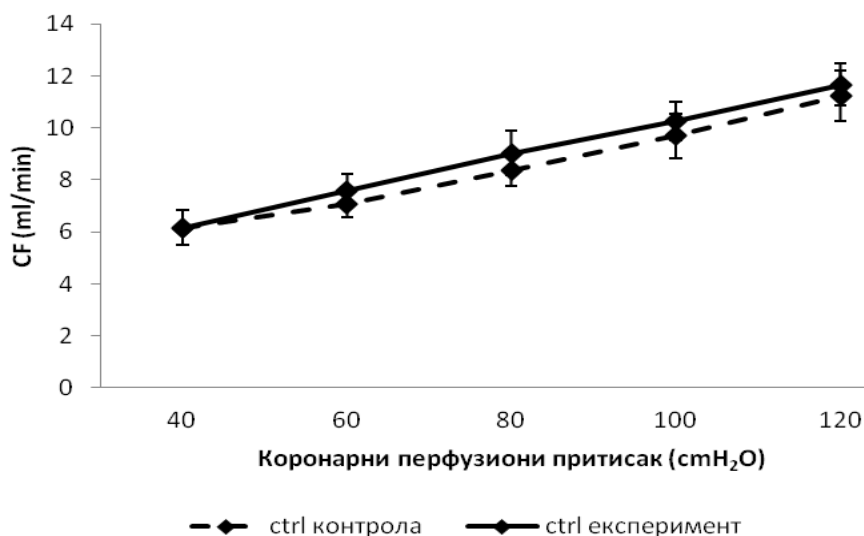
Графикон 33. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца у контролним и експерименталним условим. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на HR – срчану фреквенцу изолованог срца у контролним и експерименталним услоима представљени су на Графикону 34. Срчана фреквенца се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 34. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на HR – срчану фреквенцу изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

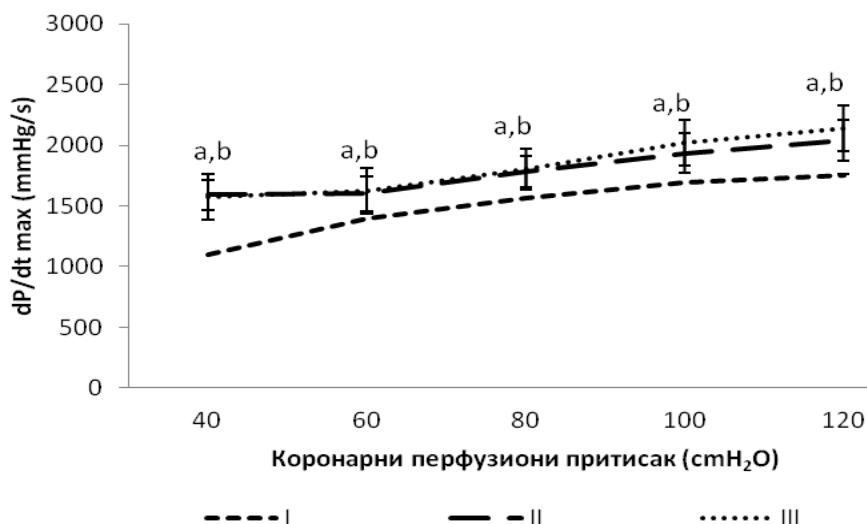
Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на CF – коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 35. Коронарни проток се није статистички значајно разликовао ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако су се вредности коронарног перфузионог притиска мењале.



Графикон 35. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на CF – коронарни проток изолованог срца у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

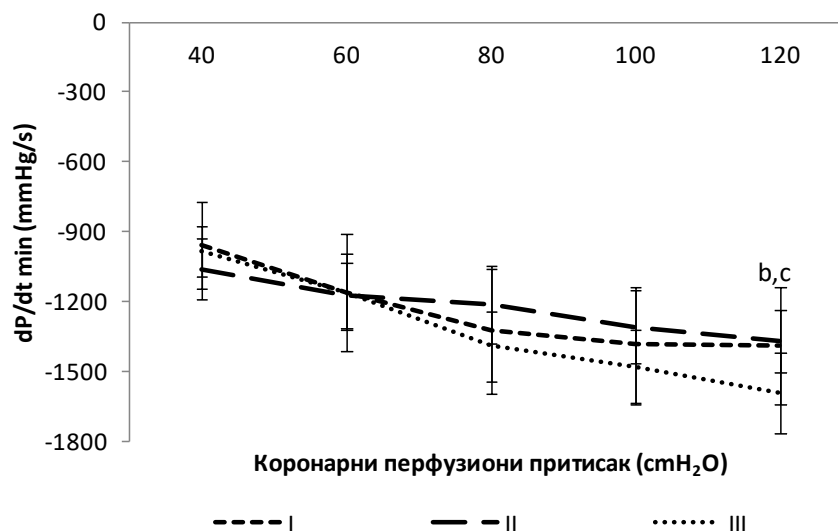
#### 4.2.6. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Поређење ефеката хроничне администрације три комплекса рутенијума (саа етилендиамином, диаминоциклохексаном и бипиридином) на  $dp/dt$  max - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца представљени су на Графикону 36. Максимална стопа развоја притиска у левој комори се статистички значајно разликовала ( $p < 0,05$ ) између ове три групе на свим коронарним перфузионим притисцима. Уочили смо статистички значајно веће вредности параметра  $dp/dt$  max у II и III групи у односу на I групу на КПП 40-120  $cmH_2O$ . Вредности  $dp/dt$  max између II и III групе се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) на свим коронарним перфузионим притисцима.



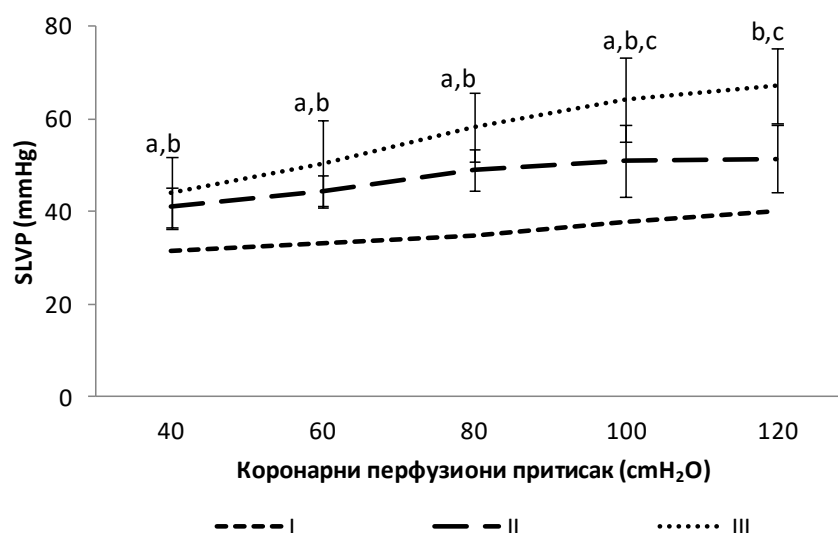
Графикон 36. Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на  $dp/dt$  max - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на  $dp/dt$  min - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца представљени су на Графикону 37. Минимална стопа развоја притиска у левој комори се није статистички значајно разликовала ( $p > 0,05$ ) између ове три групе, осим што је дошло до статистички значајног повећања вредности параметра  $dp/dt$  min у I и II групи у односу на III групу на КПП од 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ).



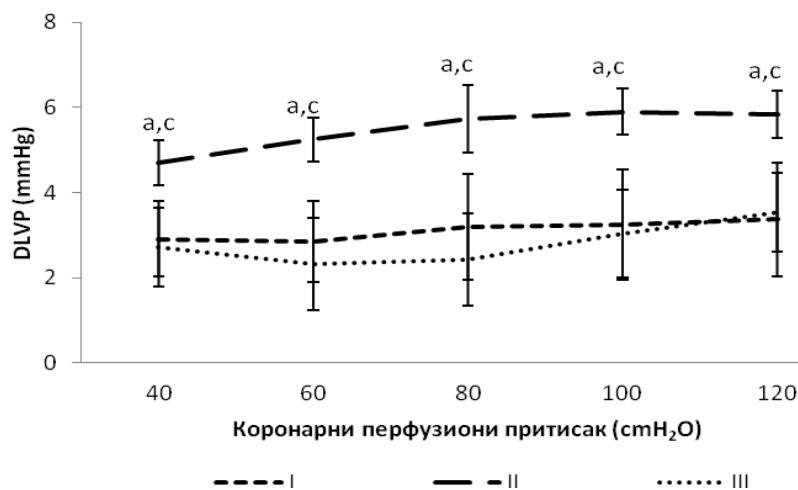
Графикон 37. Поредица ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолваног срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим перфузионим притисцима утврђене су тестом *ANOVA* и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

Поредица ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца представљени су на Графикону 38. Сиистолни притисак у левој комори је био статистички значајно већи у II и III групи у односу на I групу ( $p < 0,05$ ) на скоро свим коронарним перфузионим притисцима (40-80 cmH<sub>2</sub>O). На КПП 100 cmH<sub>2</sub>O вредности SLVP су се статистички значајно разликовале између свих група, са највишим вредностима у III групи ( $p < 0,05$ ), док је на КПП 120 cmH<sub>2</sub>O дошло до повећања вредности SLVP у III групи у односу на I и II групу ( $p < 0,05$ ).



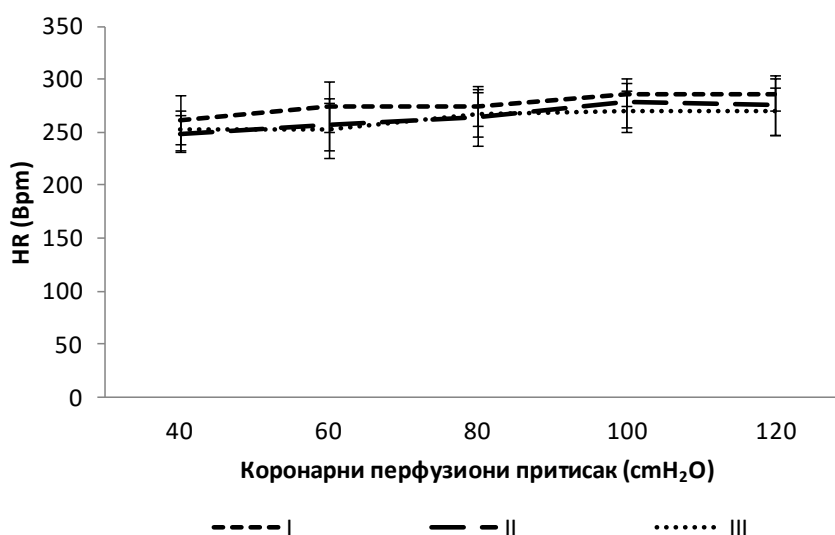
Графикон 38. Поредица ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима утврђене су тестом *ANOVA* и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца пацова представљени су на Графикону 39. Вредности дијастолног притиска у левој комори су биле статистички значајно веће у II групи у односу на I и III групу ( $p < 0,05$ ) на свим коронарним перфузионим притисцима (40-120 cmH<sub>2</sub>O).



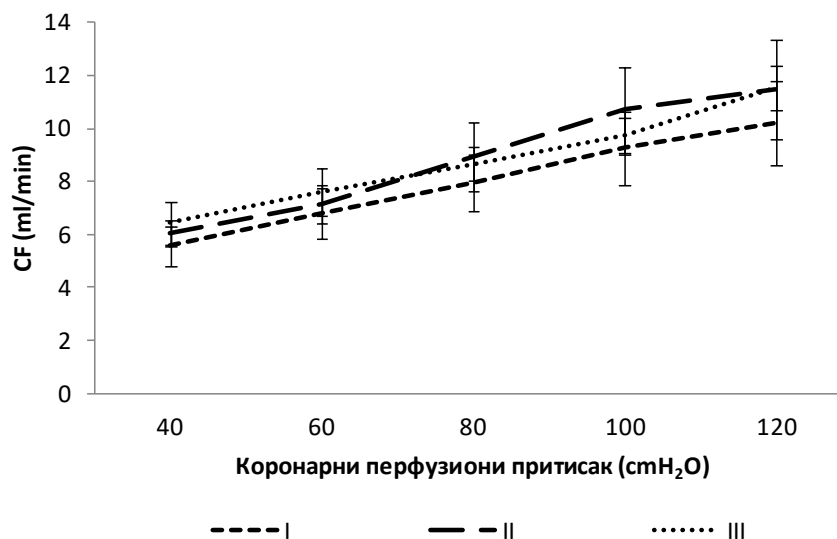
Графикон 39. Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистичка значајност ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузиооним притисцима утврђена је тестом ANOVA и приказана словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на HR – срчану фреквенцу изолованог срца пацова приказани су на Графикону 40. Вредности срчаане фреквенце нису се статистички значајно разловале међу групама ( $p > 0,05$ ) на свим коронарним притисцима.



Графикон 40. Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на HR – срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистчки значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим перфузионим притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на CF – коронарни проток изолованог срца пацова приказани су на Графикону 41. Вредности коронарног протока нису се статистички значјно разликовал међу групама ( $p > 0,05$ ) на свим коронарним притисцима.



Графикон 41. Поређење ефеката хроничне примене три комплекса рутенијума на CF – коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – II vs III.

#### 4.2.7. Поређење ефеката хроничне примене свих испитиваних једињења на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

У Табели 10 дате су средње вредности ± стандардне девијације свих кардиодинамских параметара, као и коронарног пртока изолованог срца након интраперитонеалне примене свих испитиваних супстанци у овој студији. У наставку текста ови резултати су приказани и графички за сваки појединачни параметар.



Табела 10. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на све параметре кардиодинамике и коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Групе	КПП	dp/dt max (mmHg/s)	dp/dt min (mmHg/s)	SLVP (mmHg)	DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (ml/min)
<b>I</b>	40	1101.83 ± 108.21	-956.25 ± 188.21	31.52 ± 6.09	2.92 ± 0.88	261.62 ± 22.88	5.57 ± 0.75
	60	1400.12 ± 235.43	-1159.33 ± 254.02	33.23 ± 6.79	2.85 ± 0.95	274.30 ± 23.72	6.80 ± 0.94
	80	1567.50 ± 280.60	-1325.17 ± 266.12	34.83 ± 7.38	3.20 ± 1.25	275.08 ± 19.16	7.97 ± 1.05
	100	1690.67 ± 252.72	-1384.60 ± 250.95	37.80 ± 8.18	3.25 ± 1.30	286.12 ± 11.28	9.27 ± 1.40
	120	1757.17 ± 280.28	-1385.33 ± 25.23	40.05 ± 7.95	3.37 ± 1.34	286.22 ± 15.46	10.20 ± 1.61
<b>II</b>	40	1590.87 ± 127.52	-1058.88 ± 131.44	41.00 ± 4.21	4.70 ± 0.52	248.95 ± 17.73	6.03 ± 0.94
	60	1599.37 ± 127.52	-1171.92 ± 143.35	44.28 ± 3.47	5.25 ± 0.52	257.27 ± 24.54	7.13 ± 0.71
	80	1781.85 ± 127.65	-1211.92 ± 168.45	49.05 ± 4.49	5.73 ± 0.79	263.78 ± 26.97	8.93 ± 1.31
	100	1933.25 ± 164.48	-1307.92 ± 157.02	50.97 ± 7.70	5.92 ± 0.55	278.32 ± 23.34	10.70 ± 1.63
	120	2033.68 ± 169.29	-1368.07 ± 130.80	51.45 ± 7.19	5.83 ± 0.56	276.18 ± 27.95	11.50 ± 1.88
<b>III</b>	40	1570.52 ± 188.28	-981.95 ± 107.37	44.08 ± 7.81	2.72 ± 0.43	252.45 ± 18.45	6.43 ± 0.80
	60	1624.07 ± 189.98	-1156.30 ± 163.91	50.48 ± 9.14	2.32 ± 1.08	252.15 ± 26.11	7.60 ± 0.88
	80	1800.87 ± 171.87	-1390.63 ± 151.08	58.15 ± 7.42	2.43 ± 1.09	267.37 ± 20.71	8.67 ± 0.64
	100	2016.68 ± 188.12	-1480.52 ± 161.25	64.28 ± 9.03	3.03 ± 1.03	269.93 ± 19.60	9.73 ± 0.69
	120	2141.67 ± 190.76	-1588.33 ± 172.09	67.23 ± 8.15	3.53 ± 0.93	270.13 ± 22.26	11.53 ± 0.85
<b>cisPt</b>	40	1395.02 ± 63.35	-1037.62 ± 51.18	32.43 ± 2.46	3.73 ± 0.80	250.78 ± 10.34	6.97 ± 0.75
	60	1506.88 ± 62.46	-1069.70 ± 166.64	34.23 ± 3.46	3.93 ± 0.82	257.00 ± 8.65	7.27 ± 0.76
	80	1570.07 ± 56.11	-1202.93 ± 132.94	37.32 ± 3.08	4.05 ± 0.90	262.23 ± 5.78	7.77 ± 0.70
	100	1677.65 ± 54.44	-1324.45 ± 74.52	36.45 ± 3.98	4.13 ± 0.83	266.9 ± 7.34	8.23 ± 0.73
	120	1739.88 ± 28.16	-1435.78 ± 83.28	39.08 ± 2.63	4.12 ± 0.87	270.42 ± 5.13	8.73 ± 0.55
<b>ctrl</b>	40	1736.82 ± 102.58	-1114.57 ± 71.06	54.00 ± 4.06	4.95 ± 0.59	271.95 ± 2.83	6.17 ± 0.66
	60	1997.05 ± 166.28	-1358.52 ± 127.53	60.83 ± 5.09	5.13 ± 0.31	284.17 ± 6.45	7.57 ± 0.65
	80	2354.05 ± 186.65	-1476.52 ± 99.00	65.00 ± 5.47	5.82 ± 0.33	288.35 ± 7.33	9.03 ± 0.84
	100	2523.73 ± 183.02	-1580.58 ± 131.30	69.70 ± 6.25	5.93 ± 0.42	295.92 ± 4.43	10.27 ± 0.73
	120	2699.02 ± 185.01	-1728.12 ± 119.32	72.43 ± 3.84	6.22 ± 0.62	308.40 ± 4.90	11.67 ± 0.83

Параметри кардиодинамике и коронарног протока су се статистички значајно разликовали ( $p < 0,05$ ) између скоро свих експерименталних група приликом промене коронарног перфузионог притиска од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O. У наредним табелама (Табеле 11-13) следи упоредни приказ статистичких значајности између група пацова које су третиране комплексима рутенијума са групом која је третирана цисплатином (као позитивна контрола), и групом која је добијала физиолошки расвор (као негативна контрола).

Табела 11. Упоредне вредности статистичке значајности свих параметара кардиодинамике изолованог срца пацова међу групама комплекса рутенијума (I, II, III) и цисплатине. Статистички значајне разлике међу групама утврђене су тестом ANOVA, са нивоом значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ).

КПП	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>			<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>			<i>SLVP (mmHg)</i>		
	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt
40	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
60	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
80	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
100	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
120	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
КПП	<i>DLVP (mmHg)</i>			<i>HR (bmp)</i>			<i>CF (ml/min)</i>		
	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt	I vs cisPt	II vs cisPt	III vs cisPt
40	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
60	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
80	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
100	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
120	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

Упоредивањем ефеката комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатине нисмо уочили статистички значајне разлике у вредностима ни за један параметар кардиодинамике ( $p > 0,05$ ), док су статистички значајне разлике између комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатине уочене за вредности параметара  $dp/dt \max$  (при КПП 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ), SLVP и DLVP (при КПП 80-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ). Статистички значајне разлике између комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине примећене су код параметара  $dp/dt \max$  (при КПП 100-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ), SLVP (на свим КПП 40-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ), DLVP (при КПП 60  $\text{cmH}_2\text{O}$ ), као и код CF (при КПП 100-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ). Параметри  $dp/dt \min$  и срчана фреквенца се нијесу статистички значајно разликовали када смо поредили ефекте примене сва три комплекса рутенијума и цисплатине, без обзира на промену КПП ( $p > 0,05$ ).

Табела 12. Упоредне вредности статистичке значајности свих параметара кардиодинамике изолованог срца пацова међу групама комплекса рутенијума (I, II, III) и контроле. Статистичка значајност међу групама утврђена је тестом ANOVA, са нивоом значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ).

КПП	<i>dp/dt max (mmHg/s)</i>			<i>dp/dt min (mmHg/s)</i>			<i>SLVP (mmHg)</i>		
	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl
40	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
60	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
80	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
100	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
120	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
КПП	<i>DLVP (mmHg)</i>			<i>HR (bpm)</i>			<i>CF (ml/min)</i>		
	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl	I vs ctrl	II vs ctrl	III vs ctrl
40	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
60	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
80	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
100	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
120	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

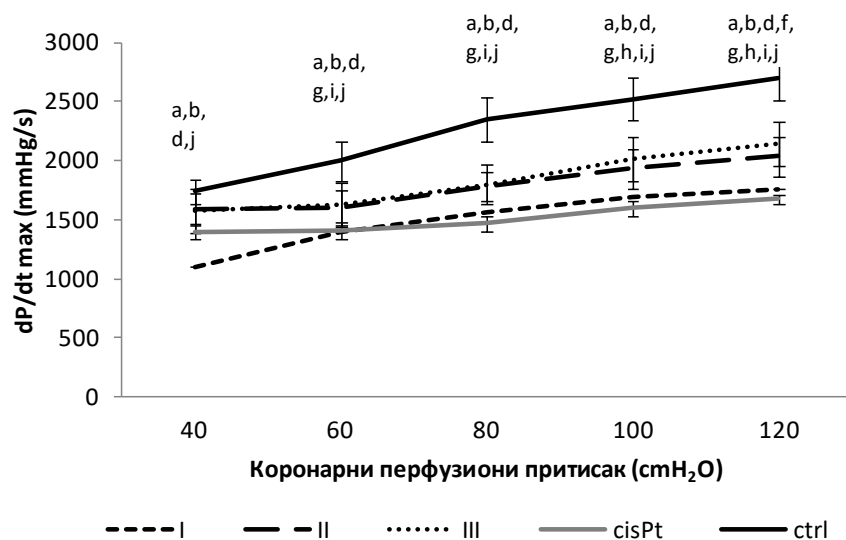
Упоређивањем ефеката комплекса рутенијума са етилендиамином и физиолошког раствора уочили смо статистички значајне разлике у вредностима  $dp/dt$  max, SLVP и DLVP на свим КПП, као и за  $dp/dt$  min на КПП од 80 до 120 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). За параметре HR и CF није уочена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ). Статистички значајне разлике између комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и физиолошког раствора уочене су за вредности параметара  $dp/dt$  max (при КПП 60-120 cmH<sub>2</sub>O),  $dp/dt$  min (при КПП 80-120 cmH<sub>2</sub>O) и SLVP на свим вредностима КПП. Није постојала статистички значајна разлика за DLVP, HR и CF ( $p > 0,05$ ). Статистички значајне разлике између комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора примећене су код параметара  $dp/dt$  max (при КПП 60-120 cmH<sub>2</sub>O), SLVP (на 40 cmH<sub>2</sub>O) и DLVP (на свим КПП), док се параметри  $dp/dt$  min, HR и CF нису статистички значајно разликовали без обзира на промену КПП ( $p > 0,05$ ).

Табела 13. Упоредне вредности статистичке значајности свих параметара кардиодинамике изолованог срца пацова између група цисплатине и контроле. Статистички значајне разлике међу групама утврђене су тестом *ANOVA*, са нивоом значајности од 0,05 (**p< 0,05**).

<i>KПП</i>	<i>dp/dt max</i> ( <i>mmHg/s</i> )	<i>dp/dt min</i> ( <i>mmHg/s</i> )	<i>SLVP</i> ( <i>mmHg</i> )	<i>DLVP</i> ( <i>mmHg</i> )	<i>HR (bmp)</i>	<i>CF (ml/min)</i>
	<b>cisPt vs ctrl</b>	<b>cisPt vs ctrl</b>	<b>cisPt vs ctrl</b>	<b>cisPt vs ctrl</b>	<b>cisPt vs ctrl</b>	<b>cisPt vs ctrl</b>
<b>40</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	p>0,05	<b>p&lt;0,05</b>	p>0,05
<b>60</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>80</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	p>0,05
<b>100</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>120</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>	p>0,05	<b>p&lt;0,05</b>

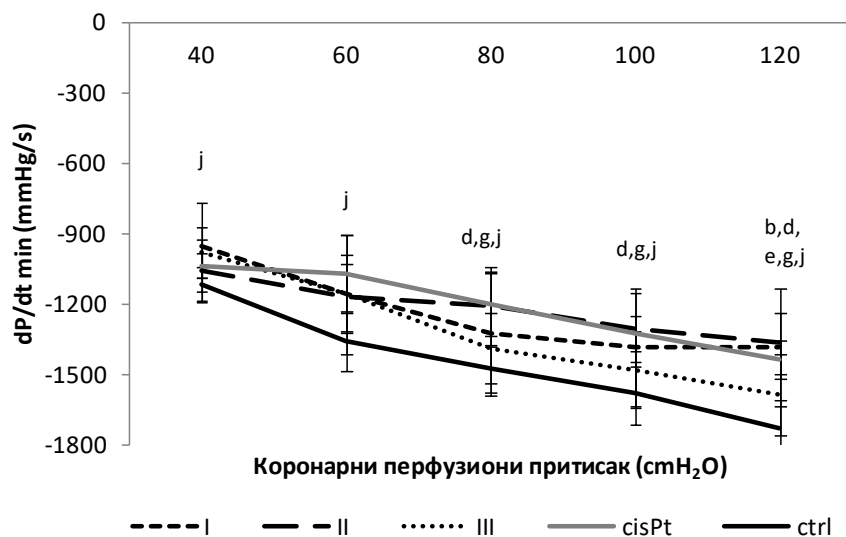
Поређењем ефеката хроничне интраперитонеалне примене цисплатине и физиолошког раствора код пацова уочили смо статистички значајна разлике у вредности параметара кардиодинамике *dp/dtmax*, *dp/dt min* и *SLVP* при свим вредностима *KПП*, док су за остале параметре статистички значајне разлике постојале само на одређеним *KПП*: *DLVP* (при *KПП* 80-120 *cmH<sub>2</sub>O*), *HR* (при *KПП* 40, 80 и 100 *cmH<sub>2</sub>O*) и *CF* (при *KПП* 100-120 *cmH<sub>2</sub>O*) (**p<0,05**).

На Графикону 42 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на *dp/dt max* - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Уочене су статистички значајне разлике између група на свим вредностима коронарног перфузионог притиска. Све значајности (**p<0,05**) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 36.



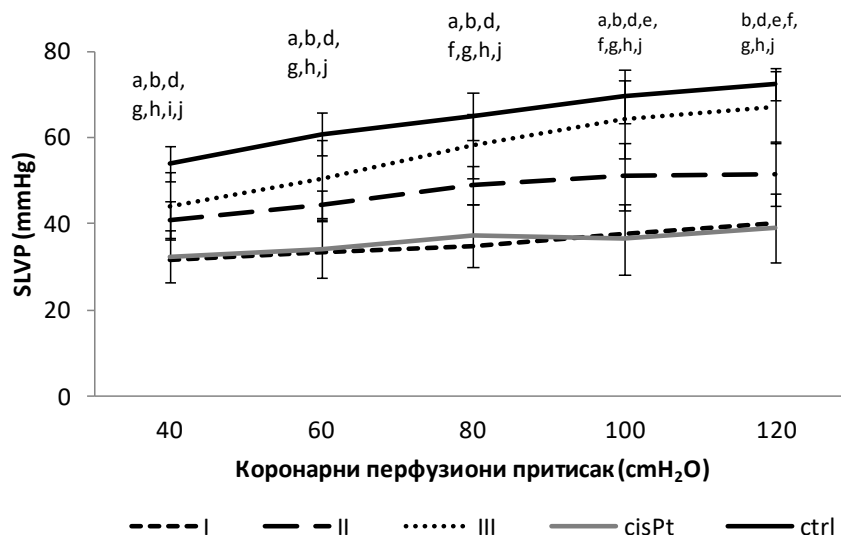
Графикон 42. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на  $dp/dt$  max - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистичка значајност ( $p < 0,05$ ) међу групама на различитим коронарним притисцима утврђена је тестом ANOVA и приказана словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

На Графикону 43 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на  $dp/dt$  min - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Уочене су статистички значајне разлике између група на свим вредностима коронарног перфузионог притиска. Све значајности ( $p < 0,05$ ) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 37.



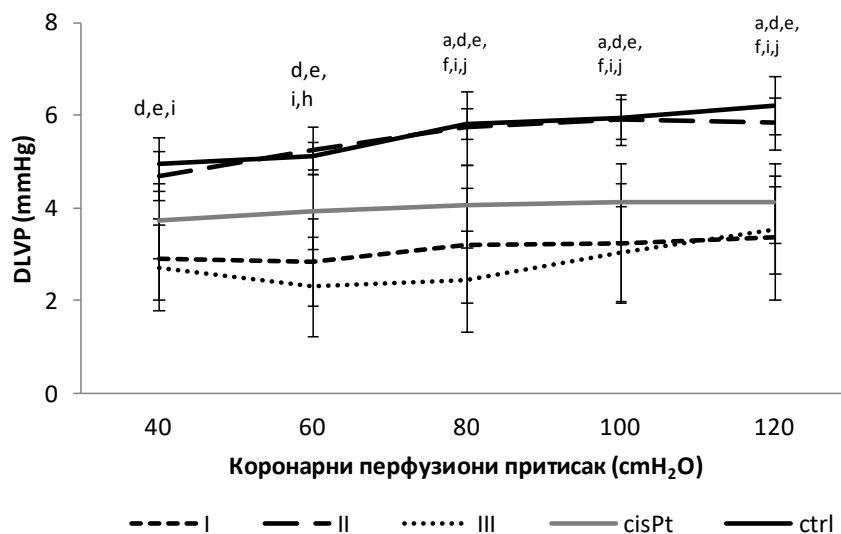
Графикон 43. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на  $dp/dt$  min - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на коронарним перфузионим притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

На Графикону 44 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца. Уочене су статистички значајне разлике између група на свим вредностима коронарног перфузионог притиска. Све значајности ( $p < 0,05$ ) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 38.



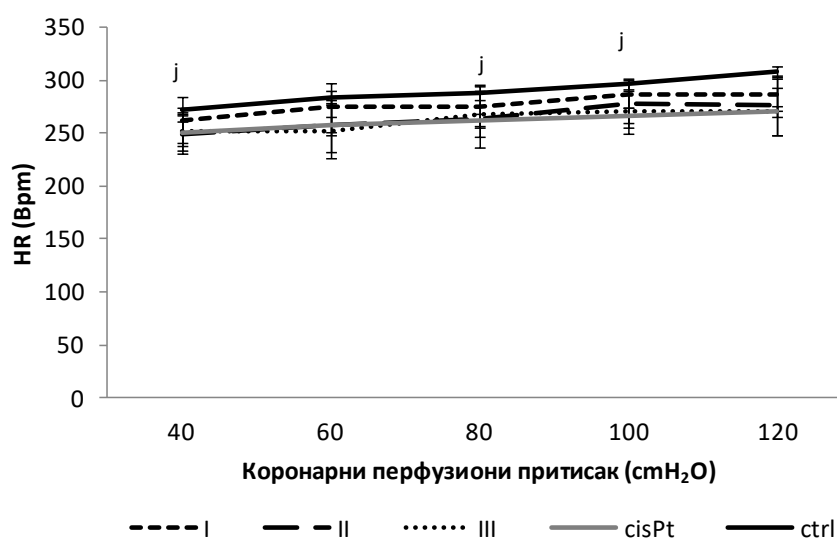
Графикон 44. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на SLVP – систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

На Графикону 45 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Уочене су статистички значајне разлике између група на свим вредностима коронарног перфузионог притиска. Све значајности ( $p < 0,05$ ) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 39.



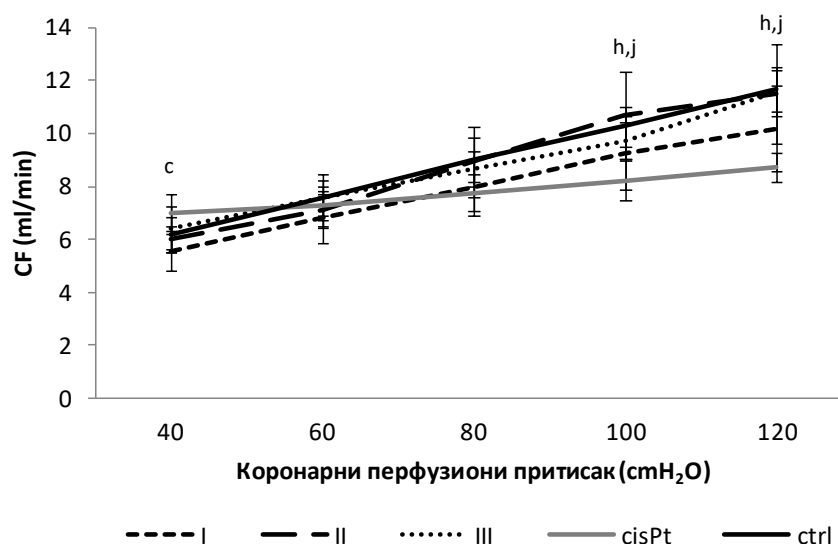
Графикон 45. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на DLVP – дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

На Графикону 46 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на HR – срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Уочене су статистички значајне разлике међу групама на вредностима коронарног перфузионог притиска од 40, 80 и 100 cmH<sub>2</sub>O. Све значајности ( $p < 0,05$ ) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 40.



Графикон 46. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на HR – срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионог притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

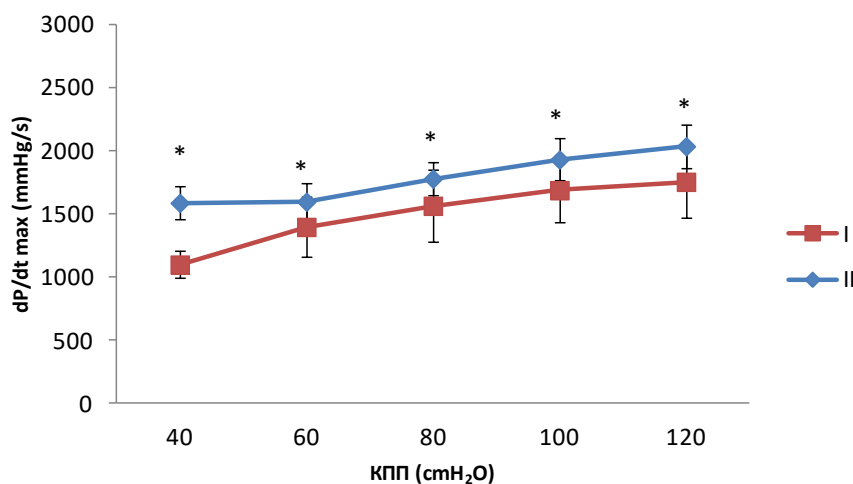
На Графикону 47 приказано је поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних једињења на CF – коронарни проток изолованог срца пацова. Уочене су статистички значајне разлике између група на вредностима коронарног перфузионог притиска од 40, 100 и 120 cmH<sub>2</sub>O. Све значајности ( $p < 0,05$ ) између група наведене су у претходним табелама (Табеле 11-13), као и на Графикону 41.



Графикон 47. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на CF – коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима утврђене су тестом ANOVA и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

#### 4.2.8. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Хронични третман комплексом рутенијума са диаминоциклохексаном довео је до статистички значајног пораста вредности  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 48).

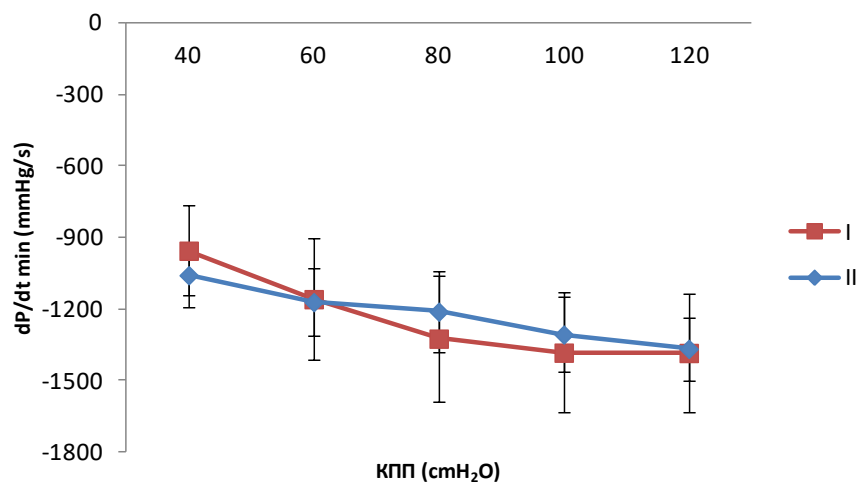


Графикон 48. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су



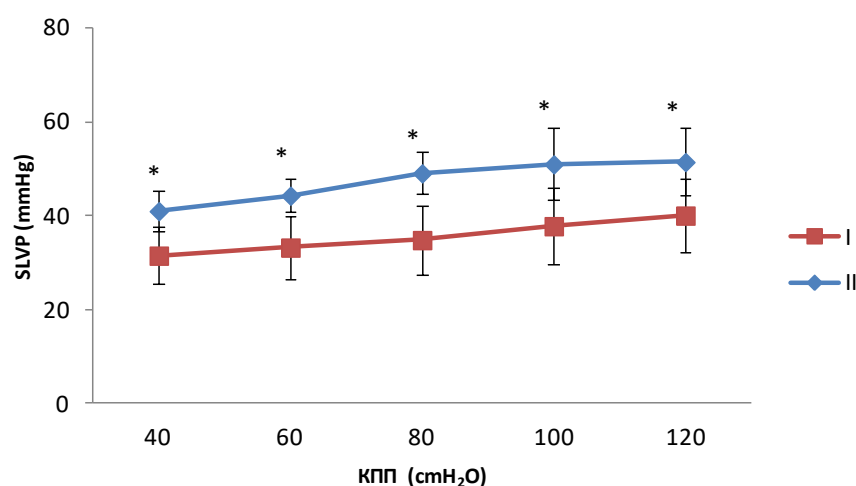
представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездicom \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном нису уочене статистички значајне разлике за параметар  $dp/dt \text{ min}$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 49).



Графикон 49. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

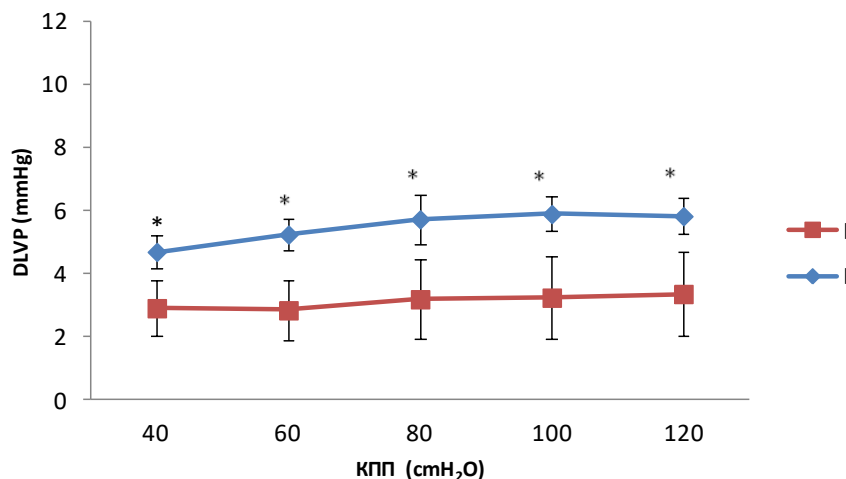
Хронична примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном довела је до статистички значајног пораста вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 50).



Графикон 50. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на SLVP-систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистичка значајност ( $p < 0,05$ ) између

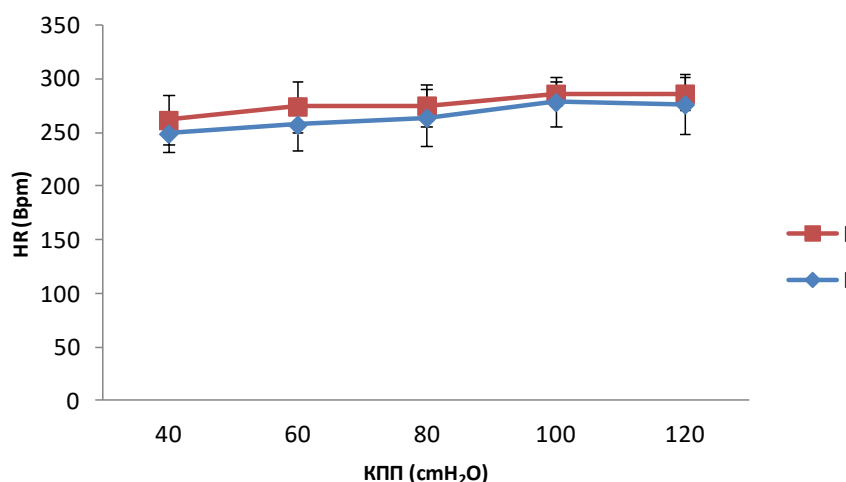
група на различитим коронарним перфузионим одређена је Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Исти тренд уочен је и код параметра DLVP (Графикон 51).



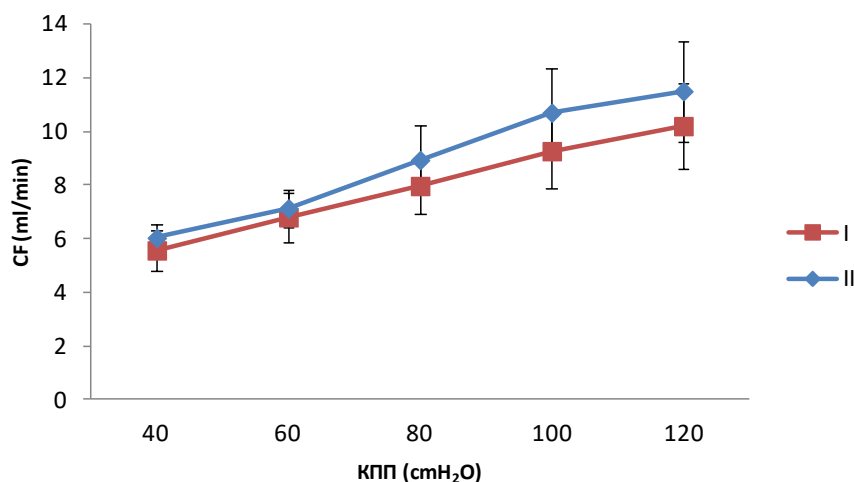
Графикон 51. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на DLVP-дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном нису уочене статистички значајне разлике за параметар HR на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 52).



Графикон 52. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на HR-срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

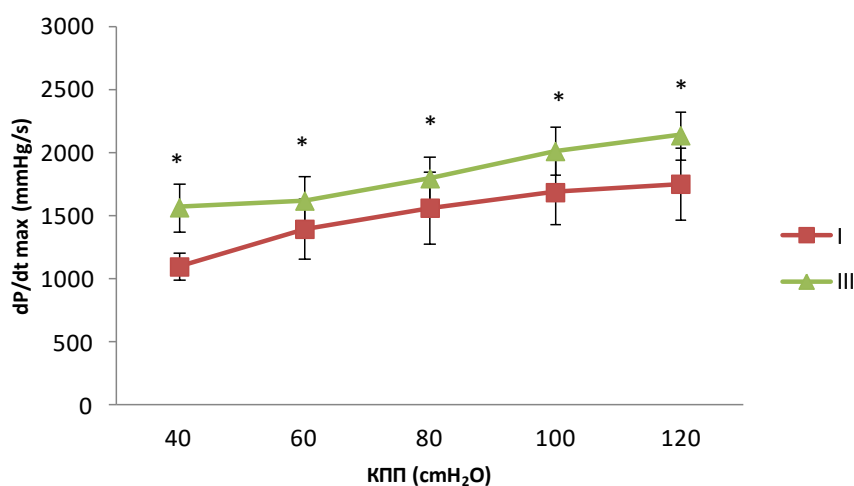
Исти тренд примећен је и за параметар CF (Графикон 53).



Графикон 53. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на CF-коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.9. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

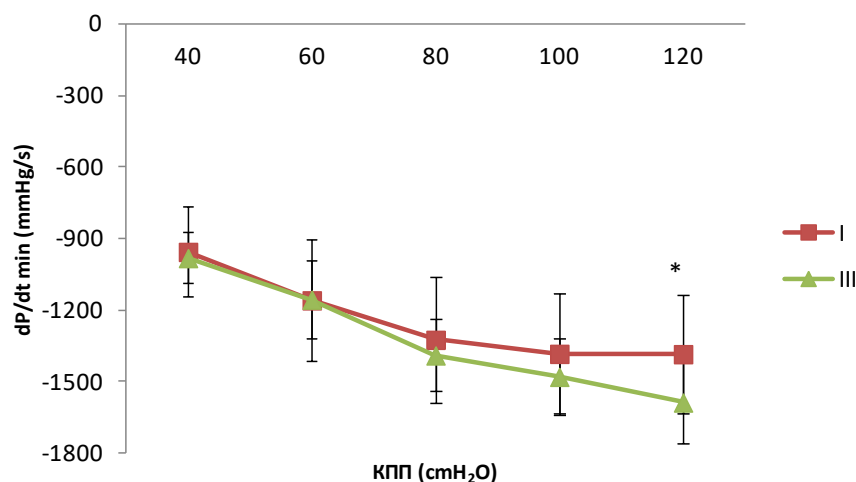
Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином изазвала је статистичк значајан пораст вредности  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним притисцима у односу на примену комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 54).



Графикон 54. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички

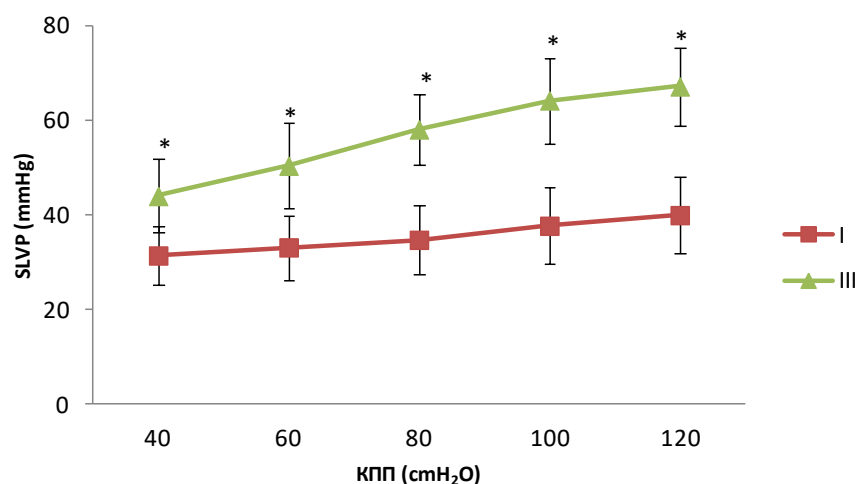
значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездicom \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са бипиридином нису уочене статистички значајне разлике за параметар  $dp/dt \min$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ), на КПП 120  $\text{cmH}_2\text{O}$  ( $p < 0,05$ ) (Графикон 55).



