

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Mr Мирослав Мишић

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

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

## САДРЖАЈ

<b>УВОД</b> .....	4
<b>1. ЈЕДИЊЕЊА ПЛАТИНЕ У БИОМЕДИЦИНИ</b> .....	4
1.1. Прва генерација .....	5
1.2. Друга генерација .....	7
1.3. Трећа генерација .....	9
1.4. Четврта генерација .....	14
<b>2. ФИЗИОЛОШКА ФУНКЦИЈА СРЦА И КАРДИОВАСКУЛАРНОГ СИСТЕМА</b> .....	16
2.1. Кардиоваскуларни систем и коронарна циркулација .....	16
2.2. Срчани циклус .....	17
2.3. Контрактилност срца .....	18
<b>3. КАРДИОТОКСИЧНОСТ ЈЕДИЊЕЊА ПЛАТИНЕ КОЈА СЕ КОРИСТЕ У БИОМЕДИЦИНИ</b> .....	20
<b>4. УЛОГА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У КАРДИОТОКСИЧНОСТИ</b> .....	20
<b>ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ</b> .....	24
<b>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД</b> .....	25
1. ВРСТА СТУДИЈЕ .....	25
2. ПОПУЛАЦИЈА НА КОЈОЈ СЕ РАДИЛО ИСТАРЖИВАЊЕ .....	31
3. ВАРИЈАБЛЕ .....	32
3.1. Независне варијабле.....	32
3.2. Зависне варијабле .....	33

3.2.1. Кардиодинамски параметри .....	33
3.2.2. Биохемијски параметри .....	34
3.2.2.1. Параметри оксидативног стреса .....	34
3.2.2.2. Ензимски параметри некрозе миокарда .....	41
4. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА .....	42
5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	42
<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	44
1.КАРДИОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ .....	44
2.БИОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ .....	56
2.1.Параметри оксидативног стреса .....	56
2.2.Ензимски параметри некрозе миокарда .....	61
<b>ДИСКУСИЈА</b> .....	64
1.Ефекти платина комплекса на кардиодинамику изолованог срца пацова .....	64
2.Утицај платина комплекса на оксидативно оштећење миокарда .....	69
<b>ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	73
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	74

# ЕФЕКТИ Pt(IV) КОМПЛЕКСА НА КОНТРАКТИЛНОСТ, КОРОНАРНИ ПРОТОК И ОКСИДАТИВНИ СТРЕС ИЗОЛОВАНОГ СРЦА ПАЦОВА

## УВОД

### 1. Једињења платине у биомедицини

Најзначајније биолошко дејство платине је употреба њених појединих једињења у хемиотерапији [1,2]. После рада Бернета Розенберга (*Barnett Rosenberg*), који је у другој половини шездесетих година XX века открио цитостатске ефекте цисплатине и сродних комплекса јавља се шири интерес за фармаколошке особине металних једињења [3].

Инпресиван учинак који је постигла цисплатина у хемиотерапији појединих карцинома усмерио је истраживања у правцу развоја нових деривата са побољшаним фармаколошким својствима, па је тако цисплатина постала прототип јединствене класе антитуморских агенаса. Ови агенси данас обухватају много деривата, међутим много њих је и напуштено још у преклиничким или раним клиничким фазама свог развоја, тако да је само неколико ушло у клиничку праксу. Од свих агенаса платине који су уведени у клиничку праксу само је један (карбоплатин) одобрен за употребу у целом свету, док су остали добили регионално одобрење (Недаплатина одобрена у Јапану; Лобаплатина одобрена у Кини). Сви клинички одобрени лекови као и већина антитуморских агенаса који су били или су тренутно у различитим фазама развоја припадају класичном типу платинских (II) комплекса *cis*-конфигурације. Поред њих извесно време пажња је усмерена на једињења која припадају типу октаедралним комплексима платине (IV) [3].

Превођење двовалентних, Pt(II)-комплекса платине у одговарајуће четворовалентне Pt(IV)-комплексе платине, вршено је ради добијања кинетички инертних аналога (мање реактивни од платина (II) аналога) са већом биорасположивошћу [4]. Због адекватне липофилности и растворљивости у води неки комплекси Pt(IV) потенцијално се могу и орално примењивати, што би довело до једноставнијег лечења пацијената [5].

Антитуморска активност Pt(IV) комплекса се огледа у биотрансформацији (редукцији) до активног Pt(II) облика, *in vivo*, који даље испољава цитотоксичне ефекте аналогне цисплатини или њеним дериватима, због чега се овакви комплекси називају прекурсори двовалентних аналога [6]. Уочена значајна одступања од овог правила до данас су остала изузеци [3].

Истраживања на комплексима платине (IV) из поменутих разлога се настављају [3-6].

### 1.1. Прва генерација

Прво комплексно једињење платине које се више од три деценије користи у медицини као антитуморски агенс (цитостатик) је цисплатина, *cis*-диаминедихлороплатинум(II), (схема 1.) *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] [7]. Цисплатина је по први пут синтетисана 1845. године од стране Мишел Пејрона (*Michele Peyrone*) по коме је овај молекул и назван Пејронов хлорид. 1965. године откривена је биолошка активност цисплатине од стране Бернета Розенберга (*Barnett Rosenberg*) и Кавалиериа (*Cavaliери*) [8]. Као прво комплексно једињење платине за лечење карцинома тестиса и једњака, 1978. године регистрована је цисплатина [9].

Приликом интравенске примене, цисплатина се на нивоу крви везује за протеине плазме (албумин, трансферин,  $\gamma$ -глобулин) и у малој мери за еритроците[3].

Механизам антитуморског дејства цисплатине огледа се у интеракцији са молекулом ДНК [10]. Комплекси платине на туморске ћелије делују тако што спречавају синтезу нових молекула ДНК и што спречавају поправку платинованих молекула ДНК. Након што доспе у ћелију молекул комплекса платине отпусти хлоридне или оксалатне анјоне и веже два молекула воде. Настаје позитивно наелектрисан молекул који може да интерреагује даље са нуклеофилним молекулима у ћелији као што су ДНК, РНК и протеини [11]. Молекули цисплатине се ковалентно везују за молекул ДНК у само 5-10% случајева и то за N7 атом имидазоловог прстена аденозина или гуанозина. Остатак, односно 90-95% молекула цисплатине се веже за различите протеине [12], из тог разлога услед лечења појављују се нежељена дејства (мучнина, повраћање, опадање косе) и тешка токсичност у

виду тешке токсичности (нуротоксичност, ототоксичност, нефротоксичност). Терапија цисплатином се такође повезује и са кардиотоксичношћу [13-18]. Мучнина и повраћање се могу ублажити премедикацијом [16]. Због нефротоксичности коју изазива цисплатина уведена је прехидрација и форсирана диуреза и на тај начин се спречава акутна бубрежна инсуфицијенција [20]. Неуротоксичност коју изазива цисплатина огледа се кумулативној периферној неуропатији која је најчешће реверзибилна након завршетка терапије [21]. Ототоксичност настала као последица лечења цисплатином јавља се због оштећења ћелија у Кортијевом органу. Ово оштећење је иреверзибилно тако да је могућа перцепција само звука високе фреквенције [22]. Учињено је много напора на развоју хемопротективних лекова који ублажавају нежељене ефекте, а да притом не утичу на антитуморску ефикасност при терапији са цисплатином. Хемопротектант који је широко прихваћен је амифосфатин. Овај медикамент се користи уз терапију са цисплатином што у извесној мери утиче на смањење учесталости нефротоксичности и неуротоксичности [3].

Поред доказане клиничке успешности не може се игнорисати чињеница да чак и код карцинома са великом брзином одговора (осим код карцинома тестиса где је стопа излечења преко 90 %) терапеутски успех још увек је ограничен у великом броју случајева. Под терапеутским ограничењем се сматра непотпуно реаговање или стварање резистенције на лек. Експериментално је доказано да терапијом створена резистенција није апсолутна. Концентрације потребне за терапеутску ефикасност су толико високе да се не могу давати пацијентима због токсичности која је лимитирајући фактор при дозирању [3].

Поред свега цисплатина је лек избора у лечењу карцинома тестиса, главе, врата и мокраћне бешике [3].

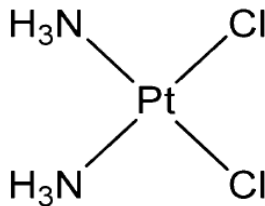


Схема 1. Структура цисплатине [3].

## 1.2. Друга генерација

С обзиром на то да је коришћење цисплатине ограничено недостацима (појава резистенције, нежељена дејства и тешка токсичност) фокус у развоју нових деривата био је на бољим фармакокинетичким и фармакодинамичким особинама. Када су одлазећи, лабилни монодентатни лиганди (јони хлора) замењени, стабилним бидентатним лигандима (нпр. дикарбоксилат), то је довело до мање токсичности нових агенаса (токсичност опада уколико опада лабилност одлазећег лиганда). Са друге стране комплекси са бидентни лигандима су задржали антитуморску активност. Значајно је и сазнање да се антитуморска активност губи када су лиганди сувише чврсто повезани у комплекс. Ове чињенице су упућивале на то да је антитуморска активност одређена природом везе између платине и одлазећег лиганда [23, 24].

Лекови на бази платине који припадају другој генерацији су: карбоплатина и недаплатина.

**Карбоплатина**, *cis*-диамин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платинум(II), (схема 2.) је платина лек друге генерације који је одобрен у целом свету као мање токсична алтернатива цисплатини. Међу платина комплексима то је први лек после цисплатине који је ушао у широку употребу. Разлози за то су: не изазива нефротоксичност у уобичајеним дозама, па се зато може давати без хидрације и диуретика; изазива много мању неуротоксичност и ототоксичност у односу на цисплатину; гастроинтестинални нежељени ефекти (мучнина и повраћање) нису изражени. Поред наведених предности, треба рећи да постоје и недостаци овог лека у виду мијелотоксичности са израженом тромбоцитопенијом. Мијелотоксичност лимитира терапијску дозу овог лека. Све ове наведене особине дају укупно предност карбоплатини у односу на цисплатину у случају високо дозиране хемијотерапије, у лечењу неких тумора оваријума и плућа [25-27].

Клиничка ефикасност карбоплатине већа је него што би се могло очекивати на основу ниске реактивности према ДНК. Код изоловане ДНК потребно је око 100 пута већа концентрација карбоплатине у односу на цисплатину да би се постигла иста стопа платинације ДНК [28]. Док су клиничке студије показале да је између 4 и 20 пута већа доза карбоплатине довољна да индукује једнаке нивое ДНК платинације код третираних

пацијената [29,30]. Различита фармакокинетика карбоплатине у односу на цисплатину, посебно слабије везивање за протеине и дуже опстајање у плазми, сигурно су заслужни за овај ефекат [3], међутим остаје непознато да ли је то само њихов допринос.

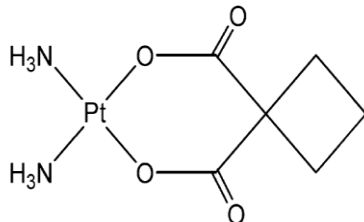


Схема 2. Структура карбоплатине [3].

**Недаплатина**, *cis*-диаминегликолатоплатинум(II), (схема 3.) је такође платина лек друге генерације који је добио регионално одобрење, користи се у Јапану за неколико индикација јер показује мање токсиколошке особине у односу на цисплатину. Мијелотоксичност је фактор који лимитира терапијску дозу овог лека. Примењује се у инфузији. Фармакокинетичка својства недаплатине слична су карбоплатини. Слабије се везује за протеине у односу на цисплатину. Око 80% лека опстаје у плазми 2,5h после давања инфузијом. Излучује се уротропно, и то брже у односу на цисплатину (50% лека се елиминише у првих 8h) [31,32]. Примећено је да недаплатина испољава антитуморску активност према неким туморима тестиса, уринарног тракта, простате, главе, врата, материце и плућа [33,34]. У поређењу са цисплатином примећена је сличност у антитуморској активности, али само спорадично и то на пацијентима који су претходно били лечени цисплатином. Не постоји јасан доказ о било каквој предности недаплатине у односу на карбоплатину [35].

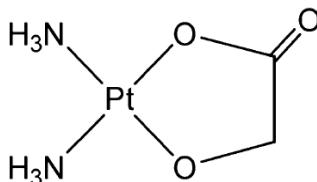


Схема 3. Структура недаплатине [3].



**Ипроплатина, мибоплатина и платина урацил плава** (*Platinum uracil blue* (PUB)) само су нека од платина једињења која су напуштена.

Ипроплатина, *cis*-дихлоро-*trans*-дихидроксибис(изопропиламин)платинум(IV), је први комплекс платине (IV) који је ушао у клиничка испитивања. У поређењу са карбоплатином није показала предност. Ова два лека су поређена у смислу реаговања и преживљавања болесника са узнапредовалим раком јајника. Коначно, развој ипроплатине заустављен је у III фази клиничких испитивања [36]. До III фазе клиничких испитивања „стигла“ је и мибоплатина, 1R,2R-пиролидинеметанамин, развој овог лека заустављен због слабије антитуморске активности у односу на цисплатину [37]. Платина урацил плава је агенс неодређене структуре, који је напуштен већ у I фази клиничких испитивања, због непредвидиве кардиотоксичности. Уочава се да је од првих 33 агенаса платине који су уведени у клиничка испитивања једино овај напуштен због кардиотоксичности [3].

### **1.3. Трећа генерација**

Трећа генерација једињења платине развијена је како би се решио проблем са резистенцијом ћелија тумора према већ постојећим једињењима платине (цисплатина, карбоплатина, недаплатина) која су ушла у клиничку праксу. Природна резистенција многих малигнитета ограничава распон индикација за коришћење одређеног антитуморског агенса. С друге стране стечена резистенција умањује ефекат након поновљених третмана било за исту или другу туморску болест код истог пацијента. Постоје четири главна механизма резистенције (редукција уноса лека, повећана детоксикација глутатионом или металотионином, појачана поправка платиноване ДНК и појачана толеранција платиноване ДНК) [3]. Ови механизми су доста проучавани на туморским ћелијама са стеченом резистенцијом при хроничном излагању цисплатини. Дошло се до сазнања да се два или више поменута механизма резистенције могу појавити истовремено, док није нађено да је један механизам резистенције нађен у свим ћелијама резистентним на цисплатину. Експериментима рађеним *in vivo* доказано је да је умерен а у неким случајевима чак и низак степен резистентности довољан да доведе до неуспеха у лечењу [38,39].

Поред великог напора да се синтетише једињење платине које нема унакрсну резистенцију са цисплатином и/или карбоплатином до сада је само једно једињење платине (оксалиплатина) показало клиничку активност према туморима природно резистентним на цисплатину (користи се код узнатредовалих колоректалних карцинома). То је допринело да се распон индикација за терапију базирану на платина лековима прошири [3]. Постоје једињења платине (нпр. Ормплатина (тетраплатина)) треће генерације која имају доказану антитуморску активност према појединим врстама карцинома, нажалост њихова клиничка примена није могућа првенствено због откривене неуротоксичности [40].

