



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Тања Перић

**ЕФЕКТИ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА НА  
КОНТРАКТИЛНОСТ, КОРОНАРНИ ПРОТОК И  
ВИЈАБИЛНОСТ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013

## *Реч аутора*

*Захваљујем ментору, проф. др Слободану Јанковићу, на несебичној подршци, корисним саветима и дискусијама које су ме усмеравале током свих фаза израде докторске дисертације.*

*Велику захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу, на указаном поверењу и стварању подстицајне радне средине, као и преношењу знања и искуства из области експерименталне кардиоваскуларне физиологије.*

*Захваљујем свим члановима Лабораторије за експерименталну кардиоваскуларну физиологију Медицинског факултета у Крагујевцу на стрпљењу и вештинама које су ми пренели у позитивној радној атмосфери.*

*Хвала мојој породици на подршци, стрпљењу и разумевању које су ми увек верно пружали.*

*Посвећујем својој ћерки Миш Манов, јер она чини живот вредним.*

## ПОРЕКЛО СКРАЋЕНИЦА

- $\alpha$ -KGDH –  $\alpha$ -кетоглутарат дехидрогеназа, ензим митохондрија
- ALT – аланин аминотрансфераза, интраћелијски ензим
- ATP – аденозин трифосфат, важно високоенергетско једињење у ћелији
- AST – аспартат аминотрансфераза, интраћелијски ензим
- Bax – протеин ћелијске некрозе
- Bcl-2 – протеин, инхибитор апоптозе и „heat shock“ протеин
- BF (*Blood flow*) – коронарни проток
- cAMP – циклични аденозин монофосфат, секундарни гласник у ћелији
- CAT – каталаза, ензим митохондрија
- CK – креатин киназа, интраћелијски ензим
- CK-MB – креатин киназа, изоензим MB, интраћелијски ензим
- CsA – циклоспорин А, имуносупресивни агенс
- DLVP (*Diastolic blood pressure*) – дијастолни притисак у левој комори
- dP/dt max (*Maximum rate of left ventricular pressure development*) – контрактилност срца
- EDV (*end-diastolic volume*) – волумен на крају дијастоле
- EF (*ejection fraction*) – ејекциона фракција
- ESV (*end-systolic volume*) – волумен на крају систоле
- GPx – глутатион пероксидаза, ензим митохондрија
- GSH – глутатион, важан интрацелуларни антиоксидант
- GSTp1 (*glutathione S-transferase pi 1*) – ген који кодира фамилију ензима одговорних за детоксикацију у ћелији уз помоћ глутатиона
- HR (*Heart Rate*) – фреквенца срца
- IL-1 $\beta$  – интерлеукин 1 $\beta$ , инфламаторни цитокин
- IL-2 – интерлеукин 2, инфламаторни цитокин
- IC<sub>50</sub> – она концентрација испитиване супстанце која изазива 50% максималног инхибиторног ефекта
- ICDH – изоцитрат дехидрогеназа, ензим митохондрија
- INF $\gamma$  – интерферон  $\gamma$ , инфламаторни цитокин

JNM (*Jun N-terminal kinase*) – интермедијерни сигнални протеин

LD<sub>50</sub> – средња летална доза, она концентрација испитиване супстанце која убије 50% експерименталних животиња

LDH – лактат дехидрогеназа, интраћелијски ензим

MDH – малат дехидрогеназа, ензим митохондрија

MBP (*Mean blood pressure*) – средњи притисак у левој комори

NADPH оксидаза – ензимски комплекс мембране значајан за продукцију ROS

NFκB – транскрипциони фактор, значајан за модулацију продукције инфламаторних цитокина

Pd-LA – паладијум α-липоинска киселина

PdC (*Palladacycle compounds*) – циклична једињења паладијума

PLB (*Phospholamban*) – фосфоламбан, протеин значајан за контрактилност срца

PLM (*Phospholemman*) – фосфолеман, протеин значајан за контрактилност срца

ROS (*Reactive oxygen species*) – реактивни кисеонични радикали

SDH – сукцинат дехидрогеназа, ензим митохондрија

SLVP (*Systolic blood pressure*) – систолни притисак у левој комори

SMA (*Smooth muscle actin*) – актин глатког мишића

SOD – супероксид дизмутаза, ензим митохондрија

СЗО – Светска здравствена организација

TNFα – фактор туморске некрозе α, инфламаторни цитокин

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
1.1. ПАЛАДИЈУМ .....	1
1.1.1. Паладијум, основне хемијске карактеристике .....	1
1.1.2. Примена и значај једињења паладијума .....	1
1.1.3. Дејство једињења паладијума на организам људи и животиња .....	2
1.2. КОНТРАКТИЛНОСТ СРЦА .....	4
1.1.1. Хемодинамски аспект контрактилности миокарда .....	4
1.1.2. Телијско-молекуларни аспект контрактилности миокарда ....	5
1.3. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ОШТЕЋЕЊЕ МИОКАРДА .....	8
<b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ</b> .....	10
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД</b> .....	11
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ .....	11
3.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА ЈЕ ИСТРАЖИВАНА .....	15
3.3. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СУ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ .....	16
3.3.1. Независне варијабле.....	16
3.3.2. Зависне варијабле .....	18
3.3.2.1. Хемодинамски параметри .....	18
3.3.2.2. Биохемијски параметри .....	19
А) Параметри оксидативног стреса .....	19
Б) Ензимски параметри некрозе миокарда .....	25
3.4. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА .....	26
3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	26
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	28
4.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ .....	28
4.2. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ .....	38
4.2.1. Параметри оксидативног стреса .....	38
4.2.2. Ензимски маркери некрозе миокарда .....	43

<b>5. ДИСКУСИЈА</b> .....	54
5.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПОРЕМЕЋАЈИ УЗРОКОВАНИ ЈЕДИЊЕЊИМА ПАЛАДИЈУМА .....	54
5.2. ПАЛАДИЈУМОМ ИНДУКОВАНО ОКСИДАТИВНО ОШТЕЋЕЊЕ МИОКАРДА .....	58
5.3. ЦИТОТОКСИЧНО ДЕЈСТВО ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА НА КАРДИОМИОЦИТЕ .....	64
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	69
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	71

# 1. Увод

---

## 1.1. ПАЛАДИЈУМ

### 1.1.1. Паладијум, основне хемијске карактеристике

Паладијум је тежак метал који припада платинастој групи елемената. Пронађен је 1803. године у Лондону од стране *William Hyde Wollaston*-а. Име елемента потиче од астероида *Pallas*. Добија се као нус-производ у току екстракције платине из резидуа бабра и никла у рафинеријама. Укупна концентрација свих елемената платинасте групе у земљиној кори је мала ( $<1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ),<sup>1</sup> при чему је удео паладијума у односу на остале елементе 20%.<sup>1,2</sup>

У чистом стању паладијум је сјајан, сребрно-сив метал, растегљив, хемијског симбола Pd и атомског броја 46. Егзистира у три оксидативна стања: Pd<sup>0</sup>, Pd<sup>2+</sup> и Pd<sup>4+</sup>, мада је у већини стабилних једињења у +2 оксидативном облику. Поседује 25 изотопа чије се атомске масе налазе између 96 – 116. Постојани изотопи су 102, 104 – 106, 108, 110.

### 1.1.2. Примена и значај једињења паладијума

Примена паладијума у индустрији почела је 1919. године, при чему је паладијум до данас коришћен за производњу електричних контаката,<sup>3,4</sup> хемијских катализатора,<sup>5</sup> накита и сатова,<sup>6,7</sup> стоматолошких протеза, уметака и круница зуба,<sup>8,9</sup> хируршких инструмената и тест трака за одређивање шећера у крви.<sup>10</sup> У аутомобилској индустрији као каталитички конвертор користи се за смањење емисије штетних полутана као што су угљен моноксид, угљен водоник и оксиди азота, претварајући их у угљен диоксид, воду и азот.<sup>11</sup> Најширу примену у индустрији имају: амонијум паладијум(II) тетраклорат (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, паладијум(II) ацетат Pd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, паладијум(II) хлорид PdCl<sub>2</sub>, паладијум(II) нитрат Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, паладијум(II) оксид PdO и дихидроген паладијум(II) тетраклорат H<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>.

Многобројни покушаји примене различитих једињења паладијума у медицини у прошлости били су често неефикасни. Тако је паладијум примењиван за лечење

туберкулозе,<sup>12</sup> гихта, гојазности,<sup>13</sup> као гермицидно средство за кожу.<sup>12</sup> Међутим, постојећи подаци данас указују на ефикасну примену паладијума у онкологији, пре свега Pd<sup>103</sup> у радитерапији карцинома простате<sup>14</sup> и меланома ока.<sup>15-17</sup> Брахитерапија карцинома простате је посебна врста радиотерапије код које се радиоактивни извор имлантира директно у малигни тумор.<sup>18,19</sup> Спроведена истраживања упућују и на ефективност различитих комплекса паладијума у лечењу не-микроћелијског карцинома плућа,<sup>20</sup> карцинома дојке,<sup>21,22</sup> и карцинома јајника.<sup>23</sup> Сматра се да соли паладијума имају способност ослобађања и везивања хистамина, што би могао бити један од механизма антитуморског дејства с обзиром да хистамин у туморским ћелијама показује супресивни ефекат на пролиферацију.<sup>24</sup>

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub><sup>25</sup> и PdCl<sub>2</sub><sup>26</sup> показују вироцитно дејство, док бактерицидно дејство испољавају (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>PdCl)<sub>2</sub>,<sup>25</sup> као и неколико комплекса паладијума.<sup>27,28</sup> Соли паладијума растворљиве у води,<sup>29</sup> Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>30</sup> и (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>PdCl)<sub>2</sub><sup>25</sup> имају фунгицидан ефекат.

### 1.1.3. Дејство једињења паладијума на организам људи и животиња

Базална вредност концентрације паладијума у телесним течностима у популацији неекспонираних људи износи <0,1 µg/l крви и <0,3 µg/l урина.<sup>31</sup> Мали је број студија на људима које су се бавиле проучавањем дејства, дистрибуције и ретенције паладијума у појединим ткивима и органима након експозиције. Већина се односи на задржавање у плувачци и зубима стоматолошких пацијената са протезама од паладијума.<sup>32,33</sup>

Са друге стране, истраживања дистрибуције паладијума у ткивима спроведена на пацовима, зечевима и псима након оралне, интратрахеалне и интравенске администрације једињења и комплекса паладијума указују на највећи проценат задржавања паладијума у бубрезима и јетри (8-21% од администриране дозе), лимфним нодусима, надбубрежним жлездама, плућима и костима.<sup>34-37</sup> При том је дужина перзистирања у појединим органима и до 104 дана.<sup>34,35</sup> Вредности LD<sub>50</sub> неорганских једињења паладијума за пацове, мишеве и зечеве износе од 3 mg/kg до 4900 mg/kg телесне тежине животиње, зависно од врсте примењеног једињења и теста.<sup>35,38,39</sup> Орална администрација паладијума показује најмању токсичност у односу на остале облике давања, због најмањег процента апсорпције.



Најтоксичније неорганичко једињење је паладијум(II) хлорид  $\text{PdCl}_2$ , док је најмање токсичан паладијум(II) оксид  $\text{PdO}$ .

Клинички знаци акутног тровања укључују смрт, тонично-клоничке конвулзије, атаксију, ход на врховима прстију, смањен унос хране и воде, слабост и дистензију абдомена животиње.<sup>12,40</sup> Оштећење бубрега у виду мембранозног гломерулонефритиса<sup>41</sup> изазвано паладијумом настаје услед поремећаја  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  антитранспортног система у тубулоцитима, што води ка ретенцији натријума и калцијума.<sup>42</sup> Оштећење јетре праћено је повећањем активности микрозомалних ензима јетре пацова након оралног давања  $\text{PdCl}_2$ ,<sup>39,43</sup> као и интраперитонеалне апликације  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ .<sup>43</sup> Кардиоваскуларни ефекти у виду аритмије и пада крвног притиска до смрти животиње, запажени су након интравенске примене  $\text{PdSO}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{PdCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_4$  и  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  на неанестезираном пацову. Најмања токсична доза била је  $0,4 \pm 0,2 \text{ mg Pd}^{2+}/\text{kg}$  телесне тежине животиње.<sup>44</sup> На мишевима  $\text{PdCl}_2$  може изазвати некрозу тестиса и деструкцију сперматозоида,<sup>45</sup> док тератогеност на животињским ембрионима није доказана.<sup>46</sup> Такође, паладијум може изазвати сензибилизацију, иритацију коже<sup>47,48</sup> и ока зеца.<sup>41,49</sup>

Дуготрајни ефекти апликације  $\text{PdCl}_2$  односе се на појаву амилоидозе органа и двоструког повећања инциденце малигнух тумора код пацова (27,7%,  $n = 18/65$ , у односу на 13,8% у контролној групи,  $n = 11/80$ ), при чему је највећа учесталост лимфома и леукемија, а затим аденокарцинома плућа.<sup>50</sup> Поткожна имплантација сребро-паладијум-златних легура код пацова доводи до појаве туморских формација на месту имплантације.<sup>51</sup> Тачан механизам њиховог настанка није разјашњен, да ли су последица хроничне физичке иритације или дејства хемијских елемената из легуре.

Токсичност паладијума за људску популацију описана је једино као неспецифична алергијска реакција на кожи<sup>52,53</sup> и укрштена реакција са никлом,<sup>53,54</sup> док се код стоматолошких пацијената описује специфична мукозна реакција изазвана легурама и протезама паладијума.<sup>55,56</sup>

Насупрот претходним наводима, постоје извесне индикације да паладијум у форми органских комплекса и једињења може имати антиоксидативно и кардиопротективно дејство.<sup>57,58</sup> Сама  $\alpha$ -липоинска киселина је позната као снажан биолошки антиоксидант.<sup>59</sup>

Међутим, показано је да је комплекс паладијум  $\alpha$ -липоинске киселине пет пута потентнији антиоксидант него сама  $\alpha$ -липоинска киселина.<sup>57</sup>

## 1.2. КОНТРАКТИЛНОСТ СРЦА

Појам контрактилности у прошлости најчешће је коришћен за описивање способности скраћивања срчаних мишићних влакана.<sup>60-62</sup> Данас се појам контрактилности може сагледати са неколико аспекта: хемодинамског, ћелијског или молекуларног.

### 1.2.1. Хемодинамски аспект контрактилности срца

Контрактилност или инотропност срца је способност срца да генерише силу потребну за избацивање ударног волумена срца задатог претходним оптерећењем (*preload*) тј. енд-дијастолним волуменом (EDV) и накнадним оптерећењем (*afterload*), односно артеријским притиском које срце ејекцијом мора савладати.

Контрактилност је један од четири елемената који детерминишу срчану функцију, поред претходног и накнадног оптерећења, и фреквенце срца.<sup>63</sup>

$$\text{минутни волумен} = \text{ударни волумен} \times \text{срчана фреквенца}$$

$$\text{минутни волумен} = (\text{EDV} - \text{ESV}) \times \text{срчана фреквенца}$$

где је EDV (*end-diastolic volume*) – волумен на крају дијастоле и ESV (*end-systolic volume*) – волумен на крају систоле.

Промене контрактилности срца производе значајне промене у величини ејекционе фракције (EF (*ejection fraction*)) = ударни волумен / EDV).<sup>64,65</sup> Повећање контрактилности води ка повећању ејекционе фракције и обратно. Ово је нарочито значајно у току вежбања, јер омогућава одржавање вредности ударног волумена у условима повећане фреквенце срца. Убрзани рад срца смањује ударни волумен због скраћеног пуњења коморе у току дијастоле, што смањује енд-дијастолни волумен. Повећањем снаге срца, енд-систолни волумен се смањује, што омогућава одржавање ударног волумена.

У срчаној инсуфицијенцији, смањење контрактилности срца смањује ударни волумен и повећава *preload*, чиме се смањује ЕФ. *Frank-Starling*-ов закон описује способност срца да у одговору на промену венског прилива у срце, измени јачину контракције и ударни волумен срца. Давањем инотропних лекова (дигоксина или агониста  $\beta$  адренергичких рецептора) *Frank-Starling*-ова крива помера се горе и лево, чиме се повећава ударни волумен, смањује претходно оптерећење и повећава ЕФ.<sup>64,65</sup>

Најважнији механизам регулисања инотропности срца је аутономни нервни систем. Симпатикус има позитивно инотропно дејство на миокард преткомора и комора, док парасимпатикус (*n. vagus*) делује негативно на контрактилност преткомора. Активацијом  $\alpha_1$  адренергичких,<sup>66</sup> ангиотензин II тип 1 ( $AT_1$ )<sup>67</sup> и ендотелин тип А ( $ET_A$ ) рецептора<sup>68</sup> мења се контрактилност миокарда повећањем пропустљивости за јоне  $Ca^{2+}$  и повећањем осетљивости миофибрила на калцијум.<sup>66-68</sup> Инхибиција контрактилности миокарда стимулацијом мускаринских или аденозинских рецептора смањује трансфер јона  $Ca^{2+}$  било кроз активацију  $K^+$  канала или супресију сАМР-посредоване фосфорилације.<sup>69</sup> Нагло повећање *afterload*-а (*Anrep effect*),<sup>70</sup> као и повећање фреквенце срца<sup>71</sup> (*Bowditch effect*)<sup>72</sup> изазивају повећање срчане контрактилности.

Многи ејекциони и изоволуметријски параметри коришћени су за описивање контрактилне функције срца.<sup>73-76</sup> Већина фактора зависи од хемодинамских услова пуњења леве коморе.<sup>77,78</sup>  $dP/dt \max$  (*Maximum rate of left ventricular pressure development*) је променљива која се користи у експерименталним и клиничким испитивањима за процену контрактилне функције леве коморе.<sup>75,79-81</sup> Током изоволуметријске контракције повећање контрактилности миокарда праћено је повећањем вредности  $dP/dt \max$ .  $dP/dt \max$  условљен је претходним оптерећењем, али је релативно независтан од накнадног оптерећења.<sup>75,76,82,83</sup> У зависности од хемодинамских услова пуњења срца, анализа промена  $dP/dt \max$  леве коморе може се користити за процену индивидуалне функционалне резерве срца.<sup>84-86</sup>

### 1.2.2. Ћелијско-молекуларни аспект контрактилности срца

На ћелијском нивоу, контрактилност је одређена силом генерисаном у миозинским попречним мостовима и способношћу скраћивања саркомера.<sup>64</sup> Промене контрактилности

условљене су променама у систему контрактилних протеина или променама у њиховом непосредном окружењу: стопом активације и кинетике јона  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрацијом и активношћу АТР-а, нивоом ангажовања регулаторних сигналних каскада, као и вредностима рН, температуре и редокс потенцијала. Промене концентрације јона  $\text{Ca}^{2+}$ , јона  $\text{H}^+$  и услова микрооколине учествују у краткорочној регулацији контрактилности миокарда, док промене у синтези и активности појединих изоформи миозинске АТР-азе доводе до промена снаге срца у дужем временском периоду.

За разлику од скелетних мишића где постоји просторна сумација моторних јединица у генерисању силе при контракцији, срчани мишић делује као синцицијум у коме тесне везе обезбеђују низак електрични отпор и лако преношење акционог потенцијала са једне на другу ћелију. Дакле, под физиолошким условима промена контрактилности појединих срчаних миоцита се директно огледа у функцији срца као пумпе. Промена броја реактивних места између актина и миозина је основа фазне контроле контрактилности миокарда, коју описује *Frank-Starling*-ов закон. Кинетика и способност реакције попречних мостова са танким актинским филаментима регулисана је дејством регулаторних протеина. Најзначајнији је механизам који укључује регулаторни миозински лаки ланац (MLC2) и миозин везујући протеин С (MyBP-C),<sup>64</sup> који интерагују са полугама попречних мостова и регулишу њихово кретање у односу на осовину миозинских влакана.

Већина сигналних путева који регулишу инотропност срца укључују  $\text{Ca}^{2+}$  јоне, било кроз повећање уласка калцијумових јона из екстрацелуларног простора, пре свега током фазе 2 акционог потенцијала, или њиховог ослобађања из саркоплазматског ретикулума и сензибилисања тропонина С. Концентрација калцијума у цитоплазми миоцита зависи од његове кинетике, тј. преносних механизма за  $\text{Ca}^{2+}$ , а то су: калцијумски канали на ћелијској и мембрани саркоплазматског ретикулума којима  $\text{Ca}^{2+}$  улази у цитоплазму,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  измена кроз плазмалему чији смер зависи од концентрације  $\text{Na}^+$ , и калцијумске пумпе на плазмалемии и сарколеми које избацују  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазме. Радом ових пумпи одржава се ниска концентрација  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазми ( $10^{-7}$  mol/l).<sup>87</sup> Сматра се да калцијум има кључну улогу у регулацији контрактилности срца.<sup>87</sup> Промена концентрације калцијума у цитоплазми доводи до промена у интеракцији  $\text{Ca}^{2+}$  и тропонина С, мењајући број реактивних места између актина и миозина и дужину саркомере. У базалним условима проценат тропонин С влакана који везују  $\text{Ca}^{2+}$  је 20-

25%.<sup>64</sup> Повећањем овог процента може се, нарочито у условима повећаног физичког напора, повећати контрактилност и снага срчаног мишића.

Активност и кинетика  $\text{Ca}^{2+}$  јона регулисана је концентрацијом сАМР-а у миоцитима,<sup>88-91</sup> односно брзином његове синтезе из АТФ-а под дејством аденил-циклазе и инактивације у АМР активношћу фосфодиестеразе. Активност аденил-циклазе стимулишу катехоламини везивањем за  $\beta$  рецепторе,<sup>91,92</sup> док хормони штитне жлезде повећавајући број ових рецептора подстичу дејство катехоламина. Циклични АМР повећава активност протеин киназа које фосфорилишу протеине  $\text{Ca}^{2+}$  канала<sup>88-91</sup> у ћелијској и мембрани саркоплазматског ретикулума, што резултује повећаним уласком  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму. Фосфорилацијом тропонина I смањује се афинитет тропонина C за калцијум, па се  $\text{Ca}^{2+}$  брже отпушта из тропонинског комплекса током релаксације, и обратно.<sup>93</sup> На тај начин тропонин I учествује у регулацији инотропности срца.

Фосфоламбан (*Phospholamban, PLB*) је мали протеин саркоплазматског ретикулума који има значајну улогу у регулацији контрактилности миокарда. У интеракцији са  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азом (*sarcoendoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA2a*) PLB убрзава транспорт калцијума из цитоплазме у саркоплазматски ретикулум, фаворизујући релаксацију. За ту активност PLB захтева фосфорилацију сАМР зависном протеин киназом.<sup>94,95</sup> Дефосфорилацијом PLB дешава се супротан процес.

Са друге стране, фосфорилацијом фосфолеманна (*Phospholemman PLM*) одржава се инотропност срца у условима катехоламинског стреса, стимулацијом  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азе и инхибицијом  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  измене на плазмалеми.<sup>96,97</sup> Такође, постоје подаци о учешћу сАМР зависних киназа у фосфорилацији гликогена, стимулацији гликолизе и стварању АТФ-а у миокарду.<sup>98,99</sup> Када концентрација АТФ-а падне на 20-40% нормалне вредности (исхемични миокард), престаје функција миоцита. При мањку АТФ-а отежана је пре свега релаксација уз последично повећање дијастолне напетости.

Укупно дејство сАМР-а је повећање контрактилности миокарда због повећања концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  јона у цитоплазми за време ексцитације, и олакшана релаксација због бржег одстрањивања  $\text{Ca}^{2+}$  из тропонинског комплекса и цитоплазме.

Вредности рН, стања јонске средине, оксидационо/редукционо стање у ћелији и продукти метаболизма могу утицати на контрактилност срца било директно модификацијом мембранозних и протеина миофибрила, или индиректно регулисањем

посттранслационе модификације ензима (киназа, фосфатаза, ацетилаза, деацетилаза, итд.). Повећањем концентрације јона  $H^+$  смањује се контрактилност миокарда због конкуренције јона  $H^+$  са јонима  $Ca^{2+}$  за места везивања на тропонину C,<sup>100-102</sup> као и смањења активности миозин АТР-азе и искоришћавања АТР-а.<sup>103</sup>

Промене у синтези и активности миозин АТР-азе дугорочно регулишу контрактилност срца одређујући брзину интеракције актина и миозина. У хипертрофији миокарда,<sup>104</sup> хипотиреози<sup>105-109</sup> и старачком срцу<sup>110,111</sup> синтетише се изоензим миозин АТР-азе смањене активности, што смањује искоришћавање АТР-а у тим стањима. Промене у синтези изоензима последица су адаптације, јер омогућавају ослабљеном срцу да уз спорију контракцију обави једнаки рад уз исти утрошак енергије као и нормално срце. Насупрот томе, хормони штитне жлезде<sup>112-114</sup> и физичка активност<sup>112</sup> подстичу синтезу изоензима са већом активношћу.

### 1.3. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ОШТЕЋЕЊЕ МИОКАРДА

У физиолошким условима количина створених реактивних кисеоничних радикала (*Reactive oxygen species, ROS*) у организму у равнотежи је са њиховом разградњом путем антиоксидативних ензима, али у условима нарушене хомеостазе може доћи до испољавања њиховог токсичног дејства.