Графикон 55. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездicom \*.

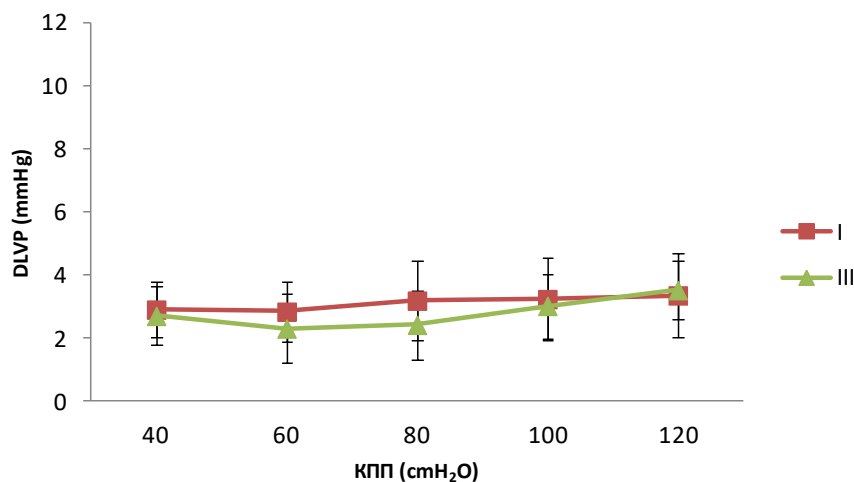
Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином довела је до статистички значајног пораста вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 56).



Графикон 56. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) међу

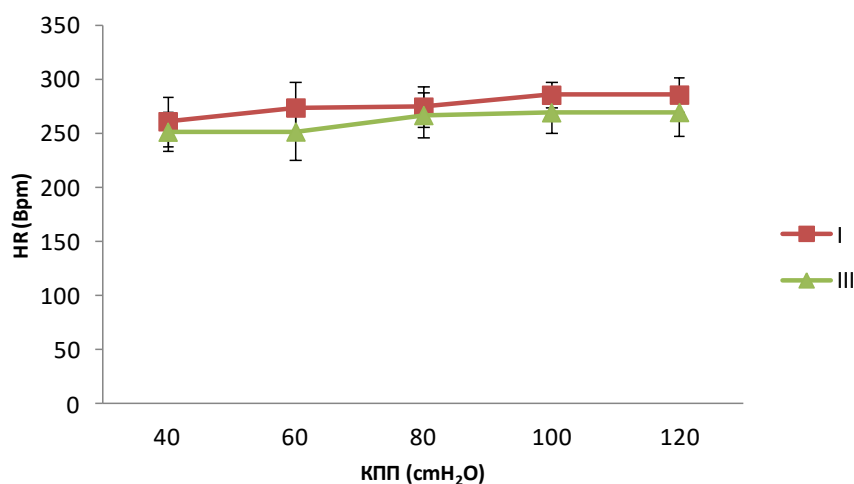
групама на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и комплекса рутенијума са бипиридином нису уочене статистички значајне разлике за параметар DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 57).

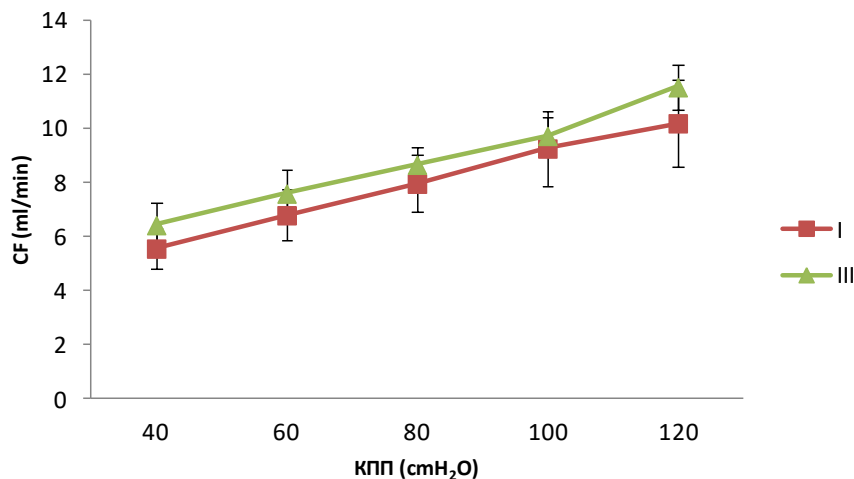


Графикон 57. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Исти тренд уочен је и за параметре HR (Графикон 58) и CF (Графикон 59).



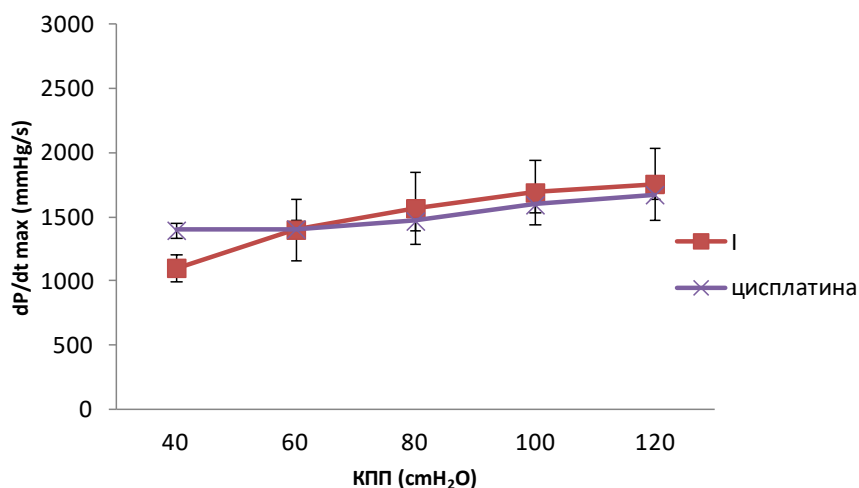
Графикон 58. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на HR- срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 59. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

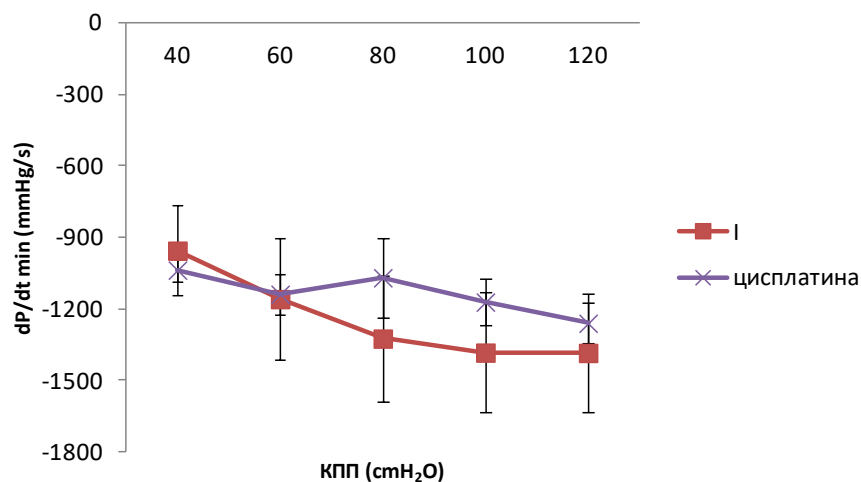
#### 4.2.10. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Поредицањем ефеката хроничне администрације комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатине није уочена статистички значајност у вредностима  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 60).

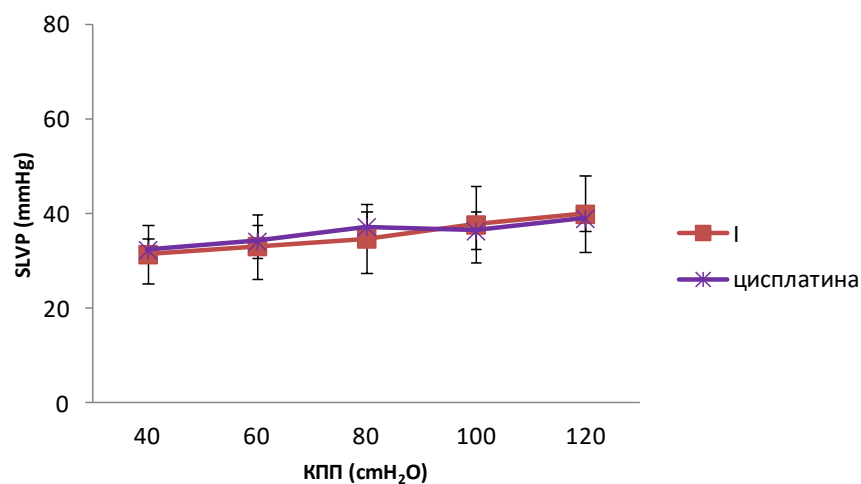


Графикон 60. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и цисплатине (cisPt) на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

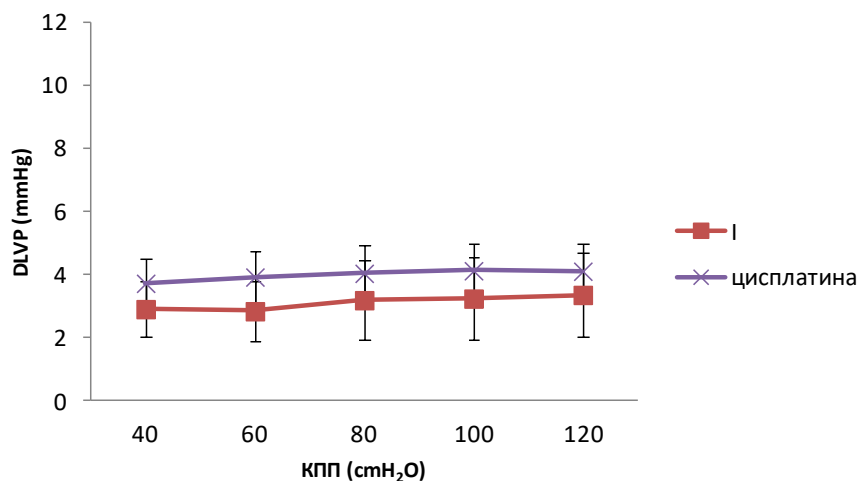
Исти тренд се запажа и за параметре  $dp/dt \text{ min}$  (Графикон 61), SLVP (Графикон 62), DLVP (Графикон 63) и HR (Графикон 64).



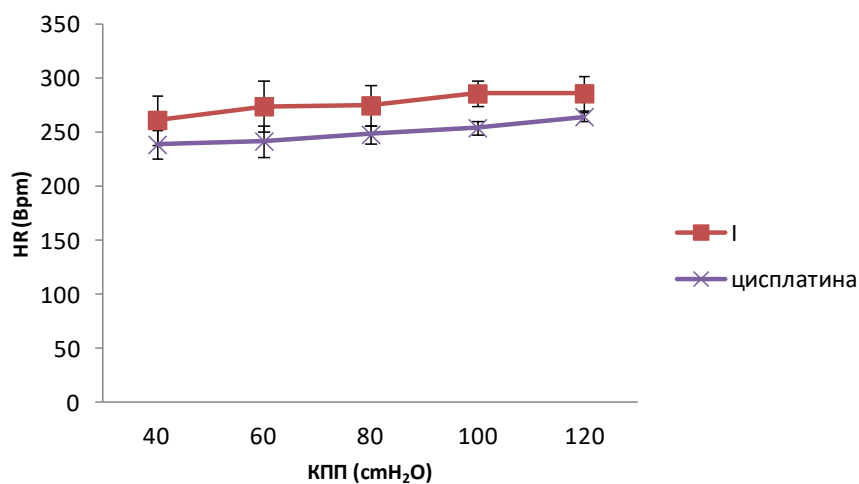
Графикон 61. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и цисплатине (cisPt) на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 62. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и цисплатине (cisPt) на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



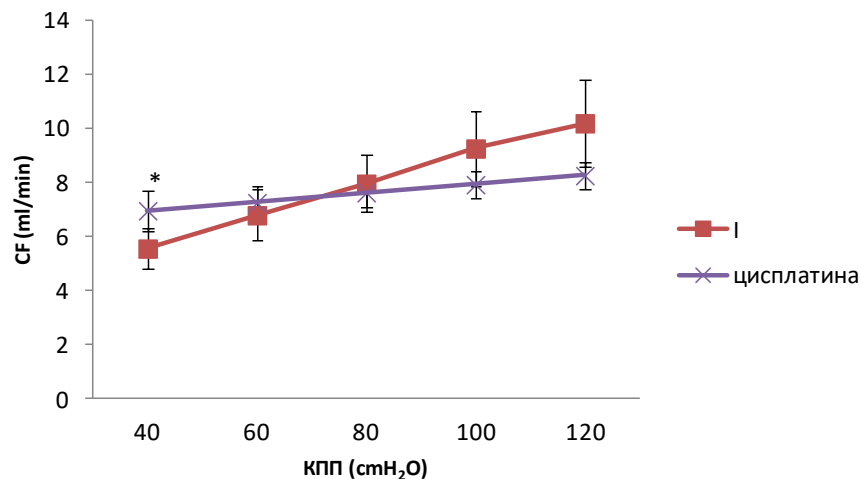
Графикон 63. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и цисплатине (cisPt) на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изолоаног срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 64. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и цисплатине (cisPt) на HR- срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином није довела до статистички значајног снижења вредности коронарног протока у поређењу са применом цисплатине, осим на коронарном перфузионом притиску 40 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ) (Графикон 65).

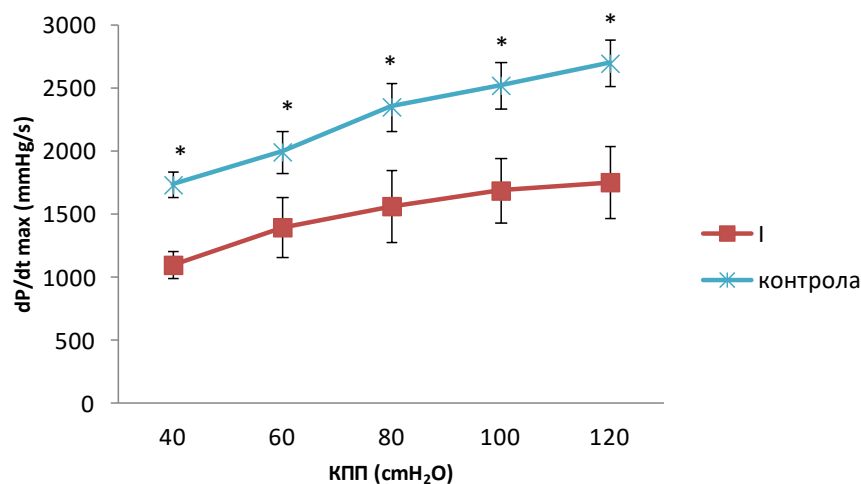




Графикон 65. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

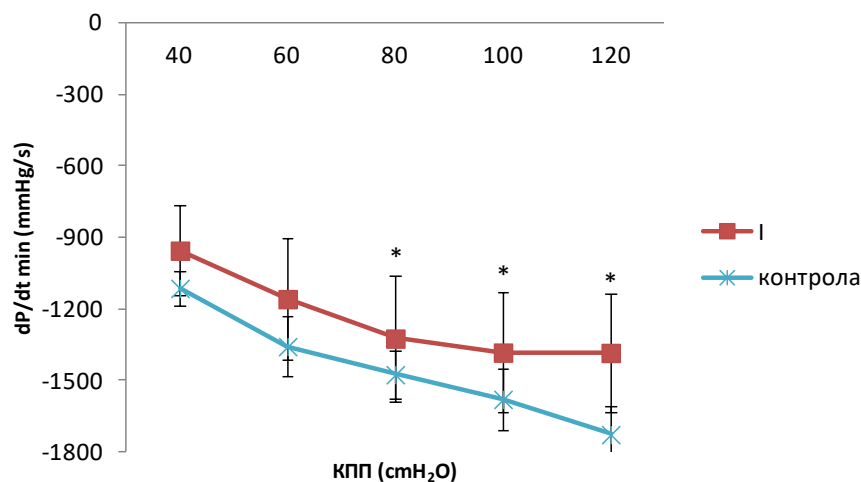
#### 4.2.11. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и физиолошког раствора на кардионамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином изазвала је статистички значајно снижење  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 66).



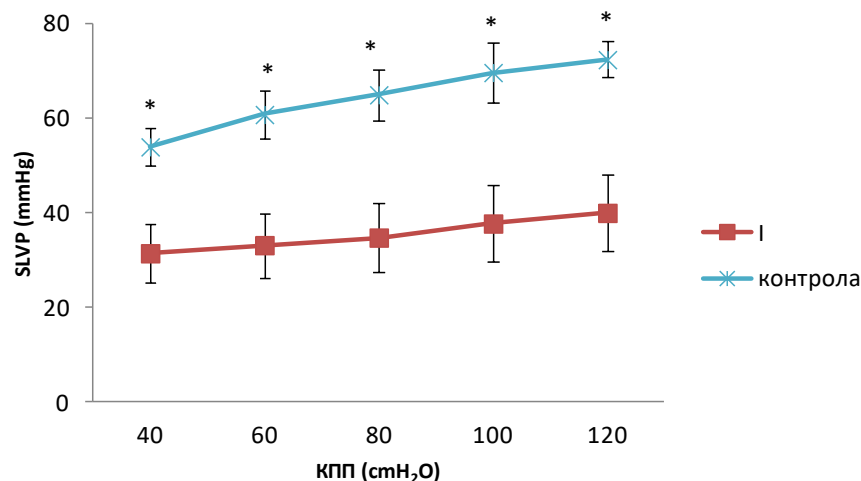
Графикон 66. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притисака у левој комри изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

Исти тренд се запажа и за вредности  $dp/dt_{min}$ , али само при КПП од 80 до 120  $cmH_2O$  ( $p < 0,05$ ) (Графикон 67).



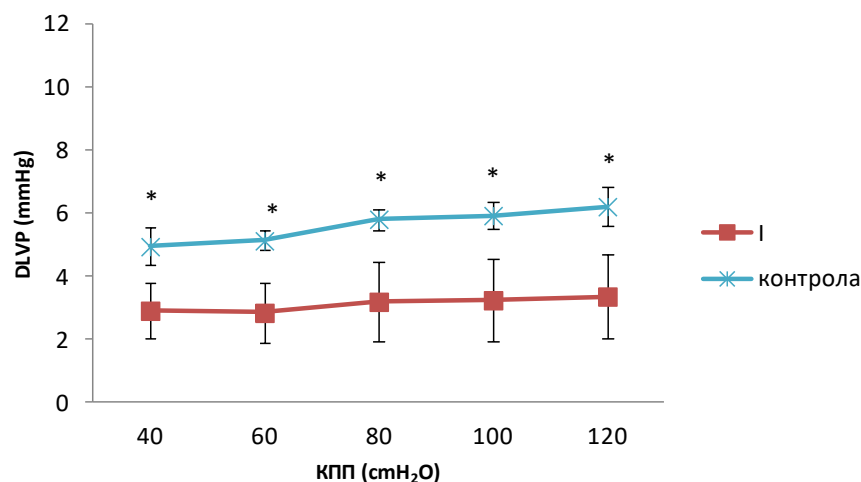
Графикон 67. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на  $dp/dt_{min}$  - минималну стопу развоја притисака у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездичом \*.

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином довела је до статистички значајног снижења вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 68).



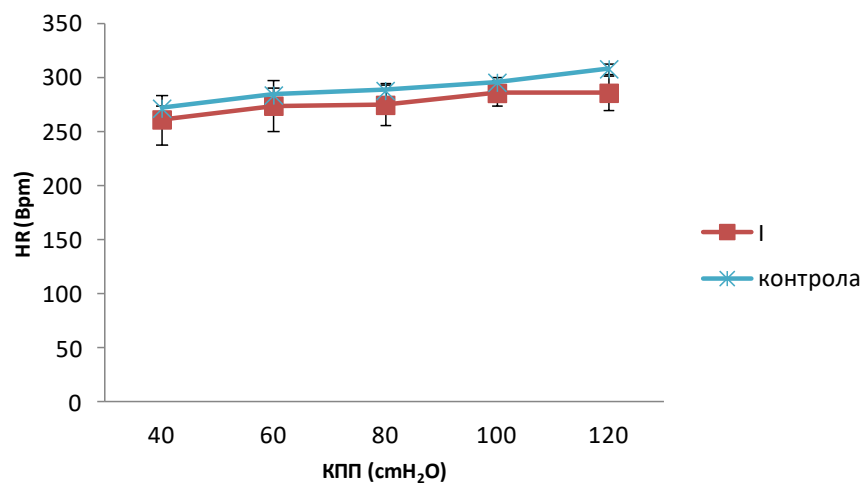
Графикон 68. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездичом \*.

Исти тренд уочен је и за параметар DLVP (Графикон 69).

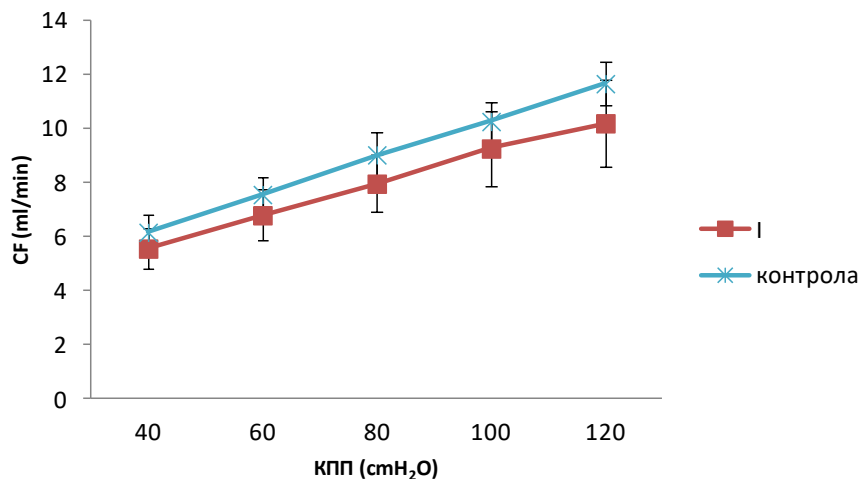


Графикон 69. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим перфузионим притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездом \*.

Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином и физиолошког раствора нису уочене статистички значајне разлике за параметре HR (Графикон 70) и CF (Графикон 71) на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ).



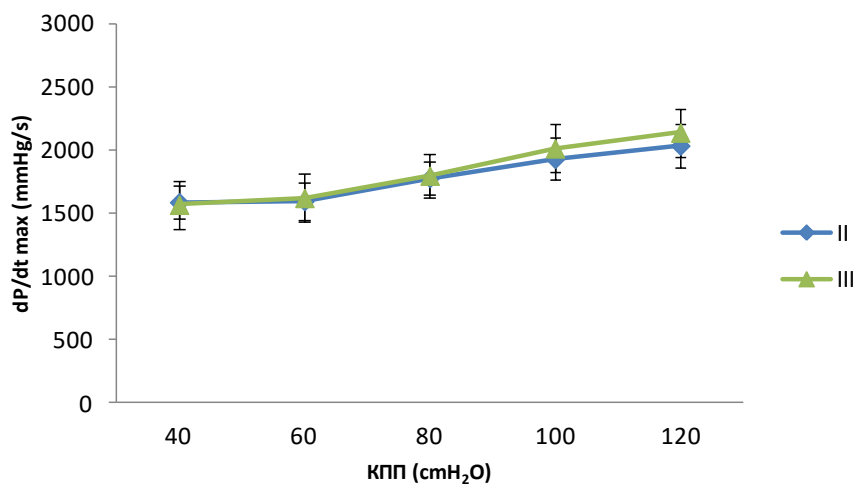
Графикон 70. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на HR- срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 71. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и физиолошког раствора (контрола) на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

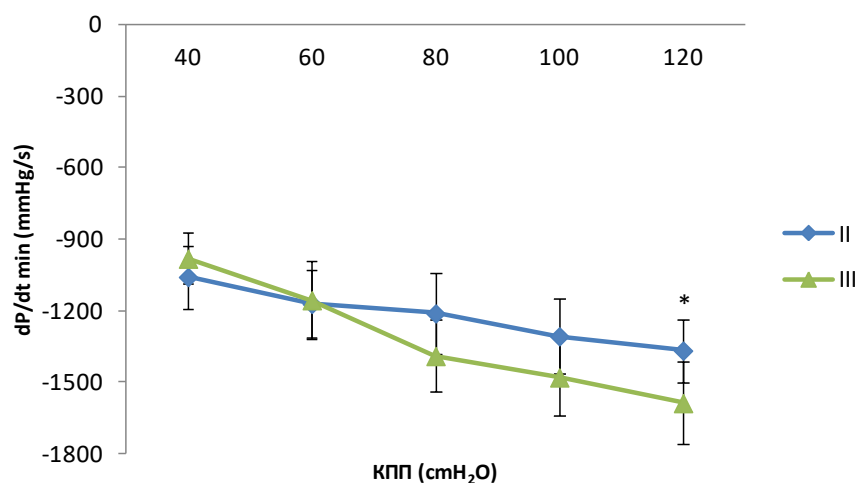
#### 4.2.12. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Поредица утицаја хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином нису уочене статистички значајне разлике у вредностима  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 72).



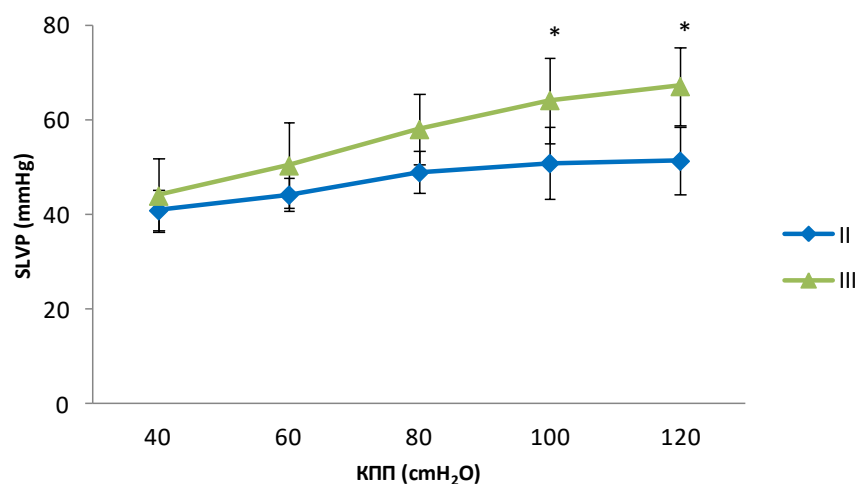
Графикон 72. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Исти тренд се уочава и за параметар  $dp/dt \text{ min}$ , осим на КПП  $120 \text{ cmH}_2\text{O}$  на ком су забележене статистички значајне вредности овог параметра након примене комплекса рутенијума са бипиридином (Графикон 73).



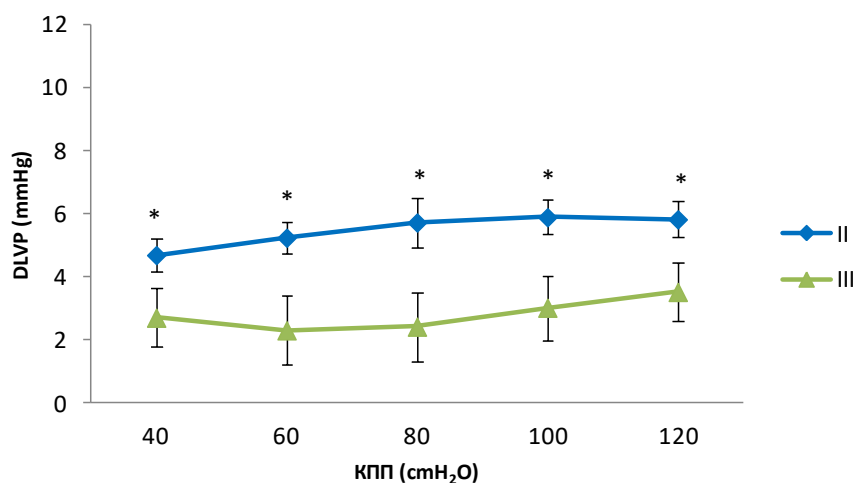
Графикон 73. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притика у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) међу групама на различитим коронарним перфузионим притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Сличан тренд прате и вредности SLVP, наиме дшло је до статистички значајно повећања вредност овог параметра при КПП  $100$  до  $120 \text{ cmH}_2\text{O}$  након примене комплекса рутенијума са бипиридином у односу на комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном ( $p < 0,05$ ) (Графикон 74).



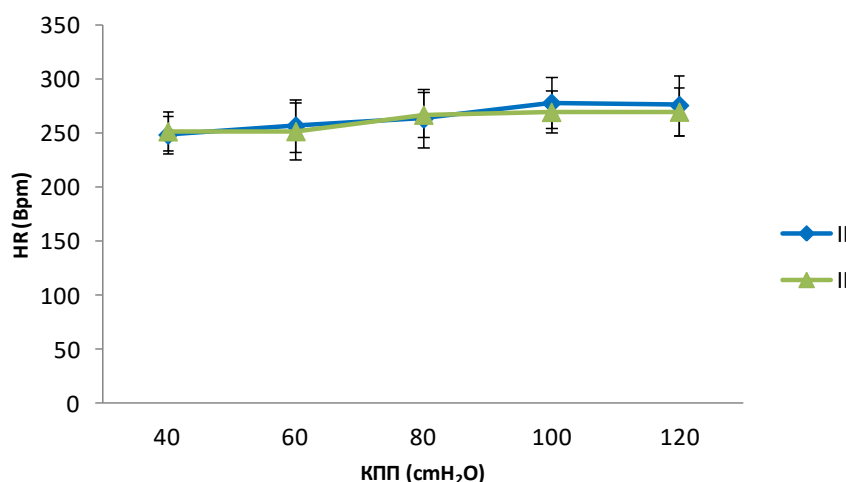
Графикон 74. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на SLVP- систлни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Хронична примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном довела је до статистички значајног пораста вредности DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену комплекса рутенијума са бипиридином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 75).

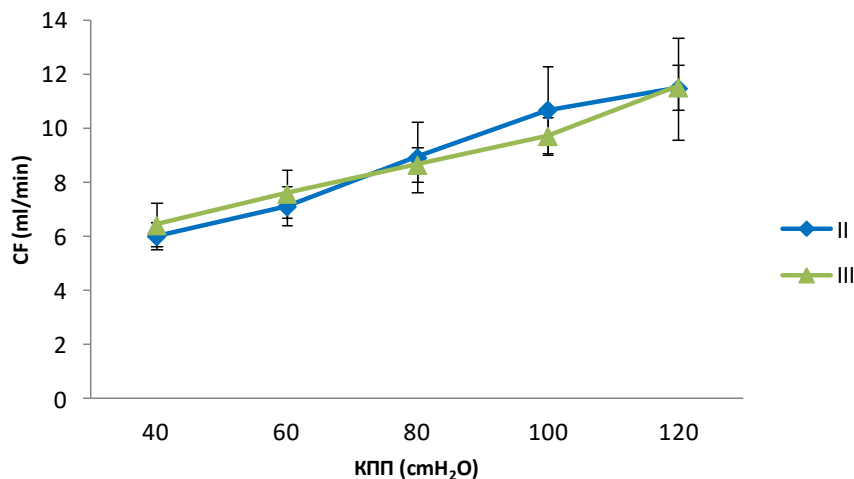


Графикон 75. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на DLVP-дијаастолни притисак у левој комори изоловног срца. Резултати су приказани у виду средњих вредности и стандардних девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином нису уочене статистички значајне разлике за параметре HR (Графикон 76) и CF (Графикон 77) на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ).



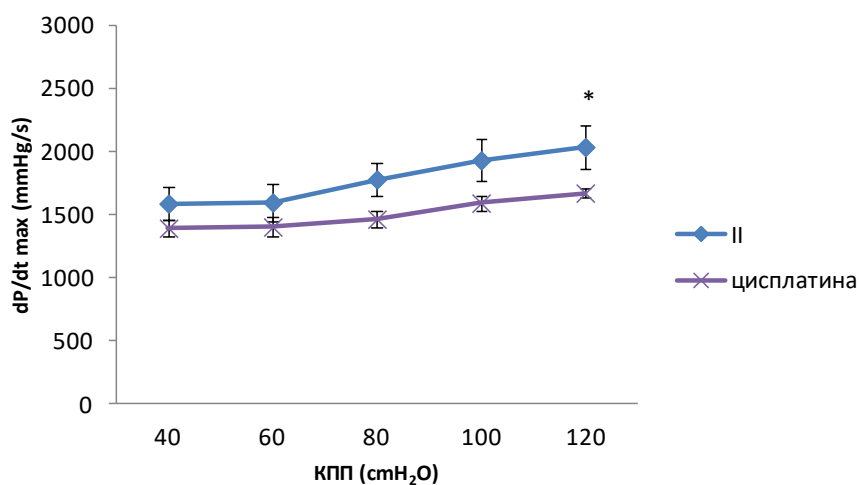
Графикон 76. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са бипиридином на HR-срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 77. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и комплекса рутенијума са биридином на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.2.13. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

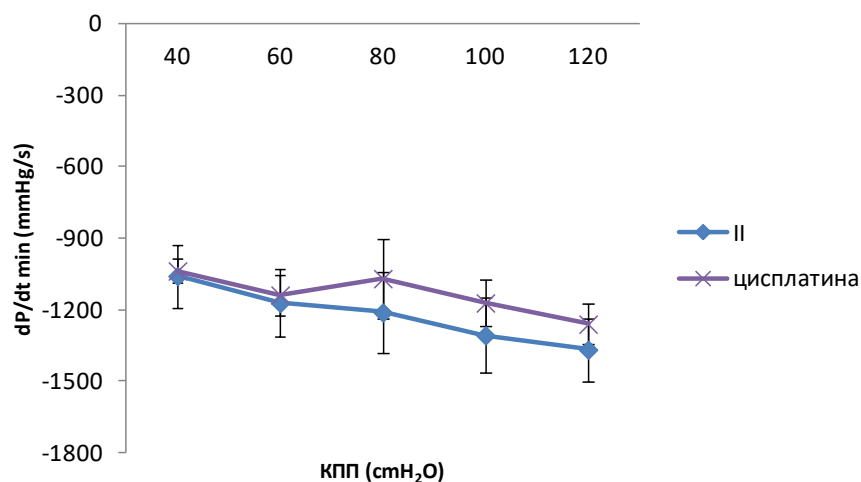
Поредица ефеката хроничног третмана комплексом рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатином није уочена статистичка значајност за  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима, осим на КПП 120 cmH<sub>2</sub>O на ком је примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном изазвала статистички значајан пораст вредност  $dp/dt_{max}$  у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 78).



Графикон 78. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња

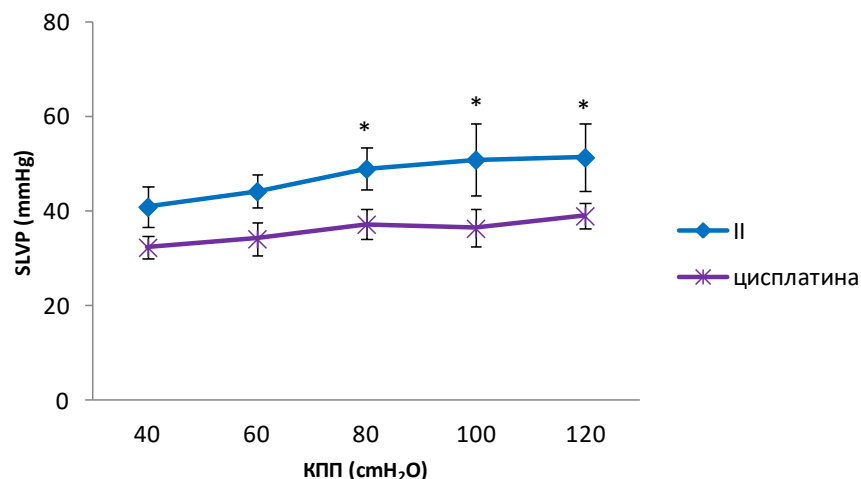
вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатине нису уочене статистички значајне разлике за параметар  $dp/dt \min$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 79).



Графикон 79. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притисака у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

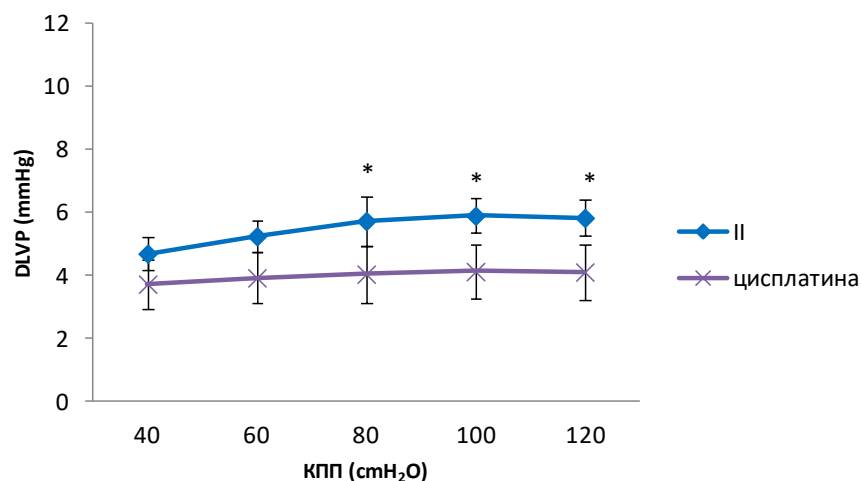
Хронична примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном довела је до статистички значајног пораста вредности SLVP на коронарним перфузионим притисцима 80-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 80).



Графикон 80. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су приказани у виду средњих вредности и стандардних девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

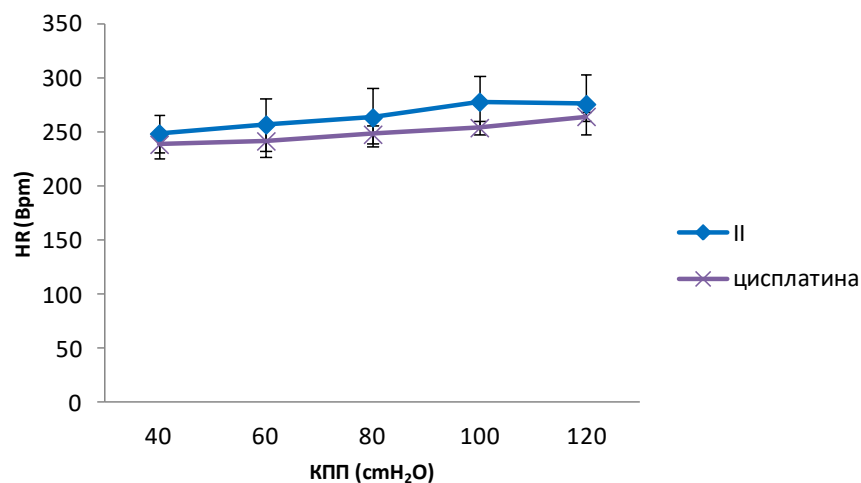


Исти тренд се уочава и за параметар DLVP (Графикон 81).

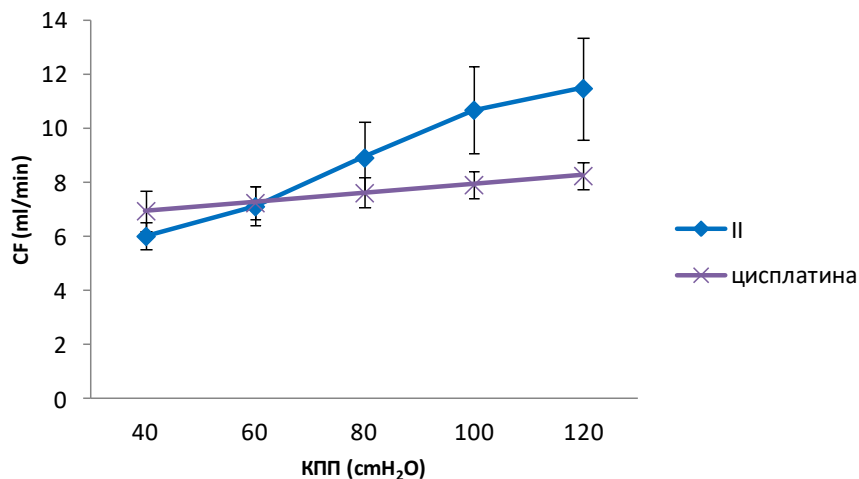


Графикон 81. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изоловнаог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандарна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатине нису уочене статистички значајне разлике за параметре HR (Графикон 82) и CF (Графикон 83) на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ).



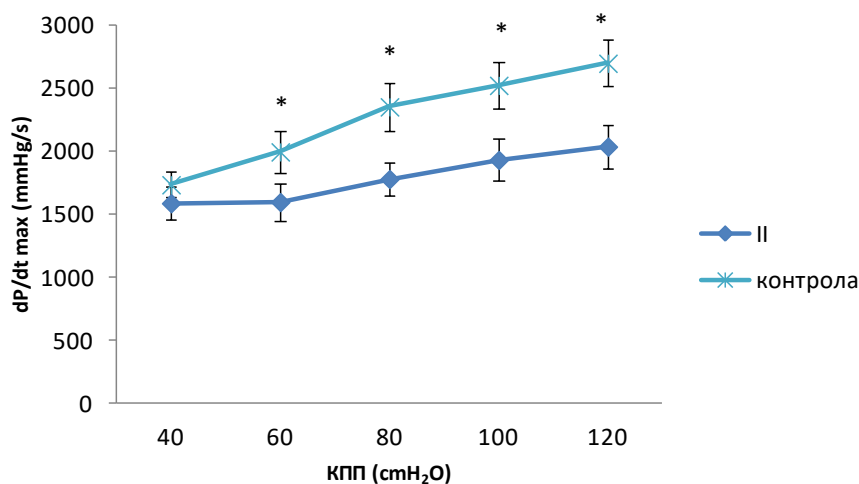
Графикон 82. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на HR- срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандарна девијација (SD).



Графикон 83. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и цисплатине на CF- коронарни проток изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

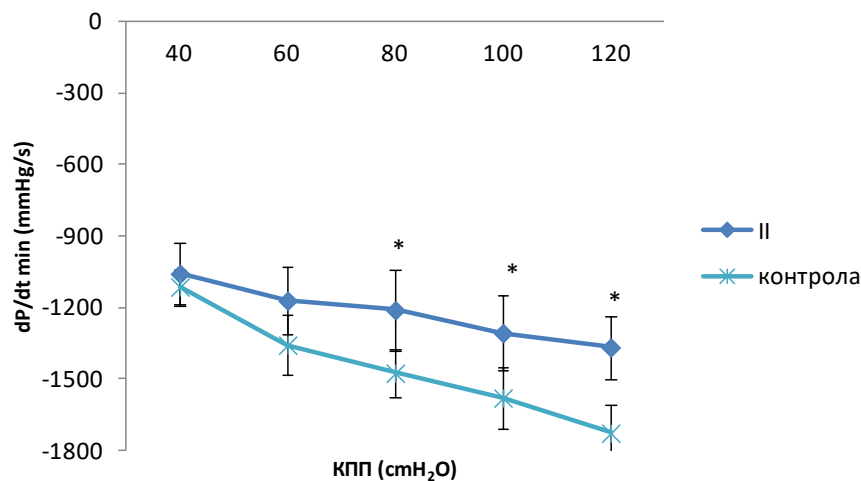
#### 4.2.14. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Хронична примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном довела је статистички значајног снижења  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима, осим на КПП 40 cmH<sub>2</sub>O, у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 84).



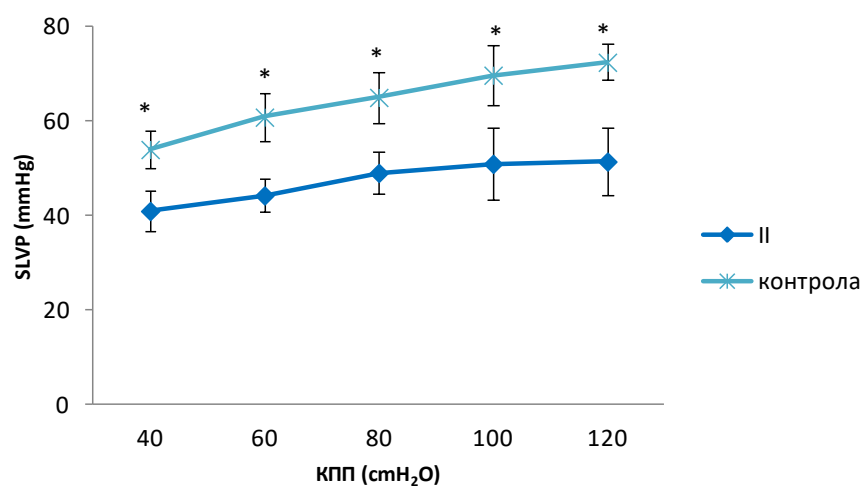
Графикон 84. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и физиолошког раствора на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Сличан тренд прате и вредности параметра  $dp/dt \text{ min}$ , с тим да при КПП 40-60  $\text{cmH}_2\text{O}$  није дошло до статистички значајног снижења вредности параметра након примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном у односу на примену физиолошког раствора ( $p > 0,05$ ) (Графикон 85).