**Оксалиплатина, [PtCl<sub>2</sub>(dach)] и ормплатина (тетраплатина), [PtCl<sub>4</sub>(dach)]** су комплекси платине који садрже 1,2-диаминоциклохексан (DACH). *Cis*-дихлоро(1,2-диаминоциклохексан)платин(II) сматра се пионирским комплексом платине који садржи као лиганд 1,2-диаминоциклохексан (DACH). На експерименталним моделима тумора поменуто једињење је показало антитуморску активност. Међутим салаба растворљивост у води, спречавала је интравенску примену, а поред тога показало се да је његова антитуморска активност слабија од цисплатине. У покушају да се реше ови проблеми, истраживања су била усмерена у правцу развоја деривата са повећаном растворљивости у води и стабилним одлазећим групама (лигандима) [3]. Истраживањима *in vivo* доказано је да комплекси платине који садрже DACH лиганд не показују унакрсну резистенцију са цисплатином, као и да је и спектар активности ове групе једињења различит од цисплатине и карбоплатине [41]. Сви комплекси платине са DACH лигандом који су „стигли“ до клиничке праксе или клиничких испитивања, садрже најактивнији *trans* R,R-DACH изомер. Потенцијална предност ове групе једињења је умањена због откривене неуротоксичности, која представља ограничавајући фактор за дозирање једињења [42].

Механизми резистенције на цисплатину не могу да се користе за објашњење зашто комплекси платине који садрже DACH (диамин) лиганд немају унакрсну резистенцију са цисплатином [43]. Покушај да се овај феномен објасни преко диференцијалне апсорпције која је запажена код неких ћелија тумора, није дао резултате. Зато што неке туморске ћелије са стеченом резистенцијом на цисплатину акумулирају комплексе платине који садрже DACH (нпр. Оксалиплатина и ормплатина) у мањем обиму од цисплатине [44]. Постоје докази о интрацелуларној инкорпорацији платине у ДНК [45]. У интеракцији

платине са ДНК, присуство волуминозног DACH лиганда утиче на ДНК оштећења, али слабо утиче на саму интеракцију. Нису измењени ни брзина ни типови ни места адуката само се мења брзина конверзије монофункционалних у бифункционалне адукте, у поређењу са комплексима који садрже етилендиамин [46]. Присуство DACH лиганда у комплексу чини платинске ДНК адукте више цитотоксичним што је у корелацији са јачим ометањем репликације ДНК [45].

Оксалиплатина, (*trans*-R,R-1,2-диаминоциклохексан)оксалатоплатин(II), (схема 4.) је први лек на бази платине који је показао клиничку активност према туморима који су примарно резистентни на цисплатину. Такође је и први лек на бази платине који садржи DACH а који је одобрен за клиничку употребу у преко 60 држава. Примењује се код узнапредовалог колоректалног карцинома [3]. За разлику од цисплатине, оксалиплатина се не акумулира у плазми, већ у еритроцитима у највећој мери [47]. Оксалиплатин има мању хематолошку токсичност у односу на карбоплатину при терапијским дозама као и мању нефротоксичност у односу на цисплатину. Овај лек проузрокује нежељене ефекте на гастроинтестиналном тракту (мучнине и повраћање) који су били први лимитирајући фактори за дозирање. Гастроинтестинални проблеми решени су после успешно уведене профилаксе у виду примене антиеметика, тако да је било могуће терапијску дозу повећати до три пута. Даље повећање терапијске дозе је забрањено због неуротоксичности. Симптоми неуротоксичности изазване оксалиплатином повлаче се код већине пацијената између циклуса хемотерапије ако се ради о акутној, или након завршетка (прекида) терапије ако се ради о хроничној неуротоксичности, мада је опоравак спор и непотпун. Тако да је неуротоксичност главни проблем који отежава клинички развој оксалиплатина [48-50].

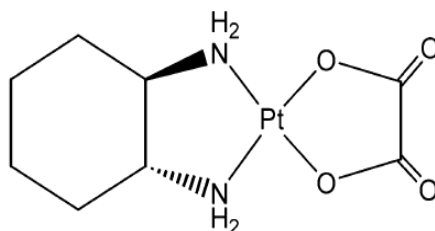


Схема 4. Структура оксалиплатине [3].

Ормплатина (тетраплатина), тетрахлоро(*trans*-1,2-диаминоциклохексан)платин(IV), (схема 5.) био је први комплекс платине (IV) који садржи DACH, који је укључен у клиничка испитивања. Овај агенс поседује антитуморску активност, смањену нефротоскичност и мијелотоксичност у односу на цисплатину и карбоплатину али не и неуротоксичност, док нема података о кардиотоксичности [51-54]. Неуротоксичност ормплатине је много јача чак и у поређењу са оксалиплатином. Овај феномен приписује се њиховим разликама у њиховој биотрансформационој кинетици. Без обзира на то што се после биотрансформације оба лека добијају исти производи, дихлоро(1,2-диаминоциклохексан)платин(II), ствара се много брже и у плазми је присутан у вишим концентрацијама после примене ормплатине на пацовима [55]. Јака неуротоксичност је главни разлог зашто је развој ормплатине заустављен у првој фази клиничког испитивања [56,57].

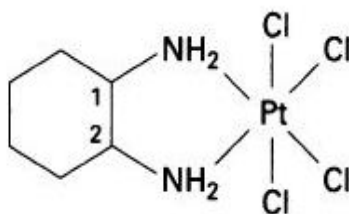


Схема 5. Структура ормплатине (тетраплатине) [52].

**Лобаплатина**, (1,2- циклобутандиметанаминам)[(2S)-2- хидроксипропанато (2-)-O1,O2] платинум(II), (схема 6.) као карбоплатина и оксалиплатина поседује нижу реактивност према изолованој ДНК у поређењу са цисплатином [58]. Фармакокинетичка својства лобаплатине су: слабо везивање за протеине и бржа уринарна екскреција у односу на карбоплатину. Антитуморска активност лобаплатине је доказана на пацијентима са карциномом јајника. Нежељена дејства током терапије су: анемија, мучнина и повраћање. Нефрототсичност, неуротоксичност и ототоксичност су примећене и јављају се половином терапије. Док тромбоцитопенија лимитира тераписку дозу овог лека. Лобаплатина је добила регионално одобрење, користи се у Кини, док је њен развој у остатку света заустављен у III фази клиничких испитивања [40,59].

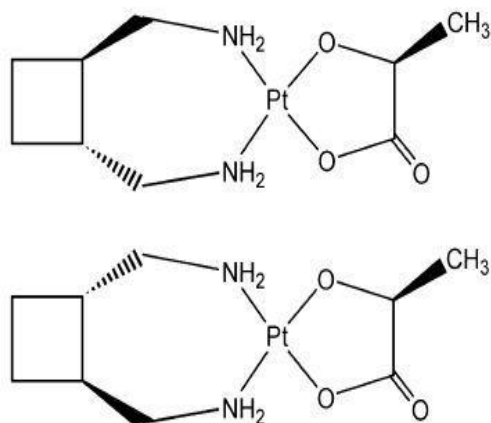


Схема 6. Структура лобаплатине (оба изомера) [3].

**Сатраплатина**, *bis*(ацетато)аминдихлоро(циклохексиламин)платин(IV), (схема 7.) је први лек на бази платине који је предвиђен за оралну примену а који је ушао у клиничка истраживања (налази се у III фази клиничких испитивања). Добро се раствара у води, стабилан је у киселом раствору и поседује већу липофилност него цисплатина. Овај лек је показао антитуморску активност сличну као интравенски дата карбоплатина. Конкретно, антитуморска активност је откривена код неких врста карцинома плућа и простате. Већа интестинална апсорпција у односу на карбоплатине и интраперитонеална у односу на цисплатину иду у прилог његовог потенцијала као оралног лека. Сатраплатина се акумулира у плазми после вишедневне (5-14 дана) оралне примене [60,61] што упућује да дозу треба додатно оптимизовати. Притом треба имати у виду да терапијску дозу лимитира првенствено тромбоцитопенија и леукопенија. У токсиколошки профил још су укључене нефротоксичност и неуротоксичност које су слабије изражене. Нежељена дејства у виду мучнине и повраћања су такође слабије изражена [62].

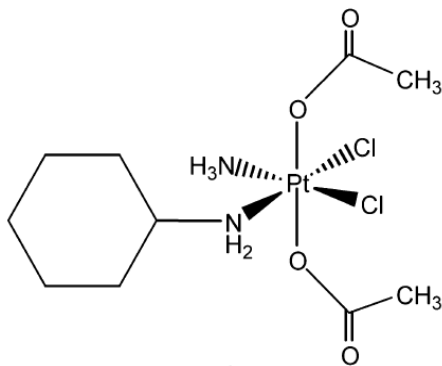


Схема 7. Структура сатраплатине [3].

#### 1.4. Четврта генерација

Већина антитуморских лекова који се тренутно користе у пракси после апликације се скоро равномерно распоређују широм целог тела што доводи до системске токсичности. Четврта генерација платина лекова развија се са циљем да идентификује агенс који поседује антитуморску активност ширег спектра, који селективно делује на туморско ткиво, а са друге стране да су мијелотоксичност, ототоксичност, нефротоксичност, неуротоксичност и кардиотоксичност слабије изражени, као и друга нежељена дејства (мучнина, гађење повраћање, алопесија и тд.) [63].

**AP5280** је полимер платине (II) (схема 8.) дизајниран да повећа терапијски индекс у односу на конвенционалне платина лекове. После интравенске примене AP5280 остаје неактиван у плазми, акумулира се у туморима због повећане капиларне пропустљивости. Након тога преко протеазе долази до цитотоксичне форме. Антитуморска активност је доказана на туморским моделима плућа и јајника. Максимална дозвољена доза је шест пута већа од карбоплатине *in vivo*. Токсичност која се јавља при терапији са цисплатином, карбоплатином и оксалиплатином при терапији са AP5280 слабије је изражена. Док су нежељена дејства у виду мучнине и повраћања изражена [64,65].

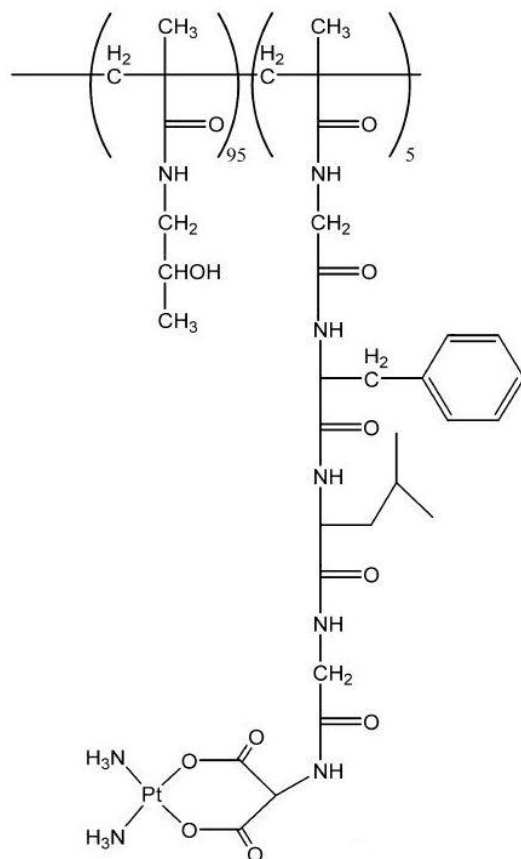


Схема 8. Структура AP5280 [3].

До сада је синтетизовано око 3000 различитих платина комплекса са циљем да се побољша антитуморска активност, смањи токсичност, превазиђе резистенција на конвенционалне цитостатике. Међутим само мали број комплекса је стигао до фазе клиничких испитивања а само пар је добило одобрење за клиничку примену. Поред платине (II) комплекса са којима се највише радило на овом пољу, комплекси платине (IV) комплекси поседују обећавајући антитуморски потенцијал [66] због већ претходно поменутих особина. На пример комплекси платине (IV) са лигандима који су деривати етилен дијамина на тестовима су показали антитуморску активност према ћелијама карцинома јајника. Ови комплекси Pt(IV) изазивају некрозу туморских ћелија и тиме показују антитуморски потенцијал. Антитуморску активност коју је на тестовима показао комплекс PtCl<sub>4</sub>(en) слабија је у односу на ону коју поседује комплекс PtCl<sub>4</sub>(dach) [66-68].

## 2. Физиолошка функција срца и кардиоваскуларног система

### 2.1. Кардиоваскуларни систем и коронарна циркулација

Кардиоваскуларни систем код сисара чине: крвни судови, крв и срце. Кардиоваскуларни систем је затвореног типа и има улогу транспорта материја у организму. Њиме се транспортују: кисеоник, угљендиоксид, храљиве материје, метаболичке материје, хормони и топлота. Кардиоваскуларни систем има улогу у размени материјала са циљем да обезбеди опстанак организма. Размена материја може бити између ћелија једног система, као и између ћелија једног система и спољашње средине. Крв се под нормалним околностима кроз крвне судове креће увек у једном и истом правцу. Циркулација крви је неопходна за живот, што значи да све компоненте које чине кардиоваскуларни систем морају да функционишу беспрекорно сваког тренутка. Кретање крви кроз систем крвних судова омогућава срчани рад правилног ритма и еластичност крвних судова [69-71].

Срце је централни орган кардиоваскуларног система. Оно је шупљи мишићни орган који има улогу пумпе, јер се ритмички контрахује што изазива континуирано кретање крви кроз велики и мали крвоток.

С обзиром на то да срце непрестано ради, веома је битно да стално буде снабдевено довољном количином крви. Срце не може исхрањивати крв која се налази у коморама или предкоморама зато што она припада функционалном крвотоку. Из тог разлога срце поседује посебан крвоток или срчану (коронарну) циркулацију. 5-10% крви која чини минутни волумен отпада на коронарну циркулацију. При најтежим физичким активностима коронарни проток се повећава и до пет пута [69-71].

Коронарну циркулацију чини артеријски и венски систем крвних судова. Коронарни артеријски систем чине две артерије, лева (*a. coronaria sinistra*) и десна (*a. coronaria dextra*). Ове артерије полазе од аорте и проводе крв кроз срчани мишић. Лева срчана артерија исхрањује леву преткомору и леву комору, предњи папиларни мишић у десној комори, мали део десне коморе, плућни конус, део срчане преграде и предњи зид



десне коморе. Десна срчана артерија исхрањује десну преткомору и комору, синоатријални чвор, задњи део срчане преграде, задњи папиларни мишић у левој комори и задњу страну леве коморе, као и булбус аорте. Венски коронарни систем завршава се коронарним синусом који се улива у десну предкомору [72,73]. Нормална коронарна циркулација је главни преуслов за правилан и несметан рад срца.

## 2.2. Срчани циклус

Срчани циклус чине две фазе: фаза контракције срца (систола) и фаза деконтракције срца (дијастола). Током систоле контрахују се коморе. Када притисак у комори надјача притисак у преткомори и васкуларном систему том приликом *AV* залистак се затвара, док се плућни и аортни записци отварају и крв отиче у плућно стабло и аорту. Нормалан притисак у аорти током систоле износи 120mmHg. У току дијастоле оксигенисана крв из плућа путем плућних вена стиже у леву преткомору, док преко доње и горње шупље вене дезоксигенисана крв стиже са периферије у десну преткомору. Током овог периода *AV* залистак је отворен и омогућава пролазак крви из преткоморе у комору. На крају дијастоле преткомора се контрахује и истискује крв у комору. Током дијастоле, притисак износи 70mmHg [74-76].