Реактивне кисеоничне групе, где спадају: слободни радикали (хидроксилни  $HO^{\cdot}$  и супероксидни анијонски радикали  $O_2^{\cdot-}$ ), водоник пероксид  $H_2O_2$  и слободни кисеоник  $O_2$ , краткоживећи продукти липидне пероксидације (пероксил  $ROO^{\cdot}$  и алкохолни радикал  $RO^{\cdot}$ ), и дугоживећи секундарни продукти (малондиалдехид и 4-хидроксиалдехид) узрокују оксидацију фосфолипида мембране, протеина, као и ДНК.<sup>115</sup> ROS оштећују структуре и функције многобројних ензима у организму. Такође, имају значајно учешће и у настанку широког спектра других патофизиолошких стања: исхемија-реперфузија оштећења ткива,<sup>116</sup> неуродегенеративна оштећења,<sup>117</sup> атеросклероза, карцином и старење.<sup>118,119</sup> Сматра се да ROS имају значајну улогу у исхемијском оштећењу миокарда,<sup>120,121</sup> ремоделирању срца и настанку срчане инсуфицијенције.<sup>115,122-124</sup> Дејство ROS на изолованим кардиомиоцитима резултира настанком апоптозе срчаних ћелија и компензаторне хипертрофије, праћене миокардном фиброзом.<sup>125</sup> Наиме, показано је да ROS

повећавају активност матрикс металопротеиназа у фибробластима срца,<sup>126,127</sup> што би могао бити један од механизма ремоделирања леве срчане коморе и развоја инсуфицијенције срца.<sup>121,128</sup>

Досадашње студије показале су да паладијум у виду неорганичких једињења има про-оксидативно дејство,<sup>129,130</sup> и да би на тај начин могао учествовати у оштећењу миокарда код изложених организама. Са друге стране, изгледа да органски комплекси паладијума имају супротан ефекат, повећавајући активност ензима Кребсовог циклуса и комплекса I, II, III и IV митохондријалних респираторних ензима,<sup>57</sup> као и активности каталазе, супероксид дезмутазе и глутатион пероксидазе.<sup>58,131</sup>

## 2. Циљеви и хипотезе

---

### А) ЦИЉЕВИ

1. Испитати ефекте триетаноламина (ТЕА) на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
2. Испитати ефекте триетаноламин ацетата (ТЕАА) на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
3. Испитати ефекте *транс*-дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум(II) комплекса на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
4. Испитати ефекте паладијум(II) хлорида ( $\text{PdCl}_2$ ) на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.

### Б) ХИПОТЕЗЕ

1. Триетаноламин (ТЕА) значајно смањује контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
2. Триетаноламин ацетат (ТЕАА) значајно смањује контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
3. *Транс*-дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум(II) комплекс значајно смањује контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.
4. Паладијум(II) хлорид ( $\text{PdCl}_2$ ) значајно смањује контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова.



## 3. Материјал и метод

---

### 3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

Сви експерименти изведени су у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/ЕЕС) и принципима Добре лабораторијске праксе.

Експериментална истраживања на изолованом срцу пацова вршена су према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по *Langendorff*-у.

#### МЕТОД РЕТРОГРАДНЕ ПЕРФУЗИЈЕ ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПРИ КОНСТАНТНОМ ПРИТИСКУ

*Langendorff* модел изолованог срца има могућност константног одржававања вредности следећих параметара:

1. Перфузија изолованог срца при константном притиску у коронарном васкуларном кориту (коронарни проток је променљиви параметар);
2. Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито (притисак је променљиви параметар).<sup>132</sup>

У оба експериментална модела реч је о средњој вредности променљивог параметра, с обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, променљива фреквенца, различито трајање систоле и дијастоле срца, итд. Због тога се променљиви параметар одређује као средња вредност регистрованих вредности параметра у току 5 минута.

Перфузија изолованог срца при константном протоку користи инфузиону пумпу за одржавање овог параметра константним, док се притисак региструје преносом са врха срца до писача путем система преносника (*transducer*). Ми смо користили први модел, где је константан притисак задат посебним системом цеви по моделу спојених судова, док се проток одређује флоуметријски. Како се у интактној циркулацији тежи одржању

константног средњег притиска, са физиолошке тачке гледишта, овај модел има предност.<sup>137</sup>

Однос притиска и протока у овом моделу изражен је следећом једначином:

$$\frac{(p=\text{const})}{\text{проток}} \approx \frac{1}{\text{полупречник}}$$

Модификовани апарат по Langendorff-у (*LF-11-LF01 F-P, Perfusion systems for isolated, small mammalian hearts according to Langendorff, Experimetria LTD Budapest, Hungary*) се састоји од:

1. Система две вертикалне стаклене цеви, исте висине, при чему се цев мањег промера налази у цеви већег промера. Загрејана дестилована вода у воденом купатилу убацује се путем бочних цеви и система црева у већу цев, чија је функција само да загреје течност у унутрашњој, мањој цеви. У мању цев се, убацује *Krebs-Hensenleit*-ов раствор (у mmol/l: NaCl 118,1; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 2,52; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 1,66; NaHCO<sub>3</sub> 24,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 и глюкоза 5,55), који има сличне особине као екстрацелуларна течност. Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препатат изолованог срца;
2. Резервоара, у коме се налази *Krebs-Hensenleit*-ов раствор, запремине 4 l, који је спојен са унутрашњом цеви мањег промера и боцом са смешом гасова O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>;
3. Боце са смешом гасова у односу O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>= 95%:5% карбоген. Примена гаса под притиском има двојачко дејство: постићи физиолошки ниво парцијалних притисака O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> као у артеријској крви, и негативним притиском убацити раствор у систем цеви;
4. Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцендентну аорту изолованог срца;
5. Воденог купатила, које загрева воду у спољашњој цеви тако да раствор у малој цеви на излазу из система има температуру 37°C.

6. Инфузионе каниле, којом се жељени агенс примењује непосредно на споју каниле и асцендентне аорте. Брзина којом ће се агенс применити зависи од базалног коронарног протока.



*Слика 1. Модификовани апарат по Langendorff-у (LF-11-LF01 F-P, Perfusion systems for isolated, small mammalian hearts according to Langendorff, Experimetria LTD Budapest, Hungary)*

Састав *Krebs-Hensenleit*-ов раствора (pH 7,4) у mmol/l: NaCl 118,1; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 2,52; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 1,66; NaHCO<sub>3</sub> 24,88; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 и глукоза 5,55.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Жртвовање животиња вршено је након краткотрајне етарске некрозе дислокацијом вратног пршљена. Након жртвовања, рађена је брза торакотомија бочним пресецањем трбушног зида. Затим је пажљивим лучним резом слева у десно пресецања дијафрагма. Константним преливањем срца хладним физиолошким раствором постигнуто је очување виталности препарата. Након одстрањења перикарда од врха ка бази срца и пресецања великих крвних судова на врху срца, срце је вађено из грудне дупље. Препарирано срце стављано је у посуду са леденим физиолошким раствором (-4 до -10°C) да би се смањили метаболички захтеви миокарда. Затим је вршена тупа препарација базе срца, у циљу одстрањења свих сувишних елемената изузев асцендентне аорте, кроз коју је вршена ретроградна перфузија.

Након препарације срца, приступало се постављању срца на *Langendorff* перфузионом апарату убацивањем каниле у асцендентну аорту. Срце је фиксирано концем и прикључивано на систем цеви. Одмах по успостављању аутоматског рада, кроз направљен отвор на левој преткомори срца, разарани су митрални записци. Кроз митрални отвор убачен је сензор (transducer BS4 73-0184, Experimetria LTD, Budapest, Hungary) у леву срчану комору, преко кога смо регистровали притиске у њој.

Цела процедура препарације и постављања срца на апарат је трајала највише 2-3 минута, како би се обезбедила виталност препарата.

Истраживање је подељено у следеће експерименталне групе:

1. **Контролна група**, на којој нису примењиване испитиване супстанце, већ је коришћена за упоређивање са осталим експерименталним групама;
2. **Експериментална група на којој је примењиван триетаноламин (ТЕА);**
3. **Експериментална група на којој је примењиван триетаноламин ацетат (ТЕАА);**
4. **Експериментална група на којој је примењиван транс-дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум(II) комплекс;**
5. **Експериментална група на којој је примењиван паладијум(II) хлорид.**

Све студијске групе подвргаване су стабилизацији протока до 30 минута при коронарном перфузионом притиску од 70 cm H<sub>2</sub>O. Проток је сматран стабилованим уколико су три узастопна мерења коронарног протока приближно истих вредности. По стабилизацији (нулти минут), на експерименталним групама су примењивани испитивани реагенси, почевши од нултог минута и на сваких 30 минута нова концентрација комплекса (30, 60, 90, 120 минут). Коронарни венски ефлуент је сакупљан по стабилизацији од 30 минута ("нулти" минут) и на крају сваке примењене концентрације раствора од 30 минута (30`, 60`, 90`, 120`). У ефлуенту су одређивани параметри оксидативног стреса и ензимске некрозе миокарда.

### **3.2. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА ЈЕ ИСТРАЖИВАНА**

Студија је вршена на изолованом срцу пацова *Wistar* соја, мушког пола, старости 8 недеља и просечне телесне масе 180-240 gr. Животиње су чуване у металним кавезима, стандардних димензија. У просторији, у којој су били смештени кавези, зоохемијски и микроклиматски услови у потпуности су одговарали стандардима. Животиње су храњене брикетима, смешом за исхрану лабораторијских животиња, стандардног сировинског и хигијенског састава. Све животиње купљене су од фарме експерименталних животиња Војномедицинске академије (ВМА), Република Србија.

### **3.3. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СУ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ**

#### **3.3.1. НЕЗАВИСНЕ ВАРИЈАБЛЕ**

Триетаноламин ацетат и *транс*-дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум(II) комплекс направљени су у истраживачкој лабораторији на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, под руководством проф. др Зорице Петровић<sup>133</sup>. Триетаноламин и паладијум(II) хлорид набављени су од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany).

#### **а) Триетаноламин (ТЕА)**

Триетаноламин је безбојна хигроскопна течност, хемијског имена 2-[бис(2-хидроксиетил)амино]етанол (IUPAC), молекулске формуле  $C_6H_{15}NO_3$  и моларне масе 149.188 g/mol, растворљива у води.

#### **б) Триетаноламин ацетат (ТЕАА)**

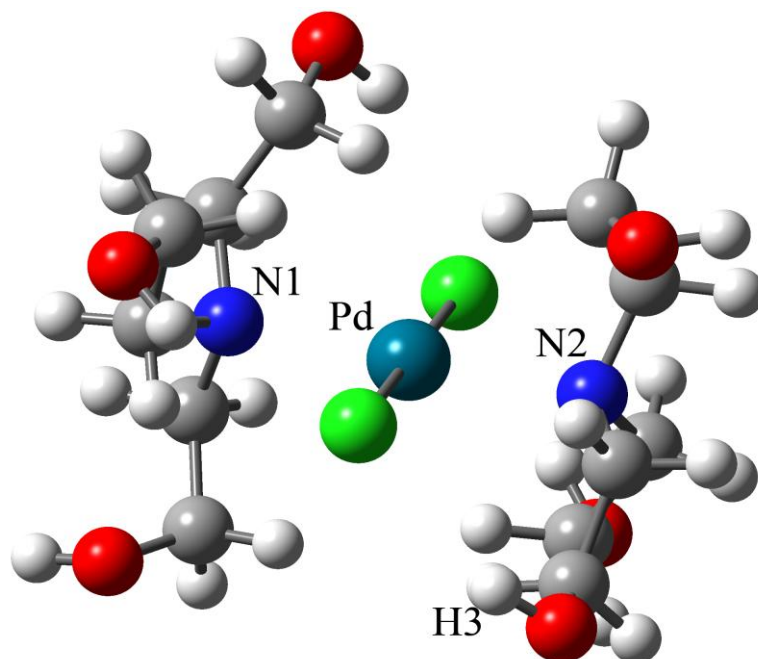
Триетаноламонијум ацетат, хемијског имена [трис(2-хидроксиетил)амонијум]ацетат (IUPAC), молекулске формуле  $C_8H_{19}NO_5$  и моларне масе 209,238 g/mol, продукат је реакције триетаноламина (ТЕА) и сирћетне киселине ( $CH_3COOH$ ). На собној температури је у течном агрегатном стању (растворљивост у води > 1000 g/l).

#### **в) *транс*-Дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум(II) комплекс (*транс*-[PdCl<sub>2</sub>(ТЕА)<sub>2</sub>])**

*транс*-Дихлоридобис(триетаноламин-N)паладиум(II) комплекс је чврста кристална супстанца, оранж боје, молекулске формуле  $PdCl_2C_{12}H_{30}N_2O_6$ , моларне масе 475,42 g/mol, добро растворљива у води.

#### **г) Паладијум(II) хлорид (PdCl<sub>2</sub>)**

Паладијум(II) хлорид је браон-црвена, хигроскопна, чврста материја, молекулске формуле  $PdCl_2$ , моларне масе 177,33 g/mol, слабо растворљива у води (боље у хладној води), добро растворљива у органским растварачима. У хлороводоничној киселини се брзо раствара.



Слика 2. Оптимизирана геометријска форма транс-[PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]. Геометријски параметри стациониране тачке оптимизовани су у вакуму, користећи Gaussian09<sup>134</sup>

Сва наведена једињења примењивана су у растућим концентрацијама:

- раствор 1: 10 ng/ml (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l транс - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]);
- раствор 2: 100 ng/ml (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l транс - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]);
- раствор 3: 1 µg/ml (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l транс - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]);
- раствор 4: 10 µg/ml (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l транс - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]);
- раствор 5: 100 µg/ml (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l транс - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]).

Приликом прављења свих раствора једињења коришћена је вода (H<sub>2</sub>O) као растварач.

### 3.1.2. ЗАВИСНЕ ВАРИЈАБЛЕ

#### 3.1.2.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ

Софтверски програм коришћен за праћење хемодинамских параметара је SPEL Advanced Naemosys software v. 3.24 (Experimetria LTD Budapest, Hungary). Баждарење апарата вршено је на следећи начин: 1. Потребно је поставити оба сензора (сензор за перфузиони притисак и сензор за леву комору) тако да буду у нивоу постављеног изолованог срца и избацити ваздух из њих да не би сметао; 2. Коришћењем наведеног софтверског програма за сваки канал мерења подешене су вредности: нивоа калибрације (*Calibration level*), доњи ниво на 0, горњи ниво на 100, и распона калибрације (*Scope Full Scale*) доњи ниво на 0, горњи ниво на 150 (за све параметре осим за DLVP, где су вредности за доњи ниво на 5, горњи ниво на 20). Увек се прво подешава доњи ниво, а затим горњи ниво вредности. Сензитивност се поставља на 1.

Сви хемодинамски параметри су континуирано мерени, при чему су за статистичку обраду података коришћене репрезентативне вредности на старту и на крају сваке дате дозе реагенса: 0, 0', 30', 60', 90' и 120' минут.

Параметри који су регистровани су:

**а) Фреквенца срца (*HR – Heart Rate*)**

Изражава се као број откуцаја срца у минути.

**б) Контрактилност срца (*dP/dt max – Maximum rate of left ventricular pressure development*)**

Изражава се у mm Hg/s.

**в) Систолни притисак у левој комори (*SLVP – Systolic blood pressure*)**

Изражава се у mm Hg.

**г) Средњи притисак у левој комори (*MBP – Mean blood pressure*)**

Изражава се у mm Hg.

**д) Дијастолни притисак у левој комори (*DLVP – Diastolic blood pressure*)**

Изражава се у mm Hg.

**ђ) Коронарни проток (*BF – Blood flow*)**



Одређује се флоуметријски, а изражава у ml/min.

### 3.1.2.2. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ

#### А) Параметри оксидативног стреса

Сви параметри оксидативног стреса мерени су на Институту за физиологију Медицинског факултета у Крагујевцу, Република Србија.

#### *Порекло реагенаса коришћених у истраживању*

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **нитрита** је набављен: N-(1-нафтил)-дихидрохлорид етилендиамин (NEDA) и 4-аминобензенсулфонска (сулфанилна) киселина од фирме „Sigma Chemical Co.“ (St. Luis, USA), амонијум хлорид ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany), натријум тетраборат ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) од фирме „Mallinckrodt Chemical Works“ (St. Louis-Montreal-Philadelphia-New York, USA-Canada), фосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) од хемијске индустрије „Zorka“ (Šabac, Republika Srbija) и натријум нитрит ( $\text{NaNO}_2$ ) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany).

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **супероксидног анион радикала ( $\text{O}_2^-$ )** је набављен: TRIS (Трис(хидроксиметил) аминометан), 37% хлороводонична киселина ( $\text{HCl}$ ), натријум етилендиаминтетрасирћетна киселина ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) и желатин од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany), а нитро тетразолијум плаво хлорид (*Nitroblue tetrazolium chloride* - NBT) од фирме „Sigma Chemical Co.“ (St. Luis, USA).

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** је набављен: калијум фосфат дихидрат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) и калијум дихидроген фосфат дихидрат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) од фирме „Alkaloid“ (Skopje, Republika Makedonija), натријум хлорид ( $\text{NaCl}$ ) и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) од хемијске индустрије „Zorka“ (Šabac, Republika Srbija), D(+) глукоза (декстроза) од фирме „Merk“ (Darmstadt,

Germany), док су фенол црвено и пероксидаза из коњске ротквице (*Horseradish peroxidaza* – *HRPO*, *EC 1.11.1.7*) од фирме „Sigma Chemical Co.“ (St. Luis, USA).

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **индекса липидне пероксидације** (*thiobarbituric acid reactive substances*, **TBARS**) је набављен: 2-тиобарбитурна киселина (ТВА) и натријум хидроксид (NaOH) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany).

Реагенси који се користе за прављење **Krebs-Hensenleit**-овог раствора су набављени: натријум хлорид (NaCl), глукоза и калијум хлорид (KCl) од хемијске индустрије „Zorka“ (Šabac, Republika Srbija), натријум бикарбонат (NaHCO<sub>3</sub>), калијум дихидроген фосфат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), калцијум хлорид (CaCl<sub>2</sub>) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany), и магнезијум сулфат (MgSO<sub>4</sub>) од фирме „Alkaloid“ (Skopje, Republika Makedonija).

#### а) Одређивање нитрита (NO)

Количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту одређивана је спектрофотометријском методом.<sup>135</sup> Како се у реакцији азот монооксида (NO) и кисеоника добија еквимоларна количина нитрита, количина ослобођених нитрита еквивалентна је количини ослобођеног азот монооксида:



Метода одређивања нитрита се заснива на употреби *Griess*-овог реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који је љубичасте боје. *Griess*-ов реагенс се добија мешањем једнаких запремина: 1% сулфанилне киселине, растворене у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденог раствора N-(1-нафтил)-дихидрохлорид етилендиамин (NEDA) (чува се у тамној бочици на 4°C због високе фотохемијске реактивности). *Griess*-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре извођења методе.

Амонијачни пуфер (pH=9), који се користи у сврху стабилизације диазо комплекса, добија се мешањем амонијум хлорида (NH<sub>4</sub>Cl) и натријум тетрабората (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) уз загревање (због слабе растворљивости натријум тетрабората).

Биохемијски поступак: у епрувете (12 × 100) се пипетира 1 ml коронарног венског ефлуента, 250 µl *Griess*-овог реагенса и 125 µl амонијачног пуфера (pH=9). Као слепа проба користи се 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута, приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини  $\lambda = 550 \text{ nm}$ .

Концентрација ослобођених нитрита одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, које су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагентом у присуству пуфера. У четири епрувете се пипетира 3, 6, 12 и 24 µl воденог раствора 1 mM NaNO<sub>2</sub> у 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Концентрације ослобођених нитрита измерене спектрофотометријски на таласној дужини  $\lambda = 550 \text{ nm}$  су 2,18; 4,37; 8,73 и 17,34 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml.

Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту добијена је на основу:

1. Одређивања стандардног фактора (F):

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда} - \text{екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1- F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

2. Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F$$

3. Количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива одређена је по формули:

$$\text{nmol NO}_2/\text{minut/g wt} = \Delta E/F \times CF/m_{\text{heart}}$$

где је CF (Coronary flow) – коронарни проток.

**б) Одређивање индекса липидне пероксидације (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS*)**

Индекс липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту одређиван је индиректно, преко продукта реакције липидне пероксидације са 2-тиобарбитурном киселином. Спектрофотометријска метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције малондиалдехида са тиобарбитурном киселином.<sup>136</sup>

Биохемијски поступак: у епрувете (12 × 100) се пипетира 800 µl коронарног венског ефлуента и 200 µl 1% ТВА у 0,05 М NaOH. Као слепа проба користи се еквивалентна количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Узорци се инкубирају у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације и прилагођавања собној температури у узорцима се спектрофотометријски одређује TBARS на таласној дужини  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

Концентрација, а затим количина ослобођених TBARS у коронарном венском ефлуенту добијена је у поступку:

1. Концентрација ослобођених TBARS добијена је на основу једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1,56 \times 1,25$$

где је  $A_u$  – апсорбанца узорка,  $A_{sp}$  апсорбанца слепе пробе, док су 1,56 и 1,25 корекциони фактори за овај есеј.

2. Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива одређена је једначином:

$$\text{nmol TBARS/minut/g wt} = \Delta A / 1,56 \times 1,25 \times CF / m_{\text{heart}}$$

При тумачењу резултата, узета је у обзир чињеница да се овим поступком ниво ослобођених TBARS изражава у µM, док се количина осталих биохемијских параметара изражава у nM. Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Ово је последица неспецифичности теста, јер он представља сумацију

деловања читавог низа реактивних кисеоничних и азотних врста, а не појединачног молекула.

### в) Одређивање супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ )

Количина супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту одређивана је спектрофотометријском методом, у реакцији  $O_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (*Nitroblue tetrazolium chloride (NBT)*).<sup>137</sup>

Есејна смеша (*assay mixture*) неопходна за одређивање количине супероксид анјон радикала садржи: 50 mM TRIS-HCL пуфера (pH=8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

Биохемијски поступак: у епрувете (12 × 100) се пипетира 50  $\mu$ l коронарног венског ефлуента и 950  $\mu$ l есејне смеше. Као слепа проба користи се еквивалентна количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Екстинкција смеше се мери на самом почетку ( $E_1$ ), а затим на сваких 60 секунди након мешања смеше пластичним штапићем и стабилизације. (Стабилизација подразумева две узастопне, приближно исте екстинкције.) Последња екстинкција се означава као  $E_2$ . Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорбције  $\lambda_{max} = 550$  nm.

Количина супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту добијена је у поступку:

1. Концентрација ослобођеног  $O_2^-$  добијена је на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml} = \Delta E/0,015 \times 1/0,05$$

2. Количина ослобођеног  $O_2^-$  по граму срчаног ткива одређена је једначином:

$$\text{nmol O}_2^-/\text{minut/g wt} = \Delta E/0,015 \times 1/0,05 \times CF/m_{\text{heart}}$$

### г) Одређивање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Количина водоник пероксида произведеног у коронарном венском ефлуенту одређивана је спектрофотометријски на основу реакције оксидације фенол црвеног помоћу водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).<sup>138</sup> Реакција је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseradish peroxidaza* – *HRPO*).

Раствор фенол црвеног (*Phenol Red Solution* – *PRS*) неопходан за ову биохемијску анализу прави се непосредно пре почетка рада мешањем 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH = 7), 5,5 mM D(+) глюкозе и 0,28 mM фенол црвеног.

Биохемијски поступак: у епрувете (12 × 100) се пипетира 200  $\mu\text{l}$  коронарног венског ефлуента и 800  $\mu\text{l}$  свеже направљеног раствора фенол црвеног (PRS). Узорцима се затим дода 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Након стајања на собној температури 10 минута, додаје се 1M NaOH како би се подесио pH  $\approx$  12. Као слепа проба користи се еквивалентна количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорбције  $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ , у стакленим киветама запремине 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom model: Ulltrospec 4050.

Концентрација ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  одређена је на основу калибрационе криве мерене за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Stock*) уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  износи 0,810). У три епрувете пипетирано је 5, 10 и 20  $\mu\text{l}$  1 mM раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 200  $\mu\text{l}$  дестиловане воде, 800  $\mu\text{l}$  раствора фенол црвеног и 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури подешен је pH  $\approx$  12 додавањем 1M NaOH. Концентрације водоник пероксида у узорцима мерене спектрофотометријски на таласној дужини максималне апсорбције  $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$  су: 2,75; 5,49 и 10,99 nmol/  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$ .

Количина ослобођеног водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту добијена је у поступку:

1. Фактор апсорбције (F) по једном nmol-у  $\text{H}_2\text{O}_2$  одређен је формулом:

$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{cuv}}$$

где је  $\Delta A$  – финална апсорбанца ( $A = A_u - A_{sp}$ ).

2. Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  добијена је на основу формуле:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml ефлуента} = \Delta A/F$$

3. Количина ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  по граму срчаног ткива одређена је формулом:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{minut/g wt} = \Delta A/F \times CF/m_{\text{heart}}$$

## **Б) Ензимски параметри некрозе миокарда**

Сви параметри ензимске некрозе миокарда рађени су у Центру за лабораторијску дијагностику Клиничког центра Крагујевац, Република Србија. Параметри су мерени из коронарног венског ефлуента, прикупљаног на већ описани начин.

На апарату Olympus AU 400 (Olympus, Japan) одређивани су следећи ензими:

### **а) Аспартат аминотрансфераза (*AST – Aspartate aminotransferase*)**

Кинетички UW тест за квантитативно одређивање AST (EC 2.6.1.1) у серуму и плазми на Olympus анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену. Активност се изражава у U/l.

### **б) Аланин аминотрансфераза (*ALT – Alanine aminotransferase*)**

Кинетички UW тест за квантитативно одређивање ALT (EC 2.6.1.2) у серуму и плазми на Olympus анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену. Активност се изражава у U/l.