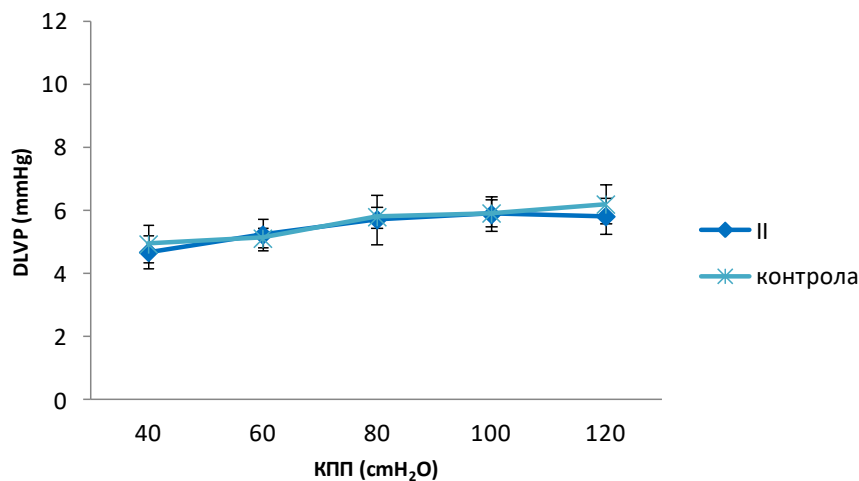
Графикон 85. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са бипиридином (III) на  $dp/dt \text{ min}$  - минималану стопу развоја притиска левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притицима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Хронична примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном довела је до статистички значајног снижења вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притицима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 86).



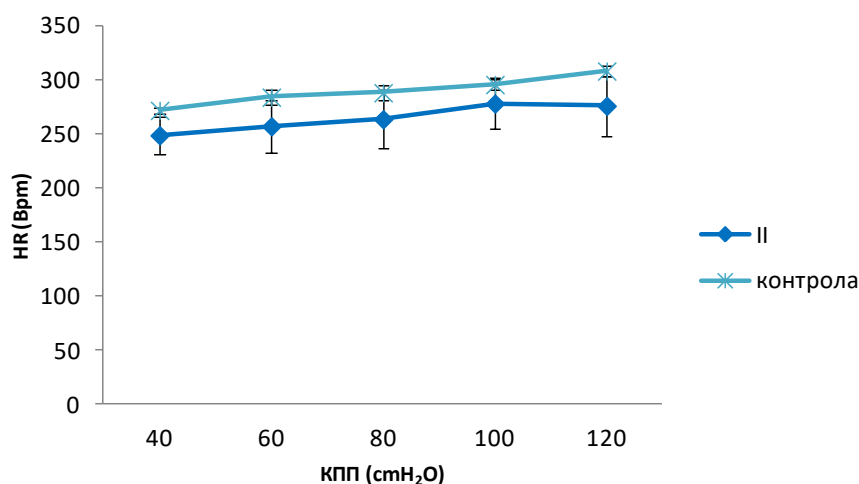
Графикон 86. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и физиолошког раствора на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултата су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и физиолошког раствора нису уочене статистички значајне разлике за параметар DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 87).

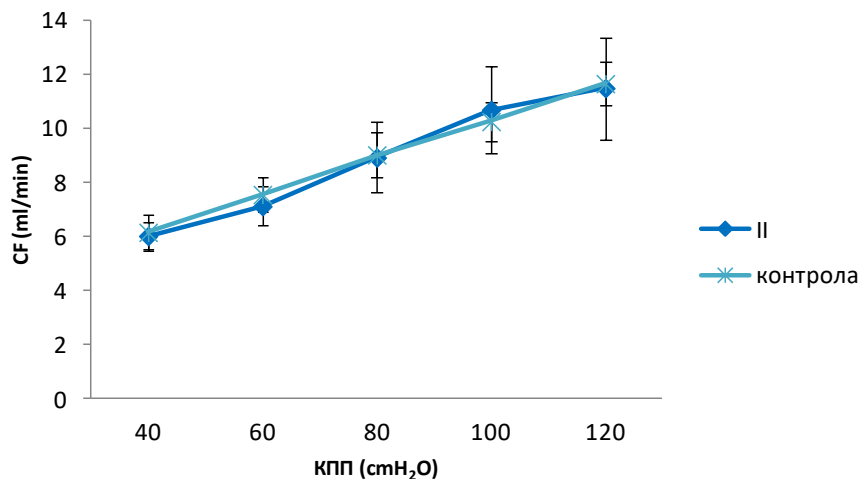


Графикон 87. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и физиолошког раствора на DLVP- дијстолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Исти тренд уочен је и код параметара HR (Графикон 88) и CF (Графикон 89).



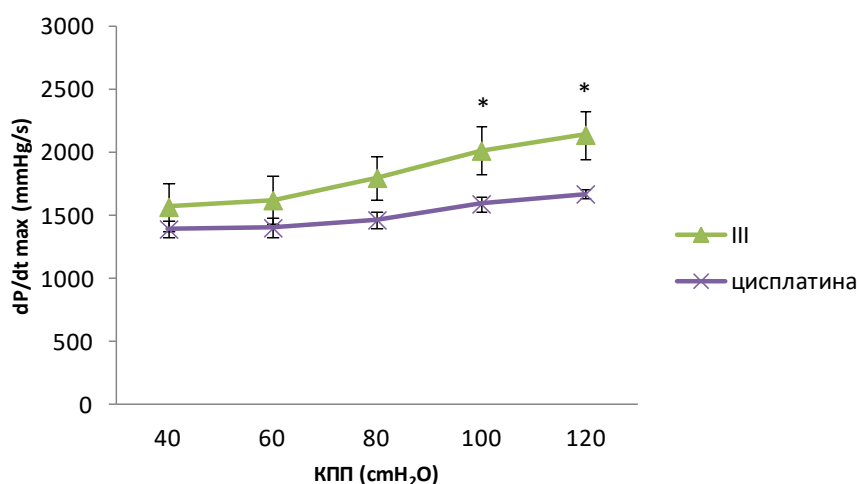
Графикон 88. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и физиолошког раствора на HR- срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 89. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) и физиолошког раствора на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

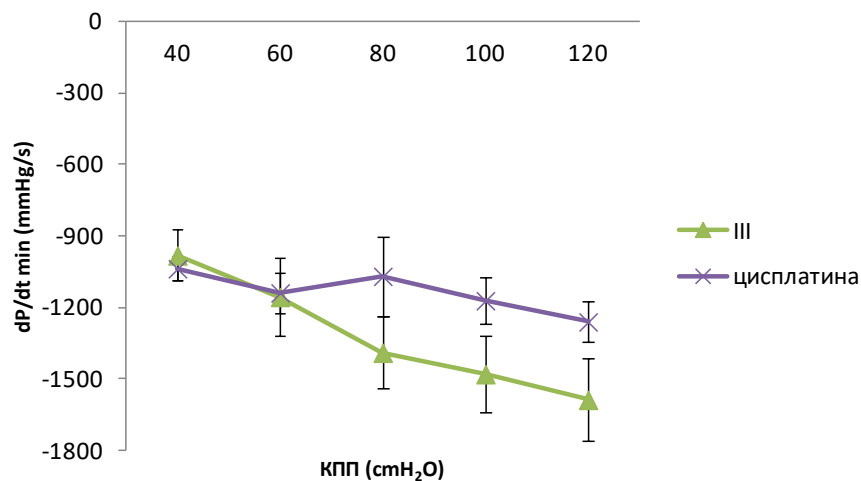
#### 4.2.15. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине на кардиодинаске параметре и коронарни проток изолованог срца

Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином изазвала је статистички значајан раст вредност  $dp/dt_{max}$  на коронарним перфузионим притисцима 100-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 90).



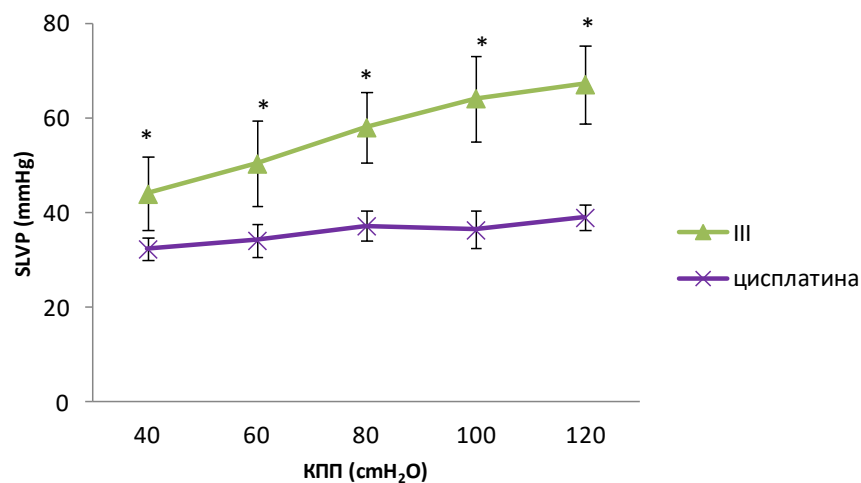
Графикон 90. Поредица ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и цисплатине на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине нису уочене статистички значајне разлике за параметар  $dp/dt \min$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 91).



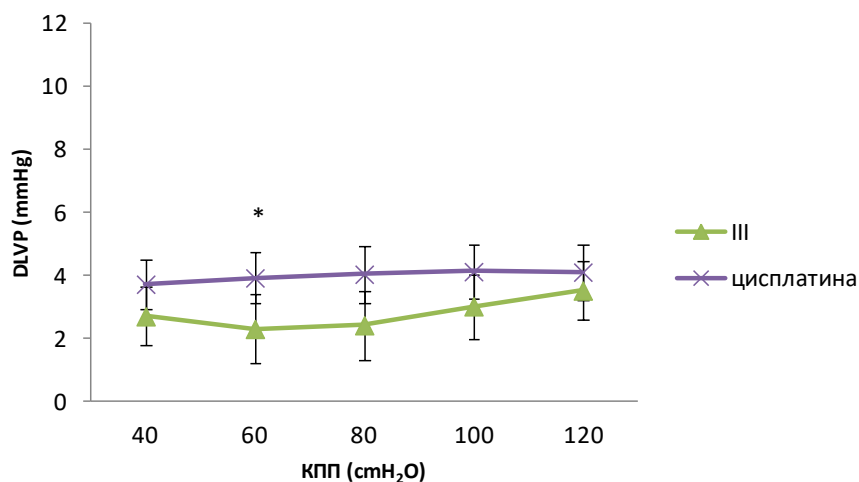
Графикон 91. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и цисплатине на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притика у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином довела је до статистички значајног пораста вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у поређењу са применом цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 92).



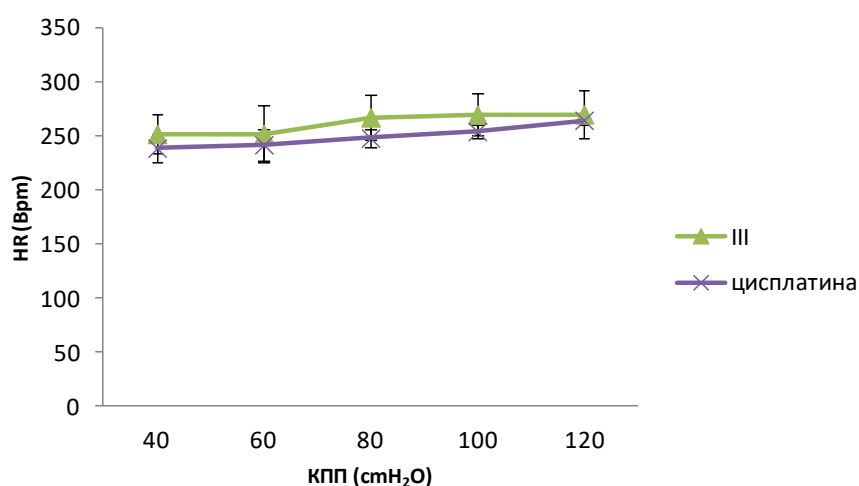
Графикон 92. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и цисплатине на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине нису уочене статистички значајне разлике за параметар DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима, осим на КПП 60 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ), на ком је дошло до снижења вредности овог параметра након примене комплекса рутенијума са бипиридином у односу на примену цисплатине (Графикон 93).



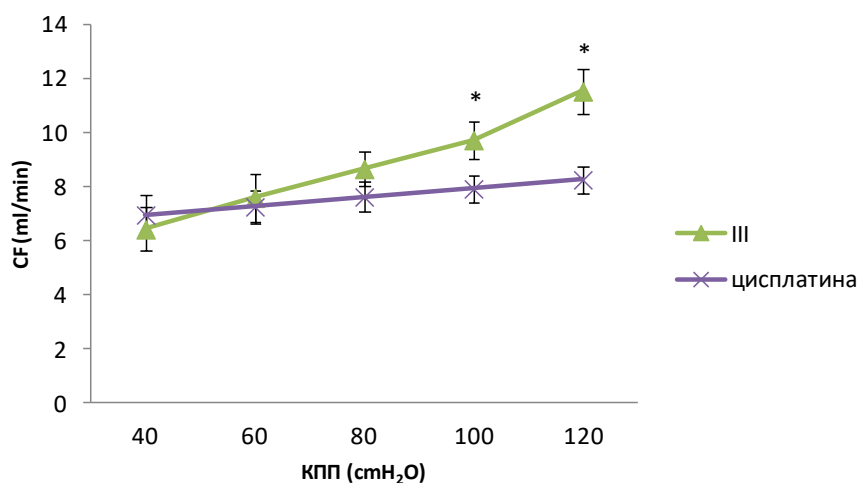
Графикон 93. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином (I) и комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (II) на DLVP-дијастолни притисак у левој комои изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездичом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине нису уочене статистички значајне разлике за параметар HR на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 94).



Графикон 94. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и цисплатине на HR-срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

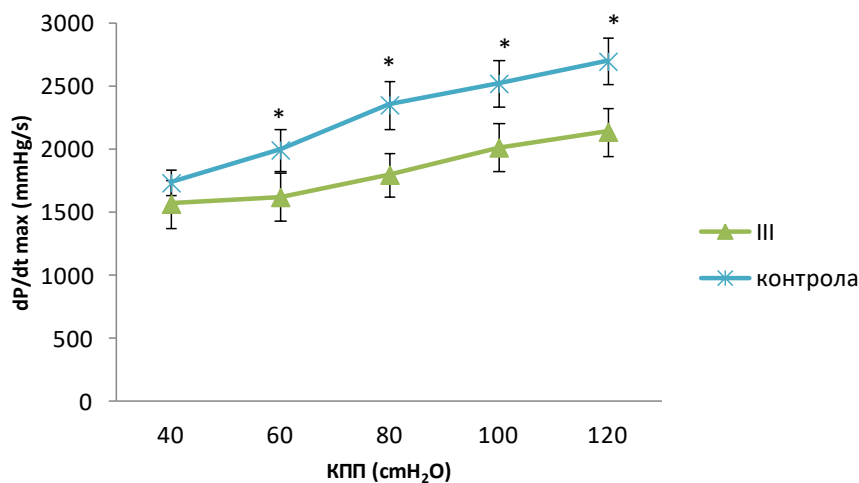
Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином довела је до статистички значајног пораста вредности CF на КПП 100-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 95).



Графикон 95. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и цисплатине на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим перфузионим притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездичом \*.

#### 4.2.16. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

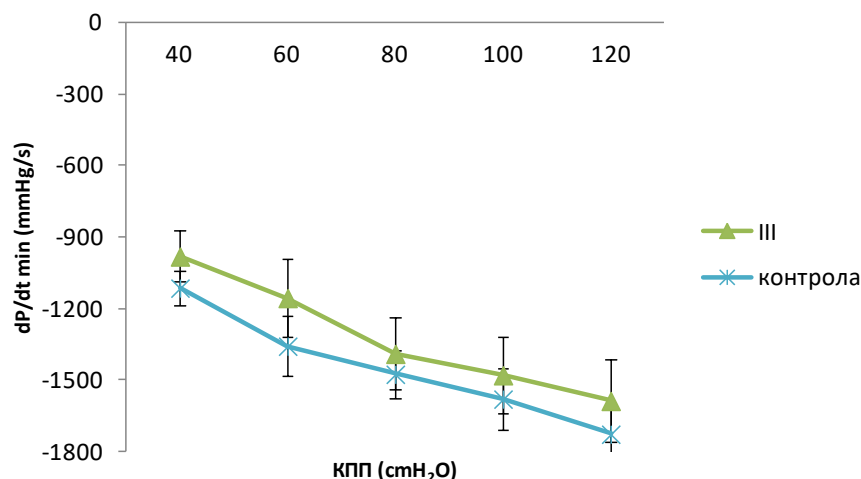
Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином изазвала је статистички значајно снижење вредност  $dp/dt_{max}$  на коронарним перфузионим притисцима 60-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 96).





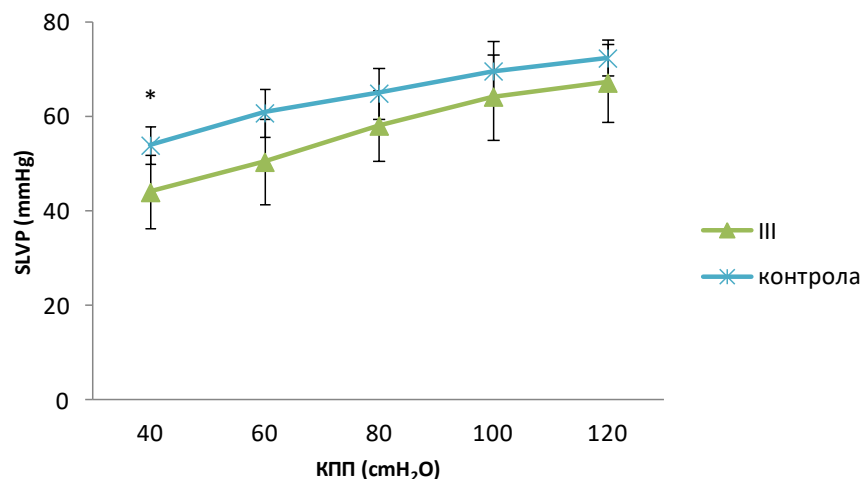
Графикон 96. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на  $dp/dt \max$  - максималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим перфузионим притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора нису уочене статистички значајне разлике за параметар  $dp/dt \min$  на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 97).



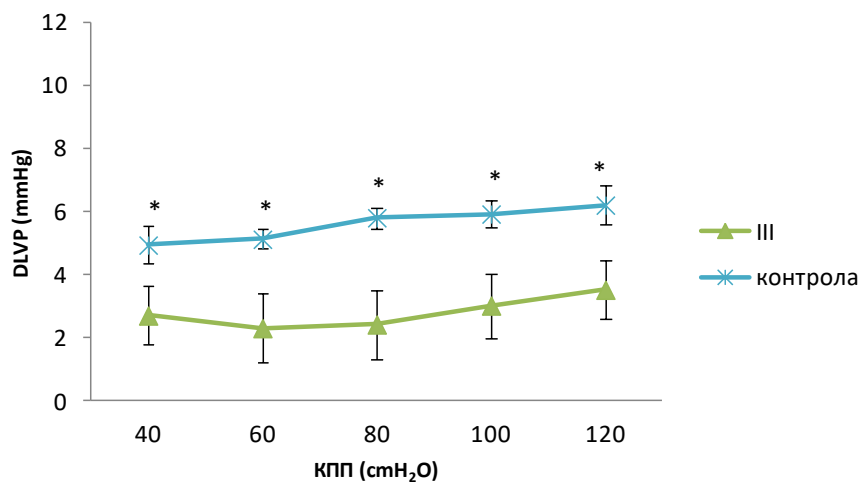
Графикон 97. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на  $dp/dt \min$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора нису уочене статистички значајне разлике за параметар SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ), осим на КПП 40 cmH<sub>2</sub>O, на ком је дошло до статистички значајног снижења вредности овог параметра након примене комплекса рутенијума са бипиридином у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 98).



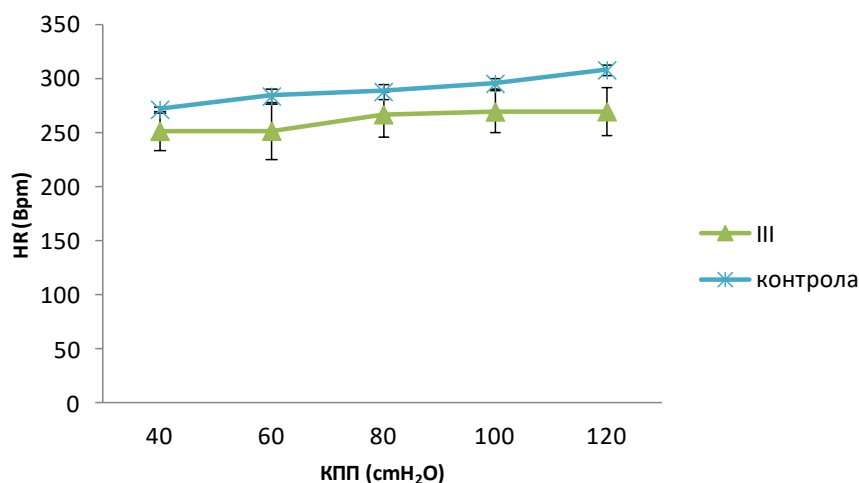
Графикон 98. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином довела је до статистички значајног снижења вредности DLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 99).



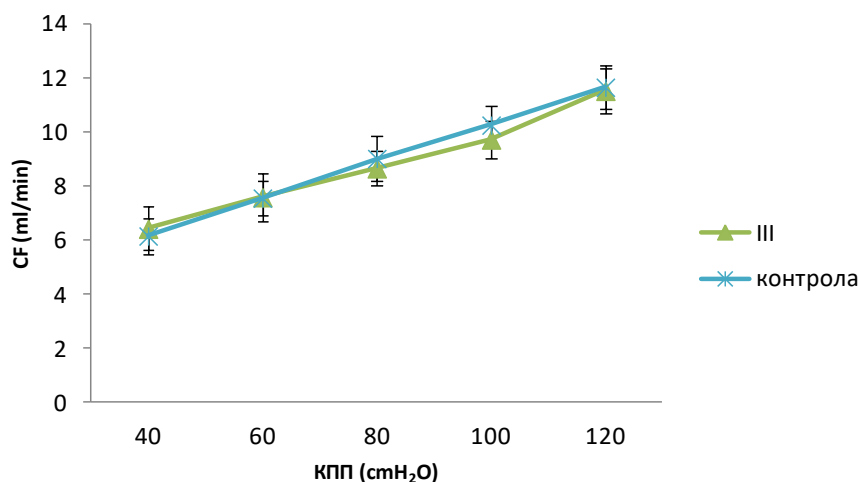
Графикон 99. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Поређењем ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином и физиолошког раствора нису уочене статистички значајне разлике за параметар HR на свим коронарним перфузионим притисцима ( $p > 0,05$ ) (Графикон 100).



Графикон 100. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на HR- срчау фреквенцу изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

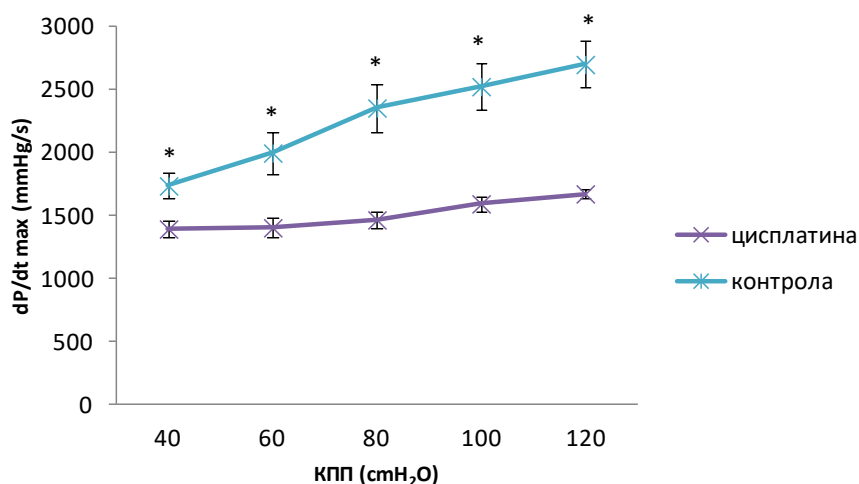
Исти тренд је примећен и за параметар CF (Графикон 101).



Графикон 101. Поређење ефеката хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином (III) и физиолошког раствора на CF- коронарни проток изолованог срца пацова. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

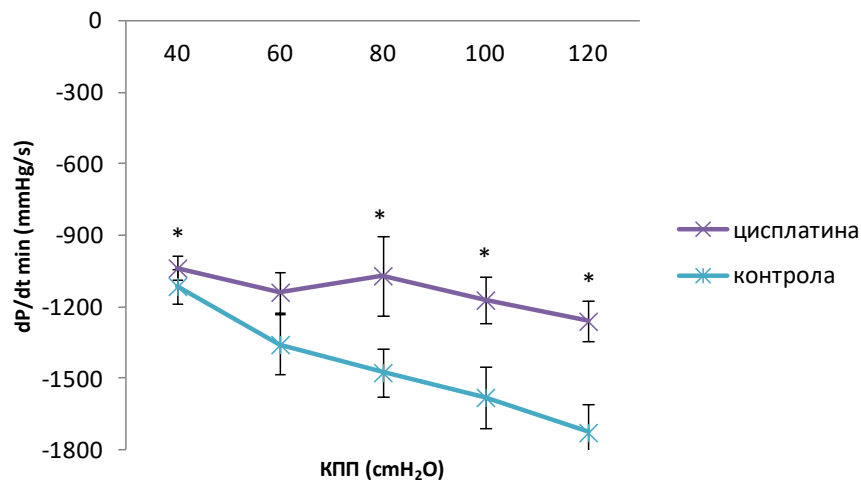
#### 4.2.17. Поређење ефеката хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Хронична примена цисплатине индуковала је статистици значајно снижење  $dp/dt_{max}$  на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 102).



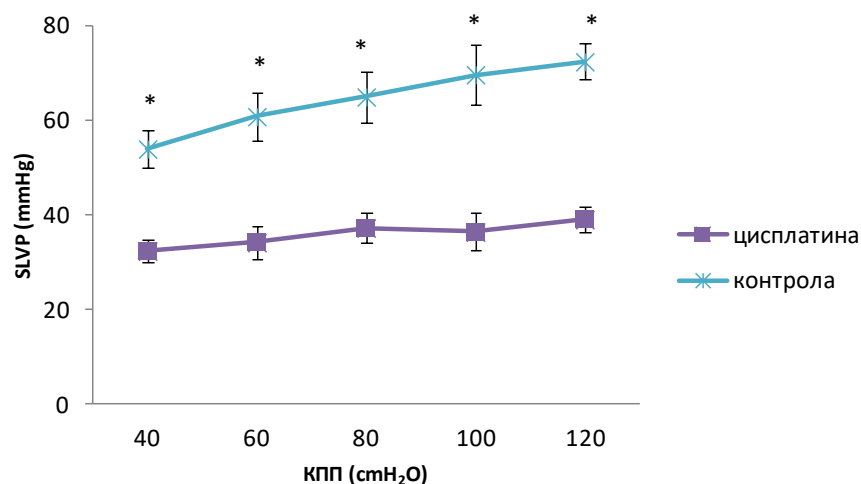
Графикон 102. Поређење ефекта хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на  $dp/dt_{max}$  - максималну стопу развоја притиса у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

Сличан тренд је уочен и за параметар  $dp/dt \text{ min}$ , заправо на свим КПП осим на 60  $\text{cmH}_2\text{O}$  дошло је до статистички значајног снижења вредности параметра након примене цисплатине у односу на примену физиолошког раствора (Графикон 103).



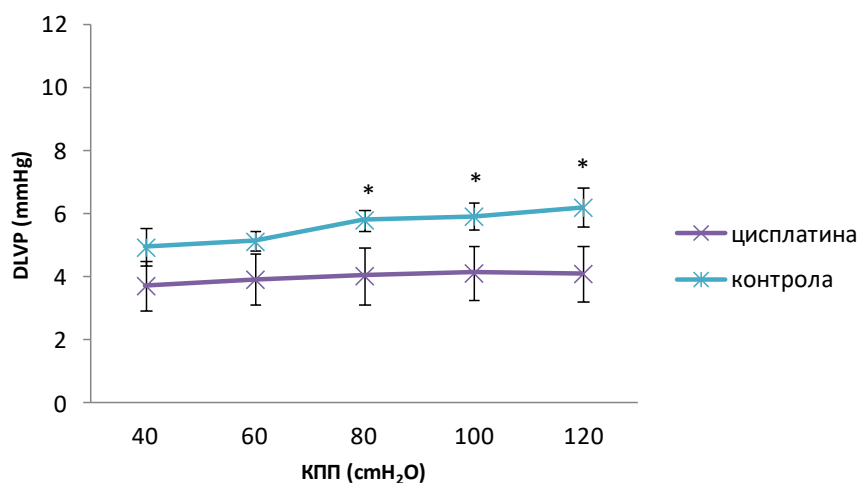
Графикон 103. Поређење ефекта хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на  $dp/dt \text{ min}$  - минималну стопу развоја притиска у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездичом \*.

Хронична примена цисплатине довела је до статистички значајног снижења вредности SLVP на свим коронарним перфузионим притисцима у односу на примену физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ) (Графикон 104).



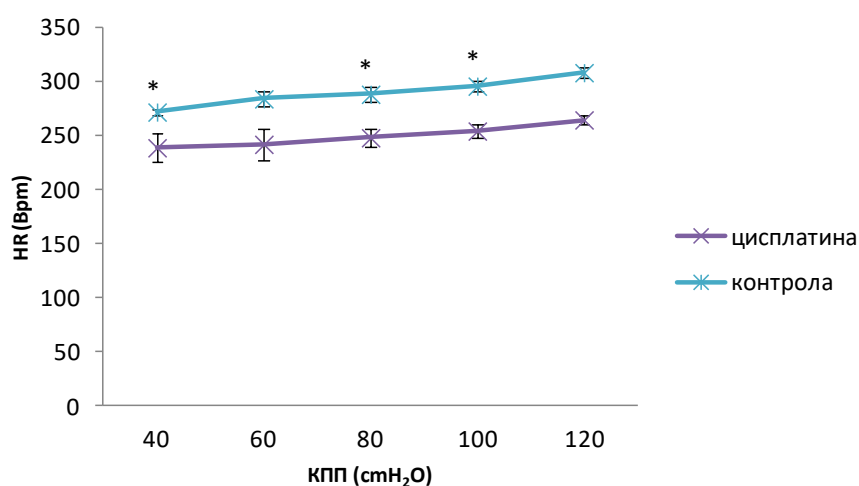
Графикон 104. Поређење ефекат хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на SLVP- систолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним перфузионим одређене су Студентовим  $t$  тестом и приказане звездичом \*.

Хронична примена цисплатине довела је до статистички значајног снижења вредности DLVP на КПП 80-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену физиолошког раствора (p<0,05) (Графикон 105).



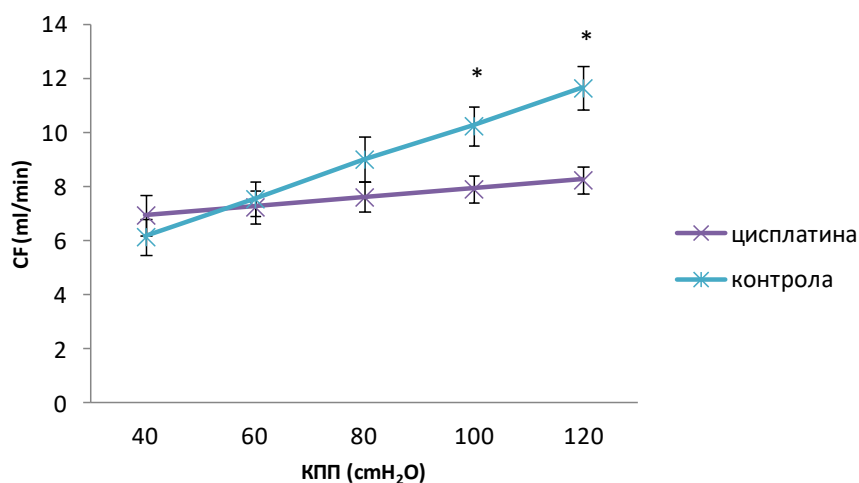
Графикон 105. Поредица ефекта хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на DLVP- дијастолни притисак у левој комори изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике (p<0,05) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Хронична примена цисплатине изазвала је статистички значајно снижење вредности HR на КПП 40,80 и 100 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену физиолошког раствора (p<0,05) (Графикон 106).



Графикон 106. Поредица ефекта хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на HR- срчану фреквенцу изолованог срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике (p<0,05) између група на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Хронична примена цисплатине изазвала је статистички значајно снижење вредности CF на КПП 100 и 120 cmH<sub>2</sub>O у односу на примену физиолошког раствора (p<0,05) (Графикон 107).

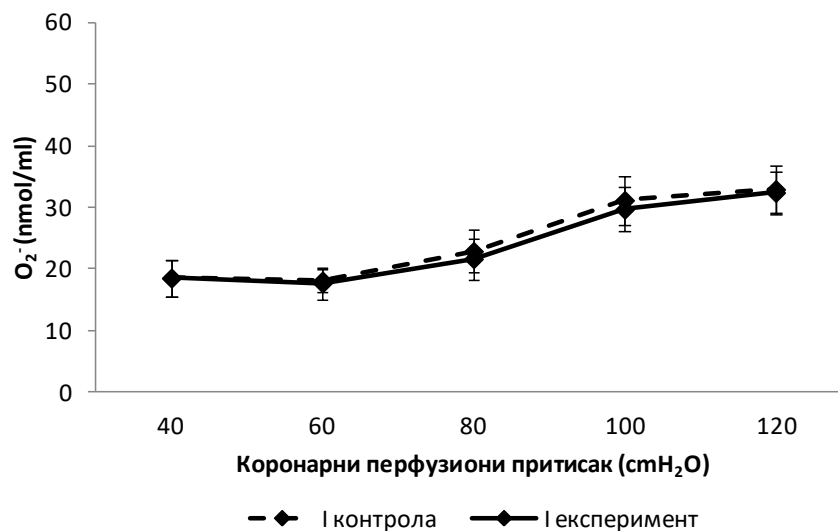


Графикон 107. Поређење ефеката хроничне примене цисплатине и физиолошког раствора на CF- коронарни проток изолваног срца. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике (p<0,05) између група на различитим перфузионим притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездом \*.

#### 4.3. Ефекти хроничне примене испитивних једињења на параметре оксидационог стреса

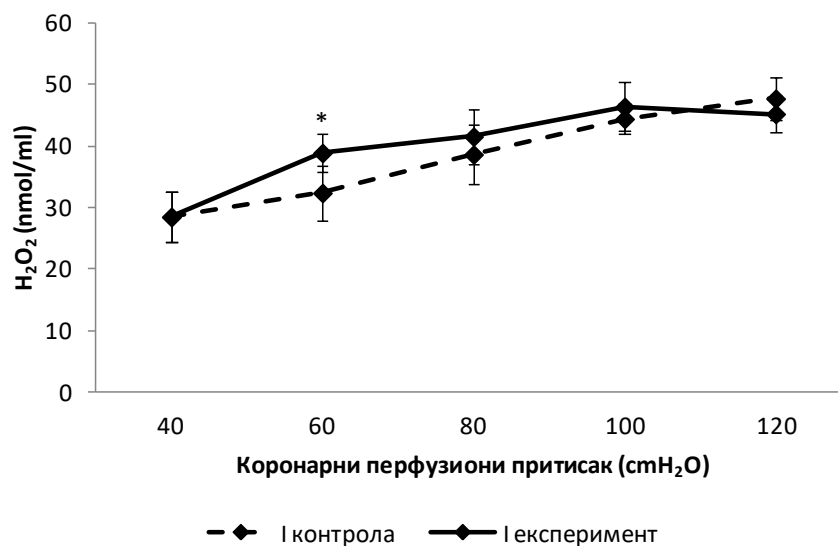
##### 4.3.1. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид ањон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 108. Вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид ањон радикала се нису статистички значајно разликовале (p>0,05) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



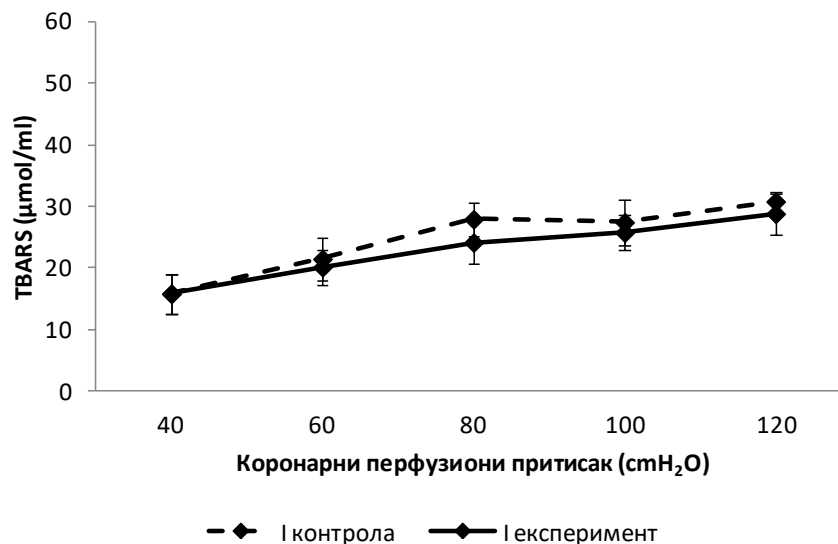
Графикон 108. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности  $O_2^-$  - супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 109. Вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак, осим на КПП 60 cmH<sub>2</sub>O.



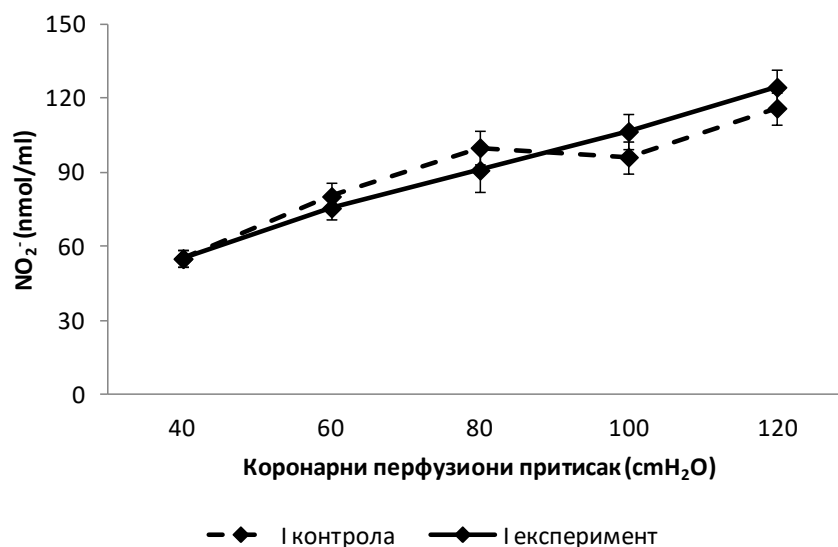
Графикон 109. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) међу контролним и експерименталним условима на различитим коронарним притисцима одређене су Студентовим t тестом и приказане звездицом \*.

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 110. Вредности TBARS се нису статистички значајно разликовале ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



Графикон 110. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности  $\text{NO}_2^-$  нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 111. Вредности  $\text{NO}_2^-$  се нису статистички значајно разликовале ( $p>0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.

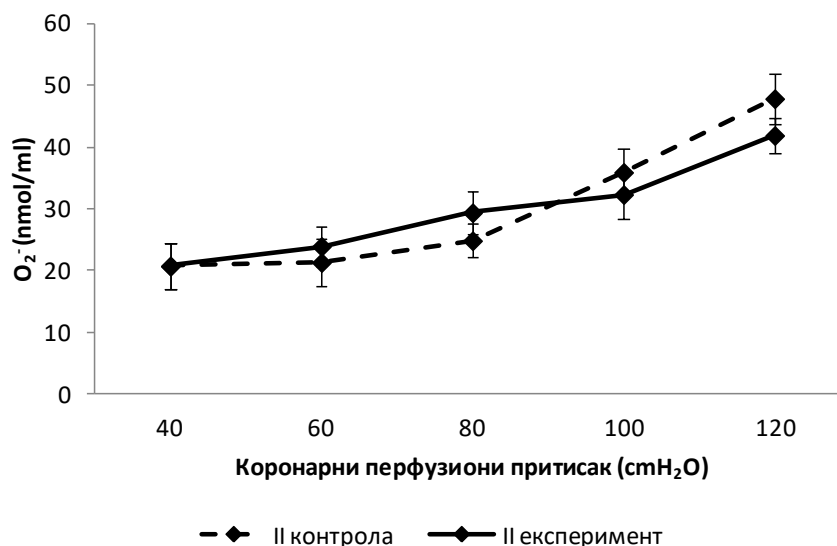


Графикон 111. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са етилендиамином на вредности  $\text{NO}_2^-$  нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



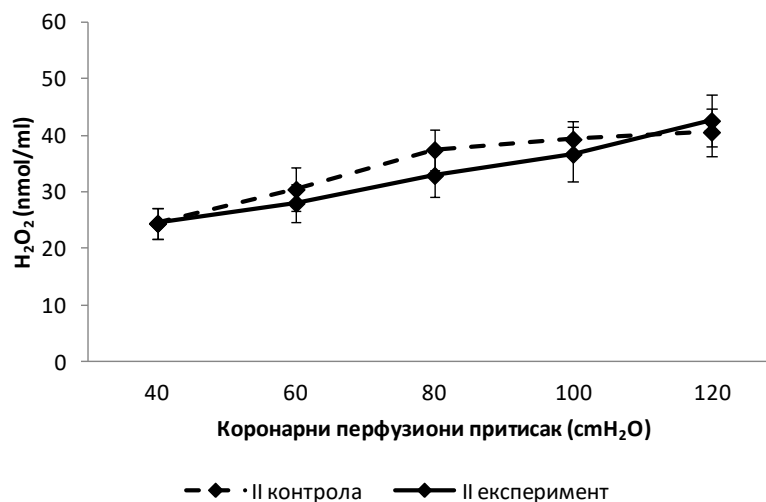
#### 4.3.2. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности  $O_2^-$  - супероксид ањон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 112. Вредности  $O_2^-$  - супероксид ањон радикала се нис статистички значајо разликовал ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



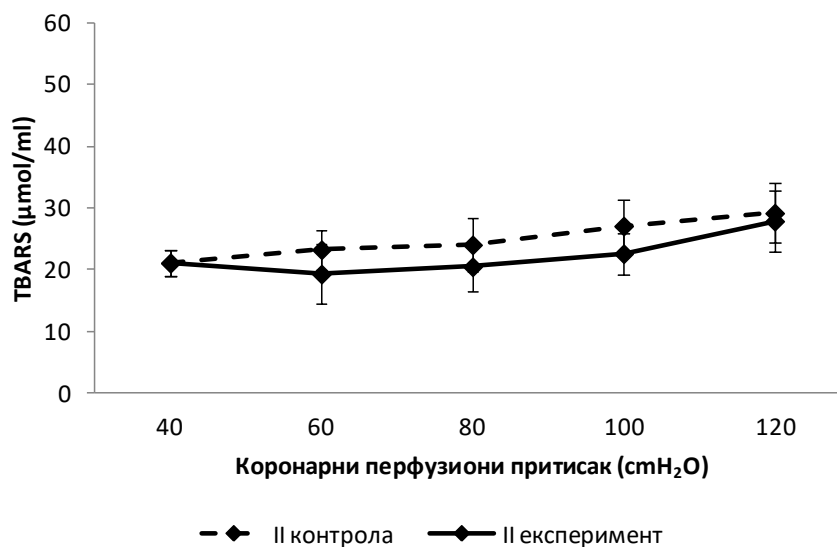
Графикон 112. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности  $O_2^-$  - супероксид ањон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 113. Вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида се нису статистички значајо разликовале ( $p > 0,05$ ) контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



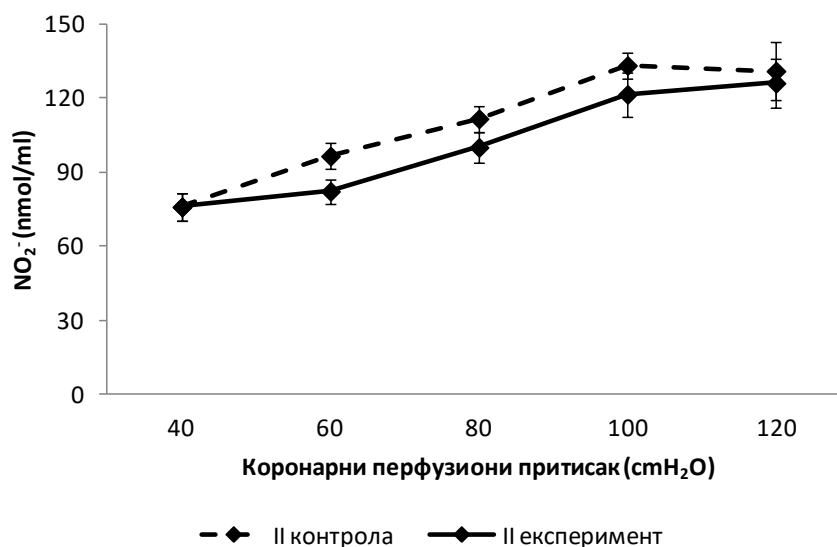
Графикон 113. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности  $\text{H}_2\text{O}_2$  – водоник пероксида у коронаном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронаном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 114. Вредности TBARS се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



Графикон 114. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

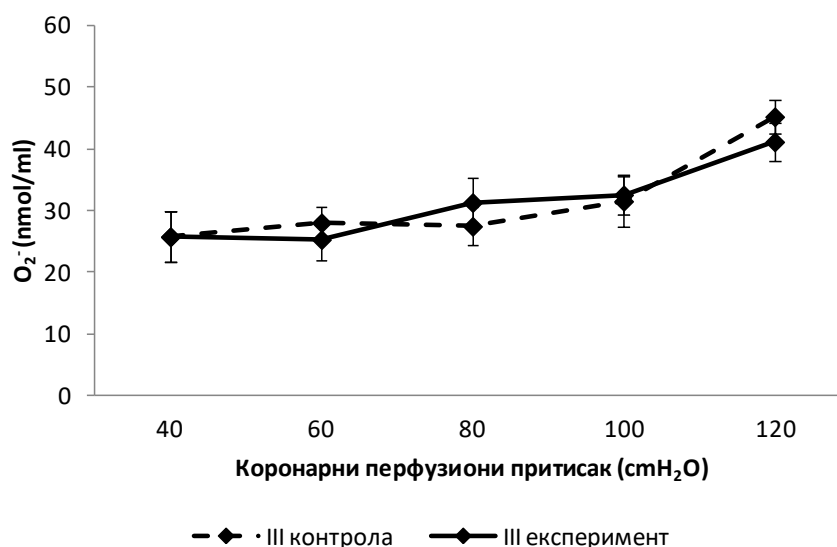
Исти тренд је забележен и за вредност  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима (Графикон 115).