Трајање једне систоле и једне дијастоле чини срчани циклус који укупно траје 0,8 s. При сваком срчаном циклусу из леве коморе испумпа се количина крви која се назива **ударни или систолни волумен**. Производ ударног волумена и фреквенције срца чини **минутни волумен**. Количник ударног волумена и вентрикуло-дијастолног волумена (*VEDV*) представља **ејекциону фракцију (*EF*)** која под нормалним физиолошким околностима износи 60-80%. Њено смањење указује на оштећење срчаног мишића и слабију контрактилност [71,74-76].

Спроводни систем срца контролише срчани циклус, који започиње стварањем електричног импулса који се спроводи до срца и утиче да се прво контрахују обе преткоморе, а потом и обе коморе [77].

### 2.3. Контрактилност срца

Прво, најједноставније објашњење појма „контрактилност“ је да је то способност скраћивања срчаних мишићних влакана под утицајем надражаја.

Миокард чини мноштво мишићних влакана чијом контракцијом и релаксацијом се генерише срчани рад као пумпе.

**Хемодинамски аспект**, контрактилност (инотропност) срца објашњава као способност срца да генерише силу потребну за избацивање ударног волумена срца задатог претходним оптерећењем (*preload*) тј. вентрикуло-дијастолним волуменом (*VEDV*) и накнадним оптерећењем (*afterload*), односно артеријским притиском које срце ејекцијом мора савладати. Контрактилност је битан елемент који детерминише срчану функцију. Промене контрактилности срца производе значајне промене у величини ејекционе фракције. Повећање контрактилности води ка повећању ејекционе фракције и обратно. Ово је нарочито значајно у току физичке активности, јер омогућава одржавање вредности ударног волумена у условима повећане фреквенце срца. Убрзани рад срца смањује ударни волумен због скраћеног пуњења коморе у току дијастоле, што смањује енд-дијастолни волумен. Повећањем снаге срца, *VEDV* се смањује, што омогућава одржавање ударног волумена [71,78].

Најважнији механизам регулисања инотропности срца је аутономни нервни систем. Симпатикус има позитивно инотропно дејство на миокард преткомора и комора, док парасимпатикус (*n. vagus*) делује негативно на контрактилност преткомора. Многи ејекциони параметри коришћени су за описивање контрактилне функције срца. Већина фактора зависи од хемодинамских услова пуњења леве коморе.  $dP/dt \max$  (*Maximum rate of left ventricular pressure development*) је променљива која се користи у експерименталним и клиничким испитивањима за процену контрактилне функције леве коморе.  $dP/dt \max$  условљен је претходним оптерећењем, али је релативно независтан од накнадног оптерећења. У зависности од хемодинамских услова пуњења срца, анализа промена  $dP/dt \max$  леве коморе може се користити за процену индивидуалне функционалне резерве срца. [79,80].

**Ћелијско-молекуларни аспект** контрактилност одређује силом генерисаном у миозинским попречним мостовима и способношћу скраћивања саркомера. Миокард чини мноштво мишићних влакана која се састоје од специфичних срчаних контрактилних протеина (актина и миозина) и регулаторног протеина (тропонина). Такође ова влакна садрже различите ензиме који су од виталног значаја за преузимање енергије (креатин киназа и лактат дехидрогеназа). Велики утицај на рад срца имају минералне материје (калцијум и калцијум) и хормони (адреналин и тироксин). За разлику од скелетних мишића где постоји просторна сумација моторних јединица у генерисању силе при контракцији, у срчаном мишићу тесне везе обезбеђују низак електрични отпор и лако преношење акционог потенцијала са једне на другу ћелију. Дакле, под физиолошким условима промена контрактилности појединих срчаних миоцита се директно огледа у функцији срца као пумпе. Промена броја реактивних места између актина и миозина је основа фазне контроле контрактилности миокарда, коју описује *Frank-Starling*-ов закон. Кинетика и способност реакције попречних мостова са танким актинским филаментима регулисана је дејством регулаторних протеина. Најзначајнији је механизам који укључује регулаторни миозински лаки ланац (MLC2) и миозин везујући протеин C (MyBP-C),<sup>64</sup> који интерагују са полугама попречних мостова и регулишу њихово кретање у односу на осовину миозинских влакана. Срчани тропонин *T* и тропонин *I* су срчани регулаторни протеини који контролишу концентрацију калцијума посредно преко актина и миозина. Тропонин *I* је протеин који се налази једино у миокарду док је тропонин *T* нађен у малој концентрацији у скелетним мишићима. Већа концентрација срчаног тропонина служи као индикатор за оштећења миокарда код пацијената са болом у грудима [78,81-83]. Повећана концентрација калцијума делује стимулативно на рад срца. Са друге стране повећана концентрација калијума делује инхибиторно на рад срца [83]. Креатин киназа (*CK*) или креатин фосфокиназа (*CPK*) је ензим који катализира реакцију креатин и аденозин трифосфата (*ATP*) при чему настаје креатин-фосфат и аденозин дифосфат (*ADP*). У ткивима која брзо троше енергију, фосфокреатин служи као брзи извор за регенерацију *ATP*-а, па је креатин киназа врло важан ензим за то ткиво. Креатин киназа у крви у повишеним концентрацијама може бити индикатор инфаркта миокарда [84]. Велики утицај на рад срца имају и хормони. Од хормона за рад срца нарочито су важни адреналин и тироксин који имају позитивно инотропно дејство [85].

Различите супстанце могу да модификују хуморалну регулацију коронарне циркулације [86]. Међу домаћим истраживањима која су се бавила овом проблематиком проучавани су нпр: повезаност хомоцистеина са кардиоваскуларним болестима [87,88], ефекти специфичних инхибитора фосфодиестеразе на оксидативни стрес током коронарне ауторегулације на изолованом срцу пацова [89], ефекти једињења паладијума на изолованом срцу пацова [90] итд.

### 3. Кардиотоксичност једињења платине која се користе у биомедицини

Кардиотоксичности је честа компликација при коришћењу многих антитуморских агенаса и то је једно од главних ограничења у коришћењу ових лекова. Они могу снажно да утичу на квалитет живота и укупно преживљавање пацијената на којима се примењују, без обзира на онколошку прогнозу. Оштећења миокарда изазвана антитуморским лековима обично су ирверзибилна [91].

Због све већег броја онколошких пацијената чији третман захтева хемиотерапију, уводе се нови агенси који се користе и у комбинованој терапији са циљем да се повећа доза датог лека, међутим то са друге стране повећава учесталост кардиотоксичности [91].

Генерално, кардиотоксичност одређују генетски и фактори животне средине. Наследни фактор, старост, пол, исхрана, стресне ситуације, аритмије, претходне медицинске интервенције или терапија су повезани са додатним ризиком за развој кардиотоксичности [92,93]. Кардиотоксичност обухвата хетерогену групу поремећаја, од релативно бенигну аритмију па до потенцијално смртоносних као што су инфаркт миокарда и исхемије. Ови ефекти се могу јавити током или непосредно након третмана, а некад се могу јавити и неколико месеци или година након третмана [94,95].

У односу на време испољавања кардиотоксичност се може поделити на акутну, субакутну и хроничну. **Акутна** кардиотоксичност се испољава у току саме примене лека или неколико сати или дана након тога. Најчешће се манифестује у виду различитих поремећаја ритма који су махом реверзибилни. Сматра се да акутна кардиотоксичност не захтева никакву посебну терапију. **Субакутна** кардиотоксичност испољава се неколико

дана или недеља након примене кардиотоксичних лекова. Манифестује се најчешће са миокардним едемима и реверзибилном дисфункцијом миокарда. **Хронична** или касна кардиотоксичност се углавном испољава у виду хроничне конгестивне инсуфицијенције миокарда. Вишегодишње праћење и искуство у лечењу кардиолошких компликација насталих услед терапије цитостатицима је показало да на основу појаве клиничких симптома могу да се разликују два подтипа хроничне кардиотоксичности. Тип I који се јавља у року од годину дана након завршетка хемијотерапије, карактерише га деструкција односно иреверзибилно оштедење миокарда. Тип II који се јавља после више од годину дана након завршетка хемиотерапије, он је реверзибилан и карактерише га дисфункција миокарда [96-98].

Традиционални цитостатици међу које спада и цисплатина су кардиотоксични, њихова кардиотоксичност је иреверзибилна јер је повезана са смрћу миоцита [99,100]. Платина урацил плава (PUB) је агенс који је напуштен већ у I фази клиничких испитивања, због непредвидиве кардиотоксичности [93]. Аритмије, артеријска хипертензија и кардиоваскуларна дисфункција су најчешћи кардиоваскуларни поремећаји при терапији са антитуморским лековима новијих генерација. Ови поремећаји су бенигни и најчешће реверзибилни [99,100].

Превенција кардиотоксичности је важна мера приликом лечења онколошких пацијената хемиотерапијом. Ова мера обухвата: праћење срчаних функција, ограничење хемиотерапијске дозе, кад год је то могуће коришћење антитуморских лекова који нису кардиотоксични, правовремено дијагностиковање кардиоваскуларних поремећаја и коришћење кардиопротективних лекова [101].

Онколошки пацијенти који примају хемотерапију а код којих постоје предиспозиције за развој кардиоваскуларних болести захтевају исти терапијски приступ као кардиолошки пацијенти. Што указује да онколошки пацијенти захтевају мултидисциплинарни третман (онколога и кардиолога) како би се избегла нежељена кардиотоксичност приликом и након давања хемиотерапије. А то би била гаранција за оптималан наставак лечења [102].

#### 4. Улога оксидативног стреса у кардиотоксичности

Познато је да је оксидативни стрес, односно прекомерна производња реактивне врсте кисеоника (*ROS*) укључена у настанак и/или напредовање многих болести и поремећаја, укључујући кардиоваскуларне болести [103].

Оксидативни стрес настаје када дође до поремећаја равнотеже између прооксиданса и антиоксиданса, односно до стварања *ROS* и азота или до недостатка антиоксидационе заштите. Деликатна равнотежа између корисних и штетних ефеката реактивних врста је важан аспект аеробних организама, а остварује се механизмом тзв. редокс-регулације. Овај процес штити организме од оксидативног стреса и одржава редокс-хомеостазу контролом редокс-статуса *in vivo* [104].

Реактивне врсте кисеоника се непрестано стварају у ћелијама које су изложене аеробној средини. Антиоксидациони системи су коеволуирали с аеробним метаболизмом како би спречили оксидационо оштећење помоћу *ROS*.

Реактивне врсте кисеоника и азота се у физиолошким условима стварају током нормалног ћелијског метаболизма у разним биохемијским реакцијама. За обе врсте је доказано да могу да испољавају корисне и штетне ефекте. Створене у малим концентрацијама, испољавају низ физиолошких улога, као што су одбрана од инфекција, пренос сигнала у ћелијама, имунорегулација, неуротрансмисија. Штетни ефекти *ROS* подразумевају биолошка оштећења која се јављају у условима оксидативног стреса [104].

Утврђено је да неки цитостатици генеришу реактивне врсте кисеоника код болесника током лечења карцинома. Слободни радикали посебно *ROS* може бити узрочник апоптозе, која зависи од тежине оксидативног стреса [105].

Срце је изложено оксидативном стресу који настаје као последица слободних радикала који су добијени током хемотерапије. Миокард се састоји од ћелија које имају ограничену способност регенерације, што може да доведе до привременог или трајног губитка (смањења) функција [94,95].

Сматра се да антрациклини оштећују ћелије срца путем стварања слободних радикала, тј. стимулацијом оксидационог стреса. Предложени механизам подразумева

најпре редукцију доксорубицина (доксорубицин прима један електрон од слободног радикала) при чему се гради доксорубицин семихинон радикал. Потом ово једињење улази у реакцију са гвожђем градећи антрациклин-гвожђе комплекс. Овај комплекс с обзиром на то да има један неспарен електрон се опет понаша као слободни радикал који је јако токсичан [106,107].

Поред тога, доксорубицин може да се веже за ендотелни азот оксид (NO) и тако да последично смањи биорасположивост (концентрацију) NO, а повећа продукцију супероксид анион радикала ( $O_2^-$ ) и пероксинитрита ( $ONOO^-$ ). Ово све заједно доводи до настанка липидне пероксидације (TBARS), повећаног оксидативног стреса и оштећења ћелија миокарда тј. кардиотоксичности [107-110].

## ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

### Циљеви

#### 1. Генерални циљ

Евалуација ефеката акутне администрације Pt(IV)-комплекса, калијум-тетрахлоро-платината (II), цисплатине, 1,2-диамино-циклохексана и етилен-диамина на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката.

#### 2. Специфични циљеви

Испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

### Хипотезе

1. Акутна апликација Pt(IV)-комплекса, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Акутна апликација калијум-тетрахлоро-платината (II), може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Акутна апликација цисплатине, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
4. Акутна апликација 1,2-диамино-циклохексана, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
5. Акутна апликација етилен-диамина, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.



## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

### 1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

Експерименти су рађени у складу са Директивом ЕУ о заштити кичмењака који се користе за експерименталне и друге научне сврхе 86/609/ЕЕЦ (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципима етичности.

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

#### Метод ретроградне перфузије изолованог срца по Лангендорф-у

Лангендорфов модел изолованог срца има две могућности, у зависности од константног и променљивог параметра.

1. Перфузија изолованог срца при константном притиску у коронарном васкуларном кориту (коронарни проток је променљиви параметар);
2. Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито (притисак је променљиви параметар) [111].

Код првог експерименталног модела притисак је константан параметар, задат посебним системом цеви по моделу спојених судова, док се проток одређује флоуметријски.

Код другог експерименталног модела проток је константан параметар и задаје се преко инфузионе пумпе, док се притисак региструје преносом са врха срца до писача путем система преносника (*transducer*).

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

У овом нашем истраживању користили смо прву варијанту експерименталног модела. Перфузија изолованог срца при константном протоку користи инфузиону пумпу за одржавање овог параметра константним, док се притисак региструје преносом са врха срца до писача путем система преносника (*transducer*). Код овог модела је константан притисак задат посебним системом цеви по моделу спојених судова, док се проток одређује флуометријски. Како се у интактној циркулацији тежи одржању константног средњег притиска, са физиолошке тачке гледишта, овај модел има предност [111].

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

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

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

1. Система две вертикалне стаклене цеви, исте висине, при чему се цев мањег промера налази у цеви већег промера. Загрејана дестилована вода у воденом купатилу убацује се путем бочних цеви и система црева у цев већег промера (између поменутих цеви) и на тај начин се до 37°C загрева раствор у цеви мањег промера. У цев мањег промера, методом негативног притиска убацује се Кребс-Хенсенлеит-ов (*Krebs-Hensenleit*) раствор, који има сличне особине као екстрацелуларна течност. Цев мањег промера се завршава канилом, на коју се поставља препатат изолованог срца.

