



**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**

Исидора М. Милосављевић

**ЕФЕКТИ Pt(II) КОМПЛЕКСА НА КОНТРАКТИЛНОСТ,
КОРОНАРНИ ПРОТОК И ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС ИЗОЛОВАНОГ
СРЦА ПАЦОВА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др рер. нат. Слободан Новокмет, ванредни професор

КРАГУЈЕВАЦ 2017

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Исидора Милосављевић
Датум и место рођења: 22.11.1987., Пећ
Садашње запослење: Факултет медицинских наука
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни проток и оксидациони стрес изолованог срца пацова
Број страница: 234
Број слика: табеле 71, слике 89, схеме 28 и графикони 47
Број библиографских података: 257
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Крагујевац
Научна област (УДК): Молекулска медицина: клиничка и експериментална фармакологија
Ментор: проф. др Слободан Новокмет
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 28.10.2015.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-32/15 од 03.02.2016.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: проф. др Живадин Бугарчић, председник; проф. др Владимир Јаковљевић, члан; проф. др Драган Ђурић, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: проф. др Владимир Јаковљевић, председник; проф. др Живадин Бугарчић, члан; проф. др Драган Ђурић, члан; проф. др Зорица Вујић, члан; доц. др Јована Богојески, члан.
Датум одбране дисертације:

ABSTRACT

During therapeutic administration of cisplatin, acute and cumulative cardiotoxicity may occur, cardiotoxicity includes: electrocardiographic changes, angina, acute myocardial infarction, hypertension, hypotension, arrhythmias, myocarditis, cardiomyopathy and congestive heart failure. Cisplatin causes cardiotoxicity directly by causing toxic effects on cardiomyocytes or increasing in production of free radicals and the formation of oxidative stress. Based on previously stated facts, the aims of this study were: evaluation of the effects of acute administration of different doses of analogues of cisplatin to heart muscle and coronary circulation of the isolated rat heart, examining the effects of these complexes on oxidative stress parameters and determination of histological changes on the heart tissue. The study used bivalent platinum complexes with carrier ethylenediamine, diaminocyclohexane and terpyridine ligands and cisplatin as the reference substance. Taking into account the fact that platinum complexes currently used in clinical practice (cisplatin, carboplatin, oxaliplatin) have different potency and ability to cause side effects, we have chosen different cisplatin analogs to examine their impact on coronary circulation and myocardial function. The aforementioned analogues differ in terms of their structure, chemical reactivity, solubility, pharmacokinetics and systemic toxicity. According to the literature data, that the degree of heart damage proportional to the administered dose of cisplatin, in this study we used three different doses of each of the investigated complexes. It has been shown that the change in stable ligands leads to a change in the potency of the complex to cause cardiotoxicity. More precisely, the introduction of highly lipophilic and voluminous ligands such as 2,2':6',2''-terpyridin leads to an increase in cardiotoxicity of the complex, and also, the substitution of the aminoligand with diaminoethylene ligand affects the reduction in reactivity of the complex, which leads to a consequent decrease in the potential of this complex to lead to cardiotoxicity.

Keywords: Platinum (II) complexes; isolated rat heart; cardiotoxicity, oxidative stress

САЖЕТАК

Приликом терапијске примене цисплатине јавља се акутна и кумулативна кардиотоксичност која подразумева: електрокардиографске промене, ангину, акутни инфаркт миокарда, хипертензију, хипотензију, аритмије, миокардитис, кардиомиопатије и конгестивну срчану слабост. Цисплатина изазива кардиотоксичност тако што директно остварује токсично дејство на кардиомиоците или доводи до појачане продукције слободних радикала и настанка оксидационог стреса. На основу претходно изнесених чињеница циљеви овог истраживања били су: евалуација ефеката акутне администрације различитих доза аналога цисплатине на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, испитивање ефеката ових комплекса на параметаре оксидационог стреса и утврђивање хистолошких промена насталих на срчаном мишићу. У истраживању су коришћени двовалентни комплекси платине са носећим етилендиаминским, диаминоциклохексанским и терпиридинским лигандом и цисплатина као референтна супстанца. Узимајући у обзир чињеницу да комплекси платине који се данас користе у клиничкој пракси (цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина) имају различиту потентност и способност да изазову нежељена дејства, ми смо одабрали различите аналоге цисплатине да испитамо њихов утицај на коронарну циркулацију и функцију миокарда. Поменути аналози се разликују у погледу структуре, хемијске реактивности, растворљивости, фармакокинетице и системске токсичности. Сходно наводима из литературе да је степен оштећења срца пропорционалан примењеној дози цисплатине у истраживању су коришћене три различите дозе сваког од испитиваних комплекса.

Показано је да промена неодлазећих лиганата доводи до промене у потентности комплекса да изазове кардиотоксичност. Тачније да увођење јако липофилних и волуминозних лиганата као што је 2,2':6',2''-терпиридин доводи до повећања кардиотоксичности комплекса, као и да супституција аминолиганда диаминоетиленским лигандом утиче на смањење реактивности комплекса што доводи и до последичног смањења потенцијала овог комплекса да доведе до кардиотоксичности.

Кључне речи: двовалентни комплекси платине; изоловано срце пацова; кардиотоксичност; оксидациони стрес

*Да бисмо успели,
пре свега морамо веровати да то можемо!*

Nikos Kazantzakis

Ова докторска дисертација представља плод вишегодишњег рада великог броја људи у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију проф. др Владимира Јаковљевића.

Захваљујем се ментору, проф. др Слободану Новокмету на великој помоћи око осмишљавања теме и методологије ове докторске дисертације, као и за велико разумевање и подршку током израде и писања исте.

Велику захвалност дугујем својим драгим колегама и пријатељима доц. др Владимиру Живковићу, доц. др Ивану Срејовићу, доц. др Невени Јеремић и асс. Тамари Николић Турнић на несебичној помоћи у савладавању свих потребних метода за израду ове докторске дисертације као и на свим пријатељским саветима и великој моралној подршци.

Израда ове докторске дисертације не би била могућа без огромне помоћи моје драге колегинице и великог пријатеља асс. Јоване Јеремић. Јована је својим великим срцем и неисцрпном енергијом помогла да се ова докторска дисертација реализује и добије финални изглед.

Захвалност дугујем и свим осталим колегама из Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију: Предрагу Равићу, Катарини Радоњић, Јасмини Сретеновић, Александри Вранић, Аници Петковић, Јовани Брадић, Маји Савић и свим осталим колегама који су учествовали у извођењу биохемијских анализа или на било који други начин допринели коначном изгледу овог доктората.

За израду ове докторске дисертације највећу захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу, који је у сваком тешком тренутку био ту да својим саветима помогне да се превазиђу проблеми и да све нерешиво постане решиво! Захвална сам Вам што сте веровали у мене и мој рад и када то други људи нису чинили!

С обзиром да је породица стуб и покретач свега желим да се захвалим свом супругу Милораду, мајци Рајни, оцу Милану и брату Миши на огромној подршци и разумевању током свих ових година. Без вас четворо све ово не би имало смисла, зато је све ово посвећено вама најдражи моји!

*Свима захвална!
Исидора*

САДРЖАЈ

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	2
ABSTRACT.....	3
САЖЕТАК.....	4
САДРЖАЈ.....	6
1. У В О Д.....	12
1.1. КОМПЛЕКСНА ЈЕДИЊЕЊА ПЛАТИНЕ У БИОМЕДИЦИНИ.....	13
1.1.1. Историјат.....	13
1.1.2. Развој нових комплекса платине.....	14
1.1.2.1. Комплекси платине прве генерације.....	14
1.1.2.2. Комплекси платине друге генерације.....	15
1.1.2.3. Комплекси платине треће генерације.....	18
1.2. ИСПИТИВАНИ КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ.....	19
1.2.1. Повезаност утицаја структуре комплекса на њихову активност према ендогеним молекулима.....	21
1.3. ФАРМАКОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ЦИСПЛАТИНЕ.....	26
1.3.1. Механизам проласка цисплатине кроз ћелијске мембране.....	26
1.3.2. Везивање цисплатине за молекул ДНК – механизам дејства цисплатине.....	27
1.3.3. Везивање цисплатине за друге биомолекуле.....	28
1.3.4. Индукција оксидационог стреса као механизам дејства цисплатине.....	29
1.3.5. Утицај цисплатине на хомеостазу калцијума.....	30
1.4. НЕЖЕЉЕНИ ЕФЕКТИ ЦИСПЛАТИНЕ И ДРУГИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ У БИОЛОШКИМ СИСТЕМИМА.....	31
1.4.1. Нефротоксичност.....	31
1.4.2. Ототоксичност.....	32
1.4.3. Хепатотоксичност.....	33
1.4.4. Кардиотоксичност.....	33
1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС.....	35
1.5.1. Слободни радикали.....	35
1.5.2. Реактивне кисеоничне врсте.....	36
1.5.3. Реактивне азотне врсте.....	39
1.5.4. Липидна пероксидација.....	41

1.5.4.1. Неензимска липидна пероксидација.....	43
1.5.4.2. Липидна пероксидација иницирана ROS-ама	44
1.5.4.3. Липидна пероксидација иницирана RNS-ама	44
1.6. КАРАКТЕРИСТИКЕ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ СИСТЕМА.....	45
1.6.1. Регулација срчаног рада	46
1.6.2. Регулација коронарног протока	47
1.6.3. Ефекти реактивних кисеоничних врста на кардиоваскуларни систем	48
1.6.3.1. Ефекти на ендотелне ћелије	48
1.6.3.2. Ефекти на васкуларне глатке мишићне ћелије	49
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	50
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	52
3.1. МАТЕРИЈАЛ.....	53
3.1.1. Материјал коришћен за израду <i>Krebs-Hensenleit</i> -овог перфузионог раствора ..	53
3.1.2. Материјал коришћен за испитивање директних ефеката комплекса платине(II) на изолованом срцу пацова:	53
3.1.3. Материјал коришћен за израду реагенаса за детерминацију параметара оксидационог статуса.....	53
3.1.3.1. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS).....	54
3.1.3.2. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита.....	54
3.1.3.3. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид анјонског радикала (O ₂ ⁻)	54
3.1.3.3. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H ₂ O ₂)	54
3.2. Методе.....	54
3.2.1. Експериментални модел	55
3.2.1.1. <i>Langendorff</i> апарат	56
3.2.2. Припрема <i>Krebs-Hensenleit</i> -овог перфузионог раствора.....	58
3.2.3.1. Поступак припреме изолованог срца пацова.....	58
3.2.3.2. Експерименталне групе.....	60
3.2.4. Биохемијске анализе	61
3.2.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	61
3.2.4.2. Одређивање нитрита (NO ₂ ⁻).....	62
3.2.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻)	64
3.2.4.4. Одређивање водоник пероксида (H ₂ O ₂)	66
3.2.5. Хистопатолошке анализе.....	67
3.2.5.1. Припрема ткива за морфолошку и морфометријску анализу	67
3.2.5.2. Припрема ткива за имунохистохемијску анализу	68
4. РЕЗУЛТАТИ	70

4.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА	71
4.1.1 Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	71
4.1.1.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	71
4.1.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	74
4.1.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	76
4.1.1.4. Поређење ефеката разчићитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	78
4.1.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	80
4.1.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	80
4.1.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	83
4.1.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	85
4.1.2.4. Поређење ефеката разчићитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	87
4.1.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	89
4.1.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	89
4.1.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	92
4.1.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	94

4.1.3.4. Поређење ефеката разчићитих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	96
4.1.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	98
4.1.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	101
4.1.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	103
4.1.4.4. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова.....	105
4.1.5.1. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	106
4.1.5.2. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	110
4.1.5.3. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова	113

4.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

4.2.1. Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	116
4.2.1.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	116
4.2.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	118
4.2.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	120
4.2.1.4. Поређење ефеката разчићитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	122
4.2.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	124
4.2.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	124
4.2.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	126

4.2.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	128
4.2.2.4. Поређење ефеката разчићитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	130
4.2.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	132
4.2.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	132
4.2.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	134
4.2.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	136
4.2.3.4. Поређење ефеката разчићитих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова.....	138
4.2.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	140
4.2.4.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова..	140
4.2.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова..	142
4.2.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова..	144
4.2.4.4. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова..	146
4.2.5.1. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	148
4.2.5.2. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	150
4.2.5.3. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова	152

4.3. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА ОЧУВАНОСТ

ГРАЂЕ МИОКАРДА ПАВЦОВА

4.3.1. Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова.....	154
4.3.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова	157
4.3.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова	158

4.3.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова.....	160
4.3.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова.....	160
4.3.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова.....	163
4.3.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова.....	165
4.3.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова	167
4.3.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова	167
4.3.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова	169
4.3.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова	171
4.3.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова.....	173
4.3.4.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова	173
4.3.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова	176
4.3.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова	178
5. ДИСКУСИЈА	181
5.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ <i>cis</i> -ДИАМИНО-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) – ЦИСПЛАТИНЕ НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА	184
5.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЕТИЛЕНДИАМИН-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА	193
5.3. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ 1,2-ДИАМИНО-ЦИКЛОХЕКСАН-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА	199
5.4. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ 2,2':6',2''-ТЕРПИРИДИН-ХЛОРИДО-ПЛАТИНА(II)ХЛОРИДА НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА.....	205
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	209
7. ЛИТЕРАТУРА.....	212
8. ПРИЛОГ	234

1. У В О Д

1.1. КОМПЛЕКСНА ЈЕДИЊЕЊА ПЛАТИНЕ У БИОМЕДИЦИНИ

1.1.1. Историјат

Медицинска неорганска хемија представља дисциплину која данас има широку примену, како у дијагностичке тако и у терапијске сврхе. Већ вековима је присутна емпиријска употреба бројних неорганских једињења у терапији различитих болести. У кинеској традиционалној медицини арсентриоксид је коришћен као антисептик, у терапији реуматоидног артритиса, сифилиса и псоријазе, а чак су постојали и покушаји лечења леукемије овим једињењем у XVIII и XIX веку (1). Поред арсена и једињења других метала се са мањим или већим успехом користе у медицини као лекови: једињења бизмута као антиулцерозни лекови, литијум као психостабилизатор у терапији биполарног поремећаја, једињења злата у терапији артритиса, једињења платине у терапији тумора (*Metals in Medicine in Biological Inorganic Chemistry*). Случајно откриће цисплатине, као антитуморског агенса, шездесетих година прошлог века је имало најзначајнију улогу за даљи развој медицинске неорганске хемије (2). Молекул цисплатине је синтетисан још давне 1845. године од стране *Peyrona* по коме је и назван *Peyron's* хлорид, међутим његова биолошка активност је откривена доста касније. *Rosenberg* је са својим сарадницима 1965. године истражујући утицај електричне струје на бактерије увидео да платина може имати утицај на размножавање, али не и на инхибицију раста бактерија. У присуству амонијум-хлорида (NH_4Cl), платинских електрода и сунчеве светлости, култура *E. coli* је 300 пута увећала величину (нема инхибиције раста), али зато није имала способност деобе. Утврђено је да за овај престанак размножавања није одговорно електрично поље, већ мали платински комплекси који су настали током електролизе. Овај феномен настаје услед интеракције платинске електроде са ћелијским медијумом при чему долази до стварања платинског комплекса *cis*-диаминодихлоридоплатине(II) данас познатог као цисплатина (3). Истраживачи су претпоставили да ово једињење може имати антитуморску активност, што је потом и доказано на ћелијским културама тумора (Сарком 180) и мишијим туморским моделима (мишеви са леукемијом L1210) (4, 5). Прва фаза клиничких студија цисплатине је започета 1971. године, а већ пар година потом, 1978. године, овај лек је регистрован за клиничку употребу у терапији тумора

тестиса и јајника најпре у Канади и Сједињеним Америчким Државама а потом и у остатку света (6).

1.1.2. Развој нових комплекса платине

Цисплатина поред великог успеха у терапији одређених тумора има и велики број недостатака као што су: појава токсичности, развој резистенције на лек, ограничена растворљивост у води, обавезна интравенска примена. Са циљем да се превазиђу ови недостаци научници континуирано синтетишу нове комплексе у нади да ће пронаћи комплекс који ће бити ефикаснији и мање токсичан од цисплатине. Према доступним подацима познато је да је 28 различитих комплекса платине укључено у клиничке студије, а од свих тих комплекса свега четири се тренутно налази у клиничкој пракси. Цисплатина и карбоплатина се користе у целом свету, оксалиплатина се користи у пар земаља, док се недаплатина користи само у Јапану. Све испитиване комплексе платине можемо сврстати у три групе тј. генерације: 1. групу чине аналози цисплатине синтетисани са циљем да се добију једињења са већом ефикасношћу од цисплатине; 2. групу чине аналози карбоплатине синтетисани са циљем да се добију једињења са смањеном токсичношћу и 3. групу чине 1,2-диаминоциклохексан-дихлоридо-платина(II) синтетисани са циљем да се смањи појава укрштене резистенције.

1.1.2.1. Комплекси платине прве генерације

Цисплатина (**Схема 1**) припада првој генерацији комплекса платине са антитуморским дејством која у својој структури има два хлоридо лиганда, који представљају одлазеће (лабилне) лиганде и два аминокиселинско лиганда (монодентатна лиганда) као чврсто везане лиганде. Цисплатина се данас користи у терапији бројних тумора: тестиса, јајника, материце, бешике, главе, врата и плућа. Упркос њеној великој активности постоје и тумори код којих цисплатина није ефикасна као што су леукемије, тумори бубрега и гастроинтестиналног тракта (7, 8). Поред тога што цисплатина није ефикасна код свих тумора услед резистентности ћелија на њено дејство, као недостатак се наводи и чињеница да туморске ћелије могу развити стечену резистенцију након поновљених доза. Токсичност која настаје услед употребе цисплатине у терапији је још један од ограничавајућих фактора за њену употребу. До

сада најшире проучаване су: нефротоксичност, ототоксичност, неутропенија, тромбоцитопенија, ембриотоксичност, мутагеност, периферне неуропатије (9-12). Литературни подаци указују да примена цисплатине може бити повезана са настанком кардиотоксичности, међутим молекулски механизми којима она остварује овај вид токсичност и даље нису потпуно разјашњени (13).

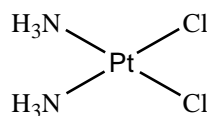


Схема 1. Структура цисплатине

У жељи да се превазиђу претходно поменути недостаци, отпочело се са синтезом нових аналога цисплатине коришћењем приступа активног аналога. Основни захтеви за добијање нових активних аналога су били да они испољавају мању токсичност уз исту или већу ефикасност, да се прошири спектар тумора на које ће деловати и да се омогући *per os* примена нових аналога (14).

1.1.2.2. Комплекси платине друге генерације

Након увођења цисплатине у клиничку праксу синтетисано је на стотине комплекса платине и испитивана је њихова антитуморска активност. Основни циљ ових синтеза је био да се добију једињења која ће имати мању токсичност уз исту или већу активност. Стратегија за смањење токсичности је подразумевала да се повећа растворљивост аналога у води и њихова стабилност. Ово је омогућено заменом одлазећих лиганда, тако да су хлоридо лиганди замењени хелатним карбоксилато, оксалато, гликолато или сулфато лигандима. Најзначајнији представник друге генерације аналога је карбоплатина (**Схема 2**).

Карбоплатина (1,1'-*cis*-циклобутилдикарбоксилатодиаминоплатина(II)) уместо два монодентатна одлазећа хлоридо лиганда има један бидентатни одлазећи дикарбоксилато лиганд. Карбоплатина има мању активност у односу на цисплатину, али њена предност се огледа у томе што има мању токсичност и не захтева форсирану диурезу тако да се може примењивати и амбулантно (15). Међутим, показано је да је спектар деловања овог лека сличан спектру дејства цисплатине и да не делује код тумора резистентних на цисплатину (16).

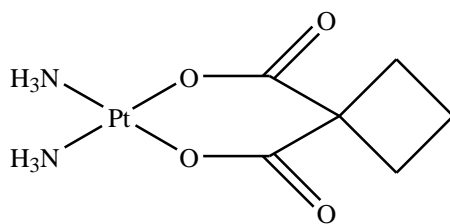


Схема 2. Структура карбоплатине

На основу добијених резултата о карбоплатини приступило се синтези нових аналога карбоплатине за које се претпоставило да ће имати боље карактеристике. Ови аналози су синтетисани крајем осамдесетих година прошлог века и сви су садржали циклобутански прстен као саставни део одлазећег лиганда (Схема 3).

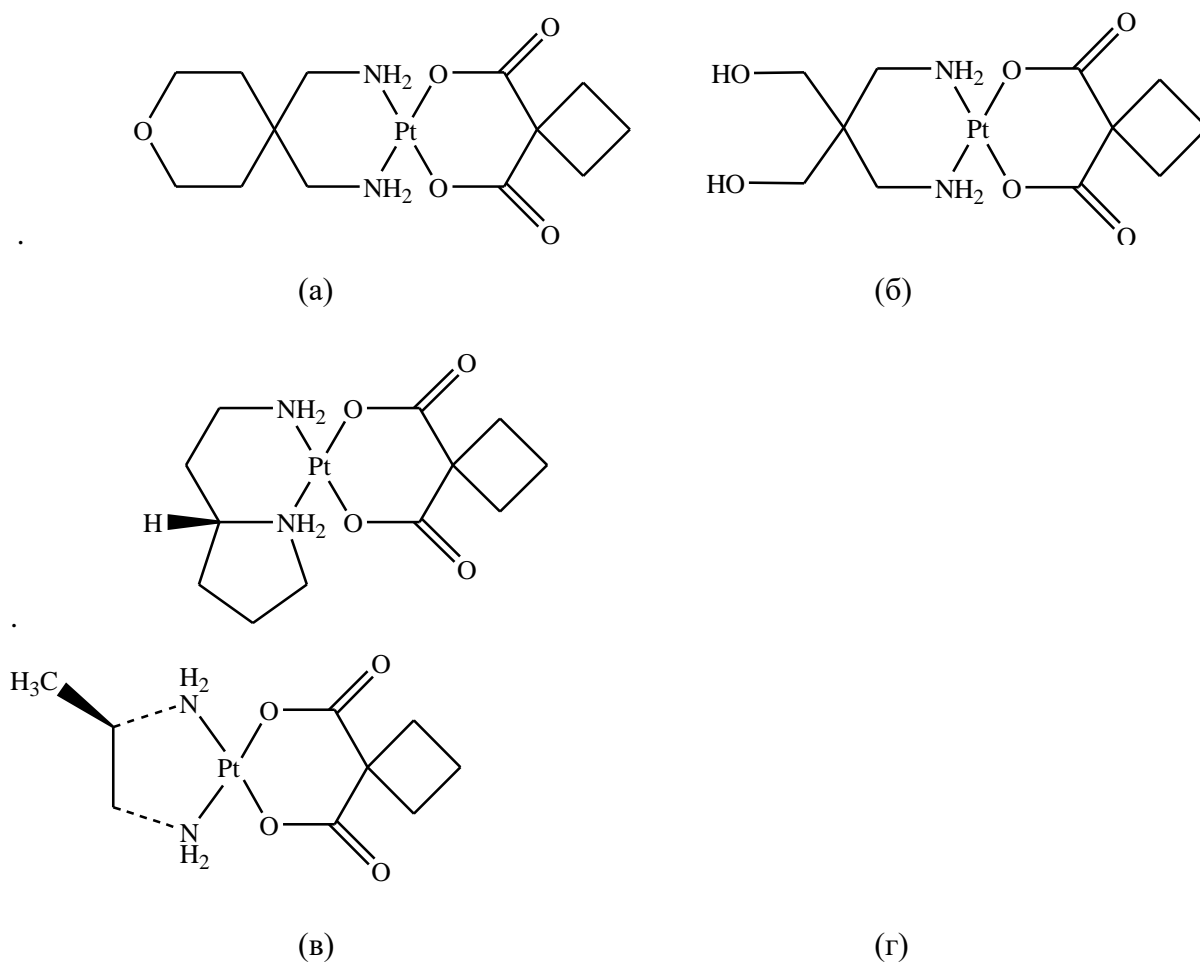


Схема 3. Структуре комплекса платине II генерације:

(а) Зениплатина, (б) Енлоплатина (в) Мибоплатина и (г) CI 973

У ову групу аналога спадају: **зениплатина** (1,1'-циклобутан-дикарбоксилато(2,2-бис(аминометил)-1,3-пропандиол)платина(II)), **енлоплатина** (1,1'-циклобутан-дикарбоксилатотетрахидро-4Nпиран-4,4-диметиламинплатина(II)),

мибоплатина (*R*-(-)-1,1'-циклобутанди- карбоксилато-2-аминометилпиролидин- платина(II)) и **СI 973** (1,1'-циклобутанди- карбоксилато-2-метил-1,4- бутандиаминплатина(II)). Даља истраживања са овим аналозима су прекинута јер или нису показали значајну ефикасност или су изазивали озбиљна нежељена дејства (17).

Поред претходно наведених комплекса у аналоге друге генерације се убрајају и једињења која су синтетисана неколико година касније: **лобаплатина** (лактато- диаминометилциклобутанплатина(II)), **SKI 2053** (малонатометилизопропилдиметил- аминодиоксилеплатина(II)), **цитоплатам** (малоатаминцикло-пантиламин-платина(II)) и **недаплатина** (*cis*-гликолатодиамин-платина(II)) (Схема 4).

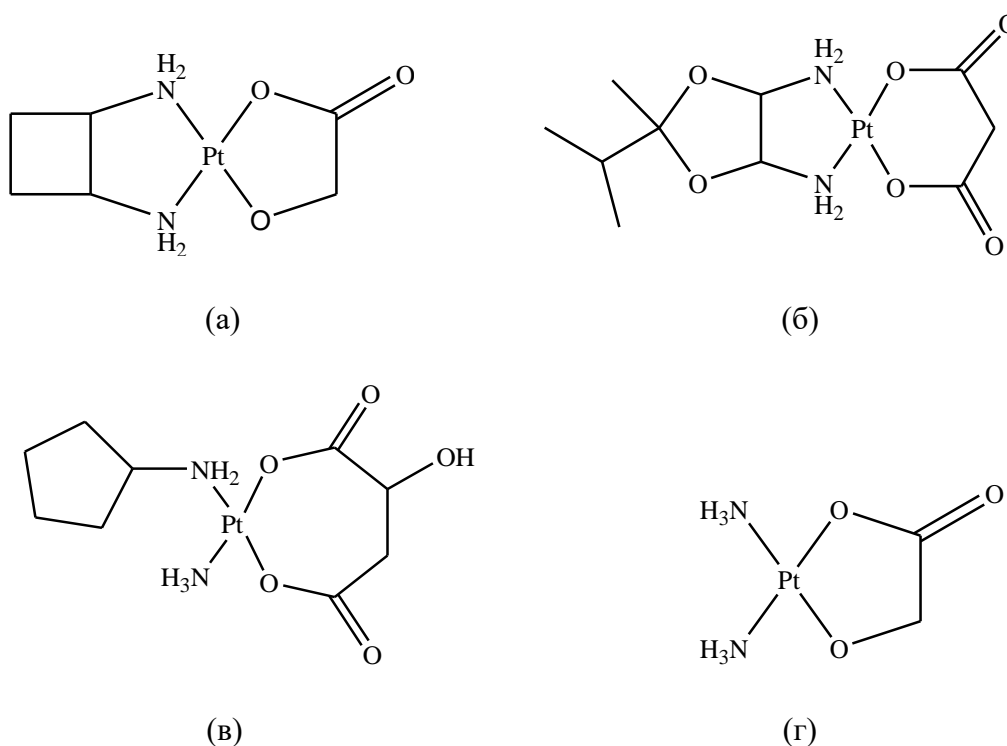


Схема 4. Структуре комплекса платине II генерације:

(а) Лобаплатина, (б) SKI 2053, (в) Цитоплатам, (г) Недаплатина

Од свих аналога друге генерације само је карбоплатина испунила циљна очекивања (18). Лобаплатина је 1992. године укључена у клиничка испитивања за терапију тумора који су развили резистентностију на цисплатину као што су тумори јајника, главе и врата, плућа. Међутим, овај лек је касније регистрован само у Кини и то за терапију тумора дојке (19, 20). Недаплатина је регистрована за клиничку употребу од 1998. године у Јапану (18).

1.1.2.3. Комплекси платине треће генерације

Burchenal и сарадници су показали да комплекси платине који у својој структури садрже диаминоциклохексански лиганд (*dach*) показују активност код L1210 леукемијских ћелијских линија које су резистентне на дејство цисплатине (21). *dach* лиганд има два асиметрична центра на угљениковим атомима (C1 и C2) тако да постоје три потенцијална изомера *R,R-(trans-l)*, *S,S-(trans-d)* и *R,S-(cis)*. Конформација платинског комплекса који садржи *dach* лиганд значајно утиче на активност комплекса.

Код *cis*-изомера циклохексански прстен заклапа скоро нормалан угао са хелатним прстеном, док код оба *trans*-изомера циклохексански прстен лежи у истој равни са хелатним прстеном. Из овог разлога *trans*-изомери лакше продиру у двоструки хеликс дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК).

cis-1R,2R-диамино-циклохександихлоридоплатина(II) [Pt(*dach*)Cl₂] (Схема 5) се показао као најзанимљивији комплекса са *dach* лигандом због своје активности и изузетних биолошких карактеристика. Овај комплекс је у мањој мери доводио до нефротоксичности за разлику од претходно изучаваних комплекса, а поред тога није се јављала ни укрштена резистенција на ове комплексе код мишијих модела (22). Ово једињење је слабо растворно у води и другим органским растварачима, па је немогуће применити га интравенски. Са циљем да се повећа растворљивост хлоридни лиганди су замењени другим лигандима и тако су синтетисани: оксалиплатина, TRK-710 и LNDDP (Схема 6).

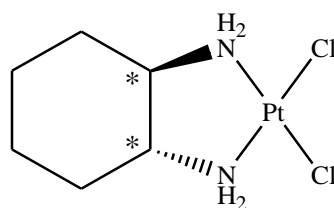


Схема 5. Структура *cis-1R,2R*-диамино-циклохександихлоридоплатине(II)

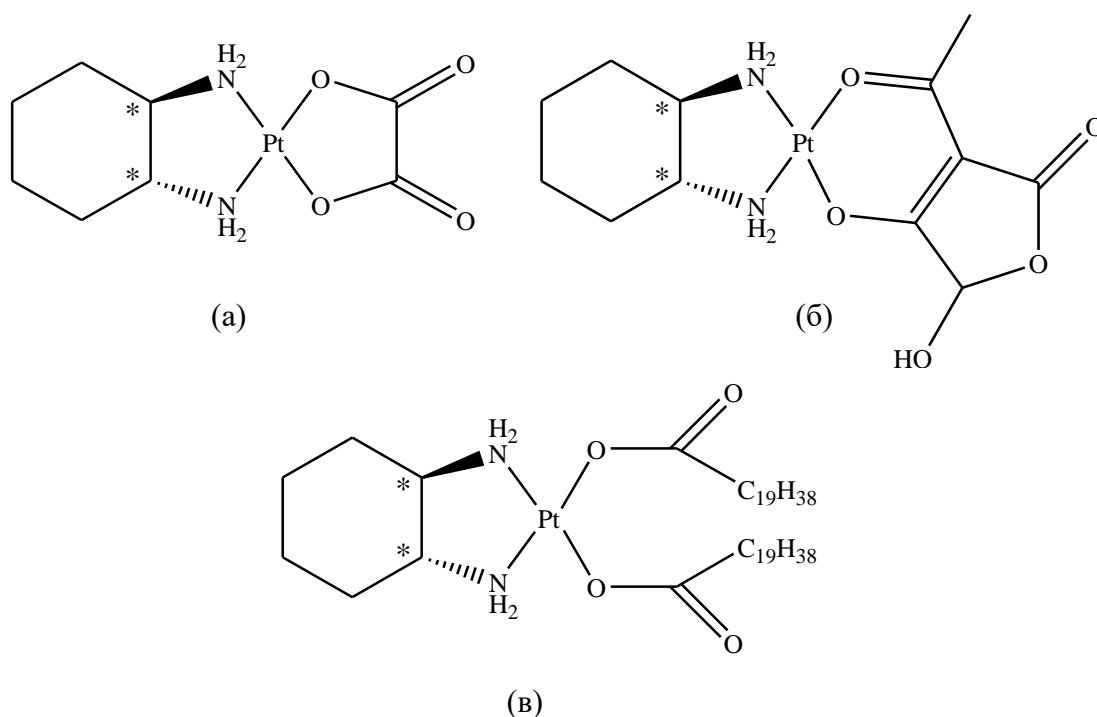


Схема 6. Структуре комплекса платине III генерације:

(а) Оксалиплатина, (б) *TRK-710* и (в) *LNDDP*

Најважнији представник треће генерације је **оксалиплатина** (*cis*-оксалато-*trans-l*-1,2-диаминоциклохексан-платина(II)). Ово једињење је показало значајну активност код колоректалног карцинома, као и код уочене резистенције на цисплатину код леукемијских L1210 ћелијских линија, а био је и први аналог који се могао примењивати перорално (23). Истраживања оваквих хиралних комплекса су показала да су *trans* изомери, нарочито *trans-l(trans-(-)-1R,2R)* изомери много ефикаснији у односу на *trans-d(trans-(+)-1S,2S)* изомере и *cis*-изомере(1*R*,2*S*). Из свега наведеног може се закључити да стереохемијске особине комплекса утичу на његову активност (24).

1.2. ИСПИТИВАНИ КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ

Координациони број двовалентне платине (Pt(II)) је 4 и она искључиво гради квадри-планарне комплексе. Када су за централни јон платине везана четири иста лиганда, везе се остварују у истој равни под углом од 90° и због тога се ова структура објашњава dsp^2 хибридизацијом. Када су за централни јон везани различити лиганди,

долази до одступања од правилне квадратно планарне геометрије, онда везе нису исте дужине и углови нису 90° . Структуре испитиваних комплекса су приказане на **Схеми 7**.

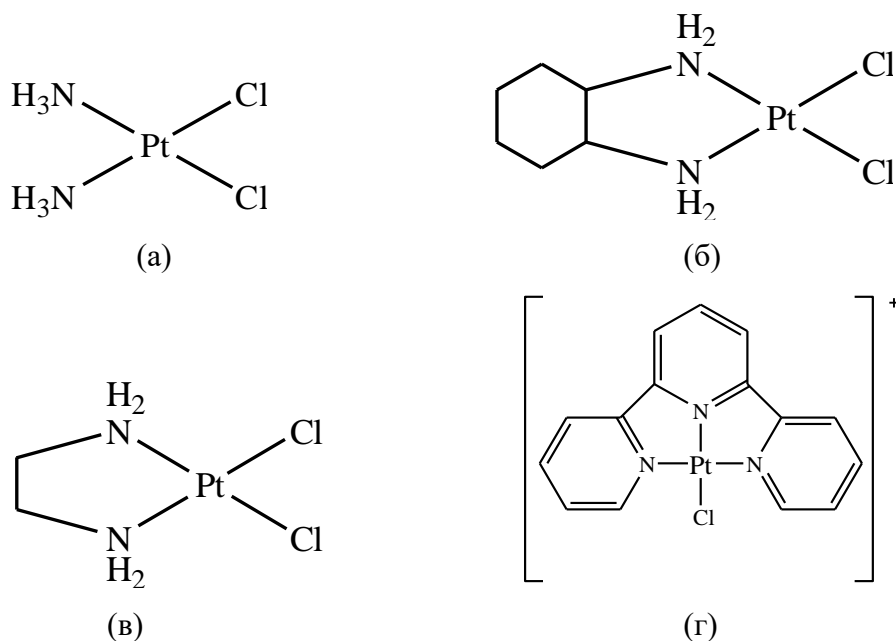


Схема 7. Структуре испитиваних комплекса платине (а) цис-диамино-дихлоридо-платина(II), (б) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платина(II), (в) етилендиамин-дихлоридо-платина(II) и (г) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорид

Табела 1. Особине лиганата испитиваних комплекса платине

Особине лиганата коришћених у истраживању					
Назив	Хлоридо	Амино	Етилен-диамин	Диамино-циклохексан	Терпиридин
Хемијска структура	Cl	NH ₃			
Наелектрисање	Анјон	Неутралан	неутралан	Неутралан	Неутралан
Бр. доносних атома	монодентатни	Монодентатни	бидентатни	Бидентатни	Тридентатни
Врста доносних атома	-	Азот	азот	Азот	Азот
Стабилност у зависности од врсте везе са металом	Одлазећи	Неодлазећи	неодлазећи	Неодлазећи	Неодлазећи

1.2.1. Повезаност утицаја структуре комплекса на њихову активност према ендогеним молекулима

На основу бројних студија у којима је испитивана активност комплекса платине установљене су основне смернице за синтезу комплекса, тј. које особине комплекс платине мора да поседује да би испољио антитуморску активност (25). Комплекс треба да поседује *cis* геометрију и одговарајуће одлазеће и неодлазеће лиганде у структури (26, 27). Сви комплекси коришћени у овом истраживању поседују хлоридо лиганд као одлазећи лиганд. Овај одабир одлазећег лиганда није случајан већ представља резултат истраживања односа структуре и активности комплекса. У истраживањима је уочено да варирањем одлазећих лиганата у комплексу цисплатине долази до повећања токсичности или инактивације комплекса. Заменом хлоридо лиганата са лигандима који остварују слабе везе са централним атомом, као што су нитрати (NO_3^-) долази до повећања токсичности насталог комплекса, док са друге стране увођењем нитрита (NO_2^-) или тиоцијаната (SCN^-) који стварају јаке везе са централним атомом настају инактивни комплекси (28). Најбољи антитуморски ефекти се постижу када се као одлазећи лиганди користе ањони који остварују средње јаке везе са централним атомом платине. У ове лиганде се убрајају следећи ањони: хлоридо (Cl^-), бромидо (Br^-), сулфато (SO_4^{2-}), цитрато, оксалато. Хлоридо лиганди омогућавају комплексима платине деловање на ткива и дистрибуцију унутар ћелије, јер услед разлике у концентрацији јона у екстрацелуларној и интрацелуларној течности постоји разлика у активности. Услед високе концентрације хлоридо јона у екстрацелуларној течности, комплекси платине су у плазми неутрални и могу пасивно да пролазе кроз ћелијске мембране. Међутим, унутар ћелије концентрација хлоридних јона је доста нижа и лако долази до одласка ових лиганата, односно до хидролизе комплекса. На место хлоридо лиганата долазе молекули воде који су слабијим везама везани за централни атом платине и самим тим су ови комплекси реактивнији према нуклеофилним центрима биомолекула (29) (Схема 8 и Схема 9).

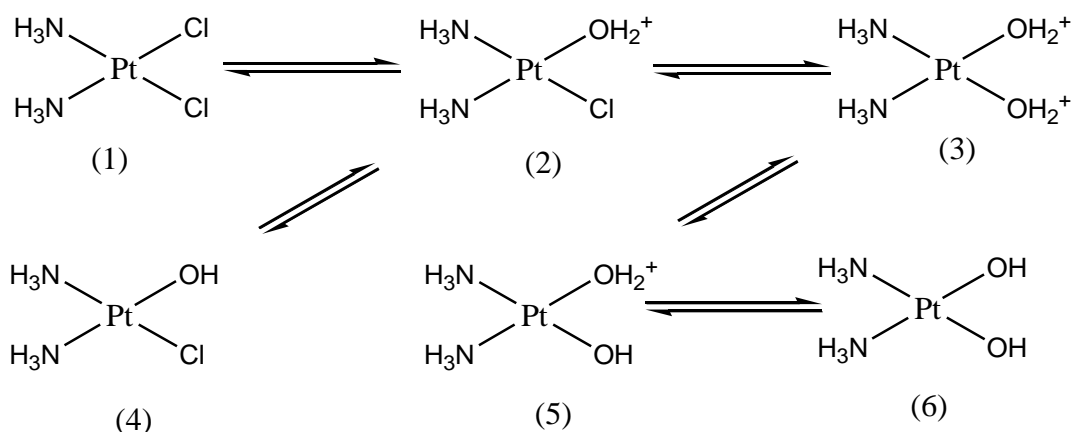


Схема 8. Хидролиза цисплатине $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$

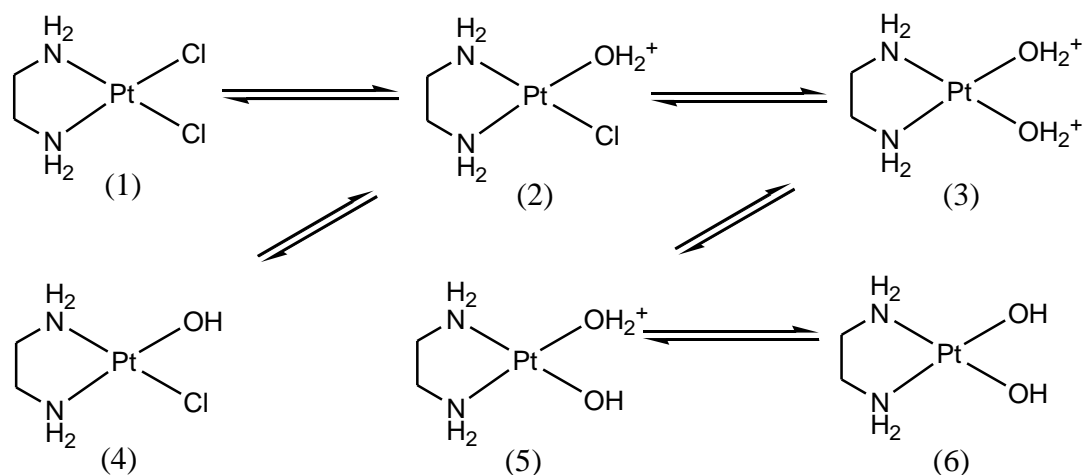


Схема 9. Хидролиза етилендиаминског комплекса платине $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$

Хидролизом цисплатине као и етилендиаминског комплекса платине примарно настају моноаква комплекси, који се брзо координују за доворски азот у нуклеинским киселинама. Даљом хидролизом долази до измене и другог хлоридо јона молекулом воде и на тај начин је могуће стварање додатне везе са молекулом ДНК (Схема 10). На основу резултата бројних студија показано је да након што дође до бифункционалног везивања комплекса цисплатине за молекул ДНК не долази до губитка аминоклиганата, односно неодлазећих лиганата.

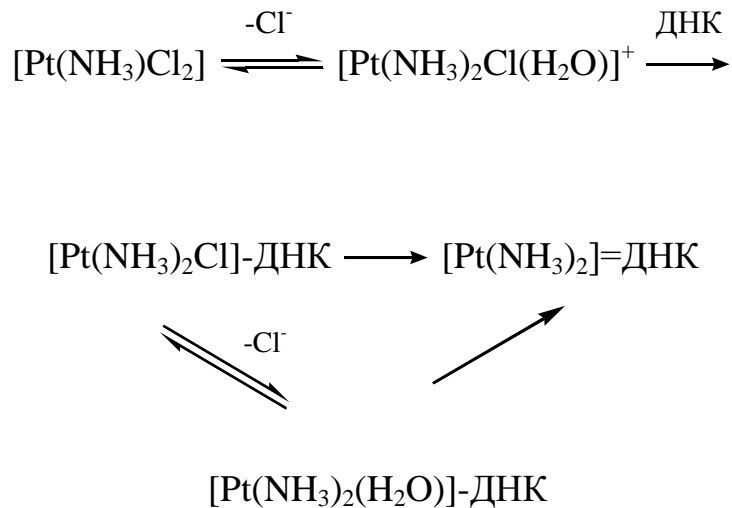


Схема 10. Везивање платинских комплекса за молекулу ДНК

Осим што комплекси платине делују на биомолекуле унутар ћелије они могу да остварују везе и са малим протеинским молекулима, као што је глутатион, и на нивоу плазме. Сматра се да овакве интеракције не представљају молекулске механизме за остваривање антитуморског дејства, већ механизме за настанак токсичности.

Главну разлику у структури истраживаних комплекса чине неодлазећи лиганди, одакле се сматра да потичу и различитости комплекса у погледу њихових дејстава и нежељених ефеката. Иако су неодлазећи лиганди у овим комплексима различити они имају и једну врло значајну заједничку особину, а то је да сви поседују азот као донорски атом, што представља још један од захтева да би комплекс имао одређену антитуморску активност (26). Није довољно само присуство азота већ и постојање најмање једне везе тог азота са водоником, без обзира да ли се ради о монодентатним или бидентатним лигандима (30). Комплекси који поседују аминокиселинске лиганде са терцијерним азотом какав је нпр. терпиридин немају антитуморску активност. Изостанак антитуморске активности настаје због немогућности комплекса да се због тридентатног лиганда бифункционално веже за молекулу ДНК (31). Сматра се да N-H група има различите функције у биолошкој активности комплекса, пре свега у кинетичком а потом и у термодинамичком смислу. Када се говори о кинетичком смислу мисли се на утицај ове групе на везивање комплекса за молекулу ДНК. Због разлике у наелектрисању између молекула ДНК (негативно наелектрисана фосфатна група) и комплекса платине (позитивно наелектрисане аминокиселинске групе) долази до електростатичке интеракције односно привлачења између ова два молекула. Када се

говори о термодинамичком смислу услед електростатичких интеракција долази до стварања додатних веза између комплекса и молекула ДНК и спречавања опоравка молекула ДНК, што повећава антитуморску активност комплекса (32). Такође присуство ове везе утиче на транспорт кроз мембрану и настанак стерних ефеката (26). У структурама испитиваних комплекса неодолазећи лиганди се разликују у погледу њихове: величине, хидрофобности и конформације. Услед везивања комплекса платине за молекулу ДНК долази до конформационих промена на нивоу молекула ДНК, односно долази до промене густине суперхеликса. До ових промена код комплекса који имају координоване лиганде са ароматичним карактером, какав је (*terpy*), долази услед интракалације. Интеркалација заправо подразумева везивање и уметања комплекса између базних парова што резултује одмотавањем двоструког хеликса ДНК за око 26° по вези. Док са друге стране код комплекса који поседују лиганде без ароматичног карактера (као нпр. *en*, *dach*) интеркалација није могућа. У случају комплекса са овим лигандима у истраживањима је примећено да долази до прекидања двоструког хеликса ДНК на месту где се везао комплекс или у близини везивног места комплекса. Овакви ефекти су могући само када дође до бифункционалног везивања комплекса платине, јер на примеру монофункционално везаних комплекса овакви ефекти нису примећени.

За алифатичне лиганде, етилендиамин (*en*) и диаминоциклохексан (*dach*) се очекује да интерагују са електронима из *6s* орбитале платине при чему би требало да се оствари умерен транс-ефекат, који ће повећати хидролизу и хидратацију комплекса и позитивно утицати на реакције супституције ових комплекса са ендогеним молекулима (33). Кинетички транс-ефекат се среће код квадри-планарних комплекса, и овим ефектом се објашњава утицај врсте инертног лиганда, у транс-положају у односу на одлазећи лиганд, на брзину супституционе реакције (34). Транс-ефекат расте са повећањем поларности лиганда у транс положају. Овако настали ефекат, за лиганде σ -доноре, је индуктиван и преноси се са инертног лиганда на јон метала (Pt), а са јона метала на одлазећи лиганд (Cl) (35, 36).

У кинетичким истраживањима је показано да реактивност комплекса *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], [Pt(*en*)Cl₂] и [Pt(*dach*)Cl₂] зависи од волуминозности неодолазећег лиганда. Најволуминознији је *dach* лиганд, самим тим и супституционе реакције комплекса са овим лигандом су спорије у односу на реакције *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] и [Pt(*en*)Cl₂] комплекса (37, 38). Циклохексанов прстен у *dach* лиганду има позитиван индуктивни ефекат тако да Pt(II) постаје мање електронегативан што објашњава

спорије супституционе реакције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекса у односу на $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекс (37).

Увођењем пиридинског прстена у координациону сферу комплекса, као што је код $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ комплекса, постиже се знатно већа реактивност у супституционим реакцијама са сумпор-донорским и азот-донорским лигандима. Већа реактивност комплекса се објашњава електронском комуникацијом пиридинских прстенова и јона метала (39, 40). Осим тога уочава се и π -повратна донација електронске густине са улазног лиганда на хелатни лиганд, што доводи до стабилизације прелазног стања квадратне-бипирамиде у односу на основно стање (41).

Осим што увођење пиридинских молекула у координациону сферу комплекса повећава лабилност комплекса у супституционим реакцијама, долази и до промене pK_a вредности аква комплекса, па се може подешавати и pK_a вредност комплекса (39). То је од посебног значаја у дизајну нових антитуморских комплекса у којима се модификацијом π -акцептора може постићи pK_a која би одговарала pH вредности туморске ћелије (40). Једна од основних разлика туморских од здравих ћелија је управо другачија специфична вредност pH .

Иако овај комплекс има високу реактивност услед електронске интеракције између terpy лиганда и $\text{Pt}(\text{II})$ и волуминозност terpy лиганда има велики утицај на карактеристике овог комплекса. У истраживањима супституционих реакција $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ комплексног јона са различитим тиоетрима и тиолима више пута је потврђена његова нереактивност према тиоетрима, која се, управо, објашњава утицајем стерног ефекта (42). Мада са друге стране у реакцијама $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ комплексног јона са неким S -метил-тиоетрима и тионима могу настати бинуклеарни комплекси платине у којима је мостни лиганд S -метил-група (43). $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ комплексни јон показује велику реактивност према тиолима, што се може објаснити настанком интрамолекуларске водоничне везе између протона са тиолне-групе и одлазећег хлоридо лиганда, чиме се додатно стабилизује прелазно стање (44).

1.3. ФАРМАКОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ЦИСПЛАТИНЕ

Цисплатина своје антитуморско дејство остварује везивањем за молекул ДНК на нивоу једра (45). Након интравенске примене цисплатина брзо дифундује у ткива и у великом проценту се везује за протеине плазме. На основу фармакокинетичких анализа показано је да се чак 90% примењене дозе цисплатине везује за албумин и друге протеине присутне у плазми, што доводи до инактивације лека. До везивања у овако високом проценту долази због велике реактивности и афинитета платине за групе које садрже сумпор или азот у бочним ланцима аминокиселина каква је нпр. цистеин (46).

1.3.1. Механизам проласка цисплатине кроз ћелијске мембране

Механизам којим цисплатина пролази кроз ћелијске мембране није у потпуности разјашњен. Ранија истраживања су указивала да се цисплатина кроз ћелијске мембране креће пасивном дифузијом јер има линеарну кинетику током 60 минута при концентрацији од 1mM (47). Међутим, новија истраживања показују да постоје и други механизми којим цисплатина пролази кроз ћелијску мембрану. Један од потенцијалних механизма је коришћење транспортера за бакар тип 1 (*CTR1* од енгл. - *cooper transporters type 1*). У истраживањима на ћелијским културама квасаца и мишева показано је да као резултат мутације или делеције гена за *CTR1* као резултат настаје повећана резистенција на цисплатину и смањење нивоа цисплатине унутар ћелија (48). Такође је показано да када постоји повећана експресија гена за *CTR1* долази до акумулације лека, али се притом његова ефикасност не повећава (49). Осим што је утврђено да су транспортери за бакар значајни за улазак цисплатине у ћелију, указано је и на чињеницу да су они значајни и за излазак цисплатине из ћелије. *ATP7B* ген кодира синтезу протеина који су део фамилије транспортера за бакар тип-*P*, за чије је функционисање неопходна енергија која се обезбеђује помоћу аденозин трифосфата. Ови транспортери регулишу хомеостазу бакра, значајни су за излазак цисплатине из ћелије као и за настанак резистенције на цисплатину не само *in vitro* него и код различитих карцинома (50-52). Као још један од потенцијалних начина пролазака цисплатине кроз ћелијску мембрану наводи се коришћење Na^+/K^+ -*ATP*-азе. У истраживањима где је коришћен оубаин, инхибитор Na^+/K^+ -*ATP*-азе показано је да се смањује улазак цисплатине у ћелију (53).

1.3.2. Везивање цисплатине за молекулу ДНК – механизам дејства цисплатине

Да би се цисплатина везала за молекулу ДНК неопходно је да цисплатина хлоридо лиганде измени молекулима воде, тј. да награди аква комплекс. С обзиром да је концентрација хлоридних јона у екстрацелуларној течности висока, око 100 mM, овај процес је супримиран. Међутим, када се цисплатина нађе у унутрашњости ћелије где је концентрација хлоридних јона између 2 и 30 mM долази до измене хлоридо лиганда молекулима воде, при чему могу да се замене један или оба одлазећа хлоридна јона из комплекса цисплатине. Као резултат ове замене настају катјони: $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ и $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ (Схема 11). Ови моноаква и диаква комплекси су доста реактивнији према нуклеофилима у односу на цисплатину јер је вода боље одлазећи лиганд од хлоридних јона (54, 55).

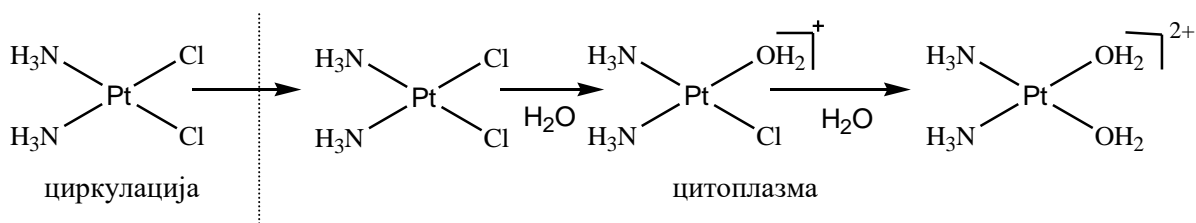


Схема 11. Хидролиза цисплатине

Као што је већ поменуто, цисплатина антитуморску активност остварује везујући се за молекулу ДНК и то углавном за азот у позицији 7 имидазоловог прстена у гуанину или аденину молекула ДНК (56). При интеракцији између цисплатине и молекула ДНК настају различити комплекси који могу бити монофункционални уколико између њих постоји једна веза односно дифункционални уколико постоје две везе. Молекулу цисплатине може дифункционално да се веже за молекулу ДНК на два начина: оба базна пара могу бити из истог ланца и такво везивање се назива унутар ланца (од енгл. - *interstrand*) или за два базна пара који припадају суседним ланцима и тако везивање се назива између ланаца (од енгл. - *intrastrand*). Најчешће, у 60-65% случајева, молекулу цисплатине остварује везе са два гуанина из различитих ланаца 1,2-d(GpG), док у 20-25% случајева остварује везе са једним аденином и једним гуанином из два различита ланца 1,2-d(ApG). У много мањем проценту настају везе типа 1,3 у истим или различитим ланцима (57). Овако настали комплекси спречавају даље процес репликације и транскрипције (58). У истраживањима је уочено да настају и везе између

комплекса ДНК-протеин и молекула цисплатине (59). Сви ти протеини који су испољавали већи афинитет према ДНК молекулима за које је везана цисплатина су у својој структури поседовали сличну или идентичну секвенцу аминокиселина, познату под називом група високе мобилности или *HMG* (од енгл. - *high mobility groups*), стога су и названи протеини са *HMG* доменом (60, 61). У *in vitro* истраживањима је показано да се протеини који имају ове домене везују за молекуле ДНК за који је везан комплекс платине, док је у *in vivo* експериментима утврђено да су ћелије које немају гене за синтезу овог протеина мање осетљиве на цисплатину (62). Мишљења о утицају протеина са *HMG* доменом на појачану цитотоксичност цисплатине су подељена. Према једној теорији сматра се да су бројни протеини који припадају овој групи заправо транскрипциони фактори и да су заслужни за апоптозу ћелија код којих се протеин са *HMG* доменом везао за комплексе цисплатине и молекула ДНК (63, 64). Док са друге стране, друга теорија тврди да долази до настанка везе преко фенил групе између протеина са *HMG* доменом и комплекса платине и молекула ДНК. Услед стварања везе са протеином, он доводи до савијања структуре ДНК при чему се успорава и отежава његов опоравак помоћу ензима, што утиче на нормалне функције ћелије (репликацију, транскрипцију), а уједно се сматра да доводи и до апоптозе (65).

За остваривање антитуморског ефекта је неопходно да су комплекси платине *cis*-изомери. Показано је да *trans*-диаминодихлоридоплатина(II) има слабу цитотоксичност *in vitro*, као и антитуморску активност *in vivo*. Сматра се да је та смањена активност последица немогућности *trans* изомера да граде 1,2-везе између два различита ланца молекула ДНК (66, 67).

1.3.3. Везивање цисплатине за друге биомолекуле

Од укупне примењене дозе цисплатине, свега 5-10% се ковалентно везује за молекуле ДНК. Иако је ово најбитнији механизам за постизање антитуморског дејства не смеју се занемарти интеракције цисплатине са другим молекулима. Након администрације 75-85% од примењене дозе цисплатине се везује за протеине плазме и то за тио-групе у структури аминокиселина (68). Пре него што доспе у ћелију може се везати за фосфолипиде или фосфатидилсерин у ћелијској мембрани, а након што доспе у цитоплазму ћелије постоји велики број молекула за које се може везати. Цисплатина се може везати за било који садржај ћелије у цитоплазми који је нуклеофил, као што су цитоскелетни миофиламенти, пептиди који садрже сумпор, протеини, рибонуклеинска

киселина (РНК) (69). Сходно томе да платински деривати имају висок афинитет везивања за молекуле који у својој структури поседују сумпор, најзначајнија интеракција цисплатине ван интеракције са молекулом ДНК је интеракција са глутатионом (*GSH*). *GSH* је трипептид који се у високој концентрацији налази унутар ћелије (0,5 – 10 mM) (70). *GSH* као и други молекули који садрже тиолне групе се врло лако везују за комплексе платине, што за последицу има развој резистенције и токсичности. Сматра се да комплекс који настаје између цисплатине и *GSH* може послужити као један вид депоа за молекулу цисплатине. Везујући се за атом сумпора у цистеину и/или метионину као и за атом азота у хистидину цисплатина може да утиче на активност рецептора, ензима и других протеина (71).

1.3.4. Индукција оксидационог стреса као механизам дејства цисплатине

Индуковање оксидационог стреса представља још један од показаних механизма којим цисплатина остварује дејство. У физиолошким условима ћелије успевају да успоставе равнотежу између стварања и елиминације реактивних кисеоничних врста *ROS*-а – (од енгл.- *reactive oxygen species*) захваљујући ензимима антиоксидационе заштите (*GSH*, супероксид дисмутаза (*SOD*) и каталаза (*CAT*)). Међутим у условима оксидационог стреса, када постоји повећано стварање *ROS*-а, може доћи до оштећења ћелијских протеина, липида, молекула ДНК. Туморске ћелије су у већој мери изложене оксидационом стресу у односу на здраве из више разлога: стимулација онкогенезе, повећане метаболичке активности и лоше функције митохондрија. Оксидациони стрес такође представља један од најзначајнијих механизма којим цисплатина остварује токсичност на нивоу различитих органа. Оксидационим стресом су у највећој мери захваћене митохондрије, при чему долази до губитка тио-група протеина митохондрија, инхибиције преузимања калцијума и смањења мембранског потенцијала митохондрија (72). Настанак оксидационог стреса може да поремети нормално функционисање ћелије и да доведе до смрти ћелије. До смрти ћелија долази услед активације сигналних путева, где врста сигналних путева која ће се активирати зависи од типа ћелија. У зависности од примењене дозе цисплатине и дужине изложености леку зависи и у којој мери ће настајати *ROS* (73). Интрацелуларна редокс хомеостаза зависи од молекула који садрже тиолне групе (-SH). При одређеним условима од тиолне групе може настати тиорадикал (-S[•]), који даље може интераговати са кисеоником при чему настаје *ROS* (74). Повећана

продукција *ROS* индукује оксидациони стрес који може покренути апоптозу ћелија и спољашњим и унутрашњим путем (75). Код спољашњег пута апоптозе *ROS* настају посредством активације Фас лиганда путем фосфорилације, која је неопходна за даље регрутовање адапторних молекула FADD (од енгл.- *Fas-associated protein with death domain*) и каспазе 8 (76). Код унутрашњег пута апоптозе, *ROS* олакшавају ослобађање цитохрома Ц, тако што активирају протеинске регулаторе (*Bcl-2* и *Bcl-xl*) и инхибирају *Bcl-2* X протеин и *Bcl-2* антагонисте (77). Код повећаних концентрација *ROS*-а осим апоптозе може да настане и некроза ћелија (78). *ROS* може да доведе до ћелијске смрти и посредством аутофагије, што представља катаболички процес који подразумева секвестрацију ћелијских компоненти, истрошених ћелијских органели и агрегата протеина у липозомима (79).

1.3.5. Утицај цисплатине на хомеостазу калцијума

Цисплатина у ћелији измењује хлоридне јоне са молекулима воде, при чему су аква комплекси 1000 пута реактивнији од цисплатине и утичу на фосфорилацију инхибирајући ћелијско дисање путем митохондрија (80). Излазак калцијумских јона (Ca^{2+}) из митохондрија и повећање интрацелуларног нивоа калцијумских јона, значајно утиче на нормалну хемостазу калцијума, а самим тим и на ћелијску функцију. Многобројна истраживања указују да *GSH* који се налази у митохондријама има кључну улогу у регулацији пермеабилности мембране митохондрија. Ензимска функција *GSH* је очувана када се ензим налази у редукованом стању, тј. када је очувана тио-група. Када тио-група глутатион није у редукованом облику онда је ензим неактиван. Сматра се да је токсичност изазвана цисплатином, нарочито нефротоксичност, повезана са смањеном концентрацијом интрацелуларног *GSH* и везивања за тио-групе протеина. Уочено је да се код третмана цисплатином снижава ниво редукованог никотинамид аденин динуклеотида (*NADH*), који је значајан за очување тио-група. Последишно, смањењем нивоа *GSH* и *NADH* инхибирају се одређене дехидрогеназе што за последицу има оксидативну фосфорилацију и повећано стварање хидроксилних радикала и настанак оксидационог стреса. Настали слободни радикали се везују за полинезасићене липиде и протеине и доводе до липидне пероксидације, што за последицу има оштећење интегритета ћелијске мембране (81). Као последица поремећаја хомеостазе калцијума услед третмана цисплатином примарно долази до инхибиције ензима и липидне пероксидације. Услед поменутих

процеса долази до оштећења ћелија кроз оштећење митохондрија, инхибиције функције митохондрија, трошења аденозин трифосфата (АТР-а) и других кофактора. Сви ови процеси највероватније доводе до апоптозе и некрозе.

1.4. НЕЖЕЉЕНИ ЕФЕКТИ ЦИСПЛАТИНЕ И ДРУГИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ У БИОЛОШКИМ СИСТЕМИМА

1.4.1. Нефротоксичност

Елиминација цисплатине путем бубрега представља основни начин екскреције лека из организма, с тога не чуди чињеница да је нефротоксичност забележена код чак 20% пацијената лечених овим цитостатиком. У тубуларним епителијалним ћелијама је забележена пет пута већа концентрација цисплатине у односу на концентрацију лека у серуму што доприноси настанку ове токсичности (82, 83). Код пацијената који су на третману цисплатином штетни ефекти на нивоу бубрега се јављају и акутно и хронично. У акутне штетне ефектне се убрајају смањење протока крви кроз бубреге, хипомагнезијемична, хипокалцемија и хипокалемија (84). Хронични ефекти у многоставно зависе од дозе лека која се примењује, при нижим терапијским дозама долази до снижења клиренса креатинина, а при вишим дозама настају комплекснији поремећаји (смањења гломеруларна филтрација, протеинурија, смањење проксималне тубуларне реапсорпције и др.) (85). *In vivo* цисплатина доводи до нефротоксичности различитим механизмима, који укључују оксидациони стрес, апоптозу, инфламацију и фиброгенезу. Високе дозе цисплатине доводе до некрозе ћелија проксималних тубула, док ниже дозе цисплатине изазивају апоптозу преко каспаза-9 зависног пута (86). На нивоу тубула долази до повећаног стварања *ROS*-а, које директно делују на компоненте ћелија (липиде, протеине, ДНК) и уништавају њихову структуру. Стварање *ROS*-а се одвија посредством ксантин-ксантин оксидаза система, митохондрија и *NADPH* (од енгл.- *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) оксидаза у ћелијама (87). Цисплатина доводи до активације глукозо-6-фосфат-дехидрогеназе и хексокиназе које условљавају повећану продукцију слободних радикала и смањену продукцију антиоксиданаса (88). Цисплатина доводи до повећане интрацелуларне концентрације калцијума који активира *NADPH* оксидазу и повећава продукцију *ROS*-а услед оштећења митохондрија (87). Показано је да су код пацова третираних цисплатином повишене вредности супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), водоник пероксида (H_2O_2) и хидроксил радикала ($\cdot OH$) (89-91).

Ови слободни радикали доводе до липидне пероксидације односно оштећења липидних компоненти мембране тубула и протеина што изазива инактивацију ензима. Слободни радикали, такође, доводе до дисфункције митохондрија (88). Цисплатина инхибира ензиме антиоксидационе заштите (*SOD*, *GSH*-пероксидаза и *CAT*) и измерене концентрације ових ензима су значајно ниже (92, 93). Осим улоге *ROS*-а у нефротоксичности изазваној цисплатином испитивана је и улога реактивних азотних врста *RNS* (од енгл.- *reactive nitrogen species*). У бубрезима пацова који су третирани цисплатином измерене су повећане концентрације пероксинитрита и азот монооксида *NO* (94, 95). Пероксинитрит доводи до оштећења структуре и функције протеина, липидне пероксидације, хемијске модификације молекула ДНК и смањеног капацитета ћелијске одбране услед оксидације тио-група ензима. Са друге стране за *NO* још увек није у потпуности разјашњено да ли он има токсичну улогу у оштећењу бубрега (95).

1.4.2. Ототоксичност

Ототоксичност представља ретко нежељено дејство хемиотерапеутских агенаса. Цисплатина изазива смањење слуха, а може изазвати и потпуни губитак слуха. Инциденца ототоксичности при употреби цисплатине се креће од 23-54% код одраслих особа и око 50% код деце (9). У истраживањима је показана да је настанак ототоксичности повезан са настанком оксидационог стреса (96). Када се код експерименталних животиња примени ототоксична доза цисплатине долази до трошења ензима антиоксидационе заштите (супероксид-дисумтазе, каталазе, глутатион-редуктазе, глутатион-пероксидазе) у кохлеарном ткиву, уз пораст нивоа малонилалдехида. Сматра се да је *NADPH*-оксидаза присутна у кохлеи одговорна за настанак слободних радикала (97).

1.4.3. Хепатотоксичност

Високе дозе цисплатине могу довести и до настанка хепатотоксичности (98). Сматра се да је као и код осталих типова токсичности изазваних применом цисплатине и овде повећан настанак оксидационог стреса основни узрок токсичности. У истраживањима је показано да се смањују нивои глутатион редуктазе, а да расте ниво малониладехида у хепатичном ткиву (99, 100). Токсичност на нивоу јетре је потврђена детекцијом високих нивоа трансaminaза у циркулацији. Пораст нивоа ензима јетре у серуму уз пораст нивоа билирубина јасно указују на оштећену функцију јетре (101). На хистопатолошким пресецима се уочава некроза и дегенерација хепатоцита уз инфилтрацију инфламаторних ћелија (102).

1.4.4. Кардиотоксичност

Приликом терапијске примене цисплатине јавља се акутна и кумулативна кардиотоксичност која подразумева: електрокардиографске промене, ангину, акутни инфаркт миокарда, хипертензију, хипотензију, аритмије, миокардитис, кардиомиопатије и конгестивну срчану слабост. (103, 104) Такође је показано да је употреба цисплатине повезана са повећаним ризиком за настанак тромбоза (105).

Цисплатина изазива кардиотоксичност тако што директно остварује токсично дејство на кардиомиоците или доводи до појачане продукције слободних радикала и настанка оксидационог стреса и повећаног ризика за настанак тромбоза (106). На једном од анималних модела *El-Awady* и сарадници су показали да примена цисплатине доводи до значајног пораста нивоа кардијалног тропонина (*cTn*), који је повезан са порастом нивоа малонилалдехида као и значајним смањењем нивоа антиоксиданаса (*GSH*, *SOD*) и оштећењем ДНК у једру и митохондријама (107). Са друге стране, *Ma* и сарадници су показали да примена цисплатине може довести до дисфункције леве коморе и депресије контрактилности кардиомиоцита. Механизам овог дејства цисплатине на функцију миокарда је објашњен настанком ендоплазматско-ретиклуларног (ЕР) стреса и апоптозе услед оштећене структуре митохондрија (108). У даљим истраживањима је показано да су повећана продукција и ослобађање слободних радикала одговорни за настанак кардиотоксичности услед примене цисплатине, а нарочито се издваја повећана продукција супероксид анјон радикала, хидроксил радикала и водоник пероксида (107, 109). Као одговор на ЕР

стрес, долази до повећаног стварања *GRP78* (од енгл.- *78-kDa glucose-regulated protein*) централног регулатора хомеостазе ЕП који је главни антиапоптотски протеин у сигналној каскади, која се активира у одговору на присуство неправилно савијених протеина. Услед тога долази до започињања апоптозе која је индукована активацијом *CHOP* и/или *c-JUN-NH2* - терминалних киназа (*JNK*) и/или активацијом каспаза-12 зависног пута (110, 111). Због повећаног стварања *ROS*-а може доћи до повећане инфламације и то кроз активацију *NF-κB*, повећано стварање проинфламаторних цитокина као и фактора некрозе тумора алфа *TNF-α* (од енгл.- *tumor necrosis factor*) и хемокина као што је моноцит хемотаксни протеин-1 (*MCP-1*) (112). Осим што *NF-κB* доводи до инфламације, активирајући програмирану ћелијску смрт, он доводи и до повреде миокарда (113). Оксидациони стрес може да доведе до апоптозе кардиомиоцита што за последицу има оштећење срчаног ткива (114). Као још један од механизма којим цисплатина доводи до кардиотоксичности помиње се способност овог молекула да доведе до активације тромбоцита и агрегације, прокоагулантне активности моноцита и оштећења ендотела ћелија (115). Уз то показано је да цисплатина може да повећати нивое *von Willebrand*-овог фактора, довести до хипомагнезмије и вазоспазма и активирати антиангиогену активност (116-118). *Al-Majed* и сарадници су на анималном моделу показали да након примене цисплатине долази до липидне пероксидације мембране кардиомиоцита. Услед оштећења кардиомиоцита долази до „цурења“ лактатдехидрогеназе и креатининкиназе. Хистолошким анализама је уочено да долази до дегенерације и некрозе ћелија срчаног мишића, уз појаву вакуола на нивоу цитоплазме и инфилтрата на крвним судовима (119).