Графикон 115. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном на вредности  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

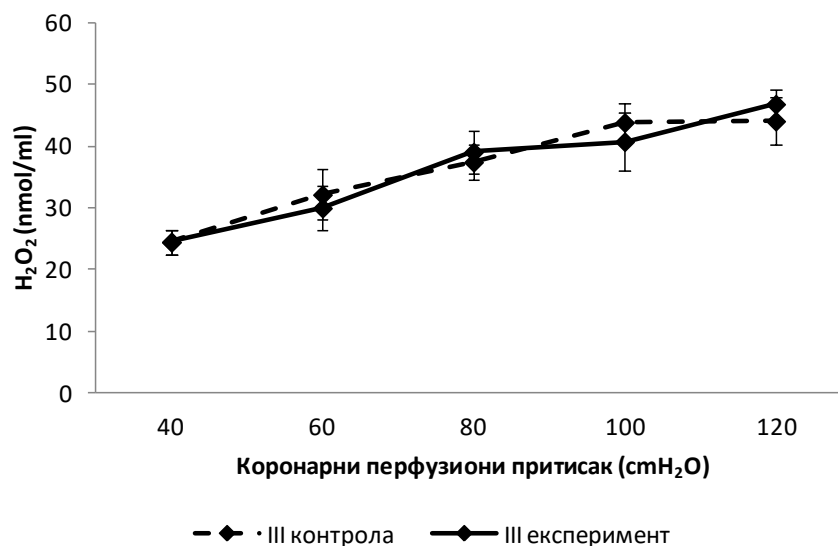
#### 4.3.3. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности  $\text{O}_2^-$  – супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 116. Вредности  $\text{O}_2^-$  – супероксид анјон радикала се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



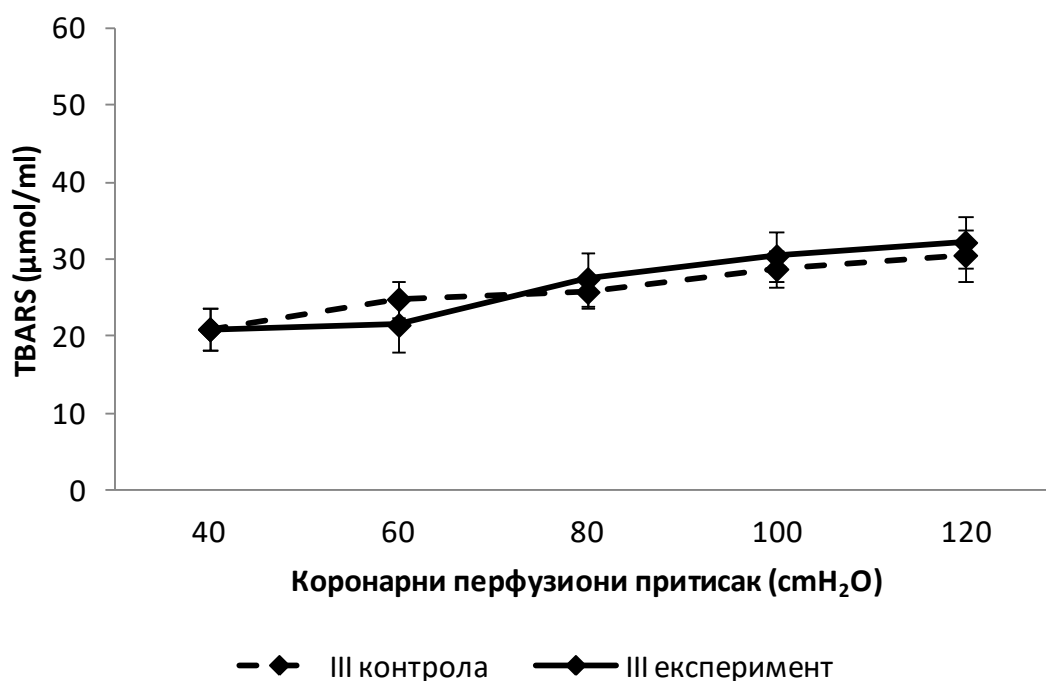
Графикон 116. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности  $\text{O}_2^-$  – супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности  $\text{H}_2\text{O}_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима представљени су на Графикону 117. Вредности  $\text{H}_2\text{O}_2$  – водоник пероксида се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.

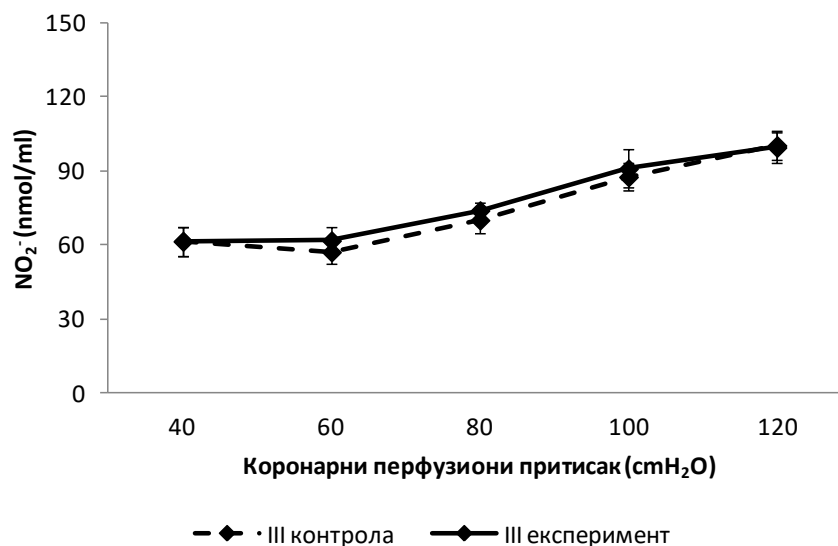


Графикон 117. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефленту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

Исти тренд је уочен за вредности TBARS – индекса липидне пероксидације (Графикон 118) и  $NO_2^-$  – нитрита (Графикон 119) у коронарном венском ефленту у контролним и експерименталним условима.



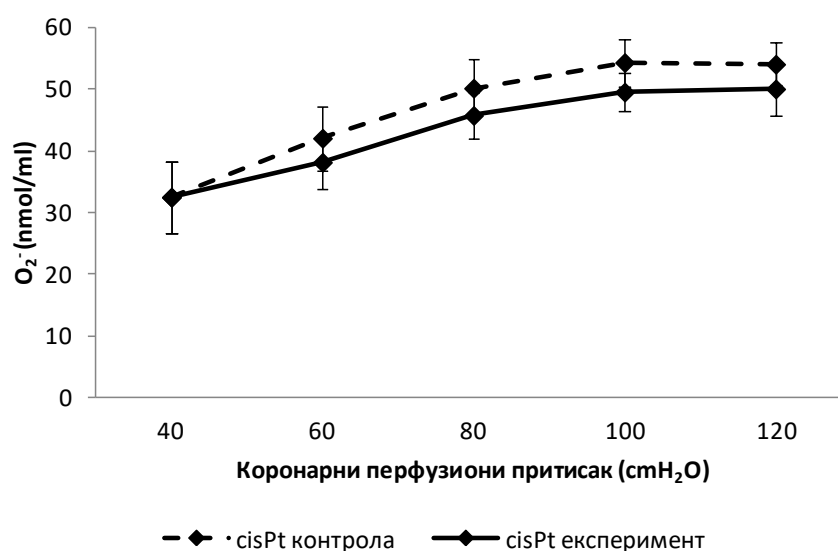
Графикон 118. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном венском ефленту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 119. Ефекти хроничне примене комплекса рутенијума са бипиридином на вредности  $\text{NO}_2^-$  нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

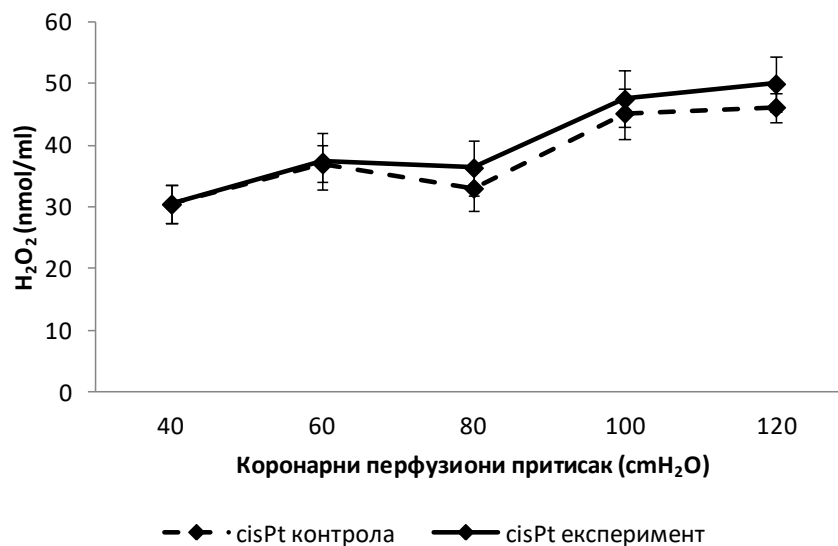
#### 4.3.4. Ефекти хроничне примене цисплатине на параметр оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Утицај хроничне примене цисплатине на вредности  $\text{O}_2^-$  - супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказани су на Графикону 120. Вредности  $\text{O}_2^-$  - супероксиид анјон радиала се ниису статистички значјно разлиовале ( $p > 0,05$ ) у контролним и експеименталним условима иако се мењао коронарни перфузиони притисак.

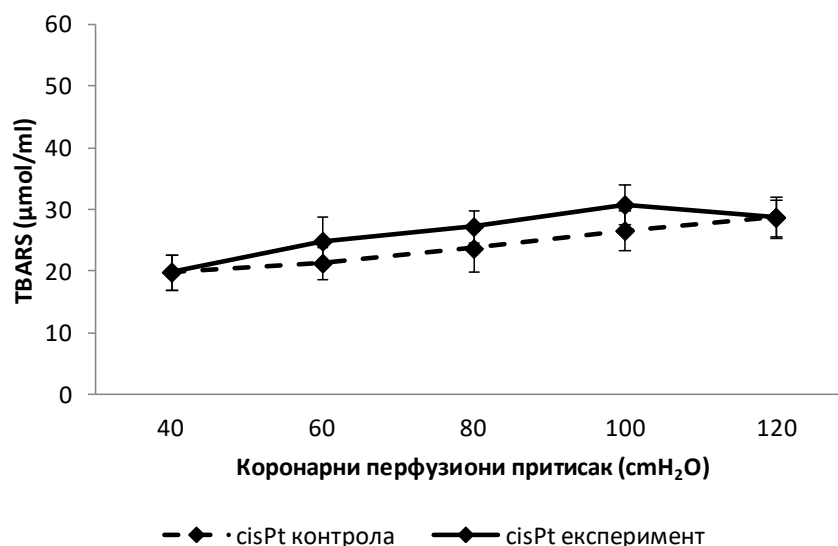


Графикон 120. Ефекти хроничне примене цисплатине на вредности  $\text{O}_2^-$  - супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

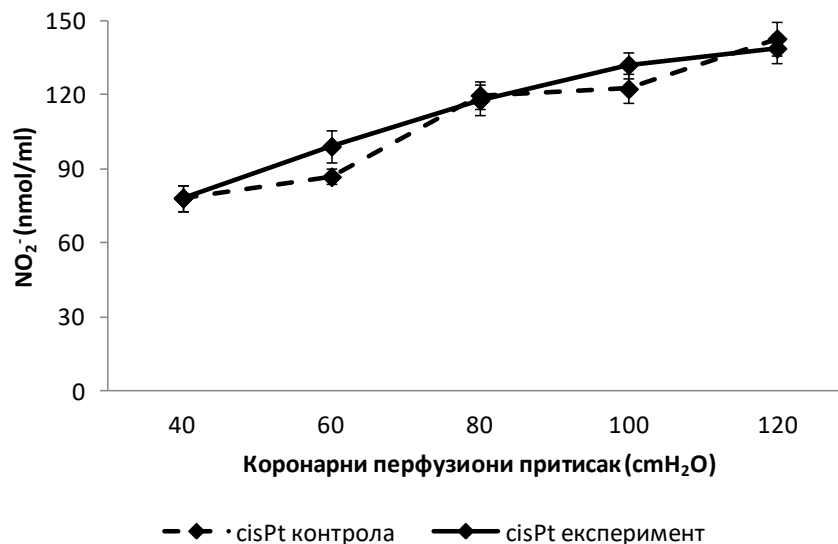
Хронична примена цисплатине није довела до статистички значајни разлика ( $p > 0,05$ ) у контролим и експерименталним условима за вредности параметара  $H_2O_2$  (Графикон 121), TBARS (Графикон 122) и  $NO_2^-$  (Графикон 123), иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



Графикон 121. Ефекти хроничне примене цисплатине на вредности  $H_2O_2$  – водоик пероксида у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



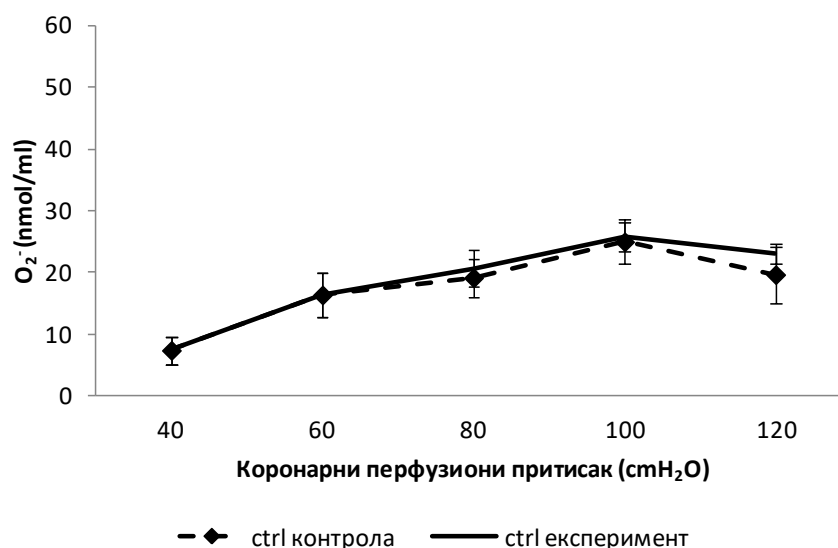
Графикон 122. Ефекти хроничне примене цисплатине на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



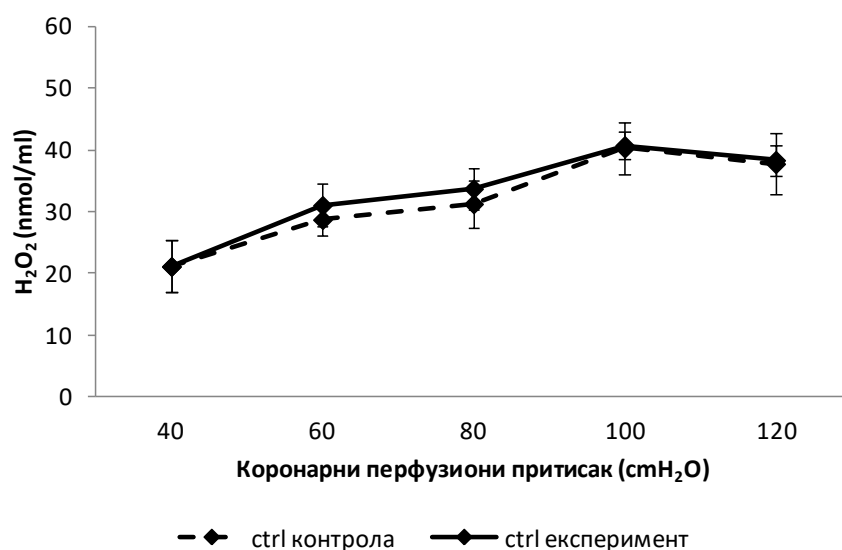
Графикон 123. Ефекти хроничне примене цисплатине на вредности  $\text{NO}_2^-$  нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

#### 4.3.5. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на парамете оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

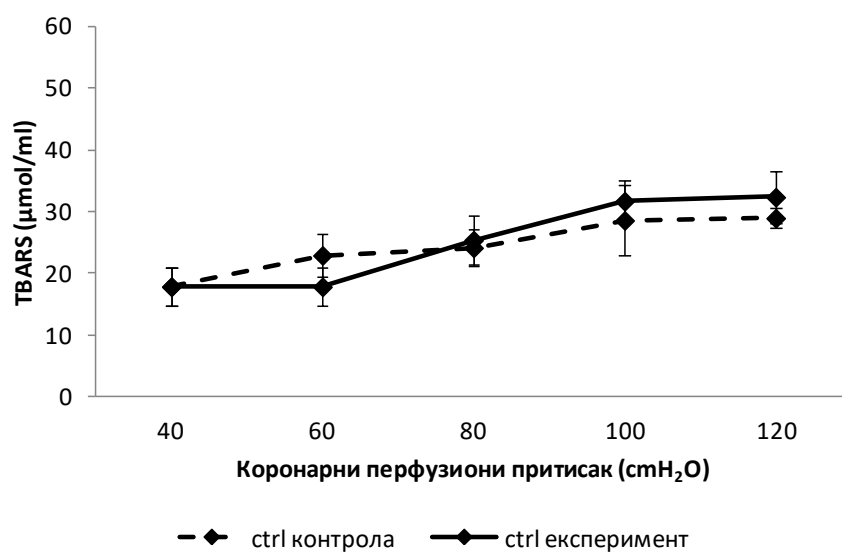
Хронична примена физиолошког раствора није довела до статистички значајни разлика ( $p > 0,05$ ) у контролним и експерименталним условима за вредности параметара  $\text{O}_2^-$  (Графикон 124),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Графикон 125), TBARS (Графикон 126) и  $\text{NO}_2^-$  (Графикон 127), иако се мењао коронарни перфузиони притисак.



Графикон 124. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на вредности  $\text{O}_2^-$  супероксид анјн радикала у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

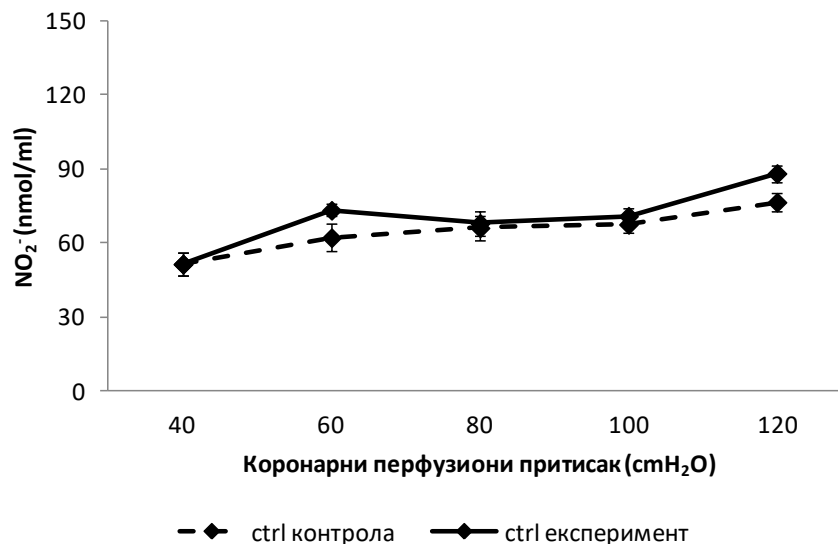


Графикон 125. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксид у коронарном ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).



Графикон 126. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у коронарном ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

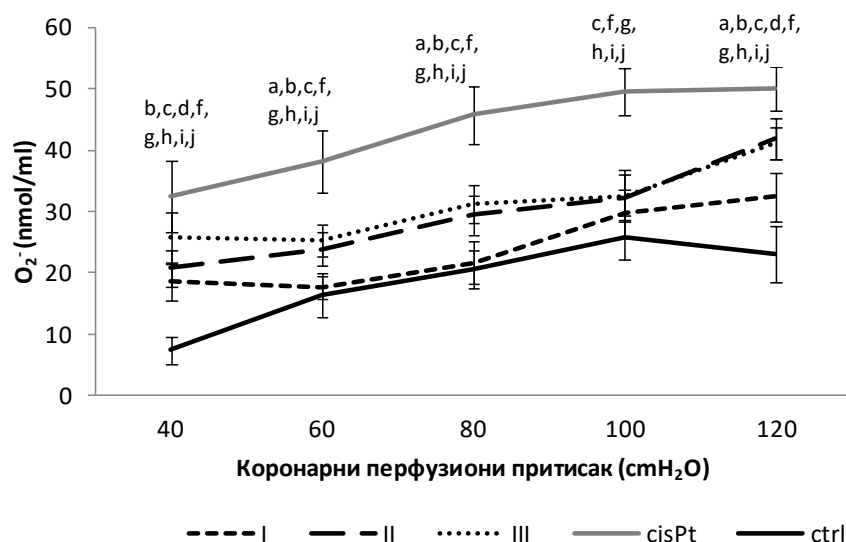




Графикон 127. Ефекти хроничне примене физиолошког раствора на вредности  $\text{NO}_2^-$  нитрита у коронарном венском ефлуенту у контролним и експерименталним условима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

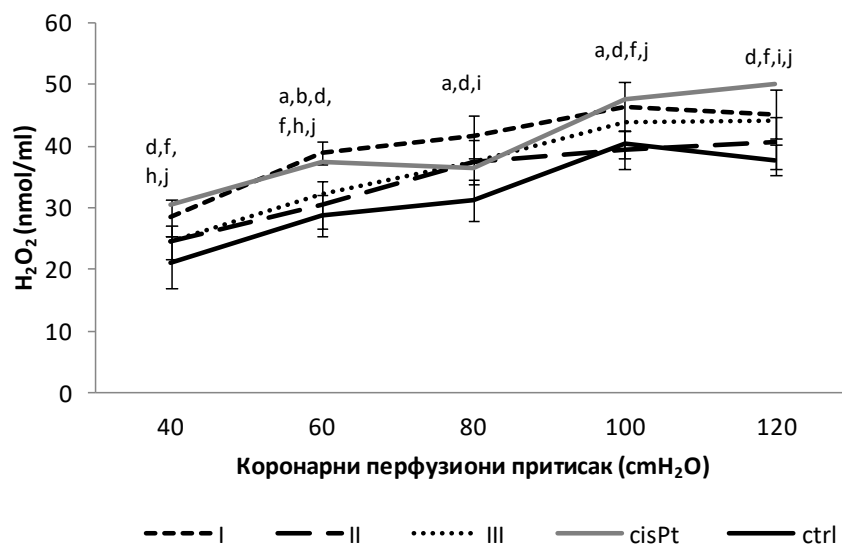
#### 4.3.6. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $\text{O}_2^-$  - супероксид анјон радикала приказани су на Графикону 128. Концентрација  $\text{O}_2^-$  у коронарном венском ефлуенту се статистички значајно разликовала ( $p < 0,05$ ) између група на свим коронарним перфузионим притисцима. Најизраженије повећање нивоа супероксид анјон радикала изазвала је цисплатина и вредности овог параметра су биле статистички значајно веће на свим КПП у односу на све остале примењиване супстанце у овој студији. Најмањи утицај на повећање нивоа  $\text{O}_2^-$  имао је физиолошки раствор са статистички значајно нижим вредностима  $\text{O}_2^-$  у поређењу са свим групама на свим притисцима, осим са групом која је примала комплекс рутенијума са етилендиамином. Уједно, упоређујући потенцијал сва три комплекса рутенијума да изазову повећање нивоа супероксид анјон радикала уочили смо да је комплекс рутенијума са етилендиамином изазвао статистички значајно ниже вредности  $\text{O}_2^-$  у односу на комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном (на КПП 60, 80, 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ) и комплекс рутенијума са бипиридином (на свим КПП осим на 100  $\text{cmH}_2\text{O}$ ). Вредности супероксид анјон радикала између II и III групе се нис статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) на свим коронарним перфузионим притисцима.



Графикон 128. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности  $O_2^-$  - супероксид ањон радикала у коронарном венском ефлуенту. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $H_2O_2$  – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту приказани су на Графикону 129. Концентрација  $H_2O_2$  се статистички значајно разликовала ( $p < 0,05$ ) између група на свим коронарним перфузионим притисцима. Најизраженије повећање нивоа водоник пероксида индуковали су комплекс рутенијума са етилендиамином и цисплатина. Најмањи утицај на повећање нивоа  $H_2O_2$  имао је физиолошки раствор са статистички значајно нижим вредностима  $H_2O_2$  у поређењу са I групом и цисплатином на свим притисцима. Комплекси рутенијума остварили су различит утицај на повећање нивоа водоник пероксида, при чему је комплекс рутенијума са етилендиамином изазвао статистички значајно више вредности ( $p < 0,05$ )  $H_2O_2$  у односу на комплексе рутенијума са диаминоциклохексаном (на КПП 60-100 cmH<sub>2</sub>O) и биридином (на КПП 60 cmH<sub>2</sub>O). Вредности водоник пероксида између II и III групе се нису статистички значајно разликовале ( $p > 0,05$ ) на свим коронарним перфузионим притисцима.



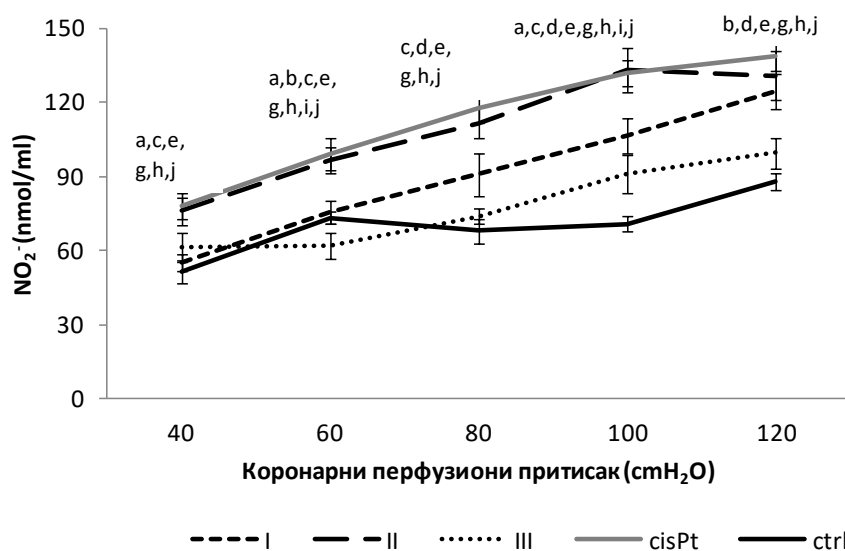
Графикон 129. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију TBARS – индекс липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту приказани су на Графикону 130. Ниво TBARS се статистички значајно разликовао ( $p < 0,05$ ) између група на свим коронарним перфузионим притисцима, осим на 120 cmH<sub>2</sub>O. Најизраженије повећање нивоа индекса липидне пероксидације индуковали су комплекс рутенијума са етилендиамином и бипиридином, као и цисплатина. Најмањи утицај на повећање нивоа TBARS имао је комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном са статистички значајно нижим вредностима TBARS у поређењу са III групом и цисплатином на притисцима од 80 и 100 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ).



Графикон 130. Поређење ефеката хроничне примене једињеа на вредност TBARS – индекса липиде пероксидације у коронарном венском ефлунту. Резултати су представљени као средња вредност и стандарда девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у коронарном венском ефлунту приказани су на Графикону 131. Ниво нитрита се статистички значајно разликовао ( $p < 0,05$ ) између група на свим коронарним перфузионим притисцима. Примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатина индуковали су повећану продукцију  $\text{NO}_2^-$ . Најслабији утицај на стварање нитрита остварио је комплекс са бипиридинским лигандом приближавајући се вредностима у контролној групи на свим коронарним перфузионим притисцима.

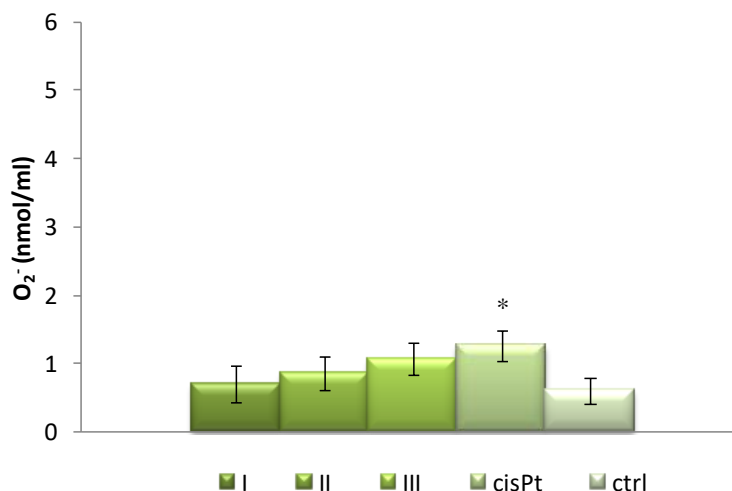


Графикон 131. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у коронарном венском ефлунту. Резултати су представљени као средња вредност и стандарда девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група на различитим коронарним притисцима одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

#### 4.3.7. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметр системског оксидационог стреса у плазми

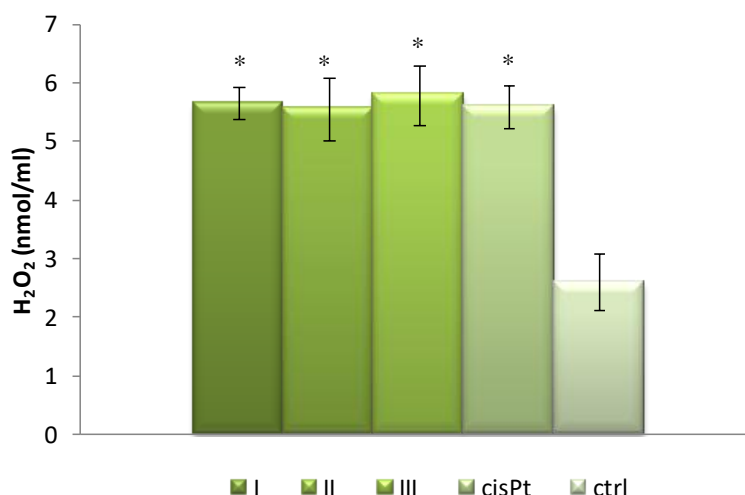
Поређење ефеката хроничне интраперитонеалне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $\text{O}_2^-$  - супероксид анјон радикала у плазми приказани су на Графикону 132. Концентрација  $\text{O}_2^-$  је статистички значајно била повишена ( $p < 0,05$ ) у групи пацова који су примали цисплатину у односу на контролни третман. Ниво

супероксид анјон радикала се није статистички значајно разликовао међу групама комплекса рутенијума ( $p > 0,05$ ).



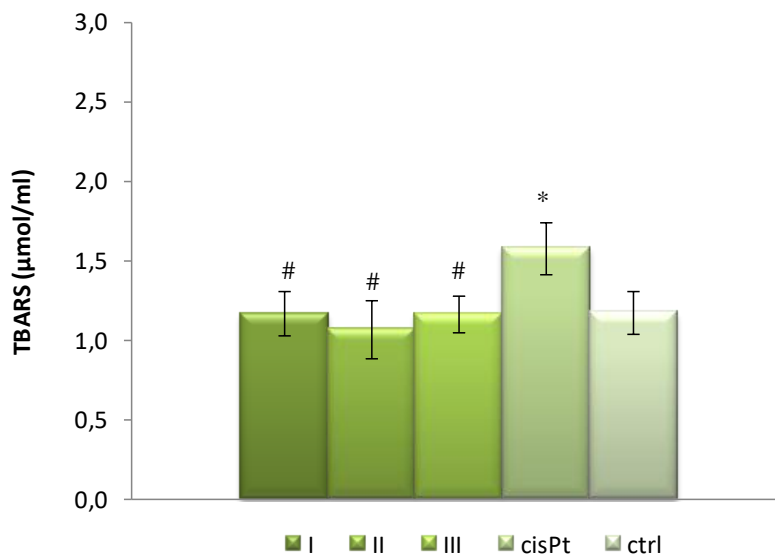
Графикон 132. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности  $O_2^-$  - супероксид анјон радикала у плазми. Резулти су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболом \* - поређење са контролом.

Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $H_2O_2$  – водоник пероксида у плазми приказани су на Графикону 133. Статистички значајно повећана концентрација  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ) је уочена код сва три комплекса рутенијума као и дисплатине, у поређењу са контролном групом ( $p > 0,05$ ). Концентрација водоник пероксида се није статистички значајно разликовала између група које су примале комплексе рутенијума ( $p > 0,05$ ).



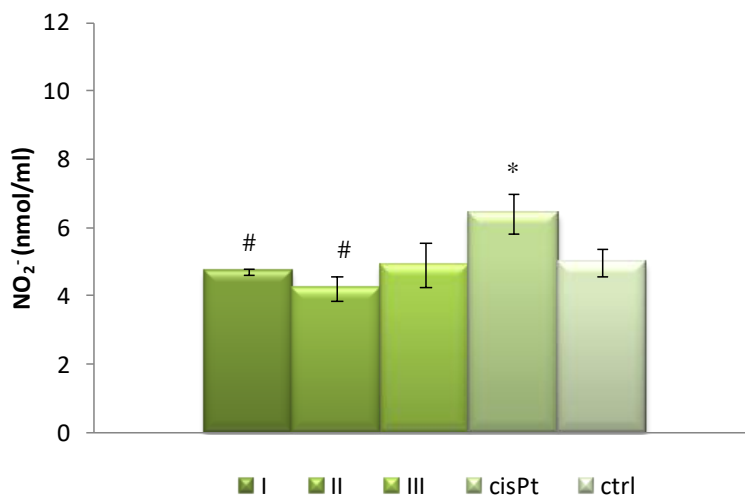
Графикон 133. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности  $H_2O_2$  – водоник пероксида у плазми. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболом \* - поређење са контролом.

Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију TBARS – индекса липидне пероксидације у плазми приказани су на Графикону 134. Ниво TBARS је статистички значајно био већи у групи цисплатине у поређењу са применом сва три комплекса рутенијума и у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ). Најизраженије повећање нивоа индекса липидне пероксидације индуковала је примена цисплатине. Концентрација TBARS се није статистички значајно разликовала између група које су примале комплексе рутенијума ( $p > 0,05$ ).



Графикон 134. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у плазми. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

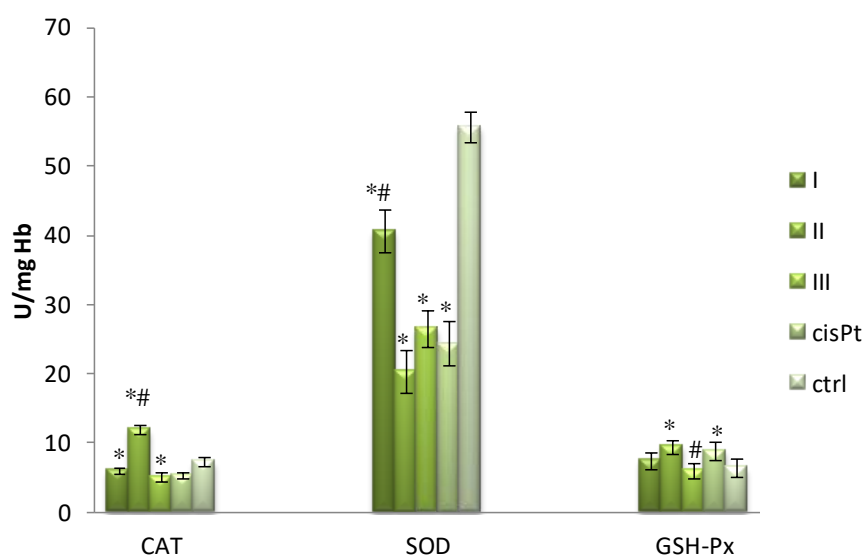
Поређење утицаја хроничне примене свих испитиваних супстанци на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у плазми приказани су на Графикону 135. Примена цисплатине је изазвала статистички значајно већу продукцију  $\text{NO}_2^-$  у поређењу са применом комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином, као и физиолошког раствора ( $p < 0,05$ ).



Графикон 135. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности  $\text{NO}_2^-$  – нитрита у плазми. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

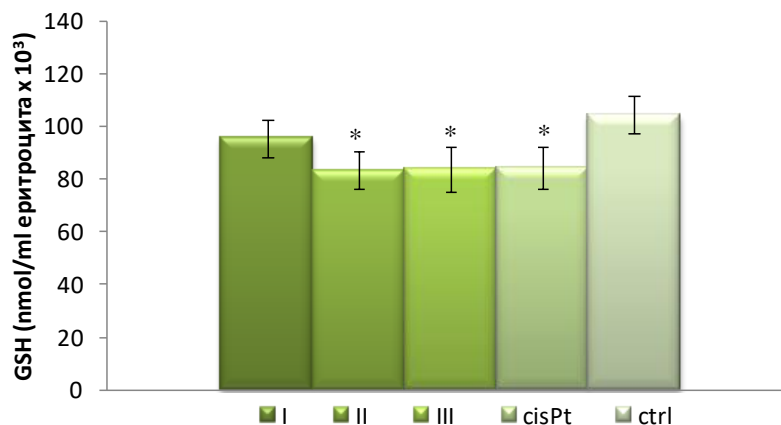
#### 4.3.8. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметре ензима антиоксидационе заштите у еритроцитима

Поређење ефеката хроничне примене свих испитиваних супстанци на активност ензима CAT (каталазе), SOD (супероксид дисмутаза) и GSH-Px (глутатион пероксидаза) у еритроцитима приказани су на Графикону 136. Активност CAT - каталазе је статистици значјно била већа у груп пацова која је добијала комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном у односу на контролни третман и цисплатину, док је у групама остала два комплекса рутенијума активност овог ензима била статистици значјно снижена у односу на контролу ( $p < 0,05$ ). Активност SOD - супероксид дисмутаза је статистички значајно била снижена у свим групама комплекса рутенијума као и цисплатине, у поређењу са контролом, с тим да је активност била значајно већа у групи која је примала комплекс рутенијума са етилендиамином у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ). Активност GSH-Px - глутатион пероксидаза у еритроцитима је била статстички значајно већа у групи комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном као и цисплатине, у поређењу са контролом, а поред тога активност овог ензима је била значајно снижена у групи кој је примала комплекс рутенијума са бипиридином у односу на примену цисплатине ( $p < 0,05$ ).



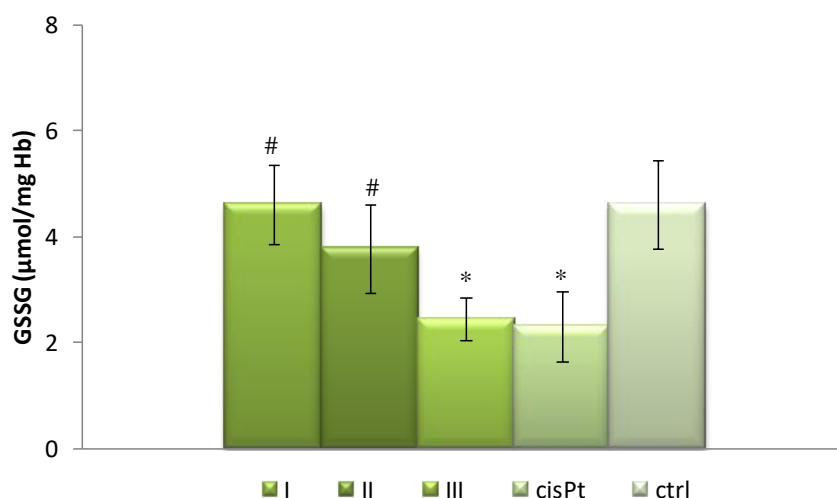
Графикон 136. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности ензима антиоксидационе заштите у еритроцитима (CAT – каталаза, SOD – супероксид дисмутаза, GSH-Px – глутатион пероксидаза). Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на вредности GSH – редукованог глутатиона у еритроцитима приказани су на Графикону 137. Концентрација GSH је статистички значајно била мања у групама животиња које су примале комплексе рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином као и цисплатину, у односу на контролни третман ( $p < 0,05$ ).



Графикон 137. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности GSH – редукованог глутатиона у еритроцитима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболом: \* - поређење са контролом.

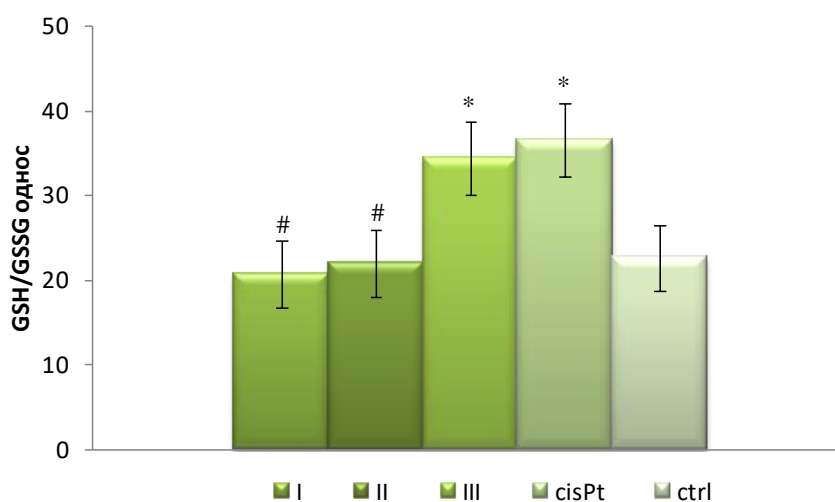
Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на вредности GSSG – оксидованог глутатиона у еритроцитима приказани су на Графикону 138. Концентрација GSSG је била статистички значајно већа у групама животиња кој су примале комплексе рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном, у односу на цисплатину ( $p < 0,05$ ). Примена комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине је довела до статистички значајно мањих концентрација оксидованог глутатиона у еритроцитима, у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ).





Графикон 138. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности GSSG – оксидованог глутатиона у еритроцитима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

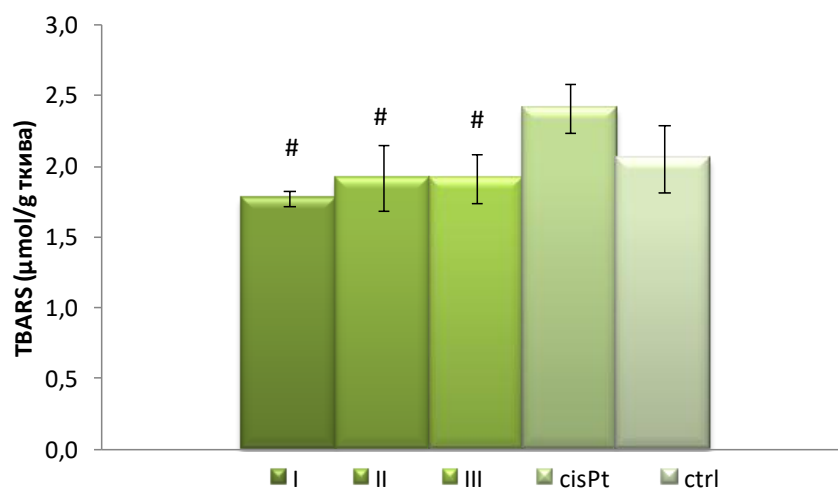
Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на вредности GSH/GSSG – односа између редукованог и оксидованог глутатиона у еритроцитима приказани су на Графикону 139. Вредност GSH/GSSG је била статистички значјно мања у групама животиња које су примале комплексе рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном, у односу на цисплатину ( $p < 0,05$ ). Примена комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине је довела до статистички значајно већих вредности односа између редукованог и оксидованог глутатиона у еритроцитима, у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ).



Графикон 139. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности GSH/GSSG – односа између редукованог и оксидованог глутатиона у еритроцитима. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

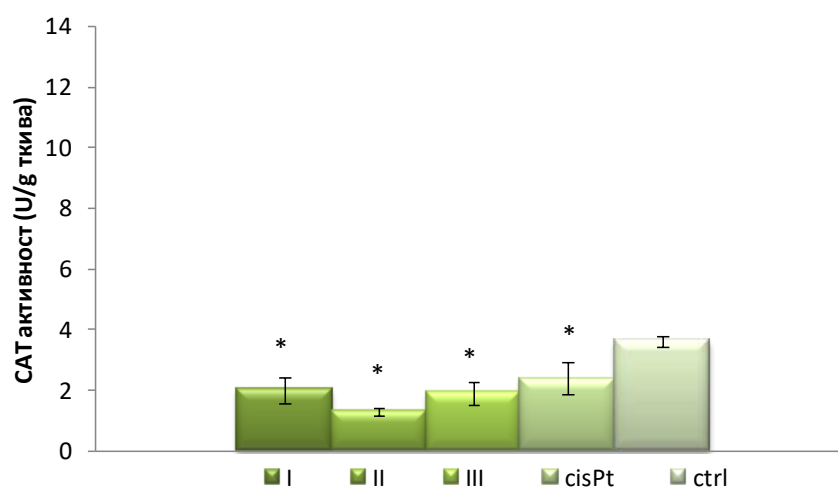
#### 4.3.9. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на параметре оксидационог стреса у срчаном ткиву

Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на концентрацију TBARS – индекса липидне пероксидације у срчаном ткиву приказани су на Графикону 140. Хронична примена сва три комплекса рутенијума је индуковала статистички значајну мању концентрацију TBARS у срчаном ткиву у поређењу са применом цисплатине ( $p < 0,05$ ).



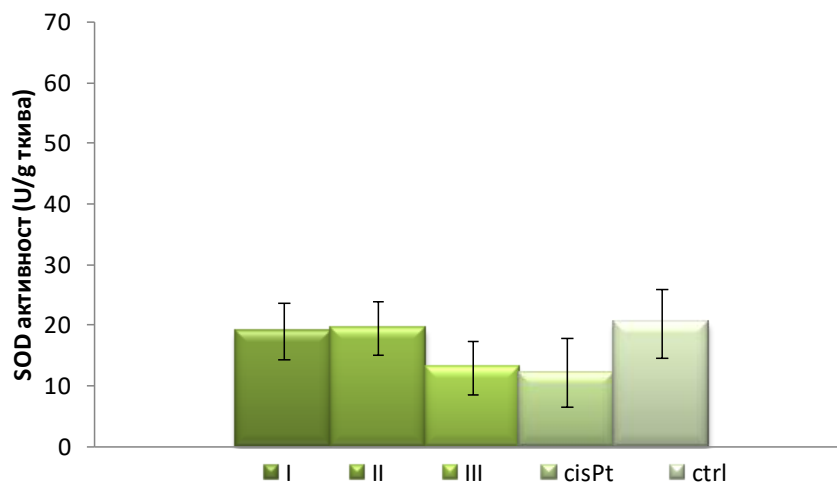
Графикон 140. Поређење ефеката хроничне примене испитваних супстанци на вредности TBARS – индекса липидне пероксидације у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

Поређење ефеката хроничне примене испитваних једињења на активност САТ - каталазе у срчаном ткиву приказани су на Графикону 141. Хронична примена сва три комплекса рутенијума као и цисплатине је изазвала статистички значајно снижену активност каталазе у срчаном ткиву у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ).