2. Резервоара чија је запремина 4 l, у коме се налази Кребс-Хенсенлеит-ов раствор, резервоар је спојен са унутрашњом цеви мањег промера и боцом са смешом гасова  $O_2/CO_2$ .
3. Боце са смешом гасова у односу  $O_2:CO_2= 95\%:5\%$ . Примена гаса под притиском има двојак дејство: постићи физиолошки ниво парцијалних притисака  $O_2$  и  $CO_2$  као у артеријској крви, и негативним притиском убацити раствор у систем цеви.
4. Каниле, која спаја изводну цев (цев мањег промера) система цеви и асцендентну аорту изолованог срца.
5. Воденог купатила, које загрева воду у спољашњој цеви. Топлота се затим преноси на раствор у ужој цеви, тако да на излазу из система раствор има температуру од  $37^\circ C$ .
6. Електростимулатора чије се електроде апликују на препарат изолованог срца у пределу срчаних предкомора, а то доводи до његовог регуларнијег рада.
7. Инфузионе пумпе, којом се жељени агенс администрира непосредно на споју каниле и асцендентне аорте. (у зависи од базалног коронарног протока).
8. Сензора – трансдјусера који су повезани са рачунаром.
9. Рачунара посебно прилагођеног за рад на овом апарату.



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

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

### **Експериментални протокол**

Након краткотрајне етарске наркозе, животиње се жртвују цервикалном дислокацијом. Непосредно после жртвовања ради се торакотомија чиме се омогућава комотан приступ срцу. Препарација срца врши се уз константно преливање хладним

физиолошким раствором, како би се очувала виталност препарата. Након тога се срце ослобађа од перикарда и пресецају се велики крвни судови базе срца, изузев асцендентне аорте кроз коју се врши ретроградна перфузија. Препарирано срце се ставља у посуду са леденим физиолошким раствором (-4 до -10°C) да би се смањили метаболички захтеви миокарда.

Након препарације срца, приступа се постављању срца на *Langendorff*-ов апарат убацивањем каниле у асцендентну аорту, затим се причврсти концем и повезује са систем цеви кроз који тече на 37°C загрејани Кребс-Хенсенлеит-ов раствор којим се перфундује срце. Перфузијом се обезбеђује аутономан рад срца који може да траје између 150 и 180 минута.

Процедура препарације и постављања срца на апарат траје највише 2-3 минута, како би се очувала виталност препарата.

Након успостављања ауторегулације срчаног рада, кроз направљен отвор на левој преткомори пресеца се митрална валвула чиме се омогућава увођење сензора (*transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) у леву комору који служи за регистровање кардиодинамских параметара.

Све студијске (експерименталне) групе подвргнуте су стабилизацији протока до 30 минута при коронарном перфузионом притиску од 70 cm H<sub>2</sub>O. По стабилизацији (0 минут), на експерименталним групама примењивани су испитивани реагенси, почевши од „0 минута“ (стабилизација) и на сваких 30 минута нова концентрација комплекса (30, 60, 90, 120 минут). Коронарни венски ефлуент сакупљан је на крају сваке примењене концентрације раствора ( 0', 30', 60', 90', 120') и у њему су мерени параметри оксидативног стреса и ензими некрозе миокарда.

## Експерименталне групе

Истраживање је било подељено у седам (7) експерименталних група:

- 1) контролна група (перфузија комплексним *Krebs-Hensenleit*-овим физиолошким раствором),
- 2) перфузија раствором тетрахлоридо(етилендиамин)платина(IV) комплекса ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l),
- 3) перфузија раствором тетрахлоридо(1,2-диаминциклохексан)платина(IV) комплекса ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l),
- 4) перфузија раствором калијум-тетрахлороплатината(II) ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l),
- 5) перфузија раствором цисплатине ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l),
- 6) перфузија раствором етилендиамина ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l),
- 7) перфузија раствором 1,2-диамино-циклохексана ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ mol/l).

Наведена једињења су перфундована у растућим концентрацијама: 34 nM/l цисплатина, 22 nM/l [Pt(dach)Cl<sub>4</sub>], 25 nM/l [Pt(en)Cl<sub>4</sub>]; 340 nM/l цисплатина, 220 nM/l [Pt(dach)Cl<sub>4</sub>], 250 nM/l [Pt(en)Cl<sub>4</sub>]; 3400 nM/l цисплатина, 2200 nM/l [Pt(dach)Cl<sub>4</sub>], 2500 nM/l [Pt(en)Cl<sub>4</sub>]; 34000 nM/l цисплатина, 22000 nM/l [Pt(dach)Cl<sub>4</sub>], 25000 nM/l [Pt(en)Cl<sub>4</sub>]; 340000 nM/l Cisplatin, 220000 nM/l [Pt(dach)Cl<sub>4</sub>], 250000 nM/l [Pt(en)Cl<sub>4</sub>].

## **2. ПОПУЛАЦИЈА НА КОЈОЈ СЕ РАДИЛО ИСТАРЖИВАЊЕ**

Истраживање је обухватило (12 животиња у групи) 84 пацова (Вистар албино сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе  $250\pm 30$ г). Животиње се набављане са фарме експерименталних животиња Војномедицинске академије (ВМА), Република Србија. Животиње се набављане 7-10 дана пре обављања експеримента због адаптације животиња на нову средину. У периоду адаптације животиње су чуване у металним кавезима, стандардних димензија. У просторији у којој су били смештени кавези, зоохемијски и микроклиматски услови у потпуности одговарају стандардима. Кавези су били смештени у просторију у којој су зоохемијски и микроклиматски услови који у потпуности одговарају стандардима. Животиње су храњене брикетима, смешом за исхрану лабораторијских животиња, стандардног сировинског и хигијенског састава.

### 3. ВАРИЈАБЛЕ

#### 3.1. Независне варијабле

Комплекси платине ( $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$  и  $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ ) су синтетисани у истраживачкој лабораторији одсека за Хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Република Србија. Цисплатина, етилендиамин, диаминоциклохексан, калијум-тетрахлороплатинат као и супстанце коришћене за добијање Кребс-Хенселејтовим раствора су набављене из Sigma-Aldrich GmbH, Немачка.

##### а) Тетрахлоридо(етилендиамин)платина(IV) комплекс, $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$

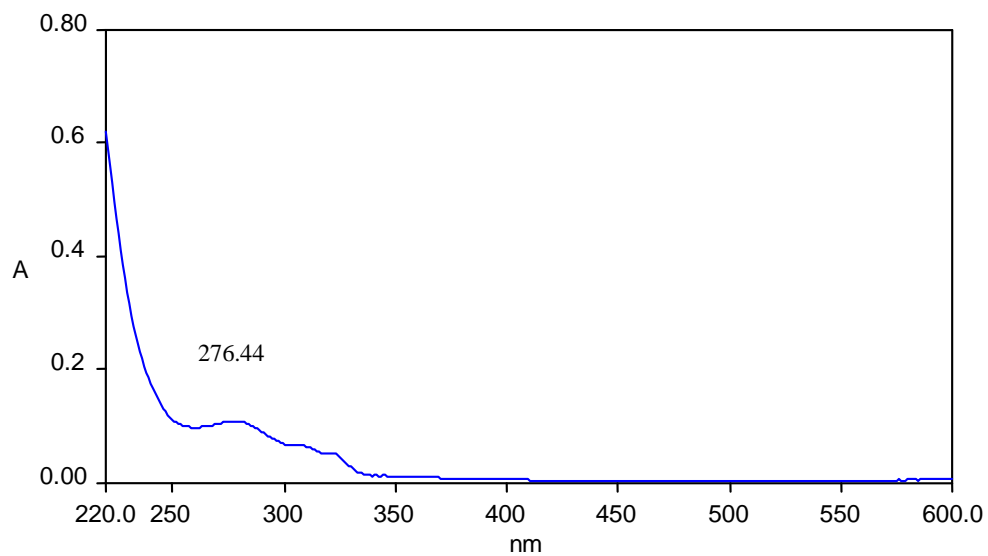
Синтеза комплекса  $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ : Комплекс  $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$  (0,059 g, 0,180 mmol) је растворен у 0,1 М NaCl на рН = 2 (0,01 М HCl), а затим је додато 5 cm<sup>3</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Тако добијена смеша је мешана на собној температури 30 минута, а затим је рефлуктована 10 минута уз загревање. После хлађења, суспензија је процеђена кроз *Millipore* филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,046 g (64 %). Израчунато за PtCl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>: С, 6.04; Н, 2.02; N, 7.06; Нађено: С, 5.92; Н, 1.82; N, 6.97.

Резултати микроанализе  $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$  комплекса

Mr(PtCl <sub>4</sub> N <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> )	397 g/mol		
	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато:	6.04	2.02	7.06
Нађено:	5.92	1.82	6.97



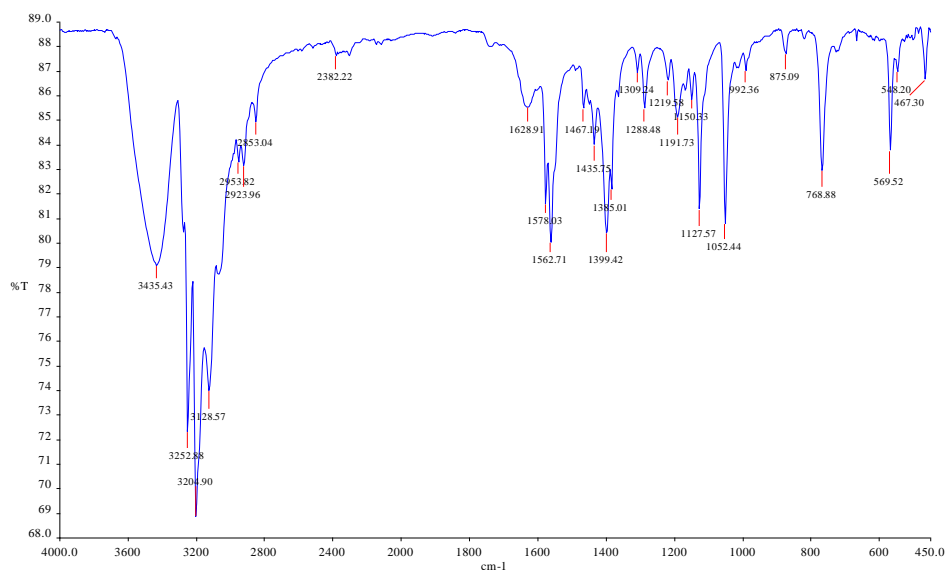
## UV-Vis spektrofotometrija



*UV-Vis spektar kompleksa [PtCl<sub>4</sub>(en)]*

Maksimum UV-Vis spektra kompleksa [PtCl<sub>4</sub>(en)] je 276.44 nm.

## IR спектроскопија



IR спектар комплекса  $[PtCl_4(en)]$

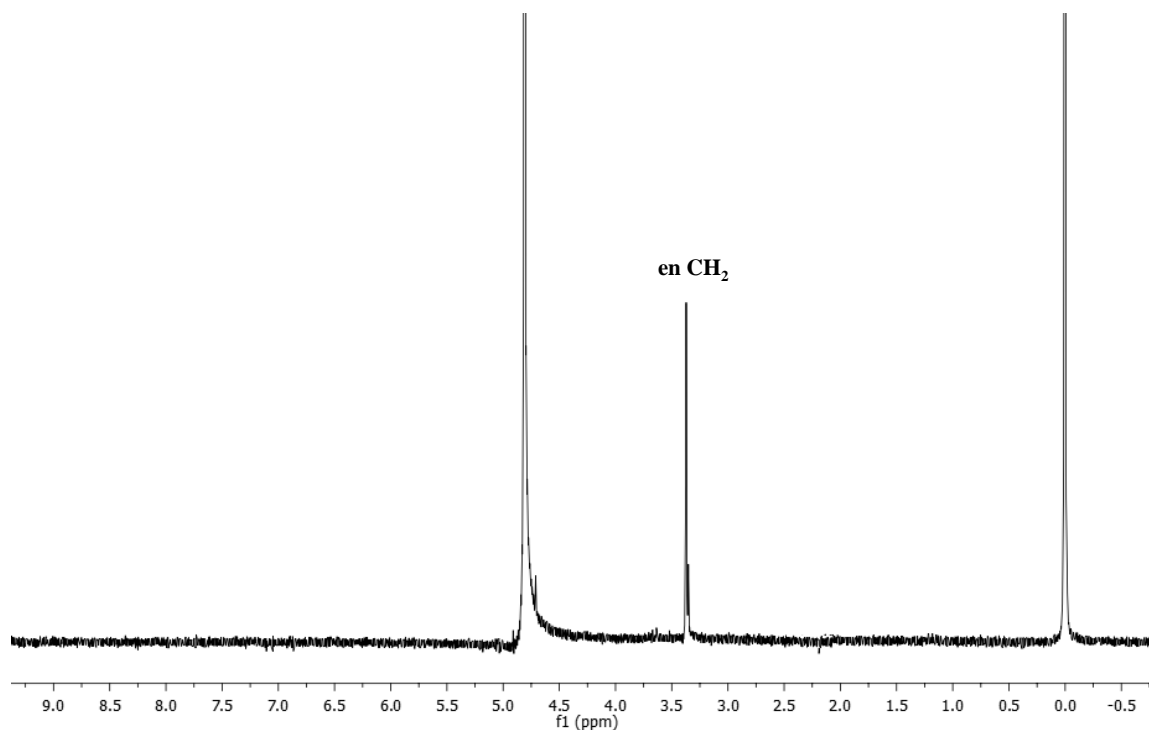
Важније траке у IR спектру комплекса  $[PtCl_4(en)]$

	$\nu(Pt-N)$ $cm^{-1}$	$(C-C)_{st}$ $cm^{-1}$	$(C-N)_{st}$ $cm^{-1}$	$(C-H)_{st}$ $cm^{-1}$	$\nu(N-H)$ $cm^{-1}$
$^1H$	768	1127	1052-1467	2853-2923	3128-3435

## NMR спектроскопија

$^1H$  NMR ( $\delta$ , ppm) комплекса  $[PtCl_4(en)]$  у  $D_2O$ :

3.37 (s, enCH<sub>2</sub>)



$^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa  $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$

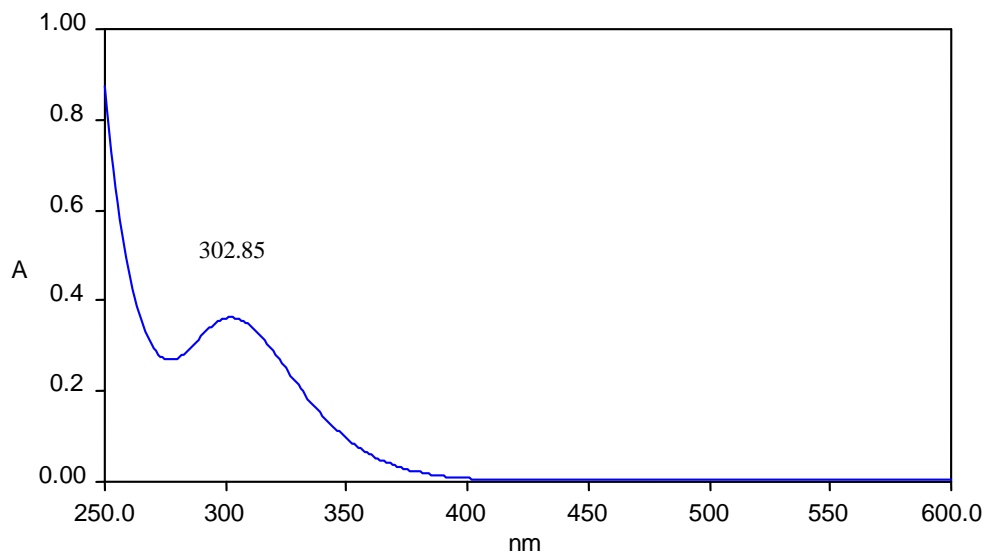
**б) Тетрахлоридо(1,2-диаминциклохексан)платина(IV) комплекс,  $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$**

Синтеза комплекса  $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ : Комплекс  $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$  (0,068 g, 0,179 mmol) је растворен у 0,1 М NaCl на рН = 2 (0,01 М HCl), а затим је додато 5 cm<sup>3</sup> 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Тако добијена смеша је мешана на собној температури 30 минута, а затим је рефлукована 10 минута уз загревање. После хлађења, суспензија је процеђена кроз *Millipore* филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,065 g (82 %). Израчунато за PtCl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: C, 15.98; H, 3.13; N, 6.21; Нађено: C, 15.68; H, 3.11; N, 6.18.