### **в) Лактат дехидрогеназа (*LDH – Lactate dehydrogenase*)**

Кинетички UW тест за квантитативно одређивање LDH (EC 1.1.1.27) у серуму и плазми на Olympus анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену. Активност се изражава у U/l.

#### **г) Креатин киназа (СК – *Creatine kinase*)**

Кинетички UW тест за квантитативно одређивање СК НАС (ЕС 2.7.3.2) у серуму и плазми на Olympus анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену. Активност се изражава у U/l.

#### **д) Креатин киназа, изоензим МБ (СК-МВ - *Creatine kinase isoenzyme MB*)**

Ензимски имуноинхибициони тест за квантитативно одређивање изоензима СК-МВ у серуму и плазми на Olympus анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену. Активност се изражава у U/l.

### **3.4. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА**

Величину узорка одређена је на основу следећих почетних параметара: снаге студије од 0,8, вероватноће грешке првог типа ( $\alpha$ ) од 0,05 за тестирање двостране нулте хипотезе и минималне корелације између датих доза и ефеката једињења паладијума 0,5 (коэффициент корелације,  $r = 0,5$ ). На основу датих параметара из табеле за одређивање величине узорка, у зависности од коэффициента корелације, пронађено је да је потребно 29 парова вредности концентрације супстанце – одговор за доказивање горе поменутог нивоа корелације. Пошто се користи пет различитих концентрација, вредност сваке концентрације треба регистровати на 6 различитих животиња, чиме се добија потребних 30 парова.

### **3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА**

За тестирање хипотеза о постојању зависности између дате дозе и ефеката примењених реагенаса коришћена је линеарна регресија логаритамски обрађених података по методи најмањих квадрата. Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци измерен на крају посматраног периода (са максималном концентрацијом супстанце) приказан је у виду процента максималног одговора. Опсег вредности коришћених за линеарну регресију био је од 15% до 85% од максималног одговора, у линеарнијем делу криве. Испитивана је статистичка значајност сваког коэффициента корелације између дате дозе и ефекта једињења, са максималном вероватноћом прихватања нулте хипотезе 0,05.



Програм који је коришћен за статистичку обраду података писан је у програмском језику *basic*, а написао га је проф. др Слободан Јанковић. Концентрација једињења која изазива 50% максималног ефекта (EC50), и њен интервал поверења ( $1,96 \times$  стандардна грешка) одређени су графички за сваку концентрација-ефекат криву графичком методом интерполације (програм *Graph*). За приказ дескриптивне статистике, тј. средњих вредности параметра са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама, коришћен је програм *Microsoft Excel 2003*.

# 4. Резултати

---

## 4.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ

### 4.1.1. Контрактилност срца (*dP/dt max – Maximum rate of left ventricular pressure development*)

Контрактилност срца (*dP/dt max*) није значајно измењена после примене било ког реагенса: ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,15$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,07$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ),  $\text{PdCl}_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 2,17$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 0,53$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења контрактилности срца у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања контрактилности у контролној серији експеримената. Средње вредности контрактилности срца (Табела 1.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

### 4.1.2. Систолни притисак у левој комори (*SLVP – Systolic blood pressure*)

Систолни притисак у левој комори (*SLVP*) није значајно измењен после примене било ког реагенса: ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,59$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 3,84$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ),  $\text{PdCl}_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 3,72$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,02$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења систолног притиска у левој комори у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност

спонтаног опадања систолног притиска у контролној серији експеримената. Средње вредности систолног притиска у левој комори (Табела 2.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

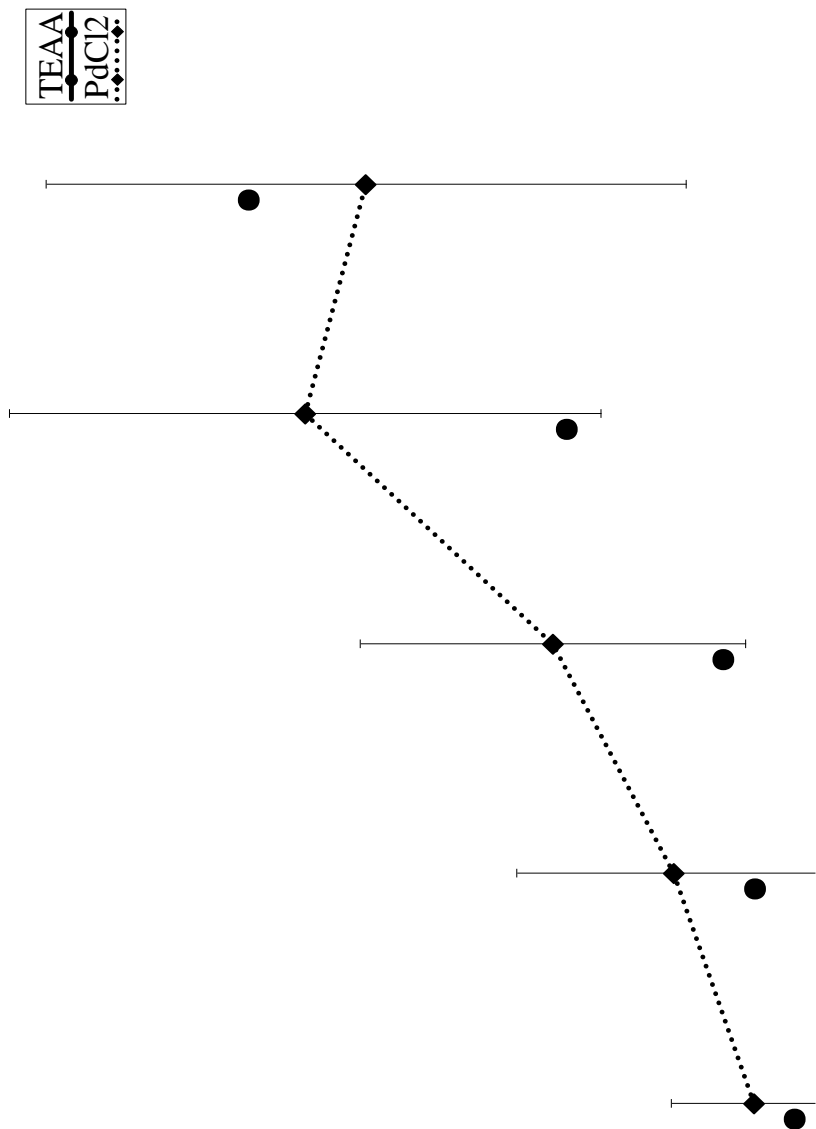
**Табела 1.** Средње вредности контрактилности срца ( $dP/dt \max$ ) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

<b><math>dP/dt \max</math> (mm Hg/s)</b>					
<b>N</b>	<b>Контрола</b>	<b>ТЕАА</b>	<b>ТЕА</b>	<b><math>PdCl_2</math></b>	<b>Pd комплекс</b>
<b>0</b>	410.6 ± 237.5	1140.8 ± 868.8	1694.8 ± 529.1	1371.5 ± 94.5	1578.8 ± 406.7
<b>1</b>	402.3 ± 102.1	1167.2 ± 1036.2	1497.4 ± 925.5	1143.9 ± 765.4	1578.8 ± 406.7
<b>2</b>	358.2 ± 64.8	934.3 ± 884.9	1423.1 ± 1021	869.4 ± 607.8	1231.7 ± 564.3
<b>3</b>	313.8 ± 91.5	736.9 ± 703.9	1295.7 ± 1002	685.9 ± 380.4	868.5 ± 437.7
<b>4</b>	240.1 ± 95.3	572.9 ± 468.7	1112.8 ± 987.8	649.2 ± 248.7	506.2 ± 311
<b>5</b>	224.5 ± 106.1	376.7 ± 279	915.6 ± 844.2	348.8 ± 128.5	386.8 ± 273.8

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l  $PdCl_2$ , 21 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(TEA)_2$ ]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l  $PdCl_2$ , 210 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(TEA)_2$ ]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l  $PdCl_2$ , 2100 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(TEA)_2$ ]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l  $PdCl_2$ , 21000 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(TEA)_2$ ]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l  $PdCl_2$ , 210000 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(TEA)_2$ ]). \*  $p < 0,05$  у односу на контролну групу.

#### **4.1.3. Дијастолни притисак у левој комори (*DLVP – Diastolic blood pressure*)**

Дијастолни притисак у левој комори (*DLVP*) значајно је смањен после примене: ТЕАА (максимално смањење од базалних вредности  $14 \pm 8\%$ ; од  $4,8 \times 10^{-8}M$  до  $4,8 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 4,20$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC_{50} = 2,9 \pm 0,01 \times 10^{-5}M$ ) и  $PdCl_2$  (максимално смањење од базалних вредности од  $11 \pm 9\%$ ;  $5,6 \times 10^{-8}M$  до  $5,6 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 4,61$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC_{50} = 2,6 \pm 0,01 \times 10^{-5}M$ ) (Графикон 1.), док није показао значајне измене након примене ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}M$  до  $6,7 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 0,85$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ) или Pd комплекса (од  $2,1 \times 10^{-8}M$  до  $2,1 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 0,48$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).



**Графикон 1.** Смањење дијастолног притиска у левој комори (DLVP) изолованог срца пацова изазвано од ТЕАА (●) и PdCl<sub>2</sub> (◆). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Еглов bags су стандардне девијације.

**Табела 2.** Средње вредности систолног притиска у левој комори (SLVP) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

SLVP (mm Hg)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	86.0 ± 33.5	91.5 ± 59.8	59.5 ± 23.1	61.4 ± 20.1	41.9 ± 18.0
1	85.0 ± 24.6	96.8 ± 56.9	44.2 ± 22.5	50.2 ± 22.2	31.6 ± 12.6
2	76.2 ± 26.2	79.5 ± 59.2	41.9 ± 23.2	41.9 ± 17.8	20.2 ± 7.3
3	63.3 ± 37.2	79.5 ± 57.9	36.8 ± 19.9	39.9 ± 16.8	14.9 ± 9.8
4	57.5 ± 41.0	58.1 ± 53.0	34.0 ± 23.7	40.5 ± 14.3	13.4 ± 10.7
5	51.6 ± 43.9	45.4 ± 42.2	26.7 ± 16.9	24.7 ± 17.2	10.9 ± 9.8

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

**Табела 3.** Средње вредности дијастолног притиска у левој комори (DLVP) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

DLVP (mm Hg)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	59.8 ± 36.8	64.3 ± 75.0	9.7 ± 4.4	14.6 ± 15.0	3.5 ± 3.2
1	63.3 ± 19.4	69.2 ± 77.6*	11.4 ± 3.0	15.3 ± 17.5*	2.5 ± 3.3
2	53.2 ± 21.8	60.3 ± 72.3*	10.8 ± 2.9	13.9 ± 16.1*	1.8 ± 2.3
3	45.8 ± 28.0	55.6 ± 67.7*	10.1 ± 3.3	12.9 ± 14.8*	1.6 ± 1.8
4	44.2 ± 35.0	45.4 ± 56.7*	9.8 ± 3.7	12.0 ± 14.5*	2.3 ± 1.7
5	39.1 ± 36.6	35.0 ± 46.0*	9.0 ± 3.9	9.2 ± 12.5*	2.6 ± 2.9

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 1.), тј. смањења дијастолног притиска у левој комори у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања дијастолног притиска у контролној серији експеримената. Средње вредности дијастолног притиска у левој комори (Табела 3.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

#### **4.1.4. Средњи притисак у левој комори (*MBP – Mean blood pressure*)**

Средњи притисак у левој комори (МБП) значајно је смањен после примене: PdCl<sub>2</sub> (максимално смањење од базалних вредности  $14 \pm 10\%$ ; од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 10,62$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 2,8 \pm 0,01 \times 10^{-5}\text{M}$ ) (Графикон 2.), док није показао значајне измене након примене ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,19$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 3,30$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ) или Pd комплекса (од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 2,40$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 2.), тј. смањења средњег притиска у левој комори у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања средњег притиска у контролној серији експеримената. Средње вредности средњег притиска у левој комори (Табела 4.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

#### **4.1.5. Фреквенца срца (*HR – Heart Rate*)**

Фреквенца срца (HR) значајно је смањена после примене: ТЕАА (максимално смањење од базалних вредности  $18 \pm 13\%$ ; од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 11,32$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 1,3 \pm 0,01 \times 10^{-5}\text{M}$ ), ТЕА (максимално смањење од базалних вредности  $9 \pm 9\%$ ; од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 4,24$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC50 = 1,7 \pm 0,01 \times 10^{-5}\text{M}$ ), PdCl<sub>2</sub> (максимално смањење од базалних вредности  $18 \pm 10\%$ ; од  $5,6 \times$

$10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 4,15$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC50 = 2,3 \pm 0,01 \times 10^{-6}\text{M}$ ), и Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности  $11 \pm 9\%$ ; од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 2,91$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC50 = 3,5 \pm 0,01 \times 10^{-6}\text{M}$ ) (Графикон 3.).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 3.), тј. смањења фреквенце срца у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања фреквенце у контролној серији експеримената. Средње вредности фреквенце срца (Табела 5.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 4.** Средње вредности средњег притиска у левој комори (МВР) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

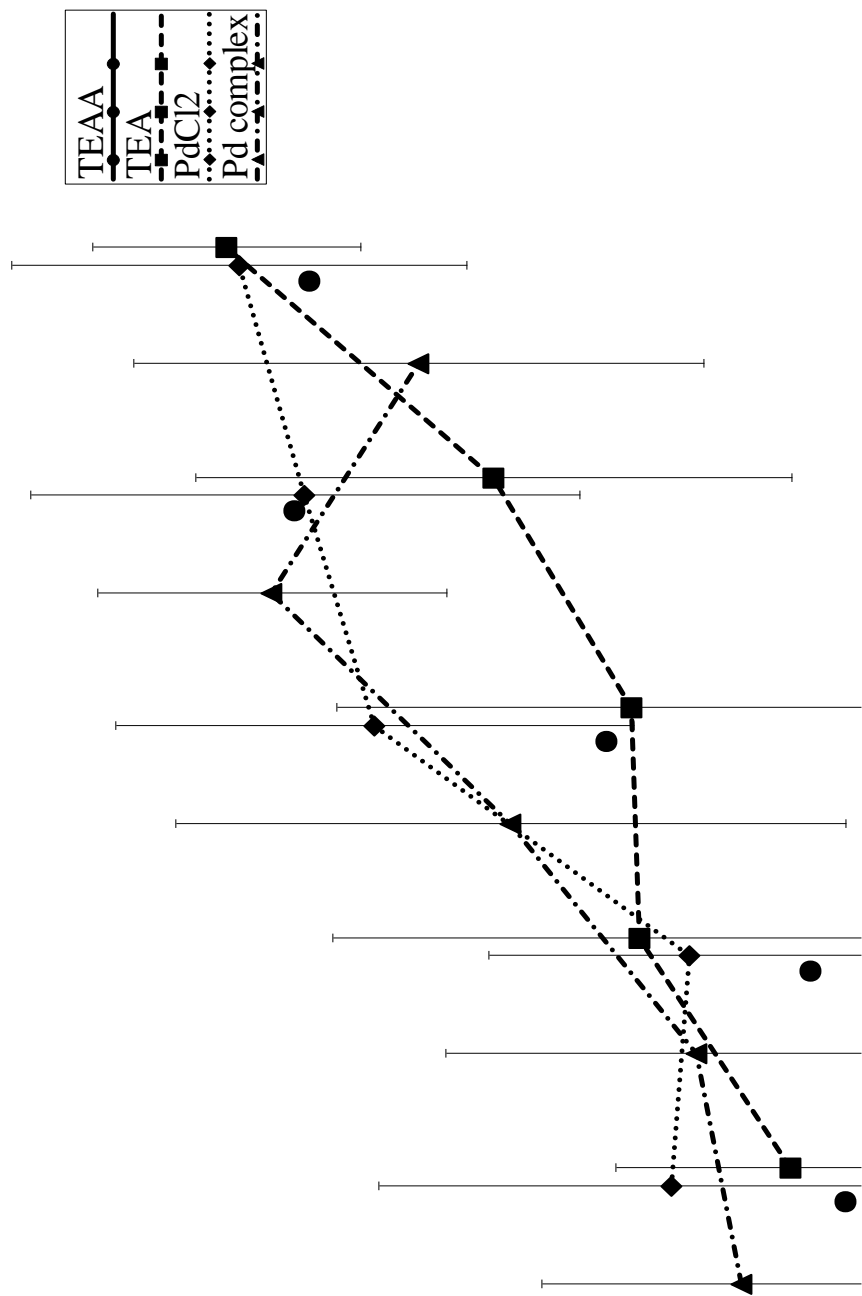
МВР (mm Hg)					
N	Контрола	ТЕАА	ТЕА	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	51.4 ± 0.6	51.8 ± 2.1	51.5 ± 1.6	52.4 ± 0.6	51.9 ± 0.9
1	51.8 ± 0.8	56.5 ± 7.9	52.0 ± 0.8	52.9 ± 0.2*	52.4 ± 1.0
2	46.4 ± 11.8	56.0 ± 8.2	52.7 ± 1.0	53.1 ± 0.3*	52.3 ± 1.0
3	51.8 ± 0.7	56.0 ± 8.0	52.5 ± 0.6	53.3 ± 0.3*	52.2 ± 1.7
4	51.9 ± 0.9	56.1 ± 7.8	52.9 ± 0.8	53.2 ± 0.3*	53.1 ± 1.0
5	51.7 ± 0.7	53.1 ± 2.1	52.4 ± 0.5	45.0 ± 18.6*	53.1 ± 0.1

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/1 TEA, 48 nM/1 ТЕАА, 56 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/1 TEA, 480 nM/1 ТЕАА, 560 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/1 *транс* -[PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/1 TEA, 4800 nM/1 ТЕАА, 5600 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/1 *транс* -[PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/1 TEA, 48000 nM/1 ТЕАА, 56000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/1 *транс* -[PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/1 TEA, 480000 nM/1 ТЕАА, 560000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/1 *транс* -[PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \*  $p < 0,05$  у односу на контролну групу.



**Графикон 2.** Смањење средњег притиска у левој комори (МВР) изолованог срца пацова изазвано од PdCl<sub>2</sub> (◆). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Епог багс су стандардне девијације.





**Графикон 3.** Смањење фреквенце срца (HR) изолованог срца пацова изазвано од TEAA (●), TEA (■), PdCl<sub>2</sub> (◆) и Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.

**Табела 5.** Средње вредности фреквенце срца (HR) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

HR (бр. откуцаја у минути)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	203.1 ± 49.6	175.3 ± 46.8	189.0 ± 93.9	180.8 ± 63.4	212.1 ± 41.0
1	258.8 ± 21.8	172.9 ± 59.4*	146.1 ± 70.1*	154.0 ± 65.2*	163.0 ± 36.4*
2	258.2 ± 50.2	150.8 ± 27*	144.4 ± 81.5*	137.5 ± 53.5*	156.8 ± 45.5*
3	231.1 ± 39.0	157.5 ± 29.3*	152.8 ± 76.2*	92.1 ± 19.3*	139.8 ± 64.2*
4	224.8 ± 47.1	109.2 ± 43.0*	134.9 ± 98.1*	92.7 ± 20.9*	161.0 ± 70.5*
5	201.9 ± 67.5	76.1 ± 31.2*	127.1 ± 103.9*	80.2 ± 18.1*	132.4 ± 68.8*

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/1 TEA, 48 nM/1 TEAA, 56 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/1 TEA, 480 nM/1 TEAA, 560 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/1 TEA, 4800 nM/1 TEAA, 5600 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/1 TEA, 48000 nM/1 TEAA, 56000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/1 TEA, 480000 nM/1 TEAA, 560000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \*  $p < 0,05$  у односу на контролну групу.

#### 4.1.6. Коронарни проток (*BF* – *Blood flow*)

Коронарни проток (BF) значајно је смањен после примене: TEAA (максимално смањење од базалних вредности  $13 \pm 4\%$ ; од  $4,8 \times 10^{-8}M$  до  $4,8 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 23,61$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 1,4 \pm 0,01 \times 10^{-6}M$ ), TEA (максимално смањење од базалних вредности  $12 \pm 4\%$ ; од  $6,7 \times 10^{-8}M$  до  $6,7 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 9,15$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 8,8 \pm 0,01 \times 10^{-7}M$ ), PdCl<sub>2</sub> (максимално смањење од базалних вредности  $24 \pm 11\%$ ; од  $5,6 \times 10^{-8}M$  до  $5,6 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 70,21$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 6,9 \pm 0,01 \times 10^{-7}M$ ), и Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности  $22 \pm 12\%$ ; од  $2,1 \times 10^{-8}M$  до  $2,1 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 3,83$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,05$ ;  $EC50 = 1,5 \pm 0,01 \times 10^{-7}M$ ) (Графикон 4.).

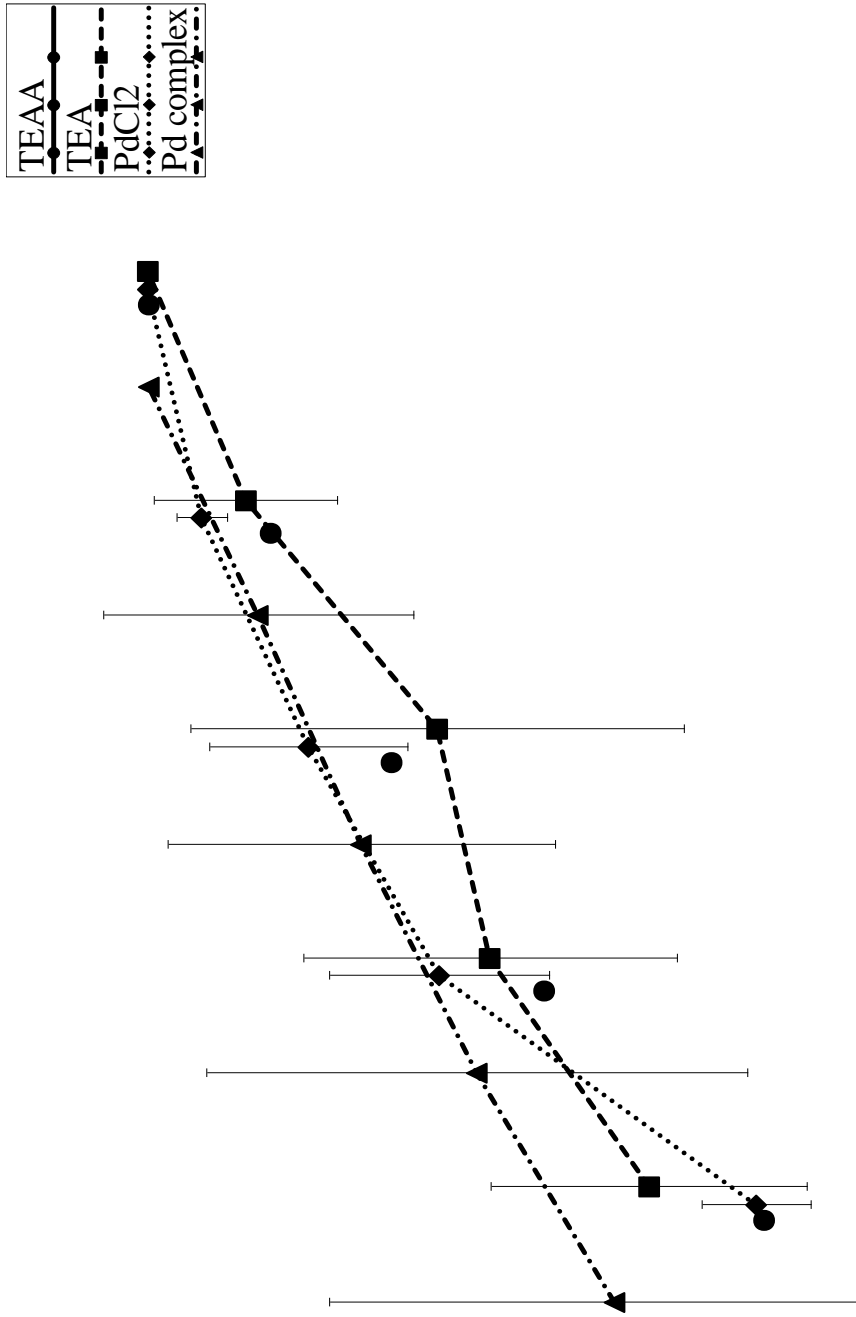
Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 4.), тј. смањења коронарног протока у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања коронарног протока у контролној серији експеримената. Средње

вредности коронарног протока (Табела 6.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 6.** Средње вредности коронарног протока (BF) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

<b>Коронарни проток (ml/min)</b>					
<b>N</b>	<b>Контрола</b>	<b>TEAA</b>	<b>TEA</b>	<b>PdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pd комплекс</b>
<b>0</b>	6.9 ± 1.1	9.6 ± 6.5	9.0 ± 6.0	6.4 ± 2.4	8.3 ± 3.2
<b>1</b>	6.2 ± 1.1	8.9 ± 6.0*	7.8 ± 6.2*	5.8 ± 2.4*	6.8 ± 4.6*
<b>2</b>	6.0 ± 1.1	7.6 ± 5.6*	7.1 ± 6.5*	3.7 ± 2.0*	5.8 ± 4.3*
<b>3</b>	5.6 ± 1.1	6.5 ± 4.6*	6.6 ± 6.2*	2.8 ± 1.8*	4.8 ± 3.8*
<b>4</b>	5.2 ± 1.2	5.7 ± 4.3*	5.5 ± 5.4*	1.9 ± 1.1*	2.9 ± 2.4*
<b>5</b>	4.8 ± 1.3	4.7 ± 3.6*	5.9 ± 5.5*	1.6 ± 0.9*	3.9 ± 3.4*

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.