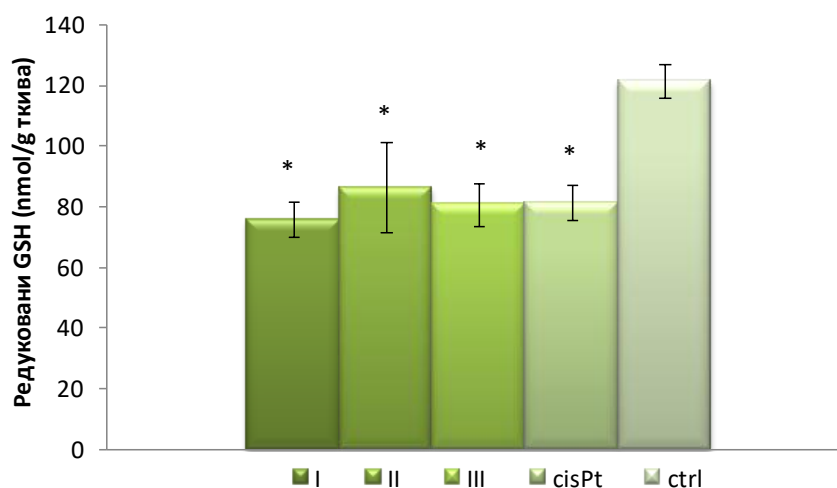
Графикон 141. Поређење ефеката хроничне примене испитваних једињења на активност САТ - каталазе у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на активност SOD – супероксид дисмутазе у срчаном ткиву приказани су на Графикону 142. Хронична примена испитиваних једињења није изазвала статистички значајне разлике у активности супероксид дисмутазе у срчаном ткиву између њих ( $p > 0,05$ ).



Графикон 142. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на активност SOD – супероксид дисмутазе у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

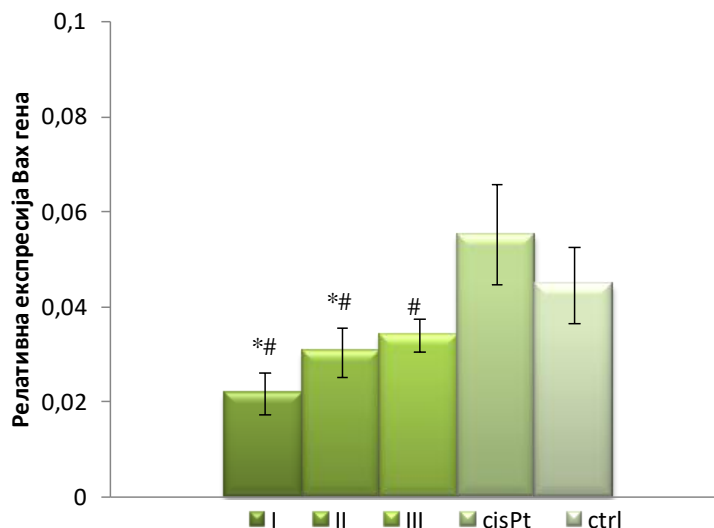
Поређење ефеката хроничне примене испитиваних супстанци на вредности GSH – редукованог глутатиона у срчаном ткиву приказани су на Графикону 143. Концентрација GSH у срчаном ткиву је статистички значајно била мања у групама животиња које су примале комплексе рутенијума као и цисплатину, у односу на контролни третман ( $p < 0,05$ ).



Графикон 143. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности GSH – редукованог глутатиона у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболом: \* - поређење са контролом.

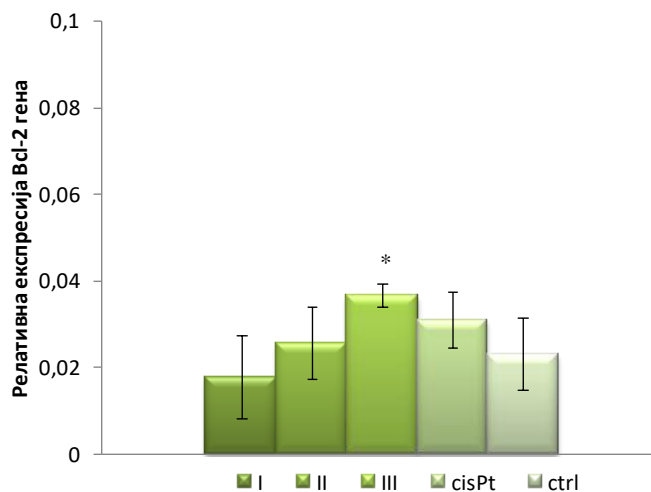
#### 4.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере апоптозе у срчаном ткиву

Хронична администрација сва три комплекса рутенијума изазвала је значајно нижу релативну експресију гена за проапоптотски молекул Вах у поређењу са третманом цисплатине. Релативна експресија Вах гена је била статистички значајно нижа у групама пацова који су примали комплекс рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ), док је међу групама комплекса рутенијума, комплекс са бипиридинским лигандом изазвао највећу релативну експресију Вах гена (Графикон 144).



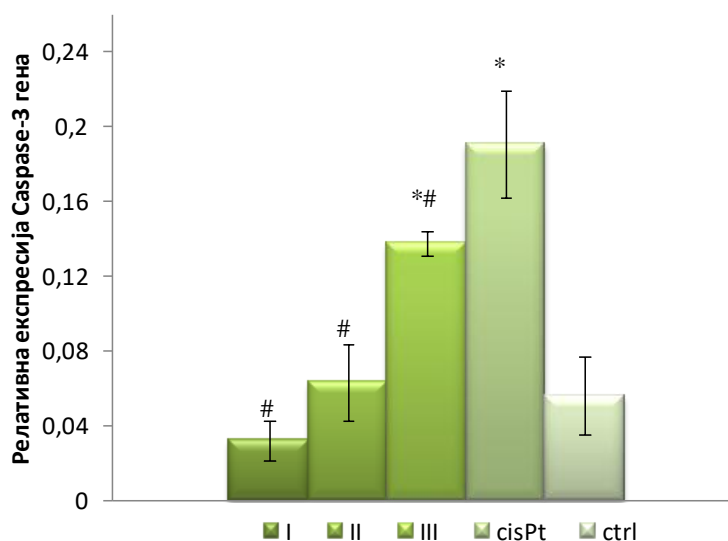
Графикон 144. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на релативну експресију Вах гена у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

Релативна експресија гена за антиапоптотски маркер Bcl-2 је остала готово непромењена након примене свих комплекса рутенијума у поређењу са цисплатином и контролом ( $p > 0,05$ ), с тим да је примена комплекса рутенијума са бипиридином довела до статистички значајно веће релативне експресије овог гена у поређењу са контролом ( $p < 0,05$ ) (Графикон 145).



Графикон 145. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на релативну експресију Bcl-2 гена у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

Релативна експресија гена за проапоптотски маркер каспазу-3 је била значајно нижа код свих група рутенијума у поређењу са цисплатином, са најмањом релативном експресијом у групи пацова која је примала комплекс рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ). Међу групама рутенијума, срца пацова у III групи имала су највећу релативну експресију каспаза-3 гена ( $p < 0,05$ ) (Графикон 146).

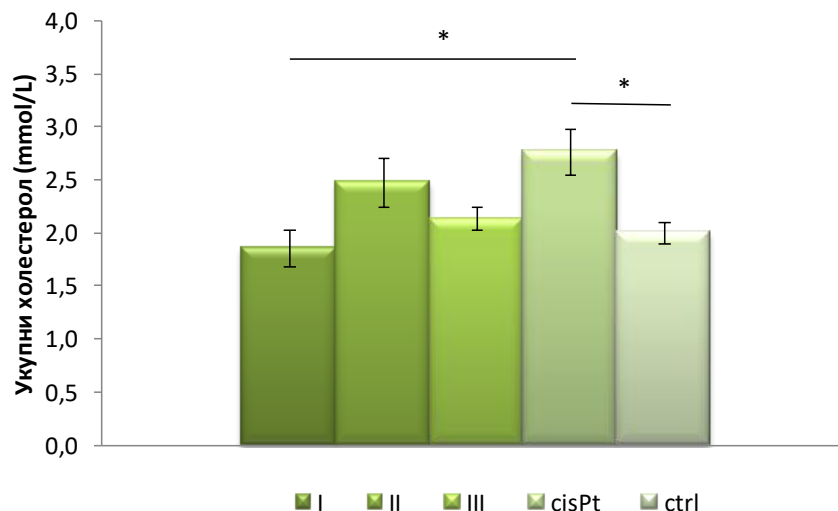


Графикон 146. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на релативну експресију каспаза-3 гена у срчаном ткиву. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане симболима: \* - поређење са контролом; # - поређење са цисплатином.

#### 4.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на биохемијске маркере у серуму

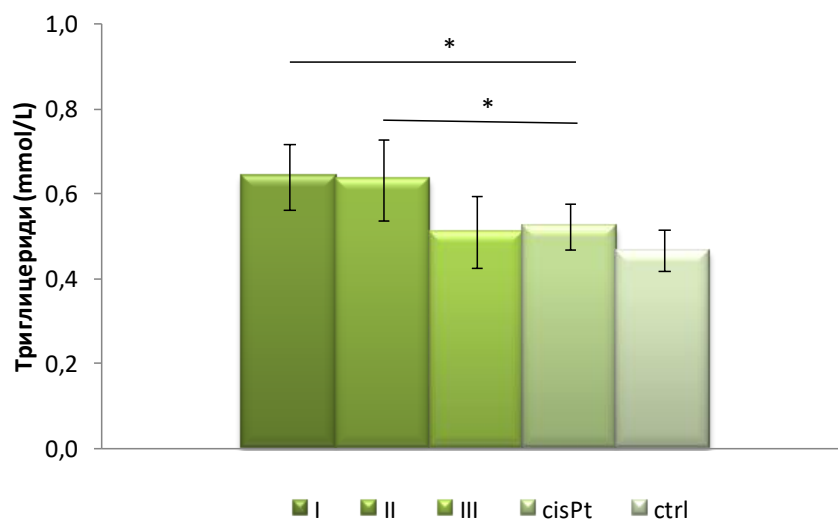
##### 4.5.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на липидни профил у серуму

Поређењем ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности укупног холестерола у серуму утврдили смо да је цисплатина изазвала статистички значајно повећање вредности овог маркера у односу на комплекс рутенијума са етилендиамином и контролном групом ( $p < 0,05$ ). Најмањи утицај на вредности укупног холестерола у серуму имао је комплекс рутенијума са етилендиамином (Графикон 147).



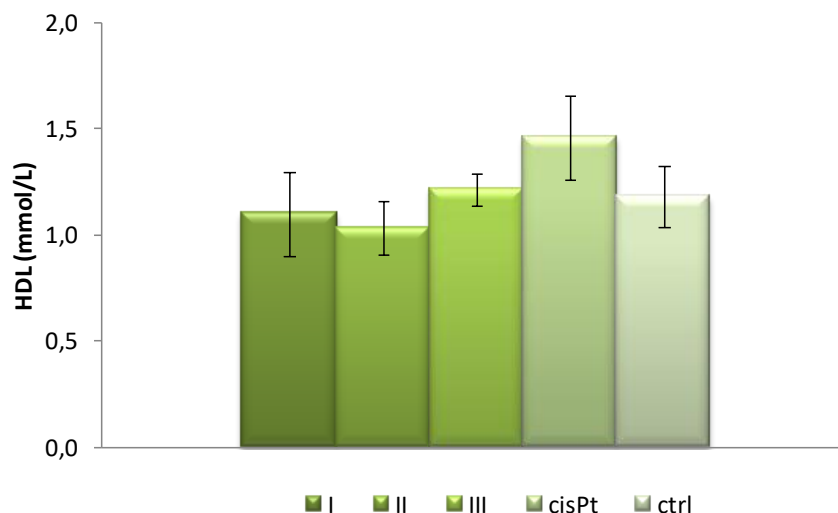
Графикон 147. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности укупног холестерола у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између група одређене су ANOVA тестом. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном изазвала је статистички значајан пораст вредности триглицерида у серуму пацова у поређењу са применом цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 148).



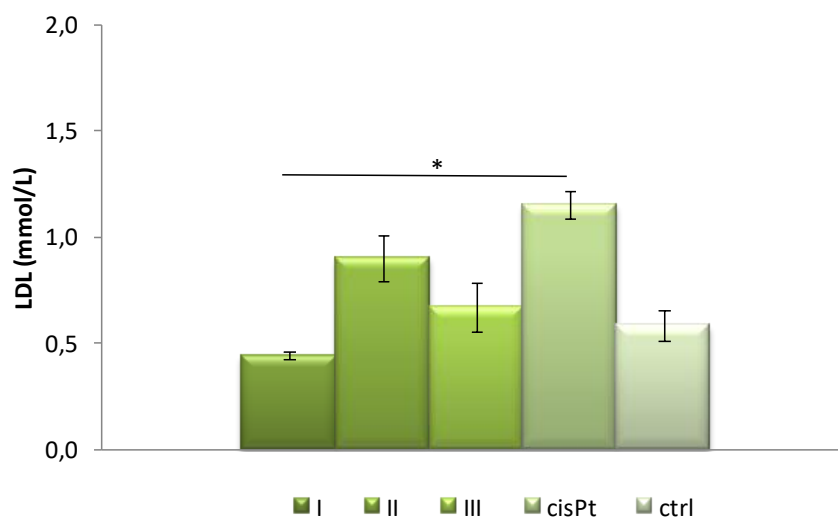
Графикон 148. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности триглицерида у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између група одређене су ANOVA тестом. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

Примена испитиваних једињења није имала значајног утицаја на повећање нивоа липопротеина велике густине у серуму ( $p > 0,05$ ) (Графикон 149).



Графикон 149. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности HDL - липопротеина велике густине у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

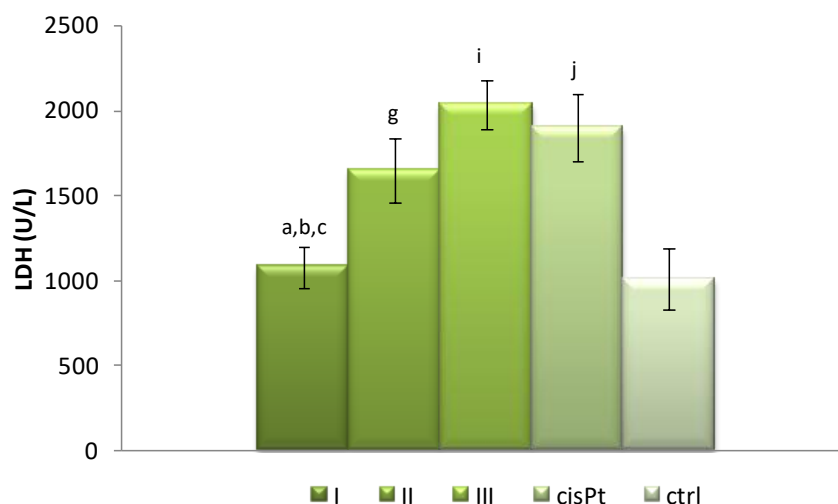
Примена цисплатине индуковала је статистички значајно повишене вредности липопротеина мале густине у серуму пацова у поређењу са применом комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 150).



Графикон 150. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности LDL - липопротеина мале густине у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике између група одређене су ANOVA тестом. Ниво значајности од 0,05 ( $p < 0,05$ ) је приказан звездицом \*.

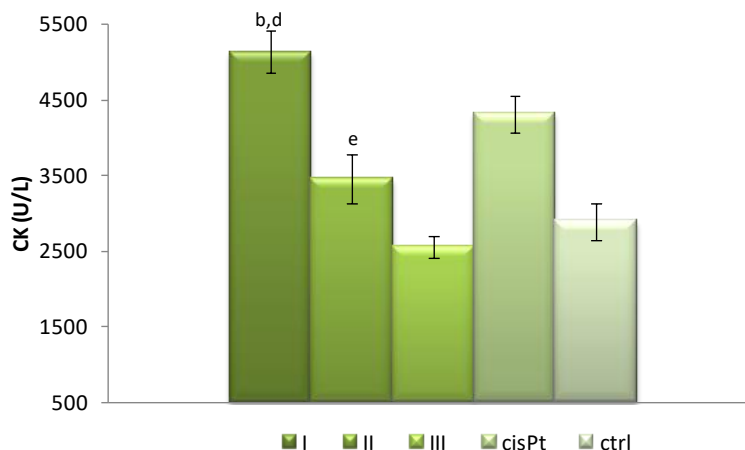
#### 4.5.2. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције срца у серуму

Поређењем ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности лактат дехидрогеназе у серуму утврдили смо да је примена свих супстанци осим комплекса рутенијума са етилендиамином изазвала статистички значајно повећање нивоа овог маркера у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ). Такође смо уочили да је примена комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатине довела до значајног повећања вредности LDH и у поређењу са применом комплекса рутенијума са етилендиамином (Графикон 151).



Графикон 151. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности LDH - лактат дехидрогеназе у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

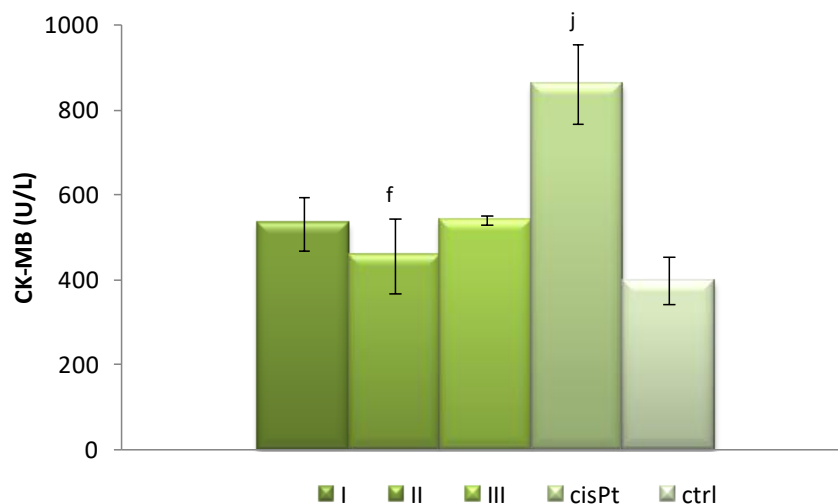
Примена комплекса рутенијума са етилендиамином индуковала је статистички значајно повећање нивоа креатин киназе у серуму у поређењу са применом комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатином. Уједно је и примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном изазвала значајно више вредности овог маркера у серуму у односу на примена комплекса са бипиридином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 152).





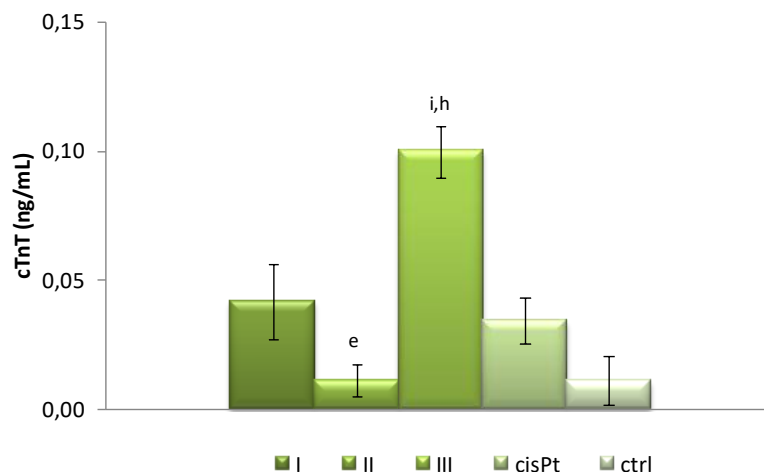
Графикон 152. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности СК – креатин киназе у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

Хронична примена цисплатине је изазвала статистички значајан пораст креатин киназе-МВ серуму у поређењу са применом комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и контролном групом ( $p < 0,05$ ) (Графикон 153).



Графикон 153. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности СК-МВ – креатин киназе-МВ у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

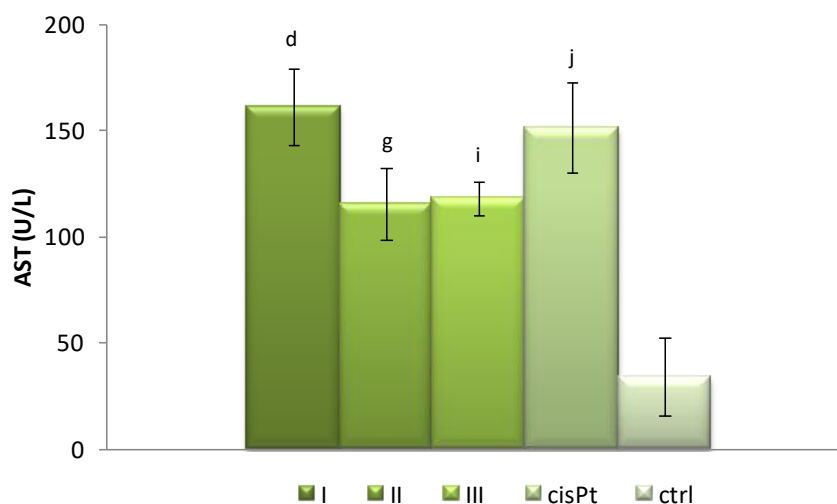
Примена комплекса рутенијума са биридином је изазвала статистички значајно више вредности кардио тропонина Т у серуму пацова у поређењу са применом свих осталих супстанци, осим комплекса рутенијума са етилендиамином ( $p < 0,05$ ) (Графикон 154).



Графикон 154. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности cTnT –тропонина Т у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

#### 4.5.3. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције јетре у серуму

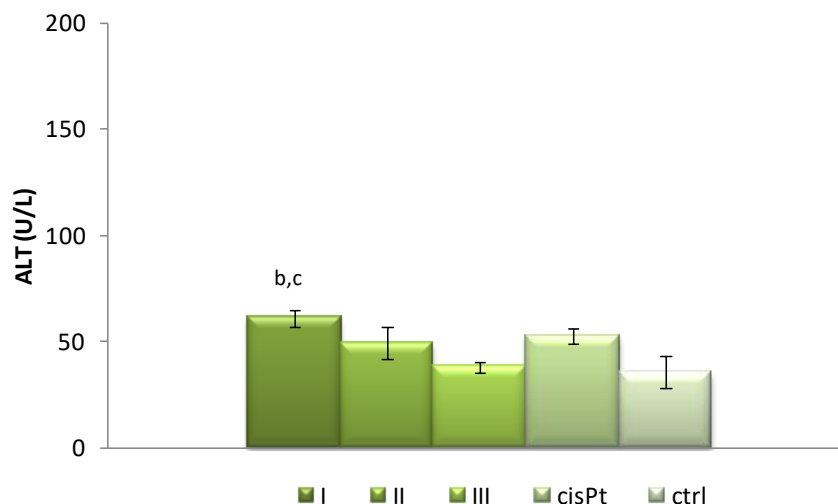
Примена свих испитиваних супстанци изазвала је пораст активности ензима аспарат аминотрансферазе у серум пацова у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ). Међу комплексима рутенијума, комплекс са етилендиаминским лигандом се издвојио са највећим утицајем на повећање нивоа AST (Графикон 155).



Графикон 155. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности AST - аспарат аминотрансферазе у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ )

између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

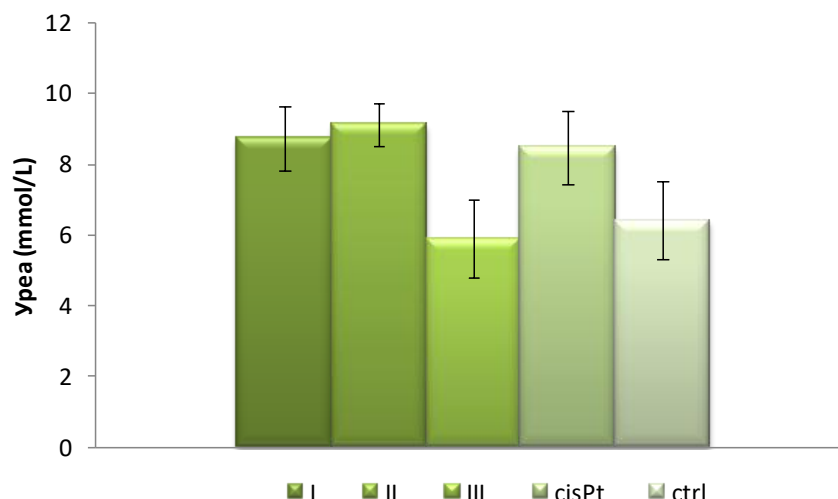
Поређењем утицаја свих испитиваних супстанци на ниво ензима аланин аминотрансферазе у серуму уочено је да је примена комплекса са етилендиамином индуковала је статистички значајан пораст активности ALT у односу на III групу и групу цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 156).



Графикон 156. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности ALT - аланин аминотрансферазе у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значјне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

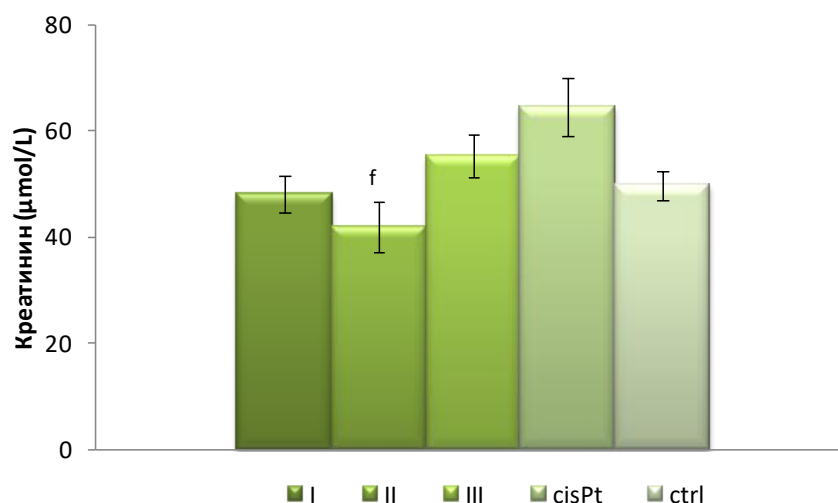
#### 4.5.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере функције бубрега у серуму

Примена свих испитиваних супстанци није довела до значајних разлика међу њима у нивоу урее у серуму пацова ( $p > 0,05$ ). Међу комплексима рутенијума, комплекси са етилендиамином и бипиридином су довели до пораста вредности урее слично као и у групи цисплатине, али оне нису биле статистички значајно веће у односу на контролну групу (Графикон 157).



Графикон 157. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности уреје у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD).

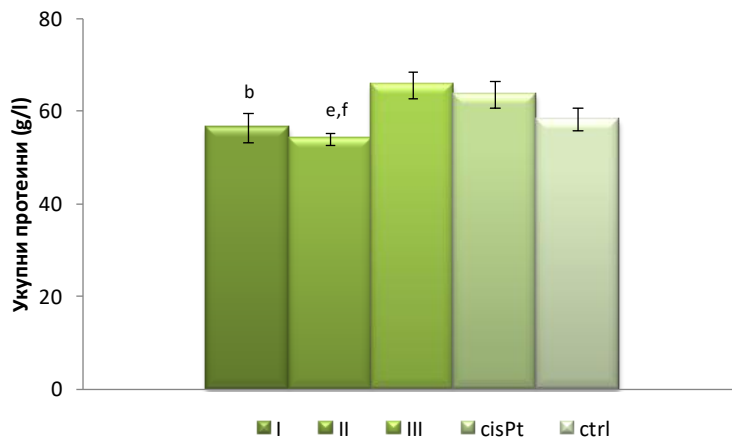
Поређењем ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности креатинина у серуму утврдили смо да је примена цисплатине изазвала статистички значајно повећање нивоа креатинина у односу на примену комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном ( $p < 0,05$ ) (Графикон 158).



Графикон 158. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности креатинина у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су ANOVA тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

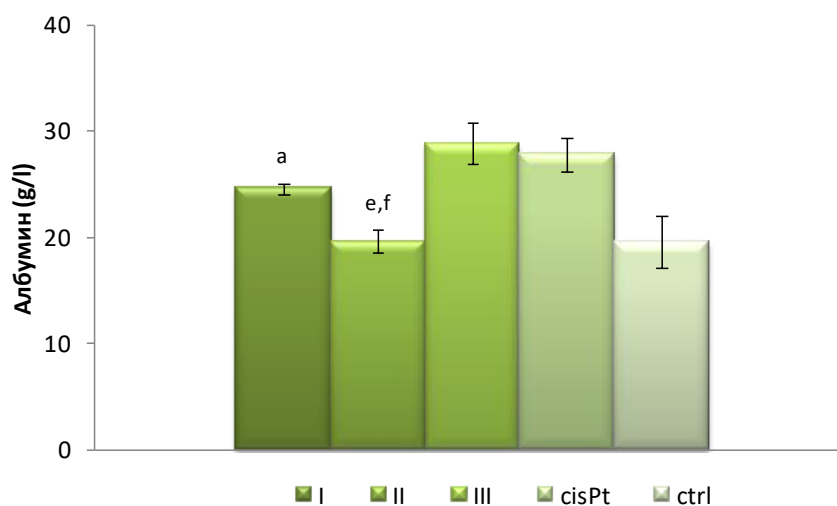
## 4.5.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на протеине у серуму

Примена комплекса са бипиридином је изазвала статистички значајан пораст концентрације укупних протеина у сеуму пацова у поређењу са применом остала два комплекса рутенијума ( $p < 0,05$ ) (Графикон 159).



Графикон 159. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности укупних протеина у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

Хронична администрација комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном је довела до статистички значајног снижења албумина у серуму пацова у поређењу са применом остала два комплекса рутенијума и цисплатине ( $p < 0,05$ ) (Графикон 160).

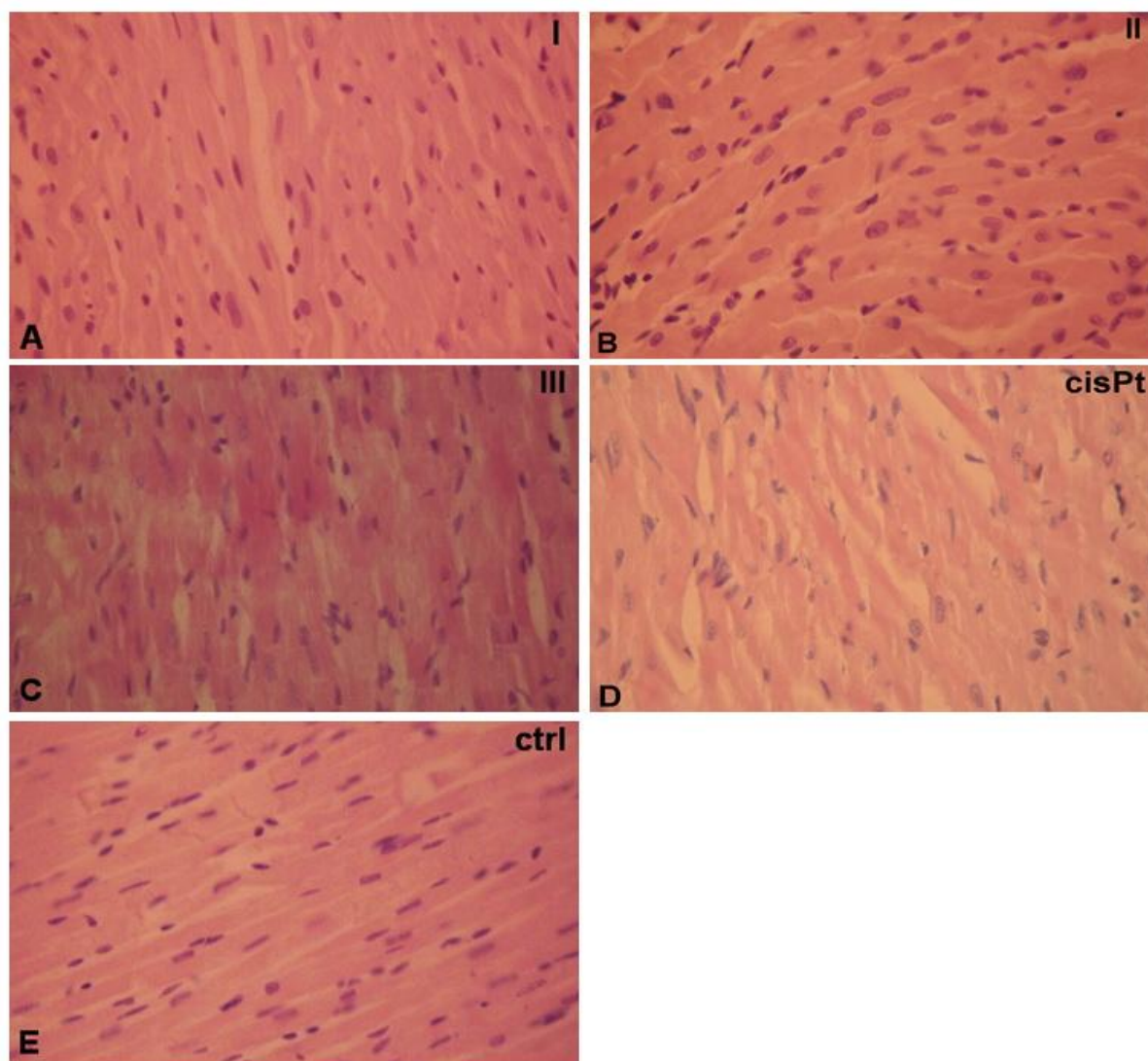


Графикон 160. Поређење ефеката хроничне примене испитиваних једињења на вредности албумина у серуму. Резултати су представљени као средња вредност и стандардна девијација (SD). Статистички значајне разлике ( $p < 0,05$ ) између група одређене су *ANOVA* тестом и приказане словима: a – I vs II; b – I vs III; c – I vs cisPt; d – I vs ctrl; e – II vs III; f – II vs cisPt; g – II vs ctrl; h – III vs cisPt; i – III vs ctrl; j – cisPt vs ctrl.

#### 4.6. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене органа

##### 4.6.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на хистолошке промене у ткиву срца

Хронична интраперитонеална примена комплекса рутенијума са етилендиамином је изазвала одређене морфолошке промене у срчаном ткиву пацова. Мишићна влакна срца су већим делом у регуларном распореду, лако проширеног интерстицијума, са знацима лакостепене хипертофије. Једра мишићних ћелија су полиморфна и лако увећана са дисперзно расутиим хроматином (Слика 4А). С друге стране, хистолошка анализа срчаног ткива пацова који су примали комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном показала је ређа једра затупастог изгледа, што представља знак умерене хипертофије мишићних влакана. Једра мишићних ћелија су полиморфна и увећана, дисперзно расутог хроматина. Уочава се значајно смањена попречна испруганост мишићних влакана и фокално су присутна таласаста појединачна влакна, али без присутне стазе (Слика 4В). Хистопатолошким испитивањем срца пацова који су били изложени хроничном третману комплекса рутенијума са бипиридином уочили смо да су мишићна влакна местимично у ирегуларном распореду, са знацима исхемије и губитком попречне испруганости мишићних влакана. Такође смо забележили и присуство затупастих полиморфних једара (Слика 4С). Примена цисплатине је изазвала најозбиљније морфолошке промене срчаног ткива. Наиме, мишићна влакна су у ирегуларном распореду, хипертрофична, проширеног интерстицијума, са знацима фрагментације мишићних влакана и миоцитоллизе. Једра кардиомицита су благо полиморфна, хетерохроматична, са фокалним знацима хиперхромазије и пикнозе. Присутни су морфолошки знаци оштећења ћелија, без видљиве попречне испруганости мишићних влакана (Слика 4Д). Насупрот томе, примена физиолошког раствора очекивано није изазвала битне промене у хистолошкој грађи срца. Мишићна влакна су регуларног распореда, очуване грађе, уобичајене ширине интерстицијума, видљива је попречна испруганост мишићних влакана. Једра су еухроматична и издужена, уједначене величине (Слика 4Е).

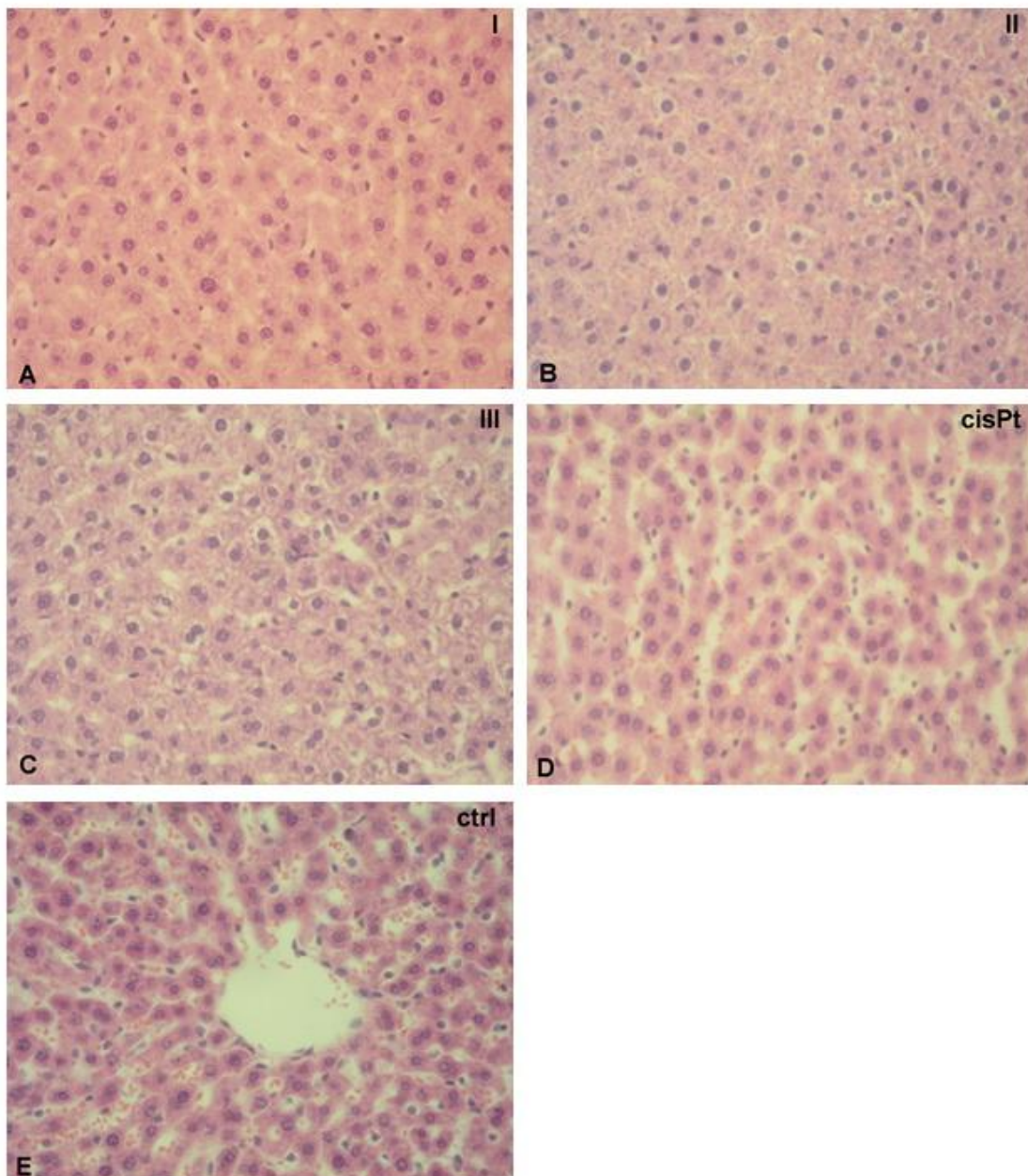


Слика 4. Приказ ткива миокарда обојеног хематоксилин/еозин методом (увећање 400х)

#### 4.6.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене у ткиву јетре

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином није изазвала значајне морфолошке промене у јетри пацова. Наиме, очувана је лобуларна грађа јетриног паренхима, хепатоцити су увећани, волуминозне светле цитоплазме испуњене гликогеном, са централно постављеним крупним једрима, регуларног распореда хроматина. Уочава се лакостепена стаза у капиларима (Слика 5А). Насупрот томе, комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном је изазвао значајно оштећење ткива јетре. Очувана је лобуларна грађа јетриног паренхима, хепатоцити су лако увећани, волуминозне светле цитоплазме испуњене мањом количином гликогена са централно постављеним једрима очуваних контура, са израженим дисперзно расутиим хетерохроматином, без кариолизе и некрозе. Међутим, присутна је значајна стаза и често перинуклеарно расветљење цитоплазме, слабије изражене ћелијске границе

(Слика 5В). Хронични третман комплексом рутенијума са бипиридином није изазвао значајне хистопатолошке промене у јетри пацова. Очувана је лобуларна грађа јетриног паренхима, хепатоцити су хипертрофични, волуминозне светле цитоплазме испуњене гликогеном, са централно постављеним једрима, дисперзно расутог хроматина. Не уочава се стаза, једра су еухроматична, нормалног облика. Фокално се уочавају крупне двоједарне ћелије светле цитоплазме (Слика 5С). С друге стране, примена цисплатине је довела до изражене стазе. Очувана је лобуларна грађа јетриног паренхима, али се на хистолошком препарату виде знаци свеже хеморагије у перивенуларним и синусоидним просторима. Ћелије су атрофичне и дифузно су присутне крупноједарне ћелије са кондензованим хроматином (Слика 5D). Као што је и очекивано, у контролној групи се бележи регуларна хистоморфолошка грађа паренхима јетре. Једра су уобичајене морфологије, еухроматична. Уочава се тамнија цитоплазма са нижим присуством гликогена, без присутне стазе у крвним ћелијама (Слика 5E).

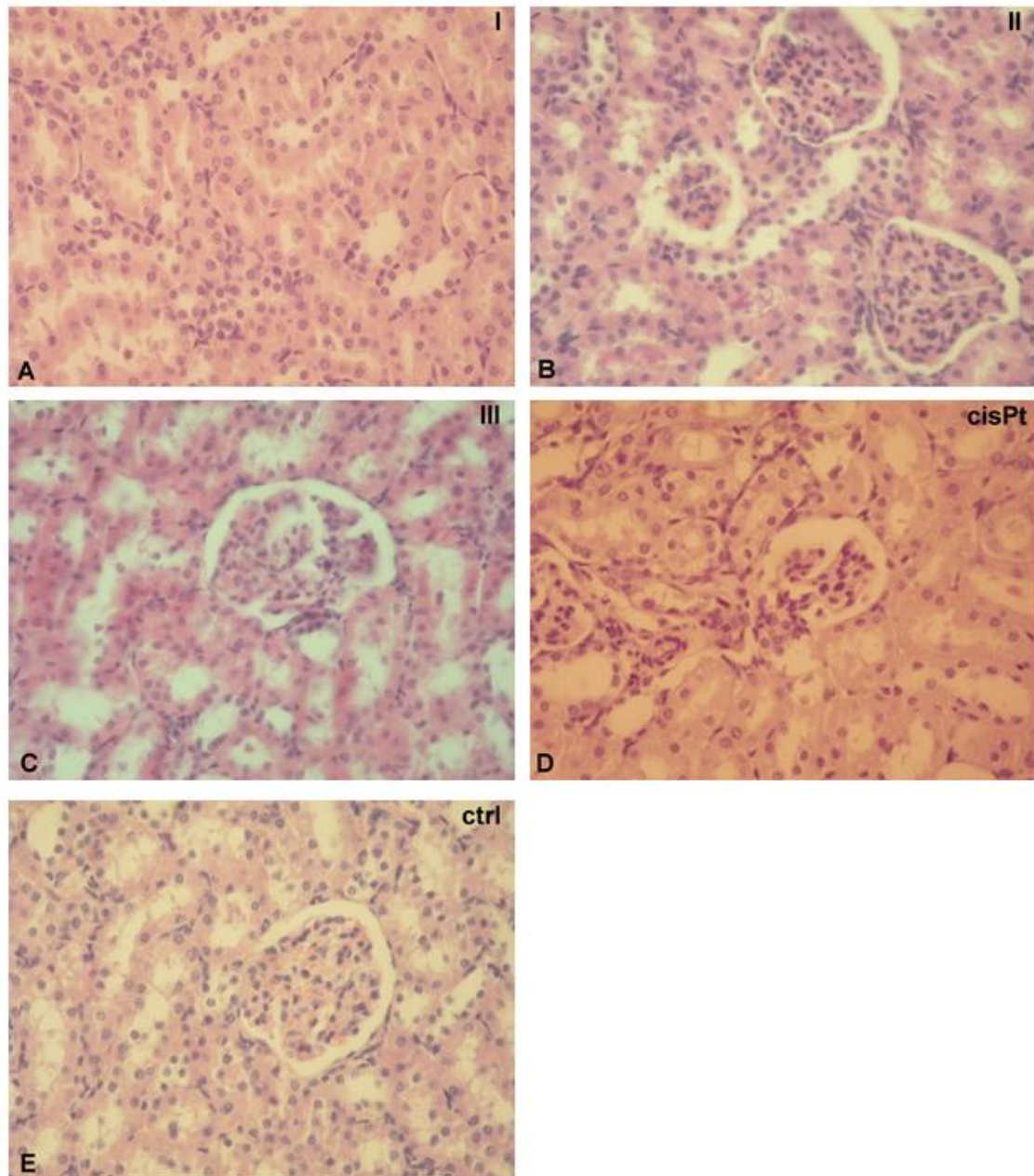


Слика 5. Приказ ткива јетре обојеног хематоксилин/еозин методом (увећање 400x)



#### 4.6.3. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене у ткиву бубрега

Комплекс рутенијума са етилендиамином је изазвао оштећење ткива бубрега. На препаратима се уочавају лако дилатирани лумени проксималних сабирних каналића, док су у тубуларном епителу присутни знаци умерено изражене вакуолизације и некрозе, без прекида континуитета тубулске базалне мембране. Бубрежни корпускули су очуване грађе са интактном Баумановом чауром, и присутна су оштећења тубуларног епитела са интратубуларним цитоплазматским садржајем (Слика 6А). Хронична интраперитонеална примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном је довела до сличних промена у грађи бубрега, с тим да се уочава поремећена архитектоника бубрежних тубула и изражено фокално присуство аморфног садржаја у тубулима. Бубрежни корпускули су ирегуларног облика са проширеним Баумановим простором. Фокално се јавља еозинофилни аморфни садржај у интеркапсуларном простору (Слика 6В). Комплекс рутенијума са бипиридином је довео до извесних морфолошких промена у бубрезима пацова. Забележени су лако дилатирани лумени појединих проксималних сабирних каналића, а у тубуларном епителу већине сабирних каналића присутни су знаци лакостепене вакуолизације и некрозе, без прекида континуитета тубулске базалне мембране. Проширен је интермембранозни простор и измењена је структура гломерула. Такође је присутан еозинофилни садржај у тубулима, са фокално збрисаном тубуларном структуром (Слика 6С). Најизраженије промене на нивоу ткива бубрега остварила је примена цисплатине. Наиме, лумени проксималних и дисталних сабирних каналића су дилатирани, изражена је вакуолизација и некроза тубулских ћелија, без прекида континуитета тубулске базалне мембране. Бубрежни корпускули су атрофични, тубуларни епител је оштећен, са знацима некрозе (Слика 6Д). У контролној групи бубрези су били очуване морфолошке грађе. Такође, гломерули су регуларне грађе, као и епител проксималних и дисталних тубула, без присуства дегенеративних промена (Слика 6Е).