Резултати микроанализе  $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$  комплекса:

Mr(PtCl <sub>4</sub> N <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	451 g/mol		
	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато:	15.98	3.13	6.21
Нађено:	15.68	3.11	6.18

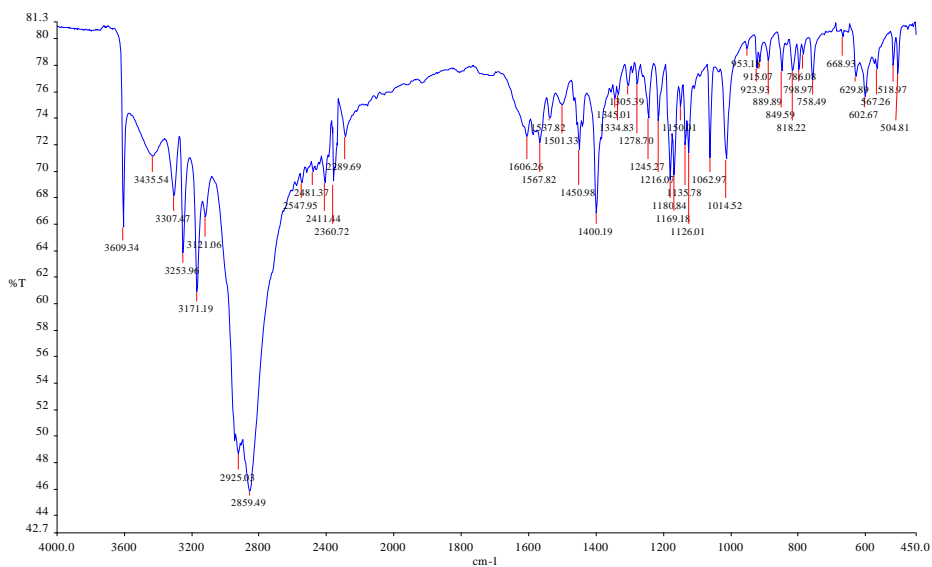
## UV-Vis spektrofotometrija



*UV-Vis spektar kompleksa  $[PtCl_4(dach)]$*

Максимум UV-Vis спектра комплекса  $[PtCl_4(dach)]$  је 302.85 nm.

## IR spektroskopija



*IR spektar kompleksa  $[PtCl_4(dach)]$*

Важније траке у IR спектру комплекса [PtCl<sub>4</sub>(dach)]

v(Pt-N) cm <sup>-1</sup>	(C-C)st cm <sup>-1</sup>	(C-N) st cm <sup>-1</sup>	(CH <sub>2</sub> )st cm <sup>-1</sup>	(C-H)st cm <sup>-1</sup>	v(N-H) cm <sup>-1</sup>
758	1126	1000-1400	800-1060	2859,2925	3171-3435

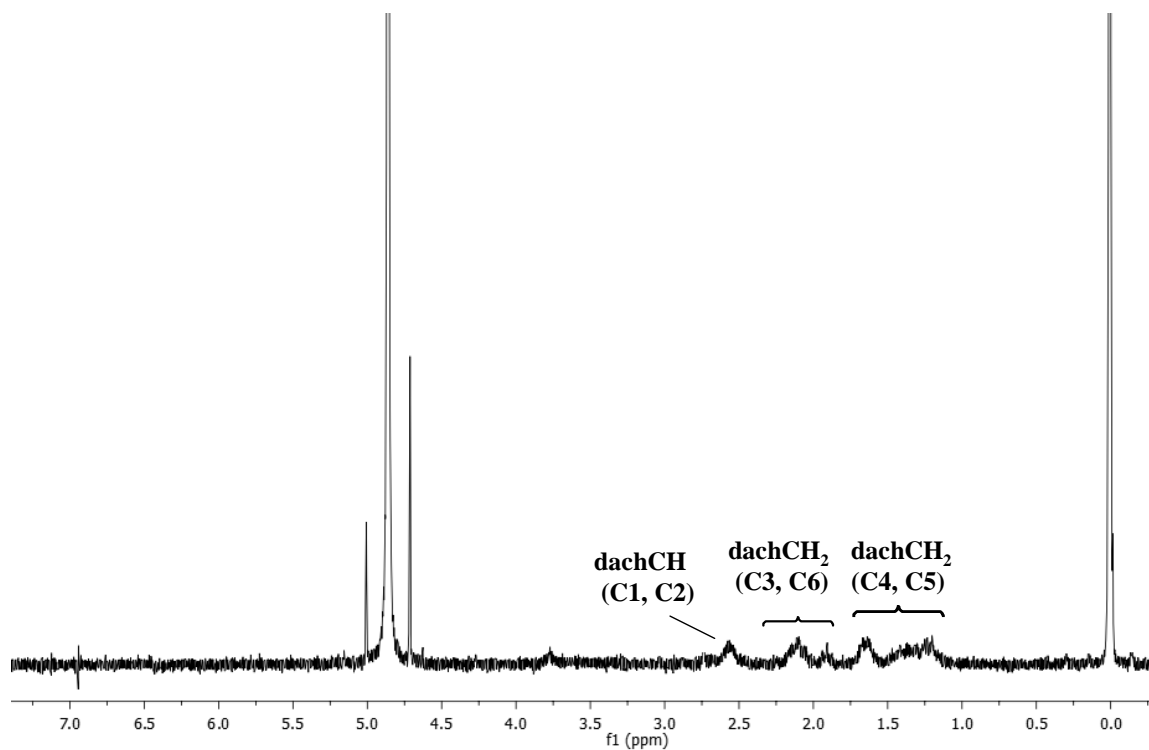
## <sup>1</sup>H NMR спектроскопија

<sup>1</sup>H NMR (δ, ppm) kompleksa [PtCl<sub>4</sub>(dach)] u D<sub>2</sub>O:

1.23-1.63 (m, dachCH<sub>2</sub>, C4, C5)

1.76-2.08 (m, dachCH<sub>2</sub>, C3, C6)

2.45-2.61 (m, dachCH, C1, C2)



<sup>1</sup>H NMR спектар комплекса [PtCl<sub>4</sub>(dach)]

### в) Калијум-тетрахлороплатинат (II)

Калијум-тетрахлороплатинат (II) је хемијско једињење са формулом  $K_2[Pt(Cl)_4]$ , релативна молекулска маса износи 415,09 g/mol и приметно се раствара само у води. Ова црвенкасто-наранџаста со је важан реагенс за припрему других комплекса платине.

### г) Цисплатина

Хемијска формула овог комплекса је  $PtCl_2(NH_3)_2$ , релативна молекулска маса износи 300,05 g/mol, раствара се у води. Цисплатина поседује антитуморску активност (прво комплексно једињење платине које је регистровано као цитостатик).

### д) Етилендиамин (en)

Етилендиамин је безбојна течност која има мирис сличан амонијаку и добро се раствара у води. Хемијска формула овог једињења је  $C_2H_4(NH_2)_2$ , релативна молекулска маса износи 60,10g/mol.

### ђ) 1,2-диамино-циклохексана (dach)

Хемијска формула овог једињења је  $C_6H_{10}(NH_2)_2$  релативна молекулска маса износи 114.19 g/mol, раствара се у води.

## Г.2. Зависне варијабле

### Г.2.1. Кардиодинамски параметри

Компијутерски програм коришћен за праћење Кардиодинамских параметара је *SPEL Advanced Haemosys software v. 3.24 (Experimetria LTD Budapest, Hungary)*. Баждарење апарата врши се на следећи начин: 1. Потребно је поставити оба сензора (сензор за перфузиони притисак и сензор за леву комору) тако да буду у нивоу постављеног изолованог срца и избацити ваздух из њих да не би сметао; 2. Коришћењем наведеног софтверског програма за сваки канал мерења подесити вредности: нивоа калибрације (*Calibration level*), доњи ниво на 0, горњи ниво на 100; распона калибрације

(*Scope Full Scale*) доњи ниво на 0, горњи ниво на 150 (за све параметре осим за *DLVP*, где су вредности за доњи ниво на 5, горњи ниво на 20). Увек се прво подешава доњи ниво, а затим горњи ниво вредности. Сензитивност се поставља на 1.

Сви кардиодинамски параметри биће континуирано мерени, при чему ћемо за статистичку обраду података користити репрезентативне вредности на старту и на крају сваке дате дозе реагенса.

Параметри који су регистровани су:

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

Изражава се као број откуцаја срца у минути.

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

Изражава се у mm Hg/s.

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

Изражава се у mm Hg.

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

Изражава се у mm Hg.

**д) Коронарни проток (*CF – Coronary flow*)**

Одређује се флуометријски, а изражава у ml/min.

## **Г.2.2. Биохемијски параметри**

### **Г.2.2.1. Параметри оксидативног стреса**

Сви параметри оксидативног стреса (одређивање нитрата ( $\text{NO}_2^-$ ), индекса липидне пероксидације (TBARS), супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ))

рађени су на Институту за физиологију Медицинског факултета у Крагујевцу, Република Србија.

### **Порекло реагенаса коришћених у истраживању параметара оксидативног стреса**

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

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

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** је набављен: калијум фосфат дихидрат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) и калијум дихидроген фосфат дихидрат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) од фирме „Alkaloid“ (Skoplje, Republika Makedonija), натријум хлорид ( $\text{NaCl}$ ) и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) од хемијске индустрије „Zorka“ (Šabac, Republika Srbija), D(+) глукоза (декстроза) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany), док су фенол црвено и пероксидаза из коњске ротквице (Horseradish peroxidaza – HRPO, EC 1.11.1.7) од фирме „Sigma Chemical Co.“ (St. Luis, USA).

Комплет реагенаса неопходних за спектрофотометријско одређивање **индекса липидне пероксидације** (thiobarbituric acid reactive substances, **TBARS**) је набављен: 2-

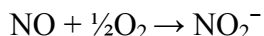


тиобарбитурна киселина (ТВА) и натријум хидроксид (NaOH) од фирме „Merk“ (Darmstadt, Germany).

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

#### а) Одређивање нитрита (NO)

Количину ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту одређиваћемо спектрофотометријском методом [112]. Како се у реакцији азот монооксида (NO) и кисеоника добија еквимоларна количина нитрита, количина ослобођених нитрита еквивалентна је количини ослобођеног азот монооксида:



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

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

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

Концентрација ослобођених нитрита одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, које су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. У четири епрувете се пипетира 3, 6, 12 и 24  $\mu$ l воденог раствора 1 mM NaNO<sub>2</sub> у 1 ml Krebs-Hensenleit-овог раствора. Концентрације ослобођених нитрита (nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml) мере се спектрофотометријски на таласној дужини  $\lambda = 550$  nm.

Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита у коронарном венском ефлуенту добија се на основу:

1. Одређивања стандардног фактора (F):

Екстинкција стандарда – екстинкција слепе пробе

Концентрација NaNO<sub>2</sub> у стандарду за сваки појединачни стандард (F1- F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

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

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

3. Количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива одређује се по формули:

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

где је CF (Coronary flow) – коронарни проток.

**б) Одређивање индекса липидне пероксидације (*Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS)**

Индекс липидне пероксидације у коронарном венском ефлуенту одређиваћемо индиректно, преко продукта реакције липидне пероксидације са 2-тиобарбитурном киселином. Спектрофотометријска метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције малондиалдехида са тиобарбитурном киселином [113].

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

Концентрација, а затим количина ослобођених TBARS у коронарном венском ефлуенту добија се у поступку:

1. Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу једначине:

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

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

2. Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива одређује се једначином:

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

При тумачењу резултата, треба имати у виду да ће се овим поступком ниво ослобођених TBARS изражавати у µM, док ће се количина осталих биохемијских параметара изражавати у nM. Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Ово је последица неспецифичности теста, јер он

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

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

Количину супероксид анјон радикала у коронарном венском ефлуенту одређиваћемо спектрофотомеријском методом, у реакцији  $O_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (Nitroblue tetrazolium chloride (NBT)) [114].

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

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

Количина супероксид анион радикала у коронарном венском ефлуенту добија се у поступку:

1. Концентрација ослобођеног  $O_2^-$  добија се на основу следећих једначина:

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

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

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

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

2. Количина ослобођеног  $O_2^-$  по граму срчаног ткива одређује се једначином:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{minut/g wt} = \Delta E/0,015 \times 1/0,05 \times CF/m_{\text{heart}}$$

### г) Одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ )

Количину водоник пероксида произведеног у коронарном венском ефлуенту одређиваћемо спектрофотометријски на основу реакције оксидације фенол црвеног помоћу водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) [115]. Реакција је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseradish peroxidaza* – *HRPO*).

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

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

Концентрација ослобођеног  $H_2O_2$  одређује се на основу калибрационе криве одређиване за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни раствор  $H_2O_2$  (Stock) уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10mM  $H_2O_2$  износи 0,810). У три епрувете се пипетира 5, 10 и 20  $\mu$ l 1 mM раствора  $H_2O_2$ , 200  $\mu$ l дестиловане воде, 800  $\mu$ l раствора фенол црвеног и 10  $\mu$ l (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури подеси се pH  $\approx$  12 додавањем 1M NaOH. Концентрације водоник пероксида (nmol/  $H_2O_2$ /ml) у узорцима мере се спектрофотометријски на таласној дужини максималне апсорбције  $\lambda_{\text{max}} = 610$  nm.

Количина ослобођеног водоник пероксида у коронарном венском ефлуенту добија се у поступку:

1. Фактор апсорбције (F) по једном nmol-у H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> одређује се формулом:

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

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

2. Концентрација H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добија се на основу формуле:

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

3. Количина ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по граму срчаног ткива одређује се формулом:

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

#### Г.2.2.2. Ензимски параметри некрозе миокарда

Сви параметри ензимске некрозе миокарда радиће се у Центру за лабораторијску дијагностику, Клинички центар Крагујевац, Република Србија. Параметри ће бити рађени из коронарног венског ефлуента, прикупљаног на већ описани начин.

На апарату *Olympus AU 400 (Olympus, Japan)* одређиваће се следећи ензими:

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

Кинетички *UV* тест за квантитативно одређивање *AST (EC 2.6.1.1)* у серуму и плазми на *Olympus* анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену.

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

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

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

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

**г) Креатин киназа (*CK – Creatine kinase*)**

Кинетички *UW* тест за квантитативно одређивање *CK NAC* (EC 2.7.3.2) у серуму и плазми на *Olympus* анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену.