У студији која је пратила преживљавање и компликације код пацијената са карциномом тестиса лечених цисплатином показано је и да након двадесет година од завршетка третмана може да се детектује одређен ниво цисплатине у плазми и да су они у повећаном ризику за настанак инфаркта миокарда (120). Код ових пацијената је била присутна дисфункција ендотелијалних ћелија, које су биле одвојене од зидова крвних судова (121). Инфаркт миокарда се десио код 6% ових пацијената, што указује на велику интерперсоналну варијабилност у настанку нежељених ефеката након третмана цисплатином (122, 123).

1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Оксидациони стрес се дефинише као природни физиолошки процес који се у биолошким системима дешава када присуство слободних радикала надмаши способности механизма антиоксидационе заштите и на тај начин се ствара дисбаланс између оксиданаса и антиоксиданаса.

Оксидациони стрес представља стање повишених концентрација реактивних кисеоничних врста, које се физиолошки контролишу концентрацијом кисеоника, сигналним трансдукционим путевима и одржавањем редокс хомеостазе. Поред реактивних кисеоничних врста и реактивне азотне врсте су одговорне за настанак оксидационог стреса. У литератури се помиње да све ове реактивне врсте имају значајну улогу у одржавању хомеостазе ћелије за нормално функционисање ткива, као секундарни гласници и у регулацији функције ћелије међајући сигналне путеве (124).

Повећана продукција реактивних врста, као и смањена концентрација антиоксиданаса (ензима и других молекула са антиоксидационим потенцијалом) доводи до дисбаланса у еквилибријуму прооксиданаса и антиоксиданаса који може довести до настанка бројних поремећаја. Реактивне кисеоничне врсте регулишу дивергентне ефекте ћелијске функције као што су: ћелијски раст и диференцијација ћелија, фактор ћелијског раста, митогени одговор, апоптоза, продукција екстрацелуларних компоненти, инактивација азот монооксида, стимулација проинфламаторних гена и бројних киназа (125).

1.5.1. Слободни радикали

Moes Gomberg је пре више од сто година по први пут описао слободне радикале (126). Дуго се веровало да због своје високе реактивности и кратког полувремена живота они не перзистирају у биолошким системима. Међутим, тридесет година касније *Leonor Michaelis* износи тврдњу да су све оксидационе реакције органских молекула посредоване слободним радикалима (127). Свакако ова тврдња није у потпуности тачна међутим навела је истраживаче да детаљно проуче улогу слободних радикала у биолошким процесима. Средином прошлог века откривено је присуство слободних радикала у биолошким системима и одмах се посумњало да они имају значајну улогу у патолошким процесима и старењу (124, 128, 129). Слободни радикали су означени као штетне супстанце, а ову тврдњу је ојачало откриће *McCord*-а и

Fridovich-а који су описали први ензим који служи за заштиту организма од слободних радикала, назван супероксид-дисмутаза (130). Након овог уследила су два јако битна открића везана за улогу слободних радикала у биолошким процесима. Прво откриће се односило на улогу слободних радикала у борби имуног система против инфективних узрочника (131). Док се друго откриће односило на синтезу азот монооксида из л-аргинина од стране ендотелних ћелија васкуларног система (132, 133). Ова открића су покренула лавину других истраживања везаних за слободне радикале, њихову функцију и сигналне путеве у којима учествују (134, 135). Данас је јасно да слободни радикали имају врло значајну улогу како у патогенизи бројних болести тако и у нормалном функционисању живих организама.

Слободни радикали се дефинишу као молекули који поседују један или више неспарених електрона у орбити. Молекулски кисеоник има два неспарена електрона, док азот моноксид има један неспарени електрон и као такви могу перзистирати независно. У хемијским реакцијама може доћи до трансфера неспарених електрона при чему настају нови слободни радикали. Ћелије користе кисеоник за стварање енергије при чему настају слободни радикали као резултат стварања *АТФ*-а у митохондријама (136). Слободни радикали постају део пропагационих ланчаних реакција где се они комбинују са другим радикалима при чему настају много токсичније врсте, осим ако се овај ланац реакција не прекине антиоксидансима и настану нетоксичне врсте (136). Слободни радикали имају веома кратак полуживот (мери се у мили, микро, наносекундама) и спремно реагују са липидима, молекулом ДНК, протеинима при чему настају веома штетни производи као што су липидни пероксиди и други липидни производи. Интеракцијом слободних радикала са протеином долази до губитка ензимске активности, док услед интеракције са молекулом ДНК долази до мутагенезе и карциногенезе (137).

1.5.2. Реактивне кисеоничне врсте

Кисеоник је есенцијални елемент за аеробно преживљавање, међутим он може бити токсичан чак и при атмосферским концентрацијама. У живим организмима при аеробним условима више од 90% кисеоника се редукује до воде у присуству цитохром-оксидазе без стварања реактивних кисеоничних врста (138). Међутим, преостали проценат молекуларног кисеоника се може редукovati стварајући супероксид анјон

радикал ($O_2^{\cdot -}$), који даље може да изгуби један електрон и прими два протона градећи водоник пероксид (H_2O_2) (Схема 12).

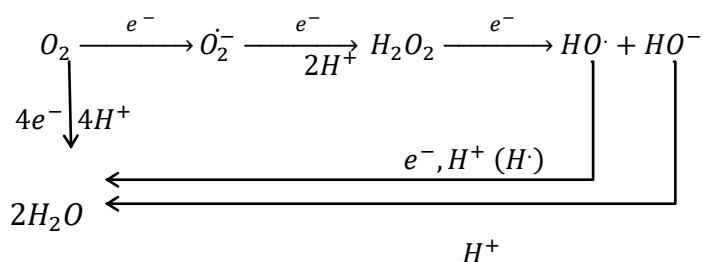


Схема 12. Настанак реактивних кисеоничних врста

Овако настали водоник пероксид није слободни радикал, али је хемијски доста реактивнији од молекуларног кисеоника па се убраја у *ROS*. Водоник пероксид даље може да прими још један електрон при чему од њега настају хидроксил радикал (HO^{\cdot}) и хидроксил анјон (HO^-). Овако настали хидроксил радикал интерагује са једним електроном и протоном, а хидроксил анјон са једним протоном стварајући молекуле воде. У биолошким системима у овој реакцији углавном учествују водоникови атоми из протеина и липида што условљава иницијацију ланчаног процеса.

Као што је већ објашњено супероксид анјон радикал настаје тако што молекуларни кисеоник прими један електрон. Ова реакција је посредована *NADPH* оксидазом; ксантин оксидазом или електрон-транспортним системом митохондрија (139). Митохондрије чија је основна функција стварање *ATP*-а представљају највећег посредника за продукцију $O_2^{\cdot -}$. Супероксид анјон радикал се посредством супероксид дисмутазе преводи у водоник пероксид, који такође може настати посредством ксантин оксидазе, аминокиселинске оксидазе, *NADPH* оксидазе, као и у пероксизомима при метаболичким реакцијама (140).

Заштита биолошких ораганизама од *ROS*-а је посредована високо сложеним процесима елиминације посредством антиоксидационог система заштите. Антиоксиданси се према молекулској маси деле у две велике категорије: антиоксиданси са малом молекулском масом (најчешће је молекулска маса мања од 1 kDa) и антиоксиданси са великом молекулском масом (молекулска маса већа од 1, а најчешће и од 10 kDa). Највећи број антиоксиданаса мале молекулске масе живи организми уносе путем хране и то су: аскорбинска киселина (витамин Ц), токоферол (витамин Е), полифеноли, мокраћна киселина и каротеноиди. Али неке од њих и сами

синтетишу, пример је трипептид глутатион који учествује у контроли *ROS*-а директно везујући се за *ROS* или индиректно као кофактор у ензимским реакцијама детоксикације (141). Последњих година много већа пажња је усмерена на проучавање антиоксиданаса велике молекулске масе. Као што је већ раније поменуто, прво велико откриће у овој области било је проналазак и карактеризација ензима супероксид-дисмутазе који каталише реакцију стварања водоник пероксида (**Схема 13**).

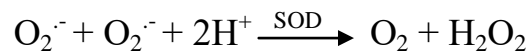


Схема 13. Стварање водоник пероксида

Овако настали водоник пероксид у присуству каталазе (*CAT*) може да подлегне дисмутацији (редукцији и оксидацији) при чему настају вода и молекуларни кисеоник (**Схема 14**) или да се редукује у присуству различитих пероксидаза као што је глутатион-зависна пероксидаза (*GSH-Px*) (**Схема 15**).

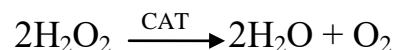


Схема 14. Дисмутација водоник пероксида



Схема 15. Редукција водоник пероксида

Као што се и види из претходно објашњених реакција, антиоксиданси велике молекулске масе посредују у заштити од $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 али не и у заштити од HO^{\cdot} . Још увек нису познати ензими који учествују у елиминацији HO^{\cdot} , сматра се да је најбољи начин да се организам заштити од ових радикала заправо спречавање њиховог настанка. Сматра се да су за спречавање њиховог настанка одговорни антиоксиданси мале молекулске масе (глутатион, токоферол, аскорбинска киселина). Мале количине *ROS*-а које успеју да избегну дејство антиоксиданаса могу да доведу до оштећења компонената ћелија и настанка оксидационог стреса.

Јони тешких метала могу представљати један од егзогених извора за настанак слободних радикала. Ови јони доводе до оштећења ћелија услед инактивације ензима, везивања за протеине, молекул ДНК и липидне пероксидације (142). Метални јони

доведе до стварања слободних радикала кроз *Fenton* или *Haber-Weiss* реакцију (Схема 16 и 17).



Схема 16. *Fenton* реакција

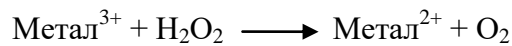


Схема 17. *Haber-Weiss* реакција

Поред механизма који подразумевају ове две реакције, јони метала могу да се везују директно за молекуле унутар ћелије и да стварају слободне радикале, као што су тиол радикали или да активирају сигналне путеве ћелија. Овако настали радикали могу даље интераговати са другим тиолним молекулима да створе O_2^- . На већ раније описан начин долази до превођења O_2^- до водоник-пероксида, који опет доводи до стварања нових кисеоничних радикала (143). Јони тешких метала могу инхибирати антиоксидационе ензиме, нпр. глутатион-С-трансферазу, глутатион-пероксидазу и глутатион редуктазу везујући се за њихове сулфхидрилне групе (144). Такође, јони тешких метала могу довести до липидне пероксидације (145). Могу заменити јон цинка, кофактор бројних ензимских реакција, услед чега долази до инактивације цинк-зависних ензима као и до везивања за базе у молекулу ДНК (146).

1.5.3. Реактивне азотне врсте

Захваљујући интензивном изучавању азот монооксида и његових метаболита, настао је нови термин реактивне азотне врсте (147, 148). *RNS* је термин који се користи за већи број азотних једињења: азот монооксид радикал (NO^\cdot), пероксинитрит (ONOO^-), азот диоксид радикал (NO_2^\cdot), као и бројни други оксиди азота и производа насталих у реакцији NO^\cdot са O_2^- , RO^\cdot и $\text{N}^\cdot\text{NO}^\cdot$ (133). NO^\cdot је 1980. године окарактерисан као вазодилататорна супстанца коју секретује ендотел (132). Након овог открића интересовања научника за истраживање овог молекула и његових улога расту тако да је 1992. године проглашен молекулом године (149). Пар година потом *Furchgott*, *Ignaro* и *Murad* су добили Нобелову награду за Физиологију и Медицину због открића да NO^\cdot има значајну улогу у кардиоваскуларном систему као сигнални молекул (150, 151).

Овај молекул има значајну улогу за преношење сигнала до ћелије, као вазодилататор и у имунском одговору. Високо је реактиван, неналектрисан и поседује један неспарени електрон, па се зато сматра слободним радикалом. Полуживот овог молекула је 15 секунди, врло лако дифундује кроз мембране захваљујући томе што није наелектрисан. Овај молекул настаје посредством азот моноксид синтазе *NOS* (од енгл- *nitric oxide syntase*) где се L-аргинин и кисеоник преводе до NO^\cdot и цитрулина кроз оксидационе процесе. Постоје три различите изоформе *NOS* ензима: *nNOS* се налази у неуронима, *eNOS* у ендотелним ћелијама и *iNOS* у макрофагима. Ове реакције захтевају присуство многих кофактора као што су *FAD*, *FMN*, *NADPH*, тетрахидробиоптерин и хем (**Схема 18**) (152, 153).

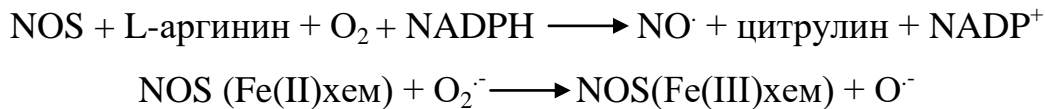


Схема 18. Настанак азот моноксид радикала

У биолошким системима извор свих *RNS* је азот моноксид. Као што је већ поменуто у реакцији између азот моноксида и супероксид анјон радикала настаје пероксинитрит, који даље доводи до различитих реакција: оксидације, нитрозације (адисија NO) или нитрација (адисија NO_2). Пероксинитрит је изузетно нестабилан у физиолошким условима и врло лако изомеризује до нитрата. Сходно томе да су нитрати инертни у ћелијама сисара, онда сматрало се да је ова реакција врло значајна за неутрализацију супероксид анјон радикала (154). Међутим, новија истраживања су показала да пероксинитрит може да ступа у интеракције са великим бројем макромолекула и да доведе до цитотоксичности (155). Пероксинитрит је медијатор у електрон-трансфер реакцијама при чему настају слободни радикали. Као такав ступа у интеракције и са липидима и може да доведе до иницијације реакција пероксидације (156). Пероксинитрит ступа у интеракције са протеинима мале молекулске масе као и са протеинима који имају тио-групе при чему настају тио-радикали, који се лако оксидују. Сходно томе да *GSH* поседује тио-групе, показано је да је везивање глутатиона за пероксинитрит најважнији механизам за заштиту од оксидационог стреса (157). У овој реакцији настаје S-нитрозоглутатион, донор NO -а, који је значајан као сигнални молекул у ћелијским реакцијама (158).

1.5.4. Липидна пероксидација

Липидна пероксидација представља један од основних молекулских механизма оксидационог стреса. Овај процес доводи до оштећења структуре ћелија и ћелијске смрти. Липидна пероксидација представља комплексан процес који се дешава и код биљака и животиња. Овај процес обухвата стварање и пропацију слободних радикала, ресорпцију кисеоника, премештање двогубих веза у незасићеним мастима и разарање липидних мембрана, при чему настају алкохоли, кетони, алкани, алдехиди и етри (159).

Липидна пероксидација подразумева ланчане реакције које настају услед одузимања водоника или додавања кисеоничних радикала при чему долази до оксидационе промене полинезасићених масних киселина *PUFAs* (од енгл. *polyunsaturated fatty acids*). Сходно чињеници да су полинезасићене масне киселине реактивније од засићених масних киселина, очигледно је да ће активирани метиленска група (RH) бити циљно место за оксидационе промене. Присуство суседне двогубе везе метиленској групи, чини C-H везу слабијом и повећава се могућност за одлазак водоника из метиленске групе. Услед „одласка“ водоника, остаје један неспарен електрон на угљенику при чему настаје угљенични радикал (R[•]) (Схема 19), који може да се стабилизује премештањем двогубе везе.



Схема 19. Настанак угљеничног радикала

Услед премештања двогубе везе настаје коњуговани диен који реагује са молекулским кисеоником стварајући липидни пероксил радикал (ROO[•]) (160) (Схема 20).

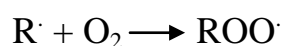


Схема 20. Настанак липидног перокси радикала

Липидни пероксиди у присуству јона прелазних метала се разграђују до алкокси (RO[•]) и хидрокси (HO[•]) радикала и ово представља фазу иницијације липидне

пероксидације. Стварање перокси радикала даље иницира стварање хидропероксида који могу одузети водоник следећој полинезасићеној масној киселини и ово представља фазу пропације липидне пероксидације. Ова фаза се зове пропација јер мали број слободних радикала може да изазове промену великог броја *PUFA* до липидних хидропероксида. У овој фази могу да учествују алкил, перокси и алкокси радикали, у зависности од њиховог присуства. Липидни хидропероксиди (ROOH) представљају први стабилан производ у реакцији липидне пероксидације (160) (Схема 21).

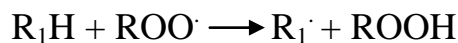


Схема 21. Настанак липидних хидропероксида

Осим липидних хидропероксида настају различити алдехиди, међу којима се посебно издвајају малонилдиалдехид *MDA* (од енгл.- *malondialdehyde*), пропанал, хексенал и 4-хидроксиноненал *4-HNE* (од енгл.- *hydroxynonenal*) (161). Показано је да је *MDA* најмутагенији производ липидне пероксидације, док је *4-HNE* најтоксичнији (162). *MDA* се користи као поуздан биомаркер липидне пароксидације омега-3 и омега-6 масних киселина, јер врло лако ступа у реакцију са тиобарбитурном киселином *TBA* (од енгл.- *thiobarbituric acid*) (163).

У реакцији Fe^{2+} јона са липидним пероксидима настају алкокси радикали (Схема 22), док Fe^{3+} јон реагује спорије при чему настају перокси радикали (Схема 23).

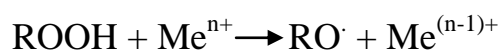


Схема 22. Настанак алкокси радикала

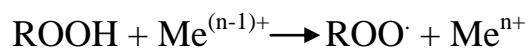


Схема 23. Настанак перокси радикала

Овако настали слободни радикали, алкокси и пероксил, учествују у пропацији, при чему као крајњи производи настају липидни хидропероксиди, цитотоксични алдехиди и угљоводонични гасови као што је етан (160). Ова ланчана реакција се завршава фазом која се назива терминација, а настаје када дође до

коњугације два слободна радикала или када дође до везивања слободног радикала са антиоксидансом какав је нпр. витамин Е (**Схема 24**).

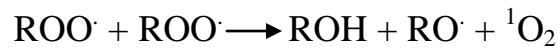


Схема 24. Фаза терминације липидне пероксидације

Услед липидне пероксидације оштећује се ћелијска мембрана, јер је већином састављена од полинезасићених масних киселина, при чему се смањује њена пропустљивост и функција. Производи настали липидном пероксидацијом инхибирају синтезу протеина, функцију макрофага и функцију ензима (164).

Липидна пероксидација може бити ензим-катализована или се може одиграти без присуства ензима. Ензим-катализована липидна пероксидација се дешава у присуству липооксигеназа, који учествују у оксидацији слободних и естерификованих полинезасићених масних киселина. Као резултат ове липидне пероксидације настају перокси радикали. Са друге стране липидна пероксидација без ензима захтева присуство молекулског кисеоника и редукованог гвожђа, при чему настају липидни пероксиди (165).

1.5.4.1. Неензимска липидна пероксидација

Ова врста липидне пероксидације се назива и аутооксидација, јер присуство слободних радикала доводи до иницијације аутооксидације (**Схема 25**). Ова врста липидне пероксидације је карактеристична за фосфолипиде који у својој структури садрже *PUFA*, као што су арахидонска и линоленска киселина (165).

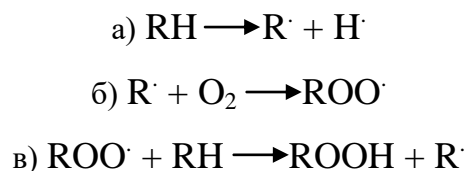
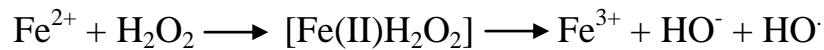


Схема 25. Аутооксидација

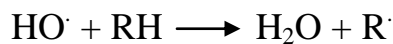
а) иницијација, б)пропагација и в)терминација

1.5.4.2. Липидна пероксидација иницирана ROS-ама

Реактивне кисеоничне врсте, $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 могу довести до иницијације липидне пероксидације у аеробним ћелијама сисара. При ниским концентрацијама H_2O_2 , Fe^{2+} доводи до разградње липидних пероксида при чему настају пероксил и алкоксил радикал и фаворизује се липидна пероксидација (166) (Схема 26).

**Схема 26.** Иницијација липидне пероксидације ферил-интермедијером

Реакција иницијације је посредована или ферил-интермедијером или HO^{\cdot} , јер оба ова једињења имају потенцијал да одузму водоник из незасићене масне киселине и да формирају алкил радикал (166) (Схема 27).

**Схема 27.** Иницијација липидне пероксидације хидроксил радикалом

1.5.4.3. Липидна пероксидација иницирана RNS-ама

Незасићене масне киселине су подложне реакцијама оксидације које су инициране RNS-ама. Деривати азот монооксида дифундују кроз ћелијске мембране и брзо интерагују са масним киселинама и липидним пероксил радикалима, стварајући оксидоване и нитроване производе слободних липида (арахидонска киселина, арахидон-олеат, линолеат) и естерификованих липида (холестерил-линолеат).

Липидна нитрација *in vivo* укључује бројне механизме: а) аутооксидацију NO до нитрита, б) електрофилну адицију деривата NO на незасићене масне киселине, в) радикалску реакцију између ROO^{\cdot} и NO, г) оксидацију посредовану пероксинитритом, реакције нитрације и нитрозације.

Азот монооксид и радикали изведени из NO-а реагују са масним киселинама стварајући оксидоване и нитроване врсте као што су нитроалкени и нитроалкохоли (167).

1.6. КАРАКТЕРИСТИКЕ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ СИСТЕМА

Кардиоваскуларни систем примарно представља срце, крвне судове и крв. Основна улога кардиоваскуларног система је транспорт кисеоника, хранљивих материја, воде и минерала до свих ћелија у организму, као и елиминација штетних ендогених или егзогених материја путем бубрега, плућа и коже. Функције свих ћелија у организму повезује кардиоваскуларни систем јер се путем циркулације преносе метаболити, хормони, антитела, фактори коагулације и сл (168).

Срце је централни орган кардиоваскуларног система, а захваљујући његовом аутоматизму и ритмичкој активности обезбеђује се континуирани ток крви. Како би срце остварило улогу пумпе и како би могло неуморно ритмично да ради потребна је обилна исхрана срца хранљивим супстратима као што су глукоза, масне киселине и протеини, као и снабдевање миокарда кисеоником (169).

Срце је шупљи попречно пругасти мишић који се анатомски може поделити на леву и десну страну, тј. леву и десну пумпу. Са леве стране су смештене лева преткомора и лева комора које покрећу циркулацију крви кроз велики крвоток. Артеријска крв, крв обогаћена кисеоником, из плућа доспева у леву преткомору из које даље доспева у леву комору, а потом кроз аорту у системску циркулацију. Са десне стране налазе се десна преткомора и комора у које доспева крв сакупљена венском циркулацијом и која одатле одлази у плућа малим крвотоком (170).

Срце је изграђено од три слоја: епикарда, ендокарда и миокарда. Епикард окружује радну мускулатуру срца споља и има заштитну улогу. Ендокард је састављен од ендотела, субендотелног везивног ткива и мишићно-еластичног слоја и представља омотач који обавија срчане шупљине и све избочине које се ту налазе. Миокард, односно срчани мишић је састављен од попречно-пругастих мишићних влакана. Када се посматра функционални аспект, ћелије миокарда се деле на: ћелије специјализоване за контракцију и ћелије специјализоване за стварање и спровођење импулса. Кардиомиоцити су ћелије радне мускулатуре срца и састављени су од густо пакованих контрактилних миофибрила. Свака од миофибрила је састављена од низа понављајућих саркомера, које представљају основну структуру и функционалну јединицу контракције. Осим миофибрила (чине 50% масе ћелија) већински саставни део миокардиоцита чине и митохондрије (25-30%), одговорне за процес оксидативне фосфорилације. Миофибриле, односно саркомере су сачињене од контрактилних

протеина: миозина ($\approx 40\%$), актина ($\approx 20\%$), титина ($\approx 10\%$), небулина ($\approx 5\%$), птопомиозина ($\approx 5\%$), тропонина ($\approx 5\%$), Ц-протеина ($\approx 5\%$), М-протеина, α -актина и β -актина. Ћелије специјализоване за стварање и спровођење импулса су подељене у три групе: *P*-ћелије, прелазне ћелије и Пуркињеове ћелије. Све ове ћелије су једноставније грађе у односу на контрактилне ћелије и чине основу спроводног ткива срца (синатријалног (*SA*)-чвора, интератријалног и интернодалних проводних путева, атриовентрикуларног (*AV*)-чвора, Хисовог снопа и Пуркињеове мреже) (169, 171).

1.6.1. Регулација срчаног рада

Срце се константно налази у стању наизменичне раздражљивости и рефрактарности, тј. стално се смењују контракција и релаксација. Прво долази до контракција преткомора (систола преткомора), а потом следи контракција комора (систола комора), а након контракције следи релаксација (дијастола) када су и коморе и преткоморе срца опуштене. *SA* чвор је предводник срчаног ритма, и фреквенција његовог окидања одређује фреквенцију срчаног рада. Импулси настали у *SA* чвору кроз атријумске путеве долазе до *AV* чвора, из овог чвора доспевају у Хисов сноп и кроз гране овог снопа даље до Пуркињеовог система и на крају до мишића коморе. Различити делови спроводног система, а у патолошким стањима и делови миокарда, способни су за спонтано окидање импулса. Ипак, *SA* чвор нормално окида најбрже, а деполаризација се од њега шири до осталих делова пре него што у њима дође до спонтаног окидања импулса. Након што дође до преношења импулса (ексцитације) да би се десила контракција неопходне су адекватне концентрације електролита (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) Динамички догађаји повезани са контракцијом и релаксацијом срца се означавају појмом кардиодинамике (168).

Регулација контрактилности (инотропни ефекти) се остварује на нивоу физиологије органа, ћелијском нивоу и нивоу гена. Када се прича о регулацији контрактилности на нивоу органа може се рећи да снага срчане контракције зависи од почетне дужине мишићних влакана, док почетна дужина мишићних влакана зависи од венског прилива, тј. волумена на крају дијастоле. Регулација ни нивоу ћелија подразумева способност ћелија да мењају функционисање тј. да се прилагођавају различитим условима. Промене у динамици јона калцијума у екстрацелуларној течности, цитосолу, ендоплазматском ретикулуму и митохондријама играју главну улогу у повезаности ексцитације и контракције миокарда. Дејства јона калцијума

су индиректна и остварују се кроз хиперполаризацију мембране и промене у трајању акционог потенцијала. Регулација на нивоу гена подразумева контролу експресије гена и могућност да се на тај начин срце прилагоди патофизиолошким условима (171).

Релаксација срца је регулисана лузитропним ефектима и зависи од већег броја фактора. Са једне стране зависи од стања фиброзног скелета срца, перикарда као и од геометрије и дебљине зидова коморе, док са друге стране зависи од физиолошко-биохемијских варијабли. У ове варијабле се убрајају брзина дисоцијације контрактилних протеина, пумпање јона калцијума у саркоплазматски ретикулум и смањење афинитета калцијума за тропонин. Затварањем семилунарних залистака аорте и почетком дијастоле миокард креће да се релаксира, и ова фаза је названа изоволуметричка релаксација. Након отварања митралне валвуле наступају остале фазе дијастоле (фаза брзог пуњења, дијастаза и пресистолна фаза) које воде у изотоничку релаксацију чиме је омогућен венски прилив крви за наредну контракцију (169).

1.6.2. Регулација коронарног протока

Две велике коронарне артерије (лева и десна) заједно са њиховим гранама омогућавају исхрану срца оксидованом крвљу. Исходиште ове две артерије се налази изнад Валсавлиног синуса, док се разгранато стабло дели на: велике коронарне артерије (смештене изнад миокардног зида у субепикардном масном ткиву) и мале десцедентне артерије (смештене у миокарду у непосредној близини мишићних влакана).

Ове две артерије пролазе кроз површину епикарда срца, док се мање гране налазе у делу од епикарда према ендокарду. Међусобно су повезане хетероколлатералама, кроз које у физиолошким условима пролази мала количина крви, а када постоји компромитована перфузија миокарда могу да омогуће проток велике количине крви. На коронарни проток утичу перфузиони притисак и резистенција протока крви. Такође осцилације коронарног протока зависе од цикличне акције срца, односно разликује се коронарни проток током систоле и дијастоле. На резистенцију коронарних крвних судова утичу спољашњи фактори (компресионе силе унутар миокарда) и унутрашњи фактори (метаболички и хуморални). Сходно чињеници да је вентрикуларни притисак доста већи током систоле него током дијастоле, сам ефекат екстраваскуларне компресије на мале крвне судове унутар миокарда је већи током систоле. Због тога се највећи део протока крви, нарочито кроз леву комору, остварује

током дијастоле. Свака значајнија промена фреквенце срчаног рада условљава промене у трајању срчаног циклуса што значајно утиче и на проток. Унутрашња резистенција је углавном одређена тонусом циркулаторних глатких мишића коронарних артериола. На коронарни тонус утичу: метаболички вазодилататорни систем; неурогени контролни систем (вазоконстрикторни и вазодилататорни) и васкуларни ендотел (може деловати вазоконстрикторно и вазодилататорно). Сматра се да је метаболички контролни систем најважнији за одржавање коронарног протока, јер при сваком дисбалансу између потребе и снабдевености ткива кисеоником долази до локалног ослобађања медијатора и модератора коронарног протока (170).

1.6.3. Ефекти реактивних кисеоничних врста на кардиоваскуларни систем

1.6.3.1. Ефекти на ендотелне ћелије

Реактивне кисеоничне и азотне врсте утичу на бројне функције ендотела. Најпознатија улога ових реактивних врста је у ендотел-зависној вазорелаксацији, која је умањена услед губитка биоактивности NO у зидовима крвних судова. Ове реактивне врсте утичу на апоптозу ендотелних ћелија, повећавају адхезију моноцита и играју значајну улогу у ангиогенези (172). На анималним моделима код различитих болести је показано да до ендотелне дисфункције долази услед инактивације NO посредством O_2^- (173). Услед излагања ендотелних ћелија дејству O_2^- и H_2O_2 долази до програмиране ћелијске смрти (апоптозе), што доводи до губитка ендотелних ћелија и настанка атерогенезе и прокоагулативног стања (174). Показано је да је апоптоза стимулирана оксидованим *LDL*-ом, ангиотензином II, високим нивоима глукозе, *TNF*-ом α , а да је инхибирана *SOD*-ом, каталазом и витаминима који имају антиоксидационе способности (витамин Е, Ц и А), што додатно потврђује чињеницу да су реактивне врсте укључене у патогенезу апоптозе. Други тип програмиране ћелијске смрти аноксис је такође посредована реактивним врстама које стварају митохондрије а инхибирана је молекулима који имају антиоксидационо дејство (175). У физиолошким условима ендотел је инертан на дејство проинфламаторних молекула. Међутим, у патолошким условима долази до стимулације експерсије адхезивних молекула на површини ендотела, при чему долази до адхезије моноцита и стварања атеросклеротских лезија. Експерсија адхезионих молекула, *VCAM-1* и *ICAM-1* зависи од реактивних кисеоничних а азотних врста (176). NO може да смањи експерсију

VCAM-1 стимулисану *TNF*-ом α и због своје антиоксидационе природе може да веже слободне радикале при том спречавајући настанак перокси-масних киселина (177). Експресија адхезионих молекула је такође инхибирана дејством *N*-ацетил-цистеина (*NAC*) (178). Узимајући у обзир претходно изнешене тврдње може се закључити да реактивне врсте унапређују адхезију инфламаторних ћелија. Показано је да су реактивне врсте значајне и у процесима ангиогенезе, јер H_2O_2 изазива пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија, а ови процеси представљају основу ангиогенезе. Ангиогенеза није само значајна у развоју ембриона и зарастању рана, већ и у бројним патолошким стањима (тумори, дијабетесне ретинопатије, атеросклероза) (179).

1.6.3.2. Ефекти на васкуларне глатке мишићне ћелије

Велики број функција васкуларних ћелија глатких мишића (*VSMC*) зависи од ослобађања слободних радикала. Једна од најистраженијих улога је утицај на ћелијски раст. Показано је да *ROS* доводе до хипертрофичног и пролиферативног раста *VSMC*. Позната је чињеница да ангиотензин II може да доведе до *VSMC* хипертрофије, што је искоришћено да се утврди веза између *ROS* и хипертрофије. Бројна истраживања сведоче о томе да каталаза инхибира ову функцију ангиотензина II што објашњава повезаност између слободних радикала и хипертрофије *VSMC* (180). H_2O_2 индукује пролиферацију *VSMC*, али она зависи од концентрације водоник-пероксида (181), при високим концентрацијама $500\mu\text{mol}/\text{dm}^3 - 1\text{mmol}/\text{dm}^3$ долази до апоптозе, док при средњим концентрацијама $100\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ долази до заустављања ћелијског циклуса у фази G1 (182). Осим што *ROS*-е утичу на пролиферацију *VSMC* оне утичу и на апоптозу и диференцијацију. *Li* и сарадници су показали да до апоптозе *VSMC* долази услед изложености различитим агенсима, кроз стварање хидроксил радикала (183). Значајна је улога реактивних врста и у миграцији *VSMC* као и у регулацији матрикса (деградација и реорганизација екстрацелуларног матрикса) (184). Још једна од врло битних функција *ROS*-а на васкуларне ћелије глатких мишића је утицај на њихову контрактилност. Супероксид анјон радикал утиче на вазомоторну активност тако што инактивира NO . Међутим, директни ефекти реактивних врста на *VSMC* су контраверзни. H_2O_2 изазива вазорелаксацију плућне, коронарне и мезентеричне артерије (185, 186), док са друге стране слободни радикали настали од молекулског кисеоника доводе до вазоконстрикције аорте. Такође контракције аорте применом ангиотензина II се могу инхибирати каталазом (187).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу претходно изнесених чињеница циљеви овог истраживања били су:

1. Евалуација ефеката акутне администрације различитих доза 1,2-диаминоциклохексан-дихлоро-платине(II) - $[Pt(dach)Cl_2]$ на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова
2. Евалуација ефеката акутне администрације различитих доза етилендиамин-дихлоро-платине(II) - $[Pt(en)Cl_2]$ на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова
3. Евалуација ефеката акутне администрације различитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида - $[Pt(terpy)Cl]^+$ на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова
4. Евалуација ефеката акутне администрације различитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) - цисплатине - $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова
5. Утврђивање учешћа различитих параметара оксидационог стреса: супероксид анјон радикала (O_2^-), водоник пероксида (H_2O_2), нитрита (NO_2^-) и индекса липидне пероксидације мерених као *TBARS* на кардиодинамске параметре и коронарну циркулацију
6. Утврђивање хистолошких промена насталих на срчаном мишићу услед перфузије изолованог срца поменутих комплексима.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

3.1.1. Материјал коришћен за израду *Krebs-Hensenleit*-овог перфузионог раствора

Комплет реагенаса за припремање *Krebs-Hensenleit*-овог перфузионог раствора: натријум хлорид (NaCl 27,216 g/4L), калијум хлорид (KCl 1,4 g/4L), магнезијум сулфат ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,636 g/4L), калијум дихидроген фосфат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0644 g/4L), натријум бикарбонат (NaHCO_3 8,36g/4L), глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ 8,8g/4L) и калцијум хлорид (CaCl_2 1,117 g/4L). За припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка).

3.1.2. Материјал коришћен за испитивање директиних ефеката комплекса платине(II) на изолованом срцу пацова:

Цисплатина – комерцијално доступна - *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка). Етилендиамин-дихлоридо-платина(II), 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платина (II) и 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорид су синтетисани у лабораторији проф. др Живадина Бугарчића на Институту за Хемију, Природно Математички факултет, Универзитет у Крагујевцу.

3.1.3. Материјал коришћен за израду реагенаса за детерминацију параметара оксидационог статуса

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, (Немачка)

3.1.3.1. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS)

2-тиобарбитурна киселина (ТВА ($C_4H_4N_2O_2S$) $M_r=144,15$ g/mol); натријум хидроксид ($NaOH$ $M_r=40,00$ g/mol).

3.1.3.2. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина ($C_6H_7NO_3S$) $M_r=173,19$ g/mol), N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA ($C_{12}H_{15}C_{12}N$) $M_r=259,18$ g/mol), амонијум хлорид ((NH_4Cl) $M_r=53,49$ g/mol), Боракс ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$ $M_r=381,37$ g/mol), 85% ортофосфорна киселина (H_3PO_4 $\rho=1,685$ gcm⁻³ $M_r=98$ g/mol), натријум нитрит ($(NaNO_2)$ $M_r=69,00$ g/mol).

3.1.3.3. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид анијонског радикала (O_2^-)

TRIS (трис(хидроксиметил)аминометан ($C_4H_{11}NO_3$) $M_r=121,14$ g/mol), 37% хлороводонична киселина ((HCl) $\rho=1,19$ gcm⁻³ $M_r=36,5$ g/mol), натријум-етилендиаминтетрасићетна киселина ((Na_2EDTA) $M_r=372,24$ g/mol), нитротетразолијум плаво хлорид (NBT ($C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$) $M_r=817,6$ g/mol), желатин ($(C_{15}H_{11}N_2NaO_2)$ $M_r=61,5$ kDa).

3.1.3.3. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2)

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ($(K_2HPO_4 \times 2H_2O)$ $M_r=214,23$ g/mol), калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($(KH_2PO_4 \times 2H_2O)$ $M_r=164,09$ g/mol), натријум хлорид ($(NaCl)$ $M_r=58,44$ g/mol), водоник пероксид ((H_2O_2) $M_r=34,01$ g/mol), D(+)-глукоза монохидрат (декстроза ($C_6H_{12}O_6 \times H_2O$) $M_r=198,17$ g/mol), фенол црвено (*phenol red* ($C_{19}H_{14}O_5S$) $M_r=354,4$ g/mol), пероксидаза из коњске ротквице (*peroxidase from horse radish* (HRPO EC 1.11.1.7) $M_r=44$ kDa).

3.2. Методе

3.2.1. Експериментални модел

За изучавање функције миокарда и коронарне циркулације користили смо модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца, применљив на изолованом срцу сисара (пацов, пас, мачка, зец, заморчић). Постоје две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима:

- 1) Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
- 2) Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито.

Без обзира о којој од ове две врсте перфузије се ради један параметар је константан (проток/притисак), док је други параметар променљива варијабла (притисак/проток). У првом типу експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „флоуметријски“, тј. сакупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу флоуметра (од енгл.- *flow meter*), који се апликује директно у коронарно артеријско корито. Код оба експериментална модела користи се средња вредност променљивог параметра, с обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, чије радне компоненте (систола и дијастола) не трају исто, фреквенца срца која се сваког тренутка мења, минималне разлике у температури комплексног физиолошког раствора којим се срце перфундује итд. Са циљем да се добију прецизни и поуздани резултати одређивање променљивог параметра у функцији задатог параметра региструје у трајању од 5 минута. У нашој експерименталној студији је коришћен експериментални модел ретроградне перфузије по *Langendorff*-у при константном притиску од (70 cmH₂O), док је проток био променљива компонента.

3.2.1.1. *Langendorff* апарат

Експериментална истраживања у нашој студији су спроведена на *Langendorff* апарату марке *LF-01 F-P* произвођача *Experimetria Ltd*, Будимпешта, (Мађарска). Овај апарат је састављен из већег броја компоненти:

1. Две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра. Између површине ове две цеви циркулише вода из воденог купатила, која се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система црева. У цев мањег калибра се, методом негативног притиска убацује комплексан физиолошки раствор (у нашем случају *Krebs-Henseleit*-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност. Циркулишућа вода у цеви већег калибра се загрева у воденом купатилу и греје унутрашњу цев тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има температуру 37 °C тј. оптималну телесну температуру. Цев мањег калибра се завршава канилом, на који се поставља препарат изолованог срца
2. Резервоара у коме се налази комплексни *Krebs-Henseleit*-ов раствор, чија је запремина 4 литра. Овај резервоар је повезан са једне стране са унутрашњом цеви мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова O_2/CO_2
3. Боца са смешом гасова у односу $O_2:CO_2=95\%:5\%$. Ова боца има двоструки задатак:
 - 1) да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав физиолошки постоји у артеријској крви
 - 2) да негативним притиском који ствара у резервоару убацује раствор у унутрашњу цев система цеви
4. Каниле која служи за причвршћивање изолованог срца за апарат и његово повезивање преко асцедентне аорте за цев мањег калибра и тако се омогућава проток *Krebs-Henseleit* раствора кроз изоловано срце пацова
5. Воденог купатила које загрева воду у спољашњој цеви и на тај начин индиректно постиже температуру физиолошког раствора од 37 °C (изотермичност)

6. Инфузионе пумпе којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте.
7. Рачунара који поседује одговарајући софтвер (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) за континуирано праћење кардиодинамских параметара срчаног рада. Рачунар захваљујући сензору добија податке о раду срца, а потом софтвер те податке посредством математичких формула преводи у излазне податке.
8. Сензора - трансдјусера који се посебним техникама уводи у изоловано срце и који је повезан и са рачунаром. Улога сензора је у континуираном регистровању функције миокарда - леве коморе (промена систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце). На моделу *Langendorff* апарата који се користи у нашој лабораторији постоје три врсте сензора: *transducer BS4 73-0184, perfusion pressure transducer* (за праћење притиска у аорти), *temperature transducer* (за праћење температуре изолованог срца). *Transducer BS4 73-0184* служи за мерење кардиодинамских параметара у левој комори. Овај сензор је физички повезан са лучно савијеном, танком металном цеви која се завршава балончићем (пречника 5mm, латекс/ најлон фолија) испуњеним дестилованом водом. Након прокидања митралне валвуле између леве преткоморе и коморе балончић се уводи у леву преткомору и омогућава сензору директно регистровање притисака и срчане фреквенце из ове шупљине срца. На овај начин се региструју следећи параметри функције леве коморе: *dp/dt max* – максимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s), *dp/dt min* – минимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s), *SLVP* – систолни притисак у левој комори (mmHg), *DLVP* – дијастолни притисак у левој комори (mmHg) и *HR* – фреквенца рада срца (bpm). Сходно чињеници да је морфолошки и функционално лева комора доминантна, праћењем ових параметара се може објективно и прецизно испитати функција срца у целости.

3.2.2. Припрема *Krebs-Hensenleit*-овог перфузионог раствора

Комплексни *Krebs-Hensenleit* перфузиони раствор је по свом саставу доста сличан екстрацелуларној течности, што му омогућава да обезбеди одговарајућу исхрану срца и а тако му и обезбеди несметан рад на апарату. Овај раствор је састављен од: натријум хлорида (NaCl – 118 mmol/L), калијум хлорида (KCl – 4,7 mmol/L), магнезијум сулфата ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфата ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,18 mmol/L), натријум бикарбоната (NaHCO_3 – 24,88 mmol/L), глукозе ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ – 5,5 mmol/L) и калцијум хлорида (CaCl_2 – 2,52 mmol/L). *pH* вредност припремљеног раствора износи 7,4.

3.2.3. Екпериментални протокол

Све екперименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. За истраживање коришћен је модел изолованог срца пацова. Животиње коришћене у студији, пацови *Wistar albino* соја, су били стари 8 недеља, мушког пола просечне телесне масе 250 ± 50 g). Животиње су чуване у виваријуму Факултета медицинских наука, у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, релативна влажност ваздуха 50%, 12:12 часова циклус светлост:тама) и са слободним приступом води и храни (*ad libitum*). При екперименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципа етичности. Екпериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит екперименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.2.3.1. Поступак припреме изолованог срца пацова

Након краткотрајне наркозе изазване интраперитонеалном применом комбинације кетаминa и ксилазида, животиње се жртвују цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). Након жртвовања животиње отвара се абдомен, потом се лучно с лева на десно пресеца дијафрагма, при

чему је грудни кош отворан бочно, дуж мамиларне линије. Након отварања грудног коша, пресечен је перикард и тиме је омогућено изоловање органа. Како би се срце одржало у релативној хомеостазии, током описаних процедура, препарат се континуирано преливао охлађеним физиолошким раствором (+4 °C). По пресецању перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се изолује из грудног коша и одмах преноси у суд са леденим физиолошким раствором (-4 до -10 °C), чиме се постижу тзв. „физиолошка кљешта“ и метаболички процеси у миокарду се свде на минимум. Након што се орган пренесе у посуду са леденим физиолошким раствором, спроводи се тупа препарација базе срца, при чему се уклањају сви елементи изузев асцедентне аорте. Асцедентна аорта се оставља како би се помоћу ње срце причврстило за канилу апарата и омогућила ретроградна перфузија, односно експеримент. Ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута, како би се омогућила виталност изолованог органа. Након што је срце концем причвршћено за апарат приступа се даљој препарацији. У пределу леве аурикуле се пресеца лева преткомора и тако се обезбеђује приступ митралној валвули. Након чега се пинцетом разарају митрални залистци, што свди притисак у левој преткомори на нулу и тиме искључује утицаје независне од функције леве коморе на коронарну циркулацију. На овај начин смо оптимизовали услове за ретроградну перфузију изолованог срца, јер раствор путем аорте одлази у леву преткомору, а из ње у леву комору до коронарног синуса, коронарних артерија и вена. Осим тога прокидањем митралне валвуле је обезбеђен и директно постављање сензора у леву комору, којим се омогућава праћење функција срчаног мишића (региструју се притисци у левој комори срца: $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, $SLVP$ – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, $DLVP$ – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути). Параметри функције леве коморе се прате и снимају помоћу рачунара, што је омогућено захваљујући повезаности између сензора и софтверске јединице. Поред поменутих параметара праћен је и проток крви кроз коронарне крвне судове (CF). CF се мери скупљањем капи перфузионог раствора који излазе из коронарних крвних судова и срца, флуорометријском методом, а изражава се у ml/min. Након постављања сензора уследио је период стабилизације срчаног рада у трајању од око пола сата. Успостављање стабилног (правилног) срчаног рада је подразумевало да се коронарни проток након неколико серија мерења као и сви параметри срчане

функције не мењају значајно. Крај периода стабилизације, означава почетак испитивања функције изолованог срца, као и испитивања ефеката акутно примењених комплекса на функцију изолованог срца. За испитивање ефеката примењених комплекса коришћена је инфузиона пумпа, која омогућава да испитивана супстанца заједно са перфузионим раствором кроз аорту доспе у изоловано срце. Испитиване супстанце су се апликовале континуираном перфузијом у трајању од 30 минута, након чега је уследио период опоравка у трајању од 15 минута. Параметри од интересе су бележени: пре перфузије испитиваном супстанцом и тај моменат је означен као „контрола“; потом у 15. минуту перфузије испитиваном супстанцом „15“; у 30. минуту перфузије „30“, као и након престанка апликовања супстанце на крају периода опоравка „опоравак“. Опоравак је период када је срце након перфузије тестираном супстанцом перфундовано само *Krebs-Hensenleit*-овим раствором. У сваком од поменутих тренутака од интереса осим бележења кардиодинамских параметара прикупљани су и узорци коронарног венског ефлуента за биохемијске анализе.

3.2.3.2. Експерименталне групе

Животиње су биле подељене у четири (4) експерименталне групе (24 животиње у групи):

1. група: акутна апликација цис-диамино-дихлоридо-платине(II) - цисплатине,
2. група: акутна апликација етилендиамин-дихлоридо-платине(II),
3. група: акутна апликација 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II),
4. група: акутна апликација 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида.

Свака од експерименталних група је била подељена у три подгрупе у зависности од концентрације примењеног комплекса (10^{-5}M , 10^{-6}M и 10^{-7}M).

3.2.4. Биохемијске анализе

Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан по завршетку периода стабилизације, након тридесетоминутног периода апликације испитиваног комплекса и након петнаестоминутног периода од престанка апликације комплекса када је срце искључиво било перфундовано *Krebs-Hensenleit* раствором. Сви реактивни молекули од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом на апарату марке *Shimadzu*, модел *UV-1800 UV-VIS* Спектрофотометар, Јапан.

3.2.4.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (*TBARS*)

Индекс липидне пероксидације се одређује индиректно преко производа реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, отуда и потиче скраћеница *TBARS* (од енгл.- *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). За потребе нашег истраживања ниво *TBARS*-а у коронарном венском ефлуенту је одређиван спектрофотометријски (1). Нивои липидних пероксида, малониладехида (*MDA*), се одређују на основу њихове способности да интерагију са тиобарбитурном киселином (*TBA*). У стаклене епрувете (12 x 100) пипетирано је 800 μ l коронарног венског ефлуента и 200 μ l 1% *TBA* у 0.05 М NaOH. Слепа проба се припремала на исти начин, с тим што је уместо коронарног венског ефлуента коришћена једнака количина *Krebs-Hensenleit* раствора. Након што је додата прописана количина *TBA* у NaOH, узорци су инкубирани на 100° С у воденом купатилу у трајању од 15 минута. Након завршеног периода инкубације, узорци су прилагођени собној температури, након чега се приступо одређивању концентрације ослобођених *TBARS* у коронарном венском ефлуенту. Нивои *TBARS* су детерминисани спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=530$ nm.

Концентрација ослобођених *TBARS* добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS} / \text{ml ефлуента} = \frac{\Delta A(Au - Asp)}{1,56 \times 1,25}$$

при чему је:

A_u - апсорбанца узорка,

A_{sp} - апсорбанца слепе пробе,

1,56 и 1,25 - корекциони фактор за овај есеј.

Количина ослобођених *TBARS* по граму срчаног ткива се потом одређивала на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS у минути} / \text{g wt} = \frac{\Delta A}{1,56 \times 1,25} \times \frac{CF}{\text{маса срца (g)}}$$

при чему је:

CF - коронарни проток (количина ефлуента која протекне кроз срце у минути, изражена у ml)

Измерене вредности *TBARS*-а се изражавају у μM , за разлику од свих осталих параметара оксидационог стреса мерених у истраживању који се изражавају у nM. Овај податак говори у прилог чињеници да је сам тест одређивања *TBARS*-а неспецифичан, због тога што представља сумирање деловања реактивних кисеоничних и азотних врста.

3.2.4.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

За одређивање нитрита коришћена је спекторфотометријска метода (2). Сходно чињеници да азот моноксид са молекуларним кисеоником ствара еквимоларну количину нитрита (**Схема 28**), са великом сигурношћу можемо тврдити да детерминисана количина нитрита заправо одговара ослобођеној количини азот монооксида.



Схема 28. Настајање нитрита из азот монооксида

За биохемијско одређивање нитрита се користи *Griess*-реагенс, који са нитритима гради диазо-комплекс, љубичасте боје. *Griess*-ов реагенс се припрема *ex tempore*,

непосредно пре аналитичког одређивања. Овај реагенс је састављен од једнаких запремина (v/v) 1% сулфанилне киселине и 0,1% воденог раствора: N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорида (*NEDA*). Сулфанилна киселина је растворена у 5% орто-фосфорној киселини и чува се на собној температури, док се *NEDA* чува у тамној бочици (изузетно је фотосензибилна) у фрижидеру (4°C). Припрема узорка за детерминацију нитрита је подразумевала пре свега одмеравање 1 ml коронарног венског ефлуента који се пипететирао у епрувете (12 x 100). Након одмеравања узорка у сваку од епрувета се додавало 250 µl свеже направљеног *Griess*-ов реагенса, па потом и 125 µl амонијачног пуфера ($pH=9,0$), сачињеног од амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($Na_2B_4O_7$). Као што је већ поменуто у реакцији између нитрита и *Griess*-овог реагенса настају диазо-комплекси, како би се новонастали комплекси стабилизовали додаје се амонијачни пуфер. Слепа проба се припремала на исти начин као и узорци, с тим што је уместо 1 ml коронарног венског ефлуента коришћен 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. За одређивање концентрације ослобођених нитрита у узорцима коришћена је калибрациона крива. Калибрациона крива је добијена на основу екстинкција узорка, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Коришћене су растуће запремине 1 mM воденог раствора $NaNO_2$ у 1 ml *Krebs-Hensenleit*-овог раствора и то: 3, 6, 12, 24 µl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2,18; 4,37; 8,73 и 17,34 nmol NO_2^-/ml . Након стабилизације диазо-комплекса на собној температури (5-10 минута) приступало се одређивању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Концентрација, а потом и количина ослобођених нитрита добијана је употребом већег броја корака употребом различитих једначина:

$$F = \frac{Es - Esp}{\text{концентрација } NaNO_2 \text{ у стандарду}}$$

при чему је:

F - фактор добијен употребом стандарда

Es – екстинција стандарда

Esp - екстенција слепе пробе

Поменуто је да је коришћено четири различита стандарда (3, 6, 12, 24 μl NaNO_2), за сваки од њих су се рачунале вредности (F1-F4). Потом се рачунала аритметичка средина добијених вредности.

Концентрација нитрита у коронарном венском ефлуенту је израчуната на основу следеће једначине:

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

при чему је:

E_u - екстинкција узорка

E_{sp} - екстенција слепе пробе

F – фактор добијен употребом стандарда

Количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се потом одређивала на основу следеће једначине:

$$\text{nmol NO}_2 \text{ у минути} / \text{g wt} = \frac{\Delta E}{F} \times \frac{CF}{\text{маса срца (g)}}$$

при чему је:

CF - коронарни проток (количина ефлуента која протекне кроз срце у минути, изражена у ml)

3.2.4.3. Одређивање супероксид анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Одређивање количине супероксид анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) у коронарном венском ефлуенту заснива се на реакцији ових слободних радикала са нитро тетразолијум плавим *NBT* (од енгл.- *Nitro Blue Tetrazolium*), при чему настаје нитроформазаз плавни (3). За одређивање количине $\text{O}_2^{\cdot-}$ пипетирано је 50 μl коронарног венског ефлуента и 950 μl есејне смеше у епрувете (12 x 100). Есејна смеша (од енгл.- *Assay mixtures*) садржи: 50 mM *TRIS*-HCl пуфера ($\text{pH}=8,6$), 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. За припрему слепе пробе уместо коронарног венског ефлуента коришћена је иста количина *Krebs-Hensenleit*-овог раствора и есејна смеша. Мерење екстинције се спроводи на таласној дужини максималне апсорпције, $\lambda_{\text{max}}=550 \text{ nm}$. Одмах по

додавању есејне смеше у узорак се мери екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . На сваких 60 секунди се испипетирани узорак меша пластичним штапићем и мери екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног O_2^- се израчунава на основу следећих једначина:

Екстинција узорка

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u}$$

при чему је:

E_{2u} – екстинција узорка, већа измерена вредност

E_{1u} – екстинција узорка, мања измерена вредност

Екстинција слепе пробе

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp}$$

при чему је:

E_{2sp} – екстинција слепе пробе, већа измерена вредност

E_{1sp} – екстинција слепе пробе, мања измерена вредност

Финална екстинција

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

при чему је:

E_u – екстинција узорка

E_{sp} – екстинција слепе пробе

Коначна концентрација ослобођеног O_2^-

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

Количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин

$$nmol O_2^- / \text{минути/g} = \frac{\Delta E}{0,015} \times \frac{1}{0,05} \times \frac{CF}{\text{маса срца}}$$

3.2.4.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Одређивање количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на реакцији фенол црвеног са водоник пероксидом, ова реакција је катализована ензимом пероксидаза из коњске ротквице *HRPO* (од енгл.- *HorseradishPerOxidase*). Водоник пероксид оксидује фенол црвено при чему настаје једињење чији је максимум апсорпције на $\lambda_{max}=610nm$ (4). Овом методом могућа је детерминација продукције и ослобађања H_2O_2 у временском интервалу од 5-60 минута. За одређивање количине водоник пероксида према протоколу су коришћене епрувете (12 x 100) у које је пипетирано 200 μl коронарног венског ефлуента и 800 μl свеже направљеног раствора фенол црвеног *PRS* (од енгл.- *Phenol Red Solution*). *PRS* је сачињен од 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($pH=7$), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Након додавања фенол црвеног у прописаној количини узорцима се додавало 10 μl (1:20) *HRPO*, који је припремљен *ex tempore*. Након додавања пероксидазе узорци су инкубирани 10 минута на собној температури, а потом је подешавана *pH* на приближно 12, коришћењем 1M NaOH. За припрему слепе пробе кошрићен је исти протокол као и за узорке, с тим што је уместо коронарног венског ефлуента употребљена прописана количина *KrebsHensenleit*-овог раствора.

За израчунавање концентрације ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту коришћен је калибрациони дијаграм (стандардна крива). За формирање стандардне криве користи се стандардни (*Stock*) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (апсорбанца на 230nm за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). За добијање стандарда коришћене су растуће количине 1mM раствора H_2O_2 (5, 10 и 20 μl) и 200 μl дестиловане, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) *HRPO*. Након периода инкубације (10 минута) на собној температури, подешена је на приближно 12 помоћу 1M NaOH (10 μl). На овај начин су добијене финалне концентрације H_2O_2 и износиле су: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H_2O_2 /ml. Апсорбанца је мерена на спектрофотометру на таласној дужини $\lambda=610nm$, коришћењем стаклених кивета запремине 1 ml.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу следећих једначина:

Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у H_2O_2 :

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

Финална апсорбанца (ΔA)

$$\Delta A = A_u - A_{sp}$$

при чему је:

A_u - апсорбанца узорка

A_{sp} - апсорбанца слепе пробе

Коришћењем добијене вредности за финалну апсорбанцу, фактор F и количине коронарног венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчуната је концентрација H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$

Количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml} / \text{минут} / \text{g wt} = \frac{\Delta A}{F} \times \frac{CF}{\text{мсрца}}$$

3.2.5. Хистопатолошке анализе

3.2.5.1. Припрема ткива за морфолошку и морфометријску анализу

За морфолошку и морфометријску анализу коришћена су изолована срца пацова акутно третирана комплексима Платине(II). Целокупан материјал је узоркован и укључен у анализу. Део ткива намењен за хистохемијску и морфометријску анализу је рутински припремљен и укалупљен у парафину. Овако припремљено ткиво коришћено је и за имунохистохемијску анализу на парафинским резovima. Ткива су узета на крају експерименталног протокола и одмах стављена у унапред припремљени раствор фиксатива. Ткиво је фиксирано имерзионим поступком у 4% неутрално пуферисаном формалдехиду у току најмање 24h. Пре даље процедуре, спољашња, адвентицијална површина исечка обележена је црним тушем. Потом је ткиво дехидратисано алкохолима растућих концентрација, просветљавано у ксилолу и калупљено у Парапласту апаратом за калупљење (*Leica HistoCore Arcadia H*).

Сваки калуп је потом пажљиво нивелисан и сечен до појаве целе дебљине зида крвног суда. Појава целе дебљине зида контролисана је захваљујући претходном обележавању тушем. Калупи ткива су серијски сечени микротомом (*Leica RM 2125 RTS*) на исечке дебљине 5 μm . Тако добијени исечци бојени су специфичним хистохемијским методама хематоксилин еозином, *Massson* трихромно бојење, као и методом за селективно бојење ретикулинских влакана.

3.2.5.2. Припрема ткива за имунохистохемијску анализу

Парафински калупи ткива претходно припремљени за хистохемијску и морфометријску анализу коришћени су и за имунохистохемијска бојења. Исечци за имунохистохемијску анализу су депарафинисани и испирани *TBS-Tween* пуфером (*Tris buffer saline*) $\text{pH}=7,4$ у току 10 минута. Потом је вршено демаскирање антигена одговарајућом методом кувања у EDTA пуферу *Thermo Scientific LabVision AP-9004-500* на 98°C у трајању од 20 минута. Разблажење концентрованих комерцијално доступних антитела вршено је коришћењем комерцијалног дилуента (*Antibody Diluent OP Quanto, TA-125-ADQ*). Деловање ендогене пероксидазе блокирано комерцијалним препаратом (*UltraVision Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific LabVision, TA – 060-H2O2Q*) у току 5 до 15 минута. Потом је по потреби наносен комерцијални раствор (*UltraVision Protein Block, Thermo Scientific LabVision, TA – 125 - PBQ*) ради блокирања неспецифичног бојења.

При развијању реакције коришћено је примарно антитело *CD31 Clone JC/70A Thermo Scientific LabVision MS-353-S0* у разблажењу 1:100 инкубација је вршена на собној температури у трајању од 30 минута. При развијању реакције системима *UltraVision (Thermo Scientific LabVision, TL – 125 - HL)* примењивана је следећа процедура. Након испирања TBS-ом на исечке је додат обележени „*link*” који делује 30 минута у мраку. „*Link*” садржи одговарајуће биотином обележено секундарно антитело у раствору *PBS (phosphate buffered saline)*, уз додатак протеинског „носача” и 15 mM натријум-азид. Потом су исечци испирани *TBS-Tween* пуфером и инкубирани са стрептавидин пероксидазним обележивачем у трајању од 30 минута. Овај раствор садржи стрептавидин коњугован с пероксидазом рена у *PBS*-у, протеински носач и антимикуробне агенсе. Исечци су поново испирани *TBS-Tween* пуфером и излагани деловању раствора хромогена: *DAB* (диаминобензидин) у трајању од 10 минута. Потом су исечци испирани *TBS-Tween* пуфером и контрастно бојени Мајеровим (*Mayer*)

хематоксилином 30 секунди. Исечци су дехидратисани алкохолима растуће концентрације, просветљавани ксилолом и покривани помоћу *DPX*-а.

Сва имунохистохемијска бојења изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола. Негативне контроле добијене су изостављањем примарног антитела.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ И КОРОНАРНИ ПРОТОК ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

4.1.1 Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.1.1.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платина(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у **Табелама 1 и 2**, као на и **Графику 1**.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене систолног притиска и срчане фреквенце (**Табела 2**).

Табела 1. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола	Ефекат 15'	Ефекат 30'	Оправак
dp/dt max (mmHg/s)	2465,95 ± 199,60	2367,42 ± 293,06	2224,87 ± 252,30	2147,62 ± 232,08
dp/dt min (mmHg/s)	199,60 ± 133,63	293,06 ± 189,77	352,30 ± 155,60	432,08 ± 249,96
SLVP (mmHg)	68,27 ± 4,63	66,07 ± 5,89	61,18 ± 4,03	55,52 ± 5,28
DLVP (mmHg)	1,50 ± 0,49	1,65 ± 0,54	2,23 ± 0,63	2,15 ± 0,54
HR (bpm)	307,68 ± 11,89	244,37 ± 9,17	246,83 ± 13,93	269,42 ± 15,10
CF (ml/min)	9,13 ± 1,91	8,17 ± 1,58	7,27 ± 1,69	6,90 ± 2,00

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 2. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max (mmHg/s)	0,173 ↓4,00%	0,345 ↓9,78%	0,249 ↓12,91%	0,463 ↓6,02%	0,249 ↓3,47%
dp/dt min (mmHg/s)	0,463 ↓2,81%	0,345 ↓11,21%	0,116 ↓13,45%	0,173 ↓8,64%	0,249 ↓2,52%
SLVP (mmHg)	0,116 ↓3,22%	0,046 ↓10,38%	0,028 ↓18,68%	0,028 ↓7,39%	0,058 ↓9,26%
DLVP (mmHg)	0,917 ↑10,00%	0,416 ↑48,89%	0,043 ↑43,33%	0,172 ↑35,35%	0,416 ↓3,73%
HR (bpm)	0,028 ↓20,58%	0,028 ↓19,78%	0,028 ↓12,44%	0,345 ↑1,01%	0,028 ↑9,15%
CF (ml/min)	0,786 ↓10,51%	0,833 ↓20,37%	0,752 ↓24,42%	0,083 ↓11,02%	0,157 ↓5,09%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије

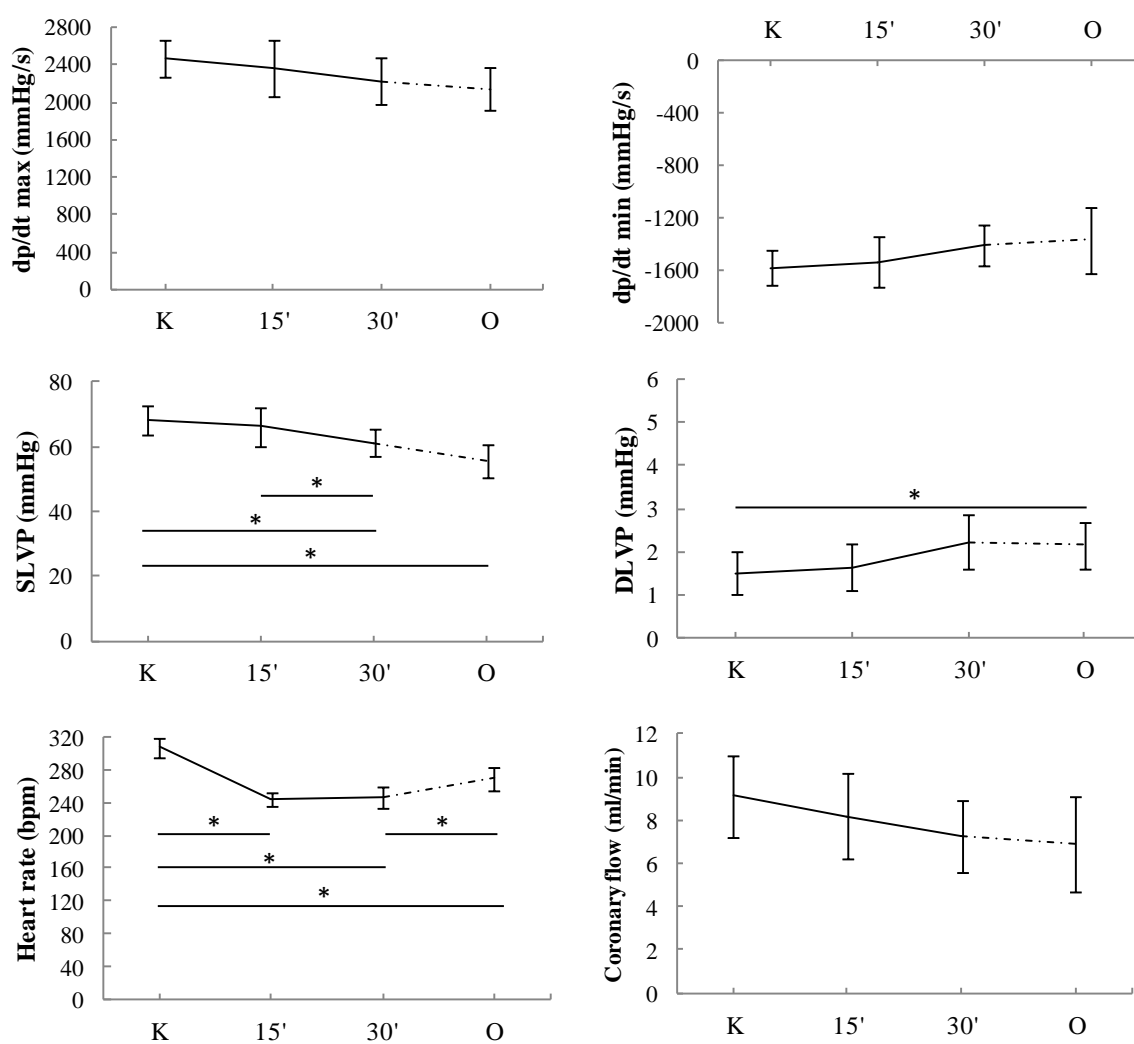


График 1. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М.

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током екеперимента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 3 и 4, као и на Графику 2.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска и срчане фреквенце.