**Графикон 4.** Смањење коронарног протока (BF) изолованог срца пацова изазвано од ТЕАА (●), ТЕА (■), PdCl<sub>2</sub> (◆) и Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.

## 4.2. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ

### 4.2.1. Параметри оксидативног стреса

#### а) Азот моноксид (NO)

Ниво ослобођеног азот монооксида (NO) није значајно измењен после примене било ког реагенса: ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 1,83$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 0,27$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ),  $\text{PdCl}_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 0,98$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 4,82$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења вредности азот монооксида у коронарном венском ефлуенту у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања азот монооксида у контролној серији експеримената. Средње вредности азот монооксида (Табела 7.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

#### б) Индекс липидне пероксидације (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS*)

Индекс липидне пероксидације (TBARS) значајно је смањен после примене: Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности  $16 \pm 2\%$ ; од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 5,58$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $EC50 = 2,3 \pm 0,01 \times 10^{-8}\text{M}$ ) (Графикон 5.), док није показао значајне измене након примене ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 0,95$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 4,94$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ) и  $\text{PdCl}_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 5,0$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 5.), тј. смањења индекса липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту у појединим експерименталним групама на крају сваког

посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања индекса липидне пероксидације у контролној серији експеримената. Средње вредности индекса липидне пероксидације (Табела 8.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 7.** Средње вредности азот монооксида (NO) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

NO (nmol NO <sub>2</sub> /ml ефлуента)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	1.0 ± 0.7	2.4 ± 1.4	0.7 ± 1.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.5
1	1.1 ± 0.5	1.7 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.4
2	1.1 ± 0.7	1.9 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1
3	1.4 ± 0.8	1.7 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.9	0.8 ± 0.4
4	1.2 ± 0.8	2.0 ± 0.5	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.7
5	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

### в) Супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Ниво ослобођеног супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) није значајно измењен после примене било ког реагенса: TEAA (од 4,8 x 10<sup>-8</sup>М до 4,8 x 10<sup>-4</sup>М; F = 1,10, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), TEA (од 6,7 x 10<sup>-8</sup>М до 6,7 x 10<sup>-4</sup>М; F = 2,18, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), PdCl<sub>2</sub> (од 5,6 x 10<sup>-8</sup>М до 5,6 x 10<sup>-4</sup>М; F = 1,16, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), или Pd комплекс (од 2,1 x 10<sup>-8</sup>М до 2,1 x 10<sup>-4</sup>М; F = 0,61, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05).

**Табела 8.** Средње вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

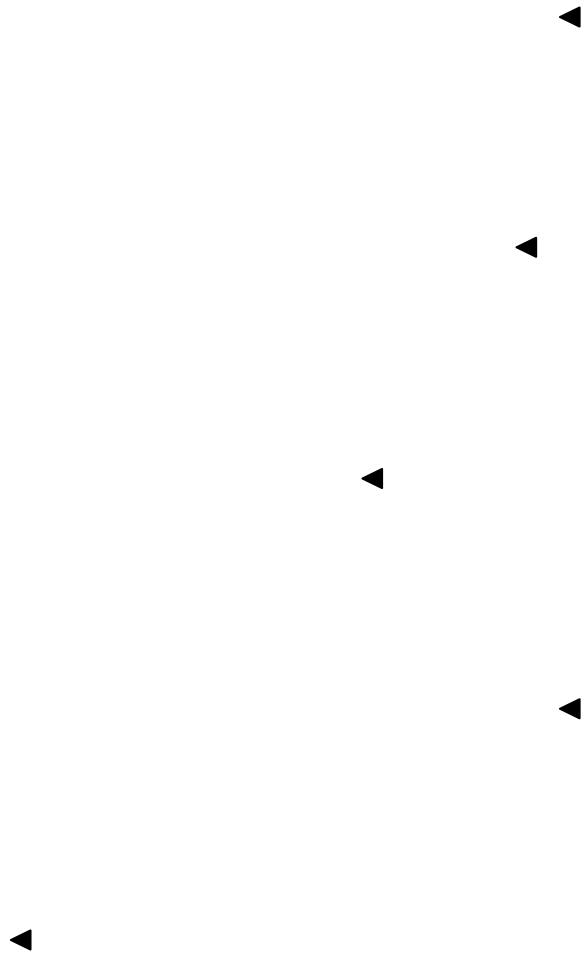
<b>TBARS (nmol TBARS/ml ефлуента)</b>					
<b>N</b>	<b>Контрола</b>	<b>TEAA</b>	<b>TEA</b>	<b>PdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pd комплекс</b>
<b>0</b>	1.0 ± 0.6	3.5 ± 4.7	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<b>1</b>	0.9 ± 0.6	3.7 ± 3.9	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1*
<b>2</b>	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.9	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0*
<b>3</b>	0.8 ± 0.3	2.4 ± 2.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1*
<b>4</b>	0.6 ± 0.2	5.6 ± 4.5	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1*
<b>5</b>	1.4 ± 1.5	3.1 ± 3.2	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1*

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

**Табела 9.** Средње вредности супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

<b>O<sub>2</sub> (nmol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml ефлуента)</b>					
<b>N</b>	<b>Контрола</b>	<b>TEAA</b>	<b>TEA</b>	<b>PdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pd комплекс</b>
<b>0</b>	2.4 ± 1.5	2.8 ± 1.1	3.5 ± 1.9	3.6 ± 2.0	1.8 ± 1.3
<b>1</b>	2.3 ± 1.6	3.5 ± 2.2	1.9 ± 0.8	3.0 ± 2.2	2.6 ± 0.9
<b>2</b>	2.0 ± 1.8	1.9 ± 0.7	2.5 ± 1.5	5.1 ± 3.1	1.3 ± 1.5
<b>3</b>	2.0 ± 1.0	3.4 ± 1.1	2.2 ± 1.6	3.5 ± 1.9	2.2 ± 1.5
<b>4</b>	2.5 ± 1.2	3.2 ± 1.5	2.2 ± 1.5	3.3 ± 1.5	2.2 ± 2.7
<b>5</b>	2.3 ± 1.4	2.7 ± 0.8	1.8 ± 0.6	3.7 ± 1.1	1.5 ± 1.3

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.



**Графикон 5.** Смањење индекса липидне пероксидације (TBARS) у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова изазвано од Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Епог bags су стандардне девијације.



Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења вредности супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања супероксид анјон радикала у контролној серији експеримената. Средње вредности супероксид анјон радикала (Табела 9.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

#### г) Водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Количина произведеног водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) није значајно измењена после примене било ког реагенса: ТЕАА (од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 5,26$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $6,7 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 5,75$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ),  $\text{PdCl}_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 2,73$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ), или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $2,1 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 8,89$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења вредности водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања контрактилности у контролној серији експеримената. Средње вредности водоник пероксида (Табела 10.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

### 4.2.2. Ензимски параметри некрозе миокарда

#### а) Аспартат аминотрансфераза (*AST – Aspartate aminotransferase*)

Ниво активности аспартат аминотрансферазе (AST) значајно је смањен после примене ТЕАА (максимално смањење од базалних вредности  $34 \pm 21\%$ ; од  $4,8 \times 10^{-8}\text{M}$  до  $4,8 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $F = 21,08$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p < 0,01$ ;  $\text{EC}_{50} = 1,5 \pm 0,01 \times 10^{-6}\text{M}$ ) (Графикон 6.),

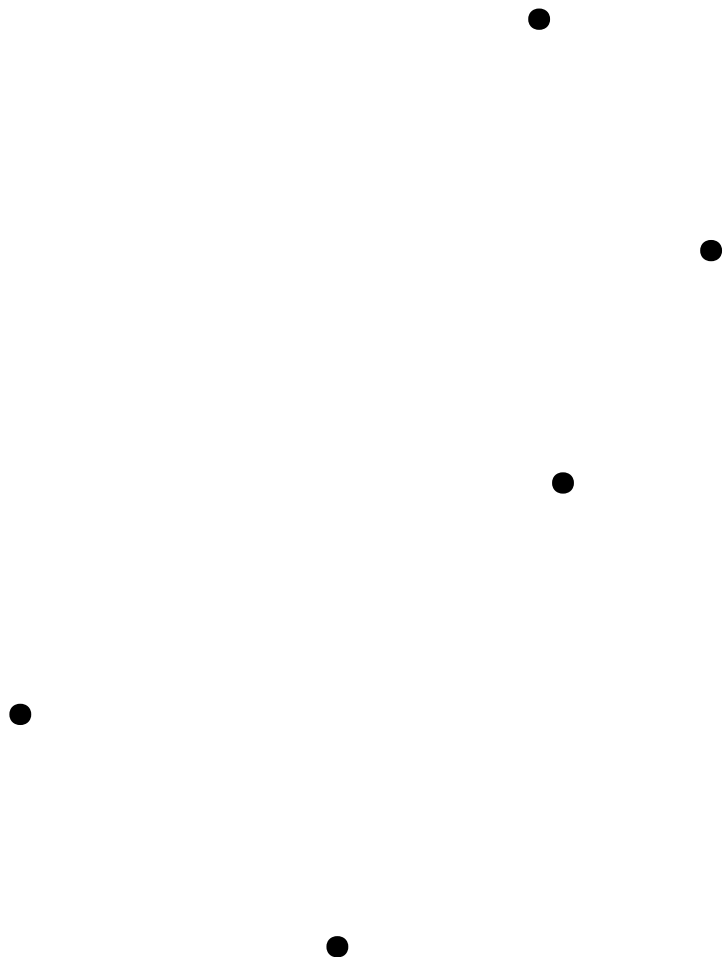
док није показао значајне измене након примене TEA (од  $6,7 \times 10^{-8}M$  до  $6,7 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 7,45$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ),  $PdCl_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}M$  до  $5,6 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 1,21$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ) или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}M$  до  $2,1 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 2,86$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 20$ ,  $p > 0,05$ ).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 6.), тј. смањења активности аспартат аминотрансферазе у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања аспартат аминотрансферазе у контролној серији експеримената. Средње вредности аспартат аминотрансферазе (Табела 11.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 10.** Средње вредности водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml ефлуента)</b>					
<b>N</b>	<b>Контрола</b>	<b>TEAA</b>	<b>TEA</b>	<b>PdCl<sub>2</sub></b>	<b>Pd комплекс</b>
<b>0</b>	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.2
<b>1</b>	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1
<b>2</b>	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3
<b>3</b>	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.2
<b>4</b>	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.1
<b>5</b>	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.4

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/1 TEA, 48 nM/1 TEAA, 56 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/1 TEA, 480 nM/1 TEAA, 560 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/1 TEA, 4800 nM/1 TEAA, 5600 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/1 TEA, 48000 nM/1 TEAA, 56000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/1 TEA, 480000 nM/1 TEAA, 560000 nM/1 PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/1 *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \*  $p < 0,05$  у односу на контролну групу.



**Графикон 6.** Смањење активности аспаргат аминотрансферазе (AST) у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова изазвано од ТЕАА (●). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.

**Табела 11.** Средње вредности аспартат аминотрансферазе (AST) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

AST (U/l)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	19.3 ± 10.0	10.2 ± 13.7	10.0 ± 5.1	6.5 ± 3.5	10.8 ± 2.4
1	16.5 ± 13.6	5.0 ± 5.6*	8.0 ± 5.5	17.0 ± 21.8	12.0 ± 9.5
2	20.3 ± 23.6	3.0 ± 2.8*	4.7 ± 3.8	12.0 ± 11.4	8.8 ± 7.9
3	29.5 ± 35.4	2.7 ± 2.4*	2.5 ± 2.2	13.5 ± 18.6	9.8 ± 3.6
4	34.3 ± 41.1	2.7 ± 2.0*	3.0 ± 3.0	12.0 ± 8.7	13.6 ± 7.6
5	30.0 ± 41.5	3.8 ± 2.4*	3.0 ± 3.0	12.2 ± 12.6	10.2 ± 7.2

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

### б) Аланин аминотрансфераза (ALT – *Alanine aminotransferase*)

Ниво активности аланин аминотрансферазе (ALT) није значајно измењен после примене било ког реагенса: TEAA (од  $4,8 \times 10^{-8}M$  до  $4,8 \times 10^{-4}M$ ; F = 3,76, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), TEA (од  $6,7 \times 10^{-8}M$  до  $6,7 \times 10^{-4}M$ ; F = 1,01, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), PdCl<sub>2</sub> (од  $5,6 \times 10^{-8}M$  до  $5,6 \times 10^{-4}M$ ; F = 0,21, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05), или Pd комплекс (од  $2,1 \times 10^{-8}M$  до  $2,1 \times 10^{-4}M$ ; F = 0,0, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора, тј. смањења активности аланин аминотрансферазе у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања аланин аминотрансферазе у контролној серији експеримената. Средње вредности аланин аминотрансферазе (Табела 12.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 12.** Средње вредности аланин аминотрансферазе (ALT) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

ALT (U/l)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	0.8 ± 1.3	2.0 ± 1.3	1.3 ± 1.4	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0
1	0.2 ± 0.4	1.0 ± 1.1	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.8	0.2 ± 0.4
2	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.6 ± 1.3
3	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
4	0.5 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.8	0.2 ± 0.4
5	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

### в) Лактат дехидрогеназа (LDH – *Lactate dehydrogenase*)

Ниво активности лактат дехидрогеназе (LDH) значајно је смањен после примене: TEAA (максимално смањење од базалних вредности 33 ± 31%; од 4,8 x 10<sup>-8</sup>М до 4,8 x 10<sup>-4</sup>М; F = 7,23, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,01; EC50 = 4,5 ± 0,01 x 10<sup>-6</sup>М), TEA (максимално смањење од базалних вредности 17 ± 10%; од 6,7 x 10<sup>-8</sup>М до 6,7 x 10<sup>-4</sup>М; F = 20,62, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,01; EC50 = 3,8 ± 0,01 x 10<sup>-6</sup>М), PdCl<sub>2</sub> (максимално смањење од базалних вредности 21 ± 17%; од 5,6 x 10<sup>-8</sup>М до 5,6 x 10<sup>-4</sup>М; F = 3,82, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,05; EC50 = 4,0 ± 0,01 x 10<sup>-6</sup>М), и Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности 24 ± 21%; од 2,1 x 10<sup>-8</sup>М до 2,1 x 10<sup>-4</sup>М; F = 3,80, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,05; EC50 = 1,1 ± 0,01 x 10<sup>-6</sup>М) (Графикон 7.).

Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 7.), тј. смањења активности лактат дехидрогеназе у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на

вредност спонтаног опадања лактат дехидрогеназе у контролној серији експеримената. Средње вредности лактат дехидрогеназе (Табела 13.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

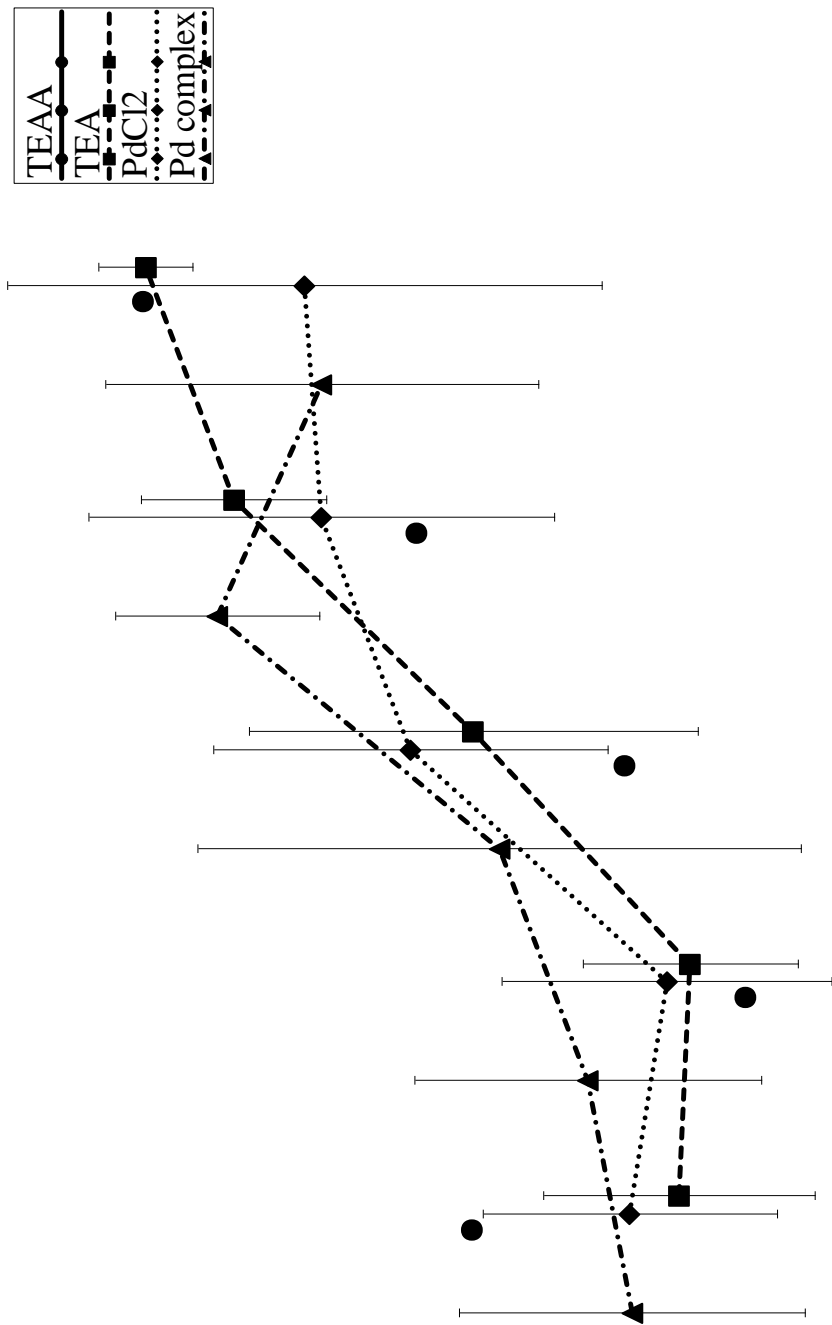
**Табела 13.** Средње вредности лактат дехидрогеназе (LDH) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

LDH (U/l)					
N	Контрола	ТЕАА	ТЕА	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	42.2 ± 12.7	19.8 ± 15.4	45.8 ± 16.6	29.7 ± 11.0	38.4 ± 4.5
1	30.3 ± 7.0	9.0 ± 3.3*	32.7 ± 26.7*	20.0 ± 2.8*	23.6 ± 3.2*
2	28.5 ± 8.8	13.2 ± 3.2*	24.7 ± 7.2*	18.3 ± 10.5*	21.6 ± 2.6*
3	34.3 ± 15.8	10.3 ± 4.2*	21.7 ± 3.1*	23.2 ± 6.5*	24.6 ± 6.5 *
4	41.0 ± 18.8	12.5 ± 5.8*	20.8 ± 8.2*	23.8 ± 7.8 *	25.0 ± 4.4*
5	40.8 ± 20.3	8.0 ± 6.2*	17.3 ± 5.0 *	25.8 ± 9.9*	26.2 ± 7.2*

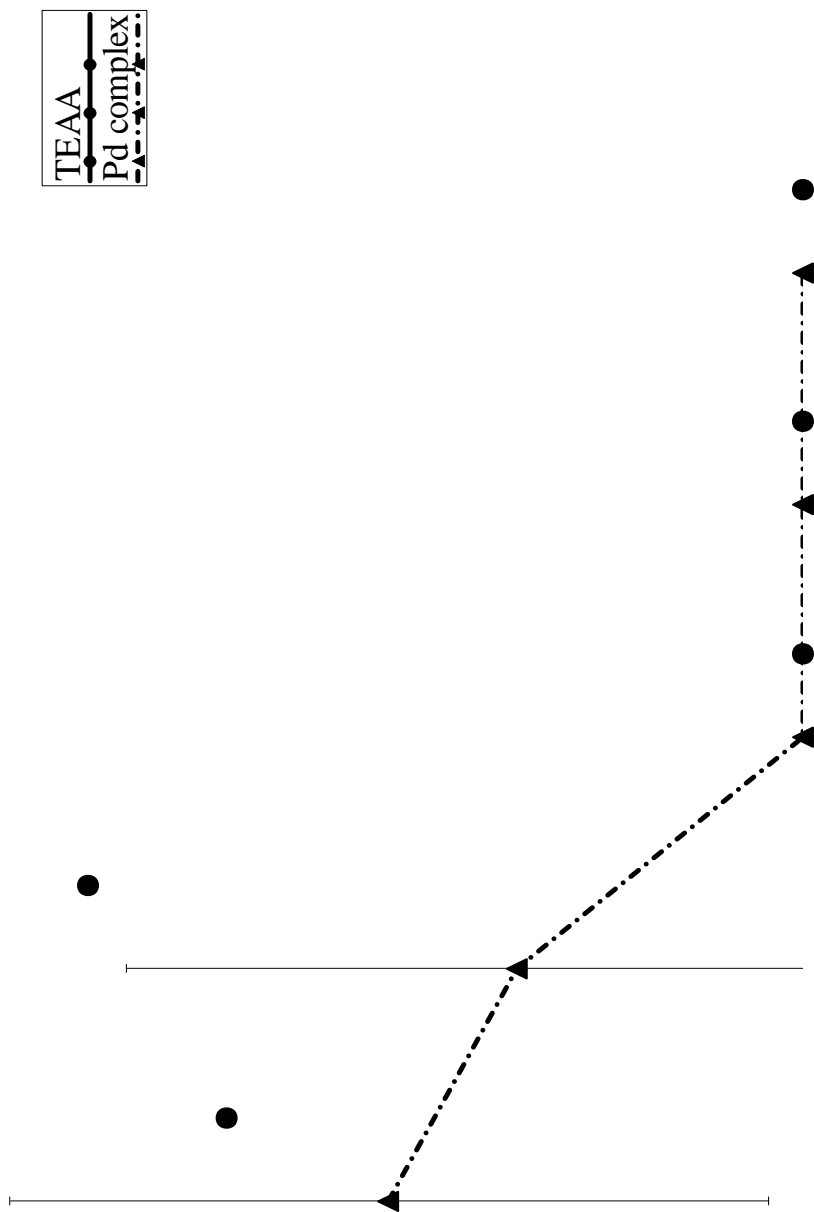
N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

### г) Креатин киназа (СК – *Creatine kinase*)

Ниво активности креатин киназе (СК) значајно је смањен после примене: ТЕАА (максимално смањење од базалних вредности 28 ± 20%; од 4,8 x 10<sup>-8</sup>М до 4,8 x 10<sup>-4</sup>М; F = 1013,28, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,01; EC50 = 1,4 ± 0,01 x 10<sup>-6</sup>М) и Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности 67 ± 47%; од 2,1 x 10<sup>-8</sup>М до 2,1 x 10<sup>-4</sup>М; F = 3,27, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,05; EC50 = 2,4 ± 0,01 x 10<sup>-8</sup>М) (Графикон 8.), док није показао значајне измене након примене ТЕА (од 6,7 x 10<sup>-8</sup>М до 6,7 x 10<sup>-4</sup>М; F = 2,89, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05) и PdCl<sub>2</sub> (од 5,6 x 10<sup>-8</sup>М до 5,6 x 10<sup>-4</sup>М; F = 1,78, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p > 0,05).



**Графикон 7.** Смањење активности лактат дехидрогеназе (LDH) у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова изазвано од TEAA (●), TEA (■), PdCl<sub>2</sub> (◆) и Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.



**Графикон 8.** Смањење активности креатин киназе (СК) у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова изазвано од ТЕАА (●) и Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.



Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 8.), тј. смањења активности креатин киназе у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања креатин киназе у контролној серији експеримената. Средње вредности креатин киназе (Табела 14.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 14.** Средње вредности креатин киназе (СК) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

СК (U/l)					
N	Контрола	TEAA	TEA	PdCl <sub>2</sub>	Pd комплекс
0	3.5 ± 5.2	1.8 ± 0.8	1.2 ± 1.5	0.5 ± 0.8	1.2 ± 0.8
1	3.0 ± 5.4	1.8 ± 1.2*	0.8 ± 1.3	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.9 *
2	3.7 ± 6.1	1.8 ± 0.8*	1.3 ± 1.6	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5*
3	9.8 ± 18.2	1.3 ± 0.8*	1.3 ± 1.4	1.0 ± 1.3	1.4 ± 0.9*
4	11.7 ± 20.1	1.8 ± 0.8*	0.7 ± 1.2	1.2 ± 1.0	1.4 ± 1.1*
5	8.8 ± 13.3	2.0 ± 0.6*	0.8 ± 0.8	0.2 ± 0.4	1.0 ± 1.2*

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l TEA, 48 nM/l TEAA, 56 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 2 (670 nM/l TEA, 480 nM/l TEAA, 560 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 3 (6700 nM/l TEA, 4800 nM/l TEAA, 5600 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 2100 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 4 (67000 nM/l TEA, 48000 nM/l TEAA, 56000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 21000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]); 5 (670000 nM/l TEA, 480000 nM/l TEAA, 560000 nM/l PdCl<sub>2</sub>, 210000 nM/l *транс* - [PdCl<sub>2</sub>(TEA)<sub>2</sub>]). \* p < 0,05 у односу на контролну групу.