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

Ензимски имуноинхибициони тест за квантитативно одређивање изоензима *CK-MB* у серуму и плазми на *Olympus* анализаторима. Само за *in vitro* дијагностичку примену.

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

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима [116-119]. За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G Power 3*) [120]. Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 84 (по 12 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе (комплијанса – некомплетни подаци), укупни студијски узорак је утврђен на најмање 90 експерименталних животиња.

## 5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

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

Програм који је коришћен за статистичку обраду података писан је у програмском језику *QBASIC*, а ауторско је дело професора Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, др Слободана Јанковића. Концентрација једињења која изазива 50% максималног ефекта (EC50), и њен интервал поверења ( $1,96 \times$  стандардна грешка) приказани су графички (програм *Graph*). За приказ дескриптивне статистике, тј. средњих вредности параметра са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 6 различитих животиња по експерименталним групама, коришћен је програм *Microsoft Excel 2003*.

### РЕЗУЛТАТИ

#### 1. КАРДИОДИНАМСКИ ПАРАМЕТРИ

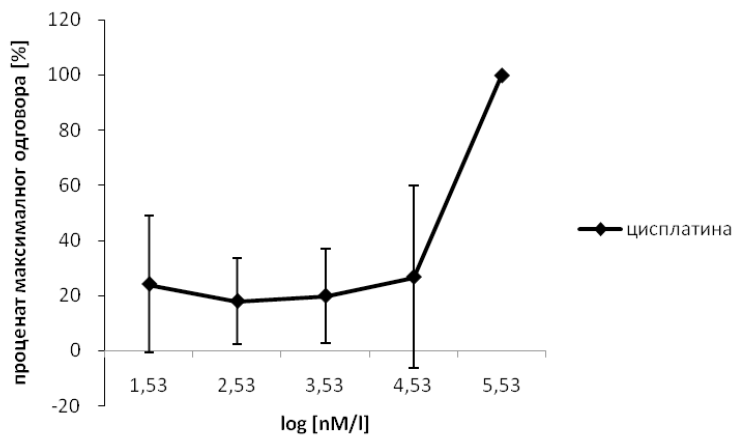
##### Фреквенца срца (*HR- Heart Rate*)

Фреквенца рада срца није значајно измењена после примене следећих реагенса : **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М;  $F= 2.34$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ); **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М,  $F= 0.8$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ); **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.76$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(dach)]** (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М;  $F= 0.41$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.75$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ).



Перфузија **цисплатине** изазвала је дозно-зависно снижење фреквенције срца (од  $34 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $34 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=24.7$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p<0.05$ ,  $EC_{50}=19809.46 \pm 4.43$ ). Ефекат различитих концентрација цисплатине изражен је процентом максималног одговора (Графикон 1.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.

Средње вредности фреквенце срца (Табела 1.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.



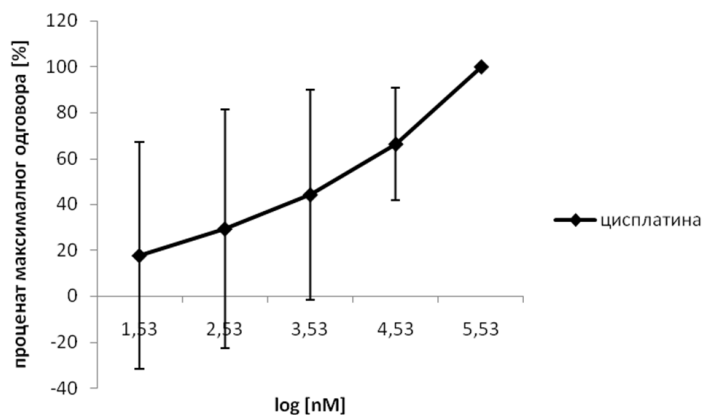
**Графикон 1.** Утицај перфузије цисплатине на срчану фреквенцу изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

### Контрактилност срца $dp/dt \max$ (*Maximum rate of left ventricular pressure development*)

Контрактилност срца није значајно измењен после примене следећих реагенса : **EN** (од  $166 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $166 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=3.00$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ); **DACH** (од  $88 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $88 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $F=1.74$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ );  **$K_2[PtCl_4]$**  (од  $23 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $23 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=0.76$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ );  **$[PtCl_4(dach)]$**  (од  $22 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $22 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=2.14$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ );  **$[PtCl_4(en)]$**  (од  $25 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $25 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=0.91$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ).

Перфузија **цисплатине** изазвала је дозно-зависно снижење контрактилности срца-  $dp/dt \max$  (од  $34 \times 10^{-8} \text{M}$  до  $34 \times 10^{-4} \text{M}$ ;  $F=8.75$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p<0.05$ ,  $EC_{50}=233.45 \pm 3.55$ ). Ефекат различитих концентрација цисплатине изражен је процентом максималног одговора (Графикон 2.), тј. смањења контрактилности срца  $dp/dt \max$  у односу на контролу.

Средње вредности контрактилности срца  $dp/dt \max$  (Табела 2.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.



**Графикон 2.** Утицај перфузије цисплатине на контрактилност миокарда изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

**Табела 1.** Средње вредности фреквенце срца (HR) са стандардним девијацијама (X±SD)

изолованог срца пацова узетих од 12 различитих

животиња по експерименталним групама.

Фреквенца срца (HR)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	256,02 ± 16,55	239,70 ± 14,25*	252,17 ± 35,50	250,25 ± 17,99	252,45 ± 20,04	246,97 ± 31,79	251,70 ± 16,90
10 <sup>-7</sup> M	247,18 ± 19,94	228,47 ± 12,47*	244,23 ± 22,95	238,87 ± 23,37	246,05 ± 20,80	230,00 ± 29,00	236,50 ± 18,13
10 <sup>-6</sup> M	240,28 ± 16,54	215,62 ± 18,92*	230,70 ± 26,12	229,48 ± 26,72	235,33 ± 21,95	219,72 ± 28,37	210,72 ± 16,85
10 <sup>-5</sup> M	232,98 ± 17,49	199,18 ± 39,53*	211,18 ± 29,12	202,70 ± 29,42	224,62 ± 20,09	201,10 ± 26,86	159,50 ± 28,73
10 <sup>-4</sup> M	225,03 ± 15,86	127,33 ± 31,17*	55,90 ± 34,49	134,85 ± 37,59	214,63 ± 20,60	185,57 ± 32,31	81,35 ± 21,80

\* p&lt;0,05 у поређењу са контролном групом.

**Табела 2.** Средње вредности контрактилности срца (dp/dt max) са стандардним девијацијама (X±SD) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Контрактилност срца - dp/dt max (mm Hg/s)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	296,12 ± 160,97	1862,99 ± 398,79*	2423,15 ± 396,16	2046,17 ± 252,12	1785,92 ± 449,69	2064,23 ± 219,47	2195,58 ± 158,67
10 <sup>-7</sup> M	2039,18 ± 186,59	1686,76 ± 391,16*	2270,65 ± 394,64	1846,32 ± 246,48	1691,55 ± 410,61	1873,27 ± 163,62	1771,23 ± 298,55
10 <sup>-6</sup> M	1945,92 ± 159,05	1451,97 ± 364,57*	2064,65 ± 401,60	1577,48 ± 371,66	1495,18 ± 312,46	1694,00 ± 166,70	1507,75 ± 105,16
10 <sup>-5</sup> M	1827,70 ± 87,53	1154,03 ± 240,19*	1710,67 ± 337,95	1223,68 ± 304,75	1339,30 ± 229,27	1466,23 ± 251,39	1123,33 ± 159,46
10 <sup>-4</sup> M	1701,70 ± 101,02	730,90 ± 187,19*	261,70 ± 126,07	501,62 ± 183,82	1159,95 ± 248,60	1270,07 ± 325,22	759,00 ± 221,81

\*p&lt;0,05 у поређењу са контролном групом.

### Контрактилност срца dp/dt min (*Minimum rate of left ventricular pressure development*)

Контрактилност срца није значајно измењен после примене било ког реагенса : **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.37$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.19$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М;  $F= 2.53$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(dach)]** (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М;  $F= 2.14$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.14$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **цисплатина** (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М;  $F= 2.53$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ).

Средње вредности контрактилности срца dp/dt min (Табела 3.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

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

Систолни притисак у левој комори није значајно измењен после примене било ког реагенса : **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.59$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.39$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М;  $F= 1.58$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(dach)]** (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М;  $F= 0.38$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М;  $F= 0.78$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **цисплатина** (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М;  $F= 0.81$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ).

Средње вредности систолног притиска у левој комори (Табела 4.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 3.** Средње вредности контрактилности срца (dp/dt min) са стандардним девијацијама (X±SD) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Контрактилност срца - dp/dt min (mm Hg/s)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	-1259,28 ± 199,18	-1164,25 ± 307,67	-1484,85 ± 243,08	-1221,98 ± 170,79	-1055,48 ± 350,20	-1235,82 ± 157,35	-1298,15 ± 103,15
10 <sup>-7</sup> M	-1194,83 ± 223,82	-907,57 ± 298,09	-1289,47 ± 273,15	-920,22 ± 171,93	-953,30 ± 309,51	-1019,73 ± 159,34	-990,52 ± 101,01
10 <sup>-6</sup> M	-1058,35 ± 138,16	-720,17 ± 227,28	-1082,12 ± 200,96	-741,62 ± 201,26	-776,77 ± 195,61	-837,70 ± 132,28	-694,28 ± 77,15
10 <sup>-5</sup> M	-952,18 ± 88,95	-537,95 ± 129,13	-826,07 ± 185,14	-536,00 ± 178,12	-622,90 ± 157,13	-700,90 ± 145,93	-407,33 ± 67,51
10 <sup>-4</sup> M	-857,68 ± 131,47	-285,77 ± 91,25	-142,65 ± 41,06	-202,90 ± 57,79	-515,10 ± 176,51	-569,05 ± 167,73	-275,70 ± 85,90

\* p<0,05 у поређењу са контролном групом.

**Табела 4.** Средње вредности систолног притисака у левој комори (SLVP) са стандардним девијацијама (X±SD) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Систолни притисак у левој комори - SLVP (mm Hg)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	53,32 ± 4,59	59,83 ± 14,68	71,28 ± 11,15	57,22 ± 5,55	47,15 ± 13,24	59,80 ± 9,28	65,77 ± 6,09
10 <sup>-7</sup> M	51,65 ± 5,16	50,42 ± 13,85	63,08 ± 10,09	47,87 ± 4,83	44,03 ± 11,26	51,70 ± 10,12	54,75 ± 5,33
10 <sup>-6</sup> M	50,12 ± 5,04	43,93 ± 9,20	59,68 ± 8,98	43,00 ± 7,38	39,73 ± 9,51	41,40 ± 8,16	42,45 ± 6,38
10 <sup>-5</sup> M	47,00 ± 3,93	36,48 ± 5,48	52,83 ± 10,68	34,02 ± 8,75	35,63 ± 7,06	39,50 ± 9,94	34,38 ± 4,60
10 <sup>-4</sup> M	44,48 ± 4,66	27,12 ± 6,28	14,72 ± 2,88	17,78 ± 3,64	30,48 ± 8,51	31,90 ± 10,25	25,35 ± 5,86

\* p<0,05 у поређењу са контролном групом.

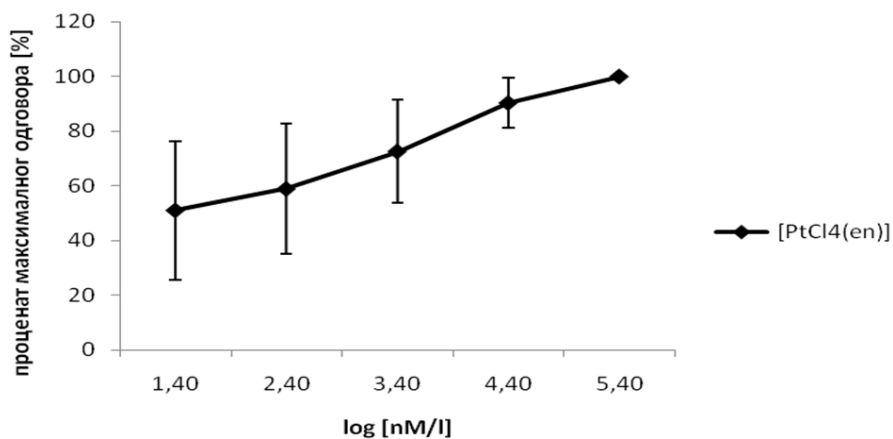
### Дијастолни притисак у левој комори (DLVP – Diastolic blood pressure)

Дијастолни притисак у левој комори није значајно измењен после примене било ког реагенса : **EN** (од  $166 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $166 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 0.24$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **DACH** (од  $88 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $88 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $F= 0.08$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $23 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 0.18$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(dach)]** (од  $22 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $22 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 2.14$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** (од  $25 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $25 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 1.89$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ); **цисплатина** (од  $34 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $34 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 0.43$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ).

Средње вредности дијастолног притиска у левој комори (Табела 5.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

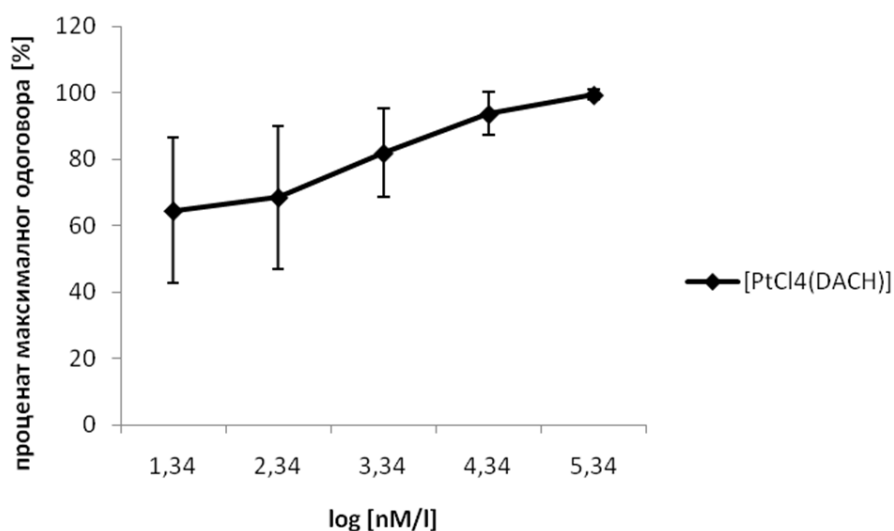
### Коронарни проток (CF – Coronary flow)

Перфузија **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** изазвала је дозно-зависно снижење коронарног протока (од  $25 \times 10^{-8} \text{ M}$  до  $25 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $F= 7.79$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p<0.05$ ,  $EC50= 39.61 \pm 3.22$ ). Ефекат различитих концентрација **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** изражен је процентом максималног одговора (Графикон 3.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.