Табела 3. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	1829,55 ± 298,68	1959,08 ± 264,65	1704,45 ± 278,47	1729,75 ± 221,26
dp/dt min(mmHg/s)	-1290,70 ± 272,89	-1303,02 ± 228,52	-1140,12 ± 273,32	-1097,03 ± 218,46
SLVP (mmHg)	55,98 ± 9,19	54,73 ± 8,42	47,60 ± 9,67	48,07 ± 8,37
DLVP (mmHg)	2,17 ± 0,62	1,67 ± 0,47	1,38 ± 0,51	1,52 ± 0,47
HR (bpm)	291,25 ± 22,29	283,70 ± 18,09	278,62 ± 18,22	272,78 ± 19,57
CF (ml/min)	7,43 ± 1,20	7,40 ± 1,39	7,50 ± 1,45	7,37 ± 1,61

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 4. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max(mmHg/s)	0,345 ↑7,08%	0,028 ↓6,84%	0,028 ↓5,45%	0,028 ↓13,00%	0,345 ↑1,48%
dp/dt min(mmHg/s)	0,917 ↑0,95%	0,028 ↓11,67%	0,028 ↓15,00%	0,028 ↓12,50%	0,345 ↓3,78%
SLVP (mmHg)	0,753 ↓2,23%	0,028 ↓14,97%	0,046 ↓14,14%	0,028 ↓13,03%	0,917 ↑0,98%
DLVP (mmHg)	0,138 ↓23,08%	0,075 ↓36,15%	0,345 ↓30,00%	0,207 ↓17,00%	0,114 ↑9,46%
HR (bpm)	0,075 ↓2,59	0,043 ↓4,45	0,028 ↓6,34%	0,074 ↓1,91%	0,046 ↓1,98%
CF (ml/min)	0,279 ↓0,40%	0,206 ↑0,94%	0,207 ↓0,81%	0,176 ↑1,35%	1,000 ↓1,73%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

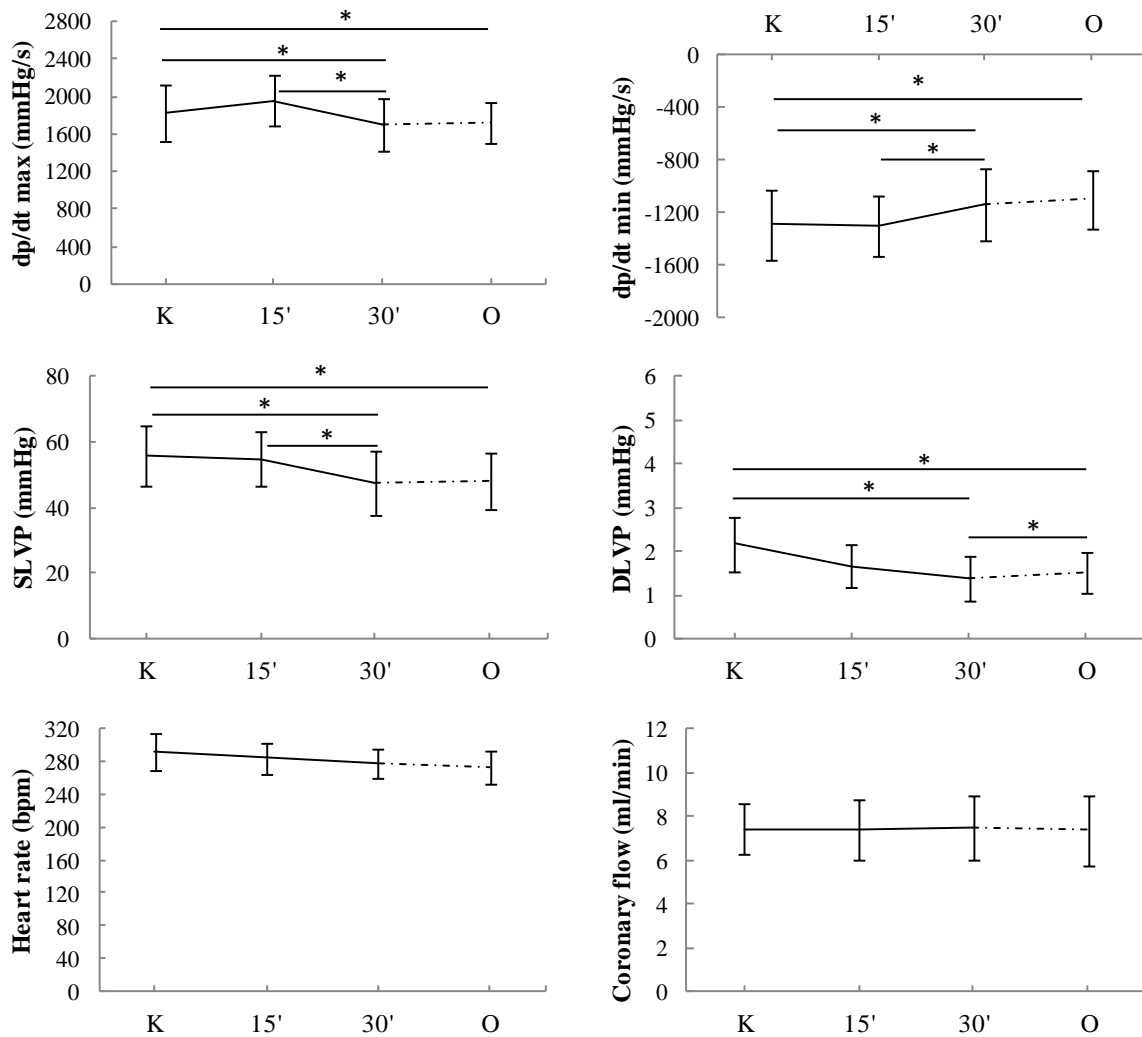


График 2. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М.

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 5 и 6, као и на Графику 3.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платина(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска и срчане фреквенце.

Табела 5. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	2326,80 ± 291,01	2437,78 ± 242,79	2334,85 ± 240,77	2319,80 ± 231,33
dp/dt min (mmHg/s)	-1568,63 ± 230,10	-1513,10 ± 230,00	-1409,32 ± 207,94	-1294,60 ± 230,05
SLVP (mmHg)	61,63 ± 7,84	60,32 ± 6,67	57,22 ± 8,14	53,67 ± 8,66
DLVP (mmHg)	0,57 ± 0,24	0,75 ± 0,30	0,77 ± 0,36	1,00 ± 0,40
HR (bpm)	283,58 ± 13,67	260,32 ± 19,68	257,60 ± 19,78	270,13 ± 20,77
CF (ml/min)	11,53 ± 2,34	11,03 ± 2,51	10,60 ± 2,69	10,60 ± 2,70

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 6. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max (mmHg/s)	0,173 ↑4,77%	0,917 ↑0,35%	0,917 ↓0,30%	0,116 ↓4,22%	0,600 ↓0,64%
dp/dt min (mmHg/s)	0,753 ↓3,54%	0,345 ↓10,16%	0,075 ↓17,47%	0,028 ↓6,86%	0,075 ↓8,14%
SLVP (mmHg)	0,600 ↓2,14%	0,345 ↓7,17%	0,046 ↓12,93%	0,046 ↓5,14%	0,046 ↓6,20%
DLVP (mmHg)	0,140 ↑32,35%	0,528 ↑35,29%	0,168 ↑76,47%	0,916 ↑2,22%	0,042 ↑30,43%
HR (bpm)	0,028 ↓8,20%	0,028 ↓9,16%	0,028 ↓4,74%	0,463 ↓1,04%	0,028 ↑4,87%
CF (ml/min)	0,279 ↓4,34%	0,206 ↓8,09%	0,207 ↓3,93%	0,176 ↓3,93	1,000 ↓0,00%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

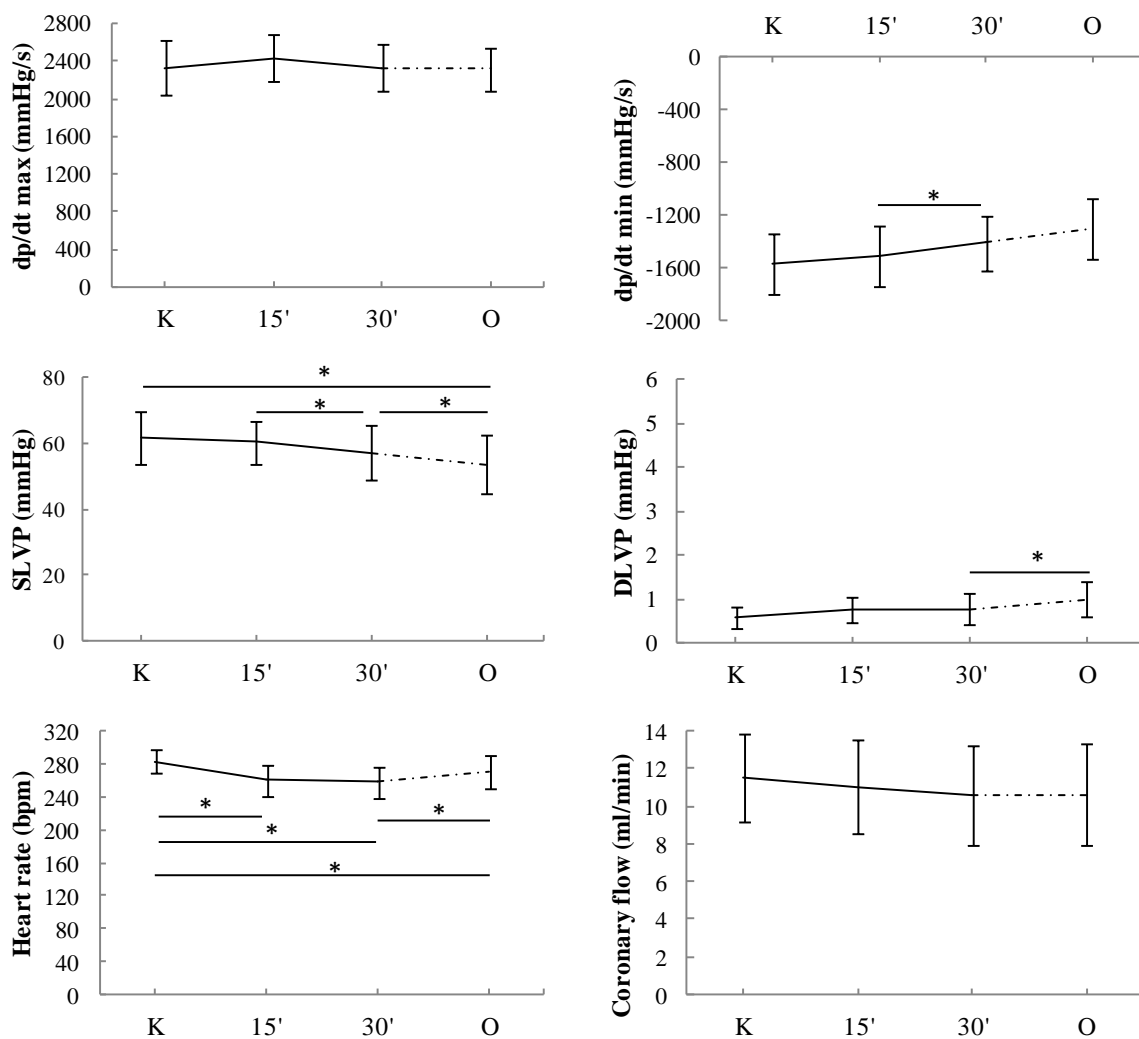


График 3. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М.

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.1.4. Поређење ефеката различитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табели 7 као и на Графику 4.

Табела 7. Поређење ефеката различитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
dp/dt max (mmHg/s)	K	0,004	0,485	0,041
	15'	0,015	0,485	0,002
	30'	0,026	0,818	0,004
	O	0,065	0,937	0,009
dp/dt min (mmHg/s)	K	0,093	0,937	0,093
	15'	0,180	0,818	0,132
	30'	0,041	0,699	0,041
	O	0,065	0,589	0,180
SLVP (mmHg)	K	0,026	0,180	0,394
	15'	0,065	0,132	0,310
	30'	0,026	0,310	0,093
	O	0,132	0,818	0,240
DLVP (mmHg)	K	0,589	0,093	0,026
	15'	0,699	0,394	0,310
	30'	0,818	0,310	0,589
	O	0,485	0,026	0,485
HR (bpm)	K	0,132	0,002	0,002
	15'	0,002	0,240	0,240
	30'	0,002	0,485	0,485
	O	1,000	1,000	1,000
CF (ml/min)	K	0,093	0,093	0,093
	15'	0,485	0,041	0,041
	30'	0,699	0,041	0,041
	O	0,818	0,026	0,026

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

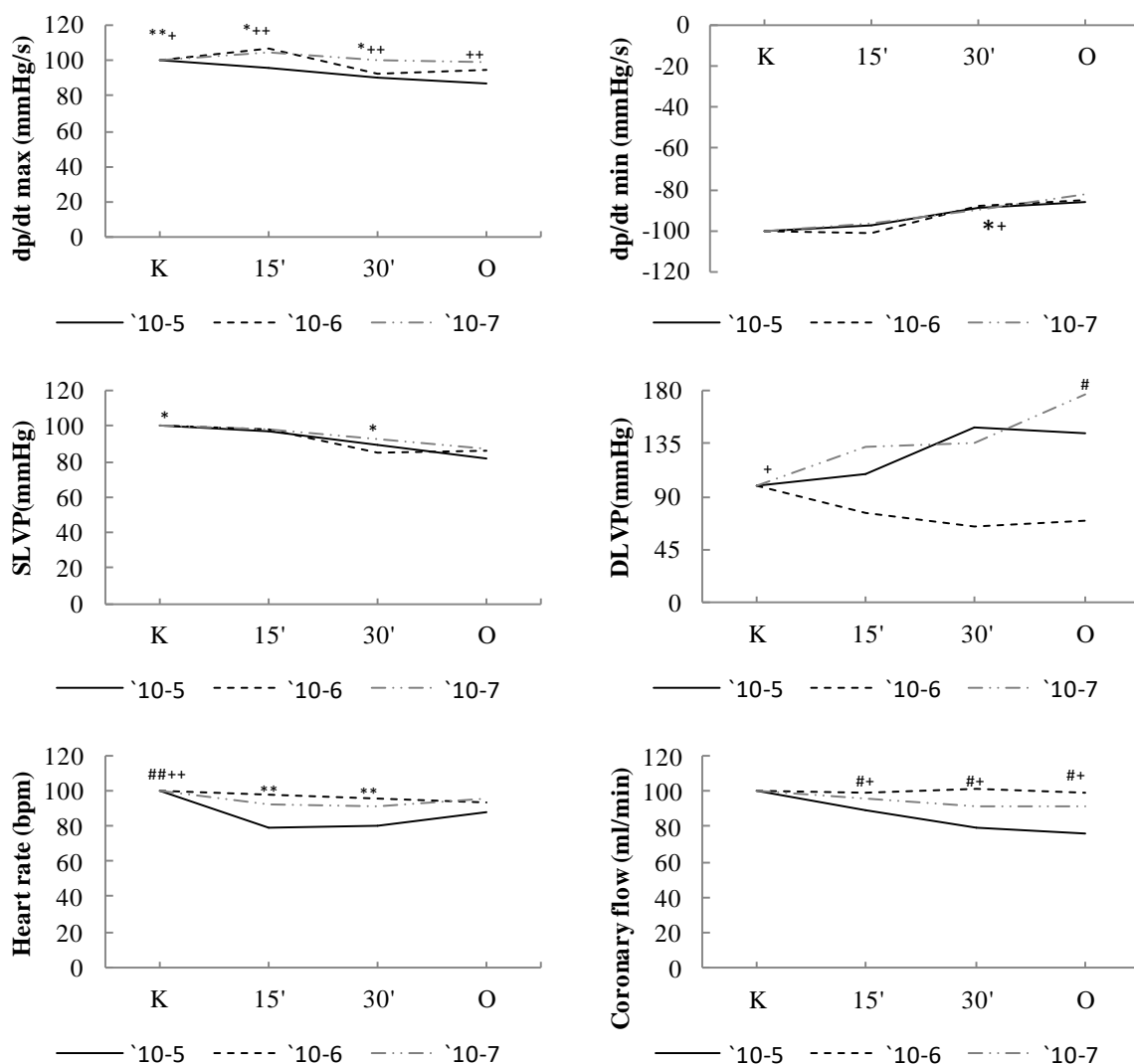


График 4. Поређење ефеката различитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-7}M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6}M$ и $10^{-7}M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.1.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у **Табелама 8 и 9**, као и на **Графику 5**.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска, срчане фреквенце и коронарног протока.

Табела 8. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	2409,75 ± 260,75	2441,88 ± 215,69	2322,15 ± 257,41	2280,32 ± 263,61
dp/dt min(mmHg/s)	-1765,82 ± 276,77	-1663,55 ± 229,86	-1474,87 ± 223,53	-1340,62 ± 245,85
SLVP (mmHg)	69,98 ± 13,85	65,58 ± 11,87	59,43 ± 7,63	57,05 ± 9,88
DLVP (mmHg)	0,78 ± 0,17	0,57 ± 0,17	0,73 ± 0,29	0,97 ± 0,22
HR (bpm)	287,95 ± 16,75	281,35 ± 17,40	270,42 ± 13,68	271,15 ± 12,62
CF (ml/min)	9,80 ± 0,84	9,70 ± 0,96	9,07 ± 0,80	8,97 ± 0,81

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 9. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
dp/dt max (mmHg/s)	0,463 ↑1,33%	0,028 ↓3,64%	0,028 ↓5,37%	0,046 ↓4,90%	0,917 ↓1,80%
dp/dt min (mmHg/s)	0,345 ↓5,97%	0,028 ↓16,48%	0,028 ↓24,08%	0,046 ↓11,34%	0,046 ↓9,10%
SLVP (mmHg)	0,046 ↓6,29%	0,028 ↓15,08%	0,028 ↓18,48%	0,028 9,38%	0,249 ↓4,01%
DLVP (mmHg)	0,786 ↓27,66%	0,916 ↓6,38%	0,078 ↑21,28%	0,680 ↑29,41%	0,042 ↑29,55%
HR (bpm)	0,249 ↓2,29%	0,028 ↓6,09%	0,116 ↓5,83%	0,043 ↓3,89%	0,753 ↑0,27%
CF (ml/min)	0,581 ↓1,02%	0,026 ↓7,48%	0,026 ↓8,50%	0,066 ↓6,53%	0,914 ↓1,10%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

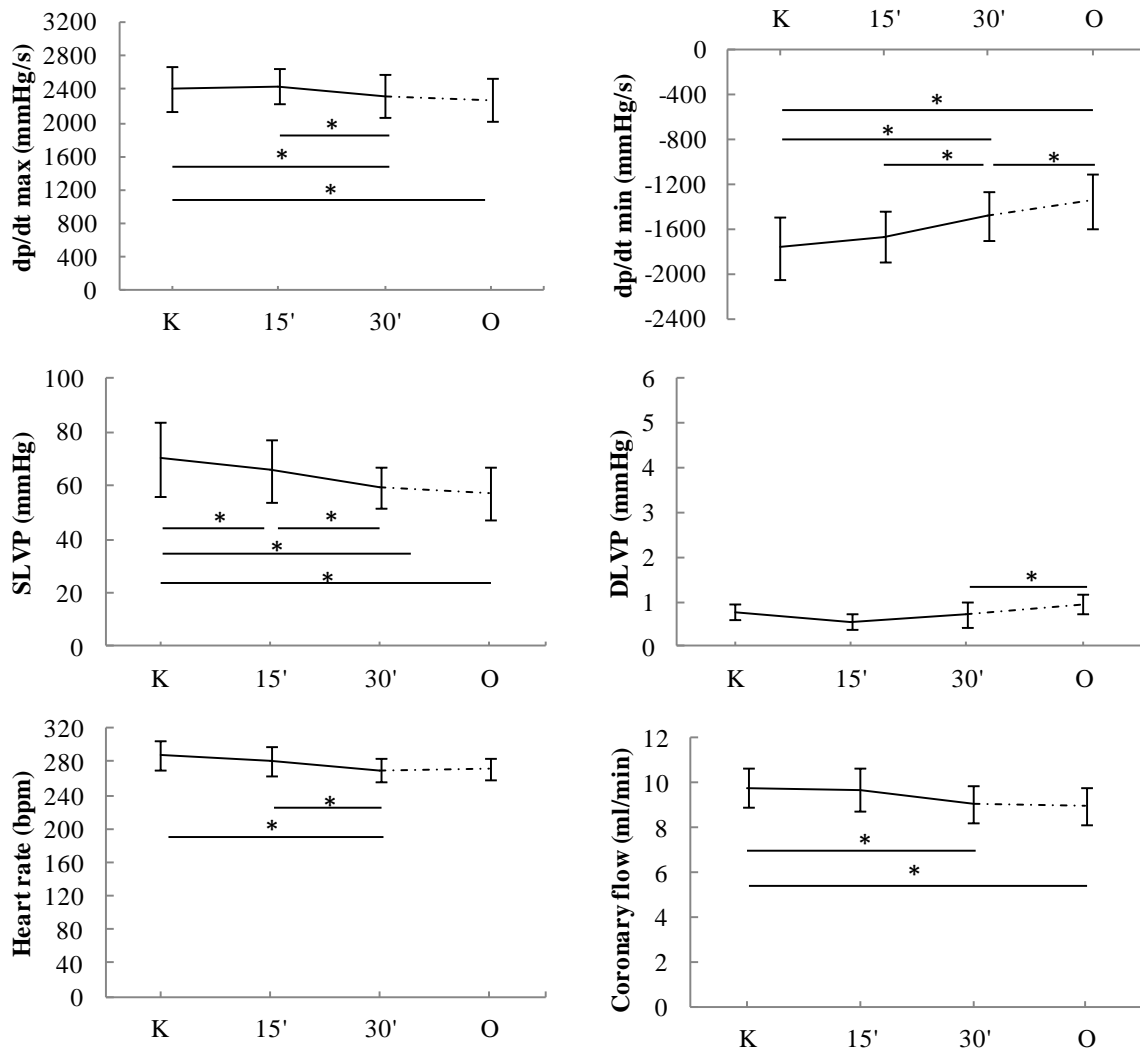


График 5. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5}M

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 10 и 11, као и на Графику 6.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска и срчане фреквенце.

Табела 10. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max (mmHg/s)	2658,40 ± 323,24	2641,35 ± 349,32	2539,05 ± 265,65	2674,72 ± 276,64
dp/dt min (mmHg/s)	-1925,28 ± 222,73	-1935,33 ± 239,23	-1799,93 ± 219,18	-1772,97 ± 176,64
SLVP (mmHg)	72,33 ± 10,81	75,50 ± 8,94	69,15 ± 9,18	68,55 ± 9,12
DLVP (mmHg)	1,08 ± 0,35	1,40 ± 0,25	0,92 ± 0,18	0,70 ± 0,24
HR (bpm)	310,95 ± 21,12	290,57 ± 16,86	279,12 ± 9,62	289,35 ± 12,46
CF (ml/min)	10,40 ± 0,96	10,37 ± 0,96	9,67 ± 1,27	9,70 ± 0,98

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 11. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max (mmHg/s)	0,600 ↓0,64%	0,028 ↓ 4,49%	0,753 ↑0,61%	0,028 ↓ 3,87%	0,028 ↑ 5,34%
dp/dt min (mmHg/s)	0,917 ↑0,52%	0,046 ↓ 6,51%	0,028 ↓ 7,91%	0,116 ↓7,00%	0,462 ↓1,50%
SLVP (mmHg)	0,463 ↑4,38%	0,249 ↓4,40%	0,400 ↓5,23%	0,028 ↓ 8,41%	0,344 ↓0,87%
DLVP (mmHg)	0,345 ↑29,23%	0,686 ↓15,38%	0,465 ↓35,38%	0,462 ↓34,52%	0,116 ↓23,64%
HR (bpm)	0,046 ↓ 6,56%	0,028 ↓ 10,24%	0,046 ↓ 6,95%	0,046 ↓ 3,94%	0,075 ↑3,67%
CF (ml/min)	0,752 ↓0,32%	0,141 ↓7,05%	0,168 ↓6,73%	0,058 ↓6,75%	1,000 ↑0,34%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

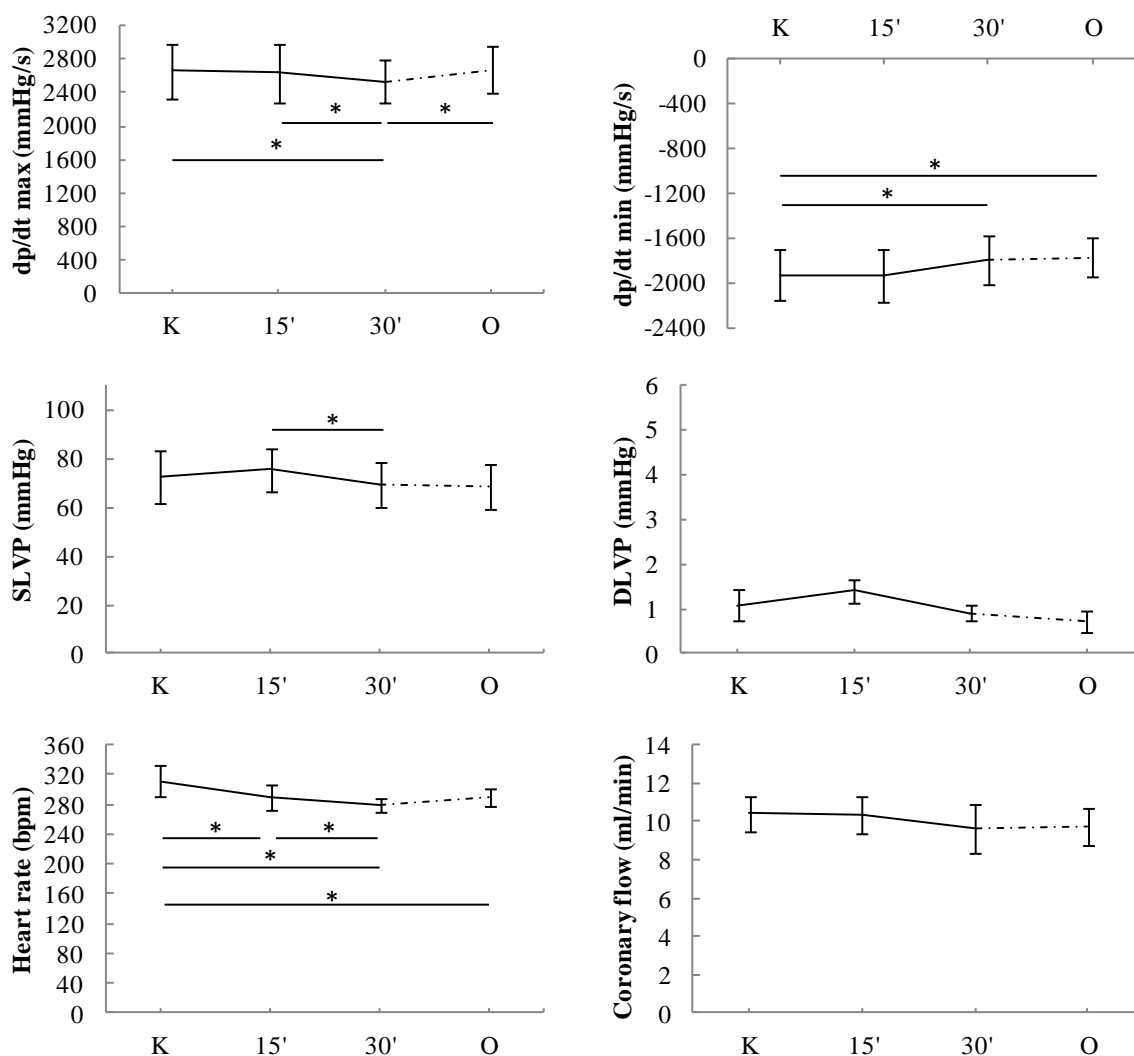


График 6. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6}M

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 12 и 13, као и на Графику 7.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: дијастолног притиска и срчане фреквенце.

Табела 12. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	2489,22 ± 228,50	2657,16 ± 297,19	2692,18 ± 255,36	2497,64 ± 224,83
dp/dt min(mmHg/s)	-1830,74 ± 269,89	-1949,34 ± 204,09	-1819,14 ± 218,61	-1547,80 ± 280,31
SLVP (mmHg)	74,46 ± 13,20	76,72 ± 8,76	73,80 ± 6,76	64,96 ± 14,63
DLVP (mmHg)	1,53 ± 0,23	2,33 ± 0,39	2,02 ± 0,43	2,58 ± 0,37
HR (bpm)	307,80 ± 31,72	302,88 ± 24,46	292,50 ± 20,50	304,20 ± 30,02
CF (ml/min)	9,71 ± 0,85	9,66 ± 0,81	9,49 ± 0,89	9,34 ± 0,82

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 13. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max (mmHg/s)	0,173 ↑6,75%	0,116 ↑8,15%	0,753 ↑0,34%	0,116 ↑1,32%	0,173 ↓7,23%
dp/dt min (mmHg/s)	0,173 ↑6,48%	0,600 ↓0,63%	0,345 ↓15,45%	0,116 ↓6,68%	0,028 ↓14,92%
SLVP (mmHg)	0,345 ↑3,04%	0,917 ↓0,89%	0,173 ↓12,76%	0,345 ↓3,81%	0,075 ↓11,98%
DLVP (mmHg)	0,027 ↑52,17%	0,345 ↑31,52%	0,248 ↑68,48%	0,674 ↓13,57%	0,225 ↑28,10%
HR (bpm)	0,463 ↓1,60%	0,046 ↓4,97%	0,753 ↓1,17%	0,046 ↓3,43%	0,249 ↑4,00%
CF (ml/min)	0,581 ↓0,59%	0,176 ↓2,35%	0,061 ↓3,82%	0,187 ↓1,78%	0,180 ↓1,51%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

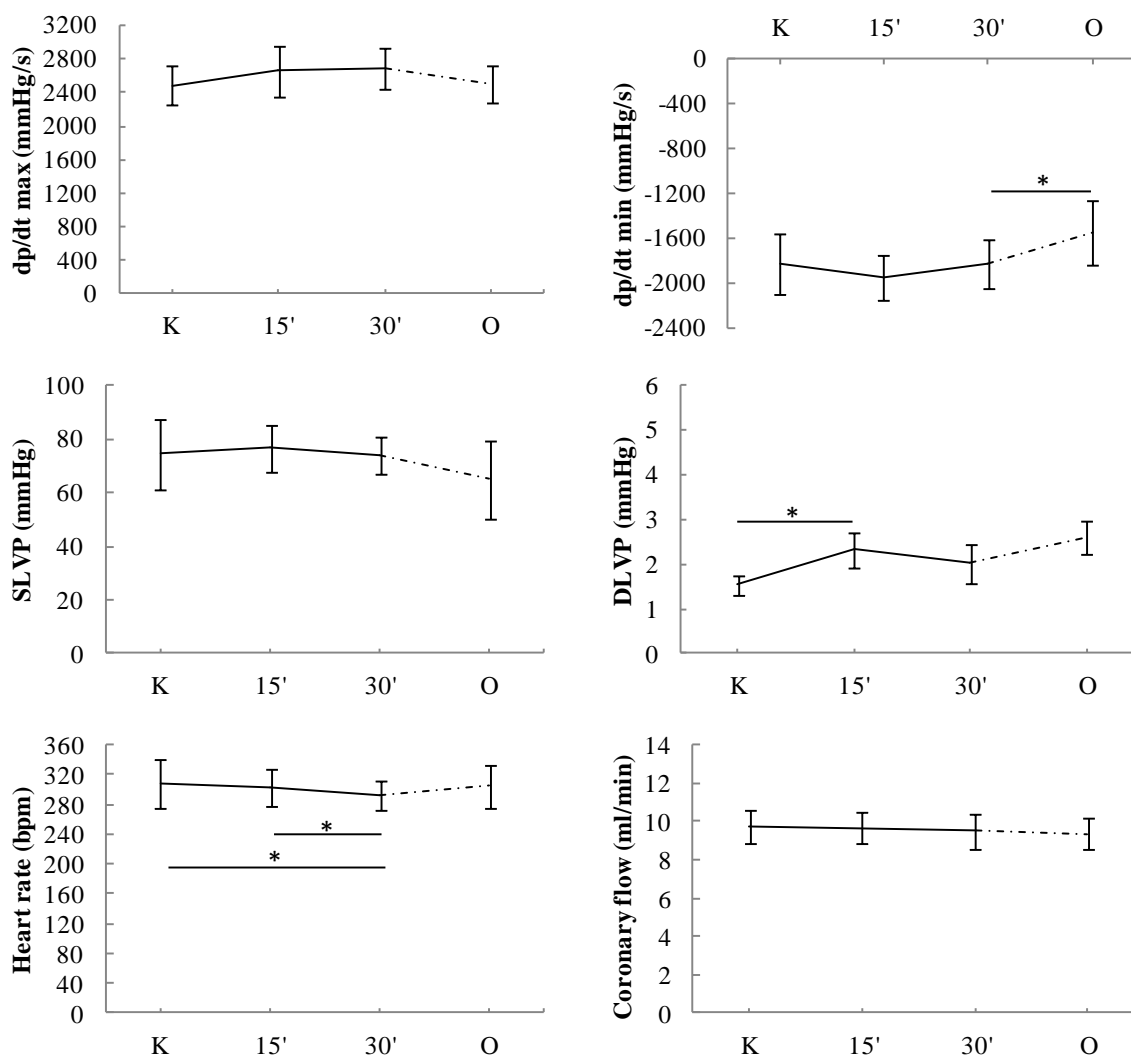


График 7. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.2.4. Поређење ефеката различитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у **Табели 14** као и на **Графику 8**.

Табела 14. Поређење ефеката различитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
dp/dt max (mmHg/s)	K	0,394	0,699	0,818
	15'	0,485	0,699	0,937
	30'	0,394	0,093	0,485
	O	0,132	0,310	0,699
dp/dt min (mmHg/s)	K	0,485	0,589	1,000
	15'	0,310	0,041	0,818
	30'	0,132	0,065	0,589
	O	0,026	0,132	0,485
SLVP (mmHg)	K	0,485	0,485	0,937
	15'	0,065	0,065	0,699
	30'	0,132	0,009	0,132
	O	0,132	0,394	0,937
DLVP (mmHg)	K	0,394	0,240	0,394
	15'	0,093	0,015	0,310
	30'	0,180	0,132	0,394
	O	0,818	0,180	0,093
HR (bpm)	K	0,026	0,132	0,937
	15'	0,240	0,240	0,485
	30'	0,310	0,132	0,240
	O	0,180	0,065	0,180
CF (ml/min)	K	0,589	0,945	0,366
	15'	0,180	0,628	0,073
	30'	0,240	0,295	0,445
	O	0,240	0,534	0,628

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

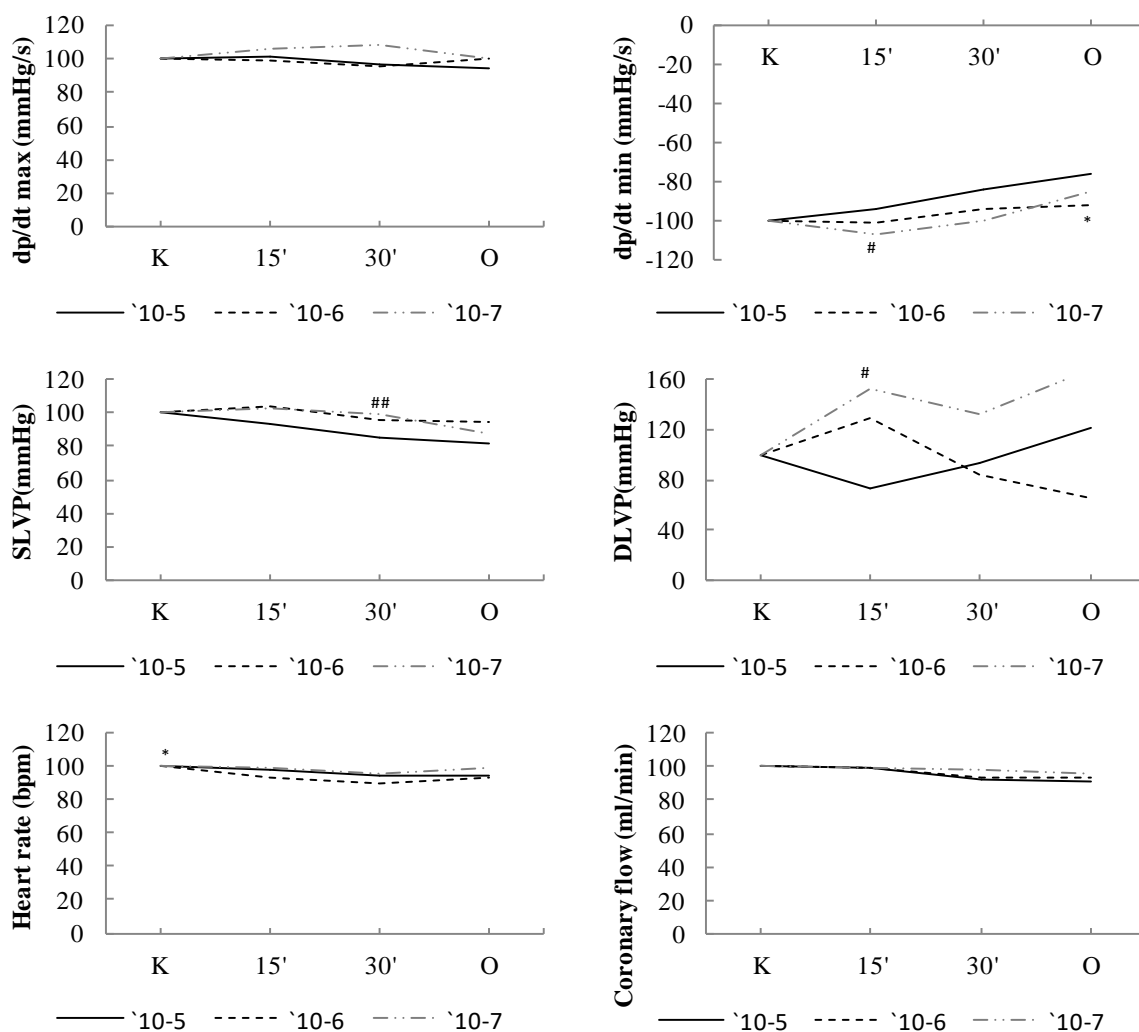


График 8. Поређење ефеката различитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-5} M и 10^{-6} M, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-5} M и 10^{-7} M, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-6} M и 10^{-7} M, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.1.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 15 и 16, као и на Графику 9.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска, срчане фреквенце и коронарног протока.

Табела 15. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max (mmHg/s)	2328,23 ± 263,60	2462,32 ± 265,17	2358,05 ± 232,38	2367,77 ± 220,82
dp/dt min (mmHg/s)	-1593,32 ± 264,76	-1594,00 ± 271,72	-1511,45 ± 271,48	-1371,17 ± 242,03
SLVP (mmHg)	60,60 ± 8,96	62,83 ± 12,41	57,77 ± 10,53	56,70 ± 12,54
DLVP (mmHg)	0,77 ± 0,19	0,60 ± 0,16	0,68 ± 0,15	0,62 ± 0,17
HR (bpm)	311,58 ± 15,78	283,92 ± 23,99	277,65 ± 16,41	282,00 ± 17,84
CF (ml/min)	10,47 ± 1,42	11,13 ± 1,83	11,23 ± 1,53	11,00 ± 1,91

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 16. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
dp/dt max(mmHg/s)	0,345 ↑5,76%	0,600 ↑1,28%	0,345 ↑1,70%	0,173 ↓4,23%	0,753 ↑0,41%
dp/dt min(mmHg/s)	0,917 ↑0,04%	0,028 ↓5,14%	0,028 ↓13,94%	0,116 ↓5,18%	0,028 ↓9,28%
SLVP (mmHg)	0,463 ↑3,69%	0,058 ↓4,68%	0,116 ↓6,44%	0,046 ↓8,06%	0,753 ↓1,85%
DLVP (mmHg)	0,892 ↓21,74%	0,916 ↓10,87%	0,674 ↓19,57%	0,462 ↑13,89%	0,334 ↓9,76%
HR (bpm)	0,046 ↓8,88	0,028 ↓10,89%	0,028 ↓9,49%	0,462 ↓2,21%	0,463 ↑1,57%
CF (ml/min)	0,058 ↑6,37%	0,027 ↑7,32%	0,207 ↑5,10%	0,457 ↑0,90%	0,344 ↓2,08%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

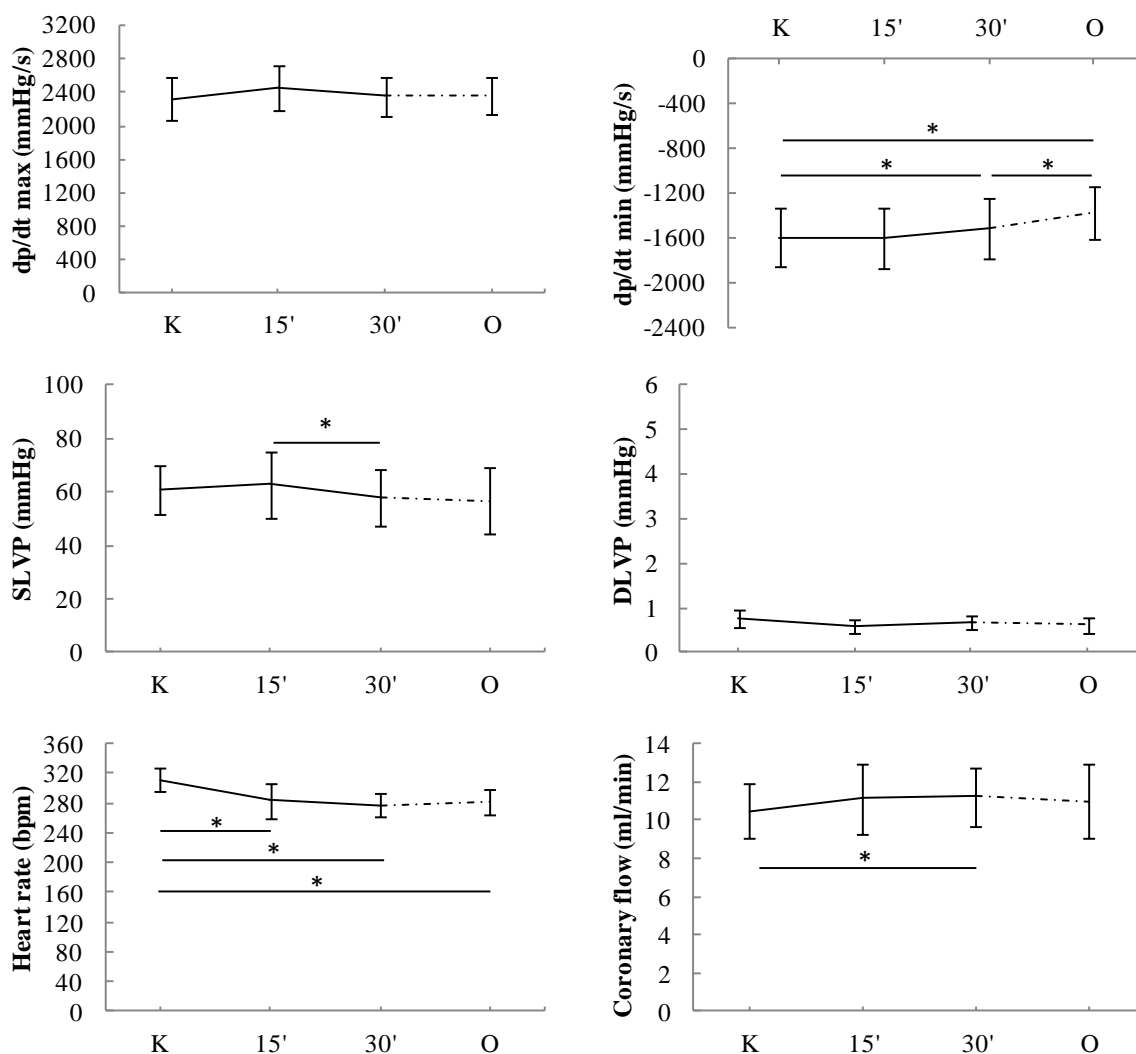


График 9. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5}M

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 17 и 18, као и на Графику 10.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: минималне стопе промене притиска у левој комори и срчаној фреквенци.

Табела 17. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max (mmHg/s)	2744,82 ± 277,17	2807,75 ± 238,38	2647,48 ± 226,98	2490,45 ± 226,00
dp/dt min (mmHg/s)	-1852,58 ± 281,97	-1976,28 ± 205,30	-1904,03 ± 273,01	-1634,80 ± 225,20
SLVP (mmHg)	77,67 ± 16,81	75,15 ± 18,96	70,48 ± 15,03	63,78 ± 12,11
DLVP (mmHg)	1,02 ± 0,33	1,22 ± 0,35	0,85 ± 0,23	1,13 ± 0,24
HR (bpm)	306,67 ± 18,93	287,78 ± 22,51	273,43 ± 25,02	278,18 ± 28,22
CF (ml/min)	10,60 ± 2,14	11,00 ± 1,98	10,83 ± 2,42	10,00 ± 2,09

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 18. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
dp/dt max (mmHg/s)	0,463 ↑2,29%	0,116 ↓3,56%	0,028 ↓9,28%	0,116 ↓5,73%	0,173 ↓5,93%
dp/dt min (mmHg/s)	0,046 ↑6,68%	0,917 ↓2,64%	0,075 ↓11,76%	0,463 ↓8,74%	0,046 ↓9,36%
SLVP (mmHg)	0,416 ↓3,24%	0,058 ↓9,25%	0,028 ↓17,88%	0,173 ↓6,21%	0,116 ↓9,51%
DLVP (mmHg)	0,345 ↑19,67%	0,833 ↓16,39	0,528 ↑11,48%	0,753 ↓30,14%	0,345 ↑33,33%
HR (bpm)	0,046 ↓6,16%	0,028 ↓10,84%	0,028 ↓9,29%	0,225 ↓4,99	0,600 ↑1,74%
CF (ml/min)	0,072 ↑3,77%	0,339 ↑2,20%	0,293 ↓5,66%	0,684 ↓1,52	0,140 ↓7,69

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

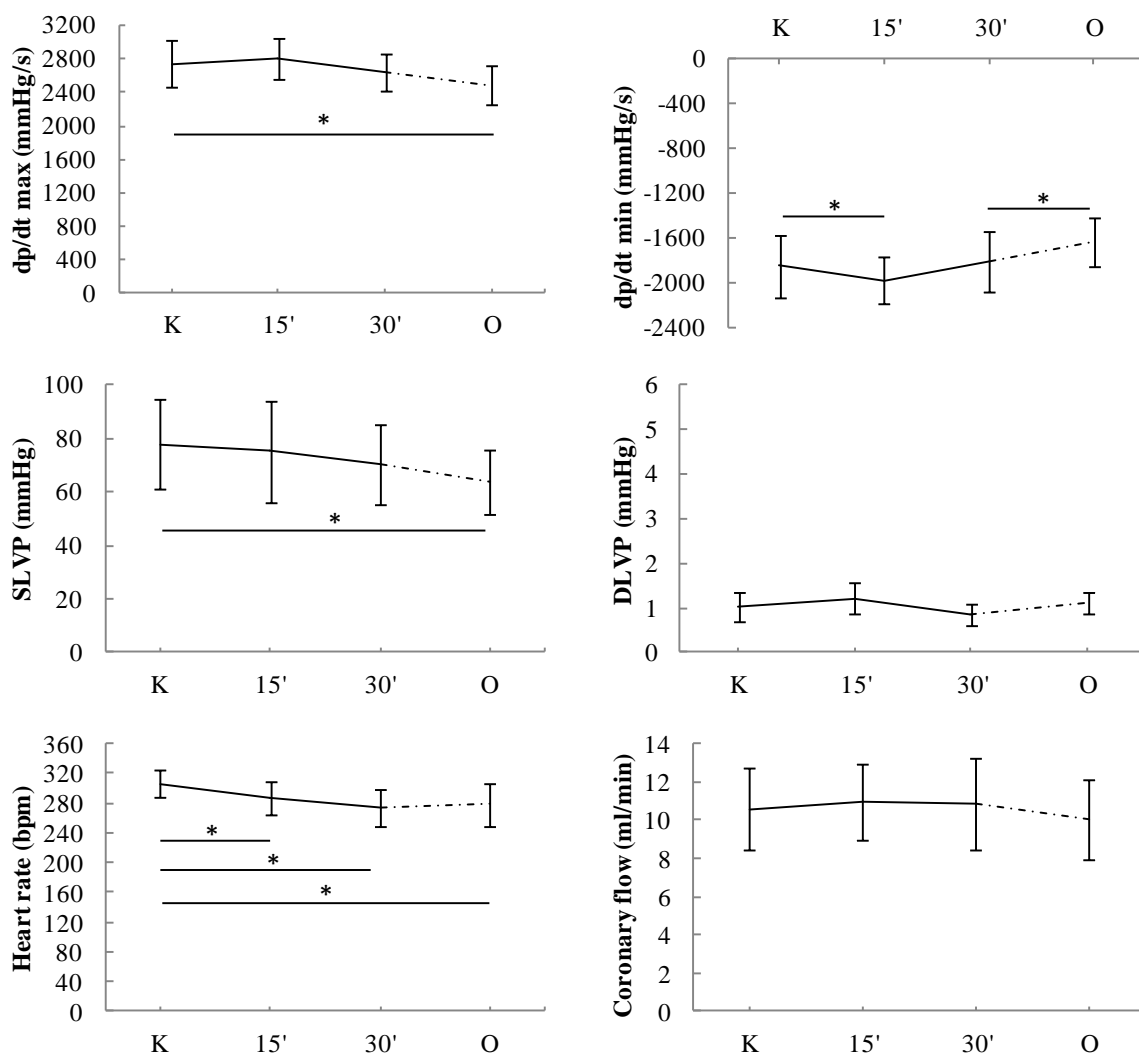


График 10. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлорида-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 19 и 20, као и на Графику 11.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори и систолног притиска.

Табела 19. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	2842,20 ± 254,17	2909,40 ± 254,23	2574,25 ± 210,40	2638,92 ± 285,37
dp/dt min(mmHg/s)	-2004,57 ± 295,68	-2027,25 ± 252,68	-1837,85 ± 222,41	-1654,07 ± 262,10
SLVP (mmHg)	86,30 ± 15,53	83,77 ± 17,41	73,83 ± 11,16	67,60 ± 14,36
DLVP (mmHg)	1,27 ± 0,39	1,17 ± 0,48	1,00 ± 0,26	1,18 ± 0,28
HR (bpm)	294,47 ± 26,27	268,05 ± 23,97	279,30 ± 19,71	281,78 ± 16,11
CF (ml/min)	9,80 ± 1,36	9,73 ± 1,30	9,60 ± 1,48	9,47 ± 1,71

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 20. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. О	E15` vs. E30`	E30` vs. О
dp/dt max (mmHg/s)	0,674 ↑2,36%	0,028 ↓9,43%	0,075 ↓7,15%	0,028 ↓11,52%	0,463 ↑2,51%
dp/dt min (mmHg/s)	0,917 ↑1,13%	0,046 ↓8,32%	0,028 ↓17,49%	0,028 ↓9,34%	0,028 ↓10,00%
SLVP (mmHg)	0,116 ↓2,94%	0,028 ↓14,45%	0,028 ↓21,67%	0,028 ↓11,86%	0,116 ↓8,44%
DLVP (mmHg)	0,684 ↓7,89%	0,500 ↓21,05%	0,599 ↓6,58%	0,684 ↓14,29%	0,684 ↑18,33%
HR (bpm)	0,075 ↓8,97%	0,116 ↓5,15%	0,173 ↓4,31%	0,463 ↑4,20%	0,463 ↑0,89%
CF (ml/min)	0,854 ↓0,68%	0,221 ↓2,04%	0,292 ↓3,40%	0,518 ↓1,37%	0,340 ↓1,39%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

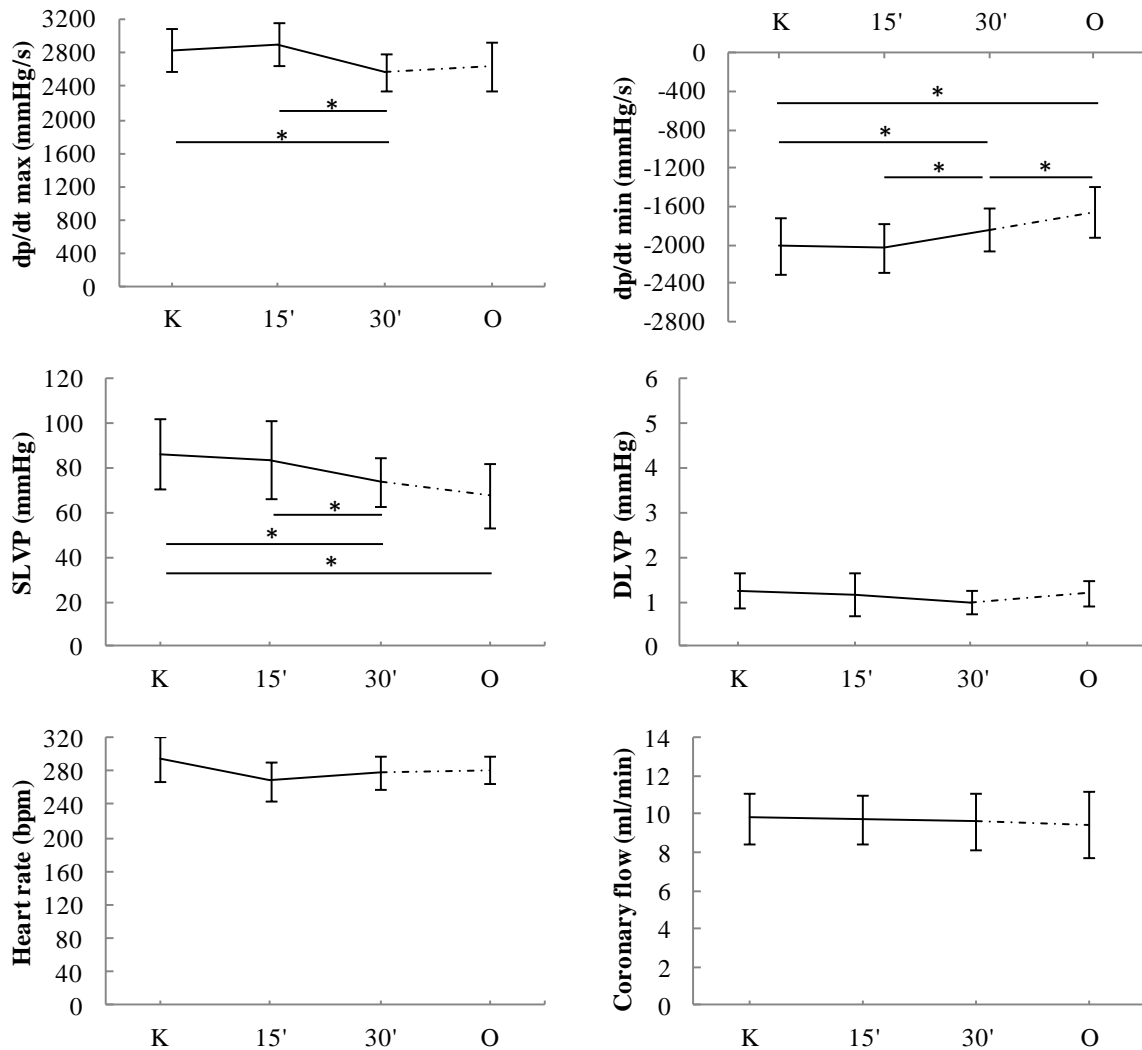


График 11. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.3.4. Поређење ефеката разчићитих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у **Табели 21** као и на **Графику 12**.

Табела 21. Поређење ефеката разчићитих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
dp/dt max (mmHg/s)	K	0,041	0,041	0,699
	15'	0,180	0,180	0,589
	30'	0,132	0,394	0,818
	O	0,589	0,485	0,699
dp/dt min (mmHg/s)	K	0,180	0,041	0,394
	15'	0,132	0,132	0,818
	30'	0,240	0,132	0,818
	O	0,310	0,132	1,000
SLVP (mmHg)	K	0,132	0,015	0,394
	15'	0,394	0,065	0,485
	30'	0,240	0,015	0,699
	O	0,699	0,180	0,937
DLVP (mmHg)	K	1,000	1,000	1,000
	15'	0,240	0,394	0,589
	30'	0,818	1,000	0,937
	O	0,093	0,589	0,937
HR (bpm)	K	0,589	0,240	0,485
	15'	0,937	0,485	0,394
	30'	0,937	0,818	0,937
	O	0,818	0,937	0,818
CF (ml/min)	K	1,000	0,485	0,589
	15'	0,818	0,180	0,310
	30'	0,699	0,132	0,394
	O	0,589	0,240	0,589

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

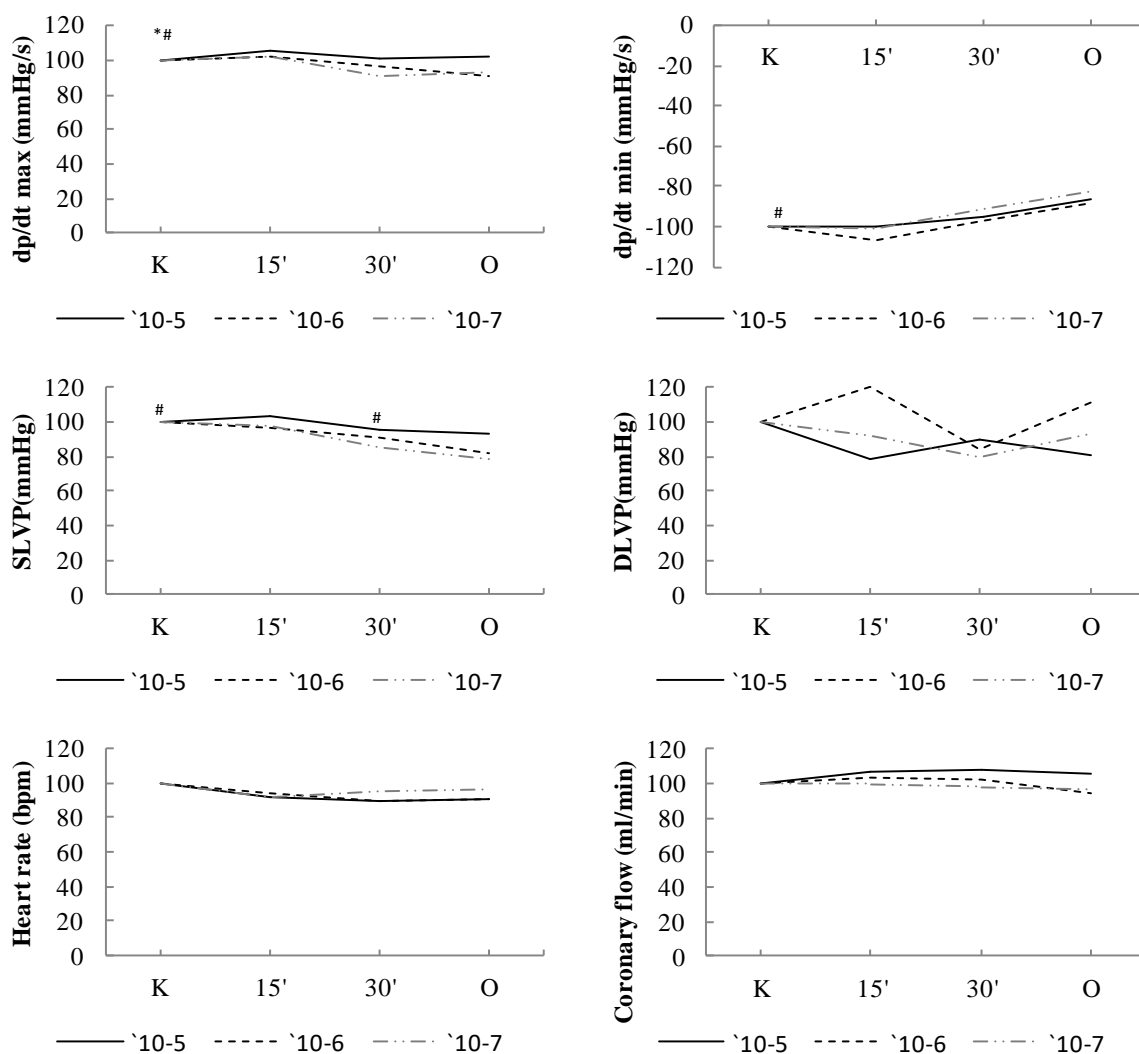


График 12. Поређење ефеката различитих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре и коронарни проток

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5} M$ и $10^{-6} M$, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5} M$ и $10^{-7} M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6} M$ и $10^{-7} M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

4.1.4.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у **Табелама 22 и 23**, као и на **Графику 13**.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска, срчане фреквенце и коронарног протока.

Табела 22. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max (mmHg/s)	2153,27 ± 314,94	1836,12 ± 223,40	1061,37 ± 285,13	803,13 ± 265,28
dp/dt min (mmHg/s)	-1467,07 ± 241,49	-1075,35 ± 174,84	-520,88 ± 167,70	-455,63 ± 144,90
SLVP (mmHg)	62,45 ± 10,42	51,17 ± 7,92	29,80 ± 8,69	31,73 ± 10,41
DLVP (mmHg)	3,32 ± 0,60	3,55 ± 0,53	2,90 ± 0,52	3,33 ± 0,43
HR (bpm)	286,17 ± 24,19	258,47 ± 39,70	247,90 ± 24,99	185,70 ± 36,97
CF (ml/min)	8,97 ± 1,21	6,63 ± 0,93	3,93 ± 1,11	3,13 ± 1,14

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 23. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. O	E15' vs. E30'	E30' vs. O
dp/dt max(mmHg/s)	0,046 ↓14,73%	0,028 ↓50,71%	0,028 ↓62,70	0,028 ↓42,20	0,028 ↓24,33
dp/dt min(mmHg/s)	0,028 ↓26,70%	0,028 ↓64,46%	0,028 ↓68,94%	0,028 ↓51,56%	0,249 ↓12,53%
SLVP (mmHg)	0,028 ↓18,07%	0,028 ↓52,28%	0,028 ↓49,19%	0,027 ↓41,76%	0,917 ↑6,49%
DLVP (mmHg)	0,496 ↑7,04%	0,462 ↓12,56%	0,917 ↑0,50%	0,116 ↓18,31%	0,340 ↑14,94%
HR (bpm)	0,116 ↓9,68%	0,075 ↓13,37%	0,028 ↓35,11%	0,463 ↓4,09%	0,046 ↓25,09%
CF (ml/min)	0,027 ↓26,02%	0,028 ↓56,13%	0,028 ↓65,06%	0,027 ↓40,70%	0,026 ↓20,34%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

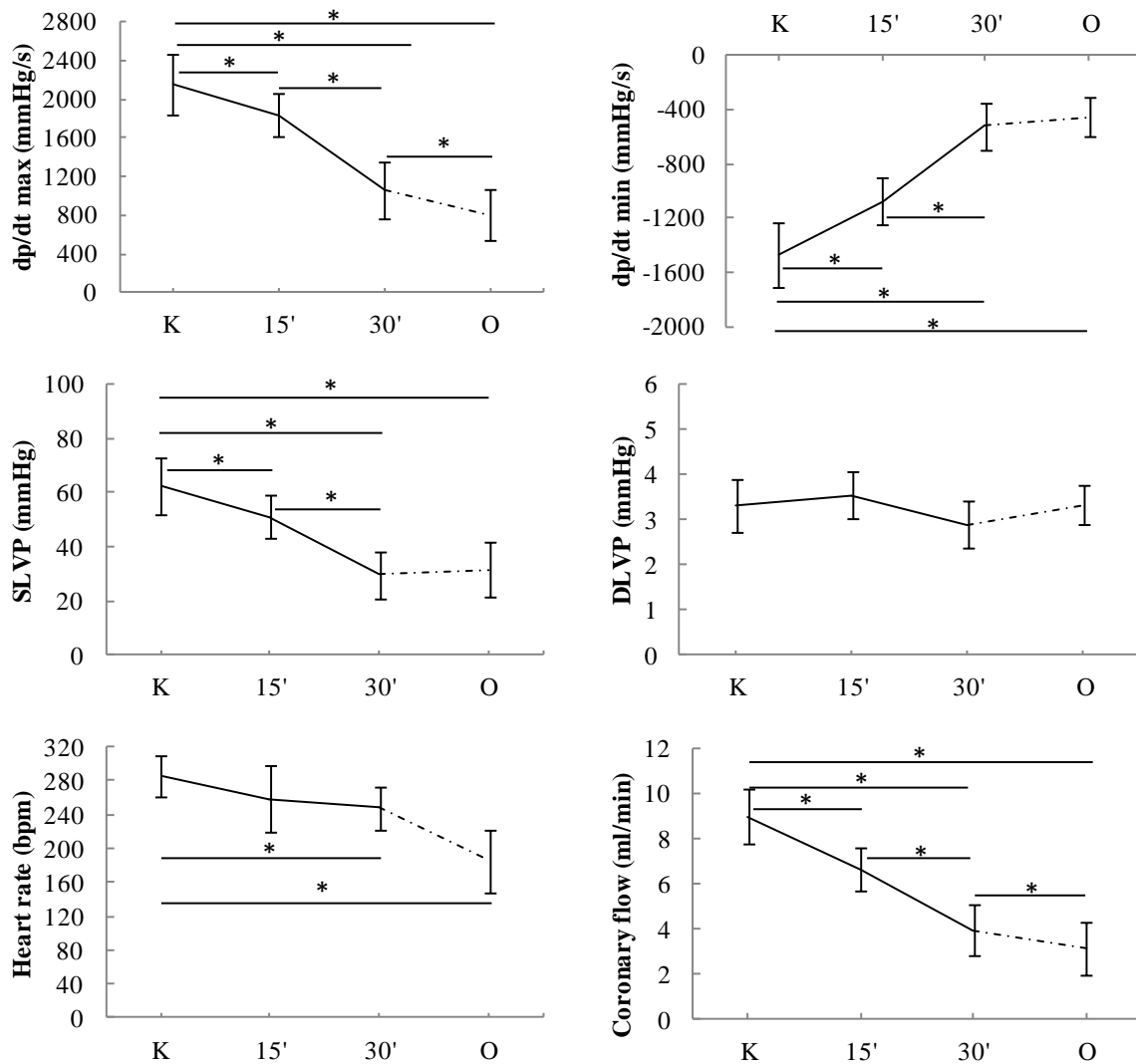


График 13. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене ,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6}M) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 24 и 25, као и на Графику 14.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене: минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска и срчане фреквенце.

Табела 24. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправка (X±SD)
dp/dt max(mmHg/s)	1892,95 ± 122,78	1964,20 ± 179,56	1788,20 ± 73,22	1775,90 ± 103,85
dp/dt min(mmHg/s)	-1147,72 ± 118,28	-1135,10 ± 115,30	-942,97 ± 75,22	-869,55 ± 91,76
SLVP (mmHg)	49,48 ± 3,36	48,20 ± 5,04	43,52 ± 4,95	41,37 ± 3,34
DLVP (mmHg)	2,13 ± 0,44	2,07 ± 0,52	2,22 ± 0,35	2,25 ± 0,41
HR (bpm)	299,12 ± 18,58	280,77 ± 7,49	269,23 ± 6,30	267,50 ± 7,02
CF (ml/min)	8,83 ± 1,48	8,40 ± 1,00	8,13 ± 1,19	7,90 ± 1,26

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 25. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M

Параметар	K vs. E15`	K vs. E30`	K vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
dp/dt max (mmHg/s)	0,463 ↑3,76%	0,753 ↓5,53%	0,345 ↓6,18%	0,116 ↓8,96%	0,463 ↓0,69%
dp/dt min (mmHg/s)	0,753 ↓1,10%	0,046 ↓17,84%	0,028 ↓24,24%	0,028 ↓16,93%	0,046 ↓7,79%
SLVP (mmHg)	0,463 ↓2,59%	0,028 ↓12,06%	0,028 ↓16,40%	0,028 ↓9,72%	0,028 ↓4,94%
DLVP (mmHg)	0,596 ↓3,12%	0,596 ↑4,06%	0,833 ↑5,47%	0,168 ↑7,42%	0,786 ↑1,35%
HR (bpm)	0,116 ↓6,13%	0,075 ↓9,99%	0,046 ↓10,57%	0,046 ↓4,11%	0,917 ↓0,64%
CF (ml/min)	0,206 ↓4,91%	0,207 ↓7,92%	0,093 ↓10,52%	0,285 ↓3,17%	0,336 ↓2,87%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

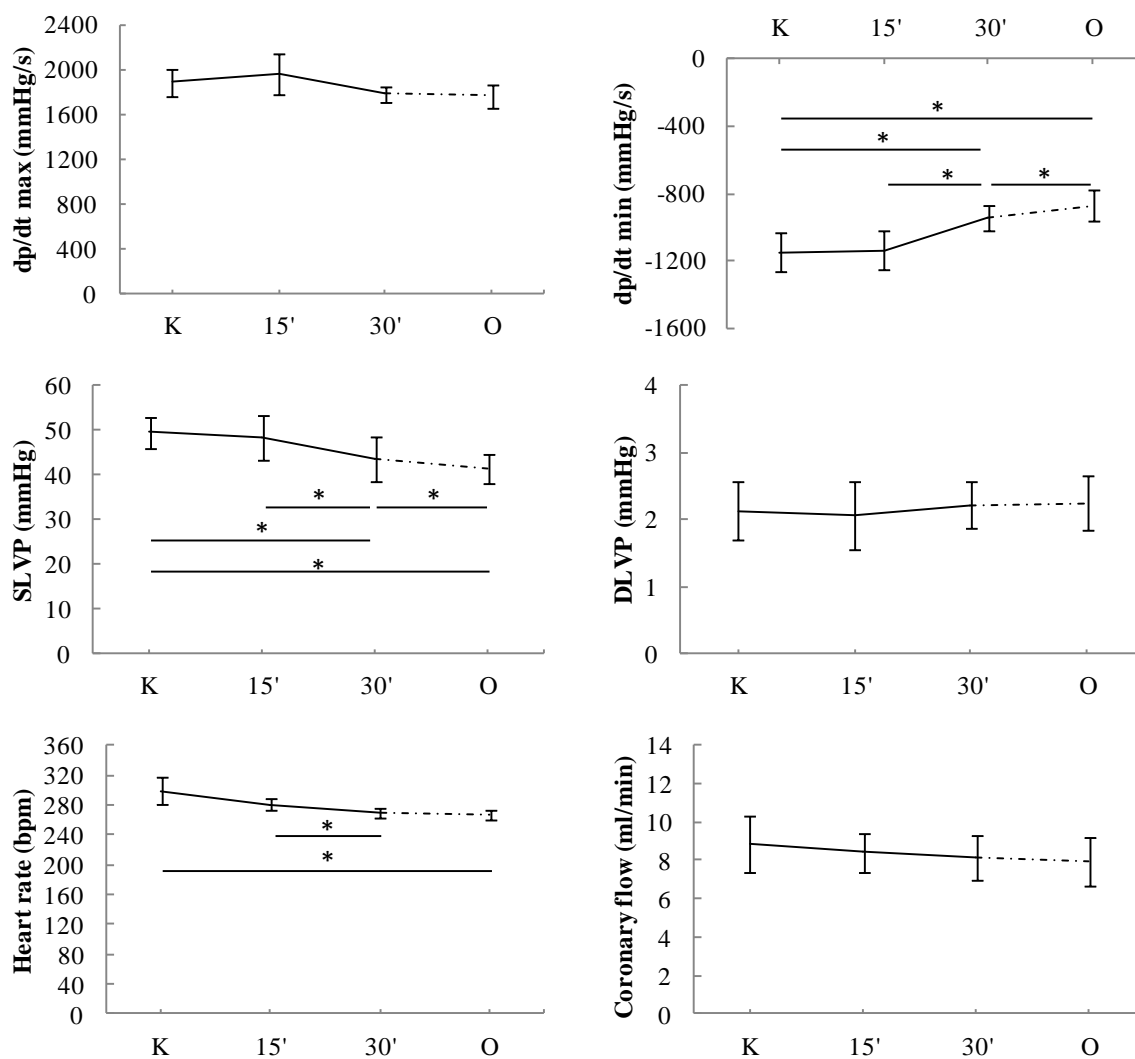


График 14. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене ,2':6',2"-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 26 и 27, као и на Графику 15.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене систолног притиска.