Слика 6. Приказ ткива бубрега обојеног хематоксилин/еозин методом (увећање 400x)

#### 4.7. Анализа корелације између свих кардиодинамских параметара свих експерименталних група са вредностима маркера оксидационог стреса

Анализом корелације утврђена је статистички значајна умерена повезаност максималне стопе развоја притиса у левој комори, систолог притисака и коронарног протка са концентрацијом индекса липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту. Умерена негативна корелација је такође утврђена између минималне стопе развоја притиса у левој комори и концентрације водоник пероксида у коронарном ефлуенту, као и јака негативна корелација са концентрацијом индекса липидне пероксидације. Између

коронарног протока и концентрације водоник пероксида и нитрита у ефлуенту је такође уочена умерена повезаност. Међутим, дијастолни притисак и прооксидациони параметри у ефлуенту не корелирају, као ни ниједан кардиодинамски параметар и концентрација супероксид анјон радикала (Табела 14).

Табела 14. *Pearson*-ов коефицијент корелације ( $r$ ) и статистичка значајност ( $p$ ) анализе корелације између свих кардиодинамских параметара и параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту. *Pearson*-ов коефицијент корелације: приказане су само вредности умерене корелације  $0,3 < r < 0,7$  и јаке корелације  $0,7 < r < 1$  за параметре за које је утврђена корелација. Знак - означава негативну повезаност, а знак / да нема корелације између датих параметара.

	$H_2O_2$	TBARS	$NO_2^-$
<b>Dp/dt max</b>	/	$r = 0,589$ $p = 0,002$	/
<b>Dp/dt min</b>	$r = -0,558$ $p = 0,004$	$r = -0,716$ $p = 0,000$	/
<b>SLVP</b>	/	$r = 0,424$ $p = 0,035$	/
<b>CF</b>	$r = 0,638$ $p = 0,001$	$r = 0,751$ $p = 0,000$	$r = 0,494$ $p = 0,012$

**V**

**ДИСКУСИЈА**

## 5. ДИСКУСИЈА

Главни циљ овог истраживања је био да се испитају и упореде ефекти три комплекса рутенијума са антитуморским дејством, на срце и коронарну циркулацију, и упореде са цисплатином као референтним хемиотерапеутиком. Функцију миокарда смо процењивали на експерименталном *Langendorff*-овом моделу изолованог срца пацова које се ретроградно перфундовало Krebs-Henseleit-овим раствором, методом ауторегулације. У циљу расветљавања механизма којим наведене супстанце доводе до извесних кардиотоксичних ефеката испитивали смо улогу оксидационог стреса, а такође покушали и да објаснимо механизме смрти кардиомиоцита путем индиректног испитивања апоптотских путева у хомогенату ткива срца. Поред тога, желели смо да утврдимо и промене на биохемијском нивоу које настају у организму након хроничне системске примене поменутих супстанци, чиме смо указали на постојање не само кардиотоксичних, већ и нефротоксичних и хепатотоксичних ефеката, а ове налазе смо поткрепили и доказима на нивоу морфологије срца, бубрега и јетре пацова. Тиме смо стекли потпунију слику у саму проблематику и истраживање системских ефеката комплекса рутенијума и компаративне анализе са цисплатином. У том смислу, а према доступним подацима из литературе, дизајн наше студије је јединствен и представља прво истраживање оваквих токсичних ефеката поменутих комплекса рутенијума, не само у нашој замљи, већ и шире.

### 5.1. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на морфометријске карактеристике

У овој студији најпре смо пратили раст телесне масе пацова током четири недеље интраперитонеалне примене испитиваних супстанци ради процене да ли различити комплекси рутенијума и цисплатине имају утицај на телесну масу животиња. Тиме смо уједно дошли и до података о ефектима ових супстанци на сам метаболизам организма, као и о њиховој системској токсичности. Током праћења телесне масе за време трајања експерименталног третмана, приметили смо да је највећи пораст телесне масе очекивано остварен у контролној групи која је примала физиолошки раствор, али и у групи која је примала комплекс рутенијума са *dach* лигандом. За разлику од овог резултата, група животиња која је третирана цисплатином имала је најмањи раст телесне масе током експерименталног периода. Интересантно је да се вредности телесне масе између група нису статистички значајно разликовале у првој и другој недељи примене испитиваних супстанци, већ је до скока телесне масе дошло тек у трећој и четвртој недељи хроничног третмана пацова и то након примене комплекса рутенијума са *dach* лигандом (Графикон 1 и Табела 1). Такође, финална телесна маса је била значајно већа у односу на почетну телесну масу и код пацова третираних комплексом рутенијума са *bpu* лигандом, тако да се може закључити да ова два комплекса не ремете процесе метаболизма. Од комплекса рутенијума, најмањи пораст телесне масе забележен је код пацова третираних комплексом рутенијума са *en* лигандом (Графикон 2). Наши налази су у сагласности са резултатима бројним публикованим студијама (Wang и др, 2020). Једна од њих је и студија *Alves de Souza* и сарадника који су испитивали *in vivo* антитуморску активност комплекса рутенијума(II) и поредили његове токсичне ефекте са цисплатином (Alves de

Souza и др, 2017). Комплекс рутенијума(II) се давао пацовима сваког трећег дана током укупно 13 дана (са циљем смањења токсичности) у дози од 5 или 10 mg/kg, при чему није изазвао губитак телесне масе животиња, за разлику од примене цисплатине у дози од 2 mg/kg, која је довела чак до губитка масе за 141%. Сличне налазе објавили су и Grozav и сарадници у својој студији акутне токсичности комплекса рутенијума(II) који су потврдили да примена комплекса рутенијума не утиче на телесну масу третираних пацова (Grozav и др, 2016). Минималан пораст телесне тежине током експерименталног протокола који је измерен у групи којој је апликована цисплатина је био и очекиван и у нашој студији. Наиме, добро је познато да дуготрајна примена цисплатине код људи, али и животиња доводи до редукције телесне масе (Ammer и др, 1993; Lin и др, 2018). Lin и сарадници су објавили податке да примена цисплатине код пацова у дози од 5 mg/kg доводи до значајног губитка телесне масе који је праћен редукцијом уноса хране, а последично и до губитка масе јетре и бубрега (Lin и др, 2021). Резултати ове студије су у складу са нашим резултатима, с тим да је у нашој студији апликована доза од 4 mg/kg па из тог разлога није забележен значајан губитак масе, већ само минималан пораст телесне масе пацова током четири недеље третмана.

Масе срца и бубрега пацова у нашој студији се нису разликовале између група, што је у супротности са резултатима претходно поменуте публикације (Alves de Souza и др, 2017) која наводи да је релативна маса бубрега била значајно већа код пацова третираних цисплатином, што је и потврђено хистолошким налазима ткива бубрега са уоченим умереним едемом тубуларног епитела. Ове промене нису забележили у бубрезима пацова изложеним комплексу рутенијума. У нашој студији су, с друге стране, уочене значајне разлике у маси јетре која је била статистички значајно нижа код пацова третираних цисплатином у односу на све остале примењене супстанце (Графикони 4 и 5). Ови резултати телесне масе и масе појединих органа пацова могу се објаснити чињеницом да цисплатина има изражено еметичко дејство и да смањује апетит. Такође, цисплатина може довести и до дистензије желуца и задржавања хране (Cabezos и др, 2008; Нојман и др, 2014). Поменуте студије и наши налази указују да цисплатина има изражен утицај на смањење телесне масе и масе органа, које се одвија на неки од предочених механизма. С друге стране, комплекси рутенијума у мањој мери утичу на телесну масу пацова и самим тим на метаболизам у организму, а од њих се издваја комплекс са *dach* лигандом као најповољнији, јер најмање ремети пораст телесне масе током периода. Системска токсичност и губитак телесне масе представљају честе нежељене ефекте третмана цисплатином, док се генерално нижа токсичност комплекса рутенијума може објаснити његовим везивањем за протеине (нарочито трансферин и албумин), што утиче на његову биодистрибуцију, фармакокинетичку и механизам деловања.

## 5.2. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на кардиоднамске параметре и коронарни проток изолованог срца

Кардиотоксичност представља честу компликацију и значајно ограничава примену многих антитуморских лекова, који тиме утичу на квалитет живота и преживљавање пацијената оболелих од карцинома. Учесталост настанка кардиотоксичних ефеката се разликује зависно од типа цитостатика. Познато је да се кардиотоксичност врло често јавља након примене доксорубицина (код 3–26% пацијената) и моноклонског антитела за лечење карцинома дојке - трастузумаба (код

2–28% пацијената) (Songbo и др, 2019). Примена хемиотерапеутских лекова повезана је са значајним бројем кардиоваскуларних компликација, које подразумевају поремећај систолне и дијастолне функције, суправентрикуларне и вентриуларне аритмије, артеријску и плућну хипертензију, хипотензију и коронарну болест. Неки од потенцијалних механизма настанка ових патолошких промена су хиперкоагулабилност и тромбоза, дисфункција ендотела и директно оштећење самог миокарда. Поред директног кардиотоксичног ефекта на миоците срца појединих антитуморских агенаса, одређени лекови могу да индукују промене на нивоу физиолошких и хемодинамских функција. Наиме, повећањем крвног притиска може доћи до промена у накнадном оптерећењу (*afterload*) или пак, задржавањем течности, до промена у претходном оптерећењу срца (*preload*) (Kim и др, 2015). Из наведеног разлога одређени антиканцерски лекови заправо доводе до настанка промена у срцу које су потенцијално реверзибилне и које могу нестати уколико се коригује хемодинамска дисфункција (Ewer MS и Ewer SM, 2015). Једна од честих компликација примене антитуморских лекова је хипертензија која може настати услед пада нивоа азот-моноксида у зидовима артериола. Такође, честа је и инциденција артеријске и венске тромбоемболије након примене хемиотерапеутика, а ризик је додатно повећан због саме природе малигних болести (Ewer, 2005).

Цисплатина се током последњих неколико деценија издвојила као један од најпотентнијих антитуморских лекова у терапији различитих тумора, међутим њена клиничка употреба је веома ограничена бројним нежељеним дејствима (кардиотоксичност, нефротоксичност, ототоксичност, хепатотоксичност, неуротоксичност, итд.). Последњих деценија се интензивно проучава кардиотоксичност изазвана применом цисплатине (Ma и др, 2020). Као једне од могућих кардиоваскуларних компликација наводе се аритмије, пре свега тахикардије, али су забележени и случајеви брадикардије и других аритмија (вентрикуларске и суправентрикуларске аритмије, блок гране или комплетни AV блок, атријална фибрилација) (Shelburne и др, 2014; Hall и др, 2013). Такође, може настати и миокардитис, срчана инсуфицијенција, ангина пекторис, исхемија срца, инфаркт миокарда, разне врсте тромбоемболија, оштећење васкуларног ендотела. Механизми којима цисплатина изазива кардиотоксичне ефекте још увек нису довољно познати, па је њихово расветљавање кључно са циљем спречавања и ублажавања ових штетних ефеката након дуготрајне примене (Todaro и др, 2013). Ипак, подаци из литературе указују да битну улогу у настанку кардиотоксичности узроковане применом цисплатине имају токсични метаболити цисплатине, индукција поремећаја редокс равнотеже, оштећење једарске и митохондријске ДНК, транспортери локализовани у мембрани ћелија, поремећај у хомеостази јона и функцији митохондрија, као и настанак инфламаторних и проапоптоских процеса.

Будући да цисплатина има способност да изазове озбиљне кардиоваскуларне компликације развијене су бројне стратегије са циљем смањења ових нежељених дејстава, а једне од њих укључују и модификацију хемијске структуре и синтезу нових хемиотерапеутика заснованих на неком другом прелазном металу. Управо с надом да ће се открити антиканцерогени лекови са мањим потенцијалом за настанак кардиотоксичности, током деценија је синтетисан велики број металофармацеутика, међу којима комплекси рутенијума показују вероватно најбољи однос између користи и ризика (Guo и Sadler, 1999; Medici и др, 2015). Стога је основни циљ нашег истраживања била процена кардиотоксичних ефеката праћењем параметара кардиодинамике и коронарне циркулације изолованог срца *Wistar albino* пацова након хроничног третмана са три Ru(II) комплекса са носећим лигандима (етилендиамин, диаминоциклохексан и бипиридин): ([Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl], [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl]), и

[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl]. Поменути комплекси рутенијума остварују различиту потентност и потенцијал за изазивање токсичних ефеката због разлика у хемијској структури и реактивности, растворљивости у биолошким течностима и фармакокинетичком профилу. Ефекте комплекса рутенијума поредили смо са цисплатином, као референтном супстанцом (позитивна контрола), и физиолошким раствором као негативном контролом.

У нашој студији кардиотоксични ефекти испитиваних супстанци процењивали су се мониторингом кардиодинамских параметара ( $dp/dt \max$ ,  $dp/dt \min$ , SLVP, DLVP, HR) и коронарног протока (CF) леве коморе изолованог срца пацова (као функционално и морфолошки доминантног дела срца) у контролним и експерименталним условима ретроградне перфузије по техници *Langendorff*, и то методом ауторегулације на коронарним притисцима у опсегу од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O. Овакав методолошки приступ омогућава двоструко сагледавање кардиотоксичног утицаја цитотоксичних агенаса, прво унутар интринзичких ауторегулаторних својстава самог изолованог срца за сваки агенс понаособ и друго, детекцију потенцијалних разлика дејстава различитих испитиваних супстанци на кардиодинамске параметре и коронарну циркулацију.

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином није довела до промена у кардиодинамици и перфузији срца током периода ауторегулације (Графикони 6-11 и Табела 2). Исти тренд је уочен и за остала два комплекса рутенијума и физиолошки раствор, осим за цисплатину која је у току ауторегулаторног ранга при вишим КПП изазвала снижење параметра  $dp/dt \min$  који одражава срчану релаксацију (Графикон 25). Ово се може објаснити чињеницом да цисплатина може значајно пореметити контрактилност и релаксацију срца, нарочито у условима хипероксије. Уколико посматрамо способност изолованог срца пацова да се из контролних услова прилагоди експерименталним условима методе ауторегулације, добијени резултати у овој студији показују да комплекси рутенијума примењени у доози од 4 mg/kg телсне тежине недељно у периоду од укупно четири недеље не изазивају кардиодепресивне дејства.

Пратећи резултате добијене у експерименталним условима методе ауторегулације и упоређујући ефекте свих испитиваних супстанци на кардиодинамику изолованог срца пацова, добили смо занимљиве налазе. Наиме, сам термин кардиодинамика односи се на динамичке процесе који су у вези са контракцијом и релаксацијом срца, те смо из тог разлога првенствено и процењивали утицај испитиваних супстанци на  $dp/dt \max$ , као индиректни параметар срчане контракције, и  $dp/dt \min$ , као индиректни параметар срчане релаксације.

На основу добијених резултата утврдили смо да хронично примењени комплекси рутенијума код пацова ремете контрактилност срца у односу на примену физиолошког раствора, али да у односу на примену цисплатине појачавају снагу срчане контракције. Овај ефекат је највише био изражен након примене комплекса рутенијума са *dach* лигандом, а на другом месту након примене комплекса са *bpy* лигандом. Комплекс рутенијума са *en* лигандом имао је готово идентичан ефекат на снагу срчане контракције као и цисплатина и може се рећи да је довео до депресије контрактилности сходно вредностима параметра  $dp/dt \max$  (Графикон 42). Један од потенцијалних механизма за објашњење депресије контрактилности настале дејством цисплатине је неадекватна хомеостаза калцијума (Miller и др, 2005; Bloom и др, 2016). Наиме, промена у флуксу Ca<sup>2+</sup> има кључну улогу у регулацији контракције и релаксације срчаног мишића. Познато је да цисплатина може инхибирати Na-K-АТФ-азу, пумпу која је одговорна за регулисање размене Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> кроз ћелијску мембрану.



Три јона  $\text{Na}^+$  излази из ћелије, док два јона  $\text{K}^+$  улази у ћелију под дејством  $\text{Na-K-ATP}$ -азе. До деполаризације мембране долази услед инхибиције  $\text{Na-K-ATP}$ -азе и нагомилавања  $\text{Na}^+$  у ћелији. Због тога се у ћелији акумулирају и јони  $\text{Ca}^{2+}$ , тачније 3 јона  $\text{Na}^+$  измењује се са 1 јоном  $\text{Ca}^{2+}$  кроз сарколему (Raschi и De Ponti, 2012). Услед високе концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  (енгл. *calcium overload*) долази до оштећења на нивоу митохондрија и дисфункције ћелија и константне контракције ћелија (Duong и др, 2020). Из овог разлога се смањује снага срчане контракције, тј. настаје негативно инотропно дејство, а може доћи и до поремећаја ритма срца. Наши резултати који се односе на ефекте хроничне примене цисплатине на изоловано срце корелирају са резултатима студије *Ma* и сарадника који су мишевима давали цисплатину (10 mg/kg) током 7 дана након чега су спровели методолошки слично истраживање - на изолованом срцу методом по *Langendorff*-у, али при константном перфузионом притиску (Ma и др, 2010). Утврдили су да цисплатина примењена у тој дози изазива снижење систолног притиска, али и параметара  $\text{dp/dt max}$ ,  $\text{dp/dt min}$  и HR. Насупрот томе, студија *Smigic* и сарадника је показала повећње вредности параметра  $\text{dp/dtmax}$  и  $\text{dp/dtmin}$  након интраперитонеалне примене цисплатине у дози од 4 mg/kg недељно током четири недеље третмана, у поређењу са применом комплекса платине(IV) и диаминског лиганда (*Smigic* и др, 2019).

Сличан тренд забележили смо у нашој студији и за параметар лузитропног дејства, минималне стопе развоја притика у левој комри срца ( $\text{dp/dtmin}$ ), са изразитим депресивним дејством цисплатине, али и комплекса рутенијума са диаминоциклохексанским лигандом. Може се рећи да је најповољнији ефекат на релаксацију срца имао комплекс рутенијума са бипиридином, и то на вишим вредностима КПП (80-120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ) (Графикон 43). Наши резултати су у складу са истраживањем које је доказало кардиотоксичне ефекте изолованог срца пацова након петонедељне апликације цисплатине (5 mg/kg телесне тежине) (Torai и др, 2018). Такође, резултати студије *Munhoz* и сарадника донекле су у корелацији са нашим резултатима, јер указују на вазорелаксантне и хипотензивне ефекте нитрозил комплекса рутенијума (*Munhoz* и др, 2012). Међутим, они су утицај овог рутенијумског комплекса испитивали на изолованој аорти *Wistar albino* и спонтано хипертензивних пацова, за разлику од нашег експерименталног дизајна који је подразумевао испитивање на изолованом срцу пацова. Претходне публикације сугеришу да примена платина(IV) комплекса са етилендиамином показује цитотоксичне ефекте (Jolley и др, 2001; *Smigic* и др, 2019). Ови резултати су донекле у корелацији са нашим, јер смо и ми код пацова примењивали комплекс рутенијума са истим лигандом (*en*) који је изазвао депресију контрактилности срца, у сличној мери као и цисплатина. Нажалост, студије које су на изолованом срцу пацова испитивале ефекте комплекса рутенијума на контрактилност срца праћењем поменутих параметара су раритетне, тако да смо наше резултате углавном упоређивали са резултатима цисплатине, као референтног антитуморског лека. С обзиром на то да испитивани комплекси рутенијума и цисплатина припадају групи металофармацеутика, постоји могућност да они деле сличне механизме потенцијалног кардиодепресивног дејства, али ближе информације о томе за сада недостају. Томе у прилог иде сазнање да поменути комплекси рутенијума, у целини узев, испољавају и слабији антитуморски ефекат у односу на цисплатину (*Lazić* и др, 2016; *Savić* и др, 2020).

На основу добијених вредности за параметар систолног притиска у левој комори може се установити да постоји диференцијална разлика између примењених комплекса рутенијума, при чему је изразито снижење вредности SLVP остварио комплекс са етилендиаминским лигандом, готово исто као и цисплатина (Графикон 44). Ови налази корелирају са резултатима других истраживања која су проучавала

сличну тематику. Наиме, Wang и научници су доказали да код пацова једнократна примена цисплатине (7 mg/kg) индукује снижење систолног притиска у левој комори и фреквенце срца (Wang и др, 2007). Сличне резултате за SLVP добили су и El-Sawalhi и сарадник (El-Sawalhi и Ahmed, 2014). Међутим, Smigic и сарадници су утврдили повећање систолног притиска у левој комори у групи пацова третираној цисплатином, у поређењу са применом платина(IV) комплекса и лиганда. У нашем истраживању вредности систолног притиска у левој комори биле су високе након апликације комплекса рутенијума са бипиридином, приближавајући се вредностима у контролној групи (Smigic и др, 2019). Једно од објашњења за смањење систолног притиска у левој комори након примене комплекса са етилендиамином и цисплатине је доказана депресија контрактилности срца, што је већ детаљно описано у претходним редовима.

Посматрано према резултатима утицаја испитиваних супстанци на дијастолни притисак у левој комори уочава се снажно снижење вредности параметра DLVP под утицајем цисплатине и још више комплекса рутенијума са етилендиаминским и бипиридинским лигандом, док комплекс са диаминоциклохексаном није утицао на овај параметар (Графикон 45). Овим резултатом се још једном доказује диференцијална ефикасност различитих комплекса рутенијума на кардиотоксичност. У нашем експерименту утицај примењених једињења на кардиодинамику испитиван је у условима хроничне изложености, када се осим функционалних очекују и морфолошке промене срчаног ткива. Овакви налази су сагласни са претходно приказаним резултатима који се тичу контрактилности и систолног притиска у левој комори (Smigic и др, 2019). Додатно, чини се да неки од ових комплекса делују и на комплијансу миокарда у непожељном смеру, тачније у смеру настанка дилатационе кардиомиопатије, тј. срчане инсуфицијенције.

Интересантно је да комплекси рутенијума нису имали утицаја на електричну активност спроводног система срца и да нису мењали срчану фреквенцу. Током експеримента на изолованом срцу нису забележене статистички значајне разлике у вредносима срчане фреквенце међу свим испитиваним групама на свим коронарним перфузионим притисцима, изузев значајно виших вредности HR у контролној групи наспрам групе цисплатине, што је и очекивано (Графикон 46). Ограничење ове студије је што нисмо пратили ближи увид у срчани ритам већ само параметар срчане фреквенце. Овакви налази сугеришу да би примарни фармакодинамски механизам кардиотоксичности испитиваних и њима сличних металофармацеутика био посредован утицајем на контрактилна, а не спроводна ткива срца. С друге стране, одређен број публикованих студија је показао значајно снижење срчане фреквенце након примене цисплатне у доози од 10 mg/kg код пацва (Ma и др, 2010). Сличне студије су показале и да апликација цисплатине у дози од 4 mg/kg недељно код пацва доводи до снижења HR (Smigic и др, 2019), што може бити последица повећане синтезе слободних радикала и настанка оксидационог стреса у срчаном ткиву, што је и потврђено у нашој студији.

У нашем истраживању испитивали смо и параметар који прати утицај на коронарну циркулацију, коронарни проток (CF). Правилно функционисање коронарне циркулације је од круцијалног значаја за правилан и несметан рад срца као пумпе. Коронарна циркулација се састоји од артерија, артериола, вена, венула и капилара. На њу отпада 5-10% минутног волумена срца, што представља проток кроз коронарне судове од 250-350 cm<sup>3</sup> крви у минути, у мировању. Овај волумен крви заправо представља коронарни проток, који се током напорног срчаног рада може повећати за 4-5 пута. Ми смо уочили да комплекси рутенијума нису имали утицаја на коронарни проток, међутим на вишим вредностима КПП (у условима хипероксије) испољен је негативан утицај комплекса са етилендиаминским лигандом и цисплатине на

коронарни проток (Графикон 47). Познато је да кисеоник има директан утицај на васкуларне глатке мишиће или преко хеморецептора. Стање хипоксије изазива коронарну вазодилатацију отварањем АТР-осетљивих калијумових канала. Осим тога у метаболичкој контроли коронарне циркулације учествују и многе вазоактивне супстанце, међу којима се издвајају аденозин, еикосаноиди и азот-моноксид. Аденозин настаје у кардиомиоцитима из аденозин трифосфата АТР као резултат исхемије, хипоксије или повећаног срчног рада, стога је и у овим стањима круцијалан за контролу коронарног тонуса. Аденозин има улогу у релаксацији глатких мишића артериола у срцу и у крајњем доводи до вазодилатације и повећања протока у коронарној циркулацији. С друге стране, NO остварује вазодилаторно дејство стимулацијом у глатким васкуларним мишићима ензима гуанилил циклазе и повећањем цикличног гуанозин монофосфата (сGMP). У нашој студији је такође показано да комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатина изазивају повећану продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту, односно плазми. Овај редокс параметар са своје стране представља индиректни индекс активности сигналног пута азот монооксида. Поремећаји у функционисању коронарне циркулације резултују настанком исхемије срца и ангине пекторис (Кајија, 2004). Уколико дође до пада коронарног протока испод нивоа потребног да задовољи метаболичке захтеве срца настаје исхемија, коју прате срчана инсуфицијенција, фибрилација комора, акутни инфаркт миокарда. Наши резултати говоре у прилог томе да се повећањем коронарног перфузионог притиска коронарни проток након примене цисплатине није значајно мењао, тј. није се повећавао преласком из нормоксичних у хипероксичне услове. Ови налази су у складу са бројним публикованим резултатима (Smigic и др, 2019; Stojic и др, 2018a; Rosic и др, 2016).

### 5.3. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Основни циљ овог дела нашег експеримента је био процена улоге оксидационог стреса у ефектима комплекса рутенијума и цисплатине на функцију срца и коронарну циркулацију. Одређивањем вредности прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту: супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ), индекса липидне пероксидације мереног као (TBARS) и азот монооксида у облику нитрита ( $NO_2^-$ ), покушали смо да установимо да ли је повећана производња слободних радикала један од механизма настанка штетних ефеката поменутих супстанци на миокард.

Бројни литературни подаци указују на блиску повезаност примене цисплатине и настанка оксидационог стреса, са последичном појавом бројних системских нежељених ефеката. Наиме, апликација цисплатине, нарочито током дужег временског периода, може узроковати повећану продукцију различитих слободних радикала, а најпре  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^\cdot$ . Ови молекули затим иницирају настанак липидне пероксидације васкуларних ендотелних ћелија, што резултује њиховим морфо-функционалним оштећењем. Дисфункција ендотела подразумева поремећај функције васкуларног ендотела, који се иначе односи на регулисање васкуларног тонуса, инфламације и хемостазе (Medina-Leyte и др, 2021). Ендотелна дисфункција се најчешће огледа у поремећају одржавања дилатације крвних судова и представља увод за појаву кардиоваскуларних нежељених ефеката (Incalza и др, 2018; Balta, 2021). Осим директног поремећаја у функционисању ендотелних ћелија, супероксид анјон

радикал који настаје услед примене цисплатине интерагује са азот моноксидом, чиме настаје још токсичнији производ, пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$ . На тај начин долази до још већег оштећења ендотелних ћелија (јер се смњује биорасполживост  $\text{NO}$ ), штоо нарушва контролу васкуларноог тонусаа, тј. физиолошу вазодијатацију (Суг и др, 2020).

Резултати наше студије показују да хронична апликација три различита комплекса рутенијума, цисплатине и физиолошког раствора (Графикони 108-127) није довела до важнијих промена у вредностима свих испитивних параметара оксидационог стреса, уколико посматрамо вредности ових маркера у коронарном венском ефлуенту, који се прикупљао за време експеримента ретроградне перфузије изолованог срца пацова методом ауторегулације, дакле на различитим коронарним перфузионим притисцима. Ипак, пратећи налазе добијене у експерименталним условима методе ауторегулације и упоређујући међусобне ефекте свих испитиваних супстанци на нивоу прооксидационих маркера у коронарном венском ефлуенту, добили смо интересантне резултате. Они се примарно огледају у диференцијалним ефектима испитиваних комплекса на различите редокс параметре.

Најизраженије повећање нивоа супероксид анјон радикала изазвала је хронична примена цисплатине, док с друге стране, упоређујући потенцијал сва три комплекса рутенијума да изазову продукцију  $\text{O}_2^-$  уочили смо да су комплекси рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином изазвали већу производњу овог маркера у односу на комплекс рутенијума са етилендиамином (Графикон 128). Сличне резултате показали су и *Stojic* и сарадници који су акутно перфундовали изолована срца пацова цисплатином у високој дози,  $10^{-5}$  М (*Stojic* и др, 2018b).

Уколико посматрамо утицај на производњу водоник пероксида, налази су нешто другачији. И овде цисплатина остаје као доминантан индуктор повећаног стварања водоник пероксида, с тим да је од комплекса рутенијума најизраженије повећање нивоа  $\text{H}_2\text{O}_2$  изазвао комплекс са етилендиаминским лигандом (Графикон 129). Насупрот нашим налазима, студија *Stojic* и сарадника објавила је да су нивои водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту остали непромењени након акутне перфузије срца цисплатином (*Stojic* и др, 2018b). Могући разлог за овакве резултате је и сам дизајн експерименталног протокола, који се разликовао од нашег.

Наши резултати су показали да је интраперитонеална примена комплекса рутенијума са етилендиамином и бипиридином довела до повећаног стварања TBARS у коронарном венском ефлуенту, као и цисплатина, док је најмањи утицај на стварање TBARS имао комплекс са диаминоциклохексаном (Графикон 130), што је у сагласности са претходно публикованим студијама.

Супротно томе, комплекс са диаминоциклохексаном је индуковао повећану продукцију  $\text{NO}_2^-$ . Такође, цисплатина је и на овај параметар имала сличан утицај и изазвала повећано стварање у коронарном венском ефлуенту (Графикон 131). Најслабији утицај на стварање нитрита остварио је комплекс са бипиридинским лигандом приближавајући се вредностима у контролној групи на свим притисцима. Ови налази нису у сагласности са резултатима студије која је потврдила да се ниво нитрита у ефлуенту смањио након примене цисплатине (*Rosic* и др, 2016; *Stojic* и др, 2018b).

Свеукупно анализирајући, испитивани металофармацеутици су изазвали значајну индукцију синтезе слободних радикала, што може да буде један од механизма њиховог токсичног дејства на контрактилност миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, при чему су ефекти делом селективни на поједине параметре.

#### 5.4. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на системски и ткивни оксидациони стрес

Као што смо више пута нагласили у овом тексту, кардиотоксичност изазвана цисплатином може настати услед директних штетних утицаја на кардиомиоците или због производње ROS који изазивају оксидациони стрес. Индуковани оксидациони стрес у кардиомиоцитима са последичном липидном пероксидацијом може узроковати лезије у срчаном ткиву и поремећај срчаних функција (Incalza и др, 2018). Поред испитивања ефеката комплекса рутенијума и цисплатине на маркере локалног оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, у нашем истраживању смо процењивали и утицај примењених супстанци на системски редокс статус, праћењем нивоа маркера у плазми и еритроцитима пацова.

Резултати нашег истраживања показали су да хронична примена цисплатине код пацова изазива статистички значајно повећање нивоа  $O_2^-$  у поређењу са контролом, док су нивои непромењени након примене комплекса рутенијума (Графикон 132). Повишени нивои супероксид анјон радикала у групи цисплатине могу бити последица смањене активности SOD, будући да овај ензим катализује конверзију  $H_2O_2$  из супероксид анјон радикала (Luanpitrong и др, 2011). У складу са нашим резултатима, једна студија је показала да примена цисплатине повећава ниво супероксид анјон радикала (Stojic и др, 2018b). У присуству супероксид анјон радикала, азот моноксид спонтано ствара веома токсични пероксинитрит, који је реактивнији од поменутих молекула и може изазвати директно оксидационо оштећење, а након тога и покренути апоптозу у бројним ћелијама, попут кардиомиоцита (Qian и др, 2018). У нашој студији је управо показано да је у групи животиња изложеним цисплатини дошло до значајног повећања експресије гена за проапоптотске сигналне молекуле Вах и каспазу-3 у хомогенату срчаног ткива, што чини доказе у прилог поменутој претпоставци и ранијим студијама (Графикони 144 и 146).

Сличан тренд као и у производњи супероксид анјон радикала, примењен је за ниво водоник пероксида у плазми, с разликом да поред цисплатине и комплекси рутенијума изазивају значајно повећање нивоа  $H_2O_2$  у поређењу са контролом, али без значајне разлике између њих (Графикон 133). Сличне резултате као и у нашем истраживању добили су и Hussein и сарадници (Hussein и др, 2012) и Tsutsumishita и сарадници (Tsutsumishita и др, 1998) који су указали на повећање оксидационог стреса индуковано применом цисплатине, и то повећањем нивоа супероксидног анјона,  $H_2O_2$  и хидроксил радикала ( $HO\bullet$ ). Добро је проучено да супероксид анјон радикал може подлећи реакцији диспропорције под дејством ензима супероксид дисмутазе, у којој настаје водоник пероксид. Водоник пероксид служи као дозор електрона за Фентонову реакцију у којој редуковано гвожђе катализује стварање хидроксилних радикала (Stohs и Bagchi, 1995). Хидроксилни радикали спадају у најактивније слободне радикале и могу изазвати липидну пероксидацију, оштећења на нивоу ДНК и оксидацију протеина. Повећање нивоа  $H_2O_2$  након примене цисплатине у поређењу са контролном групом може се објаснити брзом конверзијом  $O_2^-$  у  $H_2O_2$ .

TBARS је мерен као индекс липидне пероксидације у плазми, и примењено је да је након хроничне примене сва три рутенијумска комплекса концентрација овог биомаркера значајно снижена у поређењу са применом цисплатине (Графикон 134). Овај резултат је у складу са налазима Ciftci и сарадника (Ciftci и др, 2011a) који су показали да цисплатина повећава ниво TBARS и изазива оштећење миокарда. Такође, Rosic и сарадници (Rosic и др, 2016) су учили смањење коронарног протока и повећање активности срчаних ензима, уз повећање производње слободних радикала и

настанак липидне пероксидације у изолованом срцу пацова третираних цисплатином. *Yousef* и сарадник (*Yousef и Hussien, 2015*) су показали да додатно присуство проантоцијанидина у екстракту семенки грожђа, уз примену цисплатине, смањује ниво TBARS у плазми и срчаном ткиву за разлику од самосталне примене цисплатине.

Литературни подаци указују да оксидациони стрес може изазвати штетне ефекте на ћелијске мембране и последично липидну пероксидацију, претварањем незасићених липида у поларне липидне хидропероксиде. Добро је познато да пероксидација липида доводи до иреверзибилног оштећења ћелија. Бројна испитивања су показала да цисплатина изазива оштећење бубрега индукцијом производње ROS у тубуларним ћелијама. Слични механизми са повећаним оксидационим стресом у митохондријама одговорни су за промене у срцу након примене цисплатине (47). У складу са нашим резултатима, *Ciftci* и сарадници (*Ciftci и др, 2011a*) су показали оксидациона оштећења у срчаном ткиву пацова, како за комплексе рутенијума, тако и за комплексе злата, што је последица исцрпљивања антиоксидационих капацитета и повећања липидне пероксидације. Овај процес такође може изазвати настанак многих реактивних производа, попут епоксида и алдехида, који могу оштетити ДНК, протеине и друге важне биомолекуле (*Deavall и др, 2012*). Оштећење ДНК у једру и митохондријама срчаних ћелија настаје услед накупљања великих количина цисплатине (*El-Awady и др, 2011*). Уједно се јавља и оштећење функције митохондрија и настаје апоптоза миоцита и коначно срчана дисфункција. С друге стране, комплекси рутенијума имају другачији механизам деловања у поређењу са цисплатином, захваљујући њиховим повољним својствима. Могуће објашњење за смањени утицај испитиваних рутенијумских комплекса на процес липидне пероксидације лежи у њиховом ниском потенцијалу да изазову ћелијску токсичност.

Нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ) у крви представљају ниво азот монооксида, молекула који учествује у многим физиолошким и патолошким стањима (*Nossaman и др, 2010*). У нашем истраживању, примењени рутенијумски комплекси су изазвали смањење нивоа  $\text{NO}_2^-$  у поређењу са цисплатином (Графикон 135). На основу резултата *Demkov* (*Demkov, 2013*), као и *Chirino* и сарадника (*Chirino и др, 2004*) који су објавили пораст нивоа нитрита током хемиотерапије цисплатином, и ми смо очекивали и доказали појачану производњу нитрита након примене цисплатине. Супротно нашим резултатима, *Stojic* и сарадници (*Stojic и др, 2018b*) су показали смањење производње нитрита након акутне примене цисплатине. Ове разлике у резултатима могу се објаснити различитим експерименталним протоколом. Прекомерна производња ROS и RNS може проузроковати оштећење ћелија (*Demkow и др, 2011*). Пероксинитрит такође доприноси оштећењу бубрега у нефротоксичности изазваној цисплатином (*Chirino и др, 2004*). Поред тога, има и важну улогу у покретању апоптозе у различитим врстама ћелија, укључујући кардиомиоците (*Wang и др, 2007*).

Антиоксидациони систем заштите може ублажити штетне ефекте ROS уклањањем слободних радикала из ћелија. Системска токсичност изазвана цисплатином може се објаснити и смањењем ензимске и неензимске антиоксидационе активности (*Nakhaee и др, 2010; Rabik и Dolan, 2007*).

Активност САТ је значајно смањена у свим експерименталним групама, осим у групи комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном, што указује на то да комплекс са *dach* лигандом може да очува антиоксидациони одбрамбени систем. Слични резултати су примењени и за активност SOD, са изузетком за комплекс рутенијума са етилендиамином који индукује значајно већу активност ензима у поређењу са цисплатином. Лечење цисплатином изазвало је значајно смањење активности оба ензима у поређењу са контролом (Графикон 136). У складу са нашим резултатима је и

студија *Karthikeyan* и сарадника (*Karthikeyan* и др, 2007) који су објавили пад активности CAT и SOD у групи цисплатине. Ови резултати могу бити последица прекомерне производње ROS, попут супероксид анјон радикала и водоник пероксида.

Ћелијски антиоксиданс GSH делује као молекул прве линије одбране за разградњу ROS. Глутатион пероксидаза катализује редукцију слободних радикала оксидацијом редукованог GSH у глутатион-дисулфид (GSSG), који је познат и као оксидовани облик глутатиона. GSSG може реаговати са тиолним групама протеина које формирају протеинске адукте. Механизам оксидационог стреса изазваног цисплатином уско је повезан са променама у количини GSH. Заправо, приликом уласка у ћелију цисплатина се преводи у високо реактиван облик који може реаговати са протеинима који садрже тиол, као што је глутатион. Смањење нивоа глутатиона и других антиоксиданаса изазвано цисплатином мења редокс статус и изазива накупљање ROS у ћелијама (*Arany* и *Safirstein* 2003; *Yilmaz* и др, 2004).

Наше истраживање подржава хипотезу да је механизам кардиотоксичности цисплатине повезан са исцрпљивањем капацитета антиоксиданаса, нарочито GSH. Резултати овог истраживања показују значајан пад нивоа GSH у групама животиња третираних цисплатином и комплексима рутенијума са *en* и *dach* лигандима у поређењу са контролном групом, са акцентом да рутенијумски комплекси имају сличан потенцијал као и цисплатина да изазову снижење нивоа GSH (Графикон 137). Ови резултати су у складу са чињеницом да је GSH први молекул у каскади која покреће липидну пероксидацију (*Badary* и др, 2004). Наиме, уочили смо да трошење молекула GSH подстиче пероксидацију липида, посебно код пацова третираних цисплатином. *Karthikeyan* и сарадници (*Karthikeyan* и др, 2007) су објавили смањење нивоа GSH након примене цисплатине у поређењу са контролном групом, што указује да је овај пад нивоа GSH довео до појачане пероксидације липида, што је у складу са нашим резултатима.

Ензим глутатион пероксидаза може разградити водоник пероксид и формирати GSSG. Наше истраживање показало је да комплекси рутенијума I и II узрокују значајно повећање нивоа GSSG у поређењу са применом цисплатине (Графикон 138). У студији *Kersten* и сарадника (*Kersten* и др, 1998) уочено је повећање концентрације GSSG у бубрезима након примене рутенијумског комплекса KP692, слично нашим резултатима. У физиолошким условима, смањени ниво GSH представља најчешћу форму укупног глутатиона, међутим у условима повећаног ћелијског оксидационог стреса, GSSG се нагомилава у ћелијама, а однос GSH/GSSG се смањује. Из тог разлога, одређивање односа GSH/GSSG може бити користан показатељ оксидационог стреса (*Costa* и др, 2011). У нашем истраживању уочили смо смањење односа GSH/GSSG након примене комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном који могу индуковати оксидациони стрес променом статуса глутатиона (Графикон 139). Насупрот нашим резултатима, *Kim* и сарадници (*Kim* и др, 2018) су објавили смањени однос GSH/GSSG изазван применом цисплатине, као и побољшање тог односа након примене антиоксидационог молекула алфа-липоинске киселине. Такође, приметили смо смањену активност ензима глутатион пероксидазе GSH-Px након примене рутенијумског комплекса са *bpy* лигандом, у поређењу са цисплатином. Друга два Ru комплекса нису имала изражен утицај на активност GSH-Px (Графикон 136).

Анализирајући ефекте испитиваних супстанци на ензиме и друге молекуле антиоксидационог система заштите у еритроцитима показано је да комплекс рутенијума са биридином има најнеповољније ефекте, јер у највећем обиму изазива исцрпљивање овог система. Остала три металофармацеутика испољавају делом дивергентне ефекте било смањујући било повећавајући активност појединих ензима, односно концентрације датих молекула. Чини се да је најмање штетне ефекте испољио

комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном, јер је изазивао чак и повећање активности каталазе и глутатион пероксидазе у односу на контролни третман односно цисплатину. Ове промене такође у значајној мери корелирају са нашим претходним налазима да комплекси рутенијума у највећој мери доводе до повећања синтезе водоник пероксида који се чини као примарни оксидациони молекул индукован овим супстанцама.

Испитивани рутенијумски комплекси показали су мањи потенцијал за настанак липидне пероксидације у срчаном ткиву у поређењу са цисплатином (Графикон 140). Наши резултати су показали да пораст нивоа TBARS-а у плазми и срчаном ткиву пацова који су третирани цисплатином може бити повезан са смањењем активности каталазе, која потпомаже детоксикацију водоник пероксида у воду. Управо је активност овог ензима антиоксидативне заштите била смањена у еритроцитима експерименталних животиња у нашој студији. Такође, *El-Sawalhi* и сарадник (*El-Sawalhi* и *Ahmed*, 2014) су показали да хронична примена цисплатине изазива повећање TBARS у срчаном ткиву, што је у складу са резултатима наше студије.

Ефекти примењених супстанци на ниво антиоксиданаса (GSH, CAT и SOD) у срчаном ткиву приказани су на Графиконима 141-143. У складу са претходно објављеним резултатима из литературе (*Huang* и др, 2017; *Ciftci* и др, 2011a), резултати наше студије показали су да и рутенијумски комплекси и цисплатина изазивају пад нивоа GSH и активности CAT у срчаном ткиву у поређењу са контролом, док нису примећене разлике између комплекса рутенијума и цисплатине (Графикон 141, 143). Супротно нашим резултатима, *Alves de Souza* и сарадници (*Alves de Souza* и др, 2017) су показали повећан ниво GSH и активности ензима глутатион-S-трансферазе, као и нивоа липидне пероксидације у срчаном ткиву, уз појачану активност CAT у бубрезима пацова третираних рутенијумом. Исти аутори објавили су, слично нашим резултатима, повећање нивоа липидне пероксидације и пад антиоксиданаса GSH, SOD и CAT у срчаном ткиву након третмана цисплатином. Слично истраживање са испитивањем нефротоксичности рутенијума објавили су *Kersten* и сарадници (*Kersten* и др, 1998) који су приметили смањен ниво GSH у бубрежном ткиву након примене рутенијумског комплекса KP692. Такође, *Ajith* и сарадници (*Ajith* и др, 2007) су објавили значајно повећање нивоа малондиалдехида (MDA) у бубрегу и пад активности антиоксидационих ензима GSH и SOD у срчаном ткиву након примене цисплатине. Ови резултати су били снажан доказ настанка оксидационог стреса изазваног цисплатином.

Антитуморски металофармацеутици су редокс-активне супстанце које могу изазвати прекомерно стварање ROS различитим механизмима. Међу испитиваним комплексима рутенијума, комплекс са етилендиаминским лигандом изазвао је најизраженије смањење нивоа GSH у срчаном ткиву. Могуће објашњење овог резултата је да комплекси рутенијумаса *en* лигандом могу коњуговати GSH за Ru центар супституцијом хлоридо лиганда. Сличан тренд је уочен и за активност SOD, што је поткрепљено недавним резултатима истраживања које указује да цисплатина значајно смањује активност овог ензима (*Wang* и др, 2005).

У целини узев, ефекти комплекса рутенијума на активности ензима антиоксидационе заштите у срцу су мање повољни него њихови ефекти у плазми и еритроцитима. У срчаном ткиву, дејства ових комплекса су већином упоредива са дејствима цисплатине (изузимајући TBARS). На тај начин, поједини повољни ефекти испитиваних комплекса рутенијума на вредности параметара оксидационог стреса који су показани у самом коронарном венском ефлуенту и плазми могу да буду у знатној



мери анулирани у самом срчаном ткиву. Ове разлике у дејству би могле, бар делом, да се објасне фармакокинетичким чиниоцима који се односе на ткивну дистрибуцију. Наиме, познато је да се металофармацеутици на бази рутенијума(II) снажно везују за албумине и трансферин, протеине плазме, а од свих испитиваних комплекса у нашој студији онај са етилендиамином испољава највећи афинитет за ове протеине (Nišavić и др, 2016). Даље студије би требало ближе да испитају понашање комплекса рутенијума у *in vivo* биоокружењу и потенцијални утицај појединих фармакокинетичких особина на њихова фармаколошка дејства, као могуће модификујуће чиниоце њихове биолошке активности.