#### д) Креатин киназа, изоензим МБ (СК-МБ - *Creatine kinase isoenzyme MB*)

Ниво активности креатин киназе, изоензима МБ значајно је смањен после примене Pd комплекса (максимално смањење од базалних вредности  $47 \pm 5\%$ ; од  $2,1 \times 10^{-8}M$  до  $2,1 \times 10^{-4}M$ ; F = 3,89, df<sub>1</sub> = 4, df<sub>2</sub> = 20, p < 0,05; EC50 =  $1,1 \pm 0,01 \times 10^{-8}M$ ) (Графикон 9.), док није показао значајне измене након примене TEAA (од  $4,8 \times 10^{-8}M$  до  $4,8 \times 10^{-4}M$ ; F = 1,42,

$df_1 = 4, df_2 = 20, p > 0,05$ ), ТЕА (од  $6,7 \times 10^{-8}M$  до  $6,7 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 1,82, df_1 = 4, df_2 = 20, p > 0,05$ ),  $PdCl_2$  (од  $5,6 \times 10^{-8}M$  до  $5,6 \times 10^{-4}M$ ;  $F = 1,39, df_1 = 4, df_2 = 20, p > 0,05$ ).

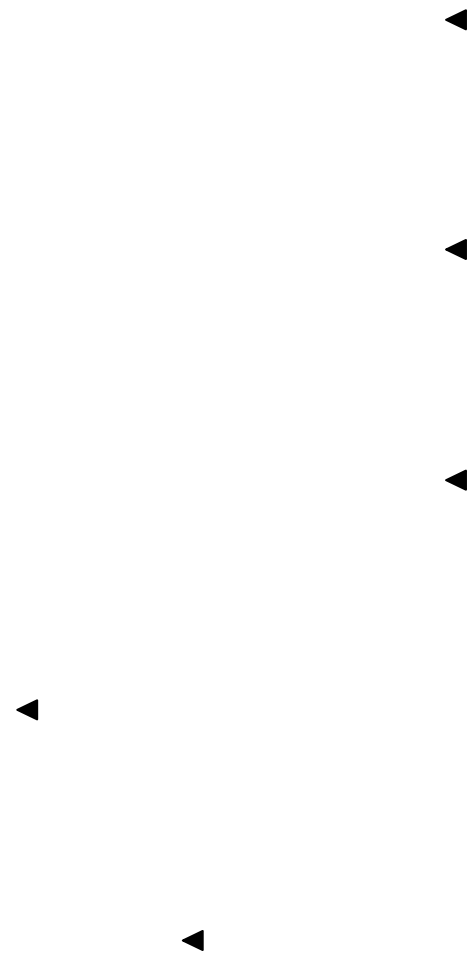
Ефекат различитих концентрација испитиваних супстанци изражен је процентом максималног одговора (Графикон 9.), тј. смањења активности креатин киназе изоензима МБ у појединим експерименталним групама на крају сваког посматраног периода, у односу на вредност спонтаног опадања СК-МВ у контролној серији експеримената. Средње вредности креатин киназе, изоензима МБ (Табела 15.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 6 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 15.** Средње вредности креатин киназе, изоензима МБ (СК-МВ ) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама.

СК-МВ (U/l)					
N	Контрола	ТЕАА	ТЕА	$PdCl_2$	Pd комплекс
0	$4.5 \pm 8.6$	$1.0 \pm 1.1$	$1.5 \pm 1.8$	$0.8 \pm 0.8$	$1.4 \pm 0.9$
1	$3.7 \pm 7.6$	$0.8 \pm 0.8$	$1.0 \pm 0.9$	$0.5 \pm 0.5$	$0.8 \pm 0.8^*$
2	$4.3 \pm 9.2$	$1.2 \pm 0.4$	$1.5 \pm 1.8$	$1.2 \pm 0.8$	$0.4 \pm 0.5^*$
3	$14.7 \pm 26.6$	$0.7 \pm 0.5$	$1.2 \pm 1.6$	$1.0 \pm 1.1$	$1.2 \pm 0.8^*$
4	$17.5 \pm 29.6$	$1.0 \pm 1.1$	$1.0 \pm 1.1$	$1.3 \pm 1.5$	$1.6 \pm 1.5^*$
5	$12.8 \pm 19.9$	$1.3 \pm 0.5$	$0.8 \pm 1.2$	$0.5 \pm 0.8$	$1.0 \pm 0.7^*$

N: 0 – базалне вредности; раствор: 1 (67 nM/l ТЕА, 48 nM/l ТЕАА, 56 nM/l  $PdCl_2$ , 21 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(ТЕА)_2$ ]); 2 (670 nM/l ТЕА, 480 nM/l ТЕАА, 560 nM/l  $PdCl_2$ , 210 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(ТЕА)_2$ ]); 3 (6700 nM/l ТЕА, 4800 nM/l ТЕАА, 5600 nM/l  $PdCl_2$ , 2100 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(ТЕА)_2$ ]); 4 (67000 nM/l ТЕА, 48000 nM/l ТЕАА, 56000 nM/l  $PdCl_2$ , 21000 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(ТЕА)_2$ ]); 5 (670000 nM/l ТЕА, 480000 nM/l ТЕАА, 560000 nM/l  $PdCl_2$ , 210000 nM/l *транс* - [ $PdCl_2(ТЕА)_2$ ]). \*  $p < 0,05$  у односу на контролну групу.

Pd complex



**Графикон 9.** Смањење активности креатин киназе (СК-МВ) у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова изазвано од Pd комплекса (▲). Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња. Error bars су стандардне девијације.

## 5. Дискусија

---

### 5.1. ХЕМОДИНАМСКИ ПОРЕМЕЋАЈИ УЗРОКОВАНИ ЈЕДИЊЕЊИМА ПАЛАДИЈУМА

Резултати добијени у овој студији указују на смањење контрактилности срца изазвано дејством паладијум(II) хлорида ( $\text{PdCl}_2$ ), које се манифестовало падом вредности дијастолног и средњег притиска у левој комори, и смањењем фреквенце срца. Остала једињења нису показала значајне промене у контрактилности и њихово инхибиторно дејство односило се само на фреквенцу срца и коронарни проток. Како ТЕА и његов  $\text{Pd(II)}$  комплекс смањују фреквенцу срца у мањој мери у односу на  $\text{PdCl}_2$ , изгледа да паладијум када је у органском облику не показује значајну кардиотоксичност. На основу тога, може се претпоставити да су органска једињења паладијума мање токсична у односу на неорганска. Оваква сазнања имала би велики значај пре свега у лечењу пацијената отрованих паладијумом.

До данас, већина спроведених истраживања о дејству паладијума на организам људи и животиња, односила су се на његово алергијско,<sup>41,47-49, 52-56</sup> антитуморско дејство,<sup>14-23</sup> као и токсично дејство на бубреге,<sup>41,42</sup> јетру<sup>39,43</sup> и опште стање животиње.<sup>12,40</sup> Међутим, број студија које су се бавиле проучавањем утицаја паладијума на кардиоваскуларни систем је мали. Шта више, само је једна студија чији је примарни циљ био испитивање овог дејства,<sup>44</sup> док је у осталим, реч о регистровању пропратног ефекта примењених једињења паладијума на срце. У поменутој студији, испитиван је ефекат неорганских једињења паладијума на срце пацова, при чему је након интравенске апликације ових једињења изванредан број животиња угинуо услед аритмије и хипотензије.<sup>44</sup> При том, испоставило се да су  $\text{PdSO}_4$ ,  $\text{Pd(NO}_3)_2$  и  $\text{PdCl}_2$  три пута потентнији изазивачи фармаколошких ефеката у односу на бивалентна једињења ( $(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_4$  и  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ). Постоје још две студије у којима је описан брзи смртни исход животиња након интравенског давања  $\text{PdCl}_2$ , највероватније услед оштећења и поремећаја рада срца.<sup>12,40</sup> У овим студијама паладијум је примењен у виду интравенске инјекције. Међутим, показано

је да иако је биорасположивост паладијума након оралне примене само 0,5%, могућа је његова апсорбција путем инхалације или инфламиране коже у мери довољној да изазове системске токсичне ефекте и у тим случајевима.<sup>139</sup> Интересантно је да студије акутне и хроничне токсичности једињења паладијума на зечевима и пацовима нису показале хистопатолошке промене на миокарду, нити специфично дејство паладијума на срце.<sup>140-142</sup>

Такође, нису познати подаци, нити студије у којима су описани кардиотоксични ефекти триетаноламина (ТЕА) и триетаноламин ацетата (ТЕАА), реагенаса коришћених у нашој студији за прављење комплекса паладијума. Иако се ТЕА широко примењује за производњу хигијенско-козметичких производа, и ТЕАА у грађевинској индустрији, не постоје подаци о њиховој токсичности, осим контактне алергијског дерматитиса код човека<sup>143</sup> и тумора јетре мишева изазваних ТЕА.<sup>144</sup>

Механизми изазивања оваквих хемодинамских поремећаја рада срца изазваних паладијумом, до данас, нису у потпуности разјашњени. Као један од механизма настанка оштећења срца наведено је нарушавање мембранског потенцијала миокарда у коморама под утицајем соли паладијума растворљивих у води.<sup>145</sup> Како је за одржавање мировног мембранског потенцијала, али и настанак акционог потенцијала ексцитаторне ћелије, значајан рад јонских пумпи ћелијске мембране, неопходно је описати утицај паладијума на њихову ефикасност.

Биолошке мембране су прва линија одбране коју морају савладати токсичне материје како би испољиле своја дејства на ћелију.<sup>146</sup> Један од најважнијих мембранских протеина је аденозинтрифосфатаза (АТР-аза) као интегрални део натријум-калијум пумпе. Она је одговорна за успостављање и одржавање електрохемијског градијента у ћелији,<sup>147-149</sup> контролу волумена, транспорт угљених хидрата и аминокиселина кроз мембрану, као и ексцитацију нервне и мишићне ћелије.<sup>150</sup> Такође, недавне студије су показале да  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТР-аза интерагује са околним мембранским протеинима и организује каскаду сигналних протеина у цитозолу за пренос информација интраћелијским органеллама.<sup>151,152</sup> Изгледа да она ту трансдукцију сигнала остварује путем интеракције са тирозин киназом и рецептором за епидермални фактор раста у срчаним миоцитима.<sup>151-154</sup> Све ово, чини је значајном метом за многа органска и неорганска фармаколошка једињења, антитуморке агенсе, биолошки значајне металне јоне, пестициде, хербициде и др. Недавна

истраживања показала су да Pd(II) комплекси показују афинитет за сулфхидрилне (SH) групе Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азе<sup>155,156</sup> и да би то могао бити један од механизма токсичног дејства паладијума. При том, показано је да *trans*-Pd(II) хлоридни комплекси значајно повећавају пропустљивост мембране и за Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> јоне, али је нешто јачи ефекат на транспорт натријумових јона кроз мембрану (Na<sup>+</sup>: K<sup>+</sup> = 9:5), у односу на јонски канал без комплекса паладијума.<sup>157</sup> Интеракција Pd(II) комплекса са тиол групама протеина описана је у више студија.<sup>158-160</sup> Наиме, ензим Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-аза може се посматрати као SH дозор, с обзиром да има 36 SH група које су одговорне за интеракцију са различитим јонима метала.<sup>158,161,162</sup> Специфично, доказано је да Pd(II) комплекси имају велики афинитет за супституцију реакција CГ лиганата са SH донорима.<sup>155,156</sup> Везујући се за ове групе ензима, паладијум доводи до инхибиције његове функције. IC<sub>50</sub> (тј. она концентрација која изазива половину максималног инхибиторног ефекта) износи 1,2 × 10<sup>-4</sup> М/л за [PdCl]<sup>+</sup> и 2.3×10<sup>-5</sup> М/л за [PdCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>.<sup>146</sup> То такође значи да се ови инхибиторни ефекти паладијума можда могу спречити додавањем лиганата са SH групама. Шта више, дозно-завистан инхибиторни ефекат Pd(II) комплекса на Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азу добијен је у присуству L-цистеина и глутатиона (GSH),<sup>156,163-165</sup> где је потпуни опоравак инхибиције рецептора добијен када је концентрација SH лиганата била једнака или виша од концентрације Pd(II) комплекса. Сматра се да тиоли имају потенцијал да истисну Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азу из ензим-инхибитор комплекса и формирају стабилни Pd(II)-тиол комплекс.<sup>166</sup> Како је концентрација GSH у ћелији до 8 mM, много већа од концентрације цистеина, способност овог лиганата за детоксикацију је значајна, нарочито након хемотерапије.<sup>146</sup> Значај инхибиције Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азе у срчаним ћелијама огледа се и у томе да значајна група лекова, кардиотонични гликозиди (дигитоксин, дигоксин, медигоксин, итд.) и неки њихови деривати (метилдигоксин, ацетилдигоксин, и сл.), представљају веома потентне и специфичне инхибиторе овог ензима.<sup>167-169</sup> Затим, функционална имобилизација и инхибиција рецептора Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азе је основа апликације многобројних лиганата у медицини и фармацији.

Међутим, описаним механизмом дејства не могу се у потпуности објаснити резултати добијени у нашој студији. Наиме, инхибиција Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азе доводи до нагомилавања Na<sup>+</sup> унутар ћелије, што ремети рад Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> пумпе која зависи од концентрационог градијента за Na<sup>+</sup>, и доводи до нагомилавања Ca<sup>2+</sup> унутар срчаних ћелија.

Повећана концентрација калцијума у ћелији узрокује продужење фазе 4 и фазе 0 срчаног акционог потенцијала, што би требало да доведе до смањења срчане фреквенце и повећања контрактилности срца.<sup>170</sup> Овакав механизам дејства требало би да обезбеди антиаритмогено дејство и повећање снаге срчане контракције. У нашој студији, пак, дошло је до смањења броја срчаних откуцаја, али снага контракције није повећана, чак шта више, она је снижена, као и притисци у левој комори. На основу тога, вероватно је да инхибиција рецептора  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азе није основни, или једини механизам дејства паладијума. Пре ће бити да паладијум делује на већи број протеинских канала и ензима, па би се њиховом комбинованом инхибицијом могао објаснити супресивни ефекат на срчану функцију. При том се у већини случајева инхибиција остварује везивањем за SH групе протеина. У зависности да ли је реч о органском или неорганском једињењу паладијума, начин дејства могао би се мењати, а самим тим и степен токсичног дејства на срце.

Инхибиторно дејство паладијума забележено је и на  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  зависну АТФ-азу саркоплазматског ретикулума скелетних мишића.<sup>171-173</sup> Најновија истраживања указују да органски Pd(II) комплекси инхибирају активни транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  јона и хидролизу АТФ-а катализовану АТФ-азом саркоплазматског ретикулума.<sup>171</sup> Механизам инхибиције подразумева интеракцију са тиол групама овог ензима.<sup>172,173</sup> При том, показано је да органски, албумински комплекс паладијума („Pd-albumin“) изазива за један ранг виши инхибиторни ефекат ензима у односу на примењено неорганско једињење ( $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ).<sup>172</sup> Ови резултати супротни су резултатима наше студије и хипотези о мањој токсичности органских комплекса паладијума. Објашњавају се концентрисањем албумина у активном центру ензима и олакшаним везивањем паладијума за SH групе ензима.<sup>172</sup> Иако се поменуте студије односе на скелетни мишић, сличан механизам токсичног дејства паладијума могао би се применити и на срчани мишић и објаснити његово инхибиторно дејство на  $\text{Ca}^{2+}$  канале. Како су цистерне саркоплазматског ретикулума срчаног мишића знатно слабије развијене у односу на скелетни мишић, неопходно је да додатна количина калцијума доспе у ћелију и из Т-тубула. Самим тим, у срчаном мишићу би била значајна и инхибиција  $\text{Ca}^{2+}$  канала ћелијске мембране, поред инхибиције  $\text{Ca}^{2+}$  АТФ-азе саркоплазматског ретикулума. У том смислу, изгледа да јони паладијума имају афинитет ка местима везивања калцијума, али и магнезијума, и других бивалентних јона на јонским каналима и ензимима, ометајући њихово везивање<sup>35,174-176</sup> и водећи ка поремећају

мембранског потенцијала, смањењу уласка калцијума у ћелију, последичном смањењу контрактилности миокарда и настанку аритмије. Такође, сматра се да токсичност двовалентних јона метала корелира са способношћу њиховог везивања и инхибиције  $\text{Ca}^{2+}$  везујућег протеина калмодулина, који регулише различите ензимске процесе у ћелији, као и концентрацију  $\text{Ca}^{2+}$  јона.<sup>177</sup>

Дејство паладијума на транспортне протеине и јонске канале, описано је и у бубрегу, где  $\text{PdCl}_2$  изазива инхибицију  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  антитранспортног система и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  измену, изазивајући ретенцију калцијума у бубрегу. Утицај на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  симпортни систем при том није забележен<sup>42</sup> Овај ефекат паладијума, на основу до сада доступних података, могао би се сматрати основом нефротоксичности паладијум(II) једињења.

Како је у нашој студији испољено кардиотоксично дејство паладијума, које се огледало у паду контрактилности, коронарног протока и фреквенце срца, описана инхибиција транспортних јонских канала и поремећај екситације и трансдукције акционог потенцијала кардиомиоцита, могу се претпоставити као основни механизам токсичног дејства паладијума на изоловано срце пацова.

## **5.2. ПАЛАДИЈУМОМ ИНДУКОВАНО ОКСИДАТИВНО ОШТЕЋЕЊЕ МИОКАРДА**

У овој студији није забележено значајно антиоксидативно дејство једињења паладијума, осим смањења индекса липидне пероксидације дејством Pd комплекса. Остала једињења примењена у студији нису изазвала промену оксидативног статуса у ћелији. Иако у нашој студији  $\text{PdCl}_2$  није изазвао повећање нивоа ROS, овакви резултати нису у супротности са већ постојећим резултатима студија које указују на про-оксидативно дејство неорганских једињења паладијума. Насупрот томе, изгледа да паладијум у органском облику не само да има мање изражено про-оксидативно дејство, већ показује и супротан, антиоксидативни ефекат. Ова сазнања иду у прилог тези о мањој токсичности органских једињења паладијума у односу на неорганска.



Митохондрије су један од главних извора продуката реактивних кисеоничних група и оксидативног стреса у ћелији, и имају централну улогу у оштећењу ткива повезаним са старењем.<sup>58,29</sup> Степен промена у кардиомиоцитима током старења пропорционалан је годинама старости.<sup>178</sup> То је вероватно последица смањења интензитета метаболизма и количине ензима у срчаним ћелијама, нарочито протективних ензима, супероксид дизмутазе (SOD) и каталазе (CAT). Главне улоге митохондрија у ћелији су енергетски метаболизам, регулација нивоа калцијума и индукција апоптозе. Потребне за енергијом диктирају број митохондрија у ћелији.<sup>179,180</sup> Срчани и скелетни мишић, мозак и јетра имају највише митохондрија због њиховог високог енергетског метаболизма. Такође, ове ћелије су изложене високом оксидативном стресу, што условљава и већи број митохондрија. Ћелијски извори ROS у срцу су кардиомиоцити, ендотелне ћелије и неутрофилни леукоцити. У срчаним ћелијама ROS могу бити продуковани од NADPH оксидазе плазма мембране, ензима митохондријалних транспортних ланаца електрона и цитозолне ксантин оксидазе.<sup>181</sup> ROS узрокују у ћелији оксидацију фосфолипида мембране, протеина и ДНК.<sup>115</sup> Недавна истраживања показала су да је оксидативни стрес укључен у патогенезу различитих кардиоваскуларних болести: атеросклерозе, хипертензије, прогресивне срчане инсуфицијенције.<sup>119</sup>

Проучавањем цитотоксичног дејства паладијума, дошло се до резултата да његова једињења могу утицати на продукцију ROS, као и активност значајних антиоксидативних ензима. При том, досадашњи резултати истраживања указују да је оксидативно дејство паладијума различито када је реч о његовим неорганским у односу на органска једињења. Наиме, показано је да неорганска једињења паладијума у већини случајева делују про-оксидативно,<sup>129,130</sup> потенцирајући како супероксид, тако и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оксидационе реакције у ћелији. За разлику од платине (Pt) која не учествује у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> посредованим реакцијама, већ делује само путем O<sub>2</sub><sup>-</sup> радикала, показано је да Pd може изазвати оштећења у *in vitro* ћелијским реакцијама путем оба радикала.<sup>129</sup> Занимљиво је да су недавна истраживања показала да Pd-хлоридни комплекси представљају значајне иницијаторе оштећења ДНК путем повећане продукције OH<sup>-</sup> радикала. Заправо, доказано је да Pd не може заменити Fe<sup>2+</sup> у Fenton-овој реакцији, али да без обзира на то повећава продукцију OH<sup>-</sup> радикала и проценат оштећења ДНК када се дода у оваквим реакцијама.<sup>182</sup> Ово би се могло објаснити

тима да Pd-хлоридни комплекси функционишу као нека врста катализатора у *Fenton*-овој реакцији, или редукциони дозор електрона за гвожђе.<sup>183</sup> Паладијум поседује високи афинитет везивања за ДНК кроз интеракцију са фосфатним резидуама у ланцу,<sup>184</sup> што може водити стварању макрохелата<sup>185</sup> и тзв. „microloops” петљи у ДНК ланцу, са последичним одмотавањем хеликса<sup>186-188</sup> и OH<sup>-</sup> посредованом фрагментацијом ДНК. Такође, Pd може инхибирати активност SOD и CAT,<sup>189</sup> што додатно доприноси оксидативном оштећењу у ћелији.

Најновија истраживања антитуморских агенаса указују да извесни паладијум(II) комплекси са Pd<sup>2+</sup> у центру комплекса, изазивају инхибицију ћелијског раста и настанак апоптозе хуманих канцерских ћелија простате.<sup>190</sup> Они то чине посредством продукције ROS и фосфорилације интермедијерног сигналног молекула JNK (*Jun N-terminal kinase*),<sup>190</sup> који је одговоран за ROS посредовану модулацију ћелијског раста и преживљавања, и индукцију ћелијске апоптозе и некрозе.<sup>191,192</sup> Такође, овај комплекс изазива „down“ регулацију GSTp1 (*glutathione S-transferase pi 1*),<sup>190</sup> који има значајну улогу у фази 1 детоксикације продукта оксидативног стреса,<sup>193</sup> и то посредством интеракције са JNK.<sup>194,195</sup> Изазвана ROS продукција индукује апоптозу канцерских ћелија и кроз деполаризацију митохондријалне мембране уз „up“ регулацију Вах протеина (протеина ћелијске смрти), и „down“ регулацију Bcl-2 протеина (протеина инхибитора апоптозе ћелија и „heat shock“ протеина).<sup>190</sup> ROS посредована индукција некрозе и апоптозе ћелија могла би имати значаја и у разјашњењу цитотоксичног дејства паладијума на кардиомиоците.

Митохондријална дисфункција је у основи апоптотичне и некротичне смрти ћелије, при чему механизми изазивања смрти ћелије могу бити последица било поремећаја пермеабилности мембране, транспорта електрона, АТР продукције, промене редокс потенцијала ћелије или отпуштања про-апоптотичних протеина у цитозол.<sup>196</sup> Пермеабилност митохондријалне мембране је Ca<sup>2+</sup> и циклоспорин А (CsA) зависан процес који се карактерише отварањем пермеабилizacionих пора мембране и неселективном дифузијом молекула до 1500 Da, са последичним повећањем волумена митохондрија, митохондријалном деполаризацијом и оксидативном фосфорилацијом.<sup>197</sup> Истраживања су показала да нека органска једињења паладијума (PdC, *palladacycle compounds*) могу изазвати Ca<sup>2+</sup> независно бубрење митохондрија, које не може бити

инхибисано ADP-ом,  $Mg^{2+}$ , или антиоксидансима, већ само циклоспорином А или тиолима.<sup>198</sup> Показано је да ова једињења реагују са тиол групама протеина митохондријалне мембране повећавајући на тај начин њену пермеабилност и ослобађање цитохрома С, компоненте транспортног ланца електрона митохондрија који индукује апоптозу.<sup>198,199</sup> Хипотетичка замена гвожђа и бакра у цитохрому С, слично дејству неких других тешких метала,<sup>200-202</sup> могла би узроковати деполаризацију и аутооксидацију мембране митохондрија са липидном пероксидацијом и митохондријалном дисфункцијом (поремећај хомеостазе калцијума, повећање водоник пероксида, разградња митохондријалног глутатиона >50%, повећање липидне пероксидације >70%, оксидација пиридин нуклеотида, NADH). Ови резултати оповргавају тезу о про-оксидативном дејству само неорганских једињења паладијума.

Дејство ROS на изолованим кардиомиоцитима резултира настанком апоптозе срчаних ћелија и компензаторне хипертофије, праћене миокардном фиброзом.<sup>126</sup> Резултати извесних студија указују да ROS повећавају активност матрикс металопроотеиназа срца,<sup>127,128</sup> што би могао бити један од механизма ремоделирања леве срчане коморе и развоја инсуфицијенције срца.<sup>122,129</sup> Металопроотеиназе су  $Zn^{2+}$  зависне протеазе, које разлажу протеине екстрацелуларног матрикса, али су такође укључене и у многе друге процесе у ткиву: ћелијску пролиферацију, миграцију, диференцијацију, ангиогенезу и апоптозу. Селективна хидролитичка разградња протеина и пептида игра значајну функционалну и регулаторну улогу у контроли ћелијског циклуса, транскрипције, сигналне трансдукције, антиген презентације и апоптозе.<sup>203,204</sup> Слично металопроотеиназама, показано је да се извесни паладијум(II) комплекси могу понашати као артефицијелне металопептидазе и да могу изазвати селективну хидролизу пептидних веза.<sup>205-212</sup> Ове хидролитичке реакције специфично су изражене у близини резидуа хистидина и триптофана. Међутим, хидролитичке реакције изазване овим металним комплексом значајно су спорије у односу на оне каталисане природним металопроотеиназама. Поред индукције синтезе ROS и активације металопроотеиназа у срцу, други механизам дејства паладијума могао би бити замена јона  $Zn^{2+}$  јонима  $Pd^{2+}$  у природним металопроотеиназама и разградња значајних протеина кардиомиоцита. Међутим, у студијама акутне токсичности метала на изолованом срцу пацова, као што је наша студија, овакав механизам дејства паладијума нема великог значаја. Хроничне

токсиколошке студије требало би да дају одговор о значајности оваквог деловања паладијума на процес ремоделирања срца.