Табела 26. Вредности кардиодинамских параметара и коронарног протока током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
dp/dt max (mmHg/s)	2154,52 ± 251,28	2359,35 ± 253,05	2309,08 ± 267,19	2264,37 ± 291,68
dp/dt min (mmHg/s)	-1449,22 ± 279,55	-1504,33 ± 211,66	-1380,00 ± 221,43	-1281,27 ± 242,37
SLVP (mmHg)	61,75 ± 9,50	64,37 ± 10,28	58,42 ± 12,35	54,80 ± 12,57
DLVP (mmHg)	3,25 ± 0,55	3,62 ± 0,65	3,85 ± 0,43	3,87 ± 0,44
HR (bpm)	288,57 ± 17,81	285,90 ± 14,74	278,20 ± 23,00	284,30 ± 15,90
CF (ml/min)	9,07 ± 1,41	9,27 ± 1,63	9,10 ± 1,62	8,80 ± 1,52

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 27. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
dp/dt max(mmHg/s)	0,046 ↑9,51%	0,463 ↑7,17%	0,752 ↑5,10%	0,345 ↓2,13%	0,463 ↓1,94%
dp/dt min(mmHg/s)	0,600 ↑3,80%	0,463 ↓4,78%	0,116 ↓11,59%	0,249 ↓8,27%	0,249 ↓7,15%
SLVP (mmHg)	0,075 ↑4,24%	0,173 ↓5,40%	0,046 ↓11,26	0,046 ↓9,24%	0,116 ↓6,19%
DLVP (mmHg)	0,225 ↑11,28%	0,080 ↑18,46%	0,141 ↑18,97%	0,249 ↑6,45%	0,343 ↑0,43%
HR (bpm)	0,600 ↓0,92%	0,249 ↓3,59%	0,345 ↓1,48%	0,463 ↓2,69%	0,249 ↑2,19%
CF (ml/min)	0,416 ↑2,21%	1,000 ↑0,37%	0,672 ↓2,94%	0,414 ↓1,80%	0,056 ↓3,30%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

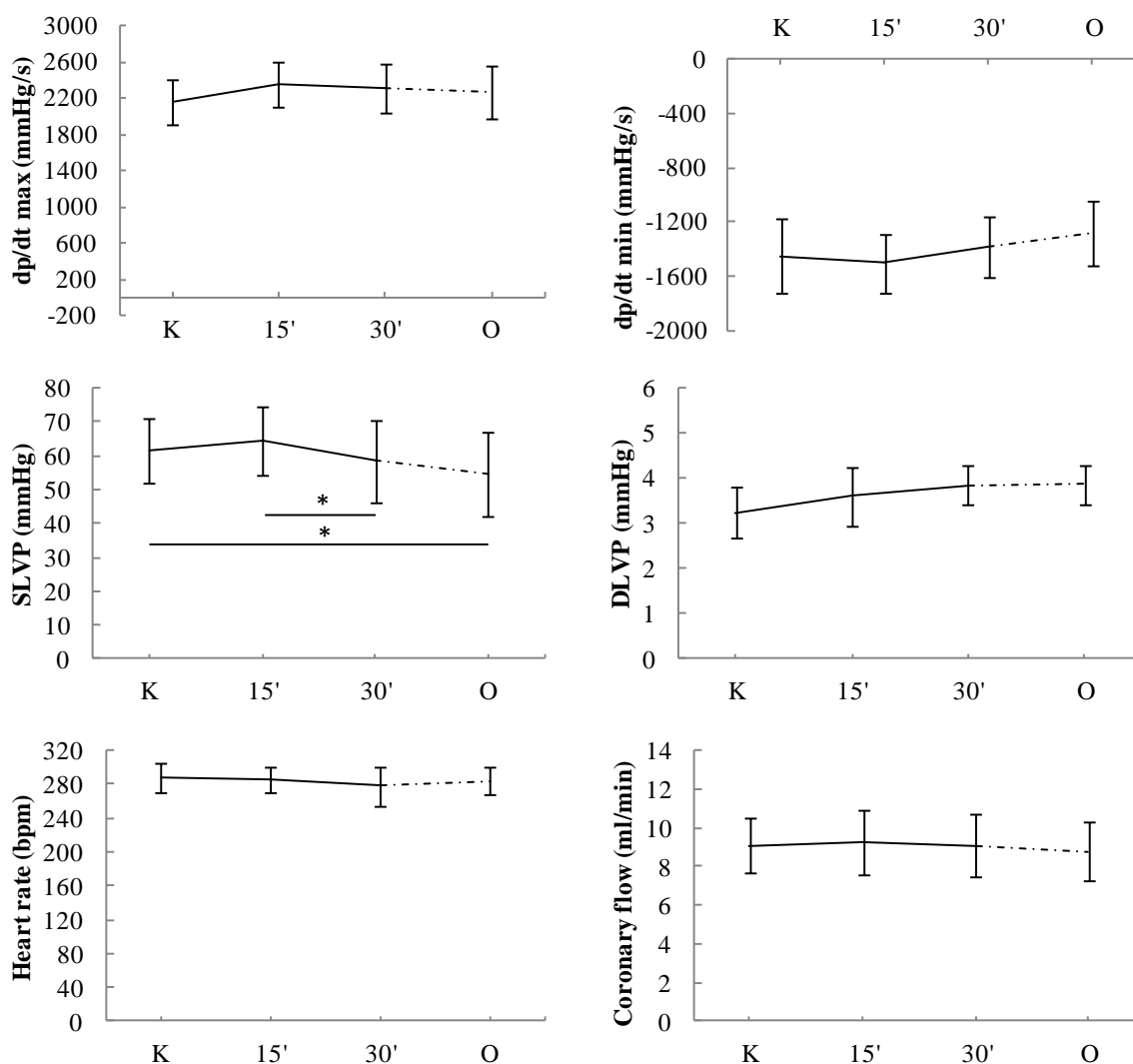


График 15. Кардиодинамски параметри и коронарни проток након примене ,2':6',2"-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.4.4. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табели 28 као и на Графику 16.

Табела 28. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
dp/dt max (mmHg/s)	K	0,093	0,589	0,589
	15'	0,240	0,093	0,240
	30'	0,002	0,002	0,180
	O	0,002	0,002	0,180
dp/dt min (mmHg/s)	K	0,015	0,394	0,589
	15'	0,699	0,132	0,240
	30'	0,002	0,002	0,065
	O	0,002	0,002	0,026
SLVP (mmHg)	K	0,002	0,485	0,310
	15'	0,699	0,240	0,180
	30'	0,015	0,004	0,065
	O	0,394	0,009	0,015
DLVP (mmHg)	K	0,026	0,589	0,065
	15'	0,065	0,699	0,065
	30'	0,394	0,180	0,041
	O	0,093	0,394	0,132
HR (bpm)	K	0,394	0,589	0,310
	15'	0,394	0,180	0,589
	30'	0,699	0,394	0,699
	O	0,240	0,093	0,093
CF (ml/min)	K	0,818	0,937	0,699
	15'	0,015	0,015	0,485
	30'	0,002	0,002	0,240
	O	0,002	0,002	0,180

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

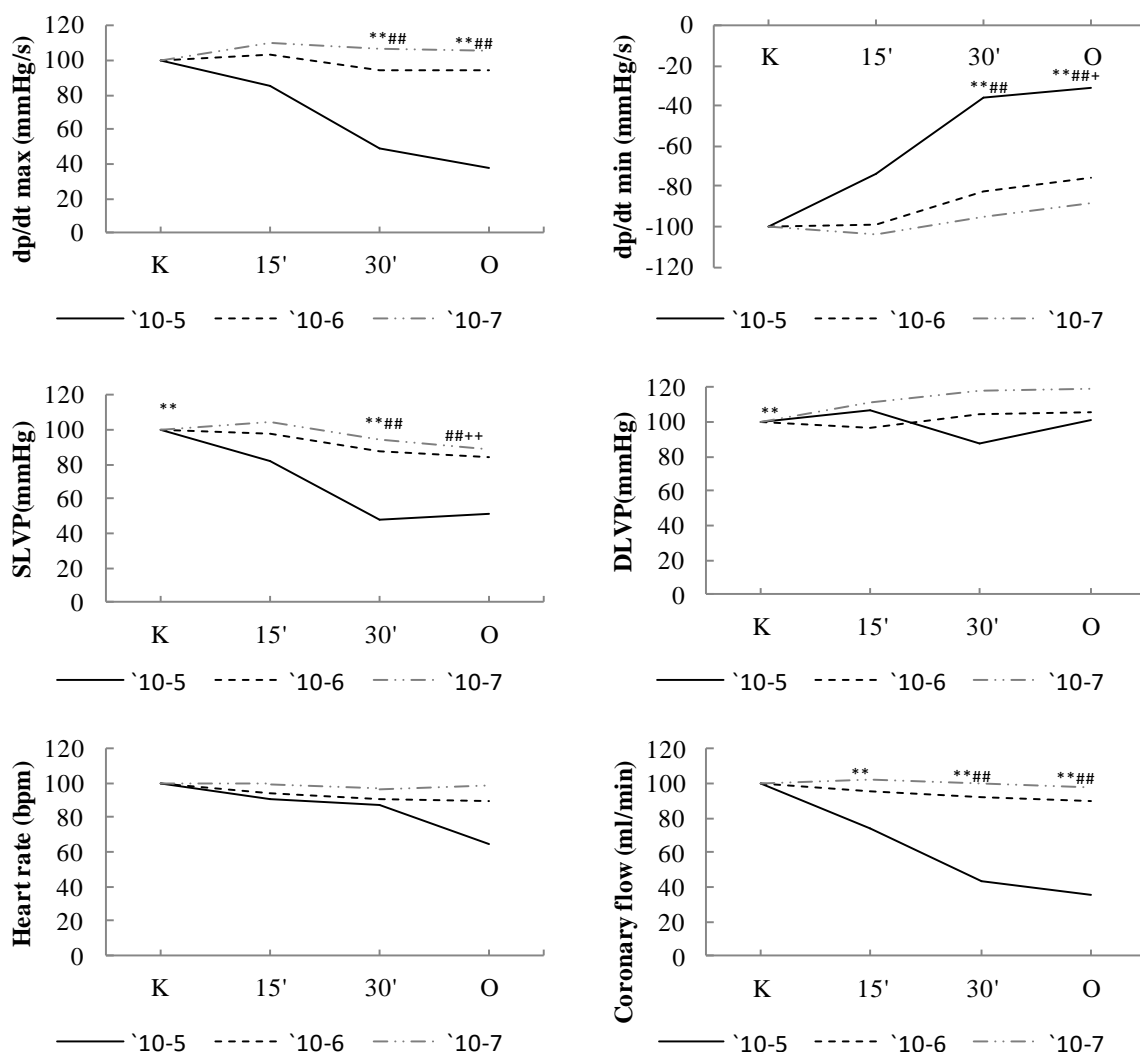


График 16. Поређење ефеката различитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида на кардиодинамске параметре и коронарни проток

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-5} M и 10^{-6} M, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-5} M и 10^{-7} M, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама 10^{-6} M и 10^{-7} M, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.1.5.1. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} M на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 29-31 као и на Графицима 17-19.

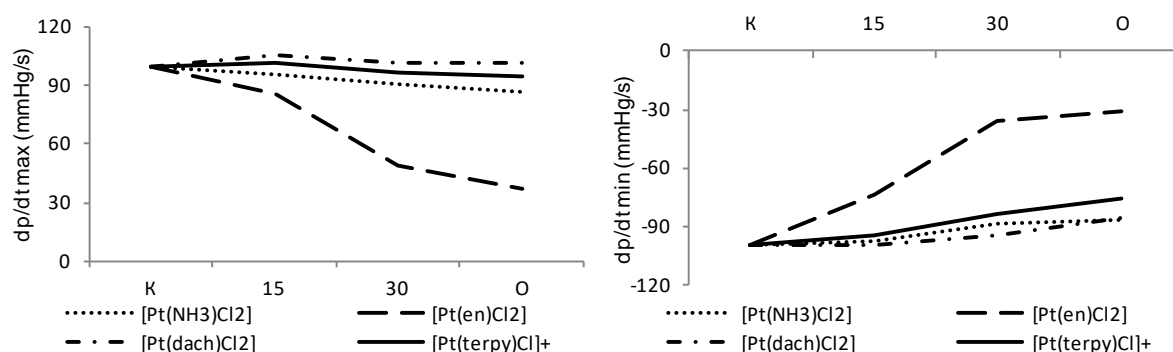


График 17. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 29. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

dp/dt max (mmHg/s)				
	К	15	30	0
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,937	0,937	0,937	,818
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,485	0,699	0,937	1,000
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,310	0,041	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,485	0,589	1,000	0,937
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,394	0,004	0,002	0,002
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,093	0,002	0,002	0,002
dp/dt min (mmHg/s)				
	К	15	30	0
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,937	0,937	0,699	0,937
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,699	0,699	0,818	0,699
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,589	0,026	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,937	0,818	0,699	1,000
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,485	0,015	0,002	0,002
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,180	0,002	0,002	0,002

У табели су приказане вредности статистике за Манн-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

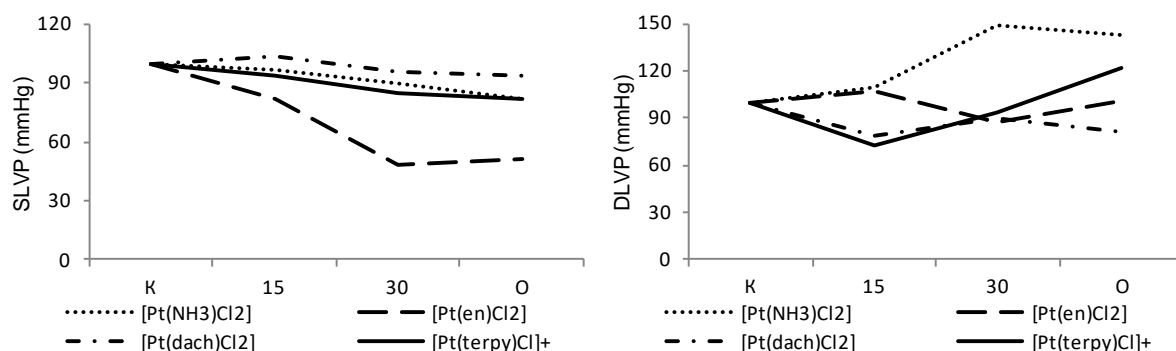


График 18. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 30. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

SLVP (mmHg)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,240	0,818	0,485	0,818
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,818	0,589	0,485	0,818
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,310	0,026	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,699	0,699	0,699
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,937	0,180	0,002	0,009
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	0,009	0,002	0,009
DLVP (mmHg)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,818	0,818	0,589	0,180
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,132	0,240	0,310	0,026
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,004	0,004
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,180	0,180	0,015
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,004	0,002
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,009	0,041	0,132	0,132

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

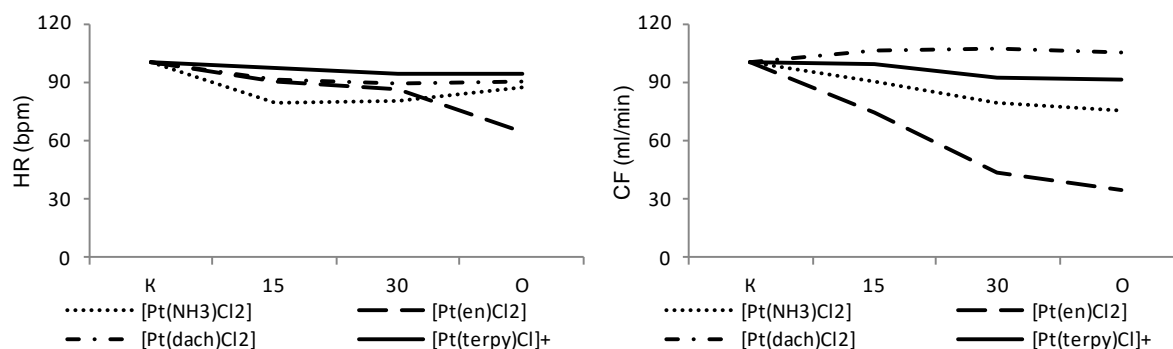


График 19. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 31. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

HR (bpm)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,065	0,818	0,589	0,394
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,065	0,002	0,041	0,818
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,818	0,240	0,589	0,065
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,699	0,002	0,015	0,240
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,093	0,394	0,485	0,041
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	1,000	0,818	0,132
CF (ml/min)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,394	0,180	0,026	0,041
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,180	0,093	0,093	0,041
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	0,002	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,015	0,004	0,004
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,093	0,002	0,002	0,002
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,937	0,093	0,004	0,009

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.1.5.2. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 32-34 као и на Графицима 20-22.

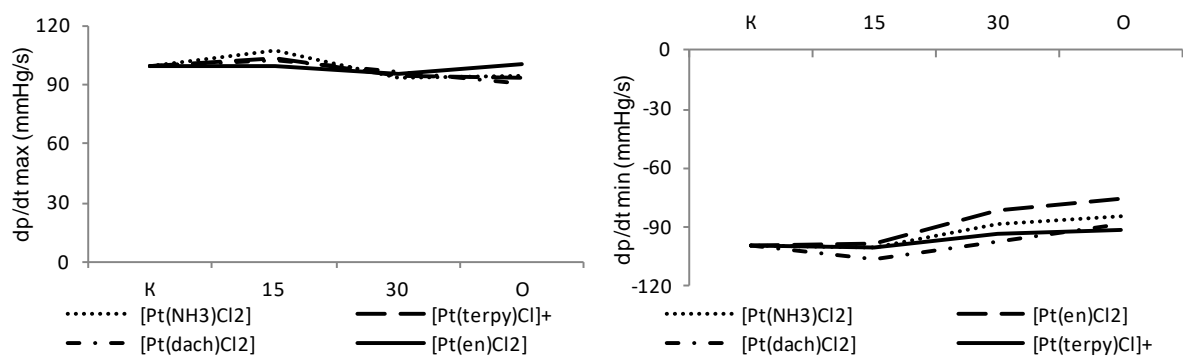


График 20. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 32. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

dp/dt max (mmHg/s)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	1,000	0,394	0,485	0,589
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,002	0,002	0,002	0,002
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,002	0,002	0,002	0,004
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,004
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,818	1,000	0,310	0,485
dp/dt min (mmHg/s)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,699	0,937	0,818	0,589
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,015	0,009	0,015	0,002
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,026	0,009	0,015	0,065
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,004	0,002	0,002	0,002
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	0,310	0,240	0,041

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

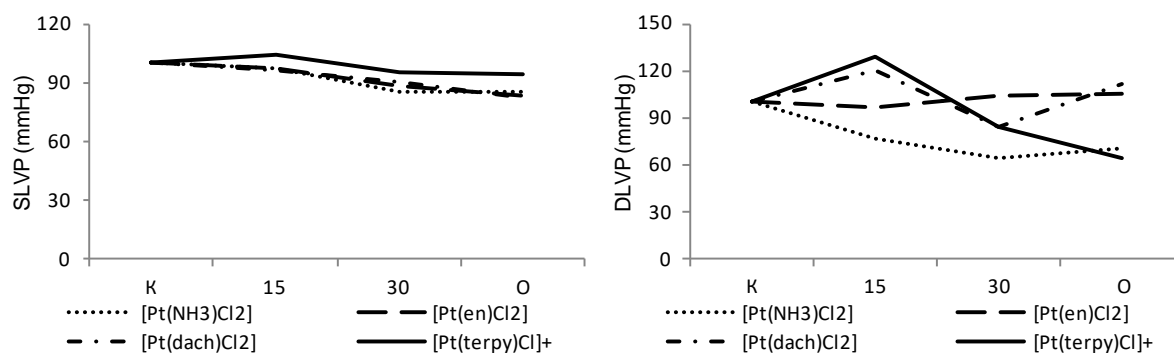


График 21. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 33. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

SLVP (mmHg)				
	К	15	30	0
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,485	0,699	0,818	0,699
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,026	0,004	0,004	0,002
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,041	0,065	0,015	0,310
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,009	0,002	0,065
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	0,180	0,589	0,093
DLVP (mmHg)				
	К	15	30	0
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,310	0,937	0,589	0,394
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,310	0,589	1,000	0,180
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,026	0,180	0,093	0,041
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,093	0,589	0,818	0,699
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,132	0,240	0,093	0,132
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,688	0,575	0,376	0,574

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

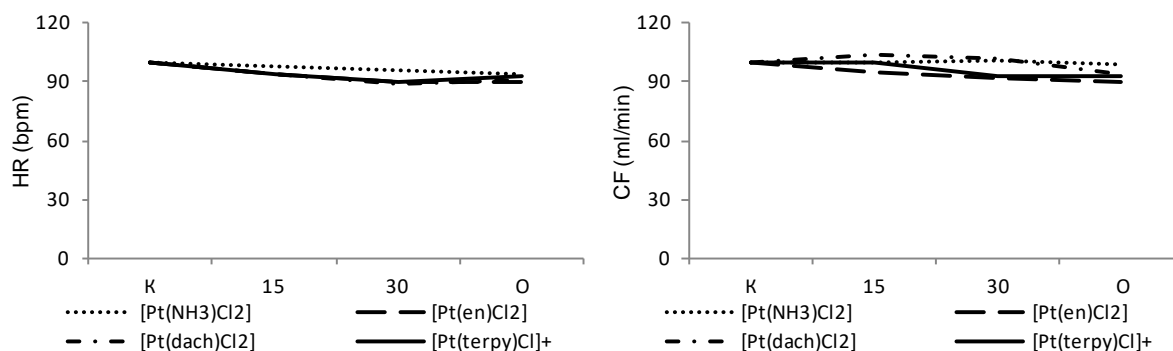


График 22. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 34. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

HR (bpm)				
	K	15	30	O
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,818	0,699	0,937	0,310
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,485	0,699	0,065
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,180	0,310	0,240	0,015
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,394	0,394	0,699	0,699
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,818	0,485	0,818	0,818
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,485	0,937	0,485	0,937
CF (ml/min)				
	K	15	30	O
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,589	0,699	0,485	0,589
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,004	0,009	0,015	0,026
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,093	0,009	0,041	0,026
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,015	0,004	0,026	0,026
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,180	0,026	0,041	0,065
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,132	0,132	0,240	0,394

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.1.5.3. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказани су у Табелама 35-37 као и на Графицима 23-25.

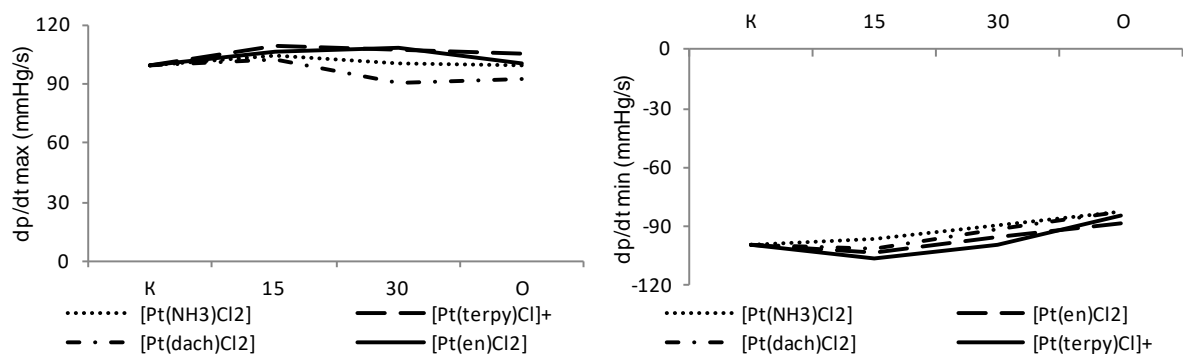


График 23. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 35. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори

dp/dt max (mmHg/s)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,394	0,485	0,937	0,937
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,485	0,394	0,065	0,394
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,310	0,310	0,394	0,310
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,026	0,093	0,180	0,132
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,065	0,180	0,699	0,240
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,394	0,818	0,937	0,818
dp/dt min (mmHg/s)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,485	0,818	0,937	0,937
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,002	0,009	0,093
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,132 ^b	0,132	0,065	0,132
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,041	0,093	0,041	0,093
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,065	0,093	0,093	0,180
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,394	0,818	0,937	0,937

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

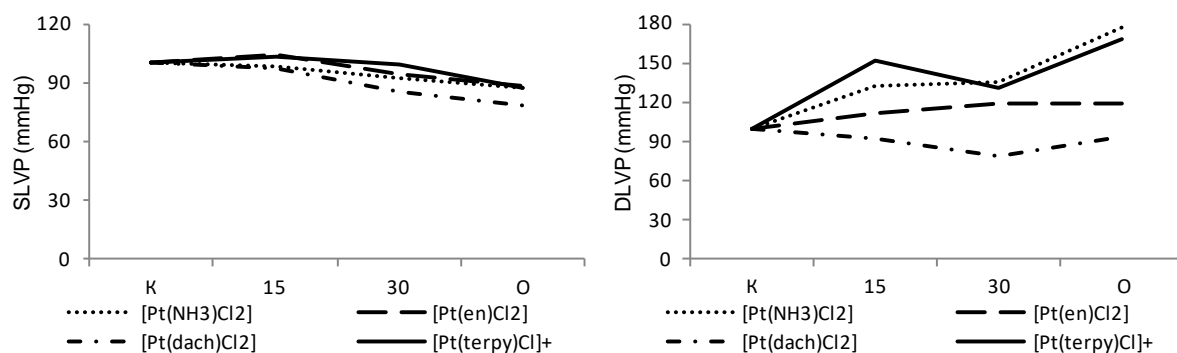


График 24. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 36. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на систолни и дијастолни притисак у левој комори

SLVP (mmHg)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,132	0,394	0,699	,589 ^b
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,065	0,002	0,004	,065 ^b
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,240	0,310	0,093	,240 ^b
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,015	0,041	0,041	,093 ^b
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,041	0,132	0,180	,180 ^b
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,485	0,699	0,699	0,937
DLVP (mmHg)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,485	0,132	0,240	0,180
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,132	0,026	0,132	0,180
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,065	0,132	0,180	0,485
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	1,000	0,937	0,937	0,937
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,180	0,093	0,015	0,041
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,065	0,065	0,026	0,026

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

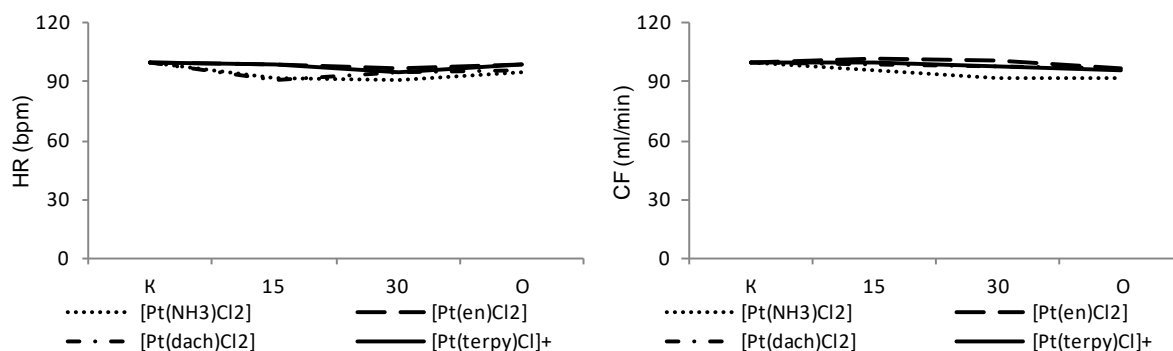


График 25. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 37. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на срчану фреквенцу и коронарни проток

HR (bpm)				
	K	15	30	O
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,394	0,093	0,240	0,132
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,015	0,015	0,065
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,310	0,310	0,310	0,240
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,485	0,699	0,180	0,485
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,818	0,394	1,000	0,699
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,818	0,026	0,180	0,485
CF (ml/min)				
	K	15	30	O
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,945	0,731	0,731	1,000
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,138	0,836	0,731	0,731
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,366	0,628	0,628	0,445
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,240	0,485	0,589	0,589
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,394	0,818	0,589	0,589
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,065	0,240	0,240	0,132

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

4.2.1. Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

4.2.1.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табелама 38 и 39**, као на и **Графику 26**.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала, нитрита и индекса липидне пероксидације.

Табела 38. Вредности параметара оксидационог стреса током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	18,57 ± 5,44	15,32 ± 4,57	12,86 ± 3,73	15,98 ± 4,82
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	101,78 ± 22,22	92,42 ± 14,18	84,06 ± 14,11	86,05 ± 24,16
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	64,85 ± 13,08	99,09 ± 22,26	93,94 ± 25,44	57,92 ± 15,29
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	35,87 ± 4,95	35,18 ± 13,21	29,12 ± 10,59	29,47 ± 10,97

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 39. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,018 ↓17,55%	0,018 ↓30,77%	0,398 ↓13,97%	0,043 ↓16,03%	0,128 ↑24,27%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,063 ↓9,20%	0,018 ↓17,41%	0,028 ↓15,45%	0,018 ↓9,05%	0,866 ↑2,38%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,018 ↑52,82%	0,043 ↑44,86%	0,310 ↓10,69%	0,612 ↓5,21%	0,063 ↓38,34%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,735 ↓1,93%	0,063 ↓18,80%	0,176 ↓17,84%	0,043 ↓17,20%	0,735 ↑1,18%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

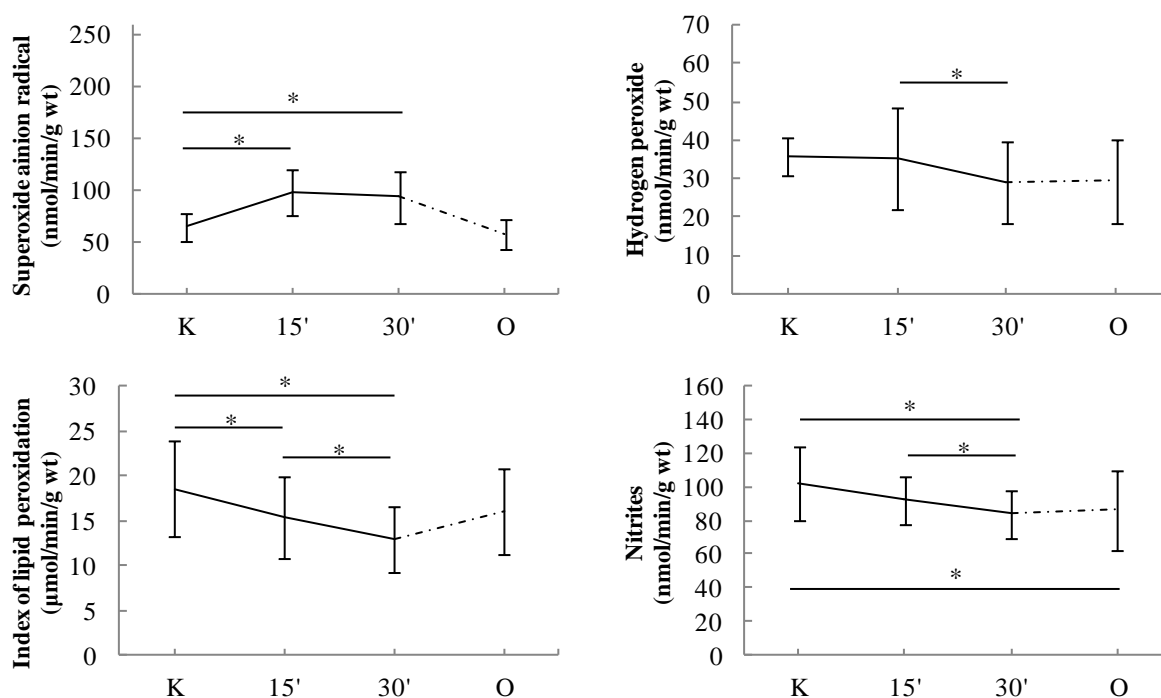


График 26. Параметри оксидационог стреса након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табелама 40 и 41**, као на и **Графику 27**.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала и индекса липидне пероксидације.

Табела 40. Вредности параметара оксидационог стреса током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	24,39 ± 6,45	23,01 ± 5,08	19,75 ± 8,29	21,87 ± 6,14
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	118,42 ± 10,15	122,94 ± 19,95	125,80 ± 18,49	118,20 ± 18,29
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	96,97 ± 11,69	151,16 ± 48,88	168,42 ± 36,33	199,76 ± 52,09
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	52,13 ± 10,63	52,37 ± 15,55	53,61 ± 4,45	47,48 ± 10,61

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 41. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,463 ↓5,66%	0,046 ↓19,02%	0,173 ↓10,32%	0,344 ↓14,16%	0,463 ↑10,74%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,249 ↑3,81%	0,173 ↑6,23%	0,893 ↓0,19%	0,345 ↑2,33%	0,046 ↓6,04%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↑55,88%	0,028 ↑73,68%	0,028 ↑105,99%	0,600 ↑11,42%	0,345 ↑18,61%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,917 ↑0,45%	0,753 ↑2,83%	0,463 ↓8,93%	0,917 ↑2,37%	0,116 ↓11,43%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

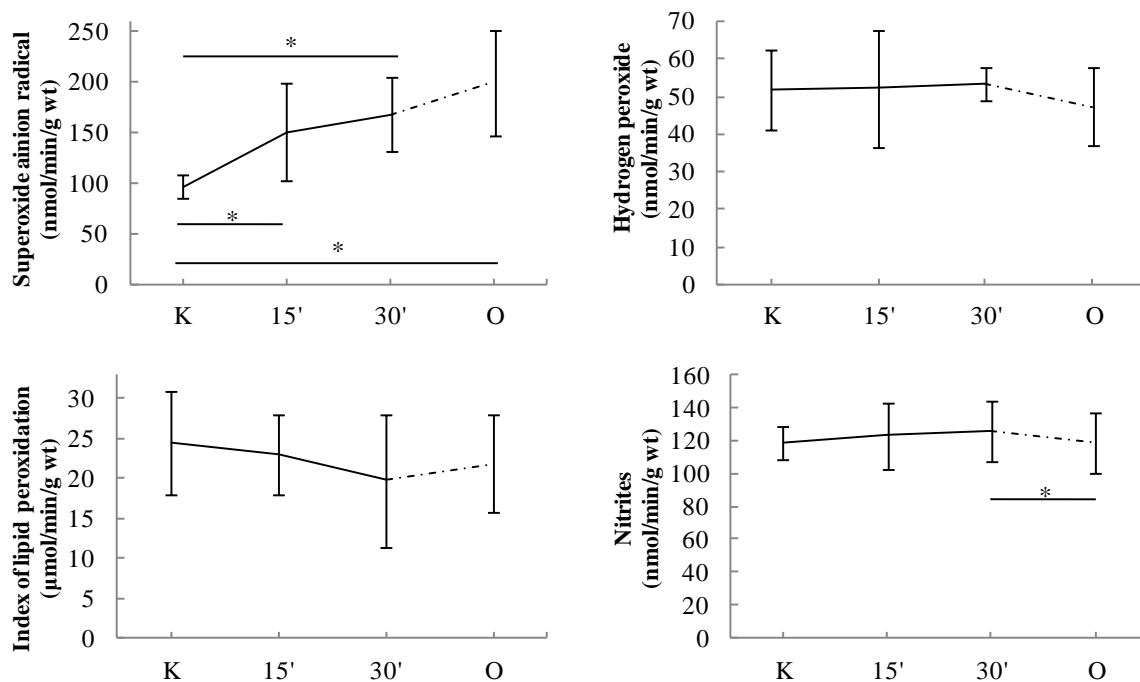


График 27. Параметри оксидационог стреса након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6}M

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табелама 42 и 43**, као на и **Графику 28**.

Примена цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала.

Табела 42. Вредности параметара оксидационог стреса током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	17,96 ± 7,12	17,50 ± 9,73	14,37 ± 4,72	16,48 ± 5,73
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	133,46 ± 24,13	124,72 ± 27,89	120,22 ± 27,19	124,42 ± 26,24
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	134,00 ± 28,98	83,74 ± 12,23	93,36 ± 23,78	91,80 ± 11,02
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	53,87 ± 11,06	52,45 ± 15,70	57,06 ± 21,44	54,23 ± 18,80

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 43. Вредности статистике и процентуалних промена током примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,753 ↓2,54%	0,173 ↓19,99%	0,600 ↓8,23%	0,345 ↓17,90%	0,249 ↑14,70%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,116 ↓6,55%	0,116 ↓9,91%	0,173 ↓6,77%	0,600 ↓3,61%	0,080 ↑3,49%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↓37,51%	0,116 ↓30,33%	0,028 ↓31,49%	0,600 ↑11,49%	0,753 ↓1,68%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,345 ↓2,69%	0,600 ↑5,91%	0,917 ↑0,67%	0,249 ↑8,79%	0,345 ↓4,95%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

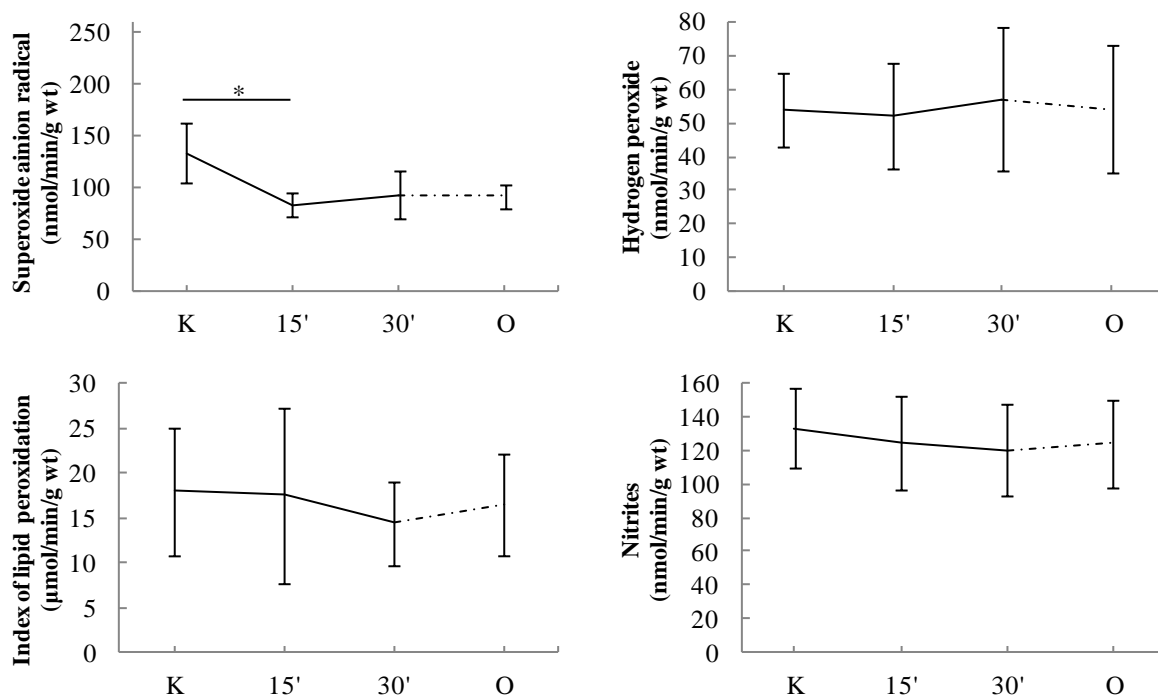


График 28. Параметри оксидационог стреса након примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.1.4. Поређење ефеката разчићитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 44 као и на Графику 29.

Табела 44. Поређење ефекат примењених доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,101	0,731	0,240
	15'	0,035	0,945	0,240
	30'	0,073	0,731	0,180
	O	0,073	1,000	0,180
NO_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,138	0,035	0,394
	15'	0,008	0,022	0,699
	30'	0,001	0,005	0,394
	O	0,073	0,022	0,699
O_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,002	0,001	0,009
	15'	0,022	0,181	0,002
	30'	0,005	0,836	0,009
	O	0,001	0,002	0,002
H_2O_2 ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,014	0,005	0,818
	15'	0,051	0,073	0,937
	30'	0,005	0,014	0,589
	O	0,014	0,014	0,818

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

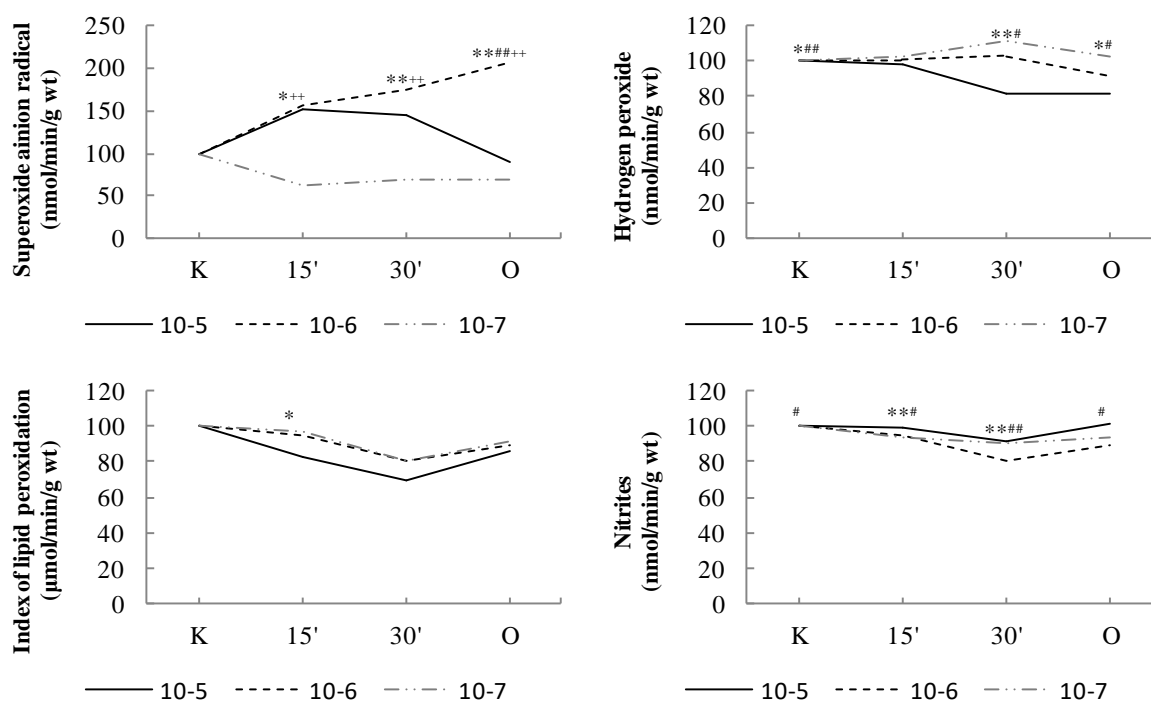


График 29. Поређење ефеката различитих доза цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на параметре оксидационог стреса

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$, # $p < 0,05$ и ### $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-7}M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6}M$ и $10^{-7}M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

4.2.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 45 и 46, као на и Графику 30.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији нитрита.

Табела 45. Вредности параметара оксидационог стреса током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	18,28 ± 6,27	17,67 ± 9,88	17,03 ± 8,25	18,05 ± 6,74
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	119,08 ± 16,17	118,45 ± 25,05	105,67 ± 17,09	104,17 ± 19,08
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	35,22 ± 17,40	42,69 ± 19,54	28,36 ± 15,78	45,88 ± 23,75
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	32,13 ± 4,76	27,96 ± 3,36	28,10 ± 8,87	27,61 ± 6,95

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 46. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,310 ↓3,32%	0,310 ↓6,81%	0,866 ↓1,27%	0,310 ↓3,60%	0,398 ↑5,94%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,735 ↓0,52%	0,043 ↓11,26%	0,128 ↓12,52%	0,128 ↓10,79%	1,000 ↓1,42%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,327 ↑21,22%	0,575 ↓19,48%	0,575 ↑30,27%	0,128 ↓33,58%	0,327 ↑61,79%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,063 ↓12,99%	0,237 ↓12,54%	0,176 ↓14,09%	0,735 ↑0,52%	0,866 ↓1,77%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

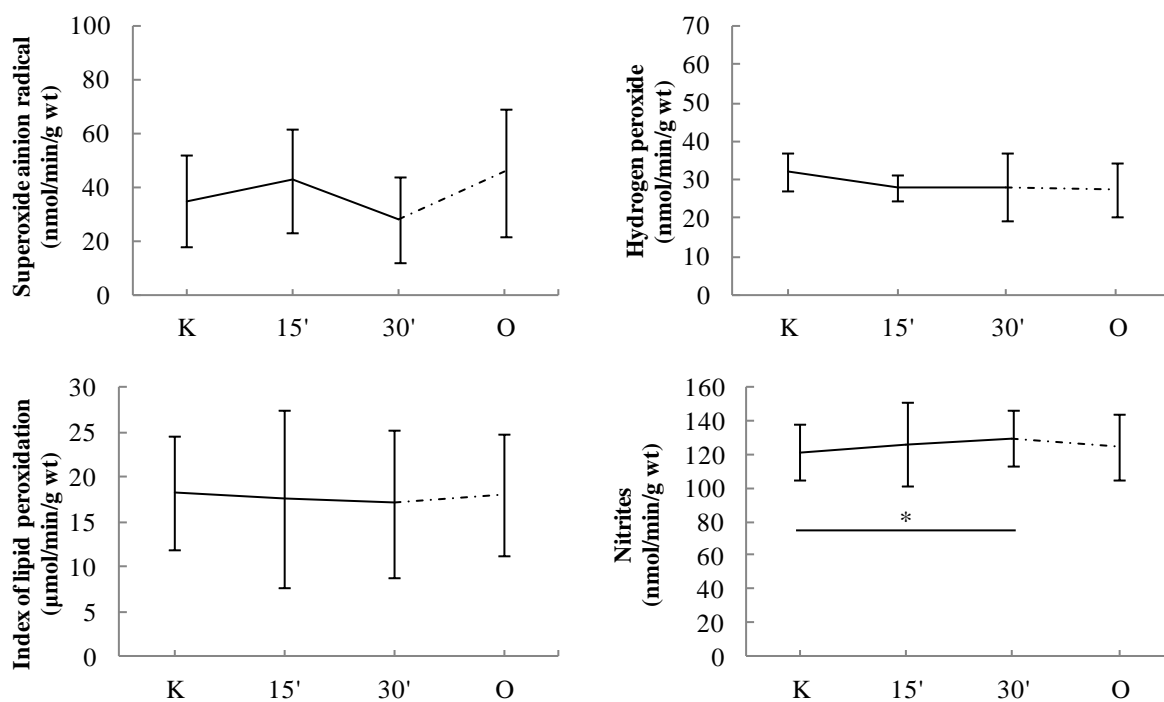


График 30. Параметри оксидационог стреса након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 47 и 48, као на и Графику 31.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анијон радикала

Табела 47. Вредности параметара оксидационог стреса током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	31,35 ± 3,76	29,16 ± 4,23	28,81 ± 4,37	27,28 ± 4,76
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	121,97 ± 20,8	127,38 ± 21,74	121,55 ± 28,27	119,23 ± 26,37
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	57,31 ± 20,36	109,05 ± 36,12	98,34 ± 34,42	68,31 ± 40,58
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	33,95 ± 7,36	32,99 ± 7,02	31,74 ± 4,15	29,41 ± 4,32

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 48. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,310 ↓6,99%	0,091 ↓8,10%	0,091 ↓12,98%	0,310 ↓1,20%	0,398 ↓5,31%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,866 ↑4,44%	0,499 ↓0,34%	0,398 ↓2,25%	0,398 ↓4,58%	0,735 ↓1,91%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,091 ↑90,28%	0,043 ↑71,59%	0,310 ↑19,19%	0,176 ↓9,82%	0,043 ↓30,54%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,735 ↓2,82%	0,310 ↓6,50%	0,176 ↓13,37%	0,398 ↓3,78%	0,398 ↓7,35%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

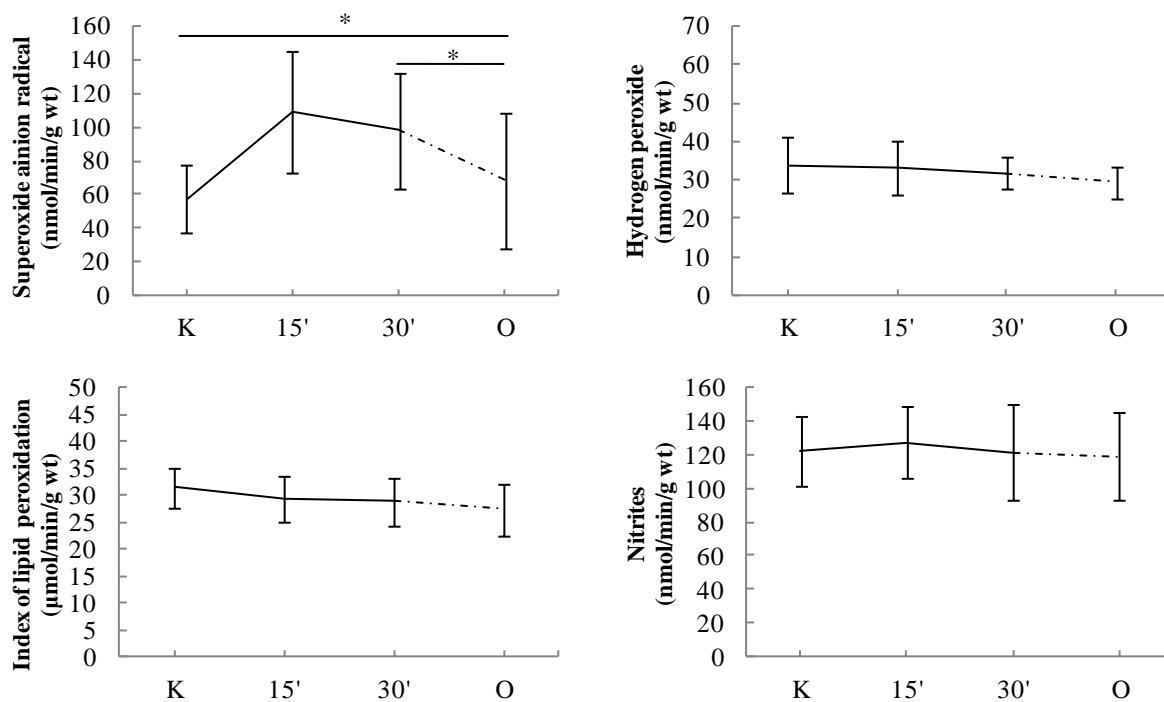


График 31. Параметри оксидационог стреса након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 49 и 50, као на и Графику 32.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији: супероксид анион радикала и водоник пероксида.

Табела 49. Вредности параметара оксидационог стреса током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	28,53 ± 5,48	28,93 ± 3,57	26,24 ± 2,71	26,96 ± 3,82
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	117,37 ± 11,7	116,09 ± 9,71	114,45 ± 11,77	112,41 ± 10,19
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	86,27 ± 44,96	96,16 ± 44,39	56,21 ± 25,53	35,29 ± 24,35
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	33,20 ± 5,48	31,20 ± 4,12	29,03 ± 5,55	29,92 ± 5,96

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 50. Вредности статистике и процентуалних промена током примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,612 ↑1,40%	0,237 ↓8,03%	0,310 ↓5,50%	0,128 ↓9,30%	0,612 ↑2,74%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,612 ↓1,09%	0,799 ↓2,49%	0,176 ↓4,23%	0,499 ↓1,41%	0,735 ↓1,78%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,735 ↑11,46%	0,043 ↓34,84%	0,028 ↓59,01%	0,237 ↓41,55%	0,046 ↓37,22%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,176 ↓6,03%	0,018 ↓12,55%	0,034 ↓9,88%	0,176 ↓6,94%	0,237 ↑3,05%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

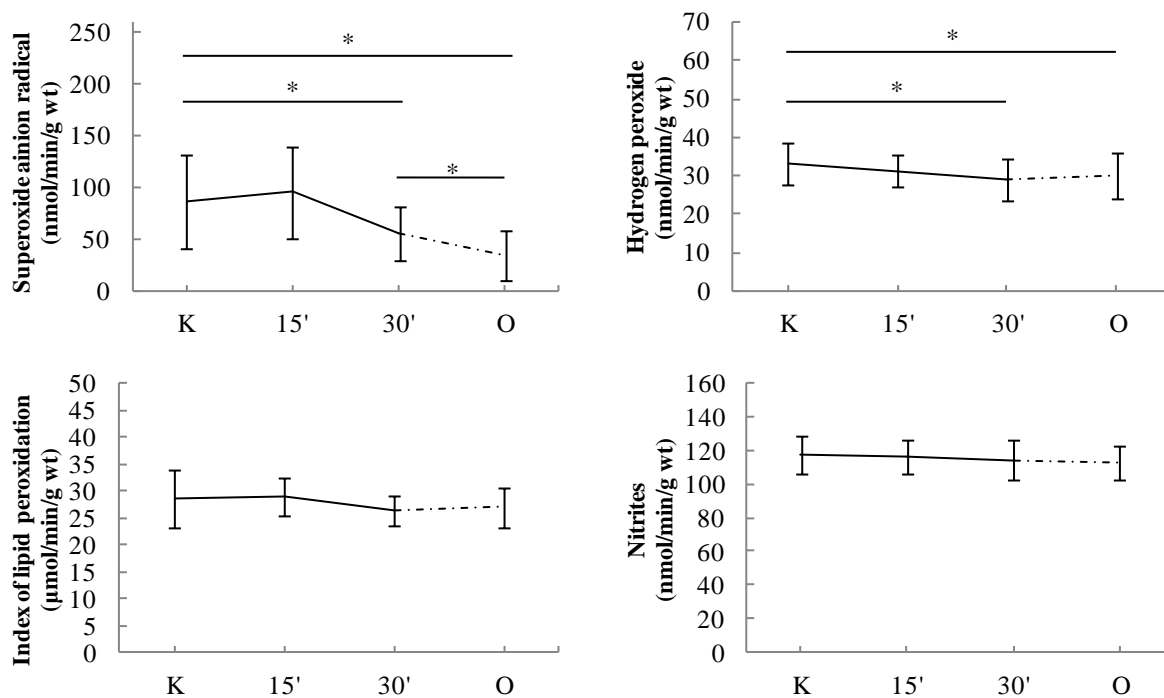


График 32. Параметри оксидационог стреса након примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7}M

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.2.4. Поређење ефеката различитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табели 51** као и на **Графику 33**.

Табела 51. Поређење ефеката различитих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,001	0,011	0,318
	15'	0,017	0,007	1,000
	30'	0,001	0,002	0,456
	O	0,011	0,017	0,902
NO_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,902	1,000	0,710
	15'	0,456	1,000	0,259
	30'	0,259	0,383	0,456
	O	0,535	0,456	0,710
O_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,073	0,007	0,318
	15'	0,017	0,165	0,535
	30'	0,002	0,053	0,073
	O	0,318	0,805	0,097
H_2O_2 ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,535	0,620	1,000
	15'	0,128	0,165	0,535
	30'	0,165	0,620	0,535
	O	0,620	0,535	0,710

У табели су приказане вредности статистике за *Mann-Whitney* тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

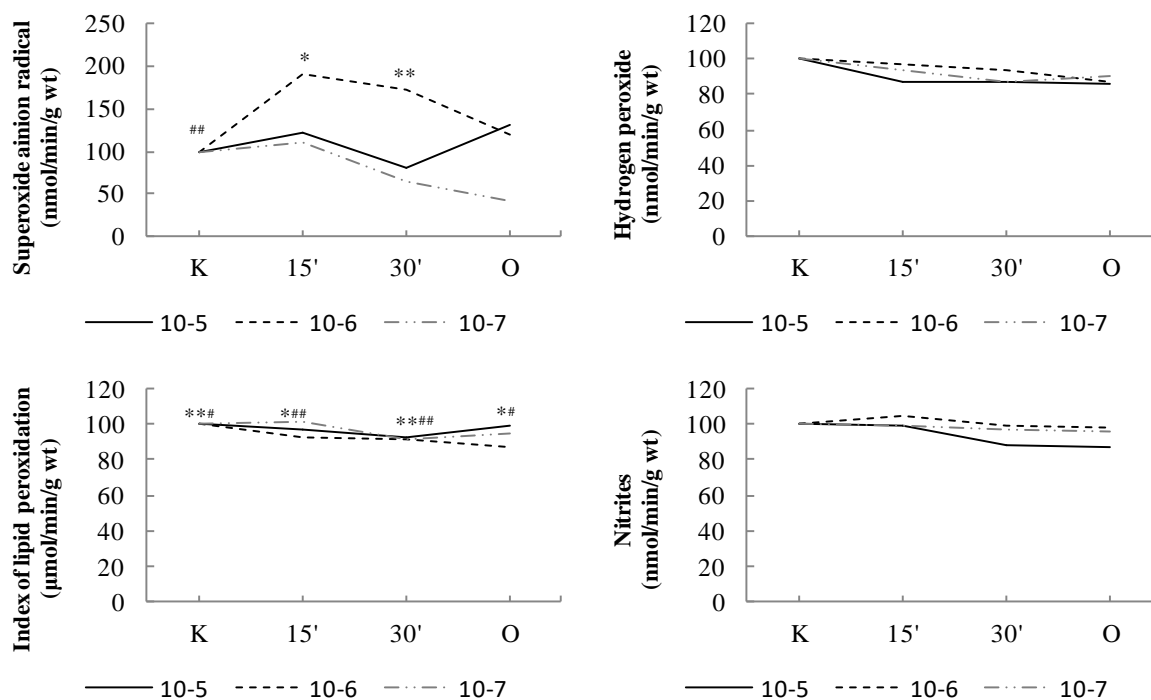


График 33. Поређење ефеката различитих доза примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-7}M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6}M$ и $10^{-7}M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

4.2.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табелама 52 и 53**, као на и **Графику 34**.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији није довела до статистички значајне промене у вредностима параметара оксидационог стреса.

Табела 52. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
ТBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	39,00 ± 9,21	36,93 ± 6,02	36,61 ± 5,67	36,44 ± 5,98
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	121,60 ± 21,37	126,34 ± 18,57	129,87 ± 17,28	124,61 ± 22,07
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	45,36 ± 28,06	47,19 ± 22,64	55,11 ± 15,81	52,18 ± 21,40
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	43,71 ± 13,38	45,69 ± 14,08	45,40 ± 13,21	44,69 ± 12,90

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 53. Вредности статистике и процентуалних промена током примене примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,237 ↓5,31%	0,735 ↓6,14%	0,735 ↓6,56%	0,612 ↓0,87%	0,735 ↓0,45%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,499 ↑3,89%	0,128 ↑6,80%	0,612 ↑2,47%	0,237 ↑2,79%	0,237 ↓4,05%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,499 ↑4,03%	0,398 ↑21,49%	0,735 ↑15,05%	0,128 ↑16,78%	0,398 ↓5,30%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,063 ↑4,53%	0,310 ↑3,85%	0,735 ↑2,23%	0,866 ↓0,65%	0,398 ↓1,56%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

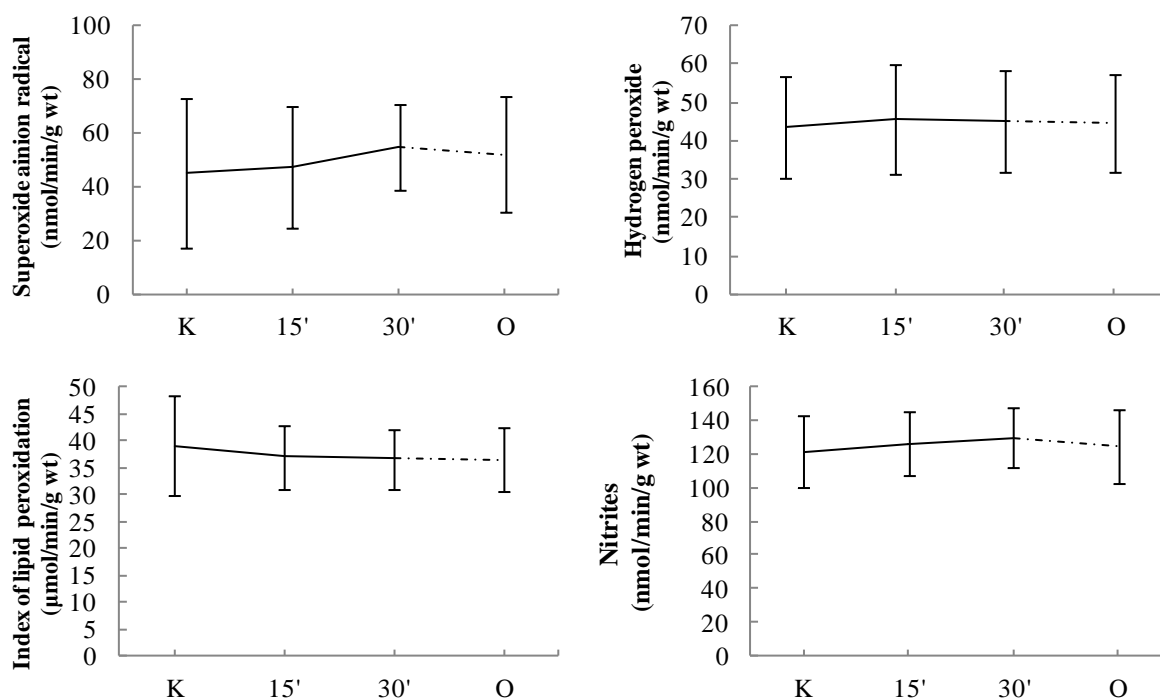


График 34. Параметри оксидационог стреса након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (К- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 54 и 55, као на и Графику 35.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала и водоник пероксида.

Табела 54. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	39,06 ± 7,55	38,90 ± 8,24	40,62 ± 11,39	36,73 ± 9,58
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	112,75 ± 21,04	106,41 ± 25,72	108,73 ± 32,00	107,88 ± 30,38
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	26,66 ± 12,10	45,98 ± 19,73	50,55 ± 21,40	41,67 ± 17,08
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	30,39 ± 6,80	33,19 ± 7,82	40,04 ± 5,28	31,82 ± 8,69

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 55. Вредности статистике и процентуалних промена током примене примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,779 ↓0,39%	0,401 ↑3,99%	0,263 ↓5,95%	0,263 ↑4,40%	0,036 ↓9,56%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,674 ↓5,62%	0,484 ↓3,56%	0,401 ↓4,32%	0,484 ↑2,18%	0,779 ↓0,79%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,012 ↑72,48%	0,017 ↑89,61%	0,036 ↑56,32%	0,401 ↑9,93%	0,401 ↓17,56%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,327 ↑9,21%	0,017 ↑31,78%	0,779 ↑4,70%	0,779 ↑20,67%	0,327 ↓20,55%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

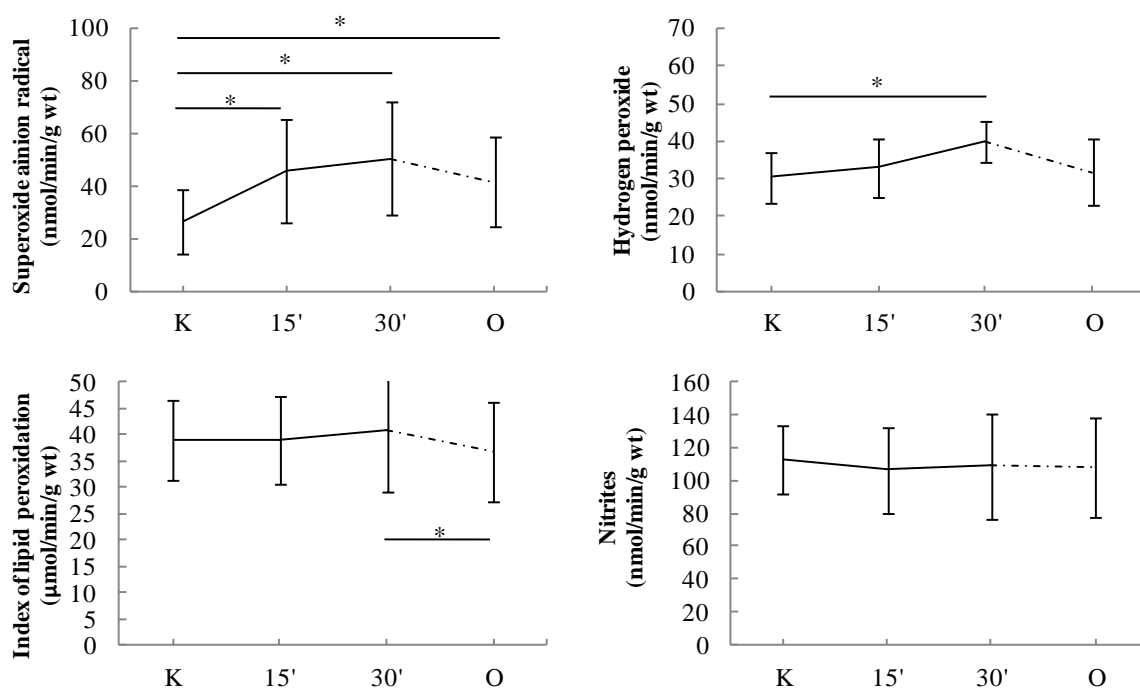


График 35. Параметри оксидационог стреса након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 56 и 57, као на и Графику 36.

Примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала и нитрита.

Табела 56. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15` (X±SD)	Ефекат 30` (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	36,47 ± 7,46	36,56 ± 6,83	35,53 ± 5,99	33,41 ± 5,43
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	116,19 ± 17,65	121,39 ± 17,88	118,68 ± 17,11	106,00 ± 15,04
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	41,88 ± 17,17	94,68 ± 34,02	169,06 ± 35,69	96,07 ± 24,47
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	26,09 ± 3,64	26,86 ± 5,07	24,49 ± 3,85	23,82 ± 4,70

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 57. Вредности статистике и процентуалних промена током примене примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. О	E15` vs. E30`	E30` vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	1,000 ↑0,27%	1,000 ↓2,56%	0,237 ↓8,38	0,499 ↓2,82%	0,176 ↓5,97%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,237 ↑4,48%	0,398 ↑2,15%	0,091 ↓8,77%	0,237 ↓2,23%	0,018 ↓10,68%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↑126,06%	0,018 ↑303,66%	0,018 ↑129,38%	0,043 ↑78,56%	0,063 ↓43,18%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,398 ↑2,97%	0,237 ↓6,11%	0,345 ↓8,70%	0,018 ↓8,81%	0,499 ↓2,76%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

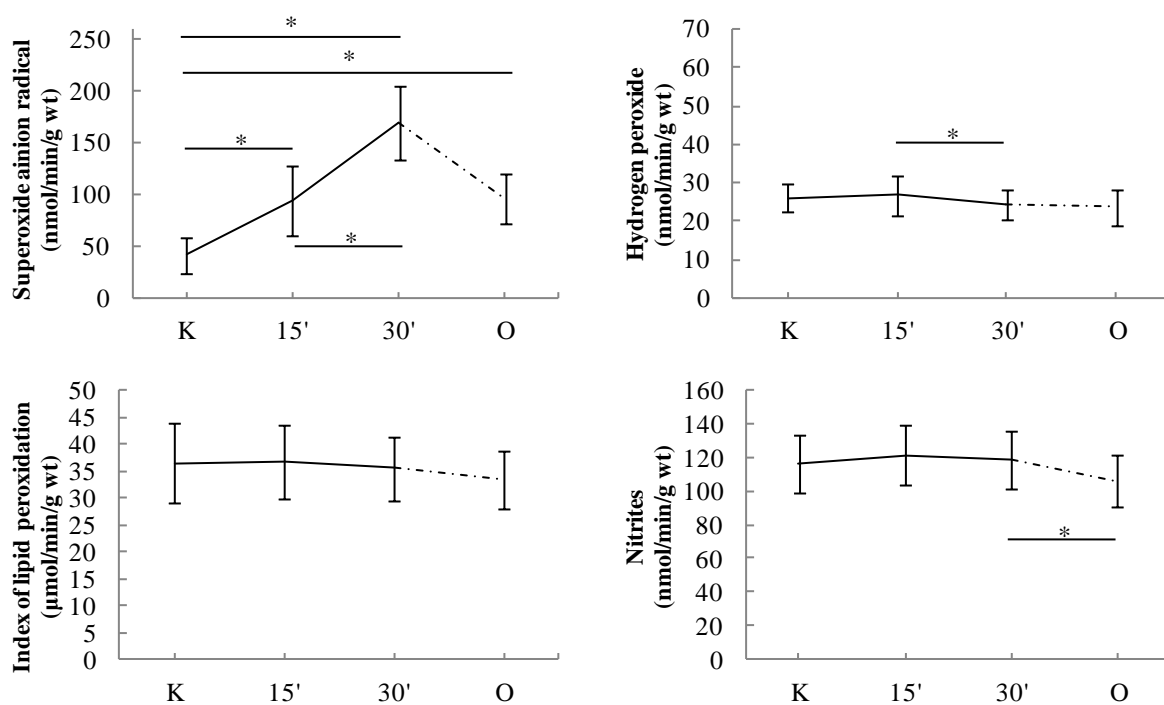


График 36. Параметри оксидационог стреса након примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10⁻⁷М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.3.4. Поређење ефеката разчититих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса приказани су у **Табели 58** као и на **Графику 37**.