### 5.5. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на маркере апоптозе

Са жељом да објаснимо неке од механизма токсичних ефеката комплекса рутенијума и цисплатине на срчано ткиво и саме кардиомиоците, наше истраживање смо оплеменили и испитивањем могућег механизма смрти ћелија срца пацова. Познато је да различити слободни радикали могу иницирати или модификовати апоптозу. Унутрашња апоптотска машинерија повезана је са променама у пропустљивости митохондријске мембране, што омогућава ослобађање проапоптотских молекула. Протеини из Bcl-2 фамилије се састоје од чланова који или стимулишу или инхибирају апоптозу, балансирајући између проапоптотских протеина, као што је Вах и антиапоптотских протеина, као што је Bcl-2 (Eskes и др, 2020). У присуству окидача апоптозе, попут индукованог оксидационог стреса, Bid протеин може индуковати Вах/Вак олигомеризацију која ствара мегапоре у митохондријској мембрани (Sinha и др, 2013). Као резултат тога, у цитоплазми настаје *апоптозом комплекс* који активира иницијаторску каспазу-9 и потом извршилачку каспазу-3, како би се процес апоптозе завршио.

Ова студија је показала да цисплатина у срчаном ткиву изазива значајно повећање релативне експресије проапоптотских маркера Вах и каспазе-3 у поређењу са комплексима рутенијума. С друге стране, на релативну експресију антиапоптотског Bcl-2 гена значајно је утицао комплекс рутенијума са бипиридином у поређењу са контролом (Графикони 144-146). Металофармацеутици, као лекови који генеришу ROS, доводе до потрошње антиоксидационог капацитета и индукују прекомерну производњу ROS, изазивајући тиме апоптозу, активацијом гена укључених у апоптозу (Ozben, 2007). Повишен ниво супероксид анјон радикала у ћелијама индукује повећање рН вредности, што спречава активацију каспазе (Akram и др, 2006).

Наши резултати подржавају ову хипотезу управо повећањем нивоа  $O_2^-$  у срчаном ткиву изазваном применом рутенијумског комплекса са етилендиаминским лигандом. Сходно томе, приметили смо нижу релативну експресију гена каспазе-3 у поменутој групи у поређењу са осталим експерименталним групама (Графикон 146). Насупрот томе,  $H_2O_2$  смањује рН вредност у ћелији и на тај начин делује као окидач апоптозе. Такође,  $H_2O_2$  иницира апоптозу конверзијом у  $HO\bullet$  радикал који директно оштећује ДНК или митохондрије (Akram и др, 2006). Наши резултати који показују да цисплатина има потенцијал да стимулише релативну експресију проапоптотског молекула Вах су у складу са поменутом студијом Akram и сарадника (Akram и др, 2006).

Липидна пероксидација мембрана такође може индуковати апоптотски сигнал и наши резултати за повишен ниво TBARS у срчаном ткиву пацова третираних цисплатином корелирају са значајним повећањем релативне експресије Вах и каспаза-3

гена. Слични резултати су добијени у студији *Kline* и сарадника (*Kline* и др, 2009 ) у којој су, након примене цисплатине, срчане ћелије развиле одговор на стрес ендоплазматског ретикулума и појачале активност проапоптотске каспазе-3. Поред тога, *El-Sawalhi* и *Ahmed* (*El-Sawalhi* и *Ahmed*, 2014) су показали да комплекс рутенијума изазива значајно већу релативну експресију антиапоптотског протеина Bcl-2 у поређењу са цисплатином, што је у супротности са нашим резултатима.

С друге стране, слично нашем истраживању, *Yildirim* и сарадници (*Yildirim* и др, 2012) су објавили пораст активности Вах и смањење антиапоптотске експресије Bcl-2 након примене цисплатине, са великом количином апоптотских кардиомиоцита. Ови подаци указују да цисплатина изазива апоптозу у срчаном ткиву. *Alves de Souza* и сарадници (*Alves de Souza* и др, 2017) су показали да рутенијумски комплекс не индукује релативну експресију гена p53, Вах, Bcl-2 и каспазе-3. Ови резултати су у складу са нашим налазима који сугеришу да апоптоза можда није укључена у кардиотоксичност изазвану применом комплекса рутенијума. Дакле, смањени потенцијал испитиваних комплекса рутенијума да изазову апоптотску смрт срчаних ћелија може бити повезан са њиховом нижом токсичношћу у поређењу са цисплатином. Насупрот томе, *Ћановић* и сарадници (*Ћановић* и др, 2017) су за комплексе рутенијума(II), који имају сличну хемијску структуру као и наши комплекси, показали да индукују апоптозу култура туморских ћелија активацијом унутрашњег митохондријалног сигналног пута апоптозе. Разлике између ове и наше студије би могле додатно да се објасне и другим методолошким факторима – коришћењем различитих ткива и ћелија, односно експерименталних модела.

## 5.6. Ефекти хроничне примене испитиваних супстанци на биохемијске маркере у серуму

Евалуацијом биохемијских показатеља функције срца, јетре и бубрега у серуму пацова изложеним испитиваним супстанцама покушали смо да добијемо комплетнију слику о њиховим системским токсичним ефектима (кардиотоксичност, хепатотоксичност и нефротоксичност). Осим тога, наш циљ је био и да утврдимо разлике између група, односно да упоредимо њихов утицај, нарочито са становишта компарације са цисплатином.

Липидни профил у серуму пацова је евалуиран одређивањем вредности: укупног холестерола, триглицерида, као и HDL и LDL холестерола. Наши резултати су показали да је примена цисплатине изазвала значајно повећање нивоа укупног холестерола и LDL холестерола у серуму, док је најмањи утицај на вредности имао комплекс рутенијума са етилендиамином, и очекивано примена физиолошког раствора (Графикони 147 и 150). С друге стране, хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном индуковала је значајно повећање вредности триглицерида у серуму пацова у поређењу са применом цисплатине (Графикон 148). Примена испитиваних једињења није имала значајног утицаја на повећање нивоа HDL у серуму (Графикон 149). Ови резултати су у корелацији са сазнањима да је један од могућих механизма којим цисплатина доводи до кахексије управо подстицање липолизе, што резултује настанком хиперлипидемије (*Garcia* и др, 2013). Многе студије су показале да администрација цисплатине изазива повећање нивоа свих фракција метаболизма липида: HDL, LDL, VLDL.

Изгледа да испитивани комплекси рутенијума имају слаб директан ефекат на метаболичке путеве холестерола, али неки од њих би могли неповољно да утичу на

метаболизам триглицерида. Ови налази такође додатно сугеришу да постоје значајне компаративне разлике у биолошким дејствима ових металофармацеутика, што је у складу са претходним налазима о њиховим дејствима на хемодинамику срца и редокс равнотежу.

Један од могућих механизма кардиотоксичности изазване цисплатином укључује настанак оксидационог стреса и апоптозу кардиомиоцита, а неки од серумских параметара који су показатељи токсичних ефеката на срчане ћелије су повишена концентрација лактат дехидрогеназе и креатин киназе, као последица липидне пероксидације мембране кардиомиоцита услед администрације цисплатине (Gunturk и др, 2019). Дакле, праћење концентрације LDH у серуму представља одличан алат за процену оштећења срчаног ткива (Zhao и др, 2018). Повишени нивои LDH могу бити последица оштећења ћелијске мембране које доводи до цурења овог ензима из срчаног ткива у крвоток. Током оштећења миокарда, као што је инфаркт, утврђено је да се ниво LDH у серуму повећава и да је он пропорционалан степену оштећења срчаног мишића (Herscher и др, 1984; Gollor и др, 2013). Ми смо у овој студији забележили да је примена свих супстанци осим комплекса рутенијума са етилендиамином изазвала значајно повећање нивоа LDH у поређењу са контролном групом, с тим да су највише концентрације у серуму уочене код пацова који су примали комплекс рутенијума са бипиридином и цисплатину (Графикон 151). Ови резултати су донекле очекивани, јер су у литератури описани слични налази повишених нивоа лактат дехидрогеназе у серуму пацијената лечених цисплатином, као и у анималним студијама (Rosic и др, 2016; Demkow и Stelmaszczyk-Emmel, 2013).

Креатин киназа се сматра главним ензимом за одређивање неуромишићних обољења, док се СК-МВ користи за потврду или искључивање акутног инфаркта миокарда због своје високе специфичности за миокард. Наши резултати показују да је третман комплексом рутенијума са етилендиамином индуковао повећање нивоа креатин киназе у серуму у поређењу са применом комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатином (Графикон 152). С друге стране, значајно повећање нивоа СК-МВ уочили смо у групи пацова третираној цисплатином, у поређењу са применом комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и контролном групом (Графикон 153). Бројне студије које су уочиле повећање активности специфичног ензима СК-МВ након примене цисплатине додатно потврђују наше доказе (Rosic и др, 2016). Од значаја је налаз да испитивани комплекси рутенијума у нашој студији нису довели до значајног повећања активности кардиоспецифичног ензима СК-МВ, у односу на контролу што указује на њихов слабији директни токсични потенцијал на срчану мускулатуру.

Срчани тропонини су регулаторни протеински молекули који се налазе у миокарду, а који се из кардиомиоцита ослобађају у циркулацију у случају њиховог оштећења. Стога је серумски тропонин изузетно осетљив показатељ повреда миокарда и један од неопходних за постављање дијагнозе акутног инфаркта миокарда. Постоје три типа тропонина: тропонин С, тропонин Т и тропонин I. Тропонин I постоји у три изоформе и утврђено је да се његов ниво повећава код акутног инфаркта миокарда након 3-6 сати од појаве бола у грудима, врхунац достиже за око 12 сати, док повишени нивои остају чак 3-10 дана након појаве првих симптома због непрекидног ослобађања компоненти миофиламента из повређеног срчаног мишића (Witkowski и др, 2021). Дакле, тропонин се користи као биомаркер када су присутне иреверзибилне промене и његови нивои су често у корелацији са хистолошким променама.

У нашој студији је хронична примена комплекса рутенијума са бипиридином изазвала статистички значајно повећање концентрације тропонина Т у серуму пацова у поређењу са применом свих осталих супстанци, осим комплекса рутенијума са етилендиамином (Графикон 154). Овај резултат може бити последица ослобађања тропонина Т из оштећених кардиомиоцита пацова, за шта имамо и морфолошку потврду у виду исхемичних промена у срцу пацова изложеним комплексу рутенијума са бипиридином (Слика 4С). Додатна чињеница у прилог оваквог дејства су ефекти овог комплекса на индукцију проапоптотичних сигнала у срчаном ткиву, односно уопште, већи потенцијал у односу на друга два рутенијумска комплекса на сигналне путеве апоптозе и нашим експериментима. Након повреде срчаног мишића траумом или исхемијом, тропонин се ослобађа у крвоток, тако да његова концентрација добро корелира са повредом ткива (Eisenberg и др, 2012). Хипертрофија леве коморе и инфламаторна стања, као што су миокардитис и перикардитис такође корелирају са повећаним ослобађањем тропонина (Ang и др, 2021). У једној студији која је поредила ефекте комплекса платина(IV) са различитим лигандима са ефектима цисплатине на вредности маркера функције срца у ефлуенту, забележено је да примена цисплатине није довела до повећања концентрације срчаног тропонина (Stojic и др, 2018b) што је у сагласности са нашим налазима.

Јетра је најважнији орган за метаболизам и детоксикацију ксенобиотика, тако да је уједно и мета за испољавање токсичних ефеката многих металофармацеутика. У нашој студији хепатотоксичност смо анализирали праћењем биохемијских параметара функције јетре у серуму и хистопатолошком анализом ткива јетре пацова. Пратили смо активност ензима AST и ALT, при чему смо имали на уму да повећање активности ових ензима увек указује на опструкцију функције јетре.

У нашем експерименту примена свих испитиваних једињења је довела до повећања активности ензима аспартат аминотрансферазе у серуму пацова у односу на контролну групу. Међу комплексима рутенијума, комплекс са етилендиамином се издвојио са највећим утицајем на повећање нивоа AST (Графикон 155). Сличне налазе објавили су *Alves de Souza* и сарадници за комплекс рутенијума(II) који је примењен код пацова у дози од 10 mg/kg који је довео до значајног пораста активности ензима AST у поређењу са применом цисплатине у дози од 2 mg/kg (*Alves de Souza* и др, 2017). У овој студији истраживачи су, слично као и ми, испитивали и упоређивали (са златним стандардом – цисплатином) системску токсичност комплекса рутенијума код здравих пацова, без тумора.

Компарацијом утицаја свих испитиваних супстанци на ниво ензима аланин аминотрансферазе уочили смо да је третман комплексом рутенијума са етилендиамином индуковао статистички значајно повећање активности ALT у поређењу са групом комплекса са бипиридином и групом цисплатине (Графикон 156). Међутим, свеукупно, ниједан од испитиваних металофармацеутика није изазвао значајне разлике у овом параметру у односу на контролну вредности. Комплекс рутенијума са етилендиамином у дози од 2 mg/kg у студији *Savic* и сарадника такође је довео до повећања активности ALT и израженијих хепатотоксичних ефеката у односу на оксалиплатину (*Savic* и др, 2020). Насупрот томе, *Wang* и колеге су објавили повећање активности AST и ALT у групи мишева третираних цисплатином у дози од 4 mg/kg, за разлику од примене комплекса рутенијума(II) у дозама од 10 и 20 mg/kg (*Wang* и др, 2019). Могући разлог за испољавање израженијих хепатотоксичних ефеката нашег комплекса рутенијума са етилендиамином у односу на остала два комплекса лежи у чињеници да овај комплекс има јачи цитотоксични потенцијал (*Savic* и др, 2020; *Lazić* и др, 2016).

С обзиром да повећање активности ALT у серуму има већу специфичност за хепатотоксично оштећење од AST, наведени резултати не указују да би комплекси рутенијума имали висок токсични потенцијал за ткиво јетре. Хистопатолошка анализа у нашој студији је управо показала да комплекси рутенијума са етилендиамином и бипиридином изазивају мале хистолошке промене овог органа. Ипак, комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном је изазвао знатно више хистолошких оштећења, тако да се и у овом делу нашег истраживања демонстрирала одређена компаративна разлика у биолошким дејствима испитиваних комплекса рутенијума.

Један од наших циљева био је да утврдимо да ли и у којој мери примена комплекса рутенијума изазива нефротоксичност, те смо одређивали нивое уреје и креатинина, као биомаркера функције бубрега. Примена свих испитиваних једињења није довела до значајних разлика међу њима у нивоу уреје у серуму пацова. Међу комплексима рутенијума, комплекси са етилендиамином и бипиридином су довели до пораста вредности уреје слично као и у групи цисплатине, али оне нису биле статистички значајно веће у односу на контролну групу (Графикон 157). Мада се ниво уреје међу групама разликује, одсуство статистичке значајности сугерише да реалних разлика у ефектима на концентрацију уреје у серуму између апликованих супстанци заправо није било. Са аспекта нивоа уреје и креатинина, *Savic* и сарадници су у *in vivo* студији на мишевима показали да примена идентичних комплекса као и наших (комплекси рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном) није довела до оштећења бубрега мишева у поређењу са оксалиплатином (*Savic* и др, 2020).

Серумски креатинин се користи да процени брзину гломеруларне филтрације и степен оштећења функције бубрега. Упоредивањем утицаја хроничне примене испитиваних супстанци на вредности креатинина у серуму утврдили смо да је третман цисплатином довео до статистички значајног повећања концентрације креатинина у серуму у поређењу са применом комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном (Графикон 158). Ипак, у односу на контролни третман, ниједан од металофармацеутика није изазвао значајно повећање овог параметра. Већина публикованих студија на пацовима је показала да третман високим дозама цисплатине (7,5 mg/kg) током 10 дана индукује повећање нивоа уреје и креатинина, које је прћено хистопатолошки потврђним оштећењима ткива бубрега (*Chen* и др, 2019; *Humanes*, 2017), што је донекле складу са нашим налазима. Такође, *Alves de Souza* и његова истраживачка група су показали да цисплатина примењена у дози од само 2 mg/kg индукује повећање вредности уреје и креатинина, за разлику од примене комплекса рутенијума(II) који ни у дози од 10 mg/kg током 13 дана није изазвао пораст ових маркера у серуму пацова (*Alves de Souza* и др, 2017). Слични налази су објављени од стране *Wang* и сарадника где је цисплатина у дози од 4 mg/kg изазвала повећање концентрације креатинина у серуму мишева, док полипиридилски комплекс рутенијума није изазвао оштећење функције бубрега (*Wang* и др, 2020).

У целини узев, испитивани комплекси рутенијума у нашој студији нису испољили значајан потенцијал за нефротоксичност, како у функционалном тако и у хистопатолошком аспекту. Овакви налази су у одређеној мери сагласни са налазима наше студије о дејству ових једињења на јетру и делом на срчано ткиво. Даље студије би требало да детаљније истраже утицај ових комплекса на бубрег, коришћењем већег распона експерименталних доза и у разноврсним експерименталним протоколима како би се боље сагледао њихов прави нефротоксични потенцијал.

У нашој студији смо мерили и вредности укупних протеина и албумина у серуму. Примена комплекса са бипиридином је довела до значајног повећања концентрације укупних протеина у серуму пацова у поређењу са применом остала два комплекса рутенијума, док су нивои укупних протеина након примене цисплатине

били слични као и након примене комплекса са бипиридинским лигандом (Графикон 159). Исти тренд смо уочили и за вредности албумина у серуму пацова. Наиме, хронична интраперитонеална примена комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном је изазвала значајно снижење албумина у серуму у поређењу са применом остала два комплекса рутенијума и цисплатине (Графикон 160). У супротности са нашим резултатима били су налази *Elsayed* и сарадника који су уочили снижење серумске концентрације укупних протеина и албумина након интраперитонеалне примене цисплатине у дози од 7,5 mg/kg (*Elsayed* и др, 2021). У клиничкој пракси су значајнија обољења и стања која доводе до снижења албумина и другим протеина у серуму него она која узрокују супротно. У нашој студији испитивани потенцијални металофармацеутици нису изазвали значајну хипоалбуминемију и хипопротеинемију, што је значајно за сагледавање њиховог свеукупног токсиколошког профила, посебно за комплексе рутенијума о којима постоји мало таквих података.

### 5.7. Ефекти хроничне примене испитиваних једињења на хистолошке промене органа пацова

Хронична интраперитонеална примена комплекса рутенијума са етилендиамином је изазвала одређене морфолошке промене у срчаном ткиву пацова. Мишићна влакна срца су већим делом била у регуларном распореду, али са знацима лакостепене хипертофије (Слика 4А). С друге стране, хистолошка анализа попречних пресека миокарда који су примали комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном показала је ређа једра затупастог изгледа, што представља знак умерене хипертофије мишићних влакана. Уочили смо и значајно смањену попречну испруганост мишићних влакана и фокално присутна таласаста појединачна влакна, али без стазе (Слика 4В). Нешто озбиљније промене у морфологији срца забележене су у студији акутних експеримената на изолованом срцу пацова (*Stojic* и др, 2018b). Хистолошким анализом срца која су претходно перфундовали 1,2-диаминоциклохексан-дихлоридо-платином(II) у високој дози, уочили су фокално некротичне промене кардиомиоцита. Могуће објашњење за ову разлику у ефекту лежи у томе да су ови истраживачи примењивали комплекс платине(II) са *dach* лигандом, док смо ми примењивали комплекс рутенијума(II) са *dach* лигандом. Хистопатолошким испитивањем срца пацова који су били изложени хроничном третману комплекса рутенијума са бипиридином уочили смо да су мишићна влакна местимично у ирегуларном распореду, са знацима исхемије (Слика 4С). *Lin* и сарадници пак нису уочили значајне иреверзибилне хистопатолошке промене, попут инфламације или некрозе, у ткивима срца мишева третираних како цисплатином, тако и комплексом рутенијума са полипиридилским лигандима (*Lin* и др, 2021).

У нашој студији примена цисплатине је изазвала најозбиљније морфолошке промене срчаног ткива. Наиме, мишићна влакна су била хипертрофична, са знацима фрагментације и миоцитоллизе. Једра кардиомицита су благо полиморфна и хетерохроматична, са фокалним знацима хиперхромазије и пикнозе. Управо овакве лезије указују на ћелијску смрт кардиомиоцита, што се и макроскопски одразило на бледу боју срчаног ткива (Слика 4D). Наши налази поткрепљују чињеницу да цисплатина изазива кардиотоксичност. Овакви резултати су у сагласности са многим студијама које су процењивале системске токсичне ефекте цисплатине (*Hu* и др, 2018). Најчешћи патохистолошки налаз препарата срца која су оштећена применом

цисплатине укључује некрозу и хипертрофију мишићних влакана и вакуолизацију цитоплазме миоцита (Bukhari и др, 2022). Такође је често присутна и кариопикноза једра, едем и хеморагија (209). *Stojic* и сарадници су објавили нешто другачије резултате хистолошких промена срца пацова третираних цисплатином (*Stojic* и др, 2018b). Наиме, срца су била уобичајене грађе и са очуваним ендотелом, међутим фокално је била присутна вакуолизација органела у цитоплазми, која може настати због поремећаја ћелијског дисања услед дејства реактивних кисеоничних врста (*Das* и др, 2008). Овакве промене изазивају поремећај Na/K пумпе зависне од АТФ што у крајњем доводи до накупљања јона калцијума у ћелији и након низа промена настаје и интерстицијални едем срца. Едем доводи до депресије контрактилности миокарда, јер утиче на *preload* и вредности максимале стопе развојаа притиса у левој комри (*Adali* и др, 2016). Управо у групи цисплатине смо приметили пад вредности  $dp/dt \max$ , односно смањење контрактилне способности срца (Графикон 42). Насупрот томе, примена физиолошког раствора очекивано није изазвала битне промене у хистолошкој грађи срца што се може уочити на Слици 4Е.

Хронична примена комплекса рутенијума са етилендиамином и бипиридином није изазвала значајне морфолошке промене у јетри пацова. Наиме, очувана је лобуларна грађа јетриног паренхима, али се уочава лакостепена стаза у капиларима (Слика 5А и 5С). Међутим, *Savic* и сарадници су утврдили да је примена комплекса рутенијума са етилендиамином у дози од 2 mg/kg код мишева изазвала веће оштећење јетре у поређењу са применом оксалиплатине, што не корелира са нашим резултатима (*Savic* и др, 2020). Насупрот томе, комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном је изазвао значајно оштећење ткива јетре. Иако је очувана лобуларна грађа јетриног паренхима, хепатоцити су лако увећани, а једра са израженим дисперзно расутиим хетерохроматином, без кариолизе и некрозе. Присутна је и значајна стаза и често перинуклеарно расветљење цитоплазме, слабије изражене ћелијске границе (Слика 5В). *Lin* и сарадници су у студији испитивања хепатореналне токсичности комплекса рутенијума(II) на мишевима уочили незнатне морфолошке промене у ткивима јетре и бубрега, док је цисплатина индуковала едем хепатоцита и некрозу у ткиву јетре (*Lin* и др, 2021). Ови резултати су донекле у сагласности са нашим које смо добили анализом препарата јетре пацова након хроничног излагања цисплатини. Наиме, примена цисплатине је довела до изражене стазе, а на хистолошком препарату могли су се видети и знаци свеже хеморагије у перивенуларним и синусоидним просторима (Слика 5Д). Као што је и било очекивано, у контролној групи се бележи регуларна хистоморфолошка грађа паренхима јетре (Слика 5Е).

Примена комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном је изазвала умерен степен оштећења ткива бубрега. На попречним пресецима ткива бубрега смо уочили лако дилатиране лумене проксималних сабирних каналића, док су у тубуларном епителу били присутни знаци вакуолизације и некрозе и оштећења тубуларног епитела са интратубуларним цитоплазматским садржајем (Слике 6А и 6В). Комплекс рутенијума са бипиридинским лигандом је такође изазвао одређене морфолошке промене у бубрезима пацова (у тубуларном епителу су присутни знаци лакостепене вакуолизације и некрозе, измењена је и структура гломерула) (Слика 6С). Међутим, ове промене у грађи бубрега су биле значајно слабијег интензитета у поређењу са хистопатолошким променама у бубрезима пацова третираних цисплатином. Наши налази су зато у складу са налазима *Savic* и сарадника који су хистопатолошким анализом ткива бубрега потврдили мање оштећење ткива бубрега третираних комплексом рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном у

поређењу са оксалиплатином (Savic и др, 2020). Сличне налазе објавили су Wang и сарадници који су показали да је у поређењу са цисплатином, полипиридилски комплекс рутенијума(II) био изузетно добро толерисан у терапијским дозама (10 и 20 mg/kg) са одсуством токсичности код третираних мишева (Wang и др, 2014). Наиме, значајна разлика у испољавању токсичних ефеката цисплатине и комплекса рутенијума који су они испитивали може се објаснити њиховим различитим ћелијским метама. Опште је познато да је мета цисплатине ДНК и главни механизам њене цитотоксичности произилази из способности ступања у моно- или бифункционалне реакције са молекулом ДНК. Због слабе селективности цисплатине између туморских и здравих ћелија овај хемиотерапеутик изазива тешке нежељене реакције у клиничкој примени. С друге стране, мета поменутих комплекса рутенијума су митохондрије у цитоплазми, и потврђено је да ови комплекси испољавају цитотоксичну активност преко унутрашњег митохондријалног сигналног пута апоптозе. Такође, у овој студији су показали да је комплекс рутенијума изазивао већу цитотоксичност на туморске ћелије у односу на здраве ћелије.

Имајући у виду познату чињеницу да цисплатина има снажан потенцијал за индукцију нефротоксичности, не чуди да смо у нашој студији најизраженије промене на бубрезима уочили на попречним пресецима ткива бубрега пацова третираних цисплатином. Лумени проксималних и дисталних сабирних каналића су били дилатирани, јавила се изражена вакуолизација и некроза тубулских ћелија, са оштећењем тубуларног епитела и знацима некрозе (Слика 6D). У корелацији са нашим налазима су и резултати студије *Alves de Souza* и сарадника који су забележили појаву едема тубуларног епитела, превасходно у пределу кортекса (*Alves de Souza* и др, 2017). Уједно су показали и да се након примене цисплатине фокално јавља пикноза и кариорексија, а познато је да обе појаве указују на ћелијску смрт. Ове промене нису забележене у бубрезима пацова изложеним комплексу рутенијума и сугеришу на ниску токсичност овог комплекса са аспекта индукције оштећења морфологије и функције бубрега. Као што је већ напоменуто раније, цисплатина изазива оксидациони стрес у митохондријама проксималних тубула и ендотелних ћелија, након чега следи продукција реактивних врста кисеоника и азота, оштећење структуре и функције митохондрија и најзад оштећење бубрега. С обзиром на то да се цисплатина акумулира у ткиву бубрега, она се ковалентно везује за протеине који утичу на смањење активности антиоксидационих ензима (Ју и др, 2021). Сходно томе, долази до оштећења ткива бубрега које се манифестује повишеним нивоима креатинина и урее у серуму. Комплекс рутенијума у дози која испољава антитуморске ефекте (10 mg/kg) није изазвао ове нежељене ефекте, што се може приписати његовим антиоксидационим, антипролиферативним и антитуморским карактеристикама (*Anchuti* и др, 2012). У контролној групи бубрези су очекивано били очуване морфолошке грађе (Слика 6E).

## 5.8. Кардиотоксичне особине и профил индукције оксидационог стреса испитиваних комплекса рутенијума

Циљ наше студије је био да испита механизме потенцијално кардиотоксичног дејства три комплекса рутенијума(II) и њихов утицај на редокс равнотежу. Додатни циљеви су били да се испита њихов ефекат на хепатотоксичност, нефротоксичност и метаболизам липида.



Комплекс рутенијума са етилендиамином је испољио снажно негативно инотропно и хипотензивно дејство. Поред тога, он је изазвао и значајно снижење коронарног протока, док није имао значајне ефекте на хронотропно дејство. Ова негативна дејства на срце су у значајној мери упоредива са дејствима цисплатине, добро познатог кардиотоксичног хемиотерапеутика. Овај комплекс изазива такође снажни оксидациони стрес, примарно индукцијом синтезе водоник пероксида, потом нитрита а најзад и супероксид анјон радикала. Инхибиција активности каталазе и супероксид дисмутазе су врло вероватни механизми оваквог дејства. Овај комплекс рутенијума испољава слаб потенцијал дејства на друге испитиване механизме поремећаја редокс хомеостазе, укључујући липидну пероксидацију и путеве повезане са глутатионом. Такође, комплекс рутенијума са етилендиамином не утиче на сигналне путеве апоптозе. Дејства овог молекула на индукцију оксидационог стреса у знатној мери су зависна од датих телесних течности и ткива. Потенцијално негативне ефекте овај комплекс би могао да испољи на метаболизам триглицерида и кроз могуће неселективно цитолитичко дејство. Интринзички хепатотоксични и нефротоксични потенцијал овог једињења је вероватно ограничен и, могуће условљен додатним, потенцирајућим чиниоцима. Свеукупно, овакав профил токсичности комплекса рутенијума са етилендиамином смањује изгледе за његову потенцијално широку терапијску примену.

Комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном је испољио умерено негативно инотропно и хипотензивно дејство, без значајног снижења коронарног протока и без хронотропних поремећаја. Ова негативна дејства на срце су знатно слабија од ефеката цисплатине. Такође, овај комплекс изазива снажни оксидациони стрес, у највећој мери индукцијом синтезе водоник пероксида и нитрита, а у одређеној мери и супероксид анјон радикала. Инхибиција активности ензима супероксид дисмутазе и делом поремећај метаболизма глутатиона су највероватније механизми оваквог ефекта. Овај комплекс рутенијума испољава слаб потенцијал дејства на липидну пероксидацију и остварује позитивне ефекте на индукцију неких путева антиоксидационе одбране, као што је повећање активности каталазе и, можда и глутатион пероксидазе, бар у неким ткивима. Такође, комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном не утиче на сигналне путеве апоптозе. Могућа негативна дејства поменути комплекс би могао да испољи на метаболизам триглицерида и кроз потенцијално неселективно цитолитичко дејство. Интринзички потенцијал за нефротоксичност овог комплекса је вероватно лимитиран и условљен додатним факторима. С друге стране, комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном би могао да има потенцијал да изазове хистопатолошка оштећења јетре, премда његов прави значај у ремећењу њених физиолошких функција није за сада јасан. Сумарно, овакав профил токсичности комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном чини га потенцијалним кандидатом за даљи развој у циљу терапијске примене, хемијским модификацијама које би додатно умањиле његов токсични потенцијал, а задржале или повећале корисну биолошку активност.

Комплекс рутенијума са бипиридином је испољио умерено негативно инотропно и слабо хипотензивно дејство, без значајног снижења коронарног протока и без хронотропних поремећаја. Ова негативна дејства на срце су знатно слабија од ефеката цисплатине. Поменути комплекс изазива умерени оксидациони стрес, примарно индукцијом производње водоник пероксида и делом супероксид анјон радикала. Инхибиција активности каталазе и супероксид дисмутазе и поремећаји метаболизма глутатиона врло вероватно синергистичким механизмом доприносе оваквом профили индукције поремећаја редокс равнотеже. Овај комплекс рутенијума испољава слаб потенцијал дејства на липидну пероксидацију. И за овај комплекс важи да су дејства на изазивање оксидационог стреса у знатној мери зависна од датих

биолошких течности и ткива. Комплекс рутенијума са бипиридином у одређеној мери утиче на сигналне путеве апоптозе, индукујући поједине и проапоптотске и антиапоптотске механизме. Поред потенцијалног неселективног цитолитичког дејства, овај комплекс би могао неповољно утицати и на целуларни интегритет кардиомиоцита, односно срчаног ткива. Интринзички хепатотоксични и нефротоксични потенцијал овог једињења је вероватно ограничен и условљен додатним, потенцирајућим факторима. Такође, овај комплекс вероватно нема значајни потенцијал за изазивање поремећаја метаболизма липида. Уопште узев, овакав токсични профил комплекса рутенијума са бипиридином чини га могућим кандидатом за даљи развој са циљем примене у терапији, изменама у хемијској структури које би даље умањиле његов токсични потенцијал, а повећале жељено биолошко дејство.

Сумарно, у поређењу са цисплатином рутенијумски комплекси испољавају другачији механизам дејства, што се приписује њиховим повољним особинама. Сматра се да способност рутенијума да опонаша гвожђе у везивању за различите биомолекуле, укључујући протеине у серуму (трансферин и албумин), доприноси ниској системској токсичности комплекса који се заснивају на рутенијуму(II) (Wang и др, 2022). Наиме, испитивани комплекси рутенијума са бидентатним хелатним лигандима *en* и *dach*, који имају способност грађења јаких водоничних веза, показали су значајно већи афинитет за везивање транспортних серумских протеина у односу на комплекс са *bpy*. Постоји позитивна корелација између ове особине бидентатних лиганда и цитотоксичности (комплекси са *en* и *dach* лигандима су више цитотоксични од *bpy* комплекса) (Nišavić и др, 2016). Такође, сва три комплекса показују већи афинитет за везивање албумина у поређењу са трансферином. С обзиром на то да је албумин најзаступљенији протеин у серуму, транспорт и биодистрибуција испитиваних рутенијумских комплекса значајно зависи од везивања за овај протеин. У случају оба протеина, највећи афинитет везивања има *dach* лиганд, док *bpy* има најнижи (Nišavić и др, 2016).

Узевши све наше резултате у обзир, а уједно и на основу резултата претходних студија, различити потенцијал испитиваних комплекса рутенијума за изазивање системске ћелијске токсичности приписује се, дакле, структури инертних хелатних лиганата. Волуминозност хелатних лиганата утиче на брзину реакције супституције. Lazić и сарадници (Lazić и др, 2016) су показали да је комплекс рутенијума са *dach* лигандом, који је волуминознији, имао спорију брзину супституционе реакције са ендогеним биомолекулима који представљају доноре сумпора, у односу на цисплатину. прстен у *dach* лигаду има позитивн индуктивни ефекат, па централни метални јон рутенијума(II) постаје мање електрофилан, што објашњава спорије реакције супституције. Такође, комплекс рутенијума са *en* лигандом је липофилнији (-1,33) у поређењу са комплексом са *dach* лигандом (-1,45), што може убрзати дистрибуцију кроз организам и преузимање од стране ћелија и довести до боље цитотоксичне активности. На основу наших резултата, можемо претпоставити да је нижи потенцијал комплекса рутенијума са *dach* лигандом да изазове оксидациони стрес ћелија и срчаног ткива последица споријег ступања у реакције са ендогеним молекулима, у односу на цисплатину. С друге стране, комплекс рутенијума са *bpy* лигандом показао је већу реактивност (Lazić и др, 2016) и, самим тим, већи потенцијал да изазове ћелијску токсичност стварањем слободних радикала. Увођење *en* и *dach* лиганда у коначну структуру комплекса може утицати на повећање антиоксидационе одбрамбене способности, као и на смањење липидне пероксидације кардиомиоцита. На основу потврђене јаче цитотоксичности комплекса рутенијума са *en* лигандом, претпоставља се да је мања величина тог лиганда у поређењу са *dach* лигандом одговорна за нешто већу цитотоксичну активност овог комплекса, што се у нашем истраживању манифестује већом индукцијом оксидационог стреса.

Можемо закључити да сви примењени комплекси рутенијума имају мање изражен потенцијал за индукцију кардиотоксичности посредоване оксидационим стресом у поређењу са цисплатином. Међу њима, комплекс са *dach* лигандом има најмањи потенцијал да индукује поремећај редокс равнотеже и последично каскадно иницирање апоптоске смрти кардиомиоцита. Иако се цитотоксичност нових металних агенаса упоређује са цисплатином, леком који је најдуже присутан у клиничкој пракси, треба имати на уму да се механизми деловања и својства металофармацеутика, као и њихова системска токсичност, могу значајно разликовати. Будућност у области хемиотерапијских лекова заснованих на рутенијуму охрабрује, имајући у виду њихове повољне карактеристике у смислу антитуморске активности и токсичности. С обзиром на то да се код пацијената са карциномом јавља широк спектар клиничких ентитета срчаних компликација, будуће студије би требало да нагласе важност расветљавања механизма кардиотоксичности потенцијалних металофармацеутика са рутенијумом.

**VI**

**ЗАКЉУЧЦИ**

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата наше студије и њихове компарације са резултатима других истраживача може се закључити следеће:

- 1) Комплекси рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином, за разлику од комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатином, не смањују телесну масу, слично контроли, што је од потенцијалне терапијске користи. Утицај свих испитиваних комплекса рутенијума на масу јетре су били упоредиви са контролом, при чему је цисплатина довела до смањења масе јетре, док није било разлике између испитиваних група у погледу масе срца и бубрега.
- 2) Унутар ауторегулаторног ранга, сва три испитивана комплекса рутенијума нису изазвала значајна одступања у вредностима испитиваних кардиодинамских и параметара коронарне циркулације, за разлику од цисплатине која је негативно утицала на релаксацију миокарда.
- 3) Комплекси рутенијума су имали повољније ефекте на контрактилност миокарда у односу на цисплатину, иако су испољили неповољнија дејства у односу на контролни третман.
- 4) Комплекси рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином су изазвали пораст систолног и дијастолног притиска у левој комори изолованог срца пацова, што би такође представљало потенцијану терапијску корист, за разлику од комплекса рутенијума са етилендиамином и цисплатином који су довели до снижења крвног притиска.
- 5) Комплекси рутенијума и цисплатина нису имали утицаја на електричну активност спроводног система срца и нису мењали срчану фреквенцу.
- 6) Комплекс рутенијума са етилендиамином и цисплатина негативно утичу на коронарни проток у условима хипероксије док остала два испитивана комплекса рутенијума не мењају значајно коронарни проток изолованог срца пацова.
- 7) Коронарни венски ефлуент садржи више концентрације слободних радикала при чему се детектују селективна дејства појединих супстанци на различите параметре и то: супероксид анјон радикала у групи изложених цисплатини, водоник пероксида у експерименталним групама изложених комплексу рутенијума са етилендиамином и бипиридином и цисплатини, TBARS у групи изложених комплексу рутенијума са етилендиамином и бипиридином, и нитрита у експерименталној групи јединки изложених комплексу рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатини.
- 8) Сва три испитивана комплекса рутенијума су индуковала повећање синтезе водоник пероксида у плазми, а цисплатина је довела до повећања свих испитиваних прооксидационих маркера: супероксид анјон радикала, водоник пероксида, TBARS и нитрита.

- 9) Активност каталазе у еритроцитима су значајно смањили комплекси рутенијума са етилендиамином и бипиридином, док је комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном изазвао повећање активности овог ензима, у односу на контролу и цисплатину.
- 10) Сви испитивани комплекси рутенијума значајно смањују активност супероксид дисмутазе у еритроцитима у односу на контролни третман, док комплекс рутенијума са етилендиамином повећава активност овог ензима у поређењу са дејством цисплатине.
- 11) Активност глутатион пероксидазе у еритроцитима је значајно смањена под утицајем комплекса рутенијума са бипиридином, док комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном и цисплатина изазвају повећање активности овог ензима.
- 12) Концентрација редукованог глутатиона у еритроцитима је значајно смањена под утицајем свих испитиваних комплекса рутенијума, сем комплекса рутенијума са етилендиамином. Концентрација оксидованог глутатиона у еритроцитима је значајно повећана под утицајем комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном у поређењу са цисплатином, док је смањена под дејством комплекса рутенијума са бипиридином и цисплатином.
- 13) Комплекси рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном смањују однос GSH и GSSG, док комплекс рутенијума са бипиридином и цисплатина повећавају овај однос.
- 14) Концентрација TBARS у срчаном ткиву је значајно повећана дејством цисплатине, док су ефекти комплекса рутенијума упоредиви са контролом. Активност каталазе у срчаном ткиву је значајно смањена под утицајем сва три комплекса рутенијума и цисплатине, у односу на контролу. Испитивани металофармацеутици не утичу значајно на промену активности супероксид дисмутазе у срчаном ткиву. Концентрација редукованог глутатиона у срчаном ткиву је значајно смањена под дејством сва четири испитивана металофармацеутика, у односу на контролни третман.
- 15) Уочене су одређене разлике поједних дејстава неких испитиваних комплекса рутенијума у срчаном ткиву, с једне и коронарном венском ефлуенту, плазми и еритроцитима, с друге стране.
- 16) Релативна експресија гена за проапоптотски маркер Вах је била значајно снижена под дејством испитиваних комплекса рутенијума у односу на цисплатину и контролни третман. Релативна експресија гена за проапоптотски маркер каспазу 3 је била значајно снижена под утицајем комплекса рутенијума у односу на цисплатину, а комплекс са бипиридином је у односу на контролни третман изазвао повећану експресију овог маркера.
- 17) Релативна експресија гена за антиапоптотски маркер Bcl-2 је била повећана под утицајем комплекса рутенијума са бипиридином у односу на контролу, док остала три комплекса нису значајно мењала овај биомаркер.

- 18) Концентрације укупног холестерола и LDL у серуму су значајно повећане под дејством цисплатине док их испитивани комплекси рутенијума не мењају, у поређењу са контролним третманом. Испитивани металофармацеутици не мењају концентрације HDL у серуму. Концентрације триглицерида су значајно повећане под утицајем комплекса рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном, у поређењу са цисплатином.
- 19) Активност LDH у серуму је значајно повећана под дејством три металофармацеутика, комплекса рутенијума са диаминоциклохексаном и бипиридином, као и цисплатине, у односу на контролни третман.
- 20) Активност СК у серуму је значајно повећана под дејством комплекса рутенијума са етилендиамином у односу на контролу, док остала три металофармацеутика не мењају активност овог ензима. Испитивани комплекси рутенијума не мењају активност кардиоспецифичног ензима СК-МВ у серуму, за разлику од цисплатине која је изазвала повећање активности овог ензима.
- 21) Комплекс рутенијума са бипиридином је изазвао значајно повећање серумске концентрације срчаног тропонина, док остала два испитивана рутенијумска комплекса и цисплатина не мењају значајно вредности овог молекула у серуму у односу на контролни третман.
- 22) Активност AST у серуму значајно је повећана у групама експерименталних животиња изложеним испитиваним металофармацеутицима у односу на контролни третман. Активност ALT у серуму није значајно повећана у групама експерименталних животиња изложеним испитиваним металофармацеутицима, у односу на контролни третман.
- 23) Испитивани металофармацеутици не изазивају значајно повећање серумских концентрација урее и креатинина, у односу на контролни третман.
- 24) Највећи потенцијал за изазивање хистопатолошких оштећења срчаног ткива је имала цисплатина а потом комплекс рутенијума са бипиридином, док су комплекси рутенијума са етилендиамином и диаминоциклохексаном изазвали знатно мање промене.
- 25) Највећи потенцијал за изазивање хистопатолошких оштећења јетре је имао комплекс рутенијума са диаминоциклохексаном а потом цисплатина, док су комплекси рутенијума са етилендиамином и бипиридином изазвали знатно мање промене.
- 26) Највећи потенцијал за изазивање хистопатолошких оштећења бубрега је имала цисплатина, док су комплекси рутенијума изазвали знатно мање или незнатне промене.

Уопште узев, испитивани комплекси рутенијума(II) су остварили нижи токсични потенцијал у поређењу са цисплатином, као референтним цитостатиком. Утврђен профил токсичности комплекса рутенијума(II) са етилендиаминским лигандом смањује изгледе за његову потенцијалну терапијску примену, док би комплекси рутенијума(II) са диаминоциклохексанским и бипиридинским лигандом могли бити потенцијални кандидати за даљи развој са циљем терапијске примене, уз хемијске модификације које би додатно умањиле њихов токсични потенцијал, а задржале или повећале корисну биолошку активност. Међу њима, комплекс рутенијума(II) са диаминоциклохексанским лигандом се издвојио као најповољнији са аспекта профила токсичности.



# **VII**

# **ЛИТЕРАТУРА**

## 7. ЛИТЕРАТУРА

Abd Rashid N, Abd Halim SAS, Teoh SL, Budin SB, Hussan F, Adib Ridzuan NR et al. The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2021;144:112328.

Abid M, Shamsi, F, Azam A. Ruthenium complexes: an emerging ground to the development of metallopharmaceuticals for cancer therapy. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16:772–86.

Abliamov O, Kedziorek M, Torborg C, Malinska M, Wozniak K, Grela K. New Ruthenium(II) Indenylidene Complexes Bearing Unsymmetrical N-Heterocyclic Carbenes. *Organometallics.* 2012;31(21):7316-9.

Adalı F, Gonul Y, Kocak A, Yuksel Y, Ozkceci G, Ozdemir C et al. Effects of thymoquinone against cisplatin-induced cardiac injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2016;31(4):271-7.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984;105:121-6.

Agunbiade TA, Zaghlol RY, Barac A. Heart Failure in Relation to Anthracyclines and Other Chemotherapies. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2019;15(4):243-9.

Ajith TA, Nivitha V, Usha S. Zingiber officinale Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin induced acute renal failure. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(6):921–7.

Akram S, Teong HF, Fliegel L, Pervaiz S, Clement MV. Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers. *Cell Death Differ.* 2006;13(4):628–41.

Alessio E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur J Inorg Chem.* 2017;2017(12):1549–60.

Alho H, Hemilä H, Korpela H. E-ja C-vitamiinin, karotenoidien, ubikinonin ja seleenin merkitys antioksidatiivisessa puolustusjärjestelmässä [Role of vitamin E and C, carotenoids, ubiquinone and selenium in the antioxidative defense system]. *Duodecim.* 1994;110(17):1621-8.

Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem.* 2020;44(3):e13145.

Allardyce CS and Dyson PJ. Metal-based drugs that break the rules. *Dalton Trans.* 2016;45(8):3201-9.

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.

Alves de Souza CE, Alves de Souza HM, Stipp MC, Corso CR, Galindo CM, Cardoso CR et al. Ruthenium complex exerts antineoplastic effects that are mediated by oxidative stress without inducing toxicity in Walker-256 tumor-bearing rats. *Free Radic Biol Med.* 2017;110:228-39.

Ammer U, Natochin Yu, David C, Rumrich G, Ullrich KJ. Cisplatin nephrotoxicity: site of functional disturbance and correlation to loss of body weight. *Ren Physiol Biochem.* 1993;16(3):131-45.

Anchuri SS, Thota S, Yerra R, Devarakonda KP, Dhulipala S. Novel mononuclear ruthenium(II) compounds in cancer therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(7):3293-8.