Са друге стране, постоје студије у којима Pd није индуковао повећање интрацелуларних нивоа ROS,<sup>213</sup> или је пак дошло до извесног снижења њихових вредности. Тако се у студији где је испитивана ROS продукција након примене различитих једињења тешких метала, дошло до резултата да PdSO<sub>4</sub> не изазива значајно повећање продукције ROS, већ изазива снижење концентрације ROS у ћелији након експозиције од 0,03 mmol/l Pd<sup>2+</sup>.<sup>193</sup> Слично овим резултатима, а посматрајући утицај паладијума на активност значајних антиоксидативних ензима, дошло се до сазнања да извесни органски комплекси паладијума имају антиоксидативно и кардиопротективно дејство.<sup>57,58</sup> У једној студији, након примене паладијум α-липоинске киселине (Pd-LA), која постоји у облику лека под називом „DNA Reductase“ и суплемента исхране „POLY-MVA“,<sup>214</sup> дошло је до повећања активности ензима у митохондријама срца остарелих албино пацова.<sup>57</sup> Ензими Кребсовог циклуса: изоцитрат дехидрогеназа (ICDH), α-кетоглутарат дехидрогеназа (α-KGDH), сукцинат дехидрогеназа (SDH) и малат дехидрогеназа (MDH), као и комплекси I, II, III и IV митохондријалних респираторних ензима показали су значајно повећање активности након примене 0,38 mg паладијум α-липоинске киселине/kg т.т. животиње једном дневно, у току 30 дана.<sup>57</sup> У сличној студији, након администрације „POLY-MVA“ остарелим пацовима, вредности каталазе (CAT) и глутатион пероксидазе (GPx) митохондрија срца биле су значајно повећане у односу на контролну групу, док нису забележене значајне измене у активности супероксид дизмутазе (Mn-SOD).<sup>58</sup> Како су у дијабетесу вредности ових ензима снижене, администрацијом паладијум α-липоинске киселине, активности ензима SOD, CAT и GPx забележиле су раст.<sup>131</sup> Такође, конзумирањем овог комплекса вредности редукованог глутатиона (GSH) показале су пораст, а индекс липидне пероксидације пад вредности.<sup>58,131</sup> Антиоксидативни статус у јетри, бубрегу и мозгу након примене овог комплекса показао је сличне резултате као у срцу.<sup>215</sup> ДНК обнова примећена је одмах након примене овог комплекса у хуманим леукоцитима крви, који су били претходно изложени радијацији.<sup>216</sup>

Механизам антиоксидативног дејства паладијум α-липоинске киселине није још увек разјашњен. Како је α-липоинска киселина биолошки антиоксидант,<sup>59</sup> извесно

антиоксидативно дејство је очекивано. Међутим, показано је да је „POLY-MVA“ пет пута потентнији антиоксидант него сама  $\alpha$ -липоинска киселина.<sup>57</sup> Такође, претходне студије су показале да се „POLY-MVA“ без комплекса паладијум  $\alpha$ -липоинске киселине не разликује много од раствора соли.<sup>214</sup> Супериорност овог комплекса у односу на саму  $\alpha$ -липоинску киселину могла би се објаснити на неколико начина. Концентрација  $\alpha$ -липоинске киселине у плазми након оралног коришћења је мала. Повећање концентрације комплекса у плазми, могао би бити један од механизма дејства Pd. Затим, паладијум(II) је диамангнетик. У оваквом случају промена спина електрона може утицати на ензимске процесе, па самим тим и активност ензима. Такође, значајно је и да овај комплекс може формирати велике структуре самовезивањем једног комплекса за други. Оне изазивају специфичну екстензију мембране митохондрија обезбеђујући њихову много већу површину, и делују као катализатор процеса трансфера електрона, повећавајући активност ензима и комплекса митохондрија.<sup>217</sup> Сматра се да су јединствена електронска и редокс својства паладијум  $\alpha$ -липоинске киселине кључне за њено физиолошко дејство.<sup>218</sup> Наиме, Pd-LA у примењиваним производима егзистира као тример паладијум- $\alpha$ -липоинска киселина-тиамин<sup>219</sup> који му обезбеђује структуру течног кристала и на тај начин омогућава да складишти велику количину енергије и понаша се као полупроводник.<sup>146</sup> Сматра се да Pd-LA осцилује између редуковане и оксидисане форме прихватајући или давајући неспарене електроне ензимима. У канцерским ћелијама Pd-LA изазива оксидацију масних киселина мембране, стварајући низ редукованих елемената и штитећи на тај начин ДНК од оксидације.<sup>11</sup> Са друге стране, није показано мутагено дејство паладијум  $\alpha$ -липоинске киселине Ames-овим тестом,<sup>220</sup> а токсиколошке студије су показале да Pd-LA није цитотоксична и да LD<sub>50</sub> прелази 5000 mg/kg.<sup>58</sup>

Наведене студије показале су да би се паладијум у виду одговарајућих комплекса једињења (Pd-LA) могао користити у превенцији старења миокарда,<sup>59</sup> и представљати потентни неуроагент за жртве пролазних исхемичних атака, срчаног удара, тешких саобраћајних несрећа и утапања.<sup>214</sup> Примена комплекса паладијума у превенцији старења миокарда имала би значаја како за кардиолошке болеснике и жртве срчаног инфаркта, тако и за здраве особе, које би на овај начин могле да продуже свој животни век.

На основу претходно наведеног, стиче се утисак да постоје опречни резултати и мишљења о утицају паладијума на оксидативне процесе у ћелији, и да зависе пре свега од примењених једињења и комплекса. Неорганска једињења паладијума у већини случајева узрокују оксидативно оштећење срца као последица комбинованог дејства: митохондријалне дисфункције, повећане продукције слободних радикала, инактивације природне антиоксидативне одбране, везивања за тиол групе и инактивације значајних протеинских ензима, инактивације глутатиона, каталазе и SOD, и повећане липидне пероксидације у органима. Међутим, како у нашој студији није забележено повећање реактивних кисеоничних радикала, а активност значајних антиоксидативних ензима није мерена, не може се са сигурношћу говорити о ROS посредованом кардиотоксичном дејству паладијума на изоловано срце пацова. Шта више, снижене вредности индекса липидне пероксидације након убризгавања органског комплекса Pd указују на његово антиоксидативно дејство. Ови резултати у складу су са већ описаним резултатима антиоксидативног дејства Pd-LA. Самим тим, значај оксидативног оштећења срца узрокованог Pd у нашој студији није велики, и забележено смањење контрактилности и фреквенце срца вероватно је последица већ описаних промена мембранског потенцијала кардиомиоцита и поремећаја рада значајних јонских пумпи мембране срчаних ћелија, или/и цитотоксичног дејства паладијума које није ROS посредовано.

### **5.3. ЦИТОТОКСИЧНО ДЕЈСТВО ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА НА КАРДИОМИОЦИТЕ**

Резултати активности ензима, маркера некрозе миокарда, у овој студији указују на извесно цитотоксично дејство паладијума. Смањење ензимске активности у коронарном венском ефлуенту запажено је након примене оба Pd(II) једињења. Наиме, PdCl<sub>2</sub> довео је до смањене активности лактат дехидрогеназе (LDH), док је Pd комплекс изазвао смањење LDH, креатин киназе (СК) и њеног изоензима MB (СК-MB). Остала једињења остварила су значајнији ефекат једино на LDH. Занимљиво је да, разматрајући ефекте примењених једињења на LDH, готово није било разлике у ефекатима PdCl<sub>2</sub> и Pd комплекса на овај ензим. Са друге стране, ТЕА и ТЕАА су остварили значајније снижење активности овог

ензима, у односу на Pd(II) једињења. То указује на њихово цитотоксично дејство, а како су ова једињења коришћена за формирање Pd комплекса, могуће је да она појачавају већ постојеће инхибиторно дејство паладијума на ензиме. Како је Pd комплекс изазвао потпуну инхибицију СК и СК-МВ већ при концентрацији од  $2,1 \times 10^{-6}$  МЛ (трећа примењена концентрација), може се закључити да Pd комплекс има нешто израженији кардиотоксични ефекат у односу на PdCl<sub>2</sub>. Овакви резултати на супрот су тези о мањој кардиотоксичности органских једињења паладијума у односу на неорганска.

Дејство комплекса паладијума проучавано је последње две деценије због њиховог потенцијалног антитуморског ефекта и чешће апликације у хемотерапији. Њихова интеракција са ДНК углавном је одговорна за антитуморско дејство, али интеракција са тиол групама протеина је описана као основа њихове токсичности у организму. Постоји велики број *in vitro* студија на људским, мишјим и ћелијама пацова које описују цитотоксично дејство паладијум(II) хлорида,<sup>221-228</sup> паладијум(II) сулфата,<sup>229</sup> и неколико неорганских и органских комплекса паладијума.<sup>174,220,230,231</sup> Све оне упућују на способност инхибиције значајних ћелијских функција јонима паладијума: инхибиција ДНК<sup>221-224</sup> и РНК синтезе у ћелији,<sup>174</sup> инхибиција синтезе протеина и смањење митохондријалне активности,<sup>221,225-227</sup> некроза фибробласта,<sup>224</sup> оштећење мембранског интегритета,<sup>226</sup> инхибиција хемотаксе макрофага,<sup>230</sup> инхибиција респираторне и АТФ-азне активности ћелије<sup>231</sup> и промене у синтези колагена.<sup>228</sup> Једињења паладијума интерагују са еукариотском<sup>232,233</sup> и плазмид ДНК *Escherichia coli*.<sup>234-236</sup> Сматра се да је инхибиција ДНК синтезе и транскрипције РНК изазвана дејством на структуру ДНК и на ензиме који учествују у овим процесима.<sup>174</sup> При том, паладијум олакшава и ROS посредовано оштећење ДНК.<sup>237</sup> Са друге стране, мутагени ефекат самих једињења и комплекса паладијума није доказан у бактеријским и ћелијама сисара.<sup>220,238-240</sup> У поређењу са једињењима платине, најзначајнијим металом из платинасте групе елемената, чија је главна мета дејства у ћелији ДНК, изгледа да једињења паладијума превасходно показују дејство на ензиме и лизозом.<sup>241</sup>

Многобројне студије су показале да Pd<sup>2+</sup> једињења, пре свега PdCl<sub>2</sub>, показују инхибиторно дејство на различите ензиме у организму. При том, претходне студије су показале да паладијум у јонском облику може инхибисати значајне интрацелуларне

ензиме, док његова метална форма не показује значајно цитотоксично дејство.<sup>220,242,243</sup> Најизраженији инхибиторни ефекат је на креатин киназу (СК), ензим значајан за енергетски метаболизам.<sup>140,141</sup> Показано је да у концентрацијама једнаким оним коришћеним у нашој студији паладијум(II) хлорид блокира ДНК синтезу *in vivo* код зечева, инхибирајући активност креатин киназе.<sup>140</sup> Механизам инхибиције овог ензима могао би бити замена  $\text{Fe}^{2+}$  јоном  $\text{Pd}^{2+}$  и стварање чврстог комплекса једињења.<sup>229</sup> Такође, сматра се да овај катјон ствара чврст комплекс са  $-\text{SH}$  групама креатин киназе,<sup>140</sup> и да на тај начин доводи до инактивације ензима. Овај ензим одговоран је за конверзију креатина у фосфокреатин, значајно високоенергетско једињење, које служи као резервоар за пренос интрацелуларне енергије и брзу регенерацију АТФ-а. Запажено је да инхибиција овог ензима смањује количину слободне енергије у кардиомиоцитима, што смањује активност  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азе саркоплазматског ретикулума и самим тим лимитира капацитет везивања  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>244</sup> Са друге стране, промене у синтези и активности миозин АТФ-азе одређују брзину интеракције актина и миозина. Како је за оптималну интеракцију актин-миозин неопходна адекватна функционална повезаност циклуса миозин АТФ-азе и циклуса СК,<sup>245-248</sup> инхибицијом активности СК дошло би до поремећаја и ове интеракције. Све ово за последицу има смањење контрактилности срца. Овим цитотоксичним дејством јона паладијума може се објаснити његово депресивно дејство на изоловано срце у нашој студији.

Постојећи подаци указују и на  $\text{PdCl}_2$  посредовану инхибицију многих других интраћелијских ензима: глутамин оксалацетат трансминазе (GOT) и лактат дехидрогеназе (LDH),<sup>242</sup> алкалне фосфатазе,<sup>141,175</sup> карбон анхидразе, сукцинат дехидрогеназе, пролил хидроксилазе и алдолазе,<sup>141</sup> рибонуклеазе.<sup>249</sup>  $\text{PdSO}_4$  инхибира пролил хидроксилазу,<sup>229</sup>  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  инхибира аминопирин деметилазу,<sup>43</sup> а  $\text{K}_2\text{PdCl}_6$  рибонуклеазу.<sup>249</sup>

LDH је есенцијалан за анаеробну гликолизу и рад срчаног мишићног ткива у условима недовољног снабдевања кисеоником. Овај ензим врши интерконверзију пирувата и лактата уз истовремену интерконверзију  $\text{NADH}$  и  $\text{NAD}^+$ . LDH има 5 изоензима, од којих је LDH-1 или  $\text{H}_4$  форма изоензима заступљена у срчаном ткиву.<sup>250</sup> Повећање вредности LDH коришћено је много година за мерење нивоа оштећења мембранског интегритета, указујући на лизу ћелија.<sup>251</sup> Показано је да  $\text{Pd}^{2+}$  може изазвати појачано



ослобађање LDH из хуманих и мишијих макрофага *in vitro*.<sup>225</sup> У нашој студији на изолованом срцу пацова Pd<sup>2+</sup> је узазвао инхибицију активности LDH. Сматра се да LDH инхибиција може изазвати биоенергетски и оксидативни стрес у ћелији водећи ка ћелијској смрти.<sup>252</sup> Овакво цитотоксично дејство паладијума могло би да буде још један од узрока његовог депресивног дејства на срце.

Занимљиво је да недавно спроведене студије на животињама и биљкама указују на изненађујуће високу акумулацију и биорасположивост паладијума након експозиције.<sup>253,254</sup> При том је биорасположивост Pd одмах иза Zn и Cu, и далеко испред Pt. Са друге стране, испитивањем ћелијске вијабилности дошло се до резултата да је LC<sub>50</sub> за Pd<sup>2+</sup> (PdSO<sub>4</sub>) био 0,4 mmol/l,<sup>193</sup> одмах иза Cd<sup>2+</sup> и Cr<sup>6+</sup>, и поклапа се са резултатима које је дала СЗО за паладијум.<sup>255</sup> Најновија истраживања су показала да паладијум(II) комплекси показују цитотоксично дејство, изазивајући апоптозу и некрозу, инхибирајући ћелијску пролиферацију,<sup>256</sup> активирајући инфламацију<sup>226,257,258</sup> и тромбозу<sup>259</sup> и изазивајући дисфункцију имуног одговора.<sup>213,260,261</sup> Резултати су показали да Pd(II) може изазвати оштећење цитоскелетних компоненти ћелије, микротубула и актинских микрофиламената, што игра значајну улогу у настанку апоптотичне и некротичне смрти ћелије.<sup>262</sup> Цитотоксичност метала може се разматрати и кроз способност мењања NFκB сигнализације. NFκB је транскрипциони фактор који има способност везивања за ДНК и модулирања процеса транскрипције гена одговорних за продукцију многих инфламаторних цитокина, укључујући IL-1β и TNFα.<sup>213</sup> Претходна истраживања показала су да Pd(II) може изазвати повећање активности NFκB.<sup>263,264</sup> Самим тим, паладијум може изменити функцију моноцита *in vitro*,<sup>226,257,258</sup> повећавајући секрецију IL1β и TNFα при нижим концентрацијама и снижавајући њихов ниво при вишим концентрацијама.<sup>265-267</sup> Показано је да паладијум утиче на процес тромбозе, генерисањем тромбин/антитромбин комплекса и изазивајући деплецију тромбоцита.<sup>259</sup> Такође, показано је да калијум паладијум (IV) хексахлорат (K<sub>2</sub>PdCl<sub>6</sub>) има значајано имуномодулационо дејство, повећавајући продукцију IL-2<sup>260,261</sup> и INFγ.<sup>260</sup> На тај начин K<sub>2</sub>PdCl<sub>6</sub> појачава Th2 одговор и мења Th1/Th2 равнотежу цитокина.<sup>261</sup>

Са друге стране, занимљиво би било испитати утицај Pd на ниво експресије гена значајних контрактилних протеина срчаног мишића: тропонина, миозина и актина. До

данас такве студије нису спроведене, или не постоје доступни подаци о њима. Једини постојећи подаци односе се на дејство радиоактивног  $\text{Pd}^{103}$  на ниво експресије актина глатког мишића крвног суда и дуктуса. Показано је да након уградње  $\text{Pd}^{103}$  радиоактивних стентова у билијарни канал пса долази до инхибиторног дејства на експресију актина глатких мишића (SMA).<sup>268</sup> Значај ове инхибиције огледа се у превенирању настанка билијарних контрактура, јер смањењем његове експресије у процесу зарашћења инхибира се и настанак ожиљних контрактура и стеноза. Слични резултати постигнути су и након уградње  $\text{Pd}^{103}$  стента у коронарну артерију свиње.<sup>269</sup> Инхибиција експресије контрактилних протеина срца могла би имати значај пре свега у хроничном тровању паладијумом. Није искључена ни могућност акумулације паладијума у срцу и другим органима, и њихово последично оштећење, слично дејству неких других тешких метала.<sup>270</sup>

На основу претходно наведеног, може се закључити да паладијум не испољава значајно цитотоксично дејство на срчане ћелије. Иако су забележене извесне статистички значајне промене у активности ензима у нашој студији, апсолутни нивои испитиваних ензима су испод граница које означавају оштећење ћелија. Спроведеним истраживањем није се могло поуздано утврдити да ли паладијум(II) једињења испољавају цитотоксични или заштитан ефекат у срчаним ћелијама.

Приказани резултати у овој студији, као и досадашњи доступни резултати истраживања контраверзни су по питању мање токсичности органских једињења паладијума у односу на неорганска. Значај мање токсичности органских једињења огледа се пре свега у лечењу пацијената отрованих паладијумом. Кардиотоксични ефекти изазвани паладијумом обсервирани у нашој студији требало би да инспиришу даља истраживања о токсичности паладијума на људску популацију.

## 6. Закључци

---

1. Паладијум(II) хлорид ( $\text{PdCl}_2$ ) изазива смањење контрактилности срца које се манифестује падом вредности дијастолног и средњег притиска у левој комори, и смањењем фреквенце срца.

2. Остала примењена једињења не показују значајне промене у контрактилности и њихово инхибиторно дејство односи се само на фреквенцу срца и коронарни проток. Како ТЕА и његов  $\text{Pd(II)}$  комплекс смањују фреквенцу срца у мањој мери у односу на  $\text{PdCl}_2$ , изгледа да паладијум када је у органском облику не показује значајну кардиотоксичност.

3. Не постоји сигнификантно про- или антиоксидативно дејство једињења паладијума у кардиомиоцитима, осим смањења индекса липидне пероксидације дејством  $\text{Pd}$  комплекса. Ова сазнања иду у прилог тези о мањој токсичности органских једињења паладијума у односу на неорганска.

4. Паладијум(II) једињења не показују значајно цитотоксично дејство на срчане ћелије.  $\text{PdCl}_2$  доводи до статистички значајне инхибиције активности лактат дехидрогеназе (LDH), док  $\text{Pd}$  комплекс изазива статистички значајну инхибицију LDH, креатин киназе (СК) и њеног изоензима MB (СК-MB), али су апсолутни нивои испитиваних ензима испод границе која означава оштећење ћелија.

5. Приказани резултати у овој студији, као и досадашњи доступни резултати истраживања контраверзни су по питању мање токсичности органских једињења паладијума у односу на неорганска. Значај мање токсичности органских једињења огледа се пре свега у лечењу пацијената отрованих паладијумом.

6. Кардиотоксични ефекти изазвани паладијумом обсервирани у нашој студији требало би да инспиришу даља истраживања о токсичности паладијума на људску популацију.

## 7. Литература

---

1. Renner H, Schmuckler G. Platinum-group metals. In: Merian E ed. Metals and their compounds in the environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1991: 1135–51.
2. Renner H. Platinum group metals and compounds. In: Elvers B, Hawkins S, Schulz G. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 5th ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1992: 75–131.
3. Coutu RA, Kladitis PE, Cortez R, Strawser RE, Crane RL. Micro-switches with sputtered Au, AuPd, Au-on-AuPt, and AuPtCu alloy electric contacts. *IEEE Trans Compon Packag Technol* 2006; 29: 341-9. doi: 10.1109/TCAPT.2006.875898
4. Shinchi A, Imada Y, Honda F, Nakajima K. Electric contact surface of Pd-plated metal in organic gas air atmospheres. *Wear* 1999; 230: 78-85. doi: 10.1016/S0043-1648(98)00170-7
5. Sikorova L, Licbinsky R, Adamec V. Platinum Group Elements from Automobile Catalysts in the Environment. *Chem Listy* 2011; 105: 361-6.
6. Budavari S, O'Neil MJO, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF. The Merckindex, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 12th ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co, 1996: 1201.
7. Kroschwitz JJ. Platinum-group metals. In: Kirk-Othmer—Encyclopedia of chemical technology. New York: John Wiley & Sons, 1996: 347–406.
8. Muraguchi K, Minami H, Minesaki Y, Suzuki S, Tanaka T. A study of self-adhesive resin cements for bonding to silver-palladium-copper-gold alloy - effect of including primer components in cement base. *Dent Mater J* 2011; 30: 199-205.
9. Wataha JC, Shor K. Palladium alloys for biomedical devices. *Expert Rev Med Devices* 2010; 7: 489-501.
10. Hsu CT, Hsiao HC, Fang MY, Zen JM. Superior long-term stability of a glucose biosensor based on inserted barrel plating gold electrodes. *Biosens Bioelectron* 2009; 25: 383-7.
11. Garnett, M. Developmental electronic circuits in cancer: research and treatments. *Garnett McKeen Med Sci* 2002; 1: 1 –11.

12. MeekSF, Harrold GC, McCord CP. The physiologic properties of palladium. *Ind Med* 1943; 12: 447–8.
13. Kauffmann M. A new degreasing agent: colloid palladium hydroxydul (“Leptynol”) *Münch Med Wochenschr* 1913; 60: 525–7.
14. Zelefsky MJ, Chou JF, Pei X, et al. Predicting biochemical tumor control after brachytherapy for clinically localized prostate cancer: The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Brachytherapy* 2011; doi:10.1016/j.brachy.2011.08.003.
15. Newman H, Chin KJ, Finger PT. Subfoveal choroidal melanoma: pretreatment characteristics and response to plaque radiation therapy. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 892-8.
16. Finger PT, Chin KJ, Yu GP, Patel NS. Risk factors for cataract after palladium-103 ophthalmic plaque radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 80: 800-6.
17. Petousis V, Finger PT, Milman T. Multifocal iris melanoma treated with total anterior segment palladium-103 plaque radiation therapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 937-40.
18. Sharkey J, Chovnick SD, Behar RJ, et al. Outpatient ultrasound-guided palladium 103, brachytherapy for localized adenocarcinoma of the prostate: a preliminary report of 434 patients. *Urology* 1998; 51: 796–803.
19. Finger PT, Berson A, Szechter A. Palladium-103 plaque radiotherapy for choroidal melanoma. *Ophthalmology* 1999; 106: 606–13.
20. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, et al. Cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1425-34.
21. Fiuza SM, Holy J, Batista de Carvalho LA, Marques MP. Biologic activity of a dinuclear Pd (II)-spermine complex toward human breast cancer. *Chem Biol Drug Des* 2011; 77: 477-88.
22. Baltas D, Lympelopoulou G, Löffler E, Mavroidis P. A radiobiological investigation on dose and dose rate for permanent implant brachytherapy of breast using 125I or 103Pd sources. *Med Phys* 2010; 37: 2572-86.