Табела 58. Поређење ефеката разчититих доза 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса

Параметар		10^{-5} vs. 10^{-6}	10^{-5} vs. 10^{-7}	10^{-6} vs. 10^{-7}
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,867	0,620	0,613
	15'	0,779	1,000	0,867
	30'	0,694	0,902	0,536
	O	0,955	0,318	0,336
NO_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,536	0,902	0,867
	15'	0,121	0,710	0,281
	30'	0,232	0,165	0,613
	O	0,232	0,165	1,000
O_2^- ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,232	0,710	0,094
	15'	0,867	0,017	0,009
	30'	0,536	0,001	0,000
	O	0,613	0,011	0,000
H_2O_2 ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,040	0,007	0,121
	15'	0,094	0,007	0,232
	30'	0,232	0,002	0,094
	O	0,094	0,001	0,040

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

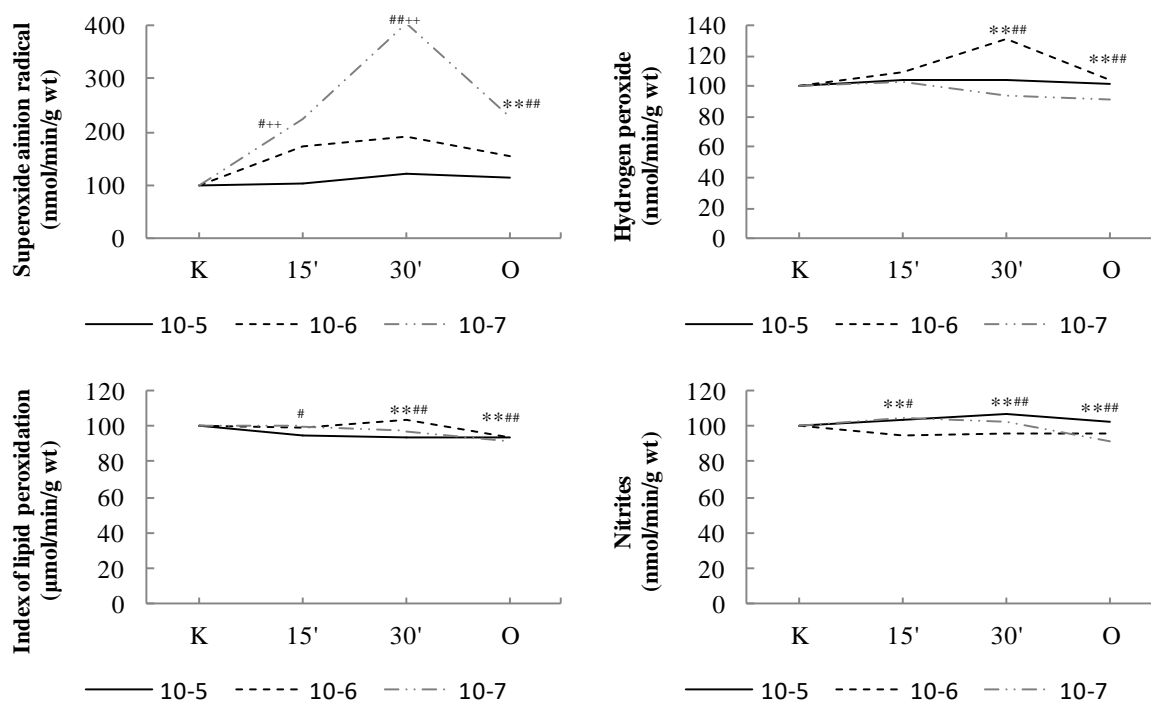


График 37. Поређење ефеката различитих доза примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-7}M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6}M$ и $10^{-7}M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

4.2.4.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5}M) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5}M на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 59 и 60, као на и Графику 38.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији: супероксид анјон радикала, водоник пероксида, нитрита и индекса липидне пероксидације.

Табела 59. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5}M

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	30,90 ± 8,64	25,17 ± 6,49	15,08 ± 5,75	12,04 ± 5,34
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	99,74 ± 10,02	75,05 ± 10,78	44,63 ± 11,63	36,48 ± 9,15
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	32,79 ± 13,15	24,16 ± 7,58	29,44 ± 13,40	14,86 ± 5,82
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	24,47 ± 4,78	18,22 ± 4,21	10,07 ± 2,74	8,22 ± 3,11

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 60. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М

Параметар	К vs. E15`	К vs. E30`	К vs. O	E15` vs. E30`	E30` vs. O
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↓18,55%	0,028 ↓51,19%	0,028 ↓61,05%	0,028 ↓40,08%	0,028 ↓20,19%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↓24,76%	0,028 ↓55,26%	0,028 ↓63,42%	0,028 ↓40,53%	0,028 ↓18,26%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,345 ↓26,31%	0,753 ↓10,23%	0,075 ↓54,68%	0,463 ↑21,82%	0,046 ↓49,51%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,116 ↓25,53%	0,028 ↓58,86%	0,028 ↓66,40%	0,028 ↓44,76%	0,028 ↓18,33%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

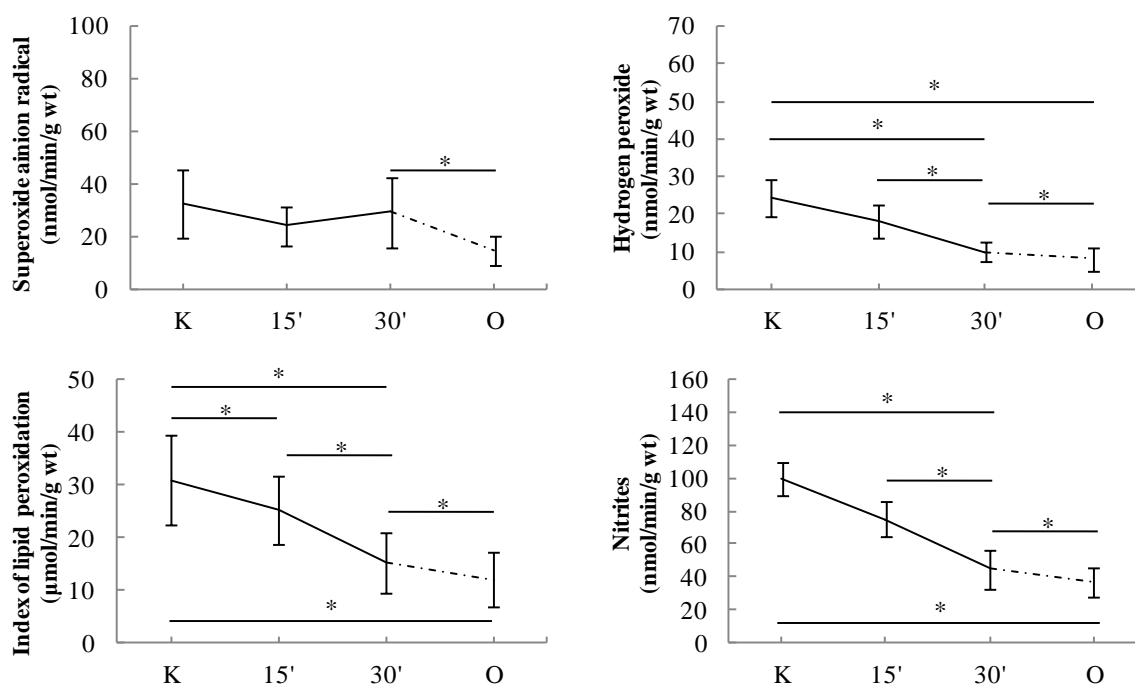


График 38. Параметри оксидационог стреса након примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (К- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6}M) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 61 и 62, као на и Графику 39.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала, водоник пероксида и индекса липидне пероксидације.

Табела 61. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	35,75 ± 5,74	33,16 ± 5,91	32,08 ± 4,98	30,17 ± 5,25
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	98,69 ± 13,51	97,32 ± 11,69	90,77 ± 18,64	87,78 ± 14,95
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	98,69 ± 37,45	37,73 ± 13,16	41,95 ± 18,87	49,78 ± 22,13
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	24,56 ± 6,02	20,52 ± 2,93	21,52 ± 4,01	18,88 ± 3,60

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 62. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6}M

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,046 ↓7,25%	0,028 ↓10,27%	0,116 ↓15,62%	0,028 ↓3,26%	0,046 ↓5,96%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,600 ↓1,38%	0,249 ↓8,02%	0,116 ↓11,05%	0,249 ↓6,73%	0,345 ↓3,30%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↓61,76%	0,028 ↓57,49%	0,028 ↓49,56%	0,753 ↑11,17%	0,753 ↑18,66%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,028 ↓16,45%	0,028 ↓12,37%	0,075 ↓23,11%	0,345 ↑4,88%	0,173 ↓12,26%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

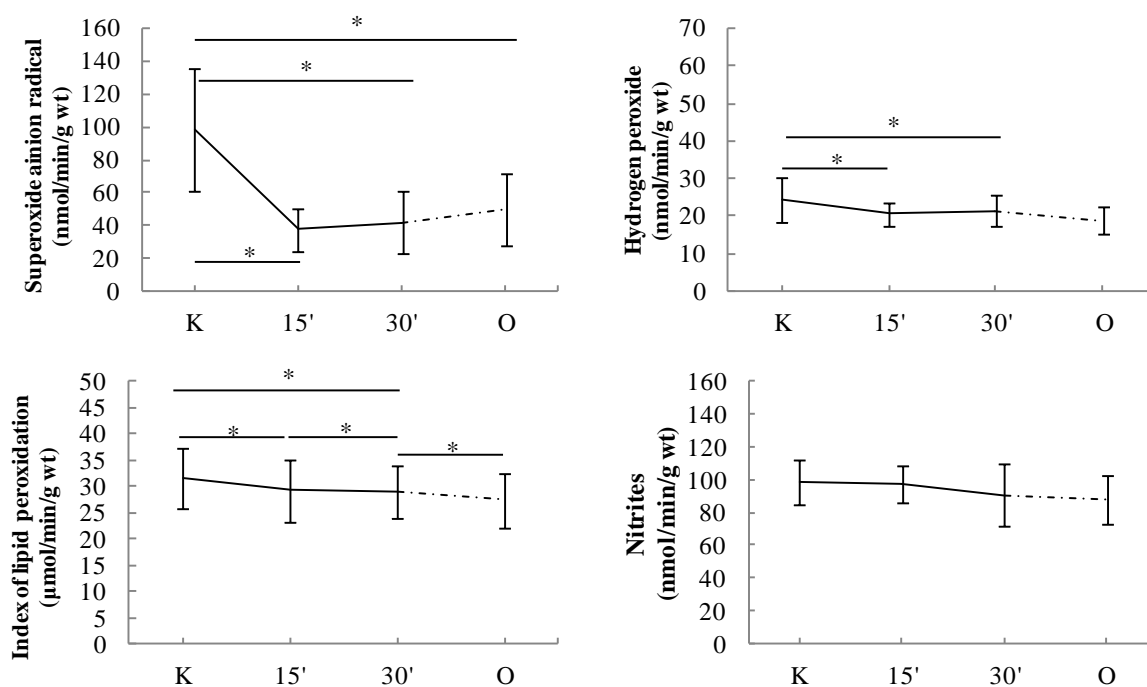


График 39. Параметри оксидационог стреса након примене 12,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 63 и 64, као на и Графику 40.

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида у поменутој концентрацији је довела до статистички значајне промене у продукцији супероксид анјон радикала.

Табела 63. Вредности параметара оксидационог стреса током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	Контрола (X±SD)	Ефекат 15' (X±SD)	Ефекат 30' (X±SD)	Оправак (X±SD)
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	34,41 ± 4,67	37,19 ± 6,47	36,03 ± 5,13	34,00 ± 5,68
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	103,67 ± 15,33	107,24 ± 21,61	103,08 ± 18,29	100,10 ± 15,08
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	58,04 ± 23,36	64,76 ± 26,37	117,99 ± 28,58	54,34 ± 24,05
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	24,07 ± 6,08	24,66 ± 8,65	26,70 ± 6,32	24,41 ± 5,21

Вредности у табели су приказане као средња вредност измереног параметра ± стандардна девијација

Табела 64. Вредности статистике и процентуалних промена током примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлорида-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

Параметар	К vs. E15'	К vs. E30'	К vs. О	E15' vs. E30'	E30' vs. О
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,075 ↑8,07%	0,173 ↑4,69%	0,917 ↓1,20%	0,600 ↓3,12%	0,173 ↓5,62%
NO₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,345 ↑3,44%	0,753 ↓0,57%	0,600 ↓3,44%	0,345 ↓3,88%	0,173 ↓2,89%
O₂⁻ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,600 ↑11,59%	0,028 ↑ 103,31	0,600 ↓6,37%	0,028 ↑ 82,20%	0,046 ↓ 53,95%
H₂O₂ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)	0,600 ↑2,46%	0,345 ↑10,93%	0,917 ↑1,40%	0,600 ↑8,27%	0,753 ↓8,59%

У табели су приказане вредности статистике за Wilcoxon тест упарених узорака, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним. Процентуалне промене су израчунате на основу разлика средњих вредности у посматраним тренуцима перфузије.

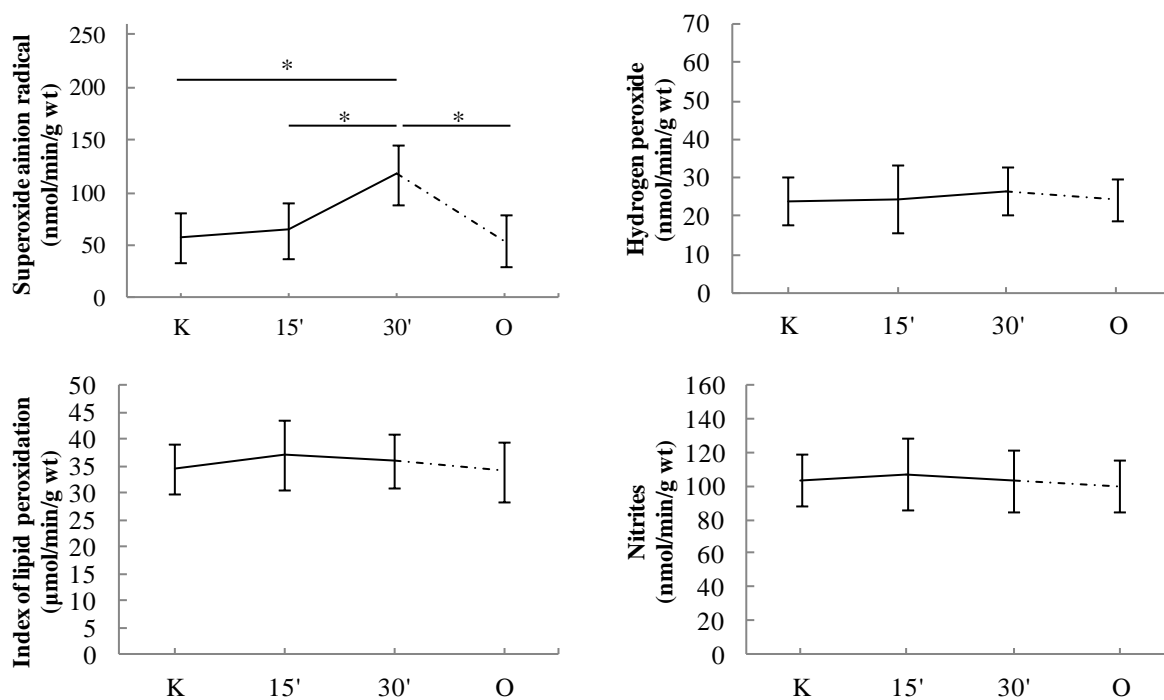


График 40. Параметри оксидационог стреса након примене 12,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М

* $p < 0,05$ су приказане статистички значајне промене између два тренутка од интереса током експеримента (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.4.4. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефекат примењених доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса приказани су у Табели 65 као и на Графику 41.

Табела 65. Поређење ефеката разчићитих доза 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса

Параметар		10 ⁻⁵ vs. 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ vs. 10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ vs. 10 ⁻⁷
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)	K	0,310	0,589	0,699
	15'	0,065	0,015	0,394
	30'	0,002	0,002	0,240
	O	0,002	0,002	0,180
NO ₂ ⁻ (nmol/min/g wt)	K	0,818	0,699	0,589
	15'	0,009	0,015	0,589
	30'	0,002	0,002	0,240
	O	0,002	0,002	0,065
O ₂ ⁻ (nmol/min/g wt)	K	0,009	0,180	0,041
	15'	0,093	0,002	0,065
	30'	0,240	0,002	0,002
	O	0,002	0,002	1,000
H ₂ O ₂ (nmol/min/g wt)	K	0,937	0,699	0,937
	15'	0,485	0,180	0,485
	30'	0,002	0,002	0,065
	O	0,002	0,002	0,132

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

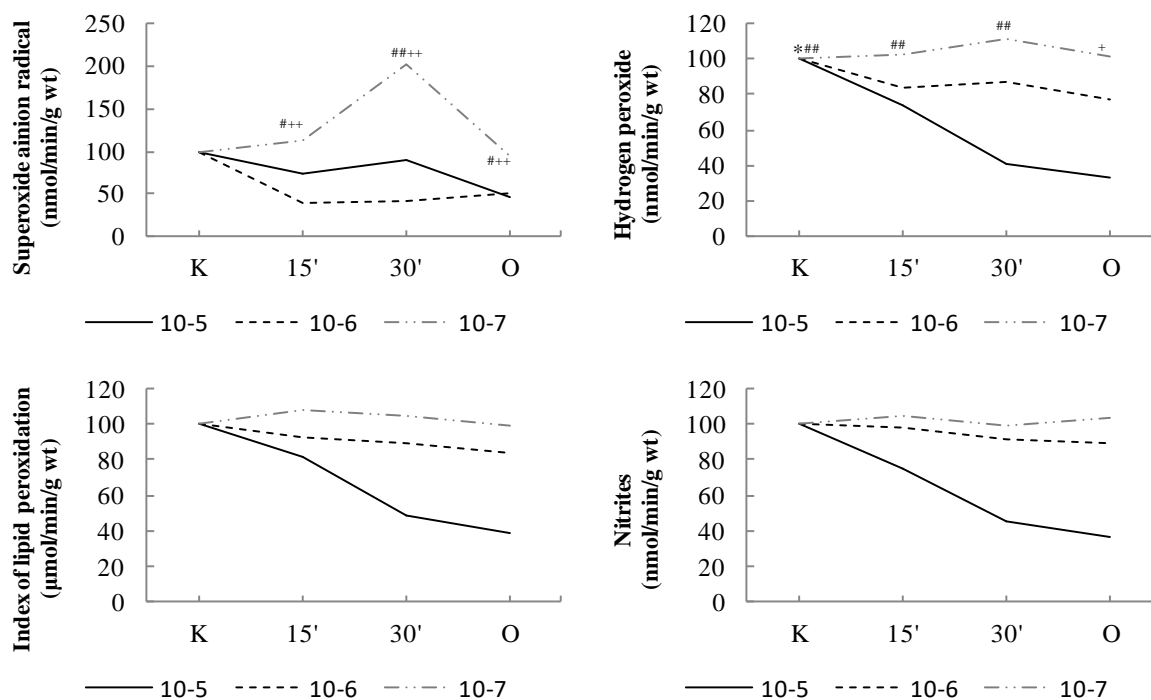


График 41. Поређење ефеката различитих доза примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на параметре оксидационог стреса

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-6}M$, # $p < 0,05$ и ### $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-5}M$ и $10^{-7}M$, + $p < 0,05$ и ++ $p < 0,01$ су приказане статистички значајне односно статистички високо значајне промене између два тренутка од интереса добијене поређењем група третираних дозама $10^{-6}M$ и $10^{-7}M$, (K- контролни услови, 15' - ефекат примењеног комплекса након 15 минута перфузије, 30' - ефекат примењеног комплекса након 30 минута перфузије, O – опоравак).

4.2.5.1. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 66 и 67 као и на Графицима 42 и 43.

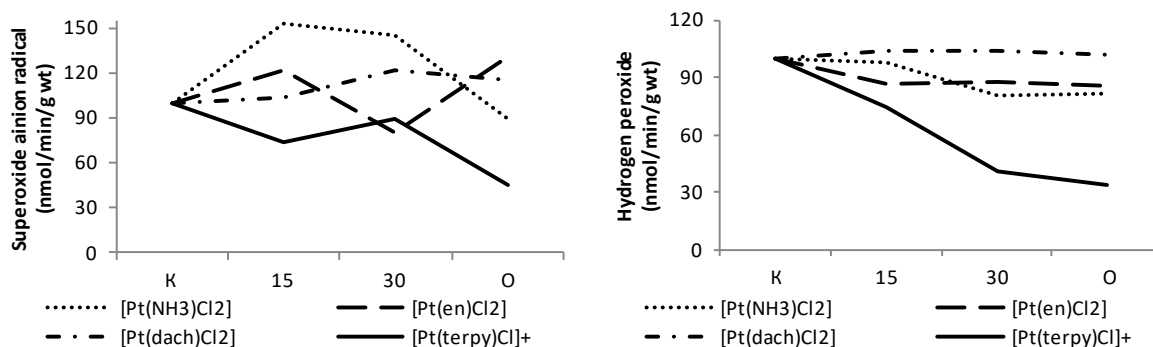


График 42. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 66. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Супероксид анјон радикал (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,535	0,805	0,007	0,805
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,017	0,001	0,001	0,620
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,628	0,073	0,836	0,181
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,209	0,001	0,007	0,259
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,366	0,073	0,014	0,005
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,022	0,001	0,001	0,001
Водоник пероксид (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,053	0,004	0,017	0,038
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,097	0,383	0,902	1,000
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,001	0,001	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,209	0,209	0,017	0,038
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,005	0,001	0,001	0,001
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,001	0,005	0,001	0,001

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

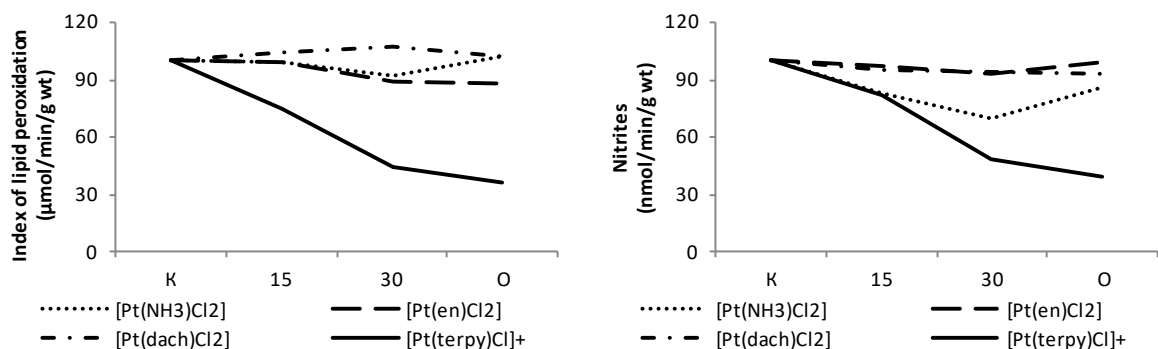


График 43. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 67. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-5} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Индекс липидне пероксидације ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,001	0,001	0,001	0,001
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,805	0,383	0,073	0,535
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,051	0,181	0,295	0,101
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,001	0,001	0,001	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,234	0,008	0,001	0,001
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,014	0,445	0,234
Нитрити (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,805	0,620	0,038	0,073
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,097	0,038	0,026	0,318
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,001	0,001	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,165	0,004	0,002	0,011
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,051	0,001	0,001	0,001
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,836	0,051	0,001	0,001

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.2.5.2. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 68 и 69 као и на Графицима 44 и 45.

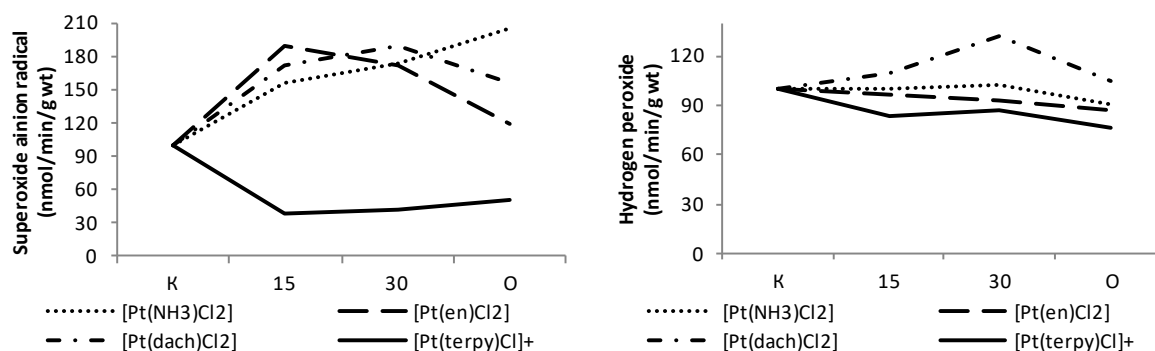


График 44. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 68. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Супероксид анјон радикал (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,014	0,029	0,021	0,189
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,002	0,234	0,005	0,001
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,101	0,005	0,005	0,366
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,001	0,001	0,001	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,001	0,662	0,950	0,573
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	1,000	0,002	0,002	0,002
Водоник пероксид (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,463	0,955	0,955	0,613
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,005	0,014	0,001	0,002
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,002	0,005	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,003	0,020	0,029	0,020
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,108	0,001	0,020	0,008
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,002

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

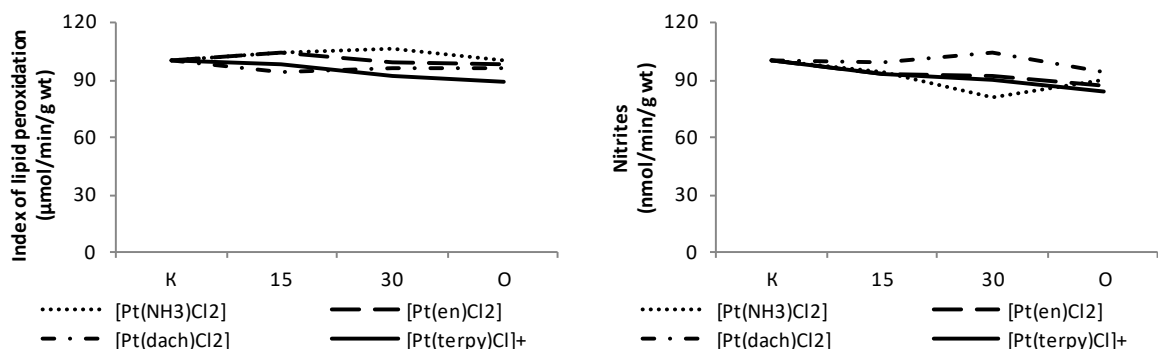


График 45. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Вредности су приказане у виду прцентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 69. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-6} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Индекс липидне пероксидације ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,014	0,014	0,002	0,054
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,073	0,073	0,051	0,138
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,181	0,181	0,073	0,295
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,005	0,001	0,008	0,005
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,414	0,181	0,142	0,181
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,026	0,026	0,026	0,026
Нитрити (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,463	0,281	0,536	0,536
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,836	0,534	0,836	0,945
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,014	0,022	0,008
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,573	0,573	0,282	0,345
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,228	0,282	0,345	0,228
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,041	0,015	0,009	0,026

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.2.5.3. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова

Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на параметре оксидационог стреса приказани су у Табелама 70 и 71 као и на Графицима 46 и 47.

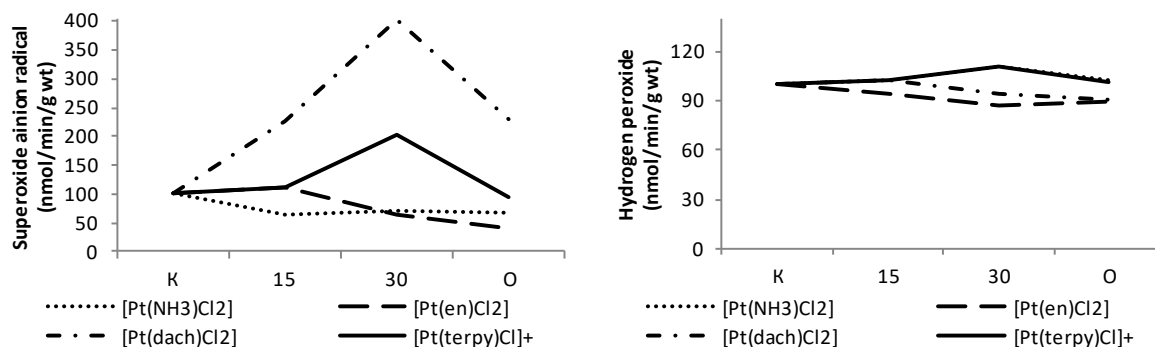


График 46. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 70. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на продукцију супероксид анјон радикала и водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту

Супероксид анјон радикал (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,038	0,805	0,001	0,001
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,073	0,731	0,008	0,001
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,366	0,731	0,002	0,181
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,001	0,628	0,014	0,945
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,181	0,138	0,101	0,008
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,180	0,180	0,015
Водоник пероксид (nmol/min/g wt)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,017	0,128	0,097	0,073
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,001	0,001	0,001	0,001
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,035	0,234	0,628	0,073
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,001	0,001	0,001	0,001
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,234	0,534	0,445	0,945
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,002	0,002	0,002	0,002

У табели су приказане вредности статистике за Mann-Whitney тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

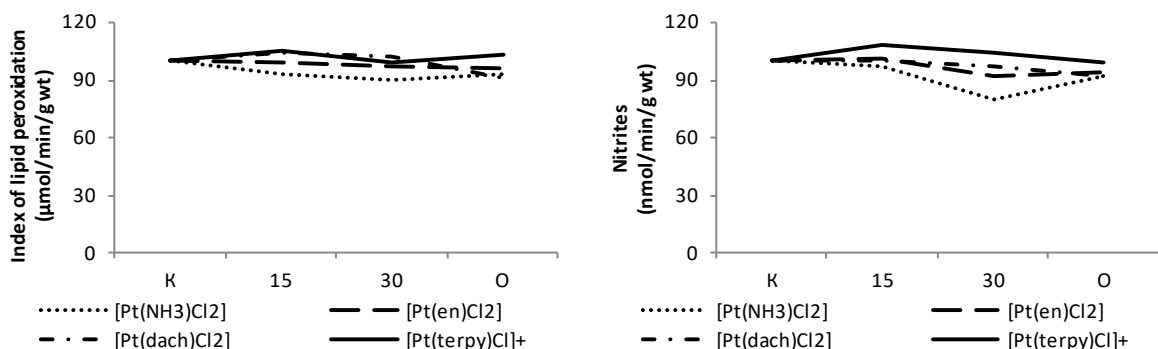


График 47. Ефекти примене комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Вредности су приказане у виду процентуалних промена, где су вредности у контролним условима означене као 100%, а остале вредности представљају процентуалну промену у зависности од контролне вредности

Табела 71. Поређење ефеката комплекса платине(II) у дози од 10^{-7} М на продукцију нитрита у коронарном венском ефлуенту и индекс липидне пероксидације

Индекс липидне пероксидације ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,073	0,038	0,004	0,038
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,014	0,051	0,002	0,014
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,138	0,022	0,001	0,035
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,005	0,008	0,001	0,002
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,628	0,731	0,836	0,836
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,009	0,009	0,002	0,002
Нитрити ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$)				
	К	15	30	О
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(dach)Cl ₂]	0,902	0,456	0,710	0,383
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,295	0,945	0,945	0,945
[Pt(en)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,181	0,628	0,234	0,234
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(NH ₃)Cl ₂]	0,181	0,945	0,945	0,234
[Pt(dach)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,295	0,181	0,138	0,445
[Pt(NH ₃)Cl ₂] vs. [Pt(terpy)Cl] ⁺	0,093	0,240	0,180	0,132

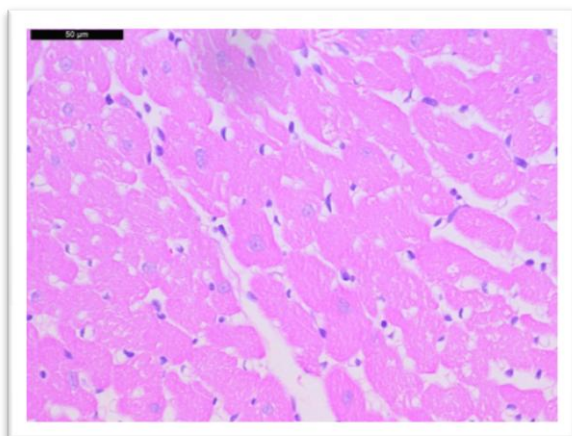
У табели су приказане вредности статистике за Манн-Витнеу тест за поређење између група, вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док се вредности $p < 0,01$ се сматрају статистички високо значајним.

4.3. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ КОМПЛЕКСА Pt(II) НА ОЧУВАНOST ГРАЂЕ МИОКАРДА ПАВЦОВА

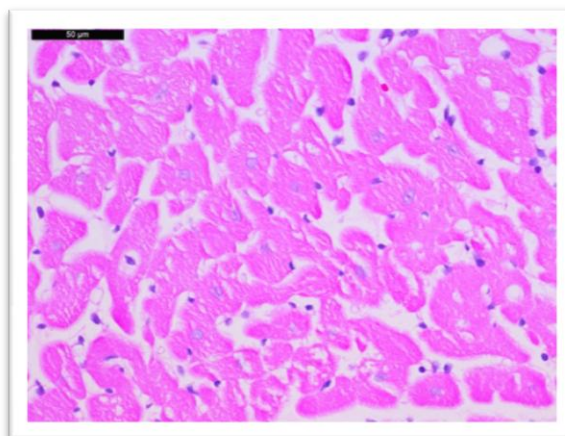
4.3.1. Ефекти акутне апликације цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова

4.3.1.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-5} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 1-7**.



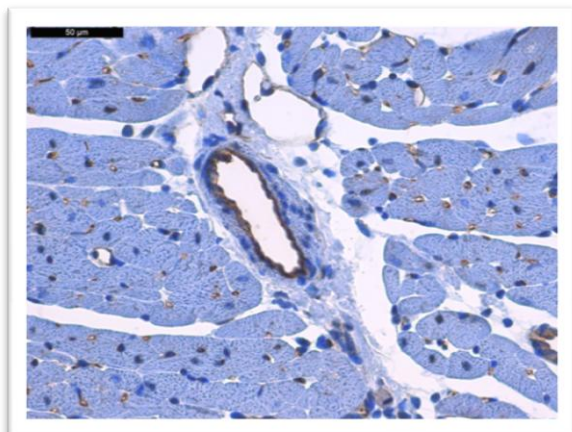
Слика 1.



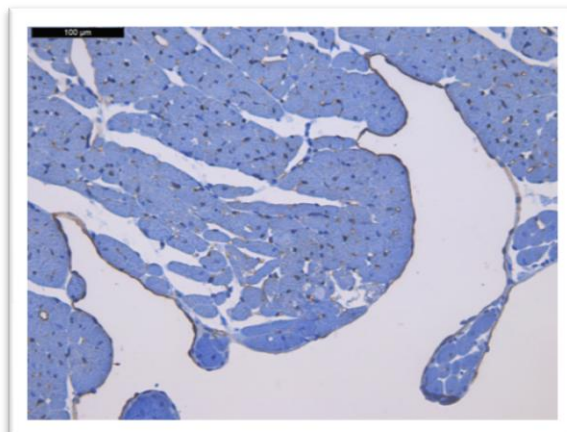
Слика 2.

Легенда. **Слика 1 и 2** H/E (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 1** се уочава очувана грађа миокарда, ћелије су правилног облика са нормалном распоређеним једрима. На **Слици 2** се уочава појава интерстицијалног едема и вакуолизације.



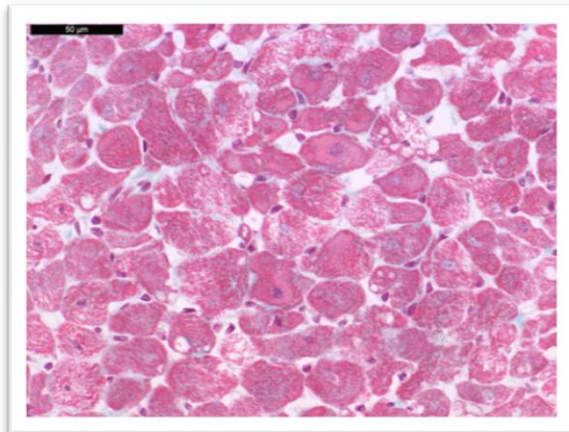
Слика 3.



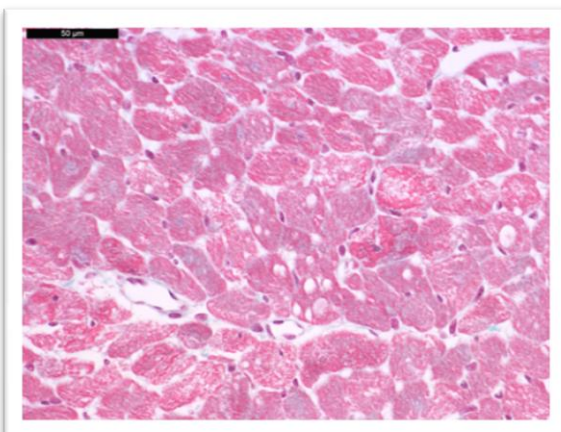
Слика 4.

Легенда. **Слика 3** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 4** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 200 x увећање (бар = 100 микрометара)

На **Слици 3** се уочава очуваност крвних судова и капиларне мреже. Док се на **Слици 4** уочава очуваност ендотела.



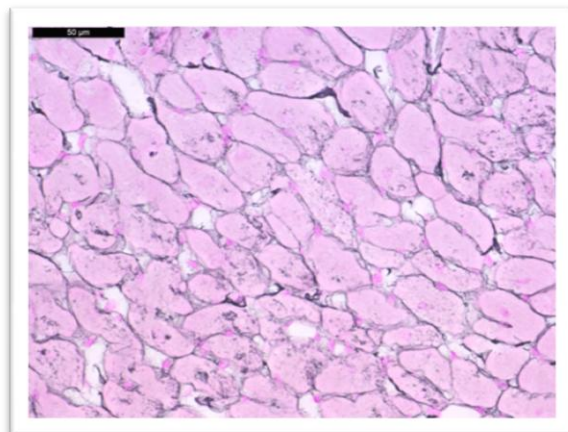
Слика 5.



Слика 6.

Легенда. **Слика 5 и 6** *MT* (масон-трихром) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 5** се уочава вакуолизација, кондензација цитоплазме у појединим ћелијама. На **Слици 6** се уз вакуолизацију уочава и феномен „*contraction band necrosis*“ као и фокална исхемија.



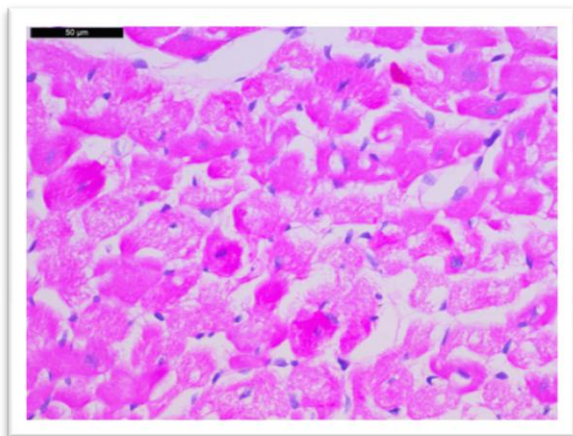
Слика 7.

Легенда **Слика 7.** *R* (ретикulinско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50
микрометара)

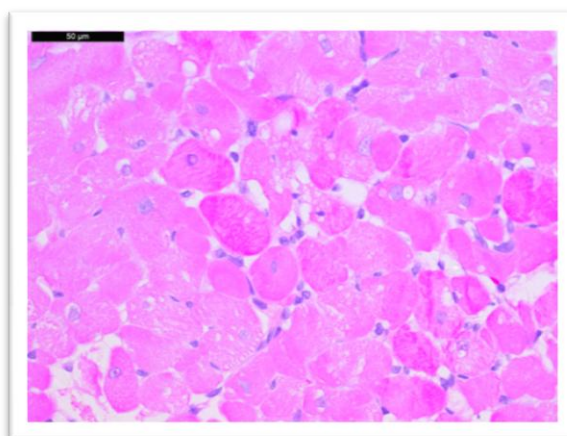
На **Слици 7** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

4.3.1.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-6} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 8-11.**



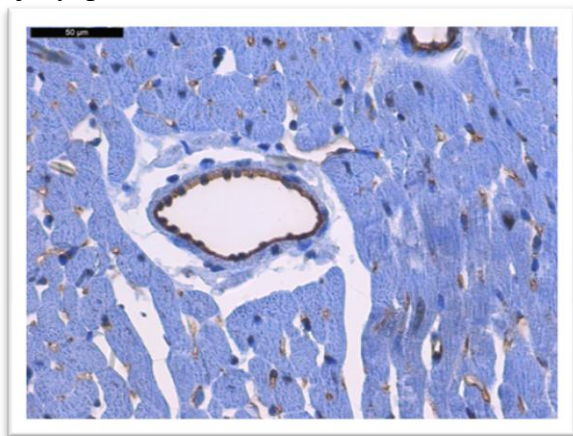
Слика 8.



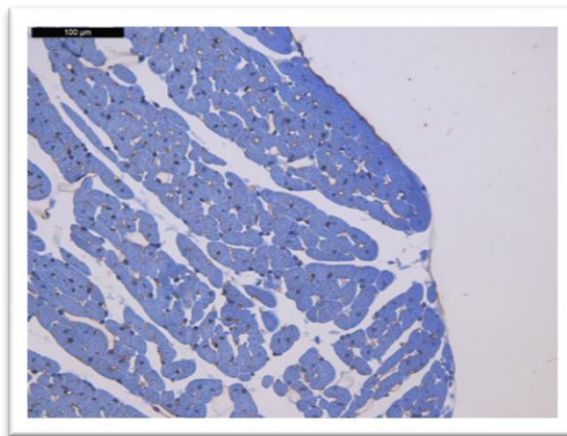
Слика 9.

Легенда. **Слика 8 и 9** H/E (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 8** се уочава кариопикноза једара и вакуолизација ћелија. Док се на **Слици 9** уочава више различитих феномена уз вакуолизацију ћелија и то појава дисоцираних контракција, хиперконтрактилност саркомера у појединим деловима уз појаву феномена „*contraction band necrosis*“.



Слика 10.



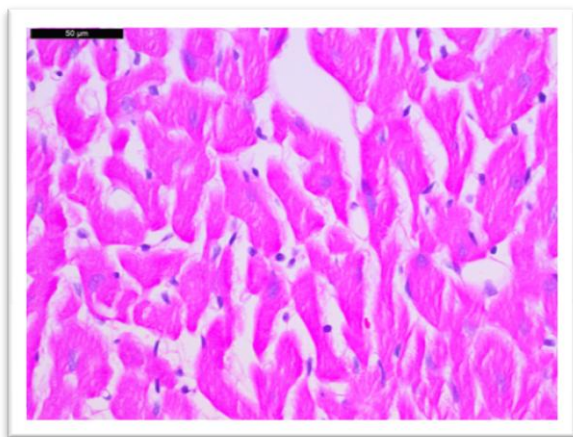
Слика 11.

Легенда. **Слика 10** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија (400 x увећање (бар = 50 микрометара)) и **Слика 11** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија (200 x увећање (бар = 100 микрометара))

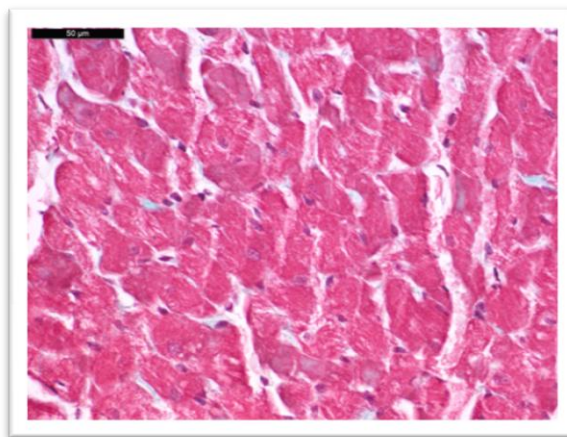
На **Слици 10** се уочава очуваност крвних судова и капиларних мрежа, док се на **Слици 11** уочава фокална очуваност ендотела.

4.3.1.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене цис-диамино-дихлоридо-платине(II) – цисплатине у концентрацији од 10^{-7} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 12-17**.



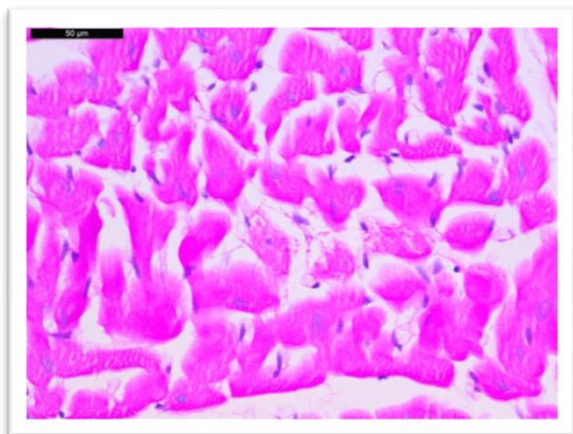
Слика 12.



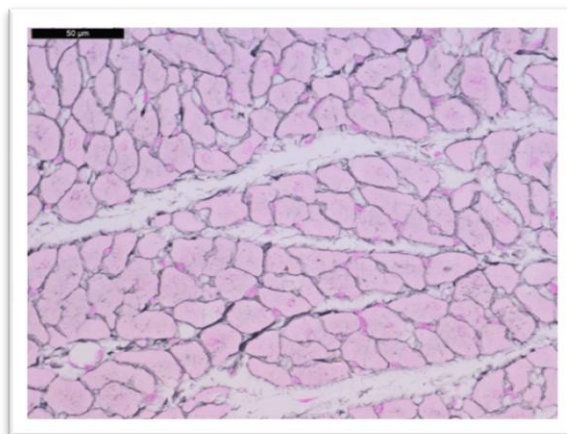
Слика 13.

Легенда. **Слика 12** *H/E* (хематоксилин/еозин); 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 13** *MT* (масон-трихром) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 12** се уочава појава интерстицијалног едема, док се на **Слици 13** уочава нормално очувано ткиво.



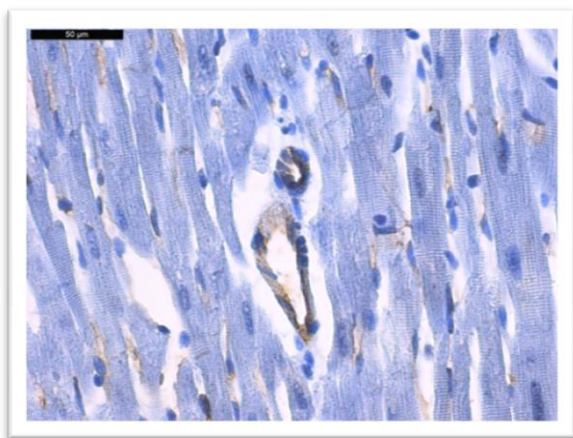
Слика 14.



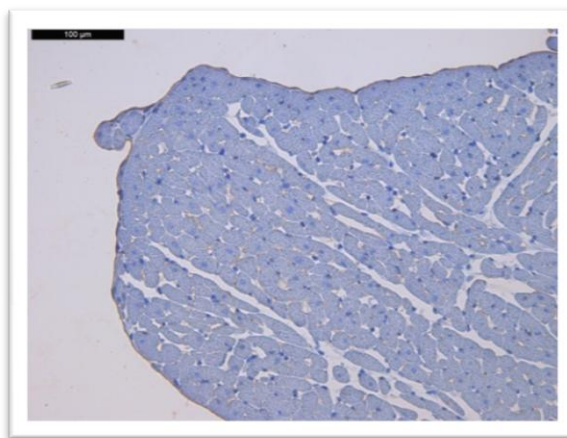
Слика 15.

Легенда. **Слика 14** *H/E* (хематоксилин/еозин); 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 15** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 14** се уочава фокална вакуолизација ћелија. На **Слици 15** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.



Слика 16.



Слика 17.

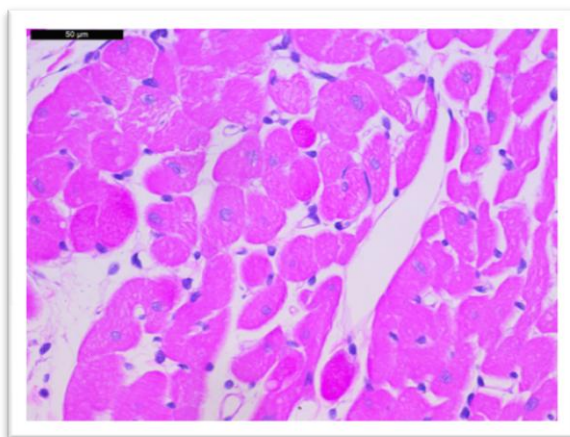
Легенда. **Слика 16** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија (400 x увећање (бар = 50 микрометара)) и **Слика 17** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија (200 x увећање (бар = 100 микрометара))

На **Слици 16** се уочава очуваност крвни судова и капилираних мрежа, док се на **Слици 17** уочава интактност ендотела.

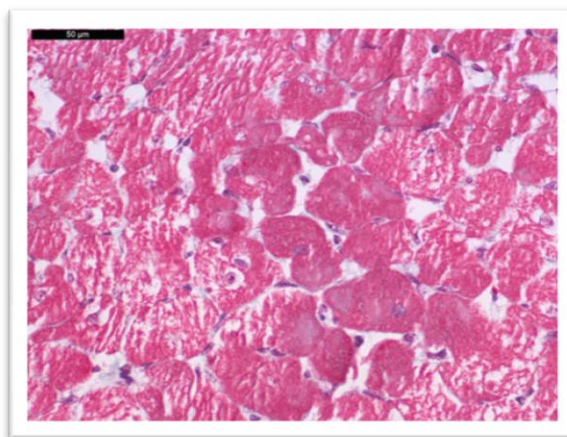
4.3.2. Ефекти акутне апликације етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

4.3.2.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 18-25**.



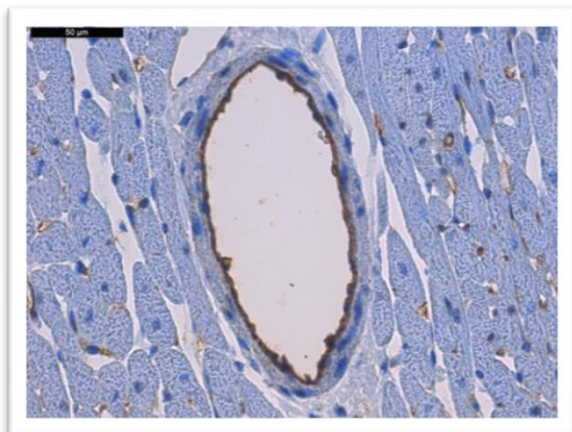
Слика 18.



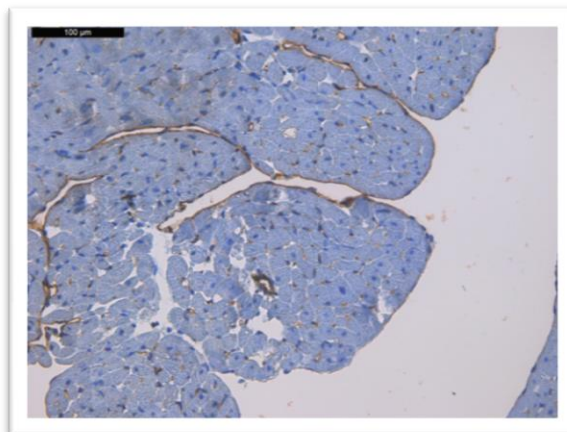
Слика 19.

Легенда. **Слика 18** *H/E* (хематоксилин/еозин); 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 19** *MT* (масон-трихром) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 18** се уочава очуван облик ћелија са јасно дефинисаним границама ћелија, једра су комплетно очувана и правилно позиционирана, миофибриле очуване. Присутна је вакуолизација ћелијских органела, која је реверзибилног карактера јер су једра очувана. **Сликом 19** се још једном потврђује вакуолизација ћелијских органела уз раздвајање миофибрила са једне стране ћелије и груписање са друге стране ћелије, тј. појава дисоциране контракције. Међутим те појаве су хетерогене, постоје делови миокарда који су потпуно очувани, а постоје делови захваћени оваквим променама.



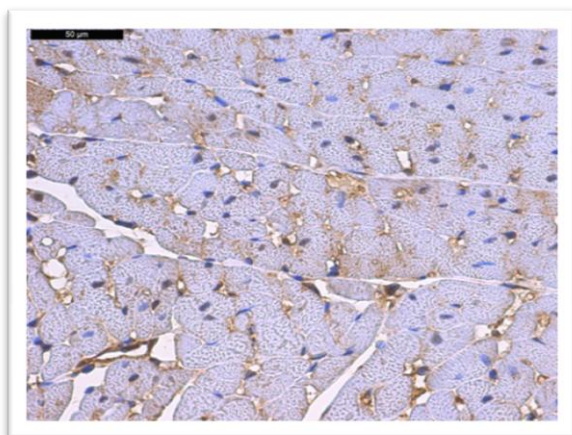
Слика 20.



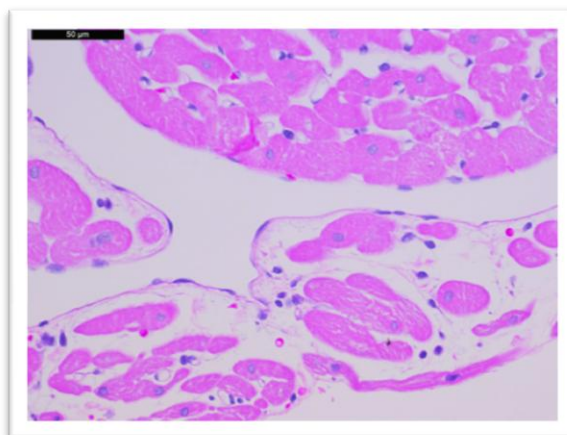
Слика 21.

Легенда. **Слика 20** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 21** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 200 x увећање (бар = 100 микрометара)

На **Слици 20** се уочава очуваност ендотела дуж целог зида артериола, капиларних мрежа и капиларних петљи, налаз је *cd31* позитиван, тј. ендотел је интактан. Са друге стране на **Слици 21** се фоклано уочава изостанак очуваности ендокардног ендотела, односно налаз *cd31* је делимично негативан у неким деловима ендотела, једра су очувана, али мембране нису.



Слика 22.

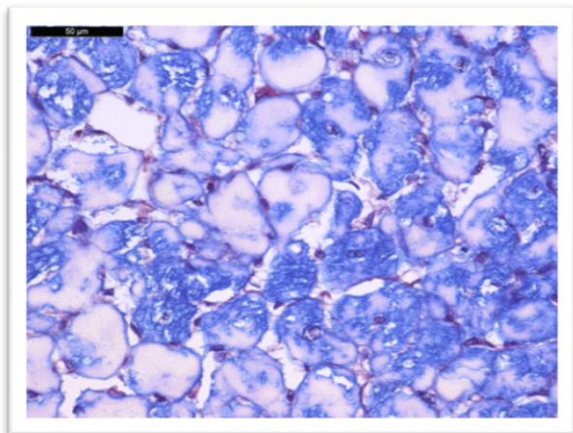


Слика 23.

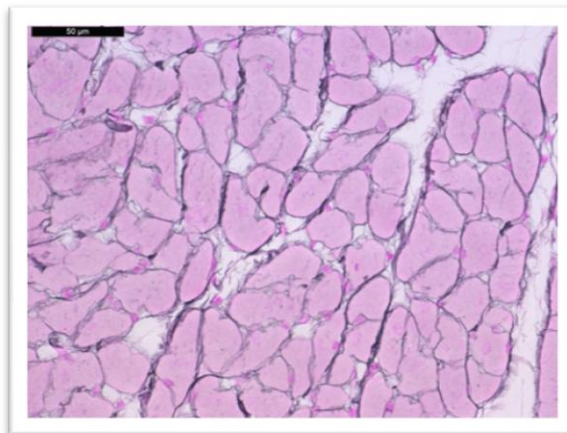
Легенда. **Слика 22** *bcl2* (једарни и цитоплазматски маркер) и **Слика 23** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 22** се такође уочавају очувани ендотел, капиларна мрежа и миофибрили. Док се на **Слици 23** уочава раздвојеност, тј. дилатација интерстицијалног

ткива и дискретан интерстицијални едем, као и екстравазација еритроцита. Присутан је одређен степен разлике у изгледу кардиомиоцита, јер се у појединим ћелијама уочава неправилан распоред миофибрила, тј. долази до њиховог груписања са знацима асинхроне контракције.



Слика 24.



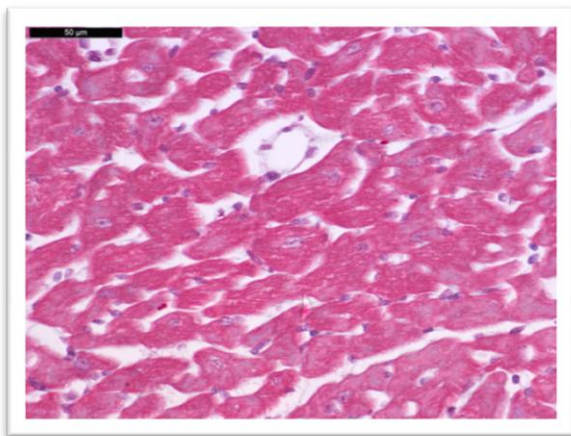
Слика 25.

Легенда. **Слика 24** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин) и **Слика 25** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

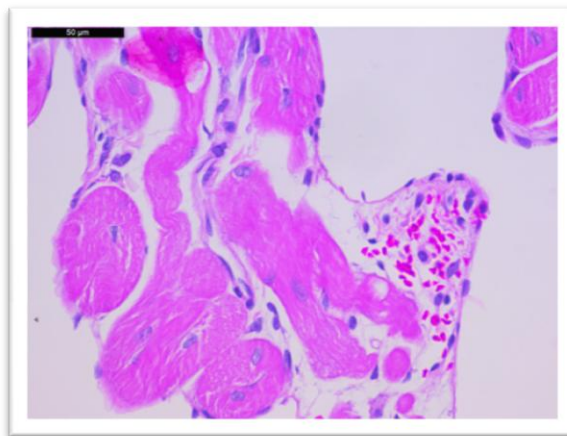
На **Слици 24** се на попречном пресеку миокарда виде поља са смањеним бројем митохондрија. На **Слици 25** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

4.3.2.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 26-33**.



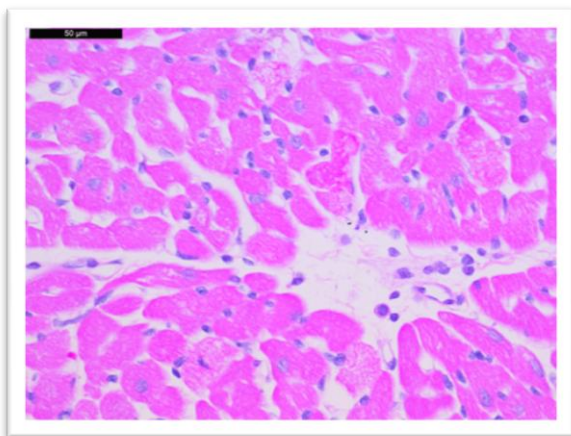
Слика 26.



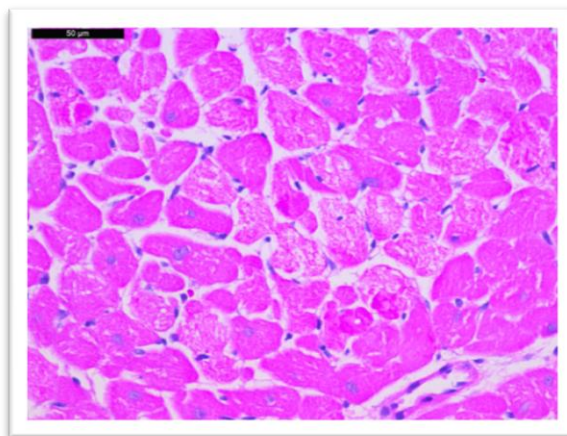
Слика 27.

Легенда. **Слика 26** *MT* (масон-трихром) и **Слика 27** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 26** се уочава очуван миокард, униформне грађе. Срчане мишићне ћелије су регуларне морфологије, са правилним распоредом миофибрила и централно постављеним еухроматским једром. На **Слици 27** се уочава екстравазација еритроцита субендотелно и субендокардно која је интензивнија него у претходној групи.



Слика 28.

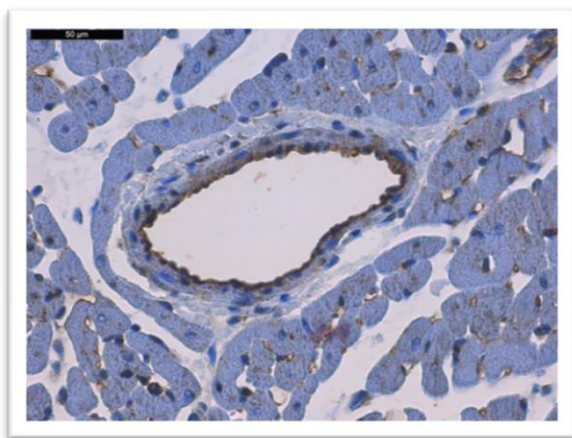


Слика 29.

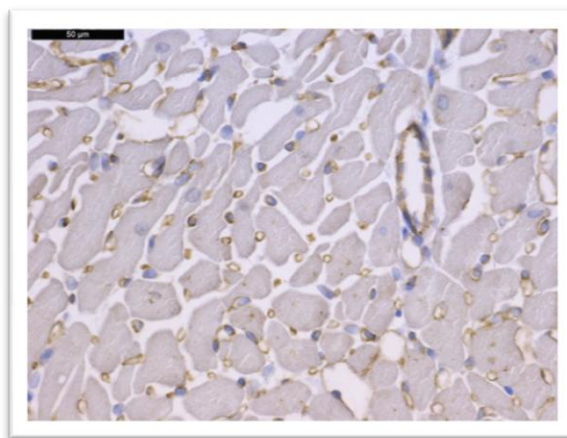
Легенда. **Слика 28 и 29** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Сликама 28 и 29** се уочавају раздвајања миофибрила са једне стране ћелије и груписање са друге стране ћелије, тј. дисоцирана контракција као и вакуолизација

ћелијских органела. Уз то на **Слици 28** су присутна поља интерстицијалног едема, док се на **Слици 29** фокално уочавају промене у структури и изгледу једра тј. кариопикноза.



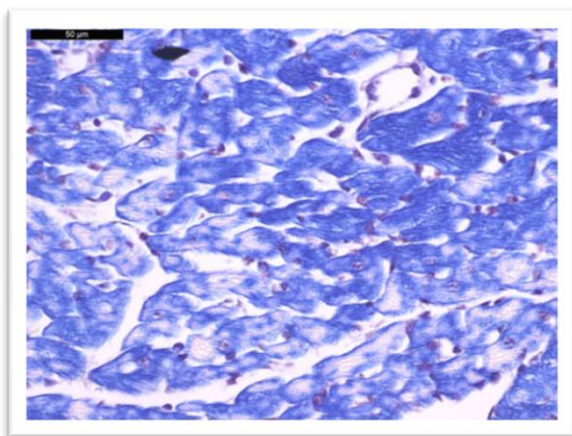
Слика 30.



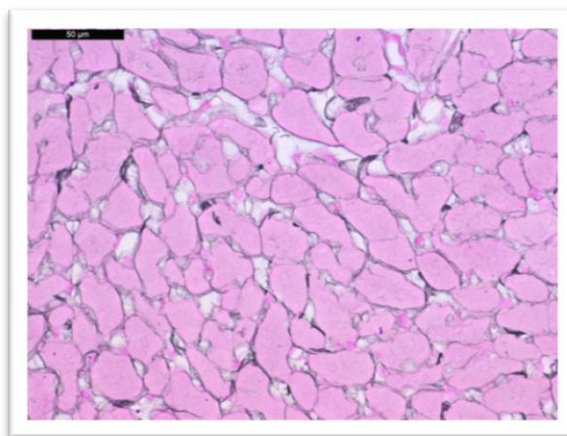
Слика 31.

Легенда. **Слика 30 и 31** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Сликама 30 и 31** се јасно уочава очуваност ендотела, како површног тако и на нивоу капиларних петљи. На **Слици 31** се уочава да уз сваки кардиомиоцит постоји бар по један капилар. Оба налаза су *cd31* позитивна, односно ендотел је интактан.



Слика 32.



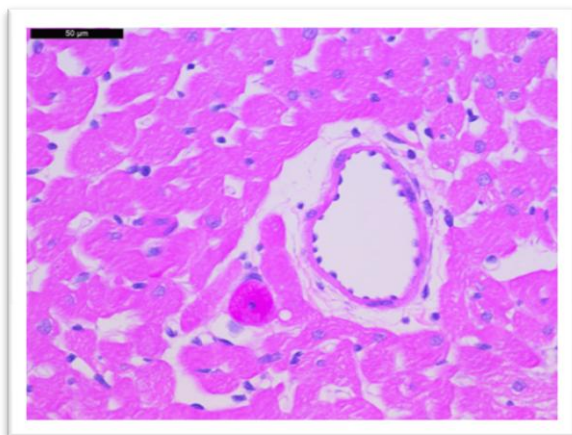
Слика 33.

Легенда. **Слика 32** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин) и **Слика 33** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

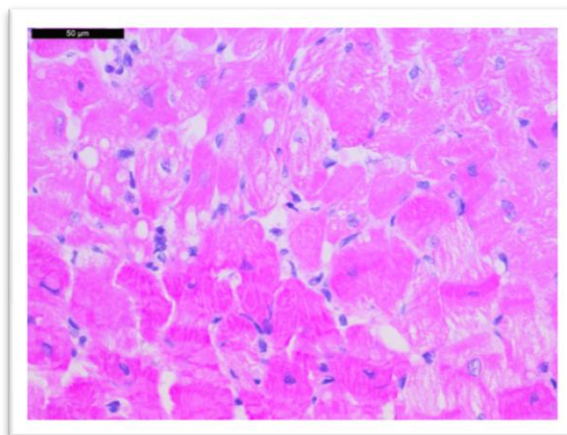
На **Слици 32** уочавамо половичну очуваност митохондрија, тј. у деловима пребојеним тамноплавом бојом постоји већи а у светлијим деловима мањи број митохондрија. На **Слици 33** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

4.3.2.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 34-39**.



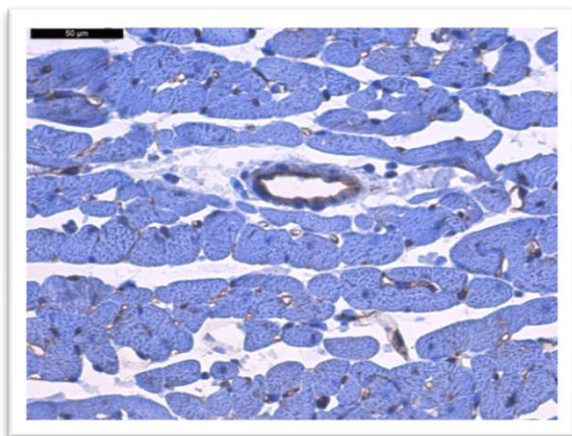
Слика 34.



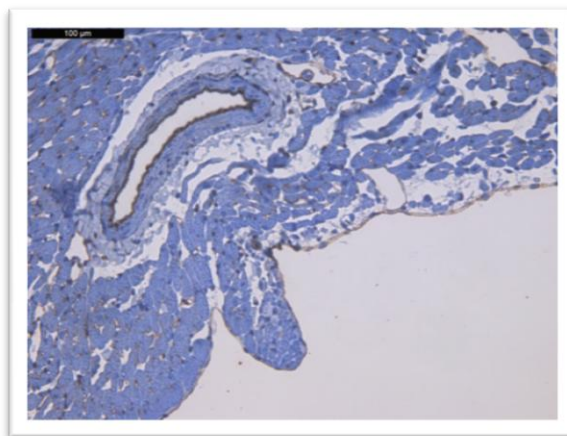
Слика 35.

Легенда. **Слика 34 и 35** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 34** се уочава нормалан изглед срчаног мишићног ткива, које је уобичајене грађе. Док на **Слици 35** уочавамо феномен „*contraction band necrosis*“ ,вакуолизацију ћелијских органела и кариопикнозу.



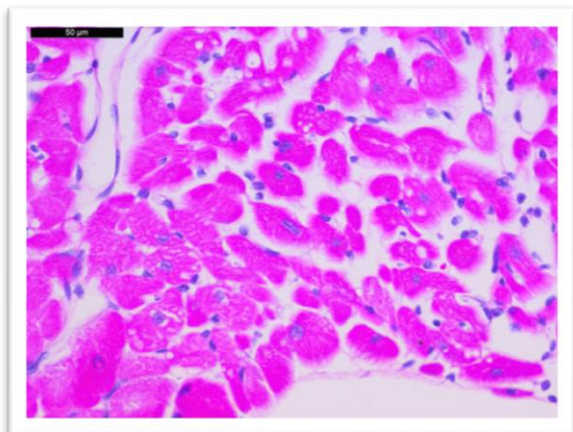
Слика 36.



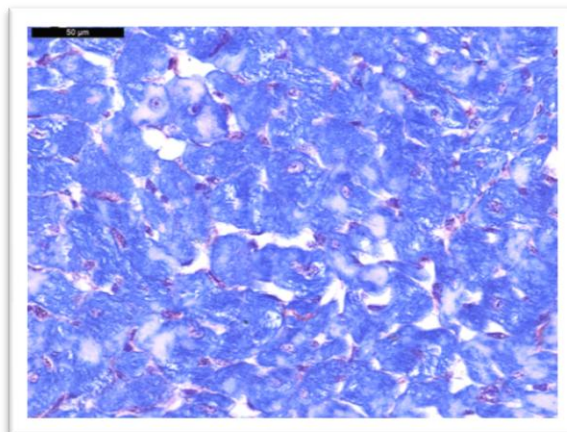
Слика 37.