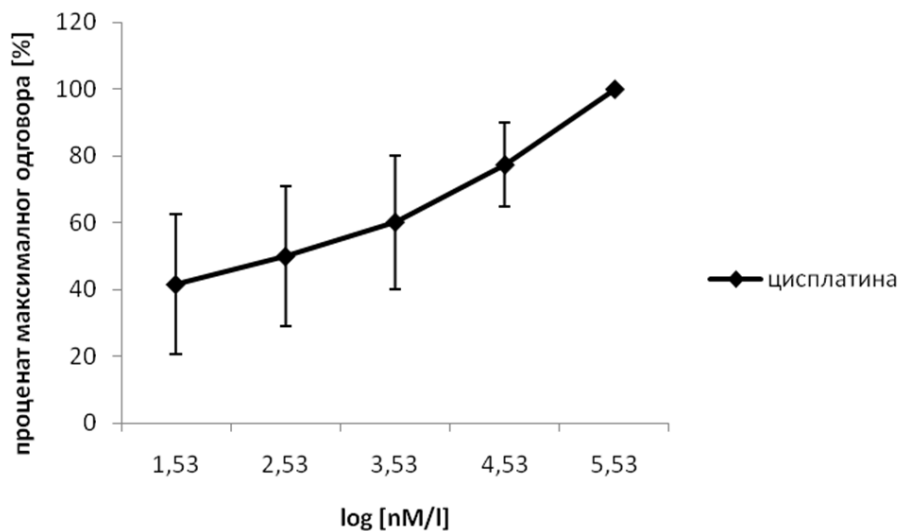
**Графикон 3.** Утицај перфузије [PtCl<sub>4</sub>(en)] на коронарни проток изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња ± СД (стандардне девијације).

Перфузија [PtCl<sub>4</sub>(dach)] изазвала је дозно-зависно снижење коронарног протока (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М; F= 5.91, df1=4, df2=25, p<0.05, EC50=  $1.02 \pm 4.06$ ). Ефекат различитих концентрација [PtCl<sub>4</sub>(dach)] изражен је процентом максималног одговора (Графикон 4.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.



**Графикон 4.** Утицај перфузије [PtCl<sub>4</sub>(dach)] на коронарни проток изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња ± СД (стандардне девијације).

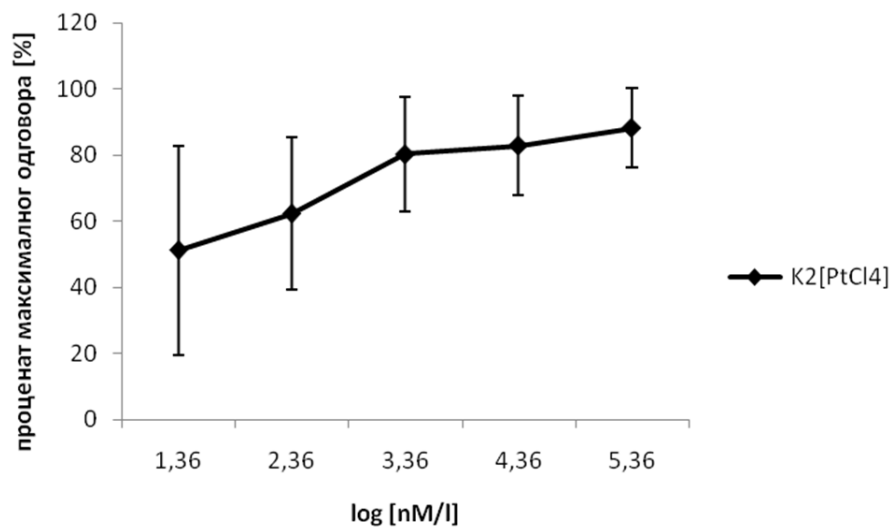
Перфузија **цисплатине** изазвала је дозно-зависно снижење коронарног протока (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М; F= 11.35, df1=4, df2=25, p<0.05, EC50=  $274.56 \pm 2.71$ ). Ефекат различитих концентрација цисплатине изражен је процентом максималног одговора (Графикон 5.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.



**Графикон 5.** Утицај перфузије цисплатине на коронарни проток изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

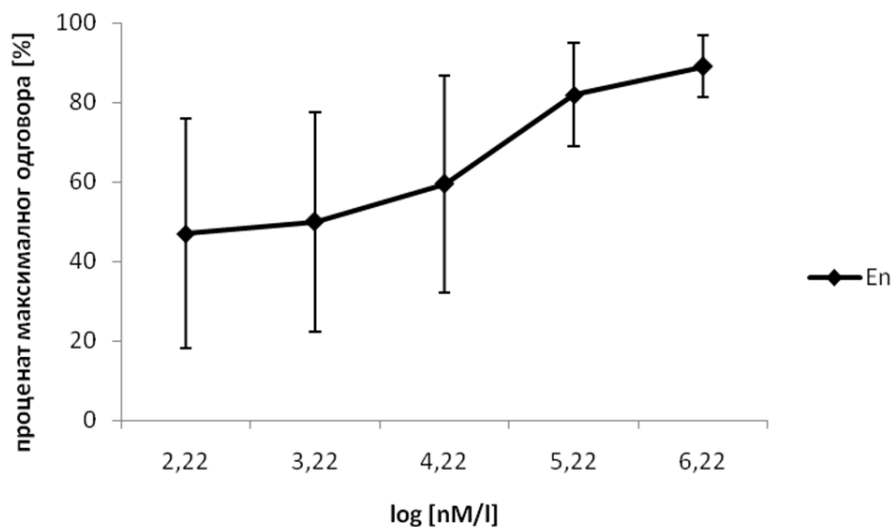
Перфузија  $K_2[PtCl_4]$  изазвала је дозно-зависно снижење коронарног протока (од  $23 \times 10^{-8} M$  до  $23 \times 10^{-4} M$ ;  $F = 3.32$ ,  $df_1 = 4$ ,  $df_2 = 25$ ,  $p < 0.05$ ,  $EC_{50} = 8.73 \pm 6.71$ ). Ефекат различитих концентрација  $K_2[PtCl_4]$  изражен је процентом максималног одговора (Графикон 6.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.





**Графикон 6.** Утицај перфузије  $K_2[PtCl_4]$  на коронарни проток изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

Перфузија **ЕН** изазвала је дозно-зависно снижење коронарног протока (од  $166 \times 10^{-8} M$  до  $166 \times 10^{-4} M$ ;  $F= 4.22$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p<0.05$ ,  $EC_{50}= 770.88 \pm 5.17$ ). Ефекат различитих концентрација ЕН изражен је процентом максималног одговора (Графикон 7.), тј. смањења фреквенце срца у односу на контролу.



**Графикон 7.** Утицај перфузије EN на коронарни проток изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

Лиганд DACH није дао значајан ефекат на коронарни проток (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.49$ ,  $df1=4$ ,  $df2=25$ ,  $p>0.05$ ).

Средње вредности коронарног поротока (**Табела 6.**) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 5.** Средње вредности дијастолног притисака у левој комори (DLVP) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Дијастолни притисак у левој комори - DLVP (mm Hg)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	1,80 ± 0,85	5,13 ± 1,65	2,88 ± 1,20	3,65 ± 1,54	2,02 ± 1,12	3,00 ± 1,40	6,43 ± 2,15
10 <sup>-7</sup> M	1,65 ± 1,30	4,92 ± 2,22	3,52 ± 1,26	3,37 ± 1,33	2,00 ± 1,04	3,25 ± 1,27	5,22 ± 1,41
10 <sup>-6</sup> M	1,73 ± 1,09	4,82 ± 2,25	3,52 ± 1,41	3,53 ± 1,49	2,08 ± 0,99	3,22 ± 1,29	4,58 ± 1,18
10 <sup>-5</sup> M	1,67 ± 0,98	5,03 ± 1,86	4,38 ± 1,43	3,35 ± 1,71	2,15 ± 1,30	3,23 ± 1,45	3,83 ± 1,28
10 <sup>-4</sup> M	1,53 ± 0,80	4,80 ± 1,80	3,57 ± 2,13	2,77 ± 1,61	2,07 ± 1,11	3,05 ± 1,26	3,52 ± 1,45

\*  $p < 0,05$  у поређењу са контролном групом.

**Табела 6.** Средње вредности коронарног протока (CF) са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ )

изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Коронарни проток - BF (ml/min)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	9,80 ± 0,68	7,13 ± 1,05*	7,73 ± 0,99*	7,80 ± 0,89	6,97 ± 1,35*	7,07 ± 0,85*	8,27 ± 1,01*
10 <sup>-7</sup> M	9,63 ± 0,75	6,43 ± 1,16*	7,33 ± 0,97*	6,90 ± 1,07	6,60 ± 1,23*	6,43 ± 0,89*	7,27 ± 1,01*
10 <sup>-6</sup> M	9,33 ± 0,77	5,50 ± 1,28*	6,60 ± 1,06*	5,50 ± 1,11	5,77 ± 1,05*	5,40 ± 0,95*	5,00 ± 0,47*
10 <sup>-5</sup> M	8,93 ± 0,69	4,10 ± 1,09*	5,00 ± 0,70*	4,03 ± 1,08	4,87 ± 1,06*	3,97 ± 1,07*	2,63 ± 0,56*
10 <sup>-4</sup> M	8,43 ± 0,61	2,33 ± 0,69*	0,60 ± 0,22*	1,53 ± 0,43	4,17 ± 0,94*	2,97 ± 1,15*	1,20 ± 0,51*

\*  $p < 0,05$  у поређењу са контролном групом.

## 2.БИОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ

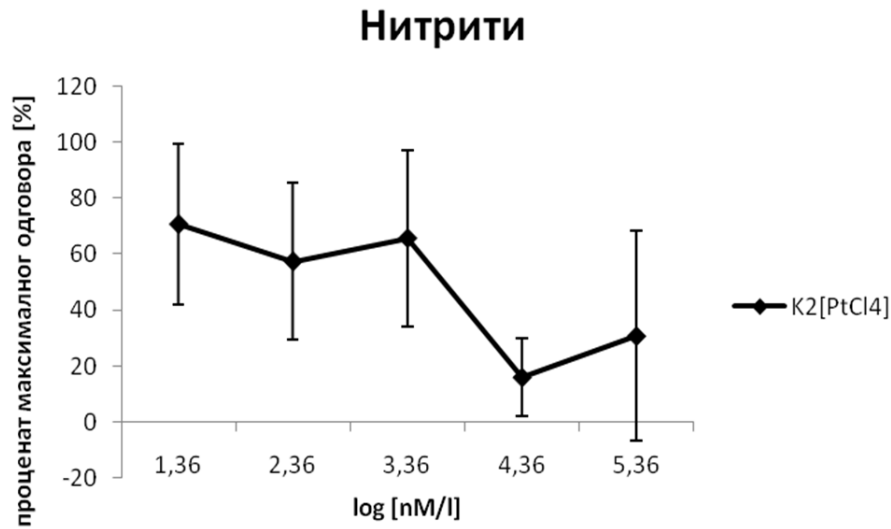
### 2.1.Параметри оксидативног стреса

#### Нитрити( $\text{NO}_2^-$ )

**[PtCl<sub>4</sub>(dach)]** (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М,  $F= 0.39$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ) није дала значајан ефекат на нитрите, као ни сам лиганд **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.22$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ). **[PtCl<sub>4</sub>(en)]** (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М,  $F= 2.57$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ) такође није дала значајан ефекат на нитрите као ни сам лиганд **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.25$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ). **Цисплатина** је такође супстанца која није дала значајан ефекте на нитрите (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М,  $F= 1.65$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p>0.05$ ).

**K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М,  $F= 3.97$ ,  $df_1=4$ ,  $df_2=25$ ,  $p<0.05$ ,  $EC_{50}= 1606.29 \pm 0.12$ ) повећава статистички значајно вредности нитрита у односу на контролу. Поменуто повећање је дозно-зависно. Ефекат различитих концентрација **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** изражен је процентом максималног одговора (Графикон 8.), тј. повећањем нитрита у односу на контролу.

Средње вредности нитрата (Табела 7.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.



**Графикон 8.** Утицај перфузије  $K_2[PtCl_4]$  на нитрита из ефлуента изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

**Табела 7.** Средње вредности нитрита ( $NO_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

	Нитрити ( $NO_2^-$ )						
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	$K_2[PtCl_4]$
$10^{-8}M$	5,20±4,39	10,24±4,79	3,62±1,80	6,69±2,53	8,48±6,32	6,45±4,26	12,19±3,96*
$10^{-7}M$	3,72±2,40	10,60±4,20	2,60±1,53	4,09±2,30	9,69±5,41	2,35±1,70	8,90±3,90*
$10^{-6}M$	2,34±1,93	8,99±2,22	3,36±1,36	3,94±1,34	7,34±2,57	2,85±1,99	7,57±1,12*
$10^{-5}M$	2,79±1,32	6,29±1,28	3,21±1,80	3,18±2,13	5,04±3,57	2,71±1,78	3,81±0,62*
$10^{-4}M$	5,21±8,07	3,12±0,85	0,24±0,21	1,97±1,92	5,04±1,83	2,10±2,77	1,60±0,82*

\*  $p < 0,05$  у поређењу са контролном групом.

## Супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ )

[PtCl<sub>4</sub>(dach)] (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М, F= 0.40, df1=4, df2=25, p>0.05) није дала значајан ефекат на супероксид анјон радикал, као ни сам лиганд **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М, F= 0.87, df1=4, df2=25, p>0.05), ни [PtCl<sub>4</sub>(en)] (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М, F= 0.50, df1=4, df2=25, p>0.05) није дала значајан ефекат на супероксид анјон радикал као ни сам лиганд **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М, F= 1.52, df1=4, df2=25, p>0.05); ни **цисплатина** није дала значајан ефекат (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М, F= 2.40, df1=4, df2=25, p>0.05); као ни **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М, F= 1.18, df1=4, df2=25, p>0.05).

Средње вредности супероксид анјон радикала (Табела 8.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 8.** Средње вредности супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ )							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> М	55,66±18,11	40,46±51,20	26,06±12,31	38,54±25,64	42,58±8,70	44,05±40,72	36,40±22,90
10 <sup>-7</sup> М	40,19±28,30	43,96±22,35	27,57±11,16	19,65±12,54	36,35±17,05	41,76±15,95	29,16±18,95
10 <sup>-6</sup> М	45,04±26,20	27,93±26,95	18,80±12,46	18,20±13,27	14,88±9,03	40,09±25,49	52,90±47,37
10 <sup>-5</sup> М	53,51±25,38	14,36±8,84	30,85±18,85	14,82±5,14	26,64±10,01	22,49±9,27	21,47±15,83
10 <sup>-4</sup> М	49,87±15,36	13,14±12,36	2,20±1,48	8,50±4,28	12,96±6,09	26,49±18,41	8,95±5,16

\* p<0,05 у поређењу са контролном групом.

### Водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

[PtCl<sub>4</sub>(dach)] (од 22x10<sup>-8</sup> М до 22x10<sup>-4</sup> М, F= 0.85, df1=4, df2=25, p>0.05) није дала значајан ефекат на водоник пероксид, као ни сам лиганд **DACH** (од 88x10<sup>-8</sup> М до 88x10<sup>-4</sup> М, F= 0.67, df1=4, df2=25, p>0.05), ни [PtCl<sub>4</sub>(en)] (од 25x10<sup>-8</sup> М до 25x10<sup>-4</sup> М, F= 0.39, df1=4, df2=25, p>0.05) није дала значајан ефекат на водоник пероксид као ни сам лиганд **EN** (од 166x10<sup>-8</sup> М до 166x10<sup>-4</sup> М, F= 0.42, df1=4, df2=25, p>0.05); ни **цисплатина** није дала значајан ефекат (од 34x10<sup>-8</sup> М до 34x10<sup>-4</sup> М, F= 0.37, df1=4, df2=25, p>0.05); као ни **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од 23x10<sup>-8</sup> М до 23x10<sup>-4</sup> М, F= 0.28, df1=4, df2=25, p>0.05).