23. Tummala R, Diegelman P, Fiuza SM. Characterization of Pt-, Pd-spermine complexes for their effect on polyamine pathway and cisplatin resistance in A2780 ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep* 2010; 24: 15-24.
24. Tomilets VA, Dontsov VI, Zakharova IA, Klevtsov AV. Histamine releasing and histamine binding action of platinum and palladium compounds. *Arch Immunol Ther Exp* 1980; 28: 953-7.
25. Graham RD, Williams DR. The synthesis and screening for anti-bacterial, -cancer, -fungicidal and -viral activities of some complexes of palladium and nickel. *J Inorg Nucl Chem* 1979; 41: 1245-9.
26. Tayim HA, Malakian AH, Bikhazi AB. Synthesis and physicochemical, antimetastatic, and antiviral properties of a novel palladium (II) coordination compound. *J Pharm Sci* 1974; 63: 1469-71.
27. Khan BT, Bhatt J, Najmuddin K, Shamsuddin S, Annapoorna K. Synthesis, antimicrobial, and antitumor activity of a series of palladium (II) mixed ligand complexes. *J Inorg Biochem* 1991; 44: 55-63.
28. Hueso-Urena F, Moreno-Carretero MN, Salas-Peregrín JM, Alvarez de Cienfuegos-López G. Palladium, platinum, cadmium, and mercury complexes with neutral isoorotic and 2-thioisoorotic acids: IR and NMR spectroscopies, thermal behavior and biological properties. *J Inorg Biochem* 1991; 43: 17-27.
29. White J, Munns DJ. Inhibitory effect of common elements towards yeast growth. *J Inst Brew* 1951; 57: 175-9.
30. Somers E. Plant pathology. Fungitoxicity of metal ions. *Nature* 1959; 184: 475-6.
31. Johnson DE, Tillery JB, Prevost RJ. Levels of platinum, palladium, and lead in populations of southern California. *Environ Health Perspect* 1975; 12: 27-33.
32. Dauderer M. Toxicological information on single compounds, palladium III-3. In: Dauderer M ed. *Handbuch der Umweltgifte: Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis*, 7th ed. Landsberg: Ecomed, 1993: 1-67.
33. Dauderer M. Toxicological information on single compounds, metals III-3. In: Dauderer M ed. *Handbuch der Umweltgifte: Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis*, 14th ed. Landsberg: Ecomed, 1994: 1-41.

34. Moore WJr, Hysell D, Crocker W, Stara J. Biological fate of  $^{103}\text{Pd}$  in rats following different routes of exposure. *Environ Res* 1974; 8: 234–40.
35. Moore WJr, Hysell D, Hall L, Campbell K, Stara J. Preliminary studies on the toxicity and metabolism of palladium and platinum. *Environ Health Perspect* 1975; 10: 63–71.
36. Ando A, Ando I. Biodistributions of radioactive bipoisitive metal ions in tumor-bearing animals. *BioMetals* 1994; 7: 185–92.
37. Fawwaz RA, Hemphill W, Winchell HS. Potential use of  $^{109}\text{Pd}$ –porphyrin complexes for selective lymphatic ablation. *J Nucl Med* 1971; 12: 231–6.
38. Phielepeit T, Legrum W, Netter KJ, Klötzer WT. Different effects of intraperitoneally and orally administered palladium chloride on the hepatic monooxygenase system of male mice. *Arch Toxicol* 1989; 13: 357–62.
39. Holbrook DJr, Washington ME, Leake HB, Brubaker PE. Studies on the evaluation of the toxicity of various salts of lead, manganese, platinum, and palladium. *Environ Health Perspect* 1975; 10: 95–101.
40. Orestano G. The pharmacologic action of palladium chloride. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1933; 8: 1154–6.
41. Roshchin AV, Veselov VG, Panova AI. Industrial toxicology of metals of the platinum group. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1984; 28: 17–24.
42. Bikhazi AB, Salameh A, el-Kasti MM, Awar RA. Comparative nephrotoxic effects of cis-platinum (II), cis-palladium (II), and cis-rhodium (III) metal coordination compounds in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995; 111: 423–7.
43. Holbrook DJr, Washington ME, Leake HB, Brubaker PE. Effects of platinum and palladium salts on parameters of drug metabolism in rat liver. *J Toxicol Environ Health* 1976; 1: 1067–79.
44. Wiester MJ. Cardiovascular actions of palladium compounds in the unanesthetized rat. *Environ Health Perspect* 1975; 12: 41–4.
45. Kamboj VP, Kar AB. Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. *J Reprod Fertil* 1964; 7: 21–8.
46. Ridgway LP, Karnofsky DA. The effects of metals on the chick embryo: Toxicity and production of abnormalities in development. *Ann N Y Acad Sci* 1952; 55: 203–15.



47. Campbell KI, George EL, Hall LL, Stara JF. Dermal irritancy of metal compounds. *Arch Environ Health* 1975; 30: 168–70.
48. Kolpakov FI, Kolpakova AF, Prochorenkov VI. Toxic and sensitizing properties of palladium hydrochloride. *Gig Tr Prof Zabol* 1980; 4: 52–4.
49. Hysell D, Neiheisel S, Cmehil D. Ocular irritation of two palladium and two platinum compounds in rabbits. In: *Studies on catalytic components and exhaust emissions*. Cincinnati, Ohio, US Environmental Protection Agency, Environmental Toxicological Research Laboratory, National Environmental Research Center, 1977.
50. Schroeder HA, Mitchener M. Scandium, chromium (VI), gallium, yttrium, rhodium, palladium, indium in mice: Effects on growth and life span. *J Nutr* 1971; 101: 1431–8.
51. Fujita S. Experimental studies on carcinogenicity of physical stimuli. *Shika Igaku* 1971; 34: 918–32.
52. Durosaro O, el-Azhary RA. A 10-year retrospective study on palladium sensitivity. *Dermatitis* 2009; 20: 208-13.
53. Faurschou A, Menne T, Johansen JD, Thyssen JP. Metal allergen of the 21st century--a review on exposure, epidemiology and clinical manifestations of palladium allergy. *Contact Dermatitis* 2011; 64: 185-95. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2011.01878.x.
54. Thyssen JP, Menné T. Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 309-18.
55. Kielhorn J, Melber C, Keller D, Mangelsdorf I. Palladium--a review of exposure and effects to human health. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 417-32.
56. Wataha JC, Hanks CT. Biological effects of palladium and risk of using palladium in dental casting alloys. *J Oral Rehabil* 1996; 23: 309-20.
57. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Palladium a-lipoic acid complex formulation enhances activities of Krebs cycle dehydrogenases and respiratory complexes I–IV in the heart of aged rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2124-8.
58. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Effect of POLY-MVA, a palladium a-lipoic acid complex formulation against declined mitochondrial antioxidant status in the myocardium of aged rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1858-62.
59. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 227–50.

60. Mirsky I, Parmley WW. Assessment of passive elastic stiffness for isolated heart muscle and the intact heart. *Circ Res* 1973; 33: 233– 43.
61. Sonnenblick EH. Instantaneous force velocity length determinants in the contraction of heart muscle. *Circ Res* 1965; 16: 441–51.
62. Weber KT, Janicki JS. Instantaneous force-velocity-length relations in isolated dog heart. *Am J Physiol* 1977; 232: 241–9.
63. Braunwald E, Ross J JR, Sonnenblick EH. Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. *New Eng J Med* 1967; 277: 794-1012.
64. Solaro RJ. Regulation of Cardiac Contractility. In: Solaro RJ. Control of cardiac contractility is critical to the matching of cardiac output to venous return during exercise with little change in end diastolic volume and with tuning of the dynamics of contraction and relaxation to heart rate, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
65. Klabunde RE. Cardiovascular Physiology Concepts, 2nd ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
66. Endoh M. Cardiac  $\alpha$ -adrenoceptors that regulate contractile function: Subtypes and subcellular transduction mechanisms. *Neurochem Res* 1996; 21: 217 – 29.
67. Endoh M. Cardiac action of angiotensin II. In: Heart physiology and pathophysiology, 4th ed. London: Academic Press; 2001: 609 – 31.
68. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MAH, Maruya J, Norota I. Endothelin: Receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci* 1998; 62: 1485– 9.
69. Endoh M. Muscarinic regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian atrial and ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 177-96.
70. Nichols CG, Hanck DA, Jewell BR. The Anrep effect: an intrinsic myocardial mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66: 924-9.
71. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 73-86.
72. Noguchi H, Muraoka R, Kigoshi S, Muramatsu I. Change in the contractility of rat atrial muscle by cold preservation. *Jpn Circ J* 1994; 58: 278-84.
73. Gault JH, Ross J Jr, Braunwald E. Contractile state of the left ventricle in man. *Circ Res* 1968; 22: 451-63.

74. Mirsky I, Pasternac A, Ellison RC. General index for the assessment of cardiac function. *Am J Cardiol* 1972; 30: 483-91.
75. Mason DT. Usefulness and limitations of rate of rise of intraventricular pressure (dP/dt) in the evaluation of myocardial contractility in man. *Am J Cardiol* 1969; 23: 516-27.
76. Ross J Jr, Covell JW, Sonnenblick EH, Braunwald E. Contractile state of the heart characterized by force-velocity relations in variably afterloaded and isovolumic beats. *Circ Res* 1966; 43: 149-63.
77. Robotham JL, Takata M, Berman M, et al: Ejection fraction revisited. *Anesthesiology* 1991; 74: 172-83.
78. Schiller NB. Ejection fraction by echocardiography: The full monty or just a peep show? *Am Heart J* 2003; 146: 380-2.
79. Wiggers CJ. Studies on the cardiodynamic actions of drugs. II. The mechanism of cardiac stimulation by epinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1927; 30: 233-50.
80. Gleason WL, Braunwald E. Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J Clin Invest* 1962; 41: 80-6.
81. Mason DT, Braunwald E, Covell JW, Sonnenblick EH, Ross JJR. Assessment of Cardiac Contractility: the relation between the rate of pressure rise and ventricular pressure during isovolumic systole. *Circulation* 1971; 44: 47-58.
82. Little WC. The left ventricular dP/dtmax–end-diastolic volume relation in closed-chest dogs. *Circ Res* 1987; 56: 808-15.
83. Grossman W, Haynes F, Paraskos JA, Saltz S, Dalen JE, Dexter L. Alterations in preload and myocardial mechanics in the dog and in man. *Circ Res* 1972; 31: 83-94.
84. Gillebert TC, Leite-Moreira AF, De Hert SG. Relaxation-systolic pressure relation: A load-independent assessment of left ventricular contractility. *Circulation* 1997; 95:745-52.
85. De Hert SG, Gillebert TC, Ten Broecke PW, et al. Contractionrelaxation coupling and impaired left ventricular performance in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 1999; 90: 748-57.
86. Gillebert TC, Leite-Moreira AF, De Hert SG. Load-dependent distolic dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev* 2000; 5: 345-55.

87. Endoh M. Cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> sensitizers. *Circ J* 2008; 72: 1915-25.
88. Yan X, Gao S, Tang M, et al. Adenylyl cyclase/cAMP-PKA-mediated phosphorylation of basal L-type Ca(2+) channels in mouse embryonic ventricular myocytes. *Cell Calcium* 2011; 50: 433-43.
89. Beca S, Helli PB, Simpson JA, et al. Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and cardiac contractility, independently of L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ Res* 2011; 109: 1024-30.
90. Tang T, Hammond HK, Firth A, et al. Adenylyl cyclase 6 improves calcium uptake and left ventricular function in aged hearts. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1846-55.
91. Leroy J, Richter W, Mika D, et al. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2651-61.
92. Gregg CJ, Stepan J, Gonzalez DR, et al.  $\beta$ 2-adrenergic receptor-coupled phosphoinositide 3-kinase constrains cAMP-dependent increases in cardiac inotropy through phosphodiesterase 4 activation. *Anesth Analg* 2010; 111: 870-7.
93. Layland J, Solaro RJ, Shah AM. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 12-21.
94. Cerra MC, Imbrogno S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol* 2011; doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02389.x.
95. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 566-77.
96. Wang J, Gao E, Rabinowitz J, et al. Regulation of in vivo cardiac contractility by phospholemman: role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: H859-68.
97. Cheung JY, Zhang XQ, Song J, et al. Phospholemman: a novel cardiac stress protein. *Clin Transl Sci* 2010; 3: 189-96.
98. Depre C, Ponchaut S, Deprez J, Maisin L, Hue L. Cyclic AMP suppresses the inhibition of glycolysis by alternative oxidizable substrates in the heart. *J Clin Invest* 1998; 101: 390-7.
99. Metsä-Ketelä T, Laustiola K, Vapaatalo H. Regulation of cardiac contractility and glycolysis by cyclic nucleotides during hypoxia. *Adv Myocardiol* 1983; 4: 319-25.

100. Minami H, Wolska BM, Stojanovic MO, Solaro RJ. Reversal of effects of acidosis on contraction of rat heart myocytes by CGP-48506. *Front Biosci* 2008; 13: 5638-45.
101. Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: C967–81.
102. Blanchard EM, Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res* 1984; 55: 382–91.
103. Kentish JC. Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch* 1991; 419: 310-8.
104. Cheng Y, Li W, McElfresh TA, et al. Changes in myofilament proteins, but not Ca<sup>2+</sup> regulation, are associated with a high-fat diet-induced improvement in contractile function in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H1438-46.
105. Yazaki Y, Raben M. Effect of the thyroid state on the enzymatic characteristics of cardiac myosin. A difference in behavior of rat and rabbit cardiac myosin. *Circ Res* 1975; 36: 208-15.
106. Litten RZ, Martin BJ, Low RB, Alpert NR. Altered myosin isoenzyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. *Circ Res* 1982; 50: 856-64.
107. Pagani ED, Solaro RJ. Swimming exercise, thyroid state, and the distribution of myosin isoenzymes in the heart. *Am J Physiol* 1983; 245: H713-20.
108. Pope B, Hoh JFY, Weeds A. The ATPase activity of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Letters* 1980; 118: 205-8.
109. Rovetto MJ, Hjalmarson A, Morgan HE, Barrett MJ, Goldstein RA. Hormonal control of cardiac myosin adenosine triphosphate in the rat. *Circ Res* 1972; 31: 397-409.
110. Buttrick P, Malhotra A, Factor S, Greenen D, Leinwand L, Scheuer J. Effect of aging and hypertension on myosin biochemistry and gene expression in the rat heart. *Circ Res* 1991; 68: 645-52.
111. Lompre AM, Mercadier JJ, Wisnewsky C, et al. Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Dev Biol* 1981; 84: 286-90.

112. Baldwin KM, Ernst SB, Herrick RE, Macintosh AM. Effects of physical training and thyroxine on rodent cardiac functional and biochemical properties. *Pflugers Arch* 1981; 391: 190-4.
113. Morkin E. Stimulation of cardiac myosin adenosine triphosphatase in thyrotoxicosis. *Circ Res* 1979; 44: 1-7.
114. Goodkin MJ, Dambach GE, Thyrum PT, Luchi RJ. Effect of thyroxine on ventricular myocardial contractility and ATPase activity in guinea pigs. *Am J Physiol* 1974; 226: 66-72.
115. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159– 63.
116. Chen H, Hu CJ, He YY, Yang DI, Xu J, Hsu CY. Reduction and restoration of mitochondrial DNA content after focal cerebral ischemia/ reperfusion. *Stroke* 2001; 32: 2382– 7.
117. Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44: S99– 109.
118. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; 429: 417– 23.
119. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-47.
120. Belch JJF, Chopra M, Hutchinson S, et al. Free radical pathology in chronic arterial disease. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 375-8.
121. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991; 65: 245–8.
122. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996; 148: 291– 300.
123. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 2414– 20.
124. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1536–9.

125. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: Relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 1998; 82: 482–95.
126. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 1999; 85: 147–53.
127. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98: 2572–9.
128. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201–10.
129. Theron AJ, Ramafi GJ, Feldman C, Grimmer H, Visser SS, Anderson R. Effects of platinum and palladium ions on the production and reactivity of neutrophil-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1408-17.
130. Valentini A, Conforti F, Crispini A, et al. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem* 2009; 52: 484-91.
131. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK, Krishnan CV. Palladium- $\alpha$ -lipoic acid complex attenuates alloxan-induced hyperglycemia and enhances the declined blood antioxidant status in diabetic rats. *J Diabetes* 2011; 3: 293-300.
132. Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. In: Döring C. *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology. Biological Measurement Techniques*. Berlin, Germany: Biomesstechnik-Verlag, 1988:1-129.
133. Petrović ZD, Marković S, Petrović VP, Simijonović D. Triethanolammonium acetate as multifunctional ionic liquid in palladium-catalyzed green Heck reaction. *J Mol Mod* DOI: 10.1007/s00894-011-1052-1.

134. Peric T, Jakovljevic VLJ, Zivkovic V, et al. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. *Med Chem* 2012; 8: 9-13.
135. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26: 131–8.
136. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–8.
137. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton (FL, USA): CRC Press, 1985: 177-80.
138. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161–70.
139. Melber C, Keller D, Mangelsdorf I. Palladium. *Environmental health criteria*; 226. World Health Organization, Geneva, 2002.
140. Liu TZ, Khayam-Bashi H, Bhatnagar RS. Inhibition of creatine kinase activity and alterations in electrophoretic mobility by palladium ions. *J Environ Pathol Toxicol* 1979; 2: 907–16.
141. Liu TZ, Lee SD, Bhatnagar RS. Toxicity of palladium. *Toxicol Lett* 1979; 4: 469–73.
142. Jones MM, Schoenheit JE, Weaver AD. Pretreatment and heavy metal LD50 values. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 49: 41–44.
143. Hamilton TK, Zug KA. Triethanolamine allergy inadvertently discovered from a fluorescent marking pen. *Am J Contact Dermat* 1996; 7: 164–5.
144. Stott WT, Radtke BJ, Linscombe VA, Mar MH, Zeisel SH. Evaluation of the potential of triethanolamine to alter hepatic choline levels in female B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 2004; 79: 242–7.
145. Garnett WA, Garnett M. Charge relay from molybdate oxyradicals to palladium– lipoic complex to DNA. *Conference on Oxygen Intermediates in Nonheme Metallobiochemistry*, June 1996. Abstract.
146. Vasic V, Momic T, Petkovic M, Krstic D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors* 2008; 8: 8321-60.



147. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh JD. Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 817–49.
148. Vasilets LA, Schwarz W. Structure–function relationships of cation binding in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 201–22.
149. Scheiner-Bobis G. The sodium pump, its molecular properties and mechanisms of ion transport. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2424–33.
150. Skou JC, Essman M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 249–61.
151. Xie Z, Askari A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2434–9.
152. Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003; 3: 157–68.
153. Mijatović T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007. 1776: 32–57.
154. Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, Kiss R. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 1403–17.
155. Krinulović K, Bugarčić Ž, Vrvic M, Krstić D, Vasić V. Prevention and recovery of ( $\mu$ 3-diethylentriamino)-chloro-palladium(II)-chloride induced inhibition of Na/K-ATPase by SH containing ligands – L-cysteine and glutathione. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 1292–9.
156. Krinulović KS, Vasić VM. Interaction of some Pd (II) complexes with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Inhibition, kinetics, prevention and recovery. *J Enz Inhib Med Chem* 2006; 21: 459–65.
157. WilsonCP, WebbSJ. Palladium(II)-gated ion channels. *Chem Comm* 2008; 34: 4007-9.
158. Vujsić Lj, Krstić D, Krinulović K, Vasić V. The influence of transition and heavy metal ions on ATP-ases activity in rat synaptic plasma membranes. *J Serb Chem Soc* 2004; 69: 541–7.
159. Carfagna MA, Ponsler GD, Muhoberac BB. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. *Chem Biol Interact* 1996; 100: 53–65.

160. Krstic D, Krinulovic K, Vasic V. Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Mg-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005; 2: 469–76.
161. Vasić V, Krinulović K, Krstić D, Momić T, Horvat A. ATPases as multi-response sensing system for various organic and inorganic analytes. *Monatsh Chem* 2004; 135: 605–14.
162. Vasić V, Jovanović D, Horvat A, Momić T, Nikezić G. Effect of Cd and Hg on the activity of Na,K-ATPase and Mg-ATPase adsorbed on polystyrene Microtiter Plates. *Anal Biochem* 2002; 300: 113–20.
163. Eastman A, Cisplatin. *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, the Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis*, B Lippert: VHCA, Wiley-VCH: Zurich, 1999: 111–134.
164. Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1053–73.
165. Gullo JJ, Litterst CL, Maguire PJ, Sikic BI, Hoth DF, Woolley PV. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; 5: 21–6.
166. Vasić V, Živanović M, Čakar M, Savić J, Nedeljković J, Bugarčić Ž. Influence of acidity on the reaction between [PdCl(dien)] and L-cysteine or GSH in the presence of sodium dodecyl sulfate micelles. *J Phys Org Chem* 2005; 18: 441–7.
167. Hansen O. Interaction of cardiac glycosides with (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced intropy. *Pharmacol Rev* 1984; 36: 143–63.
168. Marsh J, Lloyd BL, Taylor RR. The Influence of Heart Rate on Digoxin-induced Inhibition of Myocardial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Activity in the Dog, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 8: 283–6.
169. Almotrefi AA, Basco C, Moorji A, Dzimiri N. Class I antiarrhythmic drug effects on ouabain binding to quinea pig cardiac Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 866–70.
170. Kjeldsen K, Nørgaard A, Gheorghiadec M. Myocardial Na,K-ATPase: the molecular basis for the hemodynamic effect of digoxin therapy in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 710-3.

171. Tatyanyenko LV, Konovalova NP, Bogdanov GN, Dobrokhotova OV, Fedorov BS. Inhibition of active transport of calcium ions by Pt(IV) and palladium(II) metal complexes. Correlation between the process and the inhibition of growth of experimental metastases. *Biomed Khim* 2006; 52: 52-9.
172. Tatyanyenko LV, Konovalova NP, Zakharova IA, Moshkobskii YuSh. On the mechanism of platinum- and palladium-albumin complexes interaction with (Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>) dependent ATP-ase of sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles. *Inorg Chim Acta* 1981; 56:89-93.
173. Tatyanyenko LV, Lebedeva ON, Pivovarova TS. Interaction of platinum and palladium with thiol groups of Ca<sup>2+</sup> dependent ATP-ase from sarcoplasmic reticulum. *Vaprosy Med Khim* 1977; 23: 343-6.
174. Mital R, Shah GM, Srivastava TS, Bhattacharya RK. The effect of some new platinum (II) and palladium (II) coordination complexes on rat hepatic nuclear transcription *in vitro*. *Life Sci* 1992; 50: 781-90.
175. Liu TZ, Chou LY, Humphreys MH. Inhibition of intestinal alkaline phosphatase by palladium. *Toxicol Lett* 1979; 4: 433-438.
176. Mansuri-Torshizi H, Mital R, Srivastava TS, Parekh H, Chitnis MP. Synthesis, characterization, and cytotoxic studies of alpha-diimine/1,2-diamine platinum(II) and palladium(II) complexes of selenite and tellurite and binding of some of these complexes to DNA. *J Inorg Biochem* 1991; 44: 239-247.
177. Cox JL, Harison DSJr. Correlation of metal toxicity with *in vitro* calmodulin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 115: 106-11.
178. Coleman R, Silbermann M, Gershon D, Reznick AZ. Giant mitochondria in the myocardium of aging and endurance-trained mice. *Gerontol* 1987; 33: 34-9.
179. Beattie DS. Bioenergetics and Oxidative Metabolism. In: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Devlin TM. 5th edition, USA, New York: Wiley-Liss, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2002.
180. Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurons. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 167-85.
181. Tsutsui H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med* 2001; 40: 1177-82.

182. Liu TZ, Lin TF, Chiu DT, Tsai KJ, Stern A. Palladium or platinum exacerbates hydroxyl radical mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 155–61.
183. Shi X, Dalal NS. Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton mechanism. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 336–41.
184. Shishniashvili DM, Lystsov VN, Moshkovskii YU. Spectrophotometric studies of the interaction of palladium ion with DNA and its components. *Chem Abstr* 1972; 77: 149.
185. Sigel H, Massoud SS, Corfu NA. Comparison of the extent of macrochelate formation in complexes of divalent metal ions with guanosine (GMP20), inosine (IMP20), and adenosine 5'-monophosphate (AMP20). Crucial role of N-7 basicity in metal ion-nucleic base recognition. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 2958–71.
186. Herin TS, Teicher BA, Chan V, Collins LS, Kaufmann ME, Loh C. Effect of hyperthermia on the action of cis-diamminedichloroplatinum (II), rhodamine 123(2) [tetrachloroplatinum (II)], rhodamine 123, and potassium tetrachloroplatinate. *Cancer Res* 1988; 48: 2335–41.
187. Mong S, Huang CH, Prestayko AW, Crooke ST. Interaction of cis-diamminedichloroplatinum (II) with PM-2 DNA. *Cancer Res* 1980; 40: 3313–7.
188. Mong S, Huang CH, Prestayko AW, Crooke ST. Effects of second-generation platinum analogs on isolated PM-2 DNA and their cytotoxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1980; 40: 3318–24.
189. Liu TZ, Wang J, Chiu DT. Inhibition of superoxide dismutase and catalase activities by palladium and platinum ions. *J Biomed Lab Sci* 2001; 13: 43–8.
190. Valentini A, Conforti C, Crispini A, et al. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin of human prostate cancers cells. *J Med Chem* 2009; 52: 484-91.
191. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, et al. Regulation of JNK signalling by GSTp. *EMBO J* 1999; 18: 1321–34.
192. Kamath R, Jiang Z, Sun G, Yalowich JC, Baskaran R. Abl kinase regulates curcumin-induced cell death through activation of JNK. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 61–72.

193. Schmid M, Zimmermann S, Krug HF, Sures B. Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environ Int* 2007; 33: 385–90.
194. Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1475–83.
195. Valentini A, Gravina P, Bernardini S, Federici G. Role of glutathione S-transferase in the cellular antioxidant defence. In: *Enzymes and Cellular Fight against Oxidation*. Kerala, India: Transworld Research Network Ed, 2008.
196. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309–12.
197. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1976; 251: 5069–77.
198. Santana DP, Faria PA, Paredes-Gamero EJ, Caires ACF, Nantes IL, Rodrigues T. Palladacycles catalyse the oxidation of critical thiols of the mitochondrial membrane proteins and lead to mitochondrial permeabilization and cytochrome c release associated with apoptosis. *Biochem J* 2009; 417: 247–56.
199. Emami S, Ghourchian H, Divsalar A. Release of Cyt C from the model membrane due to conformational change induced by anticancer palladium complex. *Int J Biol Macromol* 2011;48: 243-8.
200. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2017-24.
201. Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ Res* 1998; 77: 149-59.
202. Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 203-16.
203. Thomas JJ, Bakhtiar R, Siuzdak G. Mass spectrometry in viral proteomics. *Acc Chem Res* 2000; 33: 179-87.
204. Beynon R, Bond JS. *Proteolytic Enzymes*. 2nd ed. New York, USA: Oxford University Press, 2001.