Легенда. **Слика 36** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 37** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 200 х увећање (бар = 100 микрометара)

На **Сликама 36 и 37** се као и при примени виших доза уочава очуваност ендотела и капиларних мрежа.



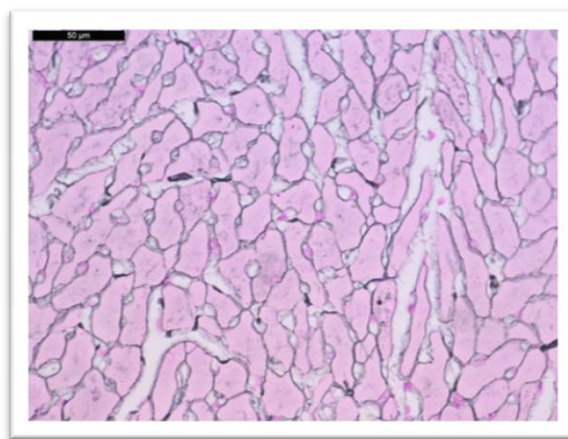
Слика 38.



Слика 39.

Легенда. **Слика 38** *H/E* (хематоксилин/еозин); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 39** *PTAN* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 38** се уочава масовна кариопикноза, већ уочена на слици 35 уз појаву апоптозе. Док се на **Слици 39** уочава очуваност митохондрија.



Слика 40.

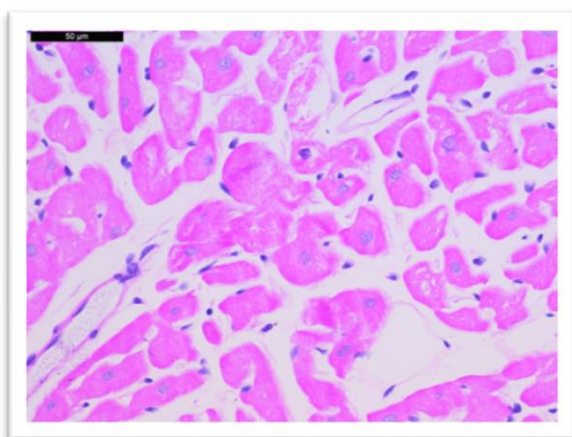
Легенда. **Слика 40** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 40** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

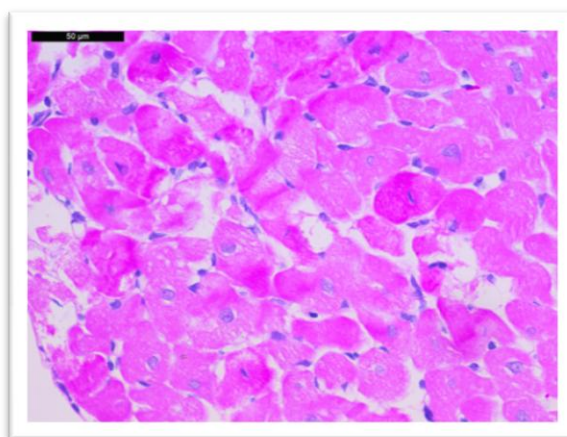
4.3.3. Ефекти акутне апликације 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

4.3.3.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-5} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 41-48**.



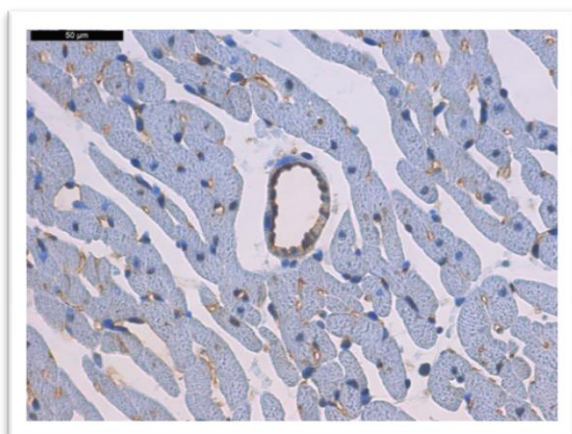
Слика 41.



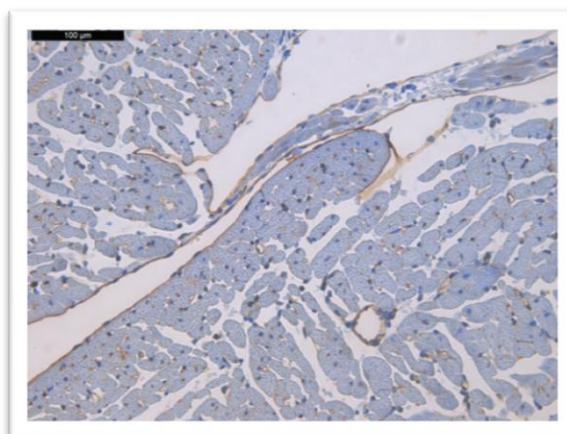
Слика 42.

Легенда. **Слика 41 и 42** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 41** се уочавају промене у структури мишићног ткива, границе ћелија су готове избрисане, присутна је некроза на нивоу појединих ћелија. Док се на **Слици 42** уочава феномен „*contraction bend necrosis*“.



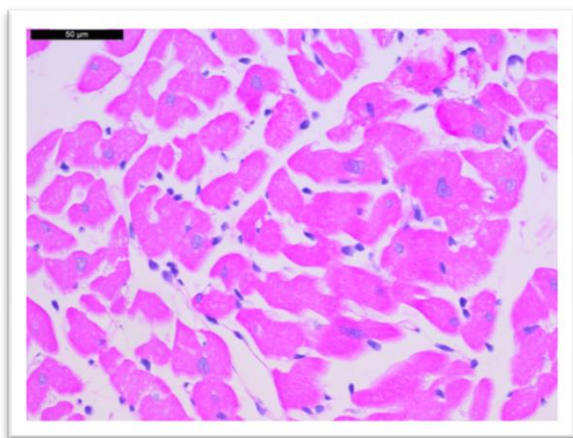
Слика 43.



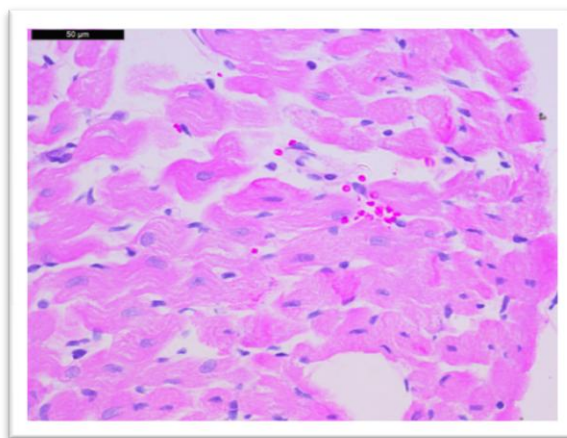
Слика 44.

Легенда. **Слика 43** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 44** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 200 х увећање (бар = 100 микрометара)

На **Слици 43** се уочавају очувани крвни судови, док је на **Слици 44** присутан фокално негативан *cd31* одговор, тј. делимично очуван ендотел уз очувану једра.



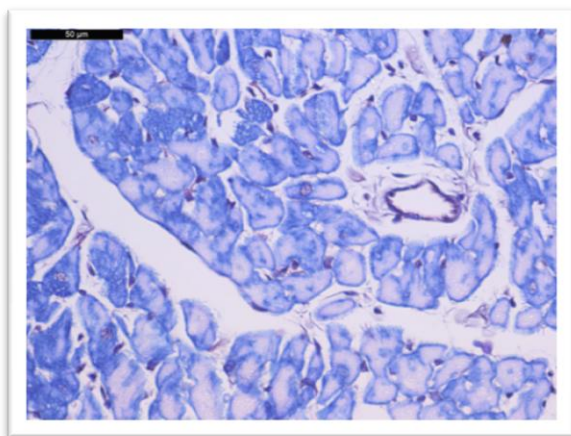
Слика 45.



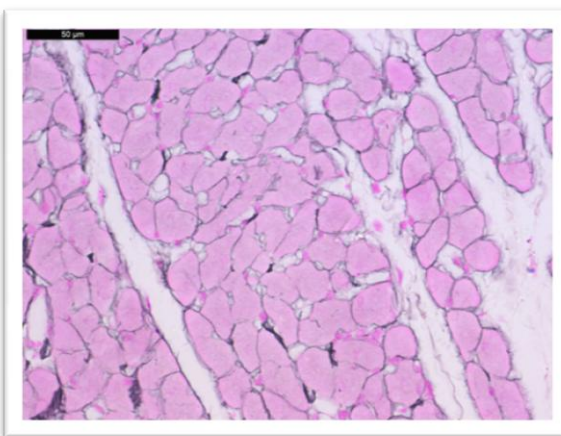
Слика 46.

Легенда. **Слика 45 и 46** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 45** се уочава интерстицијални едем уз вакуолизацију ћелијских органела. А на **Слици 46** се уочава екстравазација еритроцита и „*contraction band necrosis*“.



Слика 47.



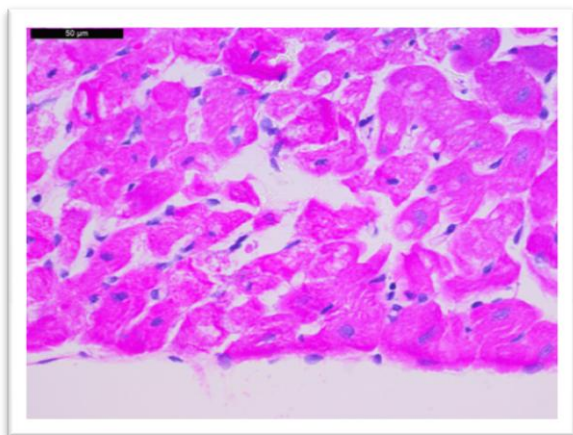
Слика 48.

Легенда. **Слика 47** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 48** *R* (ретикulinско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

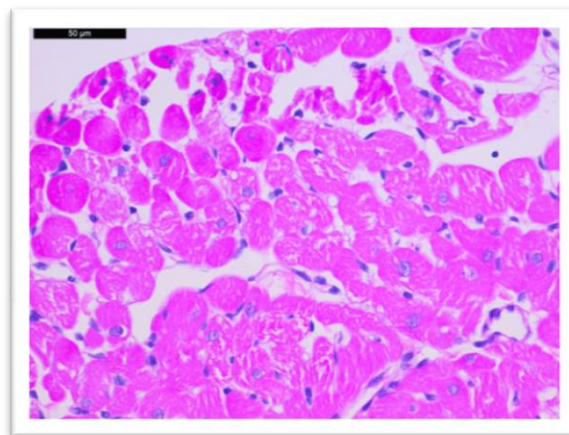
На **Слици 47** се уочава смањен број митохондрија. А на **Слици 48** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

4.3.3.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-6} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 49-55**.



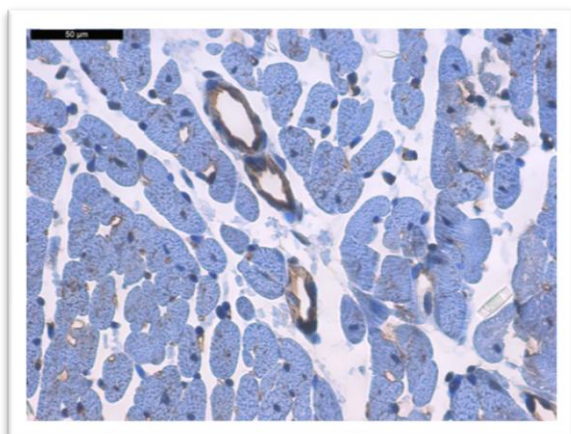
Слика 49.



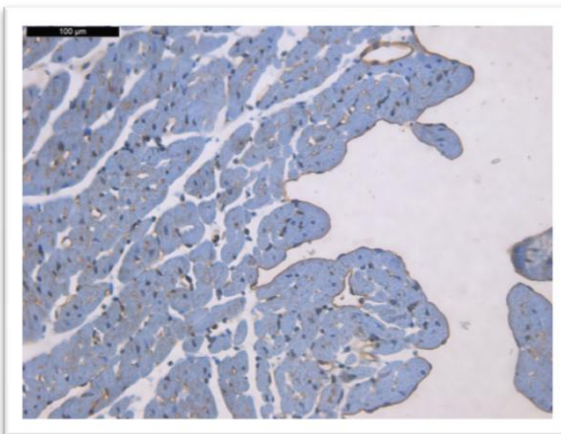
Слика 50.

Легенда. **Слика 49 и 50** H/E (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 49** се уочава вакуолизација ћелијских органела, губитак ћелијских мембрана, кариопикноза, цитоплазма је расута, дисоциране контракције. На **Слици 50** се уочава субендотелно нарушена структура кардиомиоцита.



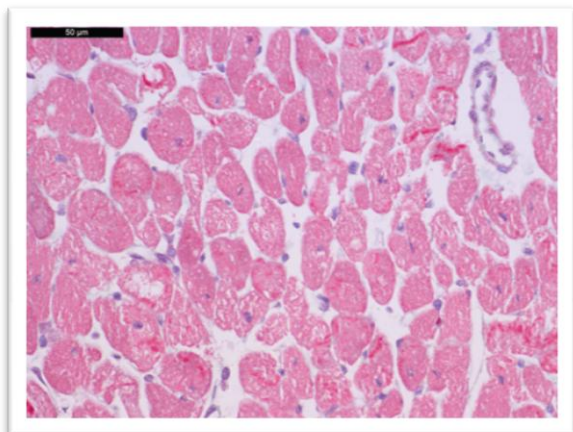
Слика 51.



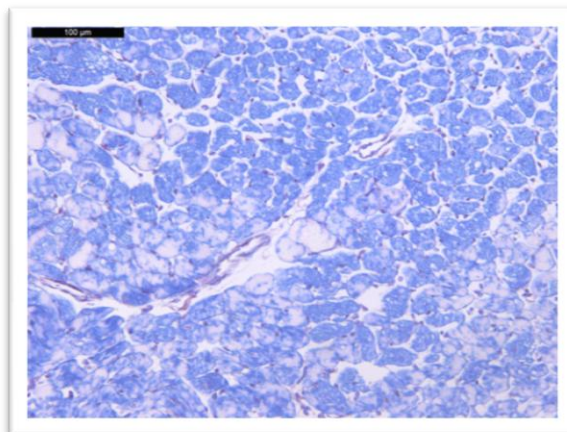
Слика 52.

Легенда. **Слика 51** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 400 х увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 52** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 200 х увећање (бар = 100 микрометара)

На Сликама 51 и 52 се уочава очуван ендотел крвних судова и капиларне мреже.



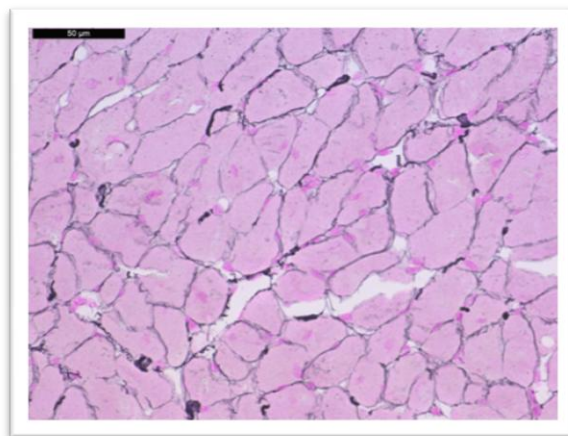
Слика 53.



Слика 54.

Легенда. Слика 53 *MT* (масон-трихром); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и Слика 54 *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин) бојење ћелија; 200 x увећање (бар = 100 микрометара)

На Слици 53 се уочава феномен „*contraction bend necrosis*“, а на Слици 54 очуваност митохондрија.



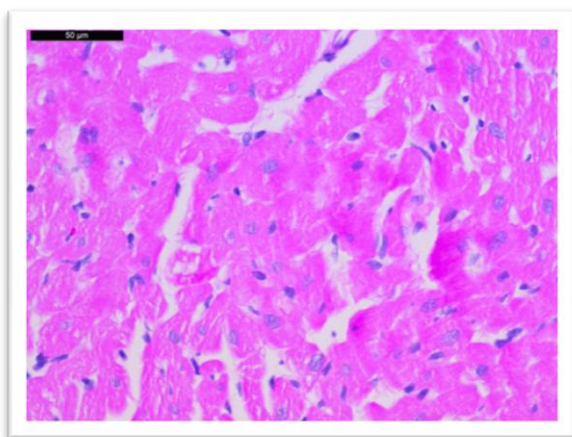
Слика 55.

Легенда. Слика 55 *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

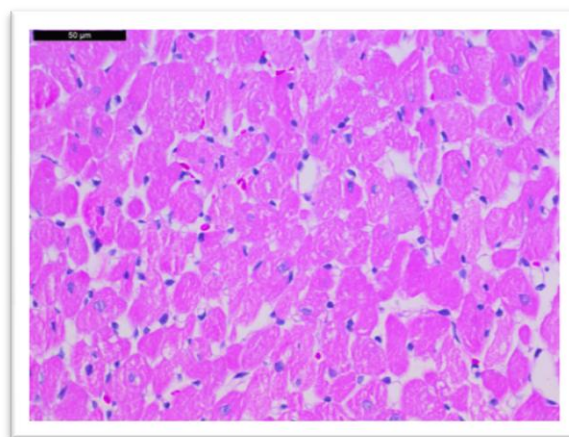
На Слици 55 се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.

4.3.3.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у концентрацији од 10^{-7} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 56-63**.



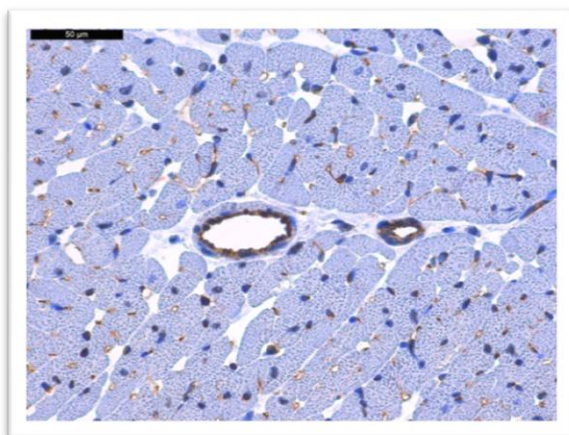
Слика 56.



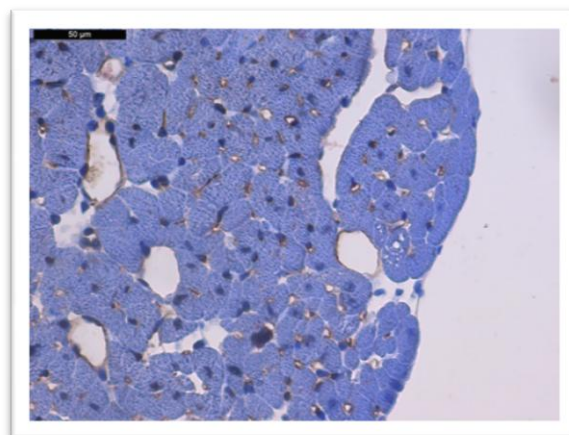
Слика 57.

Легенда. **Слика 56 и 57** H/E (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 56** се фокално уочавају дисоциране контракције уз феномен „*contraction band necrosis*“, а на **Слици 57** присуство вакуолизација.



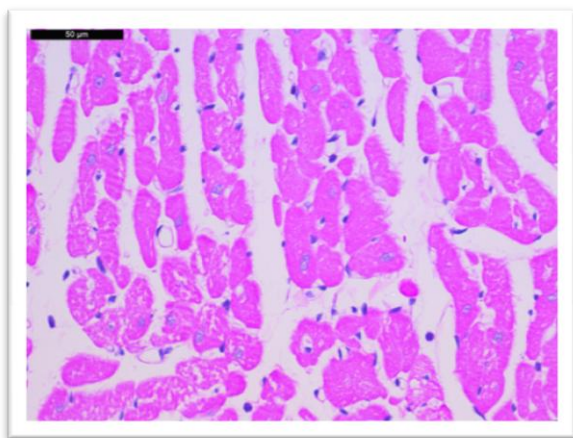
Слика 58.



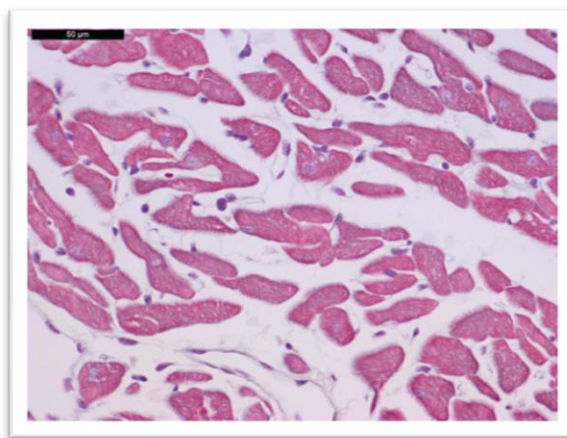
Слика 59.

Легенда. **Слика 58 и 59** cd31 (мембрански маркер) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 58** се уочава очуваност крвних судова и капиларних мрежа, док је тај налаз фокално негативан на **Слици 59**, па се може закључити да је ендотел делимично очуван.



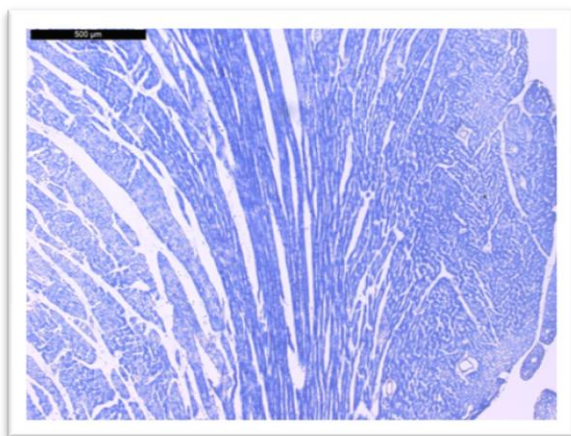
Слика 60.



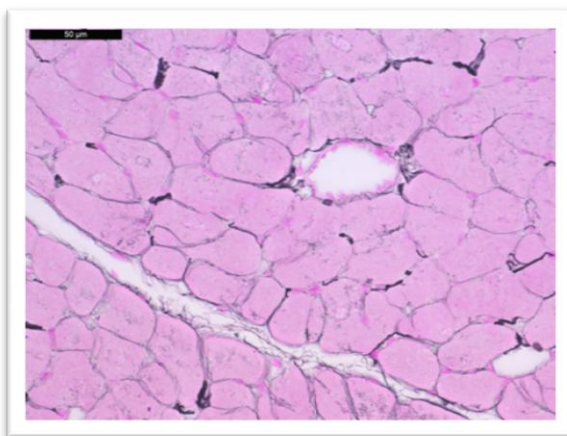
Слика 61.

Легенда. **Слика 60** *H/E* (хематоксилин/еозин) и **Слика 61** (масон-трихром) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Сликама 60 и 61** се уочава интерстицијални едем.



Слика 62.



Слика 63.

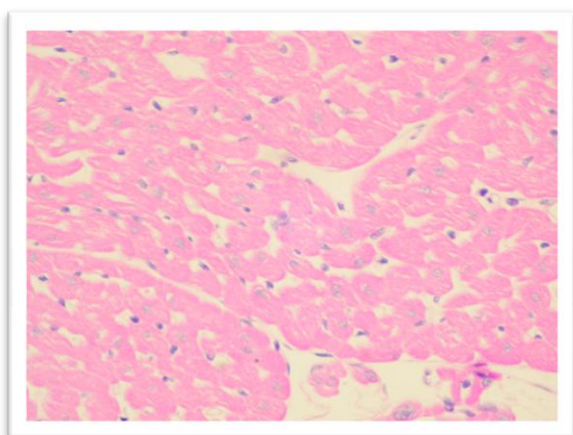
Легенда. **Слика 62** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин); 200 x увећање (бар = 100 микрометара) и **Слика 63** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 62** се уочава субендотелно повећање броја митохондрија. На **Слици 63** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива уз фокалне промене.

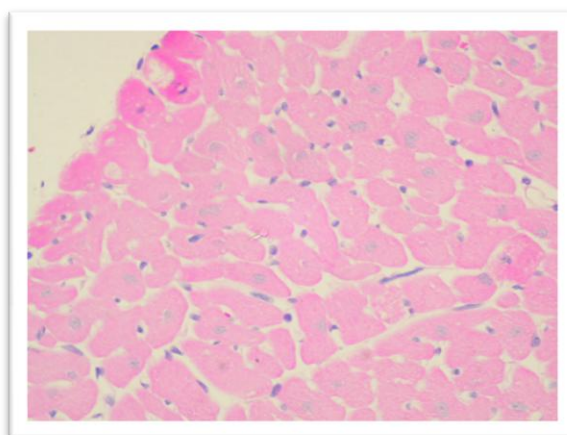
4.3.4. Ефекти акутне апликације 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова

4.3.4.1. Дејство највише примењене дозе (10^{-5} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-5} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 64-73**.



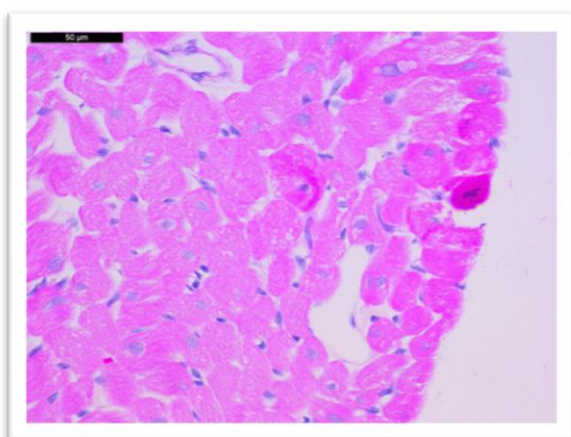
Слика 64.



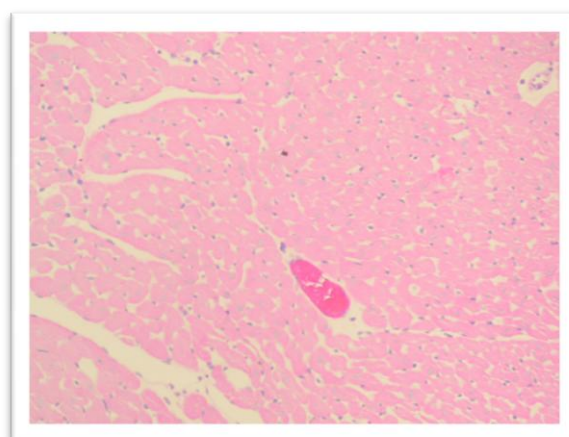
Слика 65.

Легенда. **Слика 64 и 65** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 64** се уочава очуваност кардиомиоцита, док се на **Слици 65** субендокардно уочавају дефекти.



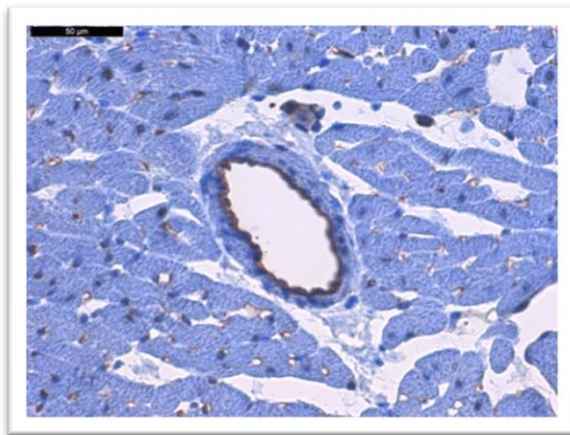
Слика 66.



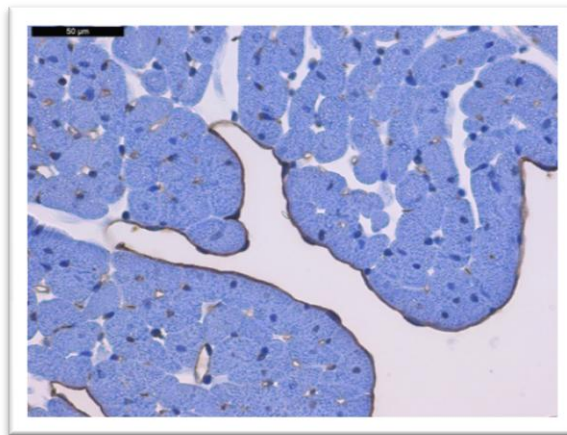
Слика 67.

Легенда. **Слика 66 и 67** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 66** се уочава карипикноза једара и вакуолизација ћелија. На **Слици 67** се поново уочава вакуолизација ћелија уз појаву хијалилног микротромба односно стаза, који није описан у претходним групама.



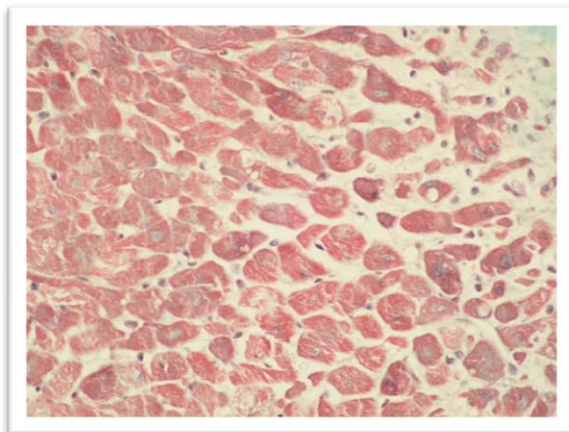
Слика 68.



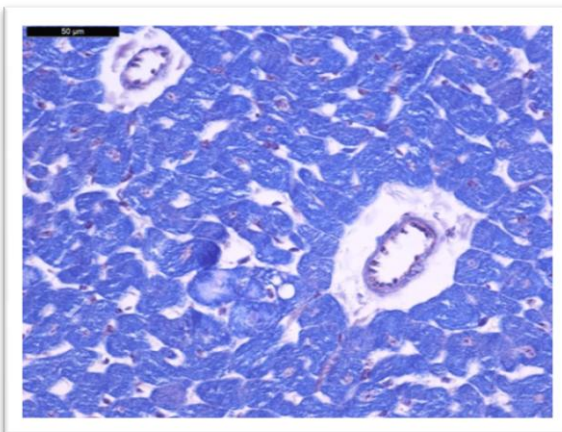
Слика 69.

Легенда. **Слика 68 и 69** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 68** се уочава очуваност крвних судова и капиларних мрежа, а на **Слици 69** се уочава готово интактан ендакардни ендотел.



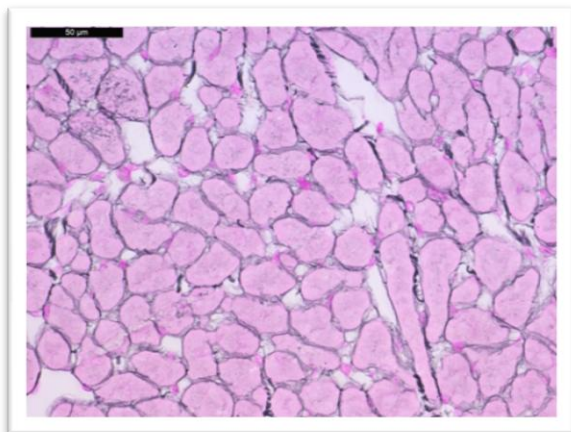
Слика 70.



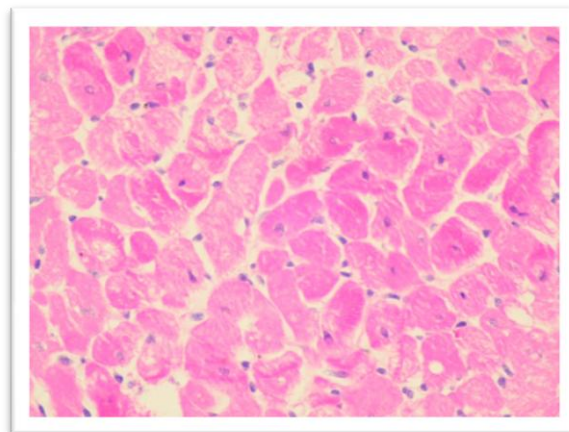
Слика 71.

Легенда. **Слика 70** *MT* (масон-трихром); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 71** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 70** се уочава вакуолизација ћелија уз поља некрозе, док се на слици **71** уочава очуваност митохондрија уз појаву стазе уочене и на **Слици 71**.



Слика 72.



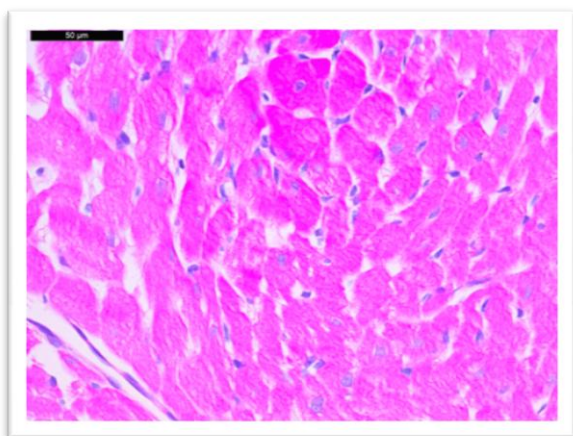
Слика 73.

Легенда. Слика 72 R (ретикулинско); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и Слика 73 H/E (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

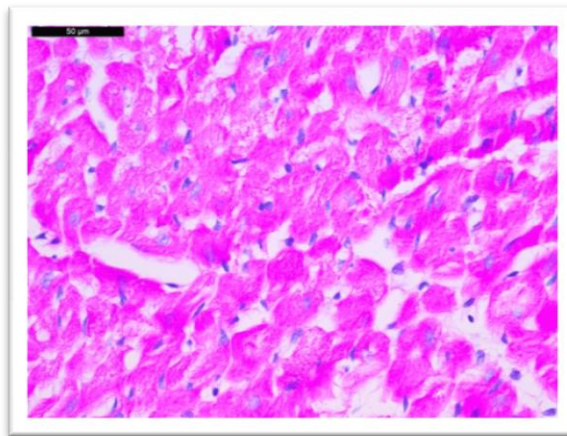
На Слици 72 се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива, док се на Слици 73 уочавају бројне патолошке промене као што су феномен „*contraction band necrosis*“, хиперконтрактилност саркомера, псеудоинклузија, груба вакуолизација.

4.3.4.2. Дејство средње примењене дозе (10^{-6} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-6} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 74-81**.



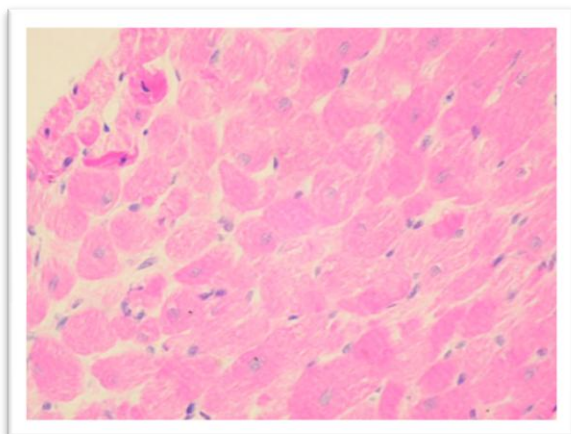
Слика 74.



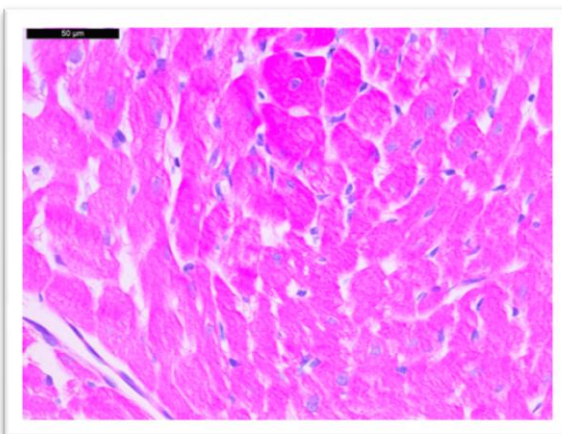
Слика 75.

Легенда. **Слика 74 и 75** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 74** се уочава нормалан изглед кардиомицита, ћелије су очуване. Док се на **Слици 75** фокално уочава интерстицијални едем и вакуолизација ћелија.



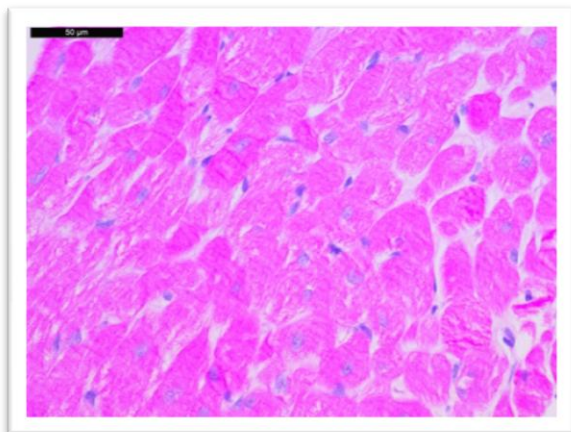
Слика 76.



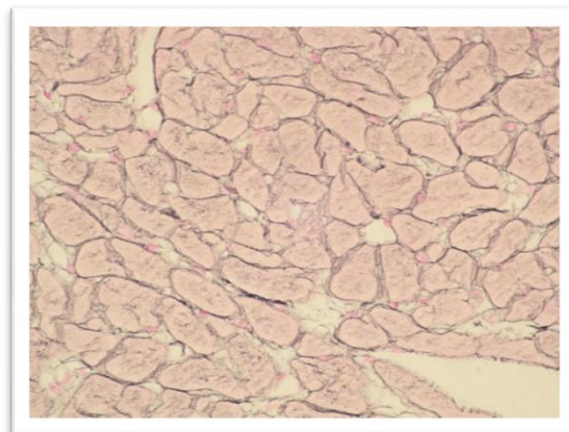
Слика 77.

Легенда. **Слика 76 и 77** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 76** се субендокардно уочава кариопикноза једара, а на **Слици 77** се фокално уочава кондензација цитоплазме.



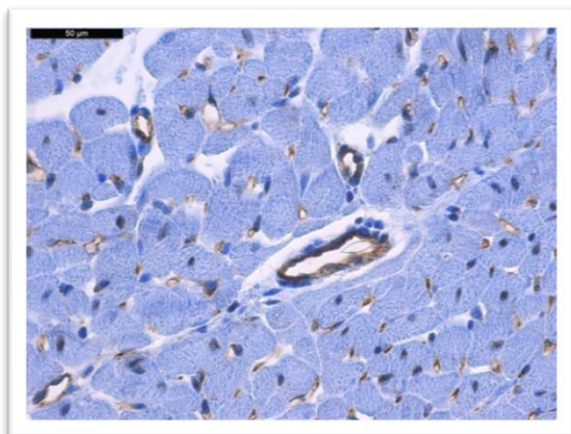
Слика 78.



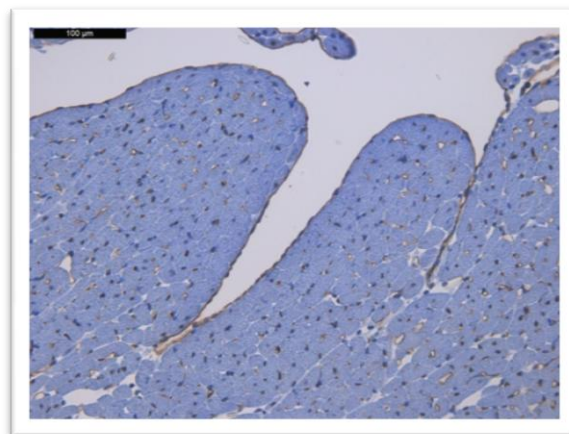
Слика 79.

Легенда. **Слика 78** H/E (хематоксилин/еозин); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 79** R (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 78** се уочава хиперконтрактилност саркомера, а на **Слици 79** очуваност интерстицијалног везивног ткива.



Слика 80.



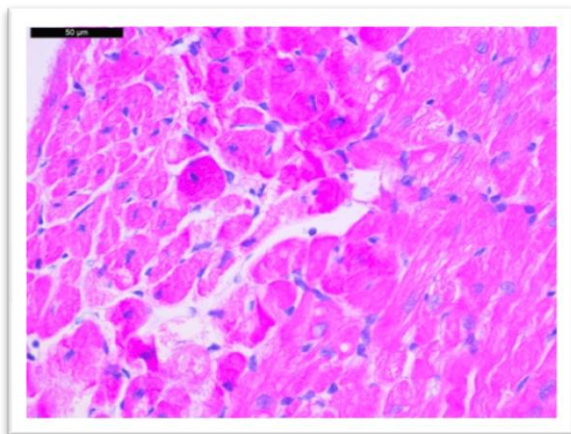
Слика 81.

Легенда. **Слика 80** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 81** *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија 200 x увећање (бар = 100 микрометара)

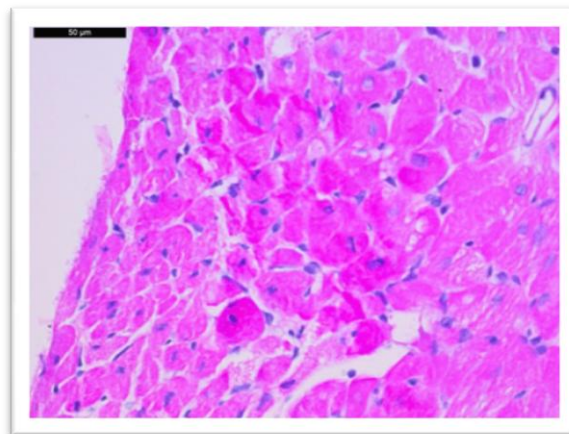
На **Слици 80** се уочава очуваност артериола и капиларних мрежа, док се на **Слици 81** уочава очуваност ендотела у коморама.

4.3.4.3. Дејство најниже примењене дозе (10^{-7} М) 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида на очуваност грађе миокарда пацова

Ефекти примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у концентрацији од 10^{-7} М на очуваност грађе миокарда пацова приказани су на **Сликама 82-89**.



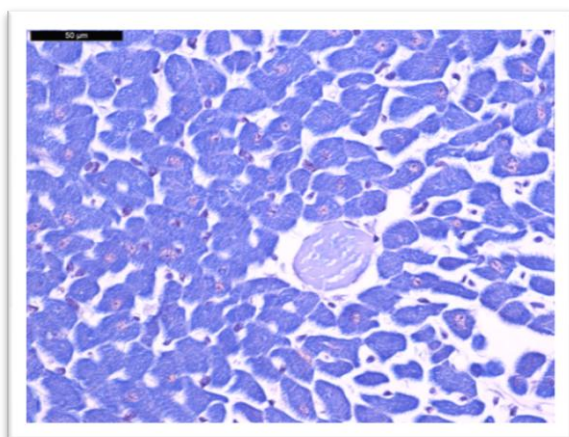
Слика 82.



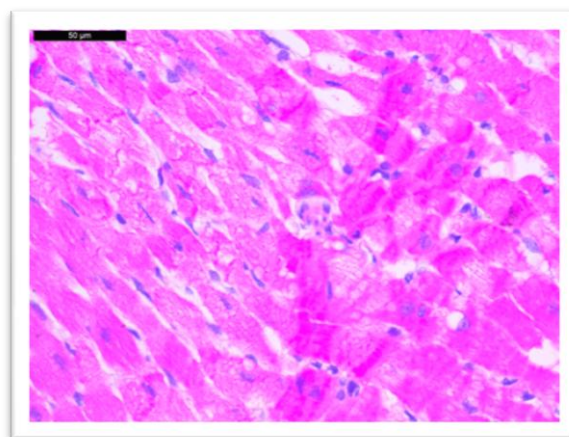
Слика 83.

Легенда. **Слика 82 и 83** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 х увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 82** се фокално уочава хиперконтрактилност саркомера, вакуолизација ћелија као и кондензација цитоплазме у ћелијама субендокардно тј. ка лумену комора. На **Слици 83** се уз кондензацију цитоплазме уочену и на **Слици 82**, уочава и кариопикноза једара.



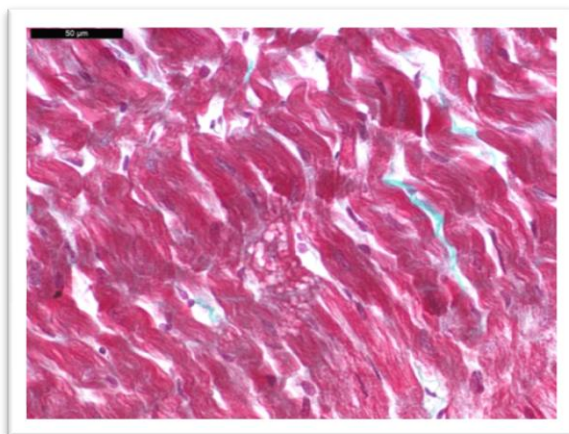
Слика 84.



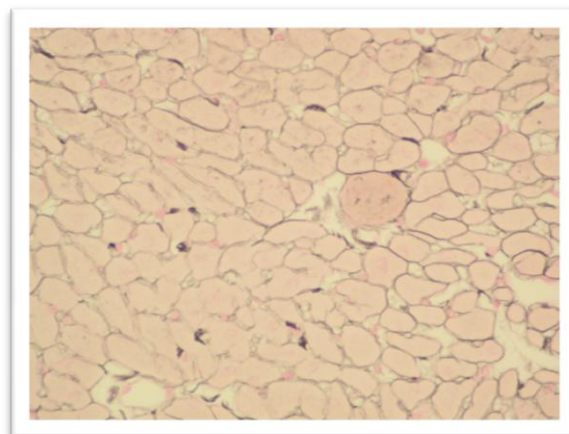
Слика 85.

Легенда. **Слика 84** *PTAH* (фосфоволфрамска киселина хематоксилин); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 85** *H/E* (хематоксилин/еозин) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 84** се уочава појава стазе која је примећена и код примене највише дозе овог комплекса. На **Слици 85** се уочавају феномен „*contraction band necrosis*“ као и дисоцирана контрактилност.



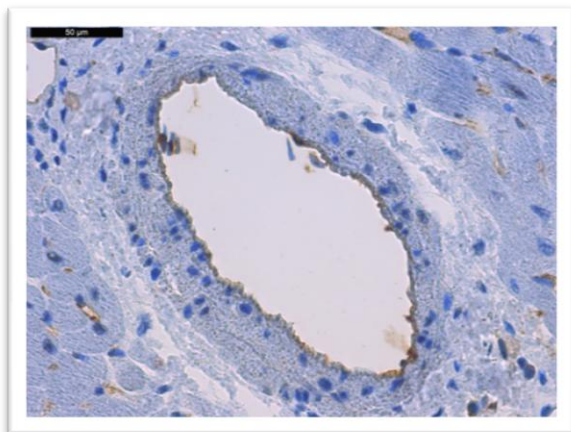
Слика 86.



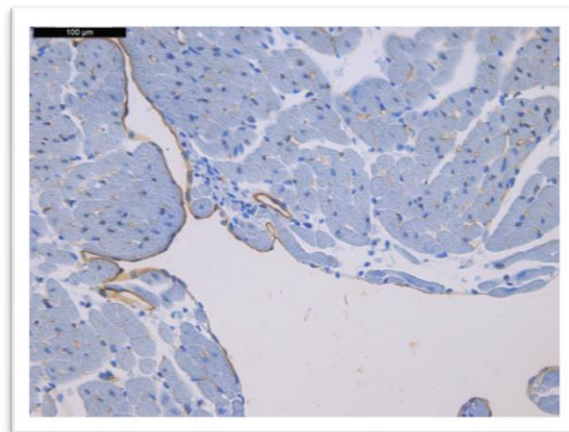
Слика 87.

Легенда. **Слика 86** *MT* (масон-трихром); 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и **Слика 87** *R* (ретикулинско) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара)

На **Слици 86** је потврђен раније уочен феномен дисоциране контрактилности, а поред тога се уочава и вакуолизација ћелија. На **Слици 87** се уочава очуваност интерстицијалног везивног ткива.



Слика 88.



Слика 89.

Легенда. Слика 88 *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 400 x увећање (бар = 50 микрометара) и Слика 89 *cd31* (мембрански маркер) бојење ћелија; 200 x увећање (бар = 100 микрометара)

На Слици 88 се уочава очуваност артериола и капиларних мрежа, док се на Слици 89 уочава делимична очуваност ендотела у коморама.

5. ДИСКУСИЈА

Основни циљ овог истраживања је био да се испитају ефекти примене двовалентних комплекса платине на функцију миокарда и коронарни проток изолованог срца пацова. У истраживању су коришћени двовалентни комплекси платине са носећим етилендиаминским, диаминоциклохексанским и терпиридинским лигандом и цисплатина као референтна супстанца. У клиничкој пракси су забележене и описане кардиоваскуларне компликације које се јављају услед примене хемиотерапије. Кардиоваскуларне компликације настале због примене цисплатине детаљно се изучавају у последњих двадесетак година (188). Инфаркт миокарда и различити типови вентрикуларних аритмија честа су појава услед акутне примене цисплатине код младих пацијената (189-191). Токсични ефекти цисплатине на кардиоваскуларни систем се испољавају кроз електрокардиографске промене (192): вентрикуларне аритмије, суправентрикуларне тахикардије, синусну брадикардију, комплетан атриовентрикуларни блок (193-195). Миокардитис, перикардитис и ангина пекторис се такође јављају услед примене цисплатине поред поремећаја срчаног ритма (103, 196). Такође, забележена је и појава хипотензије, хипертензије (197, 198), коронарног васоспазма који може да доведе до промена на коронарним артеријама, оштећење васкуларног ендотела услед пораста вредности *von Willebrand*-овог фактора (105). Последица ових догађаја је развој конгестивне срчане инсуфицијенције и изненадна срчана смрт.

Механизми настанка кардиотоксичности изазване применом цисплатине су сложени и у последње време све чешће истраживани. Сматра се да у настанак кардиотоксичности изазване применом цисплатине значајну улогу имају: мембрански транспортери, токсични метаболити цисплатине, оштећење ДНК молекула у једру и митохондријама, дисбаланс у хомеостази јона, дисфункција митохондрија и настанак оксидационог стреса, индукција инфламације и активација апоптотских путева.

Узимајући у обзир чињеницу да комплекси платине који се данас користе у клиничкој пракси (цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина – Схема 1, 2, ба) имају различиту потентност и способност да изазову нежељена дејства, ми смо одабрали одређене аналоге цисплатине да испитамо њихов утицај на коронарну циркулацију и функцију миокарда. Поменути аналози се разликују у погледу структуре, хемијске реактивности, растворљивости, фармакокинетики и системске токсичности.

Low-Friedrich и сарадници наводе да је степен оштећења срца пропорционалан примењеној дози цисплатине, због чега је један од наших циљева био да утврдимо да

ли различите дозе доводе до различитог степена оштећења функције и морфологије миокарда (199).

Већина истраживања заснивала су се на испитивању повезаности настанка оксидационог стреса и кардиотоксичности услед примене цисплатине (119, 200). Цисплатина може да утиче на редокс баланс тако што се везује за глутатион, а поред тога може да доведе до деполаризације мембране митохондрија изазивајући промене у структури митохондрија, што последично условљава појачано стварање реактивних кисеоничних и азотних врста (89, 201-203). Услед појачаног стварања слободних радикала долази до индукције оксидационог стреса који покреће каскадну активацију сигналних молекула и транскрипцију проапоптотских гена и као крајњи исход настаје смрт захваћених ћелија (203-205). Сходно томе, испитиван је утицај истовремене примене различитих једињења са антиоксидационим потенцијалом и цисплатине на анималним моделима, где је показано да примена ових агенаса умањује оксидациони стрес изазван применом цисплатине (206-208). Узимајући у обзир ове резултате додатни циљ био је да утврдимо да ли испитивани комплекси изазивају мању продукцију слободних радикала од цисплатине. С тим у вези у прикупљеном венском ефлуенту током перфузије изолованих срца смо одређивали нивое реактивних кисеоничних и азотних врста као и индекса липидне пероксидације.

У ранијим истраживањима хистопатолошких промена миокарда код животиња третираних цисплатином, показано је да услед примене овог хемиотерапеутика долази до значајних промена након само једне дозе и то на различитим нивоима (кариопикноза једара, интестинални едем, умерена инфилтрација лимфоцита и макрофага, хеморагије) (207, 209). Сходно описаним променама, након завршене перфузије изолованог срца испитиваним комплексима спровођена је даља хистопатолошка анализа са циљем утврђивања промена на нивоу структуре миокарда.

5.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ *cis*-ДИАМИНО-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) – ЦИСПЛАТИНЕ НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА

Акутна апликација комплекса цис-диамино-дихлоридо-платине(II)– цисплатине у све три примењене дозе (10^{-5} М, 10^{-6} М и 10^{-7} М) је довела до статистички значајних промене у вредностима кардиодинамских параметара (Табела 1-6, График 1-3).

При примени највише дозе 10^{-5} М дошло је до значајног снижења систолног притиска за око 11% након тридесет минута перфузије, који се додатно снизио и у периоду опоравка тако да су вредности овог параметра биле ниже за око 19% у односу на почетне вредности што указује на иреверзибилне промене систолног притиска. Забележено додатно снижење систолног притиска током периода опоравка је било праћено значајним повећањем дијастолног притиска у посматраном периоду (**Табела 1 и 2, График 1**). Такође, при примени ове дозе срчана фреквенца је значајно снижена за око 21% у односу на почетне вредности већ након петнаест минута перфузије, ово снижење се одржавало током свих тридесет минута перфузија. Промене у срчаној фреквенци су у одређеном степену реверзибилне јер након периода опоравка долази до значајног пораста срчане фреквенце за око 9%, међутим вредности нису успеле да се врате на почетне јер је снижење срчане фреквенце на крају експеримента било око 12% у односу на почетне вредности (**Табела 1 и 2, График 1**). Вредности максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори су након примене ове дозе цисплатине такође биле снижене (13% и 14%) у односу на почетне вредности, међутим ове промене нису биле статистички значајне (**Табела 1 и 2, График 1**).

Примена цисплатине у дози од 10^{-6} М је такође довела до значајног снижења систолног притиска након тридесет минута перфузије, с тим што је то снижење било доста веће него при примени више дозе и износило је чак око 15% од почетних вредности и такође је било иреверзибилно. Са друге стране примена ове дозе цисплатине је тек након тридесет минута перфузије довела до значајног снижења срчане фреквенце које је било мање него при примени више дозе и износило је око 5% од почетних вредности (**Табела 3 и 4, График 2**). Супротно делимично реверзибилним ефектима на срчану фреквенцу при примени више дозе, примена ове дозе је довела до иреверзибилних промена, где су вредности овог параметра након периода опоравка биле још ниже тако да је укупно снижење срчане фреквенце било око 7% у односу на почетне вредности (**Табела 3 и 4, График 2**). Током примене ове дозе цисплатине

дошло је до статистички значајног снижења максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори након тридесет минута перфузије, које нису забележене током примене више дозе. Снижење вредности ових параметара је износило 7% за максималну стопу промене у левој комори, односно 12% за минималну стопу промене притиска у левој комори. Вредности оба ова параметра се значајно нису промениле током периода опоравка, што указује на иреверзибилне промене овог параметра **(Табела 3 и 4, График 2)**.

Ефекти примене најниже дозе цисплатине од 10^{-7} М врло су слични ефектима које је остварила и примена највише дозе цисплатине. Срчана фреквенца се значајно снизила након свега петнаест минута перфузије и то за око 9% и у том опсегу су се вредности одржавале током целог периода перфузије комплексом. Примена ове дозе изазива ефекте који су делимично реверзибилни, јер у периоду опоравка долази до значајног пораста овог параметра за око 4%. Међутим, срчана фреквенца након периода опоравка није успела да достигне вредности контролних услова, тако да је укупно снижење овог параметра на крају експеримента износило око 5% **(Табела 5 и 6, График 3)**. Примена ове дозе цисплатине је довела и до значајног иреверзибилног снижења систолног притиска које је након тридесет минута перфузије износило око 7%, а на крају периода опоравка око 13%. Снижење систолног притиска је као и код примене највише дозе цисплатине било праћено значајним порастом дијастолног притиска у периоду опоравка **(Табела 5 и 6, График 3)**. Примена најниже дозе цисплатине је условила снижење вредности максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, међутим ове промене нису биле статистички значјане **(Табела 5 и 6, График 3)**.

У све три групе није дошло до статистички значајних промена у вредностима коронарног протока и дијастолног притиска **(Табела 1-6, График 1-3)**.

Резултати примене све три дозе цисплатине на кардиодинамске параметре изолованог срца пацова указују да долази до оштећења функције изолованог срца, где су највише погођени срчана фреквенца и систолни притисак. Ови резултати су у сагласности са резултатима студија других аутора који су се бавили сличном проблематиком. Wang и сарадници, као и El-Sawalhi и сарадници су у њиховим истраживању показали да једнократна интраперитонеална примена цисплатине у дози од 7 mg/kg код пацова доводи до значајног снижења систолног притиска и срчане фреквенце (206, 207). Претходно поменути истраживања су рађена на *in vivo* моделу где су животиње третиране једном поменутом дозом цисплатине, при чему су

кардиодинамски параметри мерени након пет дана од администрације, што указује на иреверзибилне промене поменутих параметара. *Ma* и сарадници су за истраживање користили другачији експериментални модел, при чему су недељу дана третирали мишеве интравенском применом цисплатине у дози од 10 mg/kg након чега су изоловали срца и ретроградно их перфундовали *Krebs-Henseleit* раствором при константном перфузионом притиску (108). Резултати њихове студије су показали да субхронична примена цисплатине у поменутој дози доводи до значајних промена у функцији миокарда, тј. долази до смањења систолног притиска, максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори и делимично срчане фреквенце. Уз то је показано да долази и до смањења масе срца као и односа масе срца према укупној маси експерименталне животиње.

Сви претходно поменути резултати су у сагласности са резултатима наше студије која је рађена на изолованом срцу пацова, где су примећене сличне промене у функцији миокарда. *Pai* и сарадници су у свом раду указали на чињеницу да цисплатина доводи до диспозиције у синоатријалном чвору што може да доведе до брадикардије, као и да описане промене могу представљати један од механизма којим цисплатина доводи до кардиотоксичности (188). С друге стране, дисфункција леве коморе као и депресија контрактилности миокарда такође могу да допринесу смањењу срчане фреквенце и систолног притиска.

Andrews и сарадници су у свом истраживању показали да инкубација сензитивних и резистентних ћелијских линија хуманог карцинома оваријума специфичним инхибитором Na-K-АТП-азе оубаином доводи до смањене акумулације цисплатине у овим ћелијским линијама за чак 50% (210). Овај резултат је довео до даљих истраживања о потенцијалној улози ове пумпе у регулацији уласка цисплатине у ћелију. С тим у вези, *Huliciak* и сарадници су испитивали способност цисплатине да се веже за субјединице Na-K-АТП-азе и дошли до закључка да цисплатина може да се веже за цистеинску резиду у цитоплазматском делу овог ензима, који је означен као *C45 loop* и да након везивања снажно инхибира овај ензим (211). Услед инхибиције Na-K-АТП-азе у високом проценту (око 50%) може доћи до озбиљног оштећења бубрега, што може бити један од механизма њеног нефротоксичног дејства. Поред способности цисплатине да инхибира ову пумпу, у овом истраживању испитивани су и остали металофармацеутици на бази платине који се користе у терапији тумора (карбоплатина и оксалиплатина – **Схема 2 и 6**). Овим истраживањем показано је да карбоплатина и оксалиплатина немају способност да доведу до инхибиције ове пумпе.

Ови резултати могу да послуже за објашњење мањег потенцијала управо ова два хемиотерапеутика у односу на цисплатину да изазову нефротоксичност (211). Овај потенцијални механизам дејства цисплатине на бубреге може представљати и механизам дејства цисплатине на миокард, јер је ова пумпа присутна и на нивоу миокарда. Na-K-АТФ-аза учествује у регулацији одржавања размене јона Na^+ и K^+ кроз ћелијску мембрану, тј. омогућава излазак 3 јона Na^+ из ћелије и улазак 2 јона K^+ у ћелију. Када се ова пумпа инхибира долази до акумулације јона Na^+ у ћелији, што доводи до деполаризације мембране. Услед повећане концентрације јона Na^+ у ћелији долази до нагомилавања и јона Ca^{2+} у ћелије, јер је њихова размена на нивоу сарколеме зависна од Na-Ca-измењивача (212). Тачан механизам функционисања Na-Ca-измењивача је непознат али је познато да се три јона Na^+ измењује са једним јоном Ca^{2+} кроз мембрану сарколеме. Смер кретања јона кроз ову мембрану зависи од мембранског потенцијала и хемијског градијента ових јона, тј. када је мембрански потенцијал негативан јони Ca^{2+} излазе из ћелије а јони Na^+ улазе у ћелију и обрнуто. Повишена интрацелуларна концентрација јона Na^+ смањује концентрациони градиент јона Na^+ кроз сарколему, што умањује кретање јона јона Na^+ у складу са концентрационим градијентом преко пумпе. Ово за узврат смањује спољно кретање и размену јона Ca^{2+} што доводи до његове интрацелуларне акумулације (213). Повећана интрацелуларна концентрација јона Ca^{2+} (од енгл. *calcium overload*) доводи до оштећења митохондрија и промене ћелијске функције (214). Услед високе концентрације јона Ca^{2+} унутар ћелије долази до константног контраховања ћелија, што може да доведе до некрозе, тачније феномена који се назива *contraction band necrosis* који је уочен хистопатолошком анализом пресека срца након експерименталног (Слика 6 и 9) приликом примене највише и средње дозе цисплатине. Услед *calcium overload* долази до негативног инотропног дејства (смањење снаге контракције) и настанка аритмија. Овим механизмом би могао да се објасни ефекат акутне примене цисплатине на срчану фреквенцу (Табела 1-6, Фигура 1-3), јер је за нормалну контракцију срчаног мишића неопходна хомеостаза јона Ca^{2+} , тј. излазак јона Ca^{2+} из ћелије како би се омогућила релаксација. Услед неадекватне хомеостазе калцијума смањује се снага срчане контракције и долази до депресије контрактилности што говори у прилог забележеним ефектима (215-217).

Узимајући у обзир чињеницу да је већина аутора испитивала токсичност цисплатине након примене само једне одабране дозе, ми смо желели да утврдимо да ли примена различитих доза (у опсегу од 10^{-5}M до 10^{-7}M) изазива ефекте који могу бити

дозно зависни. На основу поређења ефеката које су оствариле различите дозе можемо закључити да не постоји јасна дозна зависност у погледу насталих кардиодинамких промена (**Табела 7, График 4**). Статистички значајне разлике су уочене између примене највише и средње дозе, као и између најниже дозе и средње дозе, док између ефеката које су оствариле највиша и најнижа доза није било значајних разлика код већине кардиодинамских параметара (**Табела 7, График 4**). Примена различитих доза цисплатине (10^{-5}M vs. 10^{-6}M и 10^{-5}M vs. 10^{-7}M) је довела до значајно различитих ефеката на максималну стопу промене притиска у левој комори, међутим вредности овог параметра су се значајно разликовале и у контролним условима тако да настале разлике приликом примене различитих доза не можемо приписати само примени различитих доза цисплатине (**Табела 7, График 4**). Док са друге стране, ефекти на минималну стопу промене притиска се значајно разликују између највише и средње дозе, као и између средње и најниже дозе док не постоји разлика између највише и најниже дозе, што опет говори и прилог чињеници да дозно зависни ефекти нису уочени (**Табела 7, График 4**). Поређењем ефеката различитих доза цисплатине на систолни и дијастолни притисак нису уочене статистички значајне разлике, иако су ефекти различитих доза били значајно другачији (**Табела 1-7, График 1-4**). Почетне вредности срчане фреквенце у групи која је примала најнижу дозу цисплатине су се значајно разликовале у односу на почетне вредности у осталим групама које су примале цисплатину тако да поређење ефеката ове две дозе са најнижом дозом комплекса на срчану фреквенцу није могуће. Са друге стране, поређењем ефеката највише и средње дозе на срчану фреквенцу уочава се драстично веће снижење срчане фреквенце приликом примене највише дозе (**Табела 7, График 4**). Као што је већ и претходно описано током експеримената цисплатина није довела до статистички значајног снижења коронарног протока, међутим када се упореде вредности коронарног протока у групи која је третирана најнижом дозом са преостале две групе уочава се да су најмање промене настале приликом примене најниже дозе и да се вредности коронарног протока у овој групи значајно разликују од вредности коронарног протока у преостале две групе. Такође, није било значајне разлике у ефектима које су највиша и средња доза оствариле на коронарни проток (**Табела 7, График 4**).

Описани хемодинамски поремећаји могу бити повезани са променама на нивоу митохондрија у кардиомиоцитима, повећањем оксидационог стреса као и настанком апоптозе. Срце за нормално функционисање захтева утрошак велике количине АТП-а, који настаје у процесу оксидативне фосфорилације чији су главни чиниоци

митохондрије (218). Ове органеле у процесу оксидативне фосфорилације стварају готово 90% ћелијског АТП-а трошећи молекулски кисеоник (219). Митохондрије имају значајну улогу у ћелијском дисању, те су због тога често мета токсина и хемиотерапеутика (220). *Cullen* и сарадници су у свом истраживању показали да митохондрије представљају главну мету за цисплатину у туморским ћелијама (221).

С тим у вези у нашем истраживању смо у узорцима ефлуената прикупљеним пре, у току као и након перфузије срца испитиваним комплексима, одређивали вредности биомаркера оксидационог стреса.

На основу резултата овог истраживања можемо уочити да примена цисплатине у све три дозе доводи до снижења вредности индекса липидне пероксидације мереног као *TBARS* и то већ након петнаест минута перфузије. Даља перфузије је довела до додатног снижења вредности овог параметра, док је престанак примене комплекса довео до повећања вредности овог параметра, међутим вредности се нису вратиле на почетне (**Табела 38-43, Фигура 26-28**). Ранија истраживања су показала да системска примена једнократне дозе цисплатине (5mg/kg, 7mg/kg и 10mg/kg), доводи до повећаног стварања малонилдиалдехида у срчаном ткиву (109, 207, 208). Резултати нашег истраживања нису у сагласности са претходно поменути резултатима, што може бити објашњено другачијим експерименталним моделом пре свега, јер у свим досадашњим студијама је цисплатина примењена системски након чега су вредности малонилдиалдехида одређиване у ткиву срца (109, 207, 208). Поређењем нивоа *TBARS*-а након примене различитих доза цисплатине уочава се да средња примењена доза доводи до већих вредности индекса липидне пероксидације у односу на највишу дозу након петнаест минута перфузије, у осталим тренуцима од интереса није било разлике. Такође, између осталих доза није било значајне разлике у вредностима индекса липидне пероксидације (**Табела 44, График 29**).

Примена највише (10^{-5}M) и најниже (10^{-7}M) дозе цисплатине је била праћена значајним падом вредности азот монооксида (**Табела 38, 39 и 42, 43, Фигура 26 и 28**). Пад вредности азот монооксида је довео и до значајног пада у вредностима срчане фреквенце (**Табела 1, 2, 5 и 6, Фигура 1 и 3**). Азот моноксид (NO) има позитивно хронотропно дејство на миокард (222). Инхибиција синтезе NO може бити разлог за депресивно дејство молекула цисплатине на контрактилну способност срца. С тим у вези, *Herradon* и сарадници су показали да долази до смањене експресије гена за ендогену азотмоксид синтетазу као и да се смањује концентрација одговарајуће информационе РНК у срцима пацова третираних цисплатином (223). *Pagliaro* и

сарадници су показали да инхибиција *NOS* (од енгл. - nitric oxide synthase) код анестезираних кучића доводи до редукције срчане фреквенце (224). Ови резултати говоре у прилог томе да је акутна примена цисплатине у различитим дозама могла да доведе до инхибиције *NOS*, која је изазвала смањену продукцију азот монооксида, чији је недостак могао да услови настанак пада срчане фреквенце. *Saleh* и сарадници су такође забележили пад вредности азот монооксида у хомогенизованом срчаном ткиву пацова третираних цисплатином (225). У прилог овим тврдњама говори и чињеница да у групи третираној средњом дозом цисплатине, код које није забележен пад у вредностима азот монооксида постоји доста блажи пад вредности срчане фреквенце у поређењу са преостале две групе (**Табела 3, 4 и Фигура 2**).

Примена доза од 10^{-5} М и 10^{-6} М цисплатине довела је до значајног пораста у продукцији супероксид анјон радикала, при чему није дошло до значајне продукције водоник пероксида. Ранија истраживања *Yen* и сарадника, као и *Hasinoff* и сарадника су показали да је кардиотоксичност изазвана применом антитуморског лека доксорубицина праћена променама ткива које настају услед повећане концентрације супероксид анјон радикала (226, 227). *El-Sawalhi* и сарадници су показали да примена цисплатине доводи до повећања нивоа никотинамид аденин динуклеотид фофат оксидазе (*NADPH*-оксидазе) у ткиву срца (206). За овај ензим је познато да доводи до стварања супероксид анјон радикала и да су повишене вредности овог ензима повезане са настанком ототоксичности код примене цисплатине (228, 229). Супероксид анјон радикал може ослабити функцију миоцита. Међутим, његова потенцијална штетност огледа се у реакцији са другим метаболитима, при чему може да пређе у друге, реактивније и токсичније облике који могу интераговати са виталним протеинима. Као што је већ раније поменуто, посредовањем ензима супероксид дисмутаза дисмутацијом супероксид анјон радикала настаје водоник пероксид (**Схема 13**) (140). Међутим, са друге стране истраживањима је показано да услед примене цисплатине долази до инактивације овог ензима (206-208), што може објаснити због чега се вредности водоник пероксида нису значајно промениле након акутне примене цисплатине на изоловано срце. *Chowdhury* и сарадници су такође показали да је смањена активност овог ензима, као и каталазе, која катализује разградњу водоник пероксида, у ткиву срца животиња третираних цисплатином. Поред тога су показали и да је смањења експресија гена за супероксид дисмутаза 2 и каталазу у овом ткиву (230).