Ang E, Mwempwa A, Heron C, Ahn Y, Rivalland G, Ha L et al. Cardiac Troponin I and T in Checkpoint Inhibitor-associated Myositis and Myocarditis. *J Immunother.* 2021;44(4):162-3.

Anthony EJ, Bolitho EM, Bridgewater HE, Carter OW, Donnelly JM, Imberti C et al. Metallo drugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chem Sci.* 2020;11:12888-917.

Arany I and Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003;23(5):460-4.

Auclair C and Voisin E. 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of methods for oxygen radical research*. Edited by R.A. Greenwald, CRC Press, Boca Raton, pp. 123-132.

Azmanova M and Anaïs Pitto-Barry. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? *Chembiochem.* 2022;23(10):e202100641.

Bacac M, Vadori M, Sava G, Pacor S. Cocultures of metastatic and host immune cells: selective effects of NAMI-A for tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004;53(12):1101-10.

Badary OA, Awad AS, Abdel-Maksoud S, Hamada FM. Cardiac DT-diaphorase contributes to the detoxification system against doxorubicin induced positive inotropic effects in guinea-pig isolated atria. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(12):856-61.

Balta S. Endothelial Dysfunction and Inflammatory Markers of Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2021;19(3):243-9.

Baruah H, Barry CG, Bierbach U. Platinum-intercalator conjugates: from DNA-targeted cisplatin derivatives to adenine binding complexes as potential modulators of gene regulation. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1537-49.

Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(5):721-33.

Bergamo A and Sava G. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chem Soc Rev.* 2015;44(24):8818-35.

Bergamo A, Gagliardi R, Scarcia V, Furlani A, Allesio E, Mestroni G et al. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(1):559-64.

Bergamo A, Gaiddon C, Schellens JHM, Beijnen JH, Sava G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *J Inorg Biochem.* 2012;106:90–9.

Beutler E. Oxidized Glutathione (GSSG). In: *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Edited by Beutler E. Grune and Stratton, New York, 1975a, pp. 115-7.

Beutler E. Reduced Glutathione (GSH). In: *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Edited by Beutler E. Grune and Stratton, New York, 1975b, pp. 112–4.

Beutler E. Superoxide dismutase. In: *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Edited by Beutler E. Grune and Stratton, Philadelphia, 1984, pp. 83-5.

Bhagat A and Kleinerman ES. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Causes, Mechanisms, and Prevention. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1257:181-92.

Bhargava A and Vaishampayan UN. Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(11):1787-97.

Biancalana L, Pampaloni G, Marchetti F. Arene Ruthenium(II) Complexes with Phosphorous Ligands as Possible Anticancer Agents. *Chimia (Aarau).* 2017;71(9):573-9.

Bijelic A, Theiner S, Keppler BK, Rompel A. X-ray Structure Analysis of Indazolium trans-[Tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides Insights into the Drug Binding Mechanism. *J Med Chem.* 2016;59(12):5894–5903.

Blazevic A, Hummer AA, Heffeter P, Berger W, Filipits M, Cibir G et al. Electronic State of Sodium trans-[Tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (NKP-1339) in Tumor, Liver and Kidney Tissue of a SW480-bearing Mouse. *Sci Rep.* 2017;7:40966.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003;91(2):179-94.

Bloom MW, Hamo CE, Cardinale D, Ky B, Nohria A, Baer L et al. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure: Part 1: Definitions, Pathophysiology, Risk Factors, and Imaging. *Circ Heart Fail.* 2016;9(1):e002661.

Blunden MB, Rawal A, Lu H, Stenzel MH. Superior Chemotherapeutic Benefits from the Ruthenium-Based Anti-Metastatic Drug NAMI-A through Conjugation to Polymeric Micelles. *Macromolecules.* 2014;47(5):1646-55.

Brindell M, Stawoska I, Supel J, Skoczowski A, Stochel G, Eldik van R. The reduction of (ImH)[trans-RuIII<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(dmsO)(Im)] under physiological conditions: preferential reaction of the reduced complex with human serum albumin. *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(6):909–18.

Brioukhanov AL and Netrusov AI. Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry (Mosc).* 2004;69(9):949-62.

Brouwers B, Pruniau VP, Cauwelier EJ, Schuit F, Lerut E, Ectors N et al. Phlorizin pretreatment reduces acute renal toxicity in a mouse model for diabetic nephropathy. *J Biol Chem*. 2013;288(38):27200–7.

Bruijninx PC and Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *J Curr Opin Chem Biol*. 2008;12:197–206.

Büchel GE, Kossatz S, Sadique A, Rapta P, Zalibera M, Bucinsky L et al. cis-Tetrachlorido-bis(indazole)osmium(IV) and its osmium(III) analogues: paving the way towards the cis-isomer of the ruthenium anticancer drugs KP1019 and/or NKP1339. *Dalton Trans*. 2017;46(35):11925–41.

Bukhari IA, Mohamed OY, Alhowikan AM, Lateef R, Hagar H, Assiri RA et al. Protective Effect of Rutin Trihydrate Against Dose-Dependent, Cisplatin-Induced Cardiac Toxicity in Isolated Perfused Rat's Heart. *Cureus*. 2022;14(1):e21572.

Burns CV, Edwin SB, Szpunar S, Forman J. Cisplatin-induced nephrotoxicity in an outpatient setting. *Pharmacotherapy*. 2021;41(2):184–90.

Burton GJ and Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287–99.

Cabezos 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.

Čanović P, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demetri N, Mitrović M et al. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem*. 2017;22(7):1007–28.

Cao B, Bray F, Ilbawi A, Soerjomataram I. Effect on longevity of one-third reduction in premature mortality from non-communicable diseases by 2030: a global analysis of the Sustainable Development Goal health target. *Lancet Glob Health*. 2018;6(12):e1288–96.

Catanzaro MP, Weiner A, Kaminaris A, Li C, Cai F, Zhao F et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy. *FASEB J*. 2019;33(10):11096–11108.

Carozzi V, Chiorazzi A, Canta A, Oggioni N, Gilardini A, Rodriguez-Menendez V et al. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *Eur J Cancer*. 2009;45(4):656–65.

Champlin RE. Busulfan or TBI: answer to an age-old question. *Blood*. 2013;122(24):3856–7.

Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71(9):725–31.

Chen J, Tao Q, Wu J, Wang M, Su Z, Qian Y et al. A lysosome-targeted ruthenium(II) polypyridyl complex as photodynamic anticancer agent. *J Inorg Biochem*. 2020;210:111132.

Chen X, Wei W, Li Y, Huang J, Ci X. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2019;308:269-78.

Cheng G and Li L. High-glucose-induced apoptosis, ROS production and pro-inflammatory response in cardiomyocytes is attenuated by metformin treatment via PP2A activation. *J Biosci.* 2020;45:126.

Cheng TC, Hsu YW, Lu FJ, Chen YY, Tsai NM, Chen WK et al. Nephroprotective effect of electrolyzed reduced water against cisplatin-induced kidney toxicity and oxidative damage in mice. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(2):119-26.

Chikazawa K, Netsu S, Imai K, Ishiguro A, Kimura A, Wang L et al. Nedaplatin use in patients with hypersensitivity reaction episodes to carboplatin. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2020;59(4):546-50.

Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 2004;4:20.

Chylewska A, Biedulska M, Sumczynski P, Makowski M. Metallopharmaceuticals in Therapy - A New Horizon for Scientific Research. *Curr Med Chem.* 2018;25(15):1729-91.

Ciftci O, Ozdemir I, Cakir O, Demir S. The determination of oxidative damage in heart tissue of rats caused by ruthenium(II) and gold(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Toxicol Ind Health.* 2011a;27(8):735–41.

Ciftci O, Ozdemir I, Vardi N, Gurbuz N. Novel platinum-N-heterocyclic carbene complex is more cardiotoxic than cis-platin in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2011b;30(9):1342–9.

Cocchietto M and Sava G. Blood concentration and toxicity of the antimetastasis agent NAMI-A following repeated intravenous treatment in mice. *Pharmacology & Toxicology.* 2000;87(5):193-197.

Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:8-14.

Contreras-Zentella ML and Hernández-Muñoz R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3529149.

Corral E, Hotze AC, den Dulk H, Leczkowska A, Rodger A, Hannon MJ et al. Ruthenium polypyridyl complexes and their modes of interaction with DNA: is there a correlation between these interactions and the antitumor activity of the compounds? *J Biol Inorg Chem.* 2009;14(3):439-48.

Costa VM, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remia F. Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. *Curr Med Chem.* 2011;18(15):2272–314.

Crohns M, Liippo K, Erhola M, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H et al. Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clin Biochem*. 2009;42(12):1236–45.

Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2018;41:1-25.

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.

Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):307-21.

Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*. 2015;66(3):393-405.

Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):291-317.

Das S, Khan N, Mukherjee S, Bagchi D, Gurusamy N, Swartz H et al. Redox regulation of resveratrol-mediated switching of death signal into survival signal. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(1):82-90.

Dasari S and Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.

Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*. 2012;2012:645460.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(4):316-28.

Demkow U and Stelmaszczyk-Emmel A. Cardiotoxicity of cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;187(1):64–7.

Demkow U, Biatas-Chromiec B, Stelmaszczyk-Emmel A, Radzikowska E, Wiatr E, Radwan-Rohrenscheff P et al. The Cardiac Markers and Oxidative Stress Parameters in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. *EJIFCC*. 2011;22(1):6–15.

Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Moine L, Tolosa de Talamoni N. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol*. 2017;23(16):2841-53.

Dobson PD and Kell DB. Opinion—Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: An exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:205–20.

Dömötör O, Hartinger CG, Bytzek AK, Kiss T, Keppler BK, Enyedy EA. Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies. *J Biol Inorg Chem*. 2013;18(1):9-17.

Dougan SJ, Melchart M, Habtemariam A, Parsons S, Sadler PJ. Phenylazo-pyridine and phenylazo-pyrazole chlorido ruthenium(II) arene complexes: arene loss, aquation, and cancer cell cytotoxicity. *Inorg Chem*. 2006;45(26):10882-94.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971;31:87-96.

Dragutan I, Dragutan V, Demonceau A. Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes. *Molecules*. 2015;20(9):17244-74.

Duong QV, Hoffman A, Zhong K, Dessinger MJ, Zhang Y, Bazil JN. Calcium overload decreases net free radical emission in cardiac mitochondria. *Mitochondrion*. 2020;51:126-139.

Eisenberg MA, Green-Hopkins I, Alexander ME, Chiang VW. Cardiac troponin T as a screening test for myocarditis in children. *Pediatr Emerg Care*. 2012;28(11):1173-8.

Ejidike IP and Ajibade PA. Ruthenium(III) Complexes of Heterocyclic Tridentate (ONN) Schiff Base: Synthesis, Characterization and its Biological Properties as an Antiradical and Antiproliferative Agent. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):60.

El-Awady ESE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):335-41.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

El-Sawalhi MM and 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.

Elsayed A, Elkomy A, Elkammar R, Youssef G, Abdelhiee EY, Abdo W et al. Synergistic protective effects of lycopene and N-acetylcysteine against cisplatin-induced hepatorenal toxicity in rats. *Sci Rep*. 2021;11(1):13979.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol*. 2000;20(3):929-35.

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

Ewer MS and Lippman SM. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol*. 2005;23(13):2900-2.



Fabiani I, Aimo A, Grigoratos C, Castiglione V, Gentile F, Saccaro LF et al. Oxidative stress and inflammation: determinants of anthracycline cardiotoxicity and possible therapeutic targets. *Heart Fail Rev.* 2021;26(4):881-90.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005;37(11):719-27.

Fang CY, Lou DY, Zhou LQ, Wang JC, Yang B, He QJ et al. Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(12):1951-69.

Farris FF, Dedrick RL, King FG. Cisplatin pharmacokinetics: applications of a physiological model. *Toxicol Lett.* 1988;43(1-3):117-37.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021. doi:10.1002/ijc.33588.

Flocke LS, Trondl R, Jakupec MA, Keppler BK. Molecular mode of action of NKP-1339 - a clinically investigated ruthenium-based drug - involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Invest New Drugs.* 2016;34(3):261-8.

Florea AM and Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-71.

Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 2003;10(3):257-66.

Furue H. Chemotherapy cancer treatment during the past sixty years. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2003;30(10):1404-11.

Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med.* 2017;104:144-64.

Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem.* 2005;12(18):2075-94.

Garcia JM, Scherer T, Chen JA, Guillory B, Nassif A, Papusha V et al. Inhibition of cisplatin-induced lipid catabolism and weight loss by ghrelin in male mice. *Endocrinology.* 2013;154(9):3118-29.

GBD 2019 Risk Factors Collaborators. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020;396:1223–49.

Gebicka L and Didik J. Nadtlenoazotyn jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny [Oxidative stress induced by peroxydinitrite]. *Postepy Biochem.* 2010;56(2):103-6.

Georgiou CD and Margaritis LH. Oxidative Stress and NADPH Oxidase: Connecting Electromagnetic Fields, Cation Channels and Biological Effects. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):10041.

Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019;88:102925.

Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129-44.

Gollop ND, Dhullipala A, Nagrath N, Myint PK. Is periprocedural CK-MB a better indicator of prognosis after emergency and elective percutaneous coronary intervention compared with post-procedural cardiac troponins? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;17(5):867-71.

Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-47.

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;126:131-8.

Grozav A, Miclaus V, Vostinaru O, Ghibu S, Berce C, Rotar I et al. Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;80:233-40.

Gunturk EE, Yucel B, Gunturk I, Yazici C, Yay A, Kose K. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin induced cardiotoxicity. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(6):423-8.

Guo Z and Sadler PJ. Metals in Medicine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999;38(11):1512-31.

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.

Heffeter P, Atil B, Kryeziu K, Groza D, Koellensperger G, Körner W et al. The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. *Eur J Cancer.* 2013;49(15):3366-75.

Herrmann J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(8):474-502.

Herrmann J. Detecting Cardiotoxicity in Cancer Patients Receiving VEGF Inhibitors. *Oncology (Williston Park).* 2019;33(2):75-7.

Herscher LL, Siegel RJ, Said JW, Edwalds GM, Moran MM, Fishbein MC. Distribution of LDH-1 in normal, ischemic, and necrotic myocardium. An immunoperoxidase study. *Am J Clin Pathol.* 1984;81(2):198-203.

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.

Hojman P, Fjelbye J, Zerahn B, Christensen JF, Dethlefsen C, Lonkvist CK et al. Voluntary exercise prevents cisplatin-induced muscle wasting during chemotherapy in mice. *PLoS One*. 2014;9(9):e109030.

Hsu PY, Mammadova A, Benkirane-Jessel N, Désaubry L, Nebigil CG. Updates on Anticancer Therapy-Mediated Vascular Toxicity and New Horizons in Therapeutic Strategies. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:694711.

Hu Y, Sun B, Zhao B, Mei D, Gu Q, Tian Z. Cisplatin-induced cardiotoxicity with midrange ejection fraction: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(52):e13807.

Huang YC, Tsai MS, Hsieh PC, Shih JH, Wang TS, Wang YC et al. Galangin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF-kappaB signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;329:128-39.

Humanes B, Camaño S, Lara JM, Sabbisetti V, González-Nicolás MÁ, Bonventre JV et al. Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(10):1645-55.

Hussein A, Ahmed AA, Shouman S, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther*. 2012;6(3):147-56.

Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19.

Işeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*. 2007;230(2-3):256-64.

Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017;39(1):73-82.

Israels ED and Israels LG. The Cell Cycle. *Stem Cells*. 2001;19:88-91.

Ivry E, Ben-Asuly A, Goldberg I, Lemcoff NG. Amino acids as chiral anionic ligands for ruthenium based asymmetric olefin metathesis. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(18):3870-3.

Jain D and Aronow W. Cardiotoxicity of cancer chemotherapy in clinical practice. *Hosp Pract (1995)*. 2019;47(1):6-15.

Jensen M, Bjerring M, Nielsen NC, Nerdal W. Cisplatin interaction with phosphatidylserine bilayer studied by solid-state NMR spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* 2010;15:213-23.

Jiang M and Dong Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(2):300-7.

Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of  $[PtL_4CL_2] \cdot H_2O$  where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem.* 2001;83(2-3):91-100.

Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(4):C849-68.

Ju SM, Bae JS, Jeon BH. AMP-activated protein kinase contributes to ROS-mediated p53 activation in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021;25(21):6691-700.

Jungwirth U, Kowol CR, Keppler BK, Hartinger CG, Berger W, Heffeter P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(4):1085–127.

Jurowska A, Jurowski K, Szklarzewicz J, Buszewski B, Kalenik T, Piekoszewski W. Molybdenum Metallopharmaceuticals Candidate Compounds - The "Renaissance" of Molybdenum Metallodrugs? *Curr Med Chem.* 2016;23(29):3322-42.

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;23:29-34.

Kajiya F. Coronary circulation. *Nihon Seirigaku Zasshi.* 2004;66(6):188-96.

Kalpage HA, Bazyljanska V, Recanati MA, Fite A, Liu J, Wan J et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB J.* 2019;33(2):1540-53.

Kang L, Tian Y, Xu S, Chen H. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. *J Neurol.* 2021;268(9):3269-82.

Karthikeyan K, Bai BR, Devaraj SN. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int J Cardiol.* 2007;115(3):326-33.

Kasherman Y, Sturup S, Gibson D. Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts. *J Med Chem* 2009;52:4319-28.

Keppler BK, Henn M, Juhl UM, Berger MR, Niebl R, Wagner FE. New Ruthenium Complexes for the Treatment of Cancer, in *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 41–69.

Kersten L, Bräunlich H, Keppler BK, Gliesing C, Wendelin M, Westphal J. Comparative nephrotoxicity of some antitumour-active platinum and ruthenium complexes in rats. *J Appl Toxicol.* 1998;18(2):93–101.

Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 4th ed. Bloxham, UK: Scion. 2008.

Kim CW and Choi KC. Effects of anticancer drugs on the cardiac mitochondrial toxicity and their underlying mechanisms for novel cardiac protective strategies. *Life Sci.* 2021;277:119607.

Kim EJY, Anko ML, Flensberg C, Majewski IJ, Geng FS, Firas J et al. BAK/BAX-Mediated Apoptosis Is a Myc-Induced Roadblock to Reprogramming. *Stem Cell Reports.* 2018;10(2):331-8.

Kim KH, Lee B, Kim YR, Kim MA, Ryu N, Jung DJ et al. Evaluating protective and therapeutic effects of alpha-lipoic acid on cisplatin induced ototoxicity. *Cell Death Dis.* 2018;9(8):827.

Kim KW, Shinagare AB, Krajewski KM, Pyo J, Tirumani SH, Jagannathan JP et al. 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.

Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016;64:277-84.

Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(40):4771-8.

Kleih M, Böpple K, Dong M, Gaißler A, Heine S, Olayioye MA et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis.* 2019;10(11):851.

Kline ER, Bassit L, Hernandez-Santiago BI, Detorio MA, Liang B, Kleinhenz DJ et al. Longterm exposure to AZT, but not d4T, increases endothelial cell oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2009;9(1):1-12.

Ku CW, Day CH, Ou HC, Ho TJ, Chen RJ, Kumar VB et al. The molecular mechanisms underlying arecoline-induced cardiac fibrosis in rats. *Open Life Sci.* 2021;16(1):1182-92.

Kuhn PS, Pichler V, Roller A, Hejl M, Jakupec MA, Kandioller W et al. Improved reaction conditions for the synthesis of new NKP-1339 derivatives and preliminary investigations on their anticancer potential. *Dalton Trans.* 2015;44(2):659-68.

Laws K and Suntharalingam K. The Next Generation of Anticancer Metallopharmaceuticals: Cancer Stem Cell-Active Inorganics. *Chembiochem.* 2018;19(21):2246-53.

Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-46.

Levina A, Mitra A, Lay PA. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics* 2009;1(6):458–70.

Lin MT, Ko JL, Liu TC, Chao PT, Ou CC. Protective Effect of D-Methionine on Body Weight Loss, Anorexia, and Nephrotoxicity in Cisplatin-Induced Chronic Toxicity in Rats. *Integr Cancer Ther.* 2018;17(3):813-24.

Lin YC, Chen LW, Chen YC, Chan ST, Liao JW, Yeh SL. Quercetin attenuates cisplatin-induced fat loss. *Eur J Nutr.* 2021;60(4):1781-93.

Lin Z, Bao Y, Hong B, Wang Y, Zhang X, Wu Y. Salvianolic acid B attenuated cisplatin-induced cardiac injury and oxidative stress via modulating Nrf2 signal pathway. *J Toxicol Sci.* 2021;46(5):199-207.

Lu J and Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:75-87.

Lu Y and Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):515-23.

Luanpitpong S, Nimmannit U, Chanvorachote P, Leonard SS, Pongrakhananon V, Wang L et al. Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis.* 2011;16(8):769-82.

Luck AN and Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferrin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(8):1012-9.

Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol.* 2013;14:1165–74.

Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(4):460–5.

Ma W, Wei S, Zhang B, Li W. Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Death in Drug-Induced Cardiotoxicity. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:434.

Macciò A and Madeddu C. Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy - from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(13):1839-57.

Mahmud KM, Niloy MS, Shakil MS, Islam MA. Ruthenium Complexes: An Alternative to Platinum Drugs in Colorectal Cancer Treatment. *Pharmaceutics.* 2021;13(8):1295.

Manohar S and Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol.* 2018;31(1):15-25.

Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39(6):656-61.

Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;77(4):1525–35.

Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(24):7634-8.

Mattson DM, Ahmad IM, Dayal D, Parsons AD, Aykin-Burns N, Li L 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(2):232-7.

McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(1):119-28.

Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Zoroddu MA. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015;284:329-50.

Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):3850.

Meija J. An ode to the atomic weights. *Nat Chem*. 2014;6(9):749-50.

Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L et al. 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.

Mirzaei S, Hushmandi K, Zabolian A, Saleki H, Torabi SMR, Ranjbar A et al. Elucidating Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cisplatin Chemotherapy: A Focus on Molecular Pathways and Possible Therapeutic Strategies. *Molecules*. 2021;26(8):2382.

Mohan S, Smyth BJ, Namin A, Phillips G, Gratton MA. Targeted amelioration of cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151(5):836-9.

Mollaei M, Hassan ZM, Khorshidi F, Langroudi L. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Transl Oncol*. 2021;14(5):101056.

Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann Pharm Fr*. 2011;69(6):286-95.

Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-Mahyari H, Motevaseli E, Najafi M, Farhood B et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12537-50.

Motswainyana WM and Ajibade PA. Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. *Advances in Chemistry*. 2015; doi: 10.1155/2015/859730

Muhammad N and Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;19:144–53.

Muhammad RN, Sallam N, El-Abhar HS. Activated ROCK/Akt/eNOS and ET-1/ERK pathways in 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity: modulation by simvastatin. *Sci Rep.* 2020;10(1):14693.

Munhoz FC, Potje SR, Pereira AC, Daruge MG, da Silva RS, Bendhack LM et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO(+)](3+) in spontaneously hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 2012;26(2):111-7.

Muraoka S and Miura T. Inactivation of mitochondrial succinate dehydrogenase by adriamycin activated by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact.* 2003;145(1):67-75.

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(1):86–91.

Naushad M, Urooj M, Ahmad T, Husain GM, Kazmi MH, Zakir M. Nephroprotective effect of *Apium graveolens* L. against Cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Ayurveda Integr Med.* 2021;12(4):607-15.

Newman DJ and 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. 1204–64.

Nguyen HQ, To NH, Zadigue P, Kerbrat S, De La Taille A, Le Gouvello S et al. Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;129:13–26.

Nijstad AL, van Eijkelenburg NKA, Kraal KCJM, Meijs MJM, de Kanter CTMM, Lilien MR et al. Cisplatin and carboplatin pharmacokinetics in a pediatric patient with hepatoblastoma receiving peritoneal dialysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020;86(3):445-9.

Nišavić M, Janjić GV, Hozić A, Petković M, Milčić MK, Vujčić Z et al. Positive and negative nano-electrospray mass spectrometry of ruthenated serum albumin supported by docking studies: an integrated approach towards defining metallodrug binding sites on proteins. *Metallomics.* 2018;10(4):587-94.

Nišavić M, Masnikosa R, Butorac A, Perica K, Rilak A, Korićanac L et al. Elucidation of the binding sites of two novel Ru(II) complexes on bovine serum albumin. *J Inorg Biochem.* 2016;159:89-95.

Nossaman VE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiol Rev.* 2010;18(4):190-7.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–8.

Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 2018;47(19):6645-53.



Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007;96(9):2181–96.

Pai VB and Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* 2000;22(4): 263–302.

Pastuszko A, Niewinna K, Czyz M. Synthesis, X-ray structure, electrochemical properties and cytotoxic effects of new arene ruthenium(II) complexes. *Organometallic Chemistry.* 2013;745:64-70.

Pearce A, Sharp L, Hanly P, Barchuk A, Bray F, de Camargo Cancela M et al. Productivity losses due to premature mortality from cancer in Brazil, Russia, India, China, and South Africa (BRICS): A population-based comparison. *Cancer Epidemiol.* 2018;53:27-34.

Pereira GC, Pereira SP, Pereira FB, Lourenço N, Lumini JA, Pereira CV et al. Early Cardiac Mitochondrial Molecular and Functional Responses to Acute Anthracycline Treatment in Wistar Rats. *Toxicol Sci.* 2019;169(1):137-50.

Pick E and 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.

Pignata S, C Cecere S, Du Bois A, Harter P, Heitz F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(8):viii51-viii56.

Pilié PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(2):81-104.

Pisoschi AM and Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.

Pongratz M, Schluga P, Jakupec MA, Arion VB, Hartinger CG, Allmaier G et al. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J Anal At Spectrom.* 2004;19:46-51.

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2(4):291-9.

Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(8):1469-86.

Qian P, Yan LJ, Li YQ, Yang HT, Duan HY, Wu JT et al. Cyanidin ameliorates cisplatin-induced cardiotoxicity via inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Exp Ther Med.* 2018;15(2):1959-65.

Rabik CA and Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(1):9-23.

Ramesh G and Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F610-18.

Ramkumar V, Mukherjea D, Dhukhwa A, Rybak LP. Oxidative Stress and Inflammation Caused by Cisplatin Ototoxicity. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(12):1919.

Rancoule C, Guy JB, Vallard A, Ben Mrad M, Rehailia A, Magné N. Les 50 ans du cisplatine [50th anniversary of cisplatin]. *Bull Cancer*. 2017;104(2):167-76.

Raschi E and 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.

Rebillard A, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem*. 2008;15(26):2656-63.

Rilak A, Bratsos I, Zangrando E, Kljun J, Turel I, Bugarčić ŽD et al. New water-soluble ruthenium(II) terpyridine complexes for anticancer activity: synthesis, characterization, activation kinetics, and interaction with guanine derivatives. *Inorg Chem*. 2014;53(12):6113-26.

Rilak Simovic A, Masnikosa R, Bratsos I, Allesio E. Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. *Coordination Chemistry Reviews*. 2019;398:113011.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015;5(2):545-89.

Ron D and Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.

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.

Rosic G, Srejavic 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*. 2016;2:996-1006.

Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N et al. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980- 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1736–88.

Saglietto A, Manfredi R, Elia E, D'Ascenzo F, DE Ferrari GM, Biondi-Zoccai G et al. Cardiovascular disease burden: Italian and global perspectives. *Minerva Cardiol Angiol* 2021;69(3):231-40.

Saito H, Fushida S, Miyashita T, Oyama K, Yamaguchi T, Tsukada T et al. Potential of extravasated platelet aggregation as a surrogate marker for overall survival in patients with advanced gastric cancer treated with preoperative docetaxel, cisplatin and S-1: a retrospective observational study. *BMC Cancer*. 2017;17(1):294.

Sajadimajd S and Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(6):538-57.

Saleh RM, Awadin WF, El-Shafei RA, Elseady YY, Wehaish FE, Elshal MF. Cardioprotective role of tadalafil against cisplatin-induced cardiovascular damage in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;765:574-81.

Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM, Morales AI. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2011;41:803-21.

Sancho-Martínez SM, Prieto-García L, Prieto M, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther.* 2012;136(1):35-55.

Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, Polticelli F, Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol.* 2019;136:1237-46.

Sava G, Bergamo A, Zorzet S, Gava B, Casarsa C, Cocchietto M et al. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. *Eur J Cancer.* 2002;38(3):427-35.

Savic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Stankovic V, Rilak Simovic A et al. Antitumor Activity of Ruthenium(II) Terpyridine Complexes towards Colon Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020;25(20):4699.

Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

Senoner T and Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019;11(9):2090.

Shelburne N, Adhikari B, Brell J, Davis M, Desvigne-Nickens P, Freedman A et al. Cancer treatment-related cardiotoxicity: current state of knowledge and future research priorities. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9):dju232.

Shi Y, Zhang Z, Yin Q, Fu C, Barszczyk A, Zhang X et al. Cardiac-specific overexpression of miR-122 induces mitochondria-dependent cardiomyocyte apoptosis and promotes heart failure by inhibiting Hand2. *J Cell Mol Med.* 2021;25(11):5326-34.

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9(3):459-70.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5.

Singh SK and Pandey DS. Multifaceted half-sandwich arene-ruthenium complexes: Interactions with biomolecules, photoactivation, and multinuclearity approach. *RSC Advances.* 2014;4(4):1819.

Singla T, Singla G, Ranga S, Singla S, Arora R. Role of platelet aggregation in metastatic breast cancer patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2020;63(4):564-9.

Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87(7):1157-80.

Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN et al. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. *Mol Cell Biochem.* 2019;458(1-2):89-98.

Soerjomataram I and Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(10):663-72.

Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett.* 2019;307:41-48.

Sonkar C, Sarkar S, Mukhopadhyay S. Ruthenium(II)-arene complexes as anti-metastatic agents, and related techniques. *RSC Med Chem.* 2021;13(1):22-38.

Spreckelmeyer S, Orvig C, Casini A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. *Molecules* 2014;19(10):15584–610.

Stohs SJ and Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:321–36.

Stojic IM, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic JN et al. The perfusion of cisplatin and cisplatin structural analogues through the isolated rat heart: The effects on coronary flow and cardiodynamic parameters. *Gen Physiol Biophys.* 2018a;37(5):515-25.

Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN et al. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem.* 2018b;439(1-2):19-33.

Sun Y, Liu Y, Ma X, Hu H. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6923.

Tang Q, Wang X, Jin H, Mi Y, Liu L, Dong M et al. Cisplatin-induced ototoxicity: Updates on molecular mechanisms and otoprotective strategies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;163:60-71.

Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *J Exp Pharmacol.* 2021;13:303-28.

Tewari KS, Sill MW, Long HJ 3rd, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 2014;370(8):734-43.

Tietz NW. *Fundamental of clinical chemistry.* 3rd ed. Carl AB, Edward RA (ed.). W. B. Saunders Co, 1999.

Todaro MC, Oreto L, Qamar R, Paterick TE, Carerj S, Khandheria BK. Cardiooncology: state of the heart. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):680-7.

Tolan D, Gandin V, Morrison L, El-Nahas A, Marzano C, Montagner D et al. Oxidative Stress Induced by Pt(IV) Pro-drugs Based on the Cisplatin Scaffold and Indole Carboxylic Acids in Axial Position. *Sci Rep.* 2016;6:29367.

Tönnemann J, Scopelliti R, Severin K. (Arene) ruthenium complexes with imidazolin-2-imine and imidazolidin-2-imine ligands. *European Journal of Inorganic Chemistry.* 2014;26:4287-93.

Topal İ, Özbek Bilgin A, Keskin Çimen F, Kurt N, Süleyman Z, Bilgin Y et al. The effect of rutin on cisplatin-induced oxidative cardiac damage in rats. *Anatol J Cardiol.* 2018;20(3):136-42.

Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK. NKP-1339, The first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem Sci.* 2014;5:2925–32.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-90.

Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S et al. Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242(2):310-2.

Tubbs A and Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell.* 2017;168(4):644-56.

Udagawa C, Nakamura H, Ohnishi H, Tamura K, Shimoi T, Yoshida M et al. Whole exome sequencing to identify genetic markers for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Cancer Sci.* 2018;109(2):446-52.

Ueda N and Shah SV. Tubular cell damage in acute renal failure-apoptosis, necrosis, or both. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:318-23.

Valente A and Garcia MH. Synthesis of macromolecular ruthenium compounds: A new approach for the search of anticancer drugs. *Inorganics.* 2014;2:96-114.

van Rijt SH and Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today* 2009;14(23-24): 1089–97.

Vander Heiden MG. Targeting Cancer metabolism. A therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):671-84.

Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(9):H1453-67.

Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.

Wang F, Xu J, Habtemariam A, Bella J, Sadler PJ. Competition between glutathione and guanine for a ruthenium(II) arene anticancer complex: detection of a sulfenato intermediate. *J Am Chem Soc.* 2005;127:17734–43.

Wang H, Xia W, Long G, Pei Z, Li Y, Wu M et al. Isoquercitrin Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity Via the Inhibition of Apoptosis, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front Pharmacol.* 2020;11:599416.

Wang M, Wang H, Xu X, Lai TP, Zhou Y, Hao Q et al. Binding of ruthenium and osmium at non-iron sites of transferrin accounts for their iron-independent cellular uptake. *J Inorg Biochem.* 2022;234:111885.

Wang P, Liu H, Zhao Q, Chen Y, Liu B, Zhang B et al. Syntheses and evaluation of drug-like properties of CO-releasing molecules containing ruthenium and group 6 metal. *Eur J Med Chem.* 2014;74:199-215.

Wang X, Wang H, Song Y. Clinical efficacy and mechanism of Pralatrexate combined with Palbociclib Isethionate in treatment of bladder cancer patients. *Oncol Lett.* 2019;17(1):201-8.

Wang XL, Liu HR, Tao L, Liang F, Yan L, Zhao RR et al. Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/ reperfusion. *Apoptosis.* 2007;12(7):1209–17.

Wang Y, Jin J, Shu L, Li T, Lu S, Subarkhan MKM et al. New Organometallic Ruthenium(II) Compounds Synergistically Show Cytotoxic, Antimetastatic and Antiangiogenic Activities for the Treatment of Metastatic Cancer. *Chemistry.* 2020;26(66):15170-82.

Waseem M, Bhardwaj M, Tabassum H, Raisuddin S, Parvez S. Cisplatin hepatotoxicity mediated by mitochondrial stress. *Drug Chem Toxicol.* 2015;38(4):452-9.

Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* 2010;39:8113–27.

Whittaker JW. Non-heme manganese catalase-the 'other' catalase. *Arch Biochem Biophys.* 2012;525(2):111-20.

Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors (2020). *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Доступно на: <http://publications.iarc.fr/586>.

Witkowski M, Wu Y, Hazen SL, Tang WHW. Prognostic value of subclinical myocardial necrosis using high-sensitivity cardiac troponin T in patients with prediabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20(1):171.

World Health Organization. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all (WHO, 2020). Доступно на: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240001299>

Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992.

Xu XR, Yousef GM, Ni H. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. *Blood*. 2018;131(16):1777-89.

Yaegashi A, Yoshida K, Suzuki N, Shimada I, Tani Y, Saijo Y et al. A case of severe hepatotoxicity induced by cisplatin and 5-fluorouracil. *Int Cancer Conf J*. 2019;9(1):24-7.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007;334:115-24.

Yildirim S, Kisa F, Karadeniz A, Yildirim A, Karakoc A, Can I et al. Effects of pomegranate seed extract on liver paraoxonase and bclxL activities in rats treated with cisplatin. *J Med Plant Res*. 2012;6(12):2317–23.

Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O et al. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004;50(3):287–90.

Yousef MI and Hussien HM. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: protective effect of ginseng. *Food Chem Toxicol*. 2015;78:17-25.

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):1176–83.

Zalewska-Ziob M, Adamek B, Kasperczyk J, Romuk E, Hudziec E, Chwalińska E et al. Activity of Antioxidant Enzymes in the Tumor and Adjacent Noncancerous Tissues of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2901840.

Zhang PY, Xu X, Li XC. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(20):3091-6.

Zhang S, Ding Y, Wei H. Ruthenium polypyridine complexes combined with oligonucleotides for bioanalysis: a review. *Molecules*. 2014;19(8):11933-87.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-42.

Zhao L, Tao X, Qi Y, Xu L, Yin L, Peng J. Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress. *Redox Biol*. 2018;16:189-98.

Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S et al. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol*. 2020;11:343.

Zimmer H. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci*. 1998;13:203-10.

**VIII**  
**СКРАЋЕНИЦЕ**



**8. СКРАЋЕНИЦЕ**

$^1\text{O}_2^-$  - синглетни кисеоник

azpy - фенилазопиридински лиганд

bpy - бипиридин

CAT - каталаза

CDDP - цисплатина, *cis*-диаминодихлоридоплатина(II)

сDNA - комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина

CF - коронарни проток

cisPt - цисплатина

СК - креатин киназа

сTnT - срчани тропонин Т

ctrl – контрола

dach - 1,2-диаминоциклохексан

DLVP - дијастолни притисак у левој комори

DMSO - диметил сулфоксид

dp/dt max - максимална стопа развоја притиска у левој комори

dp/dt min - минимална стопа развоја притиска у левој комори

en - 1,2-етилендиамин

eNOS - ендотелна азот оксид синтаза

GR - глутатион редуктаза

GSH – редуковани глутатион

GSH-Px - глутатион пероксидаза

GSSG - глутатион дисулфид

GST - глутатион трансфераза

$\text{H}_2\text{O}_2$  - водоник пероксид

HR - срчана фреквенца

HRPO - пероксидаза из коњске ротквице

I - [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]

II - [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl]

III - [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl]

im – имидазол

ind – индазол

KP1019 - [Hind]trans-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>]

KP418 - (imH)[trans-RuCl<sub>4</sub>(im)<sub>2</sub>]

LDH - лактат дехидрогеназа

LDL - липопротеин ниске густине

MAPK – митогеном активирана протеинска киназа

MDA - малондиалдехид

NADPH - никотинамид аденин динуклеотид фосфат

NAMI-A - [Him]trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsO-S)]

NF-κB - нуклеарни фактор κB

NKP-1339 - [Na(trans-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>)]

nNOS - неуронска азот оксид синтаза

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити

NO - азот моноксид

NO<sub>2</sub><sup>•</sup> - азот диоксид радикал

PBS - фосфатни пуфер

pta - 1,3,5-триаза-7-фосфоадамантан лиганд

qRT-PCR - квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену

RAPTA - [Ru(η<sup>6</sup>-p-cimen)Cl<sub>2</sub>(pta)]

RNS - реактивне азотне врсте

ROONO - пероксинитрит

ROS - реактивне кисеоничне врсте

Ru - рутенијум

ROO<sup>•</sup> - пероксил радикал

SLVP - систолни притисак у левој комори

SOD - супероксид дисмутаза

TBA - тиобарбитурна киселина

TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине

TNF - фактор некрозе тумора

тпу - терпирин

VEGF - васкуларни ендотелни фактор раста

ALT - аланин аминотрансфераза

AST - аспартат аминотрансфераза

АТР - аденозин-трифосфат

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

ЕР - ендоплазматски ретикулум

КВБ - кардиоваскуларне болести

КПП - коронарни перфузиони притисак

НОО<sup>•</sup> - хидропероксил радикал

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид ањон радикал

ОН<sup>-</sup> - хидроксил ањон

ONOO<sup>-</sup> - пероксинитрит ањон

ОН<sup>•</sup> - хидроксилни радикал

РНК - рибонуклеинска киселина

cGMP - циклични гуанозин монофосфат

## БИОГРАФИЈА

*Mr ph* Катарина Михајловић рођена је 17. 5. 1987. године у Краљеву. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је школске 2006/2007. године, а завршила их на истом факултету 11. 7. 2011. године са просечном оценом 9,51, чиме је стекла стручно звање магистар фармације. Током студија је награђивана више пута за постигнуте изузетне успехе. Након обављеног приправничког стажа положила је стручни испит у децембру 2012. године.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина- подподручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је школске 2011/2012. године. Положила је све испите предвиђене планом и програмом студијског програма са просечном оценом 9,50. Усмени докторски испит положила је 16. 10. 2015. године оценом 9.

Од 27. 2. 2013. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, најпре као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија. Од 2015. године активно учествује у научно-истраживачком раду Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука. Аутор је бројних радова публикованих у домаћим и међународним часописима. Учесник је више међународних конгреса, а на једном од њих и добитник награде „2019 Canadian Journal of Physiology and Pharmacology Young Investigator Award in Cardiovascular Sciences” на конгресу одржаном у Врњачкој Бањи септембра 2019. године. Ангажована је као коистраживач на два јуниор пројекта Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

## БИБЛИОГРАФИЈА

1. Milojevic Samanovic A, Jakovljevic V, Vasovic M, Mitrovic S, Rankovic M, **Mihajlovic K**, Bolevich S, Zivkovic V. Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2021;54(9):1581-96. **M21**
2. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejavic I, **Mihajlovic K**, Dragicin N, Andjic M, Milinkovic M, Milosavljevic Z, Jakovljevic V. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8862878. **M21**
3. Sretenovic J, Joksimovic Jovic J, Srejavic I, Zivkovic V, **Mihajlovic K**, Labudovic-Borovic M, Trifunovic S, Milosevic V, Lazic D, Bolevich S, Jakovljevic V, Milosavljevic Z. Morphometric analysis and redox state of the testicles in nandrolone decanoate and swimming treated adult male rats. *Basic Clin Androl.* 2021;31(1):17. **M23**
4. Rankovic M, Jeremic N, Srejavic I, **Radonjic K**, Stojanovic A, Glisic M, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as new tools for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2021;26(2):437-50. **M21**
5. **Mihajlovic K**, Milosavljevic I, Jeremic J, Savic M, Sretenovic J, Srejavic I, Zivkovic V, Jovicic N, Paunovic M, Bolevich S, Jakovljevic V, Novokmet S. Redox and apoptotic potential of novel ruthenium complexes in rat blood and heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(2):207-17. **M23**
6. Govoruskina N, Jakovljevic V, Zivkovic V, Milosavljevic I, Jeremic J, Bradic J, Bolevich S, Omarov IA, Djuric D, **Radonjic K**, Andjic M, Dragicin N, Stojanovic A, Srejavic I. The Role of Cardiac N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Heart Conditioning-Effects on Heart Function and Oxidative Stress. *Biomolecules.* 2020;10(7):1065. **M21**
7. Ristic J, Folic M, **Radonjic K**, Rosic MI, Bolevich S, Alisultanovich OI, Dragicin N, Andjic M, Jeremic J, Milosavljevic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. Preconditioning with PDE1 Inhibitors and Moderate-Intensity Training Positively Affect Systemic Redox State of Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:6361703. **M21**
8. Nikolic T, Petrovic D, Matic S, Turnic TN, Jeremic J, **Radonjic K**, Srejavic I, Zivkovic V, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V. The influence of folic acid-induced acute kidney injury on cardiac function and redox status in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(1):99-109. **M23**
9. Djuric M, Nikolic Turnic T, Kostic S, Stankovic S, **Radonjic K**, Djuric D, Zivkovic V, Jakovljevic V, Stevanovic P. The effects of gasotransmitters inhibition on biochemical and haematological parameters and oxidative stress in propofol-anaesthetized Wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(11):1073-9. **M23**

10. Djuric M, Nikolic Turnic T, Kostic S, **Radonjic K**, Jeremic J, Petkovic A, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anesthetized male Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(9):850-6. **M23**
11. 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 of coronary flow and cardiodynamic parameters. *Gen Physiol Biophys* 2018; 37(5):515-25. **M23**
12. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, **Radonjic KG**, Bugarcic ZD, Jakovljevic VL, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Moll Cell Biochem* 2018; 439(1-2):19-33. **M23**
13. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, **Radonjic K**, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Moll Cell Biochem* 2018; 437(1-2):109-18. **M23**
14. Boskovic M, Djokovic J, Grubor I, Guzvic V, Jakovljevic B, Jurisevic M, Ljubisic D, Mijajlovic M, Milicevic I, Milovanovic M, Nikolic L, Nikolic M, Peric S, Petrovic A, Petrovic J, **Radonjic K**, Simonovic L, Simovic M, Stojanovic S, Stojic I, Tomovic J, Vranic S, Vucicevic K, Zdravkovic A, Jankovic S. PhD Students' Awareness of Research Misconduct. *J Empir Res Hum Res Ethics* 2013; 8(2): 163-4. **M21**
15. Mihajlović G, Jovanović-Mihajlović N, Radmanović B, **Radonjić K**, Djukić-Dejanović S, Janković S, Janjić V, Milovanović N, Petrović D, Tomić K. Quality of life of schizophrenic patients treated with haloperidol depot and injection preparation of long-lasting risperidone. *Srp Arh Celok Lek* 2011; 139(1): 36-40. **M23**
16. Vasić G, Mihajlović G, Jovanović-Mihajlović N, Rafajlović M, Barisić J, Djukić-Dejanović S, Janković S, **Radonjić K**. Differentiation between opiate addicts in relation to judicial problems. *Srp Arh Celok Lek* 2011; 139(1): 52-6. **M23**
17. Govoruskina N, Srejovic I, Bolevich S, Bolevich S, Tachieva B, Alisultanovich Omarov I, Jeremic J, **Radonjic K**, Jakovljevic V. The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on oxidative status in heart during conditioning maneuvers. *Ser J Exp Clin Res.* 2019;20(4):343-50. **M51**
18. Novokmet S, Stojic I, **Radonjic K**, Jovanovic M, Jeremic J. Toxic effects of metallopharmaceuticals. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18(3):191-4. **M51**
19. **Radonjic K**, Stojic I, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Jakovljevic V, Djuric D, Novokmet S. The platinum (II) complexes induced oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res* 2016; 18(2):111-7. **M51**

20. Vojvodić P, Mihajlović G, Djordjević J, Vojvodić J, **Radonjić K**. Psychopharmacological approach to the treatment of adolescents in the first psychotic episode. Engrami 2015; 37(1): 17-25. **M52**
21. **Radonjić K**. Uticaj klopazina i risperidona na metaboličke parametre i funkciju jetre kod pacijenata sa šizofrenijom. Medicinski časopis 2013; 47(1): 24-9. **M53**
22. Tomić K, Mihajlović G, Jovanović-Mihajlović N, Đukić-Dejanović S, **Mihajlović K**, Petrović G. Dijagnoza i tretman depresije kod osoba sa intelektualnom ometenošću. Acta Medica Medianae 2011; 50(3): 81-9. **M52**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Катарина Михајловић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

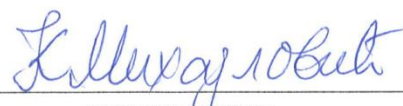
Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова

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. 8. 2022. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Катарина Михајловић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Испитивање ефеката хроничне примене цисплатине и Ru(II) комплекса на изоловано срце и оксидациони стрес пацова

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 дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 23.8.2022 године,



\_\_\_\_\_ потпис аутора

---

<sup>2</sup> 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/>