205. Yang G, Miao R, Li Y, et al. Synergic effect of two metal centers in catalytic hydrolysis of methionine-containing peptides promoted by dinuclear palladium(II) hexaazacyclooctadecane complex. *Dalton Trans* 2005; 9: 1613-9.
206. Bora RP, Barman A, Zhu X, Ozbil M, Prabhakar R. Which one among aspartyl protease, metallopeptidase, and artificial metallopeptidase is the most efficient catalyst in peptide hydrolysis? *J Phys Chem B* 2010; 114: 10860–75.
207. Milovic NM, Kostic NM. Palladium(II) and platinum(II) complexes as synthetic peptidases. *Met Ions Biol Syst* 2001; 38: 145–86.
208. Zhu L, Kostic NM. Toward artificial metallopeptidases: mechanisms by which platinum(II) and palladium(II) complexes promote selective, fast hydrolysis of unactivated amide bonds in peptides. *Inorg Chem* 1992; 31: 3994–4001.
209. Kaminskaia NV, Johnson TW, Kostic NM. Regioselective Hydrolysis of tryptophan – containing peptides promoted by palladium (II) complexes. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 8663-4.
210. Kaminskaia NV, Kostic NM. New selectivity in peptide hydrolysis by metal complexes. Palladium (II) complexes promote cleavage of peptides next to the tryptophan residue. *Inorg Chem* 2001; 40: 2368– 77.
211. Parac TN, Kostic NM. Effects of lincage isomerism and of acid-base equilibria on reactivity and catalytic turnover in hydrolytic cleavage of histydil peptides coordinated to palladium (II) identification on the active complex between palladium (II) and the histydil residue. *Am Chem Soc* 1996; 118; 5946– 51.
212. Parac TN, Kostic NM. New selectivity and turnover in peptide hydrolysis by metal coimplexes. A palladium (II) aqua complex catalyzes cleavage of peptides next to the histidyne residue. *J Am Chem Soc* 1996; 118: 51–8.
213. Barnes BJ, Karin M. Mechanisms of disease: nuclear factor- (kappa)B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066 – 721.
214. Antonawich FJ, Fiore SM, Welicky LM. Regulation of ischemic cell death by the lipoic acid–palladium complex, Poly MVA, in gerbils. *Exp Neurol* 2004; 189: 10-5.

215. Menon A, Krishnan CV, Nair CKK. Protection from gamma radiation insult to antioxidant defense and cellular DNA by POLY-MVA, a dietary supplement containing palladium lipoic acid formulation. *Int J Low Radiation* 2009; 6: 248-62.
216. Menon A, Nair CKK. POLY MVA – a dietary supplement containing  $\alpha$ -lipoic acid palladium complex, enhances cellular DNA repair. *Int J Low Radiation* 2011, 842- 54.
217. Krishnan CV, Garnett M, Antonawich F. Free Radicals in Neurodegenerative Diseases: Modulation by Palladium  $\alpha$ -Lipoic Acid Complex. In: Krishnan CV, Garnett M, Antonawich F. *Neurodegenerative Diseases- Book 1*. Garnett Mec Keen Laboratory 2011.
218. Krishnan CV, Garnett M. Liquid crystal behavior in solutions, electrode passivation, and impedance loci in four quadrants. In: Marcus P, Maurice V. *Passivation of metals and semiconductors, and properties of thin oxide layers*. Amsterdam: Elsevier, 2006: 389–94.
219. Garnett M. Synthetic DNA reductase. *J Inorg Biochem* 1995; 59: C48.
220. Bünger J, Stork J, Stalder K. Cyto- and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 69: 33-8.
221. Nordlind K. Further studies on the ability of different metal salts to influence the DNA synthesis of human lymphoid cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1986; 79: 83–5.
222. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The *in vitro* effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 1133–49.
223. Nordlind K, Liden S. *In vitro* lymphocyte reactivity to heavy metal salts in the diagnosis of oral mucosal hypersensitivity to amalgam restorations. *Br J Dermatol* 1993; 128: 38–41.
224. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995; 74: 1513–20.
225. Clothier RH, Hulme L, Ahmed AB, Reeves HL, Smith M, Balls M. *In vitro* cytotoxicity of 150 chemicals to 3T3-L1 cells, assessed by the FRAME kenacid blue method. *ATLA — Altern Lab Anim* 1988; 16: 84–95.

226. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. *In vitro* reaction of macrophages to metal ions from dental biomaterials. *Dent Mater* 1995; 11: 239–45.
227. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Pfüller S, Schweikl H. Cytotoxicity of metal cations used in dental cast alloys. *ATLA — Altern Lab Anim* 1997; 25: 323–30.
228. Hussain MZ, Bhatnagar RS, Lee SD. Biochemical mechanisms of interaction of environmental metal contaminants with lung connective tissue. In: Lee SD ed. *Biochemical effects of environmental pollutants*. Ann Arbor (Michigan): Ann Arbor Science, 1977: 341–50.
229. Rapaka RS, Sorensen KR, Lee SD, Bhatnagar RS. Inhibition of hydroxyproline synthesis by palladium ions. *Biochim Biophys Acta* 1976; 429: 63–71.
230. Aresta M, De Fazio M, Fumarulo R, Giordano D, Pantaleo R, Riccardi S. Biological activity of metal complexes: V. Influence of Pd(II), Pt(II), and Rh(I) on the macrophages chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 104: 121–5.
231. Kolesova GM, Zakharova IA, Raykhman LM, Moshkovski YS. Effect of platinum and palladium complexes on enzymatic system of mitochondria. *Vopr Med Khim* 1979; 25: 537–40.
232. Shishniashvili DM, Lystsov VN, Ulanov BP, Moshkovskii YS. Investigation of the interaction of DNA with palladium ions. *Biofizika* 1971; 16: 965–9.
233. Pillai CKS, Nandi US. Interaction of palladium (II) with DNA. *Biochim Biophys Acta* 1977; 474: 11–6.
234. Navarro-Ranninger C, Zamora F, Pérez JM, et al. Palladium(II) salt and complexes of spermidine with a six-member chelate ring. Synthesis, characterization, and initial DNA-binding and antitumor studies. *J Inorg Biochem* 1992; 46: 267–79.
235. Navarro-Ranninger C, Pérez JM, Zamora F, González VM, Masaguer JR, Alonso C. Palladium(II) compounds of putrescine and spermine. Synthesis, characterization, and DNA binding and antitumor properties. *J Inorg Biochem* 1993; 52: 37–49.
236. Matilla A, Tercero JM, Dung N-H, et al. *Cis*-Dichloro-palladium(II) complexes with diaminosuccinic acid and its diethyl ester: synthesis, molecular structure, and preliminary DNA-binding and antitumor studies. *J Inorg Biochem* 1994; 55: 235–47.
237. Liu TZ, Lin TF, Chiu DTY, Tsai K-J, Stern A. Palladium or platinum exacerbates hydroxyl radical mediated DNA damage. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 155–61.



238. Gebel T, Lantzsch H, Plessow K, Dunkelberg H. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. *Mutat Res* 1997; 389: 183-90.
239. Suraikina TI, Zakharova IA, Mashkovskii Y, Fonshtein LM. Study of the mutagenic action of platinum and palladium compounds on bacteria. *Cytol Genet* 1979; 13: 50-4.
240. Uno Y, Morita M. Mutagenic activity of some platinum and palladium complexes. *Mutat Res* 1993; 298: 269-75.
241. Caires ACF. Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2007; 7: 484-91.
242. Christensen GM. Effects of metal cations and other chemicals upon the *in vitro* activity of two enzymes in the blood plasma of the white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède). *Chem-Biol Interact* 1971; 4: 351-61.
243. Higgins JD, Neely L, Fricker S. Synthesis and cytotoxicity of some cyclometallated palladium complexes. *J Inorg Biochem* 1993; 49: 149-156.
244. Tian R, Ingwall JS. Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 270: H1207-16.
245. Sata M, Sugiura S, Yamashita H, Momomura S, Serizawa T. Coupling between myosin atpase cycle and creatine kinase cycle facilitates cardiac actomyosin sliding in vitro. *Circulation* 1996; 93: 310-7.
246. Ventura-Clapier R, Vassort G. Role of myofibrillar creatine kinase in the relaxation of rigor tension in skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch* 1985; 404: 157-61.
247. Bessman SP, Yang WCT. Intimate coupling of creatine phosphokinase and myofibrillar adenosinetriphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 1414-20.
248. Krause SM, Jacobus WE. Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. *J Biol Chem* 1992; 267: 2480-6.
249. ChristensenGM, Olson DL. Effect of water pollutantsand other chemicalsupon ribonuclease activity *in vitro*. *Environ Res* 1981; 26: 274-80.
250. Wieland T, Pfleiderer G. Demonstration of the heterogeneity of lactic acid dehydrogenases of various origins by carrier electrophoresis. *Biochem Z* 1957; 329: 112-6.
251. Craig RG. Restorative Dentai Materials. 9th edition. St. Louis: CV Mosby, 1993: 142-3.

252. Le Anne, Cooper RC, Gouw AM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *PNAS* 2010; 107: 2037-42.
253. Zimmermann S, Alt F, Messerschmidt J, von Bohlen A, Taraschewski H, Sures B. Biological availability of traffic related platinum group elements (Pd, Pt, Rh) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust. *Environ Toxicol Chem* 2002; 21: 2713–8.
254. Schäfer J, Hannker D, Eckhardt JD, Stüben D. Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements (PGE) by plants. *Sci Total Environ* 1998; 215: 59–67.
255. IPCS. Environmental health criteria 226: palladium. Geneva: World Health Organisation; 2002.
256. Kontek R, Matławska-Wasowska K, Kalinowska-Lis U, Kontek B, Ochocki J. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells in vitro. *Acta Pol Pharm* 2011; 68: 127-36.
257. Messer RLW, Lacy S, Lucas LC. Cytotoxic effects of ions released from restorative and dental implant alloys. *Trans Soc Biomater* 1995;18;136.
258. Rae T. A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro. *J Bone Joint Surg (Br)* 1975;57B:444–450.
259. Hulander M, Hong J, Andersson M, et al. Blood interactions in noble metals: coagulation and immune complement activation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2009; 1:1053-62.
260. Iavicoli I, Carelli G, Marinaccio A, Fontana L, Calabrese E. Effects of sub-chronic exposure to palladium (as potassium hexachloro-palladate) on cytokines in male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27: 493-7.
261. Iavicoli I, Carelli G, Marinaccio A, et al. The effects of sub-acute exposure to palladium on cytokines in male Wistar rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 21-4.
262. Canete M, Ortega C, Gavalda A, et al. Necrotic cell death induced by photodynamic treatment of human lung adenocarcinoma A-549 cells with palladium(II)-tetraphenylporphycene. *Int J Oncol* 2004; 24: 1221-8.

263. Lewis JB, Wataha JC, Randol TM, McCloud V, Lockwood PE. Metal ions alter lipopolysaccharide-induced NFkB binding monocytes. *J Biomed Mater Res* 2003; 67A: 868–75.
264. Lewis JB, Wataha JC, McCloud V, Lockwood PE, Messer RLW, Tseng WY. Au(III), Pd(II), Ni(II), and Hg(II) alter signaling in THP1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res* 2005; 74: 474-81.
265. Wataha JC, Ratanasathien S, Hanks CT, Sun ZL. In vitro IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  release from THP-1 monocytes in response to metal ions. *Dent Mater* 1996;12:322–327.
266. Wataha JC, Lewis JB, Volkmann KR, Lockwood PE, Messer RLW, Bouillaguet S. Sublethal concentrations of Au(III), Pd(II), and Ni(II) differentially alter inflammatory cytokine secretion from activated monocytes. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2004; 69: 11–17.
267. Rausch-Fan X, Schedle A, Franz A, Spittler A, Gomikiewicz A, Jensen-Jarolim E, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. *J Biomed Mater Res* 2000;51:88 –95.
268. He GJ, Gao QY, Xu SH, et al. <sup>103</sup>Pd radioactive stent inhibits biliary duct restenosis and reduces smooth muscle actin expression during duct healing in dogs. *HBPD Int* 2006; 5: 595-8.
269. Kutryk MJB, Kuliszewski MA, Jaffe R, et al. Low energy  $\gamma$ -emitting stents inhibit intimal hyperplasia with minimal „edge effects“ in a pig coronary artery model. *CRM* 2007; 8: 28-37.
270. Ashraf W. Accumulation of heavy metals in kidney and heart tissues of *Epinephelus microdon* fish from the Arabian Gulf. *Environ Monit Assess* 2005; 101: 311-6.

## ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Тања Перић
Датум и место рођења: 11.05.1981.
Садашње запослење: назапослена
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: „Ефекти једињења паладијума на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова“
Број страница: 93
Број слика: 2
Број библиографских података: 269
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Слободан Јанковић
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 18.10.2011.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: бр. одлуке 01-167/4-13; 18.01.2012.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, председник, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, 2. Проф. др Слободан Јанковић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, 3. Проф. др Драган Ђурић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник, 2. Проф. др Владимир Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан, 3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан.
Датум одбране дисертације:

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА****УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

<b>Редни број:</b> <b>РБ</b>	
<b>Идентификациони број:</b> <b>ИБР</b>	
<b>Тип документације:</b> <b>ТД</b>	Монографска документација
<b>Тип записа:</b> <b>ТЗ</b>	Текстуални штампани материјал
<b>Врста рада:</b> <b>ВР</b>	Докторска дисертација
<b>Аутор:</b> <b>АУ</b>	Тања Перић
<b>Ментор/коментор:</b> <b>МН</b>	Проф. др Слободан Јанковић, редовни професор
<b>Наслов рада:</b> <b>НР</b>	„Ефекти једињења паладијума на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова“
<b>Језик публикације:</b> <b>ЈП</b>	Српски
<b>Језик извода:</b> <b>ЈИ</b>	Српски/енглески
<b>Земља публиковања:</b> <b>ЗП</b>	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> <b>УГП</b>	Шумадија, Крагујевац
<b>Година:</b> <b>ГО</b>	2012.
<b>Издавач:</b> <b>ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> <b>МС</b>	Крагујевац, Светозара Марковића 69
<b>Физичи опис рада:</b> <b>ФО</b>	Број поглавља: 7; број страница: 93; број слика: 2; број табела: 15; број графикона: 9; број референци: 269.
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> <b>ДИ</b>	Физиологија
<b>Предметна одредница/ кључне речи:</b> <b>ПО</b>	Паладијум; једињења паладијума;

	кардиотоксичност; цитотоксичност; антиоксидант; тровање паладијумом.
<b>УДК</b>	
<b>Чува се: ЧУ</b>	Библиотека Факултета медицинских наука у Крагујевцу
<b>Важна напомена: МН</b>	Нема
<b>Извод: ИД</b>	<p>Претходне студије указале су на могуће антиоксидативно и кардиопротективно дејство извесних органских једињења паладијума. Спроведена је експериментална студија на изолованом срцу пацова, у циљу испитивања и упоређења ефеката органских и неорганских једињења паладијума на контрактилност, коронарни проток и вијабилност срца. Значај мање токсичности органских једињења огледа се пре свега у лечењу пацијената отрованих паладијумом. Испитивана једињења су: триетаноламин (ТЕА), триетаноламин ацетат (ТЕАА), <i>транс</i>-дихлоробис(триетаноламин-N)паладијум (II) комплекс и паладијум (II)-хлорид (PdCl<sub>2</sub>) у растућим концентрацијама: од 10 ng/ml до 100 µg/ml. Регистровани су хемодинамски параметри (dP/dt max, SLVP, DLVP, MBP, HR, коронарни проток), а из коронарног венског ефлуента одређивани су параметри оксидативног стреса (NO, TBARS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и ензими некрозе миокарда (AST, ALT, LDH, CK, CK-MB). PdCl<sub>2</sub> је изазвао смањење контрактилности срца које се манифестовало падом вредности дијастолног и средњег притиска у левој комори. Остала једињења изазвала су смањење фреквенце срца и коронарног протока, при чему су ефекти PdCl<sub>2</sub> били знатно израженији од ТЕА и његовог Pd(II) комплекса. Овакви резултати указују на мању кардиотоксичност органских једињења паладијума. Не постоји сигнификантно про-или антиоксидативно дејство једињења паладијума у кардиомиоцитима, осим смањења индекса липидне пероксидације дејством Pd комплекса. Паладијум(II) једињења не показују значајно цитотоксично</p>

	<p>дејство на срчане ћелије. PdCl<sub>2</sub> доводи до статистички значајне инхибиције активности лактат дехидрогеназе (LDH), док Pd комплекс изазива статистички значајну инхибицију LDH, креатин киназе (СК) и њеног изоензима MB (СК-MB), али су апсолутни нивои испитиваних ензима испод границе која означава оштећење ћелија.</p> <p>Приказани резултати у овој студији, као и досадашњи доступни резултати истраживања контраверзни су по питању мање токсичности органских једињења паладијума у односу на неорганска. Кардиотоксични ефекти обсервирани у нашој студији требало би да инспиришу даља истраживања о токсичности паладијума на људску популацију.</p>
<b>Датум прихватања теме од стране ННВ:</b> <b>ДП</b>	18.01.2012.
<b>Датум одбране:</b> <b>ДО</b>	
<b>Чланови комисије:</b> <b>КО</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник,</li> <li>2. Проф. др Владимир Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан,</li> <li>3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан.</li> </ol>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

<b>Accession number:</b> ANO	
<b>Identification number:</b> INO	
<b>Documentation type:</b> DT	Monograph documentation
<b>Type of record:</b> TR	Textual printed material
<b>Contents code:</b> CC	PhD
<b>Author:</b> AU	Tanja Perić
<b>Menthor/co-mentor</b> MN	Prof. dr Slobodan Janković
<b>Title:</b> TI	
<b>Language of text:</b> LT	serbian
<b>Language of abstract:</b> LA	English/serbian
<b>Country of publication:</b> CP	Serbia
<b>Locality of publication:</b> LP	Šumadija, Kragujevac
<b>Publication year:</b> PY	
<b>Publisher:</b> PU	Author's reprint
<b>Publication place:</b> PP	
<b>Physical description:</b> PD	Chapters: 7; pages: 93; pictures: 2; tables: 15; charts: 9; references: 269.
<b>Scientific field:</b> SF	Medicine
<b>Scientific discipline:</b> SD	Phisiology
<b>Subject/key words:</b> SKW	Palladium; palladium compounds; cardiotoxicity; cytotoxicity; antioxidant;



	palladium poisoning.
<b>UDC</b>	
<b>Holding data: HD</b>	Library of Medical Faculty
<b>Note: N</b>	None
<b>Abstract: AB</b>	<p>Previous studies indicated the possibility of antioxidative and cardioprotective effects of certain organic palladium compounds. Experimental study was conducted on isolated rat heart to investigate and compare the effects of organic and inorganic palladium compounds on contractility, coronary flow and viability of the heart. The importance of less toxicity of organic palladium compounds is the treatment of poisoned patients with palladium. The investigated compounds were: triethanolamine (TEA), triethanolamine acetate (TEAA), trans-dihlorobis (triethanolamine-N) palladium (II) complex and the palladium (II) chloride (PdCl<sub>2</sub>) in increasing concentrations: from 10 ng / ml to 100 mg / ml. Hemodynamic parameters were registered (dP / dt max, SLVP, DLVP, MBP, HR, coronary flow), the parameters of oxidative stress (NO, TBARS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and enzymes of myocardial necrosis (AST, ALT, LDH, CK, CK-MB) were determined in the coronary venous effluent. PdCl<sub>2</sub> reduced contractility of the heart by decreasing DLVP and MBP. Other compounds caused reduction of heart rate and coronary flow, whereas the effects of PdCl<sub>2</sub> were much greater than the effects of TEA and its Pd (II) complex. These results indicate a lower cardiotoxicity of organic palladium compounds. There was no significant pro- or antioxidant activity of palladium compounds in cardiomyocytes, except the reduction of TBARS by Pd complex. Palladium (II) compounds didn't show significant cytotoxic effects on heart cells. PdCl<sub>2</sub> induced statistically significant inhibition of lactate dehydrogenase (LDH), while Pd complex caused statistically significant inhibition of LDH, creatine kinase (CK) and isoenzyme MB (CK-MB), but the absolute levels of investigated enzymes were</p>

	<p>under the limits which indicating the damage of the cells.</p> <p>This results and previous available research results of the less toxicity of organic palladium compounds in regard to inorganic are controversial. Cardiotoxic effects observed in our study should inspire further research of the palladium toxicity in human populations.</p>
<p><b>Accepted by the Scientific Board on:</b> <b>ASB</b></p>	18.01.2012.
<p><b>Defended on:</b> <b>DE</b></p>	
<p><b>Thesis defended board</b> <b>(Degree/name/surname/title/faculty)</b> <b>DB</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. Dragan Milovanovic, full professor of Pharmacology and Toxicology,</li> <li>2. Prof. Vladimir Jakovljevic, associate professor of Phisiology,</li> <li>3. Prof. Dragan Djuric, full professor of Phisiology of Medical faculty of Belgrade</li> </ol>

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Др Тања Перић је рођена 11.05.1981. године у Нишу. Основну школу и средњу медицинску школу „Др Миленко Хацић“, одсек: медицинска сестра-техничар, завршила је у Нишу са одличним успехом. Основне студије медицине уписала је на Медицинском факултету у Нишу школске 2000/01. године и исте завршила 1.12.2008. са просечном оценом студија 9,68. Дипломски рад „Рехабилитација болесника са мултиплом склерозом“ одбранила је са највишом оценом. У току основних студија ангажована је школске 2002/03 године на Медицинском факултету у Нишу као демонстратор на предмету Анатомија, а школске 2003/04 године као демонстратор на предмету Биохемија. Добитник је "Стипендије за подстицај развоја талентованих ученика и студената" града Ниша, 2006. године.

Приправнички стаж обавила је у Клиничком центру Ниш и Дому здравља Ниш, након чега је 27.07.2009. положила стручни испит за доктора медицине. Током 2009. године радила је у Служби за здравствену заштиту одраслих Дома здравља у Нишу у виду добровољног радног ангажовања.

Академске докторске студије уписала је школске 2009/10. године на Медицинском факултету у Крагујевцу, научно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положила је све програмом предвиђене испите за прву годину, као и усмени докторски испит са укупном просечном оценом 9,33. Докторску дисертацију под насловом: „Ефекти једињења паладијума на контрактилност, коронарни проток и вијабилност изолованог срца пацова“, пријавила је 18.10.2011. године (извештај о подобности теме докторске дисертације усвојен је 18.01.2012. године на 32. седници Изборног већа Медицинског факултета у Крагујевцу, бр. одлуке 01-167/4-13). Завршену докторску дисертацију предала је 9.8.2012. године, док је извештај о оцени завршене докторске дисертације поднесен Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 5.11.2012. године.

Добитник је стипендије Министарства за науку и технолошки развој 2010. године, стипендија за 20 доктораната из области медицине на нивоу Србије. Од 2010. године укључена је у пројекат Министарства за науку и технолошки развој "Фармаколошка

анализа ефеката биолошки активних супстанци на изоловане глатке мишиће гастроинтестиналног и уrogenиталног тракта", циклус 2006.-2010. године, и истоимени пројекат Министарства просвете и науке, циклус 2011.-2014. године.

Говори енглески језик.

Мајка је шестогодишњег детета Мије Манов (2006).

## БИБЛИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија М20)

1. Knezevic MZ, Bivolarevic IC, **Peric TS**, Jankovic SM. Using facebook to increase spontaneous reporting of adverse drug reactions. Drug Safety 2011; 34 (4): 351-2. **M21**
2. **Peric T**, Jakovljevic VLJ, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrovic ZD, Simijonovic D, Novokmet S, Djuric DM, Jankovic SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. Med Chem 2012; 8: 9-13 **M23**
3. **Peric TS**, Jankovic MS. Cardiotoxicity of palladium compounds. J Med Biochem 2013; 32: 1-6. **M23**

Зборници међународних научних скупова (категорија М30)

1. Zivkovic V, Djuric DM, Djordjevic D, **Peric T**, Vuletic M, Barudzic N, Jakovljevic V. Effects of palladium compounds on the isolated rat heart: focus on oxidative stress. Winnipeg Heart International Conference, Winnipeg, Manitoba, October 13-16, 2011. Exp Clin Cardiol Abstract book: 34A. **M34**

Часописи националног значаја (категорија М50)

1. **Перић ТС**, Јанковић СМ. Електролитни поремећаји повезани са ризперидоном код психотичних пацијената. Рационална терапија 2011; 3 (1): 1-5. Часопис са рецензијом, није категорисан

Зборници скупова националног значаја (категорија М60)

1. **Перић ТС**. Оштећења тетива узрокована статинима код терапије хиперлипидемије. Трећи национални конгрес рационалне терапије у медицини, Крагујевац 26-27 мај, 2011. Рационална терапија, Књига сажетака: 66. **M64**

Учешће у научним пројектима:

1. "Фармаколошка анализа ефеката биолошки активних супстанци на изоловане глатке мишиће гастроинтестиналног и урогениталног тракта." Министарство за науку и технолошки развој (циклус 2006.-2010. године).
2. "Фармаколошка анализа ефеката биолошки активних супстанци на изоловане глатке мишиће гастроинтестиналног и урогениталног тракта." Министарство просвете и науке (циклус 2011.-2014. године).