Супероксид анјон радикал ступа у интеракције за реактивним азотним врстама (нпр. азот моноксид) при чему настаје пероксинитрит, то може додатно да објасни и

ниске концентрације азот монооксида измерене у нашим истраживањима. За пероксинитрит је показано да може да доведе до оштећења функције миокарда код мишева, јер доводи до повећања нитрозиловања протеина миоцита (231).

Оксидациони стрес може да буде окидач за апоптозу ћелија миокарда, што условљава оштећење срчаног ткива (114). Такође, услед повећаног стварања реактивних кисеоничних врста може доћи до настанка инфламације и то кроз активацију *NF-κB* (нуклеарни фактор капа Бе) и повећану продукцију проинфламаторних цитокина, нпр. *TNF-α* (фактор некрозе тумора алфа) и/или хемокина, нпр. *MCP-1* (моноцитни хемоатрактантни протеин-1) што доприноси настанку цитотоксичног ефекта цисплатине (112). *NF-κB* осим што учествује у настанку инфламације учествује и у индукцији апоптозе која доводи до оштећења миокарда (113).

На попречним пресецима миокарда третираних цисплатином (при све три испитиване дозе) се генерално уочава очувано срчано мишићно ткиво уобичајене грађе (Слика 1 и 13). Срчане мишићне ћелије су регуларне морфологије са очуваним обликом, јасно дефинисаним границама. Миофибриле имају правилан распоред што дефинише очуваност контрактилног апарата срца. Ћелије поседују једно централно постављено, овално, еухроматско једро. Такође се уочавају правилни крвни судови очуване морфологије, са очуваном капиларном мрежом и ендотелом (Слика 3-4, 10-11 и 16-17).

Међутим, фокално су уочене одређене промене као што је вакуолизација ћелија на нивоу цитоплазме (Слика 2, 8, 14), која настаје услед поремећаја респирације на нивоу ћелије деловањем слободних радикала (232, 233). Услед поремећаја аеробне респирације ћелије долази до успоравања или прекида синтезе аденозин три фосфата, што условљава поремећај Na/K пумпе која је зависна од АТП-а. Поремећај у функционисању ове пумпе условљава настанак дисбаланса у концентрацији јона, тако да долази до накупљања јона Na^+ у ћелији и изласка јона K^+ ван ћелије. Исоосмотским путем вода улази у ћелију што доводи до бубрења ћелија и губитка микровила, при чему се оштећује плазмалема и долази до неконтролисаног инфлуksа јона Ca^{2+} . Ћелија прелази на анаеробни метаболизам, при чему се смањује количина гликогена а расте концентрација млечне киселине. Ово условљава оток митохондрија и ендоплазматског ретикулума, при чему долази до одвајања рибозома од ендоплазматског ретикулума где се полизоми распадају у монозоми због чега се смањује синтеза протеина. На површини ћелије се стварају мехурићи названи вакуолама (Слике 2, 5, 6, 8, 9, 14). Ове

промене су реверзибилног карактера јер су захваћене само органеле, када дође до промена на нивоу једра промене су иреверзибилног карактера. Овакве промене су уочене и код животиња које су системски третиране цисплатином (207). Поред вакуолизације органела, која је забележена након примене све три дозе цисплатине, фокално се уочавају и знаци асинхроне контракције уз појаву груписања миофибрила у појединим ћелијама (Слика 6, 9). *Contraction band necrosis* представља врсту неконтролисане смрти миоцита (некрозе) која настаје најчешће као последица реперфузије након инфаркта миокарда. Реперфузија је праћена хиперконтракцијом миоцита која условљава руптуру сарколеме. Појава асинхроне контракције може да објасни појаву настанка аритмија код примене цисплатине код људи (193-195). Појава овог феномена је карактеристична за примену виших доза, тако да се може претпоставити и да аритмије настају приликом примене виших доза или након поновљене примене цисплатине. У групама које су третиране највишом и најнижом дозом цисплатине уочава се појава дискретног интерстицијалног едема у виду проширења међућелијског простора, док интрацелуларни едем није присутан (Слика 2 и 12). У истраживањима је показано да појава интерстицијалног едема миокарда смањује контрактилну спостобност миокарда утичући и на *preload* и на максималну стопу промене притиска у левој комори током контракције (234-236). Овај хистопатолошки налаз говори у прилог драстичном смањењу срчане фреквенце у ове две експерименталне групе.

5.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЕТИЛЕНДИАМИН-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА

Акутна апликација комплекса етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у све три примењене дозе (10^{-5}M , 10^{-6}M и 10^{-7}M) је довела до статистички значајних промена кардиодинамских параметара (**Табела 8-13, График 5-7**).

Акутна примена највише дозе етилендиамин-дихлоридо-платине(II) 10^{-5}M је довела до значајног снижења максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори након тридесет минута перфузије. Вредности максималне промене стопе притиска у левој комори су се након примене ове дозе испитиваног комплекса смањиле за око 4%, а након престанка перфузије и током периода опоравка ове вредности су се додатно смањиле у односу на контролне. Сличан тренд је забележен и код минималне стопе промене притиска у левој комори, с тим што је смањење овог параметра било драстичније и износило је приближно 17% након тридесет минута перфузије етилендиамин-дихлоридо-платином(II), а након период опоравка чак 24% од почетних вредности (**Табела 8 и 9, График 5**).

Након само петнаест минута перфузије етилендиамин-дихлоридо-платином(II) у дози од 10^{-5}M дошло је до значајног снижења систолног притиска и то за око 6% од почетних вредности, даља перфузија је довела до драматичнијег пада овог параметра, тако да је снижење након тридесет минута перфузије износило чак око 15% од почетних вредности. Након престанка примене овог комплекса, вредности систолног притиска су додатно падале, тако да је укупно снижење овог параметра износило око 19% (**Табела 8 и 9, График 5**).

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у дози од 10^{-5}M је довела и до значајног смањења срчане фреквенце, које је износило око 6% након тридесет минута, ове вредности срчане фреквенце су се одржале и након периода опоравка (**Табела 8 и 9, График 5**).

Коронарни проток је такође значајно опао за око 7% након тридесет минута перфузије. Након периода опоравка овај параметар је додатно снижен, тако да је укупан пад вредности био око 9% (**Табела 8 и 9, График 5**).

На основу ових резултата можемо закључити да су све промене биле иреверзибилног карактера, тј. да примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у дози од 10^{-5}M доводи до трајног оштећења функције миокарда. При чему ова доза

етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у највећој мери утиче на минималну и максималну стопу промене притиска у левој комори и систолни притисак.

Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у дози од 10^{-6} М је такође довела до депресивних ефеката на контрактилност миокарда (Табела 10 и 11, График 6).

Након тридесет минута перфузије изолованог срца поменути комплексом дошло је до значајног снижења како максималне тако и минималне стопе промене притиска у левој комори. Вредности ових параметара су снижене за око 5-7%, с тим што су се ове вредности након периода опоравка вратиле на вредности приближне вредностима ових параметара у контролним условима (Табела 10 и 11, График 6). Оваква динамика максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори говори у прилог реверзибилним ефектима овог комплекса на контрактилни апарат срца.

Примена комплекса у овој дози је довела и до значајног пада срчане фреквенце за око 10% од почетних вредности. Након престанка примене комплекса у периоду опоравка није дошло до пораста срчане фреквенце, што говори о насталим иреверзибилним променама (Табела 10 и 11, График 6).

Коронарни проток, систолни и дијастолни притисак се нису значајно променили током перфузије комплексом у поменутој дози (Табела 10 и 11, График 6). Сходно описаним ефектима на кардиодинамске параметре може се закључити да примена средње дозе доводи до иреверзибилних промена искључиво срчане фреквенце, док на све остале параметре утиче само тренутно, тј. да са престанком примене комплекса долази до опоравка миокарда и његовог нормалног функционисања.

Примена најниже дозе 10^{-7} М етилендиамин-дихлоридо-платине(II) је значајно утицала само на смањење срчане фреквенце и то за око 5%, при чему су ефекти били реверзибилни, јер су се након престанка примене комплекса током период опоравка вредности овог параметра вратиле на почетне (Табела 12 и 13, График 7).

Примена овог комплекса у најнижој дози није значајно утицала на остале кардиодинамске параметре, као ни на коронарни проток (Табела 12 и 13, График 7).

Поређењем ефеката које су оствариле различите дозе овог комплекса на коронарни проток и функцију миокарда можемо закључити да не постоји јасан дозно зависни ефекат код акутне апликације (Табела 14, График 8). Међутим, са друге стране може се уочити да више дозе показују депресивнији ефекат у односу на најнижу примењену дозу, као и да сви описани ефекти приликом акутне примене највише дозе етилендиамин-дихлоридо-платине(II) имају иреверзибилни карактер. Без обзира на

примењену дозу етилендиамин-дихлоридо-платина(II) утиче на смањење срчане фреквенце, с тим што при најнижој дози овај утицај драстично слаби и сам ефекат поприма реверзибилни карактер.

Узимајући у обзир чињеницу да токсичност овог комплекса није испитивана, ове резултате можемо поредити само са резултатима референтне супстанце - цисплатине. Етилендиамин-дихлоридо-платина(II) се у хемијском погледу у структури од цисплатине разликује само по стабилном лиганду, при чему су два монодентатна амино лиганда замењена етилендиамином (бидентантним лигандом) (**Схема 7**). Ова на први поглед мала разлика у структури условљава велику разлику у реактивности комплекса, заменом ових стабилних лиганда онамогућена је лака супституција монодентатних амино лиганда. Етилендиамин-дихлоридо-платина(II) је структурно слична и комплексу означеном као *М-40* који је достигао и фазу I клиничких испитивања, међутим који није прошао даља испитивања због појаве нефротоксичности (237).

Поређењем ефеката које је остварила акутна администрација етилендиамин-дихлоридо-платине(II) и цисплатине у навишој дози може се уочити да постоји разлика на утицај на кардиодинамске параметре. За разлику од цисплатине која при овој дози није довела до утицаја на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори етилендиамин-дихлоридо-платина(II) је изазвала значајно снижење, међутим поређењем вредности измерених у овим групама не уочава се статистички значајна разлика у овим параметрима (**График 17, Табела 29**). Оба комплекса су на сличан начин утицала на промену систолног и дијастолног притиска (**График 18, Табела 30**). Значајно се разликују ефекти на срчану фреквенцу које остварују ови комплекси, тј. етилендиамин-дихлоридо-платина(II) у доста мањој мери доводи до смањења срчане фреквенце током перфузије изолованог срца (**График 19, Табела 31**). Битна разлика у њиховом утицају на срчану фреквенцу је и то што су ефекти које остварује етилендиамин-дихлоридо-платина(II) блажи али у потпуности реверзибилни, док су ефекти које остварује цисплатина на срчану фреквенцу интензивнији али делимично реверзибилни. С тим у вези вредности срчане фреквенце у групи третираној цисплатином су значајно ниже током саме перфузије у оба посматрана тренутка, након петнаест и након тридесет минута перфузије, међутим ове вредности се након периода опоравка готови и не разликују (**График 19, Табела 31**). Такође, цисплатина није показала утицај на коронарни проток док је етилендиамин-дихлоридо-платина(II)

довела до снижења вредности коронарног протока које је било иреверзибилно (**График 19, Табела 31**).

Анализирајући ефекте које етилендиамин-дихлоридо-платина(II) при дози од 10^{-5} М остварује на оксидациони стрес уочава се да долази до пораста супероксид анјон радикала, међутим сам пораст није статистички значајан, док је снижење азот монооксида доста ниже него у групи третираној истом дозом цисплатине (**Табела 45 и 46, График 30**). Слабији утицај етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на редокс баланс говори у прилог блажим ефектима које је овај комплекс остварио на кардиодинамске параметре.

Приликом префузије изолованог срца пацова средњом дозом етилендиамин-дихлоридо-платине(II) једино је дошло до значајног пораста у продукцији супероксид анјон радикала (**Табела 47 и 48, График 31**), све остале промене нису биле значајне.

Када се упореде ефекти средњих доза цисплатине и етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре, уочава се доста блажи ефекат етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре, нарочито на систолни притисак и срчану фреквенцу. Сличан тренд се уочава и код ефеката на оксидациони стрес (**График 44 и 45, Табела 68 и 69**). Цисплатина доводи до већег пораста у продукцији супероксид анјон радикала, као и до већег снижења вредности NO-а. Сходно томе да су при овој дози забележене кардиодинамске промене код цисплатине иреверзибилног карактера, док је код етилендиамин-дихлоридо-платине(II) супротно може се претпоставити да је дошло до настанка пероксинитрита код перфузије цисплатином који је и условио настанак иреверзибилних промена. Док, са друге стране након перфузије етилендиамин-дихлоридо-платином(II) долази само до пораста нивоа супероксид анјон радикала који може условити иреверзибилне промене само срчане фреквенце.

Поређењем ефеката најнижих доза етилендиамин-дихлоридо-платине(II) и цисплатине уочава се значајна разлика, при чему цисплатина у поменутој дози има негативнији ефекат на функцију миокарда, тј. значајније доводи до снижења срчане фреквенце, а поред тога утиче и на систолни притисак (**График 24 и 25, Табела 36 и 37**). Примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) у дози од 10^{-7} М није довела до значајног повећања у продукцији реактивних кисеоничних врста, већ насупротив довела је до снижења њихових вредности (**Табела 49 и 50, График 32**).

Слабији депресивни ефекат етилендиамин-дихлоридо-платине(II) на контрактилност миокарда у односу на цисплатину може се објаснити смањеним

потенцијалом овог комплекса да доведе до повећане продукције слободних радикала. Разлог томе може бити то што реактивност комплекса зависи од његових неодлазећих лиганда, а овај комплекс има супституисани амино лиганд који је мање реактиван у односу на несупституисане амино лиганде присутне у цисплатини. *Summa* и сарадници су у кинетичким истраживањима двовалентних комплекса платине показали да способност комплекса да ступају у интеракцију са биомолекулима опада када су амино лиганди супституисани (37). Реакције хидролизе етилендиамин-дихлоридо-платине(II) су спорије у односу на цисплатину, а самим тим овај комплекс спорије ступа у интеракцију са биомолекулима, што може да објасни повољније ефекте, тј. мањи утцај на настанак оксидационог стреса у односу на молекул цисплатине у све три примењене дозе. Такође, услед смањене интеракције са аминокиселинама, на првом месту са цистеином, који представља везивно место цисплатине на субјединици Na-K-АТФ-азе може да се објасни потенцијално слабији инхибиторни ефекат овог комплекса на пумпу, а самим тим и повољнији ефекат на контрактилност миокарда, на првом месту мањи утцај на срчану фреквенцу (211).

Хистопатолошким анализом код примене све три дозе етилендиамин-дихлоридо-платине(II) се уочава генерално очуван облик ћелија са јасно дефинисаним границама ћелија, једра су комплетно очувана и правилно позиционирана, а миофибриле су очуване (Слика 18, 26 и 34). Такође, ендотела је очуван дуж целог зида артериола, капиларних мрежа и капиларних петљи (Слика 20, 30, 31, 36 и 37). Међутим, постоји фокална оштећеност ендокардног ендотела код срца третираних највишом дозом етилендиамин-дихлоридо-платине(II) (Слика 21). На свим осталим пресецима, код примене нижих доза налаз је комплетно *cd31* позитиван, тј. уочава се очуваност крвних судова на нивоу ендокарда.

Осим тога, фокално се уочавају и друге промене као што су вакуолизација ћелијских органела (Слика 19, 28, 29 и 35), која је била присутна и у све три групе третиране цисплатином. Сматра се да овај феномен настаје услед поремећаја аеробне респирације ћелије, што условљава поремећај Na/K пумпе која је зависна од АТФ-а (232, 233).

Још један од доказа да постоји оштећење аеробне респирације је и смањен број митохондрија који се уочава на попречним пресецима препарата срца третираних дозама 10^{-5} М и 10^{-6} М (Слика 24 и 32). До смањења броја митохондрија вероватно долази због повећаног стварања супероксид анјон радикала које је забележено у овим групама (Табела 45-48, Графици 30 и 31). Са друге стране код групе третране

најнижом дозом овог комплекса не постоји повећана продукција супероксид анјон радикала (Табела 49 и 50, График 32) па тако постоји и очуваност митохондрија (Слика 39).

При примени овог комплекса у дозама од 10^{-5} М и 10^{-6} М уочава се и екстравазација тј. изливање еритроцита (Слика 23 и 27) која није уочена код примене цисплатине, као ни при примени најниже дозе овог комплекса.

Слично као и код примене цисплатине присутна је раздвојеност, тј. дилатација интерстицијалног ткива и дискретан интерстицијални едем (Слика 23, 28) код примене највише и средње дозе етилендиамин-дихлоридо-платине(II). Појава ових интерстицијалних едема може објаснити настанак кардиодепресивног дејства услед перфузије са етилендиамин-дихлоридо-платином(II). Ове две дозе управо и доводе до смањења вредности минималне и максималне стопе промене притиска у левој комори (Табела 8-11, График 5 и 6).

5.3. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ 1,2-ДИАМИНО-ЦИКЛОХЕКСАН-ДИХЛОРИДО-ПЛАТИНЕ(II) НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА

1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платина(II) је коришћена за истраживање јер хидролизом овог комплекса *in vivo* настаје аква комплекс који је по структури идентичан онима који настају хидролизом оксалиплатине и ормаплатине (**Схема 6**). Оксалиплатина представља платински комплекс треће генерације, за који је показано да је активна код тумора који су резистентни на цисплатину и да има потпуно другачији профил нежељених дејстава (16, 238-240). Комплекси платине са диаминоциклохексанским лигандом су показали мањи степен појаве нефротоскичности од цисплатине (214, 243) као и мањи степен појаве Омијелотоксичности од карбоплатине (244, 245). Због мање појаве нежељених дејстава услед примене комплекса са диаминоциклохексанским лигандом у односу на цисплатину и карбоплатину, овај комплекс је предмет нашег истраживања.

Акутна апликација комплекса 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у све три примењене дозе (10^{-5} М, 10^{-6} М и 10^{-7} М) је довела до статистички значајних промена кардиодинамских параметара (**Табела 15-20, График 9-11**).

Примена највише дозе 10^{-5} М је значајно утицала на смањење минималне стопе промене притиска у левој комори након тридесет минута перфузије за око 5%. Након периода опоравка вредности овог параметра су се и даље смањивале, тако да је укупно смањење у односу на почетне вредности износило чак 14% (**Табела 15 и 16, График 9**).

Уз то примена овог комплекса је, такође, утицала на смењење срчане фреквенце и то већ након петнаест минута перфузије. Даља перфузија комплексом у овој дози је довела до додатног снижења срчане фреквенце, тако да је укупан пад након престанка примене комплекса износио чак 11%. У периоду опоравка није дошло до значајних промена у вредностима овог параметра (**Табела 15 и 16, График 9**).

Примена високе дозе овог комплекса је значајно утицала и на коронарни проток при чему је он након тридесет минута перфузије порастао за готово 8%, што није забележено у другим групама. Након престанка примене комплекса у периоду опоравка вредности протока су се смањиле али нису успеле да се врате на почетне вредности (**Табела 15 и 16, График 9**).

Примена највише дозе овог комплекса је довела и до снижења систолног (за 5% од почетних вредности на крају перфузије) и дијастолног притиска (за 11% од почетних вредности на крају перфузије), са престанком перфузије комплексом дошло је до даљег смањења вредности помеутих параметера, међутим те промене нису биле статистички значајне (**Табела 15 и 16, График 9**). Код примене највише дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) све забележене кардиодинамске промене су имале иреверзибилног карактера.

При примени дозе од 10^{-6} М је дошло до повећања максималне (за око 2%) и минималне (за око 7%) стопе промене притиска у левој комори након свега петнаест минута перфузије, међутим током даље перфузије комплексом као и у периоду опоравка ове вредности су падале, тако да је на крају експеримента забележен пад вредности ових параметра за око 9% односно 12% (**Табела 17 и 18, График 10**).

Утицај примене ове дозе комплекса на вредности срчане фреквенце био је готово идентичан као и код примене више дозе комплекса (**Табела 17 и 18, График 10**). Укупан пад срчане фреквенце након тридесет минута перфузије је износио чак 11% и ове вредности су се одржавале и након престанка перфузије комплексом до краја експеримента.

Примена ове дозе комплекса је условила смањење систолног и повећање дијастолног притиска и коронарног протока, међутим ове промене нису биле значајне (**Табела 17 и 18, График 10**).

За разлику од прве две дозе које су значајно утицале на срчану фреквенцу, најнижа доза од 10^{-7} М овог комплекса није значајно утицала на срчану фреквенцу (**Табела 19 и 20, График 11**).

Међутим, са друге стране је значајно утицала на систолни притисак који се након тридесет минута перфузије смањило за готово 15%, а након периода опоравка долази до додатног пада овог параметра за још 6% (**Табела 19 и 20, График 11**).

Осим промене ових параметара дошло је до снижења и минималне и максималне стопе промене притиска у левој комори након тридесет минута перфузије, при чему су се те вредности за максималну стопу промене притиска у левој комори одржале и у периоду опоравка, док су вредности за минималну стопу промене притиска наставиле да падају и након престанка примене комплекса (**Табела 19 и 20, График 11**). Сви описани ефекти настали услед перфузије изолованог срца најнижом дозом комплекса били су иреверзибилног карактера.

Поређењем ефеката које су различите дозе овог комплекса оствариле не уочава се значајна разлика између доза, осим ефеката највише и најниже дозе на систолни притисак, где постоји разлика у ефектима (**Табела 21, График 12**). Беоз обзира на примењену дозу 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) долази до значајног утицаја на контрактилност миокарда (смањење минималне и максималне стопе промене притиска у левој комори). Док са друге стране утицај овог комплекса на систолни притисак је обрнуто пропорционалан примењеној дози, тачније при вишим примењеним дозама утицај комплекса није у тој мери значајан као при примени најниже дозе. Такође, супротно томе до значајног снижења срчане фреквенце долази услед примене виших доза овог комплекса, док примена најниже дозе није значајно утицала на овај параметар.

Примена највише дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) није довела до значајног утицаја на продукцију слободних радикала и последичног оксидационог стреса. Док су примена средње и најниже дозе довеле до врло значајног пораста у продукцији супероксид анјон радикала, а уз то је примена средње дозе довела и до пораста у продукцији водоник пероксида (**Табела 52-57, График 34-36**).

Узимајући у обзир резултате истраживања *Wojnarowski* и сарадника који су показали да се оксалиплатина везује два до шест пута мање за молекулу ДНК у односу на цисплатину примењену у еквимоларној концентрацији потенцијално се може објаснити мањи афинитет 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) за протеинске молекуле, а самим тим и мањи потенцијал за индукцију оксидационог стреса (246). Објашњење за слабији афинитет везивања оксалиплатине лежи у различитом начину везивања за гуанин и аденин у молекулу ДНК (247, 248). Због волуминознијег неодлазећег лиганда долази до споријег везивања, међутим везе које настају се тешко раскидају, па је тако и инхибиција репликације молекула ДНК доста ефикаснија (249, 250).

Сходно претходно наведеним чињеницама о ограниченој способности оксалиплатине, а самим тим и 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II), да се веже за молекулу ДНК, може се претпоставити да генерално овај комплекс има и смањену могућност неспецифичног везивања *in vivo* за протеине. У прилог овоме говоре и кинетичке студије које су показале да увођењем циклохексанског прстена који има позитивни индуктивни ефекат, метални центар у комплексу постаје мање електрофилан, што условљава смањењу реактивности са биогеним молекулима (37, 39). Поређећи ефекте овог комплекса са ефектима цисплатине на срчану фреквенцу при све

три примењене дозе може се закључити да 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платина(II) доводи до блажег снижења овог параметра. Ово може бити објашњено кроз смањен степен везивања за аминокиселине у Na-K-АТФ-ази а самим тим и слабијег утицаја на хомеостазу калцијума која је кључна за одржавање срчане фреквенце.

Хистопатолошком анализом попречних пресека миокарда пацова акутно перфунованих 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платином(II) у све три дозе уочава се очувано срчано мишићно ткиво, уобичајене грађе. Срчане мишићне ћелије су регуларне морфологије, са правилним распоредом миофибрила и једним централно постављеним еухроматским једром. Крвни судови су правилне и очуване морфологије (Слика 43, 51 и 58), док је ендокардни ендотел делимично очуван (Слика 44, 52 и 59). Међутим, фокално се примећују одређене промене.

При примени највише дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) фокално се уочавају промене у структури мишићног ткива, при чему су границе одређених ћелија готово избрисане, присутна је некроза на нивоу појединих ћелија (Слика 41). Појава некрозе одређених ћелија може објаснити иреверзибилне промене у функцији миокарда које су забележене а које нису биле праћене појавом оксидационог стреса. Такође, у појединим ћелијама се уочава феномен „*contraction bend necrosis*“ који потврђује постојање промена у контрактилности миокарда (Слика 42). Слично као и при примени цисплатине и у овој групи су присутни интерстицијални едем уз вакуолизацију ћелијских органела (Слика 45) и то вероватно митохондрија јер је уочен смањен број ових виталних органела (Слика 47). При примени ове дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) фокално се уочава и екстравазација еритроцита (Слика 46).

При примени средње дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) такође се фокално уочавају одређене промене у структури мишићног ткива: губитак ћелијских мембрана, кариопикноза, расутост цитоплазме, дисоциране контракције и вакуолизација ћелијских органела (Слика 49 и 50). Као и при примени више дозе и овде се уочава феномен „*contraction bend necrosis*“ (Слика 53), док су да друге стране код примене ове дозе митохондрије очуване (Слика 54).

При примени најниже дозе 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) фокално се као и при примени виших доза уочава феномен „*contraction bend necrosis*“, интерстицијални едем и вакуолизација ћелијских органела (Слике 56 и 57). За разлику од ефеката при примени највише дозе при примени најниже дозе долази до повећања броја митохондрија (Слика 62). Повећање броја митохондрија може

позитивно утицати на срчану фреквенцу, због већег стварања АТР-а имамо и очуваност срчане фреквенце у овој групи (**Табела 19, 20 и График 11**).

Di Cesare Manneli и сарадници су у својим истраживањима показали да код примене оксалиплатине у терапији тумора оксидациони стрес има врло значајну улогу у развоју неуропатског бола и неуротоксичности као и да примена молекула са антиоксидационим потенцијалом може да превенира ове ефекте (251, 252). Они су у истраживањима показали да је хронична примена оксалиплатине довела до повећања индекса липидне пероксидације у хомогенизованом ткиву. Резултати нашег истраживања на изолованом срцу нису показали повећање индекса липидне пероксидације, већ насупротив благо смањење. На основу ових резултата бисмо могли да претпоставимо да комплекси са *dach* лигандом имају повољнији ефекат на кардиоваскуларни у односу на централни нервни систем.

Поређењем ефеката цисплатине и 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на кардиодинамске параметре уочава се повољнији ефекат 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на коронарни проток и срчану фреквенцу при највишој примењеној дози (**Табела 31 и График 19**). При примени осталих доза такође постоје разлике у вредностима срчане фреквенце и коронарног протока између ова два комплекса, међутим присутне су разлике и у вредностима ових параметара при контролним условима, тако да не можемо са сигурношћу тврдити да уочене разлике потичу од перфузије комплекса (**Табела 34, 37 и График 22, 25**). Поређењем ефеката цисплатине и 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на остале кардиодинамске параметре спорадично се уочавају разлике, међутим у највећем броју случајева постоје разлике у вредностима посматраних параметара у контролним условима, тако да не можемо тврдити да сами ефекти потичу искључиво од примене различитих комплекса (**Табела 29, 30, 32, 33, 35, 36 и График 17, 18, 20, 21, 23, 24**).

Поређењем ефеката цисплатине и 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) на параметре оксидационог стреса при примени највише дозе уочава се значајна разлика у продукцији свих мерених биомаркера оксидационог стреса, с тим што се базалне вредности индекса липидне пероксидације између група разликују, те се описане промене не могу са сигурношћу приписати примени одређене дозе комплекса. Примена цисплатине је довела до већег пораста у продукцији супероксид анјон радикала и смањења азот монооксида, док је примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) довела до веће продукције водоник пероксида (**Табела 66 и 67, График 42 и 43**). Код примене средњих и најнижих доза ових комплекса базалне

вредности супероксид анјон радикала, водоник пероксида и индекса липидне пероксидације у групама су се разликовале, тако да све остале разлике током перфузије не можемо разматрати као значајне (**Табела 68-71, График 44-47**).

На основу ових резултата може се закључити да је примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у све три дозе довела до мањег оштећења миокарда у односу на примену цисплатине у истим дозама.

5.4. ЕФЕКТИ АКУТНЕ АПЛИКАЦИЈЕ 2,2':6',2''-ТЕРПИРИДИН-ХЛОРИДО-ПЛАТИНА(II)ХЛОРИДА НА ИЗОЛОВАНО СРЦЕ ПАЦОВА

Као што је већ напоменуто 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорид се од цисплатине разликује у стабилном, неодлазећем лиганду. Увођењем терпиридинског лиганда у координациону сферу платине повећава се реактивност комплекса. До повећане реактивности комплекса долази услед комуникације електрона између пиридинских прстенова и централног металног јона, па се тако повећава могућност интеракције комплекса са биогеним молекулима (41, 52).

Акутна апликација комплекса 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у све три примењене дозе (10^{-5}M , 10^{-6}M и 10^{-7}M) је довела до статистички значајних промена кардиодинамских параметара (**Табела 22-27, График 13-15**).

Примена највише дозе 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида је довела до драматичног снижења готово свих кардиодинамских параметара и коронарног протока већ након петнаест минута перфузије. Максимална и минимална стопа промене притиска у левој комори су се након тридесет минута перфузије смањили за 50% односно 63% од почетних вредности (**Табела 22 и 23, График 13**). Након периода опоравка ове вредности су се додатно смањиле на 63% односно 69% што говори о потпуно иреверзибилним променама функције миокарда. Осим ових вредности и вредности систолног притиска су се драстично смањиле већ након петнаест минута перфузије за чак 18%, даља перфузија комплексом је довела до још већег снижења овог параметра за чак 52% (**Табела 22 и 23, График 13**). Након периода опоравка није дошло до даљег пада вредности систолног притиска. Коронарни проток се након петнаест минута перфузије смањило за око 26%, а даља перфузија је довела до још веће опструкције тако да су се вредности коронарног протока смањиле за чак 56%. Током периода опоравка дошло је до даљег пада вредности овог параметра (**Табела 22 и 23, График 13**). Као што се може и приметити све настале промене у кардиодинамским параметрима и коронарном протоку биле су иреверзибилног карактера, након периода опоравка готово сви параметри су даље падали, а ни један од посматраних параметара није показао тенденцију раста. У претходним групама вредности срчане фреквенце су значајно опадале током перфузије, што код примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у дози од 10^{-5}M није био случај

(Табела 22 и 23, График 13). Још интересантнија чињеница је да након престанка перфузије комплексом у периоду опоравка долази до драстичног пада у срчаној фреквенци.

Резултати оксидационог стреса добијени анализом прикупљеног коронарног венског ефлуента не корелирају са резултатима кардиодинамских параметара, већ насупротив долази до значајног пада у вредности ових параметара (Табела 59 и 60, График 38). На основу ових резултата могло би се закључити да у случају примене 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у дози од 10^{-5} М негативни ефекти на кардиодинамику изолованог срца не настају под утицајем дејства слободних радикала.

Анализирајући хистопатолошке резултате попречних пресека миокарда пацова третираних поменутом дозом испитиваног комплекса у глобалу се уочава очуваност кардиомиоцита, док се субендокардно уочава феномен који није забележен у другим групама, формирање хијалиних микротромба односно појава стаза које воде ка исхемији миокарда, као и поља некрозе (Слика 67, 70 и 71). На основу ових хистопатолошких резултата може се претпоставити да оксидациони стрес не игра значајну улогу у оштећењу функције миокарда баш због настанка исхемије и некрозе. Врло кратка, акутна апликација ове дозе комплекса јако брзо доводи до структурних промена ткива миокарда што не оставља простор за развој оксидационог стреса. Такође, митохондрије су у глобалу очуване (Слика 71) што говори у прилог чињеници да оксидациони стрес нема значајну улогу у насталим депресивним ефектима на функцију миокарда. Остали резултати добијени хистопатолошком анализом ове групе су доста слични и претходно описаним групама, појава карипикнозе једара и вакуолизација ћелијских органела уз очуваност митохондрија (Слика 66). Крвни судови, капиларне мреже и ендокардни ендотел су у потпуности очувани (Слика 68 и 69).

Апликација средње дозе испитиваног комплекса је довела до значајног пада минималне стопе промене притиска у левој комори након тридесет минута за око 18%, овај пад је био праћен и падом максималне стопе промене притиска који није био у тој мери значајан (Табела 24 и 25, График 14). У периоду опоравка дошло је до даљег пада ових параметара. Такође примена ове дозе комплекса је довела и до значајног пада у вредностима систолног притиска за око 12% који је настављен и у периоду опоравка 17% (Табела 24 и 25, График 14). Ови резултати указују на иреверзибилне промене у функцији миокарда. Слично као и при примени више дозе сама примена

комплекса није условила значајан пад у вредностима срчане фреквенце, међутим након завршене апликације комплекса у периоду оправка долази до значајног пада срчане фреквенце за око 11% (Табела 24 и 25, График 14). Уочено је смањење и у вредностима коронарног протока, међутим регистроване промене нису биле статистички значајне.

Као и код примене више дозе тако и код примене средње дозе примена овог комплекса је довела до пада у ослобађању мерених слободних радикала, мада овај пад није био толико значајан (Табеле 61 и 62, График 39). На поречним пресецима миокарда се генерално уочава очуваност мишићног ткива. Срчане мишићне ћелије су регуларне морфологије са очуваним обликом, јасно дефинисаним границама. Миофибриле имају правилан распоред што дефинише очуваност контрактилног апарата срца. Ћелије поседују једно централно постављено, овално, еухроматско једро (Слика 74). Такође се уочава очуваност артериола и капиларне мреже (Слика 80), као и очуваност ендотела у коморама (Слика 81). Фокално се као и у другим групама уочавају промене и то: интерстицијални едем, вакуолизација органела (Слика 75), кариопикноза једара и кондензација цитоплазме (Слика 76).

Примена најниже дозе овог комплекса је условила значајно смањење само вредности систолног притиска и то за око 12% (Табела 26 и 27, График 15). А уз то је довела до повећане продукције супероксид анјон радикала (Табела 63 и 64, График 40) која није забележена при примени виших доза. Може се приметити да само при примени најниже дозе долази до повећане продукције слободних радикала, што говори у прилог чињеници да је један од механизма кардиотоксичног дејства и овог комплекса као и свих осталих испитиваних комплекса повећана продукција слободних радикала, али да је она зависна од примењене дозе. И у овој групи је забележена појава стаза (Слика 84) као и при примени највише дозе, која је карактеристична само за примену овог комплекса која означава појаву оштећења микроциркулације и хемостазе (253). Поред појава стаза, примећени су и вакуолизација ћелија, кондензација цитоплазме у ћелијама субендокардно тј. ка лумену комора (Слика 82 и 83), феномен „*contraction band necrosis*“ као и дисоцирана контрактилност (Слика 85).

Поређењем ефеката различитих доза уочава се значјна разлика у вредностима максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног притиска и коронарног протока у групи третираној дозом од 10^{-5} М у односу на преостале две групе (Табела 28, График 16). Док, са друге стране нису уочене разлике између група третираних другим двама дозама (Табела 28, График 16). Ове резултати указују на то

да не можемо говорити о дозно зависним ефектима, али свакако можемо тврдити да доза од 10^{-5} М изазива значајни депресивни ефекат на функцију миокарда и коронарну циркулацију.

Поређењем ефеката различитих доза уочава се значајна разлика у вредностима свих измерених параметара оксидационог стреса између највише и осталих примењених доза. Док између средње и најниже примењене дозе није било значајних разлика у ефектима на продукцију оксидационог стреса (**Табела 65 и График 41**).

Примена 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида у дози од 10^{-5} М је довела до значајније већег смањења свих посматраних кардиодинамских параметара, осим срчане фреквенце, као и коронарног протока у односу на цисплатину (**Табела 29-31 и График 17-19**). Док, са друге стране поређењем ефеката преостале две дозе ова не уочава се значајна разлика у ефектима ова два комплекса на кардиодинамске параметре и коронарни проток (**Табела 32-34, 35-37 и График 20-22 и 23-25**). Ова два комплекса су при примени у највишој дози такође показали значајне разлике у свим посматраним параметрима оксидационог стреса (**Табела 66 и 67, График 42 и 43**). Цисплатина је довела до значајно веће продукције слободних радикала у односу на исту дозу 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида. Сличан тренд у продукцији слободних радикала је уочен и при примени средње дозе ова два комплекса (**Табела 68 и 69 и График 44 и 45**). Поређење измерених вредности слободних радикала при примени најниже дозе такође се уочавају значајне разлике, међутим разлике постоје и у вредностима ових реактивних врста и у контролним условима, тако да не можемо са сигурношћу да разлику у ефекту припишемо примени различитих комплекса (**Табела 70 и 71 и График 46 и 47**).

Сходно томе да је овај комплекс по својој структури другачији од свих осталих комплекса који се тренутно налазе у клиничкој пракси и чија је токсичност до сада генерално испитивана на анималном моделу сам механизам токсичности је непознат. На основу добијених резултата може се претпоставити да при вишим дозама оксидациони стрес нема значајну улогу у токсичности, али да потенцијално долази до некрозе ћелија миокарда која је показана хистопатолошким налазима. При нижим дозама овај комплекс се понаша слично као и остали примењени комплекси.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата овог истраживања и њиховог поређења са резултатима других аутора може се закључити следеће:

1. Резултати примене све три дозе цисплатине на кардиодинамске параметре указују да долази до оштећења функције изолованог срца, где су највише погођени срчана фреквенца и систолни притисак. Све забележене промене функције миокарда имају иреверзибилни карактер, без обзира на примењену дозу цисплатине. На основу биохемијских анализа може се претпоставити да индукција оксидационог стреса може бити један од механизма којим цисплатина доводи до оштећења функције миокарда. Хистопатолошким анализама утврђено је да перфузија цисплатином у трајању од тридесет минута не доводи до оштећења миокарда и коронарне циркулације. Миокард је у глобалу очуван, али су присутне фокалне промене у виду вакуолизације органела, асинхроне контракције и интерстицијалног едема.
2. На основу добијених резултата може се закључити да је примена етилендиамин-дихлоридо-платине(II) довела до мање продукције слободних радикала што је условило и настанак мањег оштећења структуре као и функције миокарда у односу на цисплатину нарочито при нижим дозама. Примена овог комплекса је само при највишим дозама иреверзибилно утицала на промену кардиодинамских параметара и коронарног протока. При нижим дозама овај комплекс утиче само на срчану фреквенцу и то реверзибилно. Хистопатолошким анализама утврђено је да перфузија етилендиамин-дихлоридо-платином(II) у трајању од тридесет минута не доводи до оштећења миокарда и коронарне циркулације. Фокално се уочавају промене у виду вакуолизације ћелија и екстравазације еритроцита.
3. На основу ових резултата може се закључити да је примена 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платине(II) у све три дозе довела до мањег оштећења миокарда у односу на примену цисплатине у истим дозама. Док са друге стране, овај комплекс је довео до лошијег ефекта на кардиодинамске параметре у поређењу са етилендиамин-дихлоридо-платином(II) при нижим дозама. 1,2-диамино-циклохексан-дихлоридо-платина(II) при свим примењеним дозама значајно утиче на максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори, док само више дозе утичу на смањење срчане фреквенце, а пак само најнижа доза на смањење систолног притиска. Као и у претходно описаним

групама тако и у овој хистопатолоким анализама уочене су само фокалне промене (вакуолизација органела, екстравазација еритроцита, интерстицијални едем) док су миокард и крвни судови у глобалу очувани.

4. На основу добијених резултата може се претпоставити да при вишим дозама 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида оксидациони стрес нема значајну улогу у токсичности, али да потенцијално долази до некрозе ћелија миокарда која је показана хистопатолошки. Највиша доза овог комплекса је довела до најнеповољнијег утицаја на кардиодинамске параметре и коронарни проток у поређењу са свим осталим комплексима. Све промене које настају при примени ове дозе 2,2':6',2''-терпиридин-хлоридо-платина(II)хлорида имају иреверзибилни карактер. Примена средње и најниже дозе је довела до мање неповољних утицаја на кардиодинамске параметре, при чему је најнижа доза једина довела до повећане продукције слободних радикала. Хистопатолошком анализом једино је у овој групи показана некроза ћелија, као и присуство хијалилних микротромба који изазивају настанак стаза.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev.* 2007; 33: 542–64.
2. Lippert B. (Ed.), *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, VCHA & Wiley-VCH, Zurich, 1999.
3. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965; 205:698-9.
4. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969; 222:385-6.
5. Kociba RJ, Sleight SD, Rosenberg B. Inhibition of Dunning asc itic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother Rep.* 1970; 54:325-8.
6. Higby DJ, Wallace HJ, Albert D, Holland JF. Diamminodichloroplatinum in the chemotherapy of testicular tumors. *J Urol.* 1974; 112:100-4.
7. Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in *Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Lippert, B. Ed.; Wiley-VCH: New York, 1999:1-27.
8. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs.* 1993; 46:360-77.
9. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 2007; 9-23
10. Goren MP, Wright RK, Horowitz ME. Cumulative renal tubular damage associated with cisplatin nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986; 18: 69-73.
11. Alberts DS, Noel JK. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs.* 1995; 6: 369-83.
12. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 219: 177-86.
13. Schimmel KJM, Richel DJ, Van Den Brink RBA, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews.* 2004; 181-91.
14. Kerpel-Fronius S. Cisplatin and its Analogues for Cancer Chemoterapy in Analogue-based Drug Discovery. IUPAC, Fisher J and Ganellin CR (Eds.) Wiley-VCH: Weinheim: 385-93.
15. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1993; 15: 191-219.

16. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M et al. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52: 1855-65.
17. Lebowitz D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998; 34: 1522-34.
18. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999; 99: 2451-66.
19. Gietema JA, Veldhuis GJ, Guchelaar HJ et al. Phase II and pharmacokinetic study of lobaplatin in patients with relapsed ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1995; 71: 1302-7.
20. Degardin M, Armand JP, Chevallier B et al. A clinical screening cooperative group phase II evaluation of lobaplatin (ASTAD-19466) in advanced head and neck cancer. *Invest New Drugs.* 1995; 13: 253-5.
21. Burchenal JH, Kalaher K, Dew K, Lokys L. Rationale for development of platinum analogs. *Cancer Treat Rep.* 1979; 63: 1493-8.
22. Khokhar AR, al-Baker S, Krakoff IH, Perez-Soler R. Toxicity and antitumor activity of cis-bis-carboxylato(trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) complexes entrapped in liposomes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 23: 219-24.
23. Perez RP, Perez KM, Handel LM, Hamilton TC. In vitro interactions between platinum analogues in human ovarian-carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992; 29: 430-4.
24. Kidani Y, Inagaki K, Iigo M, Hoshi A, Kuretani K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. *J Med Chem.* 1978; 21: 1315-8.
25. Evans, B. D., et al. Phase II study of JM8, a new platinum analog, in advanced ovarian carcinoma. *Cancer treatment reports* 1983; 997-1000.
26. Reedijk, Jan, et al. Platinum amine coordination compounds as anti-tumor drugs. Molecular aspects of the mechanism of action. Springer Berlin Heidelberg. 1987; 53-89.
27. Lippard SJ. Metals in Medicine u Bioneorganskoj hemiji. Mill City: University Science Books, 1994. p. 505-83.
28. Braddock PD, Connors TA, Jones M, Khokhar AR, Melzack DH, Tobe ML. Structure and activity relationships of platinum complexes with anti-tumour activity. *Chem Biol Interact.* 1975; 11(3):145-61.

29. Miller SE, House DA. The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) 5. The anation kinetics of *cis*-Pt(X)(NH₃)₂(OH₂)⁺ (XCl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorg. Chim Acta*. 1991; 187(2):125-32.
30. Cornelis G. Van Kralingen, Jan Reedijk, Anthony L. Spek. Synthesis and characterization of antitumor-active platinum 2,2-dimethyl-1,3-diaminopropane compounds. Crystal and molecular structure of (malonato)(2,2-dimethyl-1,3-diaminopropane)platinum(II). *Inorg. Chem.*, 1980, 19 (6), pp 1481–1485
31. Bugarčić ŽD, Bogojeski J, Petrović B, Hochreuther S, van Eldik R. Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans.* 2012; 41(40):12329-45.
32. Reedijk J. The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds *Inorganica Chimica Acta*, 1992; (198-200):873-881
33. Howe-Grant ME and Lippard SJ: Aqueous platinum(II) chemistry: Binding to biological macromolecules. In: *Metal ions in biological systems*, Volume 11. Siegel H (ed.) New York, Marcel Dekker 1980; 63-125.
34. I. Gal y Mehanizmi Neorganskih Reakcija, Naučna knjiga, 1979, поглавље 2 и 3.
35. J. H. Espenson y Chemical Kinetics and Reaction Mechanism, Друго издање, McGraw Hill, New York.1995, поглавље 2 и 6.
36. Ž. D. Bugarčić u Kinetika i Mehanizam Supsticionih Reakcija, PMF Kragujevac, 1996; 12-32.
37. Summa N, Schiessl W, Puchta R, van Eikema Hommes N, van Eldik R. Thermodynamic and kinetic studies on reactions of Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles. *Inorg Chem.* 2006; 45(7):2948-59.
38. Bogojeski J, Bugarčić ŽD, Puchta R, Eldik R. Kinetic Studies on the Reactions of Different Bifunctional Platinum(II) Complexes with Selected Nucleophiles. *Eur JIC.* 2010; 2010(34):5439-45.
39. Hofmann A, Jaganyi D, Munro OQ, Liehr G, van Eldik R. Electronic tuning of the lability of Pt(II) complexes through pi-acceptor effects. Correlations between thermodynamic, kinetic, and theoretical parameters. *Inorg Chem.* 2003; 42(5):1688-700.
40. Hofmann A, Dahlenburg L, van Eldik R. Cyclometalated analogues of platinum terpyridine complexes: kinetic study of the strong sigma-donor cis and trans effects of carbon in the presence of a pi-acceptor ligand backbone. *Inorg Chem.* 2003; 42(20):6528-38.

41. Jaganyi D, Hofmann A, van Eldik R. Controlling the Lability of Square-Planar Pt(II) Complexes through Electronic Communication between pi-Acceptor Ligands This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Fonds der Chemischen Industrie, and the Alexander von Humboldt Foundation (fellowship to D.J.). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001; 40(9):1680-1683.
42. Petrovic BV, Djuran MI, Bugarcic ZD. Binding of Platinum(II) to Some Biologically Important Thiols. *Met Based Drugs.* 1999; 6(6):355-60.
43. Annibale G, Bergamini P, Bertolasi V et al. Platinum assisted cyclization of S-methyl 3-acyl-2-methyldithiocarbazates under mild conditions. Crystal structure of $[\text{Pt}_2(\mu\text{-SMe})(\text{terpy})_2][\text{ClO}_4]_3$. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1999:3877-82.
44. Cusumano M, Di Pietro ML, Giannetto A, Vainiglia PA. The intercalation to DNA of bipyridyl complexes of platinum(II) with thioureas. *J Inorg Biochem.* 2005; 99(2):560-5.
45. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001; 59(4):657-63.
46. Judson I, Kelland LR. New developments and approaches in the platinum arena. *Drugs.* 2000;59:4:29-38
47. Mann SC, Andrews PA, Howell SB. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1991; 48(6):866-72.
48. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(22):14298-302.
49. Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(4):817-23.
50. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* 2000; 60(5):1312-6.
51. Miyashita H, Nitta Y, Mori S, Kanzaki A, Nakayama K, Terada K, Sugiyama T, Kawamura H, Sato A, Morikawa H, Motegi K, Takebayashi Y. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance

- marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin. *Oral Oncol.* 2003; 39(2):157-62.
52. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer.* 2002; 101(5):488-95.
53. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer.* 1993; 67(6):1171-6.
54. Sherman SE, Lippard SJ. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem. Rev.* 1987;87(5):1153–1181
55. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9):2467-98.
56. Yang XL, Wang AH. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(3):181-215.
57. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry.* 1985; 24(3):707-13.
58. Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl](²⁺)-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(25):5846-51.
59. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3):645-62.
60. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res.* 2001; 478(1-2):1-21.
61. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4):307-20.
62. Wozniak K, Błasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol.* 2002;49(3):583-96.
63. Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev.* 1998; 12(4):462-72.

64. Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, Kohno K. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem*. 2001; 276(10):7534-40.
65. Yuan F, Gu L, Guo S, Wang C, Li GM. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem*. 2004; 279(20):20935-40.
66. Perez JM, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000; 35(2):109-20.
67. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002; 2(4):539-51.
68. Akaboshi M, Kawai K, Ujeno Y, Takada S, Miyahara T. Binding characteristics of (-)-(R)-2-aminomethylpyrrolidine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-2-platinum(II) to DNA, RNA and protein molecules in HeLa cells and its lethal effect: comparison with cis- and trans-diamminedichloroplatinums(II). *Jpn J Cancer Res*. 1994; 85(1):106-11.
69. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(8-9):1229-35.
70. Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer*. 1998; 34(10):1535-42.
71. Reedijk J. Why does Cisplatin reach Guanine-N7 with competing s-donor ligands available in the cell? *Chem Rev*. 1999; 99(9):2499-510.
72. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004; 31(12):862-7.
73. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010; 40(4):347-59.
74. Desoize B. Cancer and metals and metal compounds: part II--cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 42(3):213-5.
75. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*. 2007; 96(9):2181-96.
76. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species

- in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 16(11):1295-322.
77. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002; 192(1):1-15.
78. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997; 414(3):552-6.
79. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(7):1161-72.
80. Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(7):1053-73.
81. Aggarwal SK. Calcium modulation of toxicities due to Cisplatin. *Met Based Drugs.* 1998; 5(2):77-81.
82. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12(12):2478-80.
83. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003; 23(5):460-4.
84. Fillastre JP, Raguenez-Viotte G. Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 1989; 46(1-3):163-75.
85. Daugaard G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Dan Med Bull.* 1990 Feb;37(1):1-12.
86. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 1996; 270:700-8.
87. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(1):65-72.
88. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004; 50(3):287-90.
89. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(12):2683-90.

90. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23(1):29-34.
91. Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. Role of poly(ADP-ribose)polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(8):966-77.
92. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*. 2005; 76(18):2125-35.
93. Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol*. 2002; 25(1):1-8.
94. Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol*. 2004; 4:20.
95. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res*. 2003; 47(2):149-56
96. Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res*. 1996; 98(1-2):116-24.
97. Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol*. 2000; 21(4):513-20.
98. dos Santos NA, Martins NM, Curti C, Pires Bianchi Mde L, dos Santos AC. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chem Biol Interact*. 2007; 170(3):177-86.
99. Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B, Uz E, Ozyurt H. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health*. 2005; 21(3-4):67-73.
100. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol*. 2006; 39(6):656-61.
101. Iseri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*. 2007; 230(2-3):256-64.

102. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62(1):45-52.
103. Khan S, Chen CL, Brady MS, Parameswaran R, Moore R, Hassoun H, Carvajal RD. Unstable angina associated with cisplatin and carboplatin in a patient with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(18):e163-4.
104. Ryberg M. Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2012:555-9.
105. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53(24):2231-47.
106. Altena R, Hummel YM, Nuver J, Smit AJ, Lefrandt JD, de Boer RA, Voors AA, van den Berg MP, de Vries EG, Boezen HM, Gietema JA. Longitudinal changes in cardiac function after cisplatin-based chemotherapy for testicular cancer. *Ann Oncol.* 2011; 22(10):2286-93.
107. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2011; 650(1):335-41.
108. Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(4):460-5.
109. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther.* 2012; 6(3):147-56.
110. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 2000; 101(5):451-4.
111. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis.* 2002; 7(4):335-45.
112. Francescato HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology.* 2007; 230(1):64-75.
113. Wang RP, Yao Q, Xiao YB, Zhu SB, Yang L, Feng JM, Li DZ, Li XL, Wu JJ, Chen J. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in myocardial injury in a rat chronic stress model. *Stress.* 2011; 14(5):567-75.

114. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34(4):379-88.
115. Czaykowski PM, Moore MJ, Tannock IF. High risk of vascular events in patients with urothelial transitional cell carcinoma treated with cisplatin based chemotherapy. *J Urol* 1998; 160:2021-4.
116. Icli F, Karaoğuz H, Dinçol D, Demirkazik A, Günel N, Karaoğuz R, Uner A. Severe vascular toxicity associated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer.* 1993; 72(2):587-93.
117. Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW Jr. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol.* 2001; 19(4):1195-206.
118. Zumkley H, Bertram HP, Preusser P, Kellinghaus H, Straub C, Vetter H. Renal excretion of magnesium and trace elements during cisplatin treatment. *Clin Nephrol.* 1982; 17(5):254-7.
119. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res.* 2006; 53(3):278-86.
120. Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, Hagerty KL, Somerfield MR, Vaughn DJ; ASCO Cancer Survivorship Expert Panel. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol.* 2007; 25(25):3991-4008.
121. Vaughn DJ, Palmer SC, Carver JR, Jacobs LA, Mohler ER. Cardiovascular risk in long-term survivors of testicular cancer. *Cancer.* 2008; 112(9):1949-53.
122. van den Belt-Dusebout AW, Nuver J, de Wit R, Gietema JA, ten Bokkel Huinink WW, Rodrigus PT, Schimmel EC, Aleman BM, van Leeuwen FE. Long-term risk of cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(3):467-75.
123. Peng B, Tilby MJ, English MW, Price L, Pearson AD, Boddy AV, Newell DR. Platinum-DNA adduct formation in leucocytes of children in relation to pharmacokinetics after cisplatin and carboplatin therapy. *Br J Cancer.* 1997; 76(11):1466-73.

124. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology*. 2009; 10(6):773-81.
125. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1):47-95.
126. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.* 1900; 22:757-71.
127. Michaelis L. Fredd radicals as intermediated steps of oxidation-reduction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol*. 1939; 7:33-49.
128. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954; 174(4432):689-91.
129. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954; 119(3097):623-6.
130. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.
131. Rossi F, Della Bianca V, de Togni P. Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1985; 8(2):187-204.
132. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789):373-6.
133. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 153(3):1251-6.
134. Tartaglia LA, Storz G, Ames BN. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J Mol Biol*. 1989; 210(4):709-19.
135. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(7):995-1014.
136. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994; 344(8924):721-4.
137. Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1992; 89(1):197-202.

138. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007; 12(5):913-22.
139. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(1):95-108
140. Dupuy C, Virion A, Ohayon R, Kaniewski J, Dème D, Pommier J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem*. 1991; 266(6):3739-43.
141. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012; 2012:736837.
142. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995; 18(2):321-36.
143. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(12):1921-42.
144. Waalkes MP, Liu J, Ward JM, Diwan BA. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology*. 2004; 198(1-3):31-8.
145. Monteiro HP, Bechara EJ, Abdalla DS. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem*. 1991; 103(1):73-83.
146. Reid TM, Feig DI, Loeb LA. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 Suppl 3:57-61.
147. McAndrew J, Patel RP, Jo H, Cornwell T, Lincoln T, Moellering D, White CR, Matalon S, Darley-Usmar V. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin Perinatol*. 1997; 21(5):351-66.
148. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2):109-42.
149. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science*. 1992; 258(5090):1862-5.
150. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*. 1991; 28(1-3):52-61.
151. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990; 30:535-60.

152. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry*. 1992; 31(29):6627-31.
153. McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BS. Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(23):11141-5.
154. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, Lumma WC, Botelho LH. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181(3):1392-7.
155. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(4):1620-4.
156. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 288(2):481-7.
157. Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J*. 1997; 322(1):167-73.
158. Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K. Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem*. 1995; 270(29):17355-60.
159. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:360438.
160. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984; 219(1):1-14.
161. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11(1):81-128.
162. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*. 1990; 238(3):223-33.
163. Pryor WA. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 1989; 7(2):177-8.

164. Fridovich SE, Porter NA. Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1981; 256(1):260-5.
165. Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol.* 2010; 84(4):255-62.
166. Repetto MG, Ossani G, Monserrat AJ, Boveris A. Oxidative damage: the biochemical mechanism of cellular injury and necrosis in choline deficiency. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(1):143-9.
167. Valdez LB, Zaobornyj T, Bombicino S, Iglesias DE, Boveris A, Donato M, D'Annunzio V, Buchholz B, Gelpi RJ. Complex I syndrome in myocardial stunning and the effect of adenosine. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(6):1203-12.
168. Mujović VM. (2012) *Medicinska Fiziologija-Textbook*, Izdavač: Fondacija "Solidarnost Srbije". Beograd, Srbija
169. Guyton AC, Hall JE. (2003) *Medicinska fiziologija (prevod desetog izdanja)*, Izdavač: Savremena administracija, Beograd, Srbija
170. Levy MN; Berne RM. (1997). *Cardiovascular physiology (7th ed.)*. St. Louis: Mosby.
171. Ganong W, Jakovljević V (glavni redaktor). (2015) *Pregled medicinske fiziologije XXIV izdanje*, Izdavač: Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac, Srbija
172. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1991; 69(5):1293-300.
173. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87(10):840-4.
174. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000; 90(1-3):19-25.
175. Li AE, Ito H, Rovira II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, Ferrans VJ, Finkel T. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res.* 1999; 85(4):304-10.
176. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993; 92(4):1866-74.

177. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(17):9114-9.
178. Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res*. 1998; 82(5):532-9.
179. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(8):1047-60.
180. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998; 32(3):488-95.
181. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992; 70(3):593-9.
182. Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4(5):845-54.
183. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett*. 1997; 404(2-3):249-52.
184. 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(11):2572-9.
185. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol*. 1999; 277(3): 978-85.
186. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 2000; 106(12):1521-30.
187. Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, Parra T, Griera M, López-Ongil S, Arilla E, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001; 59(1):104-12.
188. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf*. 2000; 22(4):263-302.

189. Berliner S, Rahima M, Sidi Y, Teplitsky Y, Zohar Y, Nussbaum B, Pinkhas J. Acute coronary events following cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Invest.* 1990; 8(6):583-6.
190. Hrovatin E, Viel E, Lestuzzi C, Tartuferi L, Zardo F, Brieda M, Dametto E, Piazza R, Antonini-Canterin F, Vaccher E, Meneguzzo N, Nicolosi GL. Severe ventricular dysrhythmias and silent ischemia during infusion of the antimetabolite 5-fluorouracil and cis-platin. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2006; 7(8):637-40.
191. Ozben B, Kurt R, Oflaz H, Sezer M, Basaran M, Goren T, Umman S. Acute anterior myocardial infarction after chemotherapy for testicular seminoma in a young patient. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2007; 13(4):439-42.
192. Raja W, Mir MH, Dar I, Banday MA, Ahmad I. Cisplatin induced paroxysmal supraventricular tachycardia. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2013; 34(4):330-2.
193. Yavas O, Aytemir K, Celik I. The prevalence of silent arrhythmia in patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Turk J Cancer.* 2008; 38(1):12-5.
194. Ozcan T, Cirit A, Kiykim A. Recurrent Complete Atrioventricular Block During Cisplatin Infusion: A case report. *J Clin Exp Cardiol.* 2011; 2(8):
195. Guglin M, Aljayeh M, Saiyad S, Ali R, Curtis AB. Introducing a new entity: chemotherapy-induced arrhythmia. *Europace.* 2009; 11(12):1579-86.
196. Bano N, Najam R, Qazi F. Adverse cardiac manifestations on cisplatin- a review. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013; 18:80-85.
197. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(5):688-95.
198. Amit L, Ben-Aharon I, Tichler T, Inbar E, Sulkes A, Stemmer S. Cisplatin-induced posterior reversible encephalopathy syndrome – a brief report and review of the literature. *J Behav Brain Sci.* 2012; 2:97-101.
199. Löw-Friedrich I, von Bredow F, Schoeppe W. In vitro studies on the cardiotoxicity of chemotherapeutics. *Chemotherapy.* 1990; 36(6):416-21.
200. Ferroni P, Della-Morte D, Palmirotta R, McClendon M, Testa G, Abete P, Rengo F, Rundek T, Guadagni F, Roselli M. Platinum-based compounds and risk for cardiovascular toxicity in the elderly: role of the antioxidants in chemoprevention. *Rejuvenation Res.* 2011; 14(3):293-308.
201. Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction

- by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280(2):638-49.
202. Nishikawa M, Nagatomi H, Nishijima M, Ohira G, Chang BJ, Sato E, Inoue M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. *Cancer Lett.* 2001; 171(2):133-8.
203. Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2009; 63(2):79-85.
204. Yin X, Apostolov EO, Shah SV, Wang X, Bogdanov KV, Buzder T, Stewart AG, Basnakian AG. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(9):2544-53.
205. Jiang M, Wang CY, Huang S, Yang T, Dong Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296(5):F983-93.
206. El-Sawalhi MM, Ahmed LA. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 2014; 207:58-66.
207. Wang J, He D, Zhang Q, Han Y, Jin S, Qi F. Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24(6):675-80.
208. Abdellatif SA, Galal AA, Farouk SM, Abdel-Daim MM. Ameliorative effect of parsley oil on cisplatin-induced hepato-cardiotoxicity: A biochemical, histopathological, and immunohistochemical study. *Biomed Pharmacother.* 2017; 86:482-491.
209. Oguzturk H, Ciftci O, Cetin A, Kaya K, Disli OM, Turtay MG, Gürbüz S, Basak N. Beneficial effects of hesperidin following cis-diamminedichloroplatinum-induced damage in heart of rats. *Niger J Clin Pract.* 2016; 19(1):99-103.
210. Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1988; 48:68-73
211. Huličiak M, Vacek J, Sebelá M, Orolinová E, Znaleziona J, Havlíková M, Kubala M. Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na(+)/K(+)-ATPase by binding to its cytoplasmic part. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83(11):1507-13.

212. Levi AJ. A role for sodium/calcium exchange in the action potential shortening caused by strophanthidin in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993; 7:471-481.
213. Ramirez RJ, Sah R, Liu J, Rose RA, Backx PH. Intracellular $[Na^+]$ modulates synergy between Na^+ /Ca^{2+} exchanger and L-type Ca^{2+} current in cardiac excitation-contraction coupling during action potentials. *Basic Res Cardiol* 2011; 106:967-977.
214. Fuller W, Eaton P, Bell JR, Shattock MJ. Ischemia-induced phosphorylation of phospholemman directly activates rat cardiac Na/K ATPase. *FASEB J* 2004; 18:197-199.
215. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JH, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie ZJ. Na^+ /Ca^{2+} exchange and Na^+ /K^+ -ATPase in the heart. *J Physiol.* 2015; 593(6):1361-82.
216. Pogwizd SM & Bers DM. Na/Ca exchange in heart failure: contractile dysfunction and arrhythmogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 976:454–465.
217. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM & Bers DM. Upregulation of Na^+ /Ca^{2+} exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res.* 1999; 85:1009–1019.
218. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther.* 2001; 89(1):29-46.
219. Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(5):190-8.
220. O'Rourke B, Cortassa S, Akar F, Aon M. Mitochondrial ion channels in cardiac function and dysfunction. *Novartis Found Symp.* 2007; 287:140-151.
221. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39(1):43-50.
222. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.* 2007; 81(10):779-93.
223. Herradón E, González C, Uranga JA, Abalo R, Martín MI, López-Miranda V. Characterization of Cardiovascular Alterations Induced by Different Chronic Cisplatin Treatments. *Front Pharmacol.* 2017; 8:196.

224. Pagliaro, P., Dalla Valle, R., Gattullo, D., Merletti, A., Marsh, N.A. The heart rate after inhibition of nitric oxide release in the anaesthetized dog. *General Pharmacology*. 1996; 27(4):695–699.
225. Saleh RM, Awadin WF, El-Shafei RA, Elseady YY, Wehais FE, Elshal MF. Cardioprotective role of tadalafil against cisplatin-induced cardiovascular damage in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 765:574–581.
226. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS and St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996; 98:1253–1260
227. Hasinoff BB. Chemistry of dexrazoxane and analogues. *Semin Oncol.* 1998; 25:3–9.
228. Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci.* 2010; 30(11):3933–46.
229. Li WG, Miller FJ Jr, Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem.* 2001; 276(31):29251–6.
230. Chowdhury S, Sinha K, Banerjee S, Sil PC. Taurine protects cisplatin induced cardiotoxicity by modulating inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Biofactors.* 2016; 42(6):647–664.
231. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294(1):396–401.
232. Li K, Sung RY, Huang WZ et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation.* 2006; 113(18):2211–20.
233. Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(51):E5537–44.
234. Davis KL, Mehlhorn U, Laine GA, Allen SJ. Myocardial edema, left ventricular function, and pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 1995; 78:132–137.
235. Pratt JW, Schertel ER, Schaefer SL, Esham KE, McClure DE, Heck CF, Myerowitz PD. Acute transient coronary sinus hypertension impairs left ventricular function and induces myocardial edema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1996; 271:H834–H841.

236. Charan NB, Ripley R, Carvalho P. Effect of increased coronary venous pressure on left ventricular function in sheep. *Respir Physiol.* 1998;112:227–235.
237. Elferink F, van der Vijgh WJ, ten Bokkel Huinink WW et al. Pharmacokinetics of ethylenediaminemalonatoplatinum(II) (JM-40) during phase I trial. *Br J Cancer.* 1987; 56(4):479-83.
238. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1205-18.
239. Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003; 7(4):481-9.
240. Kidani Y, Noji M, Tashiro T. Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers. *Gan.* 1980; 71(5):637-43.
241. Smith JH, Smith MA, Litterst CL, Copley MP, Uozumi J and Boyd MR: Comparative toxicity and renal distribution of the platinum analogs tetraplatin, CHIP, and cisplatin at equimolar doses in the Fischer 344 rat. *Fund Appl Toxicol* 1988; 152(10): 45-61,
242. Smith MA, Smith JH, Litterst CL, Copley MP, Uozumi J and Boyd MR: In vivo biochemical indices of nephrotoxicity of platinum analogs tetraplatin, CHIP, and cisplatin in the Fischer 344 rat. *Fund Appl Toxicol* 1988; 10:62-72.
243. Engineer MS, Ho D-HW, Khokhar AR, Newman RA and Bulger RE: A comparison of the effects of cisplatin and Nmethyliminodiacetato-(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) on renal function and gentamycin excretion in rats. *Toxicology* 1987; 47: 307-315.
244. Mathe G, Kidani Y, Triana K, Brienza S, Ribaud P, Goldschmidt E, Ecstein E, Despax R, Musset M and Misset J L: A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalatoplatinum (1- OHP). *Biomed Pharmacotherapy* 1986; 40:372-376.
245. Mathe G, Kidani Y, Segiguchi M, Eriguchi M, Fredj G, Peytavin G, Misset JL, Brienza S, de Vassals F, Chenu E and Bourut C: Oxalato-platinum or 1-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum. *Biomed Pharmacother* 1989; 43:237-250.
246. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54:770–777.

247. Page JD, Husain I, Sancar A, Chaney SG. Effect of the diaminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. *Biochemistry*. 1990; 29:1016–1024.
248. Saris CP, Vaart PJ, van de Rietbroek RC, Blommaert FA. In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis* 1996; 17:2763–2769.
249. Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, et al. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58:920–927.
250. Schmidt W, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53:799–805.
251. Di Cesare Mannelli L, Zanardelli M, Failli P, Ghelardini C. Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: could it correlate with in vivo neuropathy? *Free Radic Biol Med.* 2013; 61:143-50.
252. Di Cesare Mannelli L, Zanardelli M, Failli P, Ghelardini C. Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. *J Pain.* 2012; 13(3):276-84.
253. Oehmichen M, Pedal I, Schmidt V, Schlote W. Form variants of globular hyaline microthrombi. Light microscopy, immunohistochemical and scanning and transmission electron microscopy observations. *Z. Rechtsmed.* 1986; 97:29-40.
254. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–8.
255. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26:131–8.
256. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton. 1985; 123–32.
257. 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.

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:
РБ

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације: **Монографска публикација**
ТД

Тип записа: **Текстуални штампани материјал**
ТЗ

Врста рада: **Докторска дисертација**
ВР

Аутор: **Исидора Милосављевић**
АУ

Ментор/коментор: **др рер. нат. Слободан Новокмет, ванредни професор**
МН

Наслов рада: **Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност,
коронарни проток и оксидациони стрес
золованог срца пацова**
НР

Језик публикације: **српски (ћирилица)**
ЈП

Језик извода: **српски и енглески**
ЈИ

Земља публикавања: **Република Србија**
ЗП

Уже географско подручје: **Шумадијски округ**
УГП

Година: **2017.**
ГО

Издавач: **Ауторски репринт**
ИЗ

Место и адреса: **Факултет медицинских наука,
Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац**
МС

Физички опис рада: **8 поглавља/ 234 страница/71 табела/ 89 слика/
28 схема/ 47графика/257 референци/ 1прилог**
ФО

Научна област: **Медицина**

Научна дисциплина: Молексулска медицина:
ДИ Клиничка и експериментална фармакологија
Предметна одредница/ кључне речи: двовалентни комплекси платине;
ПО изоловано срце пацова; кардиотоксичност;
оксидациони стрес
УДК
Чува се: Библиотека Факултета медицинских наука
ЧУ Универзитета у Крагујевцу, Република Србија

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Абстракт:

Приликом терапијске примене цисплатине јавља се акутна и кумулативна кардиотоксичност која подразумева: електрокардиографске промене, ангину, акутни инфаркт миокарда, хипертензију, хипотензију, аритмије, миокардитис, кардиомиопатије и конгестивну срчану слабост. Цисплатина изазива кардиотоксичност тако што директно остварује токсично дејство на кардиомиоците или доводи до појачане продукције слободних радикала и настанка оксидационог стреса. На основу претходно изнесених чињеница циљеви овог истраживања били су: евалуација ефеката акутне администрације различитих доза аналога цисплатине на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, испитивање ефеката ових комплекса на параметаре оксидационог стреса и утврђивање хистолошких промена насталих на срчаном мишићу. У истраживању су коришћени двовалентни комплекси платине са носећим етилендиаминским, диаминоциклохексанским и терпиридинским лигандом и цисплатина као референтна супстанца. Узимајући у обзир чињеницу да комплекси платине који се данас користе у клиничкој пракси (цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина) имају различиту потентност и способност да изазову нежељена дејства, ми смо одабрали различите аналоге цисплатине да испитамо њихов утицај на коронарну циркулацију и функцију миокарда. Поменути аналози се разликују у погледу структуре, хемијске реактивности, растворљивости, фармакокинетице и системске токсичности. Сходно наводима из литературе да је степен оштећења срца пропорционалан примењеној дози цисплатине у истраживању су коришћене три различите дозе сваког од испитиваних комплекса.

Показано је да промена неодлазећених лиганата доводи до промене у потентности комплекса да изазове кардиотоксичност. Тачније да увођење јако липофилних и волуминозних лиганата као што је 2,2':6',2''-терпиридин доводи до повећања кардиотоксичности комплекса, као и да супституција аминоклиганата диаминоетиленским лигандом утиче на смањење реактивности комплекса што

доводи и до последичног смањења потенцијала овог комплекса да доведе до кардиотоксичности.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 27.01.2016.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Физиологија, председник;

2. проф. др Живадин Бугарчић, редовни професор
Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Неорганска хемија, члан

3. проф. др Драган Ђурић, редовни професор
Медицинског факултета Универзитета у Београду
за ужу научну област Физиологија, члан;

4. проф. др Зорица Вујић, редовни професор
Фармацеутског факултета Универзитета у Београду
за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан;

5. доц. др Јована Богојески, доцент
Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област Неорганска хемија, члан.

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Documentation type: Monographic publication
DT

Type of record: Textual material, printed
TR

Contents code: PhD thesis
CC

Author: Isidora Milosavljevic
AU

Menthor/co-mentor dr rer. nat. Slobodan Novokmet, associate professor
MN

Title: The effects of the Pt (II) complexes on contractility,
TI coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart

Language of text: Serbian (cyrilic)
LT

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication: Rebulic of Serbia
CP

Locality of publication: Sumadija District
LP

Publication year: 2017.
PY

Publisher: Author`s reprint
PU

Publication place: Faculty of medical Sciences, University of Kragujevac,
PP Street Svetozara Markovica 69 Kragujevac

Physical description 8 chapters/ 234 pages/ 71 tables/ 89 pictures/
PD 28 scheme/ 47charts/ 257 references/ 1 annex

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Molecular medicine:
SD Clinical and Experimental Pharmacology

Subject/key words: Platinum(II) complexes; isolated rat heart;
SKW cardiotoxicity, oxidative stress

UDC

Holding data:

HD

Library of Faculty of Medical Sciences,
University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note:

N

Abstract:

AB

During therapeutic administration of cisplatin, acute and cumulative cardiotoxicity may occur, cardiotoxicity includes: electrocardiographic changes, angina, acute myocardial infarction, hypertension, hypotension, arrhythmias, myocarditis, cardiomyopathy and congestive heart failure. Cisplatin causes cardiotoxicity directly by causing toxic effects on cardiomyocytes or increasing in production of free radicals and the formation of oxidative stress. Based on previously stated facts, the aims of this study were: evaluation of the effects of acute administration of different doses of analogues of cisplatin to heart muscle and coronary circulation of the isolated rat heart, examining the effects of these complexes on oxidative stress parameters and determination of histological changes on the heart tissue. The study used bivalent platinum complexes with carrier ethylenediamine, diaminocyclohexane and terpiridine ligands and cisplatin as the reference substance. Taking into account the fact that platinum complexes currently used in clinical practice (cisplatin, carboplatin, oxaliplatin) have different potency and ability to cause side effects, we have chosen different cisplatin analogs to examine their impact on coronary circulation and myocardial function. The aforementioned analogues differ in terms of their structure, chemical reactivity, solubility, pharmacokinetics and systemic toxicity. According to the literature data, that the degree of heart damage proportional to the administered dose of cisplatin, in this study we used three different doses of each of the investigated complexes. It has been shown that the change in stable ligands leads to a change in the potency of the complex to cause cardiotoxicity. More precisely, the introduction of highly lipophilic and voluminous ligands such as 2,2': 6', 2'' - terpiridin leads to an increase in cardiotoxicity of the complex, and also, the substitution of the aminoligand with diaminoethylene ligand affects the reduction in reactivity of the complex, which leads to a consequent decrease in the potential of this complex to lead to cardiotoxicity.

Accepted by the Scientific Board on:

27.01.2016.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

**1. Prof. dr Vladimir Jakovljevic, full professor
at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
for the scientific field of Physiology, president**

**2. Prof. dr Zivadin Bugarcic, full professor
at Faculty of Science, University of Kragujevac,
for the scientific field of Inorganic chemistry, member**

**3. Prof. dr Dragan Djuric, full professor
at School of Medicine, University of Belgrade,
for the scientific field of Physiology, member**

**4. Prof. dr Zorica Vujic, full professor
at Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,
for the scientific field of Pharmaceutical Chemistry, member**

**5. Doc. dr Jovana Bogojeski, assistant professor
at Faculty of Science, University of Kragujevac,
for the scientific field of Inorganic chemistry, member**

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Исидора Милосављевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни протоки
оксидациони стрес изолованог срца пацова

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 24.11.2017. године,



потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Исидора Милосављевић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Ефекти Pt(II) комплекса на контрактилност, коронарни протоки
оксидациони стрес изолованог срца пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу _____, 24.11.2017. године,



потпис аутора

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

Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers

Isidora M. Stojic¹ · Vladimir I. Zivkovic² · Ivan M. Srejovic² · Tamara R. Nikolic¹ · Nevena S. Jeremic¹ · Jovana N. Jeremic¹ · Dragan M. Djuric³ · Nemanja Jovicic⁴ · Katarina G. Radonjic¹ · Zivadin D. Bugarcic⁵ · Vladimir L. J. Jakovljevic^{2,6} · Slobodan S. Novokmet¹

Received: 30 March 2017 / Accepted: 26 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Drug-induced oxidative stress can occur in numerous tissues and organ systems (liver, kidney, ear, nervous system, and cardiovascular system). Cancer therapy with cisplatin is associated with side effects to which oxidative stress may contribute. We have compared the influences of cisplatin (reference compound) and its analogues (dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) and chloro(2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II)) in a model of isolated rat heart using the Langendorff technique. The production of oxidative stress biomarkers, antioxidant enzymes, myocardial damage, and expression of Bax, OH-1, and SODs were studied. Cisplatin and the analogues were perfused at concentration of 10^{-6} and 10^{-5} M during 30 min. The results of this study showed that examined platinum complexes had different ability to induce

oxidative stress of isolated perfused rat heart. Varying the carrier ligands, such as 1,2-diaminocyclohexane and 2,2':6',2''-terpyridine, related to amino ligands (cisplatin) directly influenced the strength to induce production of oxidative stress biomarkers. Introducing 2,2':6',2''-terpyridine ligands provoked the smallest changes in antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation, and expression of heme oxygenase-1, that undoubtedly indicated that this complex had the lowest impact on redox status in heart tissue. These findings may be useful in synthesis of novel platinum analogues with lower potential for oxidative stress induction. However, the fact that platinum complexes could induce toxic effects in the heart by other mechanisms should be taken into the consideration.

Keywords Oxidative stress · Cisplatin · Cisplatin analogues · Isolated perfused rat heart

✉ Vladimir L. J. Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

- ¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ² Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ³ Institute of Medical Physiology “Richard Burian” Faculty of Medicine, University of Belgrade, Visegradska 26/II, Belgrade 11000, Serbia
- ⁴ Department of Histology and Embriology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ⁵ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, Kragujevac 34000, Serbia
- ⁶ Department of Human Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Introduction

Cisplatin, an effective anticancer drug, exerts various dose-dependent acute and cumulative side effects such as nephrotoxicity, cardiotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity, myelosuppression, and gastrointestinal toxicity. Recent investigations have suggested the important role of oxidative stress in above mentioned cisplatin-induced side effects [1–8]. There are a lot of evidences that cisplatin can induce acute or chronic cardiotoxicity in form of: electrocardiography changes and arrhythmias (ventricular arrhythmias, supraventricular tachycardia, atrial fibrillation, atrioventricular block), myocarditis, pericarditis, angina, acute myocardial infarction, hyper and hypotension, and coronary vasospasm [9–13].

Increase in production of reactive oxygen species (ROS) due to cisplatin therapy implicates the potential role of oxidative stress in toxicity, but the mechanisms involved in cardiotoxicity are still not well characterized [14–16]. Some studies documented an important role of free radical superoxide anion radical and hydroxyl radical in cisplatin-induced toxicity, and the reduction of antioxidants' levels in plasma of cisplatin treated patients [17–19]. Investigations of potential beneficial effects of certain antioxidants in cisplatin-induced cardiotoxicity are attractive [20, 21].

Platinum analogues generally had difference potential to induce side effects; there is evidence that acute administration of oxaliplatin in rats induced fewer damaged of myocardial cells than cisplatin [22]. In an attempt to overcome cisplatin side effects, numerous analogues have been synthesized and investigated [23]. The contribution of these compounds to induce oxidative stress remains unknown, mostly. In order to provide insight into individual ability of platinum complexes (analogues) to induce oxidative stress, we investigated the potential of examined platinum compounds to induce production of ROS. We investigated the effects of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) because it showed wide and different spectrum of activity compared to cisplatin [24, 25]. On the other hand, chloro(2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II) was chosen due to its high reactivity to sulfur-donor biomolecules, such as glutathione and L-cysteine [26, 27].

The aim of the presented study was to investigate individual differences in production of oxidative stress biomarkers after acute administration in isolated perfused rat heart. In addition, we have compared the effects of different doses of same complexes on production of biomarkers of oxidative stress. Understanding these individual differences in potential for inducing oxidative stress is valuable for new platinum-based drug development.

Materials and methods

Animals and experimental design

Seventy male Wistar albino rats (twenty per group, and ten for control) were used for this study. Each experimental group were divided into two subgroups (ten per subgroup), depending on the applied dose (higher 10^{-5} M, and lower 10^{-6} M). All animals were between 10 and 12 weeks old (body mass 200–220 g) and kept in cages, day/night cycle (12:12).

For this research, we use Langendorff technique for isolated rat heart (Langendorff apparatus Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary). After quick anesthetizing with ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), the animals were euthanized via cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Following

an urgent thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were promptly excised and attached to the Langendorff apparatus via aortic cannulation and then were retrogradely perfused under a constant perfusion pressure of 70 cm H₂O with complex Krebs–Henseleit solution. Composition of Krebs–Henseleit solution was composed of the following (in mmol/l): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂·2H₂O 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, pyruvate 2, equilibrated with 95% O₂ plus 5% CO₂ warmed at 37 °C, (pH 7.4).

The hearts from all groups were made to undergo a stabilization period of 25-min. During this period, coronary flow (CF) was measured flowmetrically. After three repeatedly measurements of the same value of CF, stabilization period was over, and this point was marked “control” as zero moment of perfusion. Stabilization period was followed by period called “effect” when the hearts were perfused with examined complexes depending on the group. During the “effect period”, CF was measured after 15 and 30 min of perfusion, and those points were marked as “15 and 30”. This period was following by 15 min period of perfusion only with Krebs–Henseleit solution, and it was called “washout period”. At the end of “washout period”, CF was measured once again, and this point is marked as “washout”. At all aforementioned moments of measuring of CF, the coronary venous effluent were collected in order to determine the oxidative stress biomarkers.

Experimental groups

All experimental animals are divided into three experimental groups and one control group, and every experimental group is divided into two subgroups depending on complexes used for perfusion:

First group: hearts perfused with dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) ([Pt(dach)Cl₂]).

First subgroup dose of [Pt(dach)Cl₂] was 10^{-5} M (higher dose).

Second subgroup dose of [Pt(dach)Cl₂] was 10^{-6} M (lower dose).

Second group: hearts perfused with chloro(2,2':6',2''-terpyridine)platinum(II) ([Pt(terpy)Cl]⁺).

Third subgroup dose of [Pt(terpy)Cl]⁺ was 10^{-5} M (higher dose).

Fourth subgroup dose of [Pt(terpy)Cl]⁺ was 10^{-6} M (lower dose).

Third group: hearts perfused with cis-(dichlorodiamine)platinum(II) ([Pt(NH₃)₂Cl₂] or cisplatin).

Fifth subgroup dose of [Pt(NH₃)₂Cl₂] was 10^{-5} M (higher dose).

Sixth subgroup dose of [Pt(NH₃)₂Cl₂] was 10^{-6} M (lower dose).

Fourth group: hearts perfused with Krebs–Henseleit solution—control group.

The applied dose was selected based on the data of Pouna and coworkers who showed that cisplatin can cause cardiotoxic effects after single 10^{-5} M dose [28]. Accordingly, to this data, we applied that dose and 10 times lower dose, to investigate if the acute application of platinum complex at isolated rat heart induces oxidative stress, and if that effects are dose dependent.

Determination of biochemical parameters in coronary venous effluent and heart tissue

Heart tissue preparation

At the end of experiment, heart from all experimental animals were frozen at -80 °C, and then a 0.5 section of each tissue was homogenized in 5 ml phosphate buffer pH 7.4 using an electrical homogenizer, on ice. Then, tissue homogenates were centrifuged at $1200\times g$ for 20 min at 4 °C. The resulting supernatants were isolated and stored at -80 °C until determination of biochemical parameters. During the experiment, in above mentioned cut-point, samples of coronary venous effluent were collected and stored at -80 °C for future analyses.

Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances—TBARS)

The degree of lipid peroxidation in coronary venous effluent was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 sodium hydroxide (NaOH) incubated with coronary effluent at 100 °C for 15 min and measured at 530 nm [29].

Nitrite determination

Nitric oxide was assessed as nitrite and quantified by the spectrophometric method using the Griess-reagent. 0.5 ml of coronary venous effluent was precipitated with 200 μ l of 30% sulpho-salicylic acid, vortexed for 30 min, and centrifuged at $3000\times g$. Equal volumes of the supernatant and Griess's reagent, containing 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid/0.1% naphthalene ethylenediamine-dihydrochloride, were added and incubated for 10 min in the dark and measured at 543 nm. The nitrite levels were calculated by using sodium nitrite as a standard [30].

Superoxide anion determination

The level of superoxide anion radical (O_2^-) was measured using Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-

buffer with coronary venous effluent at 530 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe [31].

Hydrogen peroxide determination

The level of hydrogen peroxide (H_2O_2) was measured using phenol red oxidation with H_2O_2 from coronary venous effluent in the presence of horse-radish peroxidase (prepared ex tempore) at 610 nm. Krebs–Henseleit solution was used as a blank probe [32].

Determination of reduced glutathione (GSH)

The level of reduced glutathione (GSH) was determined based on GSH oxidation with 5.5-dithio-bis-6.2-nitrobenzoic acid using the method reported by Beutler. Detection was performed at 420 nm. The amount of GSH was expressed as nmol/g tissue [33].

Determination of catalase (CAT)

CAT activity was determined according to Aebi. Diluted homogenate of heart tissue (1:7 v/v) was treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v). CAT buffer, prepared sample, and 10 mM H_2O_2 was used for determination. Detection was performed at 360 nm. The amount of CAT was expressed as U/g tissue [34].

Determination of SOD

SOD activity was determined by the epinephrine method of Beutler. Homogenate of heart tissue was mixed with carbonate buffer, and then epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm. The amount of SOD was expressed as U/g tissue [35].

Expression of genes in the heart tissue

Total RNA was extracted from a frozen rat heart using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (2 μ g) was reverse-transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). qRT-PCR was performed using Power SYBR MasterMix (Applied Biosystems) and miRNA specific primers for Bax, SOD1, SOD2, SOD3, HO-1, and β -actin as a housekeeping gene (Table 1). qPCR reactions were initiated with a 10 min incubation time at 95 °C followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). Relative expression of genes was calculated according to the formula $2^{-C_t - C_{tactin}}$, where C_t is the cycle threshold of the gene of interest and C_{tactin} is the

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis

β -actin	5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3'	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'
HO-1	5'-AGA GTT TCC GCC TCC AAC CA-3'	5'-CGG GAC TGG GCT AGT TCA GG-3'
SOD-1	5'-TGTGTCCATTGAAGATCGTGTG-3'	5'CTTCCAGCATTTCAGTCTTTG 3'
SOD-2	5'-GGACAAACCTGAGCCCTAAG-3'	5'CAAAAGACCCAAAGTCACGC 3'
SOD-3	5'-GACCTGGAGATCTGGATGGA-3'	5'-GTGGTTGGAGGTGTTCTGCT-3'
Bax	5'-ACACCTGAGCTGACCTTG-3'	5'-AGCCCATGATGGTTCTGATC-3'

cycle threshold value of the housekeeping gene (β -actin) [36].

Cardiac biomarkers

Creatine kinase-MB (CK-MB) in coronary venous effluent was determined using standard commercial kits spectrophotometrically. Troponin T and N-terminal pro b-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in coronary venous effluent were measured by using electrochemiluminescence immunoassay “ECLIA” (Elecsys 2010, Roche Diagnostic).

Histopathological analysis

Tissue was immersion fixated in 4% neutrally buffered formaldehyde, then tissue was dehydrated and embedded in paraffin, sectioned in 4 μ m thick sections and stained with hematoxylin and eosin, immunohistochemically. All specimens were immunohistochemically stained using antibody CD31 (monoclonal mouse anti-CD31, clone JC/70A Thermo Fisher Scientific MA5-13188, dilution ratio 1:100). After dewaxing and rehydration, a heat-induced antigen retrieval procedure by using EDTA buffer at pH 8.0 for 20 min was performed on all tissue sections, with subsequent washing in TBS and incubation with primary antibody diluted at an indicated ratio. The sections were treated by applying the commercial UltraVision/DAB staining kit (ThermoScientific LabVision TL-060-HD). Immunoreactions were subsequently developed by DAB substrate. The sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. Negative controls were performed by using the same methodology but with the omission of primary antibody. All slides were analyzed by using the Olympus BX 41 microscope and were photo documented with the Olympus C—5060 wide zoom digital camera and the Olympus DP-soft Image Analyzer program or Leica DM2000 LED microscope and Leica DFC295 digital camera and LAS V4.4 software.

Substances

[Pt(dach)Cl₂] and [Pt(terpy)Cl]⁺ has been synthesized according to Keppler et al. [37]. Cisplatin, as well as substances necessary for the preparation of Krebs–Henseleit buffer and biochemical assays were purchased from the company Sigma-Aldrich GmbH, Germany.

Statistical analyses

Complete statistical evaluation was performed with SPSS Statistics 18 (SPSS, Chicago, IL). Normality of parameter distribution was checked with the Kolmogorov–Smirnov test. Wilcoxon signed-rank test (post hoc Bonferroni test) was used for repeated measurements in same subgroup; Mann–Whitney *U* test (post hoc Tukey test) was used for comparison of subgroups in same group and for comparison of groups. Statistic *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant, and *p* values less than 0.01 were considered to be statistically high significant.

Results

The effects of acute administration of [Pt(dach)Cl₂] on oxidative stress biomarkers in coronary venous effluent

Acute administration of [Pt(dach)Cl₂] in both doses didn't induce statistically significant changes in most examined biomarkers of oxidative stress (*p* > 0.05). Application of [Pt(dach)Cl₂] in lower dose induced statistically significant increase of O₂⁻ in both points of interest (control vs. 15 *p* = 0.012 and control vs. 30 *p* = 0.017) (Fig. 2c), as well as increase of H₂O₂ after 30 min of perfusion (control vs. 30 *p* = 0.017) (Fig. 2d). There were no significant differences between the doses in production of mentioned biomarkers.

The effects of acute administration of [Pt(terpy)Cl]⁺ on oxidative stress biomarkers in coronary venous effluent

Acute administration of [Pt(terpy)Cl]⁺ in higher dose induce statistically significant changes in almost all measured oxidative stress biomarkers (Table 2; Fig. 1a–d). Acute administration of lower dose of [Pt(terpy)Cl]⁺ also induced statistically significant changes of almost all oxidative stress biomarkers (Table 2).

When comparing the short time perfusion effects (after 15 min) of different doses on oxidative stress biomarkers, it can be noticed significant difference only in nitrites (Table 3). But on the other hand, after 30 min of perfusion

Table 2 Oxidative stress biomarkers [Pt(terpy)Cl]⁺ 10⁻⁵M and 10⁻⁶M

	Index of lipid peroxidation	Nitrites	Superoxide anion radical	Hydrogen peroxide
Control versus 15				
10 ⁻⁵ M	0.028*	0.028*	0.345	0.116
10 ⁻⁶ M	0.046*	0.600	0.028*	0.028*
15 versus 30				
10 ⁻⁵ M	0.028*	0.028*	0.463	0.028*
10 ⁻⁶ M	0.028*	0.249	0.753	0.345
Control versus 30				
10 ⁻⁵ M	0.028*	0.028*	0.753	0.028*
10 ⁻⁶ M	0.028*	0.249	0.028*	0.028*
30 versus washout				
10 ⁻⁵ M	0.028*	0.028*	0.046*	0.028*
10 ⁻⁶ M	0.046*	0.345	0.753	0.173

All values represent the results of Wilcoxon signed-rank test

* Statistically significant differences between two measurements

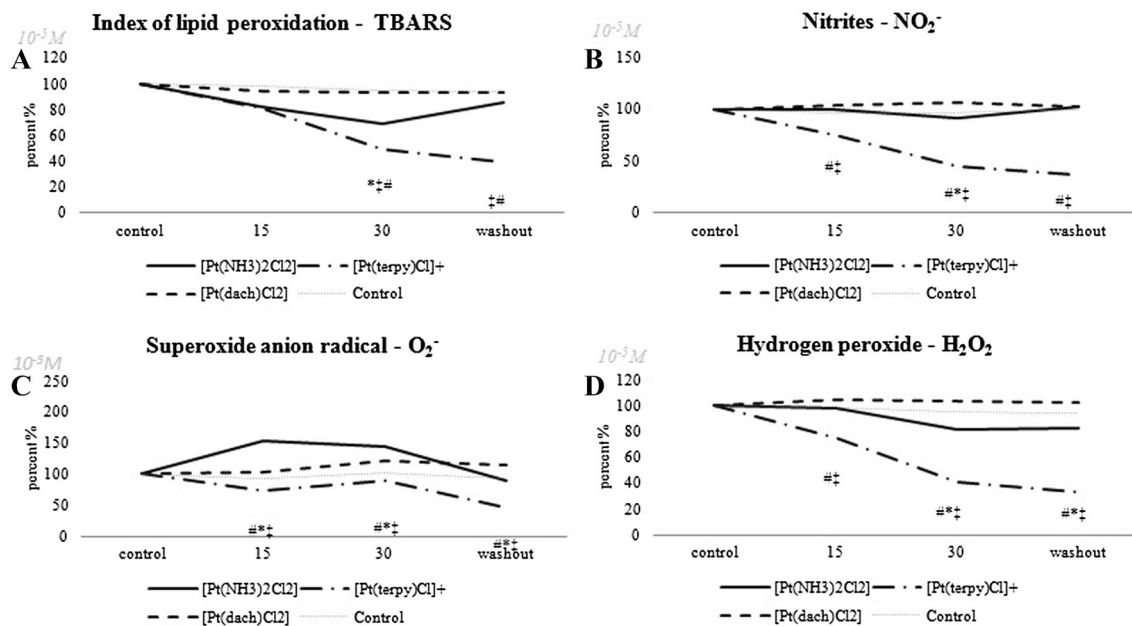


Fig. 1 Comparisons of oxidative stress biomarkers between groups (higher dose). All values are expressed as percent, wherein the measured initial values of all examined biomarkers (control) was 100%, and all other values (15, 30 and washout) were calculated taking into account the percent changes of initial values. Asterisk was used to label statistically significant differences between

[Pt(dach)Cl₂] and [Pt(NH₃)₂Cl₂] groups; hash was used to label statistically significant differences between [Pt(terpy)Cl]⁺ and [Pt(NH₃)₂Cl₂] groups, and double dagger was used to label statistically significant differences between [Pt(terpy)Cl]⁺ and [Pt(dach)Cl₂] groups

there were significant differences in values of H₂O₂ and TBARS (Table 3).

The effects of acute administration of [Pt(NH₃)₂Cl₂] on oxidative stress biomarkers in coronary venous effluent

Acute administration of [Pt(NH₃)₂Cl₂] in higher dose induce statistically significant changes in almost all

measured oxidative stress biomarkers (Table 4). The levels of hydrogen peroxide weren't changed during perfusion with both doses, and recorded changes between doses (Table 5) could be regarded because of differences in H₂O₂ values during control conditions. Lower dose of [Pt(NH₃)₂Cl₂] induced statistically significant changes in superoxide anion radical and index of lipid peroxidation. The levels of O₂⁻ were elevated in both point of interest during effect period (control vs. 15 *p* = 0.028 and control

Table 3 Comparison between doses [Pt(terpy)Cl]⁺

[Pt(terpy)Cl] ⁺ 10 ⁻⁵ versus 10 ⁻⁶ M				
	Index of lipid peroxidation	Nitrites	Superoxide anion radical	Hydrogen peroxide
Control	0.310	0.818	0.009**	0.937
15	0.065	0.009**	0.009	0.485
30	0.002**	0.002**	0.009	0.002**
Washout	0.002**	0.002**	0.009	0.002**

All values represent the results of Mann–Whitney *U* test

* Statistically significant differences between two subgroups

** Statistically high significant differences between two subgroups

Table 4 Oxidative stress biomarkers [Pt(NH₃)Cl₂] 10⁻⁵ M

	Index of lipid peroxidation	Nitrites	Superoxide anion radical	Hydrogen peroxide
Control versus 15	0.018*	0.063	0.018*	0.735
15 versus 30	0.043*	0.018*	0.612	0.043*
Control versus 30	0.018*	0.018*	0.043*	0.063
30 versus washout	0.128	0.866	0.063	0.735

All values represent the results of Wilcoxon signed-rank test

* Statistically significant differences between two measurements

Table 5 Comparison between doses [Pt(NH₃)Cl₂]

[Pt(NH ₃)Cl ₂] 10 ⁻⁵ M versus 10 ⁻⁶ M				
	Index of lipid peroxidation	Nitrites	Superoxide anion radical	Hydrogen peroxide
Control	0.101	0.138	0.002**	0.014*
15	0.035*	0.008**	0.002	0.014
30	0.035*	0.001**	0.002	0.014
Washout	0.073	0.073	0.002	0.014

All values represent the results of Mann–Whitney *U* test

* Statistically significant differences between two subgroups

** Statistically high significant differences between two subgroups

vs. 30 $p = 0.028$) (Fig. 2c). On the other hand, short time perfusion didn't induced statistically significant changes in TBARS, while after 30 min of perfusion TBARS significantly dropped (control vs. 30 $p = 0.046$) (Fig. 2a).

The baseline values (control) of O₂⁻ in coronary effluent between cisplatin subgroups (higher and lower doses) were different, so the diverse effects during perfusion should be regarded (Table 5). On the other hand, significant or high significant difference was recorded between the effects of different doses on nitrites and TBARS values after 15 and 30 (Table 5).

Oxidative stress biomarkers in coronary venous effluent of control group

There were no statistically significant changes in production and release of all examined biomarkers of oxidative

stress (O₂⁻, H₂O₂, TBARS, NO₂⁻) during the time (Figs. 1, 2).

Comparisons of oxidative stress biomarkers between groups (higher dose) in coronary venous effluent

When comparing the effects of acute administration of different platinum(II) complexes at higher concentration, differences between examined complexes can be noticed (Fig. 1a–d). The lowest changes in production of oxidative stress biomarkers induced [Pt(dach)Cl₂], and on the other hand, the greatest changes induced the administration of [Pt(terpy)Cl]⁺. The observed differences between groups are statistically significant.

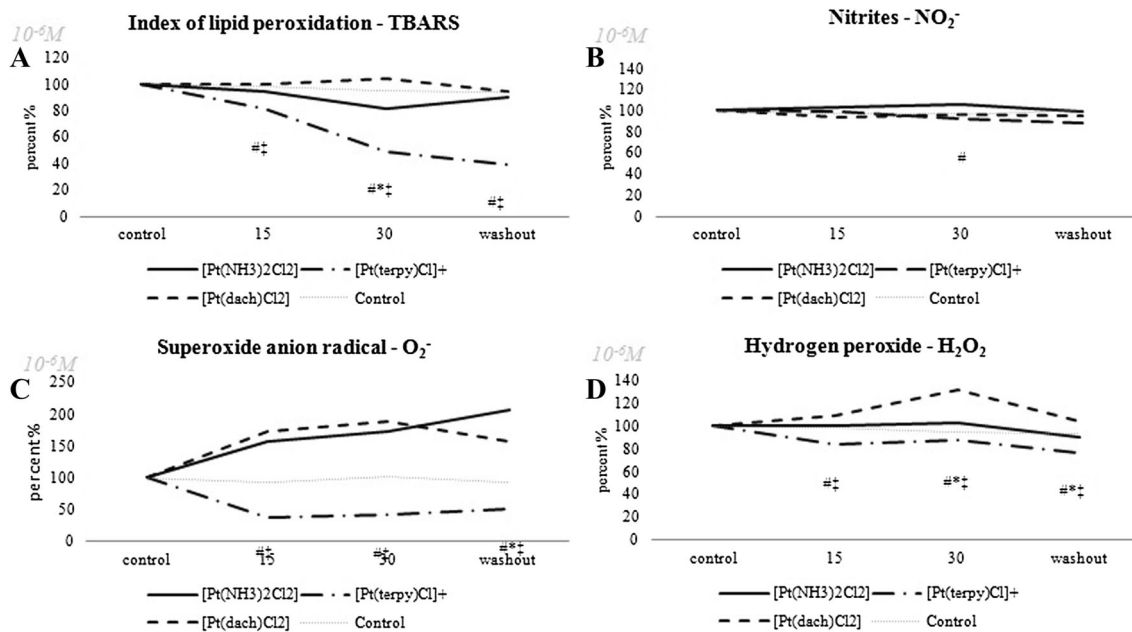


Fig. 2 Comparisons of oxidative stress biomarkers between groups (lower dose). All values are expressed as percent, wherein the measured initial values of all examined biomarkers (control) was 100%, and all other values (15, 30 and washout) were calculated taking into account the percent changes of initial values. *Asterisk* was used to label statistically significant differences between

[Pt(dach)Cl₂] and [Pt(NH₃)₂Cl₂] groups; *hash* was used to label statistically significant differences between [Pt(terpy)Cl]⁺ and [Pt(NH₃)₂Cl₂] groups, and *double dagger* was used to label statistically significant differences between [Pt(terpy)Cl]⁺ and [Pt(dach)Cl₂] groups

Comparisons of oxidative stress biomarkers between groups (lower dose) in coronary venous effluent

When comparing the effects of acute administration of different platinum(II) complexes at lower concentration, less differences between examined complexes than those in higher dose can be noticed (Fig. 2a–d). The observed differences between groups are statistically significant.

Oxidative stress in heart tissue

Administration of cisplatin and [Pt(dach)Cl₂] in higher dose induced statistically significant increase of index of lipid peroxidation in heart tissue compared to control group (Fig. 3a). Superoxide dismutase activity (SOD) was reduced in all experimental groups compared to control group (Fig. 3b). Catalase activity (CAT) was reduced in group treated with cisplatin and [Pt(dach)Cl₂] in both doses compared to control group (Fig. 3c). Reduced glutathione (GSH) was significantly decreased in group treated with cisplatin (both doses) and in a group treated with [Pt(dach)Cl₂] in higher dose compared to control (Fig. 3d).

Cardiac biomarkers

The values of CK-MB, proBNP, and troponin T are presented in Table 6. There were no significant differences between experimental groups and control group in all cut point.

The effects of platinum complexes on myocardial tissue

The acute administration of platinum complexes induced changes in myocardial cells, but that changes were different in groups, and the lower doses show less harmful changes. At higher dose, all examined complexes induced vacuolization of cells, probably as consequence of acting free radicals. And also, cisplatin and [Pt(dach)Cl₂] administration provoked mild intracellular edema and interstitial edema, and on the other hand, [Pt(terpy)Cl]⁺ provoked karyopyknosis of some nucleus. In all groups, at higher and lower doses, there was preserved CD31 immunoreactive endothelium of microcirculatory bed. Endocardial endothelium was completely preserved only in [Pt(terpy)Cl]⁺, and on the other hand, partially preserved in the remaining two groups (Fig. 4). At lower dose, pathological changes (vacuolization of cells and karyopyknosis) were only observed in cisplatin group, while in remaining

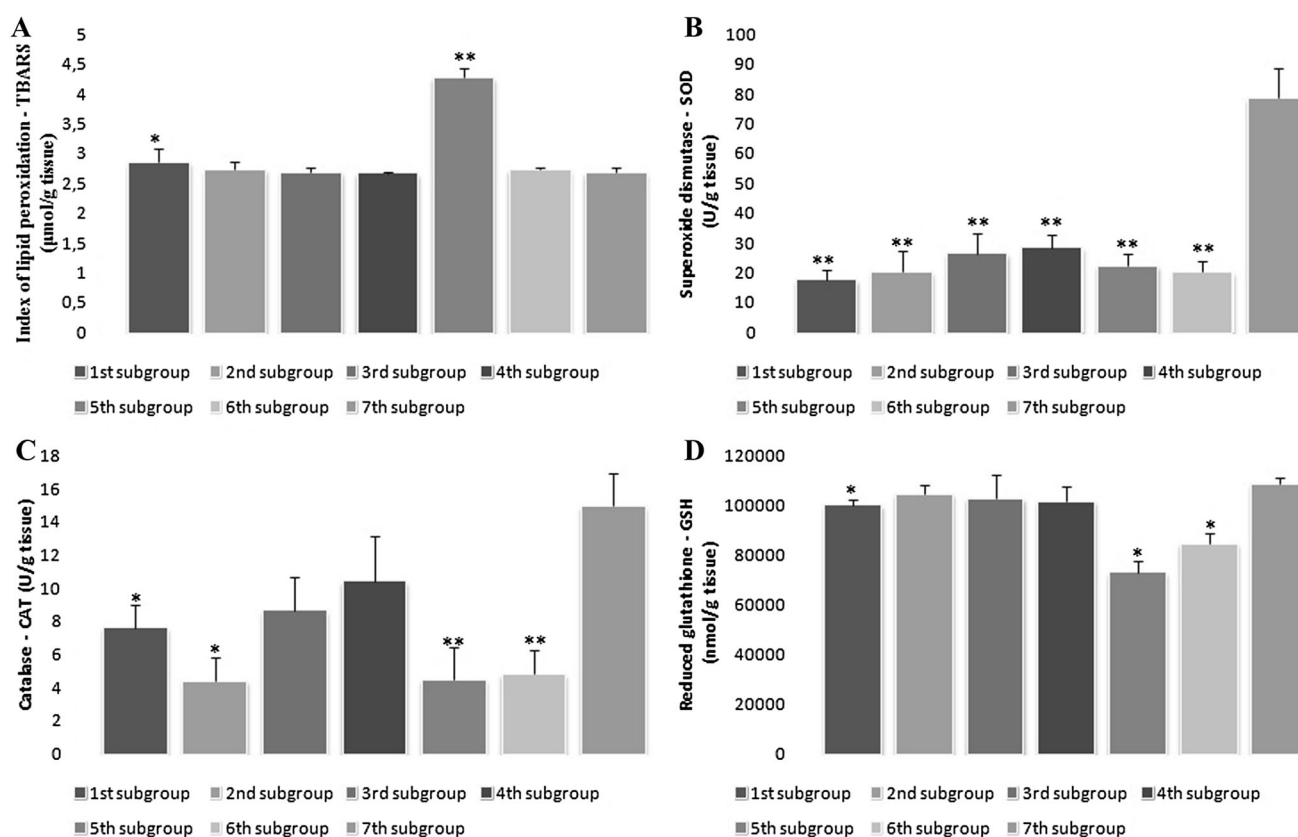


Fig. 3 Levels of GSH, CAT, SOD, and TBARS in heart tissue first subgroup—[Pt(dach)Cl₂] at higher dose 10⁻⁵ M, second subgroup—[Pt(dach)Cl₂] at lower dose 10⁻⁶ M, third subgroup—[Pt(terpy)Cl]⁺ at higher dose 10⁻⁵ M, fourth subgroup—[Pt(terpy)Cl]⁺ at lower dose 10⁻⁶ M, fifth subgroup—cisplatin at higher dose 10⁻⁵ M, sixth

subgroup—cisplatin at lower dose 10⁻⁶ M, and seventh subgroup control group. Values are means ± std deviation. Values with *star(s)* of each parameters are significantly different or significantly high different of control

Table 6 The values of cardiac biomarkers

	[Pt(dach)Cl ₂]		[Pt(terpy)Cl] ⁺		[Pt(NH ₃)Cl ₂]		Control
	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower	
CK-MB							
Control	9.2 ± 0.31	9.2 ± 0.41	9.0 ± 0.34	9.3 ± 0.42	9.8 ± 0.29	9.1 ± 0.23	9.4 ± 0.31
30	10.2 ± 0.26	10.0 ± 0.39	9.8 ± 0.28	10.6 ± 0.44	9.9 ± 0.27	9.3 ± 0.18	10.2 ± 0.28
Washout	10.8 ± 0.29	10.0 ± 0.36	10.0 ± 0.37	9.8 ± 0.38	10.2 ± 0.31	9.1 ± 0.26	9.8 ± 0.33
Troponin T							
Control	35.3 ± 2.4	28.4 ± 2.5	31.7 ± 2.5	26.5 ± 1.9	34.2 ± 2.7	29.8 ± 2.2	33.8 ± 2.1
30	44.1 ± 2.1	35.1 ± 2.1	33.4 ± 2.1	24.8 ± 2.2	36.1 ± 2.6	30.6 ± 2.1	34.9 ± 1.9
Washout	34.8 ± 2.6	37.2 ± 2.8	30.8 ± 1.9	30.5 ± 2.8	36.8 ± 2.5	32.2 ± 2.4	35.3 ± 2.2
NT-proBNP							
Control	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
30	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Washout	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

All values are expressed as average ± std deviation CK-MB (U/l), Troponin T (pg/ml), NT-proBNP (pg/ml)

two groups, we observed preserved structure of heart. Endocardial endothelium was completely preserved in [Pt(dach)Cl₂] and [Pt(terpy)Cl]⁺ groups, and partially

preserved in cisplatin group at lower dose (Fig. 5). In control group, myocardium and endocardial endothelium was completely preserved (Fig. 6).

Fig. 4 Heart tissue—experimental groups (higher dose 10^{-5} M)—(hematoxylin–eosin–floxin staining (HEF), immunohistochemical staining to CD31; **a–d, f–g** and **i** $\times 400$ magnification (*bar* 50 μm) and **e, h** $\times 200$ magnification (*bar* 100 μm)): **a–c** [Pt(terpy)Cl] $^{+}$, **d–f** [Pt(NH $_3$) $_2$ Cl $_2$] and **g–i** [Pt(dach)Cl $_2$]. **c** Vacuolization of cells and karyopyknosis; **f, i** mild intracellular edema and interstitial edema and vacuolization of cells; **a, d, g** preserved CD31 immunoreactive endothelium of microcirculatory bed; **b** completely preserved endocardial endothelium, **e, h** partially preserved endocardial endothelium

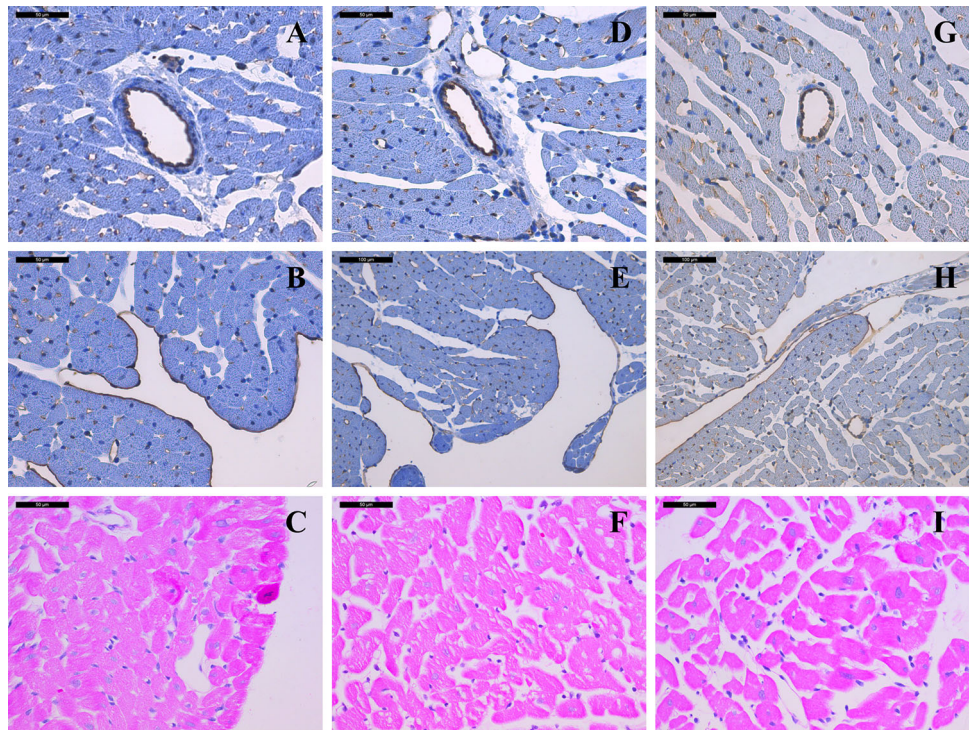
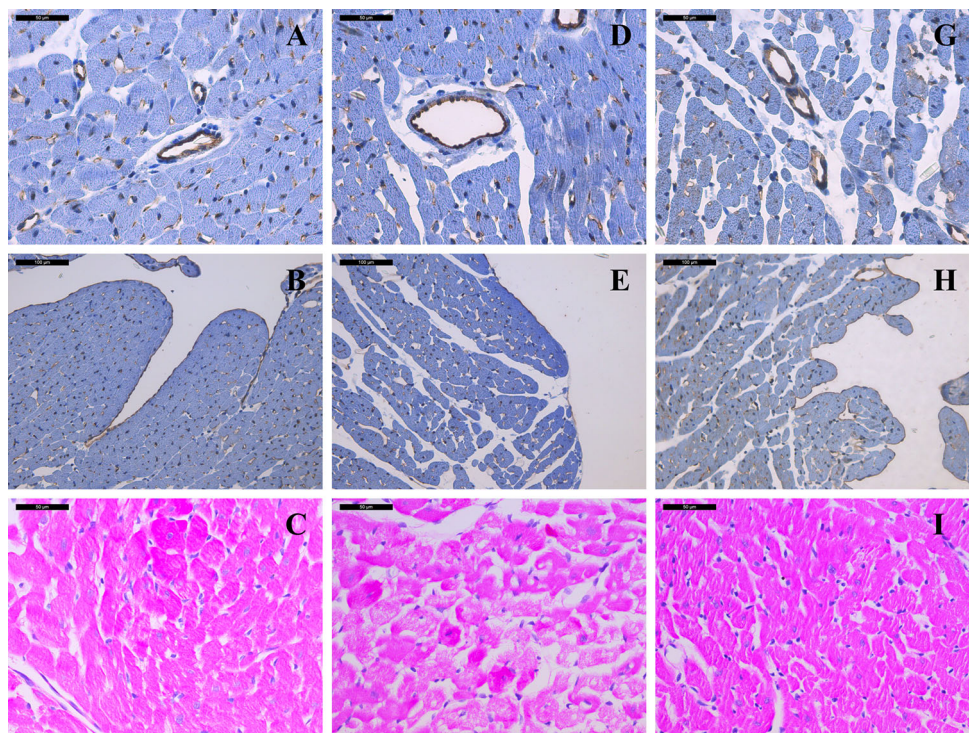


Fig. 5 Heart tissue—experimental groups (lower dose 10^{-6} M)—(hematoxylin–eosin–floxin staining (HEF), immunohistochemical staining to CD31; **a, c–d, f–g** and **i** $\times 400$ magnification (*bar* 50 μm) and **e** and **h** $\times 200$ magnification (*bar* 100 μm)): **a–c** [Pt(terpy)Cl] $^{+}$, **d–f** [Pt(NH $_3$) $_2$ Cl $_2$] and **g–i** [Pt(dach)Cl $_2$]. **c, i** Preserved structure of heart; **f** vacuolization of cells and karyopyknosis; **a, d, g** preserved CD31 immunoreactive endothelium of microcirculatory bed; **b, h** completely preserved endocardial endothelium, **e** partially preserved endocardial endothelium



The effects of platinum complexes on gene expression

The acute perfusion of heart with [Pt(dach)Cl $_2$] and cisplatin-induced significant increase in HO-1 expressions (Fig. 7a) compare to control group. The acute

perfusion of heart with all complexes induced significant increase in Bax expressions (Fig. 7b) compare to control group. The acute perfusion of heart with complexes induced significant increase in SOD-1, SOD-2, and SOD-3 expressions (Fig. 7c–e) compare to control group.

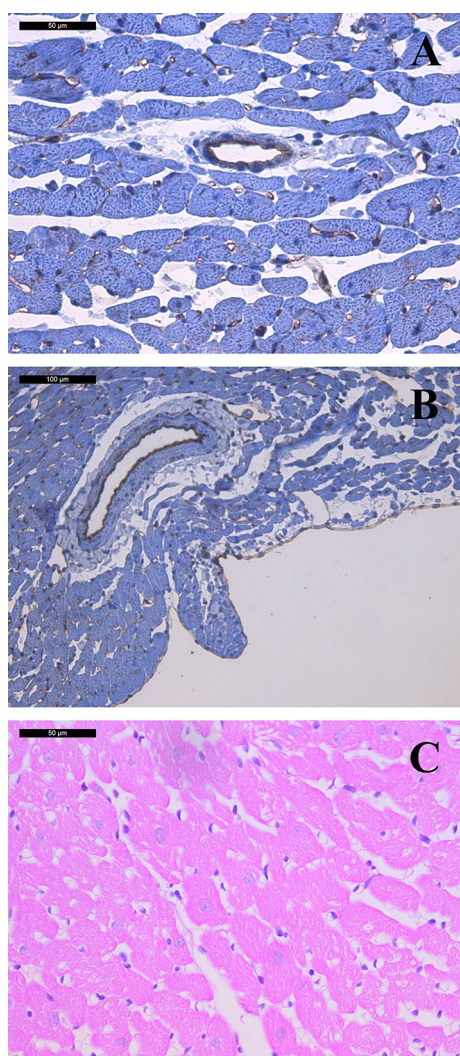


Fig. 6 Heart tissue—control group—(hematoxylin–eosin–floxin staining (HEF), immunohistochemical staining to CD31; **a**, **c** $\times 400$ magnification (*bar* 50 μm) and **b** $\times 200$ magnification (*bar* 100 μm)): **a** preserved CD31 immunoreactive endothelium of microcirculatory bed; **b** completely preserved endocardial endothelium; **c** preserved structure of heart

Discussion

Even though cisplatin is one of the most important instruments against cancer, its usage is associated with lots of disadvantages. Literature data suggests that cisplatin usage is associated with bradycardia, dysfunction of left ventricle and cardiomyocyte contraction because of cisplatin distribution in sinoartial node area [16]. The aforementioned hemodynamic abnormalities could be associated with increase of oxidative stress as indicated in the presented study. Chemotherapeutic agents, such as cisplatin, are capable to disrupt cell membranes causing the release of intracellular proteins. Elevated levels of proteins such as cardiac troponin (cTnT), lactate dehydrogenase

(LDH), creatine kinase (CK), creatine kinase-myocardial band (CK-MB) were recorded during cisplatin treatment [38]. Increased serum levels of these proteins, particularly CK and LDH, can serve as biomarkers of presence and measure of myocardial damage [18]. The leakages of these intracellular proteins are occurred due to lipid peroxidation of cardiac membrane. Lipid peroxidation of cardiac myocytes membranes results in damage of its structure, functions, and integrity [39]. The presented results show that acute administration of cisplatin and its *dach* analog induced increase of lipid peroxidation in heart tissue (Fig. 3a) but couldn't induce the increase of biomarkers of myocardial damage (Table 6). In support of these results, histological finding also confirmed that there is no necrosis of myocardial cells (Figs. 4, 5). A possible explanation of those results is acute administration of complexes and perhaps not long enough duration of perfusion (30 min).

On the other hand, acute application and also 30 min perfusion of all examined complexes didn't increase index of lipid peroxidation in effluent (Fig. 1a, b). On the contrary, during cisplatin and $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ perfusion the index of lipid peroxidation in effluent, despite of applied dose, statistically decreased (Tables 2, 4). Comparing measured values of TBARS between subgroups has greater decrease of TBARS during perfusion with higher dose for both aforementioned complexes (Tables 3, 4; Figs. 1a, 2a), that indicate dose-dependent effect. El-Sawalhi and coworkers and also Saleh and coworkers showed that either single dose or chronic treatment with cisplatin-induced increase of TBARS in heart tissue, that correlate with our results for cisplatin and *dach* analog [40, 41]. Somewhat contrary results of our study could be explained by short time perfusion and different experimental design. It is known that platinum molecules had high affinity for sulfur contacting donors, such as glutathione (GSH), and that depletion of GSH is an early and critical event during cisplatin-induced lipid peroxidation [42]. Due to binding platinum complexes to GSH, there is reduction of its free fraction and increase of superoxide anion radical production, demonstrated in our research (Figs. 1c, 2c, 3d).

The acute administration of all tested complexes induced changes in production of O_2^- in effluent. The application of cisplatin in both doses increased superoxide anion radical release (Table 4; Figs. 1c, 2c). Short time perfusion with cisplatin was enough to induce increase of O_2^- regardless of dose (Table 4; Figs. 1c, 2c). This finding may be the consequence of decreased SOD activity and thus inhibition of breakdown of O_2^- to molecular oxygen and water [43, 44], which results in increased level of this ROS. Decreased SOD activity was demonstrated for all tested complexes in both doses (Fig. 3b). Surprisingly, the perfusion of isolated rat heart with higher $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ dose didn't induce changes in O_2^- release in effluent

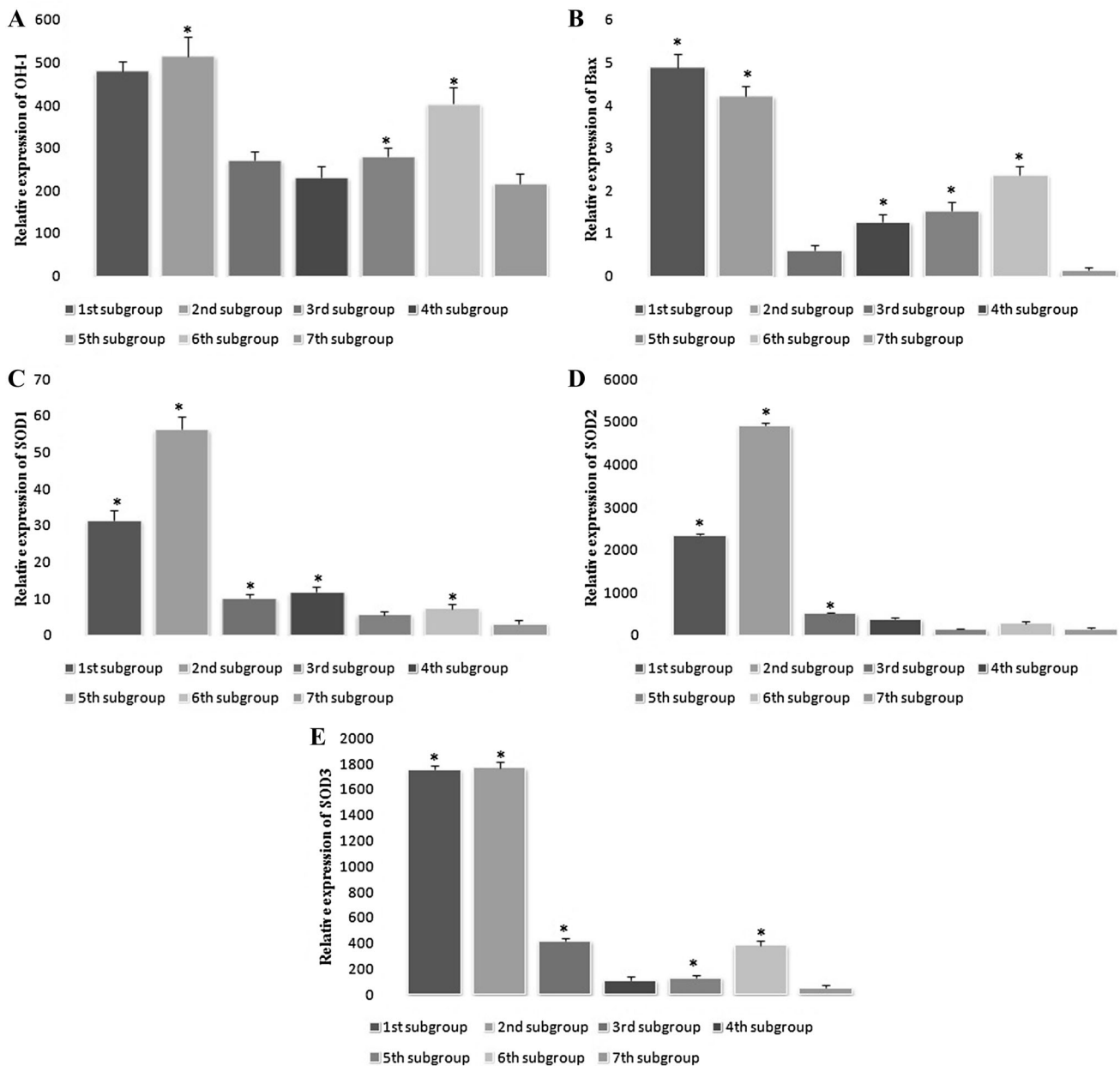


Fig. 7 The effects of Platinum complexes on gene expression

(Fig. 1c), which was opposite during perfusion with lower dose (Fig. 2c), that correlate with higher expression for SOD1 and SOD2 genes (Fig. 7c, d). In a similar manner, as cisplatin, lower dose of [Pt(dach)Cl₂] increased O₂⁻ after only 15 min of perfusion. The third applied complex [Pt(terpy)Cl]⁺ in both doses induced decrease of O₂⁻ release, but at lower dose that decrease was dramatically, for almost 60% of baseline values after only 15 min of perfusion. Further extension of perfusion didn't induce novel changes in O₂⁻ release. Based on the previously described results, we can conclude that cisplatin and [Pt(-dach)Cl₂] induced increase in production and release of

O₂⁻, unlike third complex. Comparing the effects of those two complexes on releasing of O₂⁻ it can be noticed that cisplatin-induced higher increase in production (Fig. 1c). In response to oxidative stress and production of cytokines such as TNF- α and IL-1 MnSOD mRNA could be upregulated [45, 46]. In human, there are three known SODs, and they are present in different organelles within the cell [47]. SOD1 (CuZnSOD) is present in the cytosol, nucleus, and the intermembrane space of mitochondria; SOD2 (MnSOD) is present in the mitochondrial matrix; and SOD3 (CuSOD) is found in the extracellular matrix of tissues. The major physiological role of SOD proteins is to

protect the cells against ROS toxicity, which can cause oxidative stress such as DNA damage, leading to cell death [48, 49]. Our results suggested that cisplatin and analogues induced increase in gene expression for SODs, but in different range (Fig. 7c–e).

Unchanged levels of H_2O_2 during the perfusion of isolated rat heart with cisplatin suggest that there were no significant conversion of O_2^- into hydrogen peroxide. The potential reason of this lower conversion is high affinity of cisplatin to proteins and possible inactivation of superoxide dismutase, zinc-dependent enzyme, which operate conversion of O_2^- to H_2O_2 [50, 51]. On the other hand, the production of hydrogen peroxide could be the consequence of perfusion duration. Contrary release of hydrogen peroxide after the acute application of lower dose of $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ were significant, which can be explained by high expression of SOD genes. When we get back on the previously described results about effect of this complex on release of O_2^- , it can be noticed that there were no significant increase. The increase of H_2O_2 in this group can be explained by fast conversion of O_2^- to H_2O_2 , which didn't take place in cisplatin group. In both groups perfused by $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$, the values of hydrogen peroxide was lower than baseline values, and this decrease was major at higher dose. Low levels of hydrogen peroxide could be explained by Fenton reaction of metal ions (Pt^{2+}) with hydrogen peroxide and its fast conversion to hydroxyl radical [50].

Additionally, we measured the nitrites, as another biomarker of oxidative stress. The acute application of higher dose of cisplatin and $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ induced the decrease of nitrites. The decrease of nitrites values correlate with hemodynamic results of CF (data not shown). The decrease of nitrites can be connected with high production of superoxide anion radical and consequential production of peroxynitrite anions, as results of nitric oxide (NO) and O_2^- interaction, which results in decreased NO bioavailability. Therefore, the interaction between ROS and NO compromises vascular homeostasis which is considered the major cause of impaired endothelium-dependent vasorelaxation. This leads to promoting of oxidative stress and causing the protein nitration and tissue injury [51, 52]. The acute administration of higher dose of $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ induced increase in nitrites production, which was consequently followed by increase of CF (data not shown).

There are numerous evidences that cisplatin is generally capable of leading to imbalance between generation and degradation of ROS. The mechanism of action involves conjugation and depletion of the antioxidant glutathione, as well as disruption of mitochondrial respiration [4, 53, 54]. Increase of oxidative stress induce transcription and translocation nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) into the nucleus. Activation of this factor stimulates expression of antioxidant enzymes and heme oxygenase-1 (HO-1)

as signaling pathway for protection of cell against oxidative stress and inflammation [55, 56]. The result of our research show that perfusion with cisplatin and $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ in both doses induced increase in HO-1 expressions (Fig. 7a) as response of increase generating of oxidative stress biomarkers. This results correlate with results of other authors who showed that cisplatin after single dose can induce this higher expression for almost sixfold [40]. On the other hand, the perfusion with $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ did not induce significant changes in HO-1 expressions, that is in accordance with the smallest decrease of antioxidant enzymes (Fig. 3) Oxidative stress could increase Bax and caspase-3 expression, and that lead to apoptotic cell death. In the study of Liu and coworkers, it was shown that cisplatin treatment could increase Bax and caspase-3 expression compared with the control group [57, 58]. These results are in correlation with present ones and show that all examined complexes increase Bax expression (Fig. 7b).

Various approaches have been used in order to overcome disadvantages of cisplatin, such as concomitant usage of antioxidants, hydration of patients, and synthesis of novel cisplatin analogues. In our research, we aimed to test the last-mentioned strategy, and compared the effects of cisplatin analogues on oxidative stress biomarkers after acute administration in isolated rat heart. Based on aforementioned results, it's obviously that different platinum complexes had various potential to induce oxidative stress. The main difference between these complexes is in structure of stabile ligands. In study that dealt with the kinetic properties of complexes, it is observed that voluminosity of stabile ligands affects the speed of substitution reaction [59–61]. In that sense, complexes with more voluminosity stabile ligands, such as $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$, slower subject to substitution reaction with sulfur-donor endogen molecules (proteins, enzymes), than cisplatin [62]. Cyclohexane ring, contained in dach ligands, has positive inductive effects, so central metal ion of platinum(II) become less electronegative which explain slower substitution reactions [60]. Based on the results of our study, we can assume that lower ability of $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ to induce oxidative stress is due to slower entry into substitution reactions with endogenous molecules than cisplatin. On the other hand, introducing the pyridine ring into coordination sphere of the complex, such as $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$, is achieved a significantly higher reactivity of complexes. The higher reactivity of the complex is explained by electronic communication pyridine rings and metal ions [63, 64]. In addition, it can be seen and the π -electron density feedback donation from an input of the ligand to the chelating ligand, which leads to stabilization of the transition state of a square bipyramid-in relation to the ground state [65].

Based on the previous described results, platinum complexes have different ability to provoke oxidative

stress. We have shown at the isolated rat heart model that modification of labile ligands in structure of platinum(II) complex could greatly affect the ability of producing particularly ROS. Introducing the 1,2-diaminocyclohexane and 2,2':6',2''-terpyridine ligands instead of amino ligands, decrease the production of ROS. Introducing 2,2':6',2''-terpyridine ligands provoked the smallest changes in antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation and expression of heme oxygenase-1, that undoubtedly indicated that this complex had the lowest impact on redox status in heart tissue. These findings may be useful in synthesis of novel platinum analogues that potentially have lower adverse effects. However, the fact that platinum complexes could induce toxic effects in the heart by other mechanisms shouldn't be neglected.

References

- Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H (2010) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol* 62:45–52. doi:10.1016/j.etp.2009.02.066
- Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK (2009) Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol* 47:1176–1183. doi:10.1016/j.fct.2009.02.007
- Paolicchi A, Sotiropoulou M, Perego P, Daubeuf S, Visvikis A, Lorenzini E, Franzini M, Romiti N, Chieli E, Leone R, Apostoli P, Colangelo D, Zunino F, Pompella A (2003) Gamma-glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. *Eur J Cancer* 39:996–1003
- Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH (2009) Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 63:79–85. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.004
- Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ (2006) Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* 12:5817–5825. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1037
- Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, Liedert B, Yoon MS, Kaube H, Limmroth V, Thomale J (2007) Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J Neurosci* 27:9451–9457. doi:10.1523/JNEUROSCI.0523-07.2007
- Kintzel PE (2001) Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug Saf* 24:19–38
- Rabik CA, Dolan ME (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33:9–23. doi:10.1016/j.ctrv.2006.09.006
- Raja W, Mir MH, Dar I, Banday MA, Ahmad I (2013) Cisplatin induced paroxysmal supraventricular tachycardia. *Indian J Med Paediatr Oncol* 34:330–332. doi:10.4103/0971-5851.125262
- Guglin M, Aljayeh M, Saiyad S, Ali R, Curtis AB (2009) Introducing a new entity: chemotherapy-induced arrhythmia. *Europace* 11:1579–1586. doi:10.1093/europace/eup300
- Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M (2008) Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol* 130:688–695. doi:10.1309/AJCPB66LRIIVMQDR
- Khan S, Chen CL, Brady MS, Parameswaran R, Moore R, Hassoun H, Carvajal RD (2012) Unstable angina associated with cisplatin and carboplatin in a patient with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 30:e163–e164. doi:10.1200/JCO.2011.38.7852
- Ryberg M (2012) Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2012:555–559. doi:10.14694/EdBook_AM.2012.32.555
- Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA (2016) An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology* 371:58–66. doi:10.1016/j.tox.2016.10.001
- El-Awady ESE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A (2011) Cisplatin-induced cardiotoxicity: mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 650:335–341. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.085
- Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J (2010) Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:460–465. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05323.x
- Chirino YI, Pedraza-Chaverri J (2009) Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 61:223–242. doi:10.1016/j.etp.2008.09.003
- Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK (2003) Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 142:178–186. doi:10.1016/S0022-2143(03)00111-2
- Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ, Osanto S (1998) Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol* 9:1331–1337
- Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejovic I, Zivkovic V, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V (2016) The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 242:34–46. doi:10.1016/j.toxlet.2015.11.028
- Chowdhury S, Sinha K, Banerjee S, Sil PC (2016) Taurine protects cisplatin induced cardiotoxicity by modulating inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *BioFactors* 42:647–664. doi:10.1002/biof.1301
- Najam R, Bano N, Mirza T, Hassan S (2014) Adverse effects on cardiovascular status and lipid levels of albino Wistar rats treated with cisplatin and oxaliplatin in combination with 5 Fluorouracil. *Pak J Pharm Sci.* 27(5):1409–1418
- Dasari S, Tchounwou PB (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740:364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T (1996) Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol* 52:1855–1865
- Zhang CX, Lippard SJ (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 7:481–489
- Bugarčić ŽD, Bogojeski J, Petrović B, Hochreuther S, van Eldik R (2012) Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans* 41:12329–12345. doi:10.1039/c2dt31045g
- Bugarčić ZD, Heinemann FW, van Eldik R (2004) Substitution reactions of [Pt(terpy)X]₂⁺ with some biologically relevant

- ligands. Synthesis and crystal structure of [Pt(terpy)(cyst-S)](ClO₄)₂·0.5H₂O and [Pt(terpy)(guo-N7)](ClO₄)₂·0.5-guo·1.5H₂O. Dalton Trans 21:279–286. doi:10.1039/b311056g
28. Pouna P, Bonoron-Adèl S, Gouverneur G, Tariosse L, Besse P, Robert J (1995) Evaluation of anthracycline cardiotoxicity with the model of isolated, perfused rat heart: comparison of new analogues versus doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 35:257–261
 29. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
 30. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
 31. Auclair C, Voisin E (1985) Nitroblue tetrazolium reduction. In: Ra Greenvald (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton, pp 123–132
 32. Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161–170
 33. Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61:882–888
 34. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105(121–126):25
 35. Beutler E (1984) Superoxide dismutase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, Philadelphia, pp 83–85
 36. Saksida T, Nikolic I, Vujicic M, Nilsson UJ, Leffler H, Lukic ML et al (2013) Galectin-3 deficiency protects pancreatic islet cells from cytokine-triggered apoptosis in vitro. *J Cell Physiol* 228:1568–1576
 37. Galanski M, Keppler BK (1995) Synthesis and characterization of new ethylenediamine platinum(IV) complexes containing lipophilic carboxylate ligands. *Metal Drugs* 2:57–63
 38. Demkow U, Biatas-Chromiec B, Stelmaszczyk-Emmel A, Radzikowska E, Wiatr E, Radwan-Rohrenscheff P, Szturmowicz M (2011) The cardiac markers and oxidative stress parameters in advanced non-small cell lung cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *EJIFCC* 22:6–15
 39. Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E, Varalakshmi P (2004) Protective effect of DL-alpha-lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. *Chem Biol Interact* 151:13–19. doi:10.1016/j.cbi.2004.10.004
 40. El-Sawalhi MM, Ahmed LA (2014) Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 207:58–66. doi:10.1016/j.cbi.2013.11.008
 41. Saleh RM, Awadin WF, El-Shafei RA, Elseady YY, Wehaish FE, Elshal MF (2015) Cardioprotective role of tadalafil against cisplatin-induced cardiovascular damage in rats. *Eur J Pharmacol* 765:574–581. doi:10.1016/j.ejphar.2015.09.015
 42. Lushchak VI (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acid* 2012:736837. doi:10.1155/2012/736837
 43. Abdellatif SA, Galal AA, Farouk SM, Abdel-Daim MM (2017) Ameliorative effect of parsley oil on cisplatin-induced hepatocardiotoxicity: a biochemical, histopathological, and immunohistochemical study. *Biomed Pharmacother* 86:482–491. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.038
 44. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S (2012) Ameliorating effect of DL-α-lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther* 6:147–156
 45. Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispé JR (1996) Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1):L150–L158
 46. Kim JW, Sahm H, You J, Wang M (2010) Knock-down of superoxide dismutase 1 sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 30(7):2577–2581
 47. Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97–112
 48. Valdivia A, Pérez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordán J (2009) Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem*. 65(2):195–208
 49. Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F (2009) Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxid Redox Signal* 11(11):2701–2716. doi:10.1089/ars.2009.2692
 50. Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321–336
 51. Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, Cohen SD, Gordon MK, Gerecke DR, Zhou P, Laskin DL (2002) Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 184:27–36
 52. Harstad EB, Klaassen CD (2002) iNOS-null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 175:83–90
 53. Nishikawa M, Nagatomi H, Nishijima M, Ohira G, Chang BJ, Sato E, Inoue M (2001) Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. *Cancer Lett* 171:133–138
 54. Davis CA, Nick HS, Agarwal A (2001) Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 12:2683–2690
 55. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F, Ciccoli L, Valacchi G (2013) NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 267(1):30–40
 56. Surh YJ, Kundu JK, Na HK (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 74(13):1526–1539
 57. Liu Q, Si T, Xu X, Liang F, Wang L, Pan S (2015) Electromagnetic radiation at 900 MHz induces sperm apoptosis through bcl-2, bax and caspase-3 signaling pathways in rats. *Reprod Health* 12:65. doi:10.1186/s12978-015-0062-3
 58. Liu Q, Hu S, He Y, Zhang J, Zeng X, Gong F, Liang L (2017) The protective effects of Zhen-Wu-Tang against cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *PLoS ONE* 12(6):e0179137. doi:10.1371/journal.pone.0179137
 59. Howe-Grant ME, Lippard SJ (1980) Aqueous platinum(II) chemistry: binding to biological macromolecules. In: Siegel H (ed) *Metal ions in biological systems*, 11th edn. Marcel Dekker, New York, pp 63–125
 60. Summa N, Schiessl W, Puchta R, van Eikema Hommes N, van Eldik R (2006) Thermodynamic and kinetic studies on reactions of Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles. *Inorg Chem* 45:2948–2959. doi:10.1021/ic051955r
 61. Bogojeski J, Bugarčić ŽD, Puchta R, Eldik R (2010) Kinetic studies on the reactions of different bifunctional platinum(II) complexes with selected nucleophiles. *Eur J IC* 2010:5439–5445
 62. Hofmann A, Jaganyi D, Munro OQ, Liehr G, van Eldik R (2003) Electronic tuning of the lability of Pt(II) complexes through pi-acceptor effects. Correlations between thermodynamic, kinetic, and theoretical parameters. *Inorg Chem* 42:1688–1700
 63. Hofmann A, Dahlenburg L, van Eldik R (2003) Cyclometalated analogues of platinum terpyridine complexes: kinetic study of the

- strong sigma-donor cis and trans effects of carbon in the presence of a pi-acceptor ligand backbone. *Inorg Chem* 42:6528–6538
64. Petrovic BV, Djuran MI, Bugarcic ZD (1999) Binding of platinum(II) to some biologically important thiols. *Met Based Drugs* 6:355–360
65. Jaganyi D, Hofmann A, van Eldik R (2001) Controlling the lability of square-planar Pt(II) complexes through electronic communication between π -acceptor ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 40:1680–1683