Средње вредности водоник пероксида (Табела 9.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.

**Табела 9.** Средње вредности индекса водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама (X±SD) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Водоник пероксид (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> М	23,54±13,26	13,61±4,33	7,84±5,22	24,47±10,02	9,13±4,69	3,88±1,11	2,97±2,74
10 <sup>-7</sup> М	18,58±5,43	11,90±6,50	7,77±8,28	18,71±4,48	8,65±3,12	3,86±1,30	1,41±1,25
10 <sup>-6</sup> М	19,66±7,48	9,28±5,03	8,39±6,82	17,35±2,82	7,33±3,36	3,55±0,98	1,08±0,53
10 <sup>-5</sup> М	17,30±10,94	8,95±5,30	3,58±2,56	11,74±3,00	5,88±2,07	2,62±1,27	0,55±0,51
10 <sup>-4</sup> М	20,01±14,96	4,47±2,96	0,53±0,51	3,98±1,13	4,76±1,41	1,19±0,61	0,26±0,20

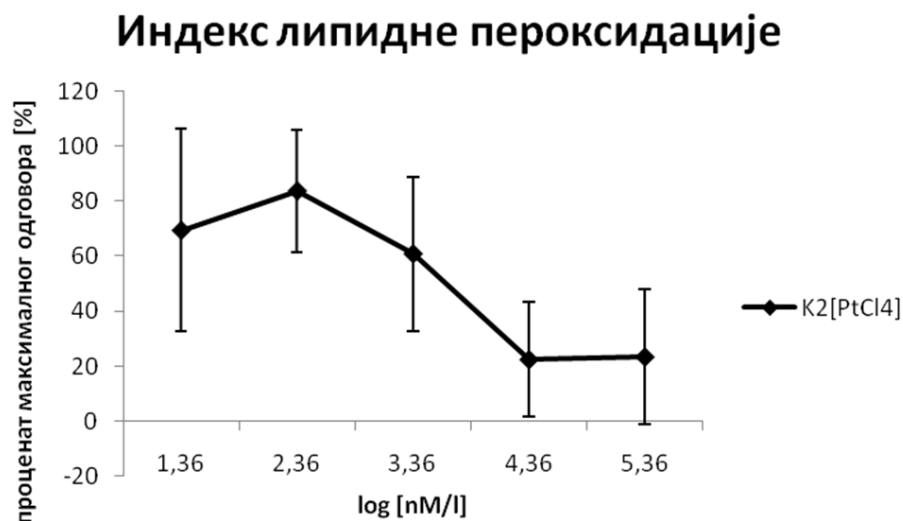
\* p<0,05 у поређењу са контролном групом.

## Индекс липидне пероксидације (*thiobarbituric acid reactive substances, TBARS*)

[PtCl<sub>4</sub>(dach)] (од  $22 \times 10^{-8}$  М до  $22 \times 10^{-4}$  М, F= 0.24, df1=4, df2=25, p>0.05) није дала значајан ефекат на индекс липидне пероксидације, као ни сам лиганд **DACH** (од  $88 \times 10^{-8}$  М до  $88 \times 10^{-4}$  М, F= 1.08, df1=4, df2=25, p>0.05). [PtCl<sub>4</sub>(en)] (од  $25 \times 10^{-8}$  М до  $25 \times 10^{-4}$  М, F= 2.56, df1=4, df2=25, p>0.05) такође није дала значајан ефекат на индекс липидне пероксидације као ни сам лиганд **EN** (од  $166 \times 10^{-8}$  М до  $166 \times 10^{-4}$  М, F= 0.34, df1=4, df2=25, p>0.05). **Цисплатина** је такође супстанца која није дала значајан ефекте на индекс липидне пероксидације (од  $34 \times 10^{-8}$  М до  $34 \times 10^{-4}$  М, F= 0.92, df1=4, df2=25, p>0.05).

**K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** (од  $23 \times 10^{-8}$  М до  $23 \times 10^{-4}$  М, F= 6.29, df1=4, df2=25, p<0.05, EC<sub>50</sub>= 3092.74±0.20) повећава статистички значајно вредности индекса липидне пероксидације у односу на контролу. Поменуто повећање је дозно-зависно. Ефекат различитих концентрација **K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]** изражен је процентом максималног одговора (Графикон 9.), тј. повећањем индекса липидне пероксидације у односу на контролу.

Средње вредности индекса липидне пероксидације (Табела 10.) представљају аритметичку средину вредности измерених у 12 различитих експеримената на крају сваког посматраног периода, тј. после максималне изложености испитиваној супстанци.





**Графикон 9.** Утицај перфузије  $K_2[PtCl_4]$  на индекс липидне пероксидације из ефлуента изолованог срца пацова. Свака тачка репрезентује средњу вредност одговора изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња  $\pm$  СД (стандардне девијације).

**Табела 10.** Средње вредности индекса липидне пероксидације (TBARS) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Индекс липидне пероксидације (TBARS)							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	69,42±9,91	28,68±23,76	12,51±6,02	29,01±12,59	10,21±3,93	22,13±11,98	40,03±18,38*
10 <sup>-7</sup> M	83,76±10,26	20,65±16,24	10,20±7,33	35,69±17,36	19,80±23,25	32,63±19,14	48,84±18,59*
10 <sup>-6</sup> M	60,91±10,50	24,56±11,41	16,52±11,83	31,37±25,78	10,32±3,15	18,01±7,95	37,10±22,36*
10 <sup>-5</sup> M	22,41±9,23	15,97±10,15	12,10±4,09	23,63±12,71	7,54±2,50	21,59±11,96	18,35±6,52*
10 <sup>-4</sup> M	23,36±8,10	8,49±4,60	1,33±0,96	5,50±2,58	9,72±5,89	12,47±9,79	7,03±4,39*

\*  $p < 0,05$  у поређењу са контролном групом.

## 2.2. Ензимски параметри некрозе миокарда

После статистичке обраде података који су се односили на ензиме некрозе миокарда (AST, ALT, LDH, МБ (СК-МВ)) добијени су резултати који нису били релевантни. Зато су поменути резултати одбачени, а у раду су представљене средње вредности ензима некрозе миокарда из коронарног венског ефлуента са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова (Табела 11,12,13,14).

**Табела 11.** Средње вредности аспартат аминотрансферазе (AST) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Аспартат аминотрансфераза - AST [IU/L]							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	3,17±1,60	1,33±0,82	2,50±0,55	2,83±0,75	3,33±0,82	3,00±2,00	2,50±1,22
10 <sup>-7</sup> M	2,00±0,63	2,00±1,10	2,17±0,75	1,50±1,22	3,00±0,89	2,50±1,64	2,50±0,55
10 <sup>-6</sup> M	2,00±0,63	2,00±1,67	2,17±0,75	2,83±1,17	2,17±0,98	2,67±0,82	2,17±0,75
10 <sup>-5</sup> M	2,00±0,63	1,76±0,82	1,83±0,98	3,33±1,37	2,17±0,98	2,00±0,89	2,50±1,38
10 <sup>-4</sup> M	2,50±0,84	1,17±1,17	5,67±2,80	4,17±3,28	2,83±0,75	2,50±0,55	1,67±1,51

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

Аланин аминотрансфераза - ALT [IU/L]							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	4,33±1,86	3,33±1,37	3,17±1,60	4,67±0,82	4,50±1,38	5,33±1,21	4,00±1,10
10 <sup>-7</sup> M	4,33±0,82	2,33±0,52	4,50±1,87	4,17±0,98	4,67±0,52	4,17±2,48	4,17±0,75
10 <sup>-6</sup> M	4,50±0,55	1,83±1,17	4,50±0,84	5,00±1,41	4,17±0,98	3,67±1,03	4,00±1,10
10 <sup>-5</sup> M	5,67±1,51	2,67±0,52	3,50±1,38	5,00±1,10	4,17±1,47	4,50±1,05	3,83±0,75
10 <sup>-4</sup> M	3,50±1,05	3,17±0,98	4,33±1,21	5,33±1,03	3,67±1,51	4,50±1,22	3,67±1,51

**Табела 13.** Средње вредности лактат дехидрогеназе (LDH) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Лактат дехидрогеназа - LDH [IU/L]							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	16,50±4,68	20,83±4,54	14,00±6,42	9,17±6,08	18,00±3,74	15,00±3,22	16,00±8,41
10 <sup>-7</sup> M	14,83±6,08	19,50±4,68	13,83±3,92	8,67±6,25	17,00±4,24	14,00±7,72	15,17±4,07
10 <sup>-6</sup> M	14,83±7,14	18,83±9,37	10,33±2,80	8,83±4,22	11,50±5,96	15,67±4,93	17,50±5,09
10 <sup>-5</sup> M	8,50±4,18	20,67±3,44	13,17±4,54	10,17±6,91	16,67±5,01	15,00±8,92	11,33±5,13
10 <sup>-4</sup> M	12,17±5,74	21,17±5,42	14,83±4,96	13,50±3,08	14,83±6,77	18,17±6,68	20,67±3,44

**Табела 14.** Средње вредности креатин киназе, изоензима МБ (СК-МВ ) у коронарном венском ефлуенту са стандардним девијацијама ( $X \pm SD$ ) изолованог срца пацова узетих од 12 различитих животиња по експерименталним групама.

Креатин киназе, изоензима МБ - СК-МВ [IU/L]							
	Контрола	Цисплатина	EN	DACH	[Pt(dach)Cl <sub>4</sub> ]	[Pt(en)Cl <sub>4</sub> ]	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>4</sub> ]
10 <sup>-8</sup> M	1,82±1,50	0,37±0,49	1,25±1,52	0,63±0,63	0,13±0,22	1,67±1,34	0,97±1,13
10 <sup>-7</sup> M	0,32±0,50	1,15±0,85	0,63±0,80	0,48±0,85	0,13±0,24	0,68±1,40	0,63±0,83
10 <sup>-6</sup> M	0,73±1,28	0,83±0,99	0,58±0,85	0,72±0,97	0,75±1,34	0,32±0,78	0,48±0,67
10 <sup>-5</sup> M	1,58±0,89	0,83±0,71	2,18±2,49	1,43±1,18	0,95±1,15	0,45±0,91	0,75±0,88
10 <sup>-4</sup> M	0,85±0,93	0,97±1,17	0,98±1,08	1,83±2,10	0,40±0,50	1,45±1,00	0,00±0,00

## ДИСКУСИЈА

### 1. Ефекти платина комплекса на кардиодинамику изолованог срца пацова

Генерални циљ овог истраживачког рада био је евалуација ефеката акутне администрације Pt(IV)-комплекса, калијум-тетрахлоро-платината (II), цисплатине, 1,2-диамино-циклохексана и етилен-диаминна на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката.

Механизам антитуморске активности цисплатине, Pt(II) комплекса и Pt(IV) комплекса добро је познат, међутим још увек не постоје сазнања о механизмима кардиотоксичности цитостатика на бази Pt [121,122].

Контрактилност срца, је у нашој студији испитивана путем континуираног мониторинга два кардиодинамска параметра:  $(dp/dt)_{max}$  - максималне стопа промене притиска у левој комори и  $(dp/dt)_{min}$  - минималне стопа промене притиска у левој комори). У том смислу,  $(dp/dt)_{max}$  нам омогућава да индиректно одредимо контрактилну силу миокарда, односно инотропни ефекат, тиме и систолну функцију срца.  $(dp/dt)_{min}$  нам омогућава да индиректно одредимо способност миокарда да се релаксира, односно лузитропни ефекат, а следствено и дијатолну функцију срца. На тај начин, праћењем оба параметра добијамо увид у комплетан срчани циклус (кардиодинамику) изолованог срца пацова. У овој студији такође смо могли да пратимо ефекте перфундованих супстанци на ендотел коронарне циркулације.

Ендотелне ћелије које облажу лумен крвних судова садрже рецепторе за многе супстанце које могу мењати интензитет контраховања глатког мишића у зидовима крвних судова. Као реакција на њихову интеракцију са коришћеним супстанцама, ендотелијалне ћелије ослобађају вазоактивне факторе који утичу на проширење или сужење крвних судова и модификују контрактилну способност васкуларних глатких мишића [123].

Механизам којим ендотелне ћелије врше утицај је било ослобађање дифузивне супстанце која је учествовала у међусобној интеракцији са ћелијама глатких мишића

у зидовима крвних судова [124]. Ова супстанца, која се првобитно називала ендотелијално-изведен фактор опуштања, идентификована је потом као азотни оксид [125,126]. Други ендотелијално-изведен фактор који поседује веома моћно дејство сужавања крвних судова је изолован, и именован је као ендотелин [127]. Ендотелин, 21-пептидни фрагмент, има рецепторе на срчаним ћелијама и снажно позитивно инотропно дејство услед промене концентрације калцијума унутар ћелије и промене реакције контрактилних протеина на активатор калцијума [128]. Оштећење ендотела срчаног мишића смањује највиши степен напетости који се развија и изазива ранији почетак релаксације. Фактор који ослобађају ендотелне ћелије ублажава последице оштећења ендокардијума [129,130]. Супстанце интерагују са ендотелијалним ћелијама, и стимулишу ослобађање фактора који регулишу срчану контрактилност [123,131]. Таквим механизмом се смањује контрактилна активност миокардних ћелија када је доток енергије смањен и повећала контрактилну активност када је срчани напор повећан, а снабдевање кисеоником адекватно. Сензори могу деловати на срчаним миоцитима и обрада информација би се могла догодити у ендотелним ћелијама [123].

Биолошке мембране су прва линија одбране од токсичних супстанци [132]. Натријум-калијум пумпа облик је активног транспорта јона кроз ћелијску мембрану. Концентрација јона натријума је већа у екстрацелуларној течности у односу на интрацелуларну течност, тако да јони натријума имају тенденцију да улазе у ћелију олакшаном дифузијом. Концентрација јона калијума је већа у интрацелуларној течности у односу на екстрацелуларну течност, тако да јони калијума имају тенденцију да изађу из ћелије олакшаном дифузијом. Пумпа за  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  одржава одговарајуће концентрације јона натријума и јона калијума у ћелији, тако што испумпава 3 јона натријума из ћелије (на супрот концентрацији јона натријума) и упумпава у ћелију 2 јона калијума (на супрот концентрацији јона калијума). Овај процес је могућ само уз утрошак АТП-а на протеинском каналу за транспорт натријума и калијума. Пошто се енергија троши на самом протеинском носачу, овај је процес примарног активног транспорта [132,133].

Различите супстанце могу деловати на јонске носаче и јонске канале који регулишу пролаз јона кроз мембране. Овим се може инхибирати јонски

“физиолошки” транспорт, тако што долази до поремећаја у раду  $K^+/Na^+$  пумпе чиме се ремети  $Na^+/Ca^{2+}$  транспорт што резултује порастом нивоа  $Ca^{2+}$  у ћелији [134,135].

Кардиотоници се везују за екстрацелуларни део  $Na^+/K^+$  АТФ-азе у мембрани срчаних миоцита и инхибишу је. Настаје повишење концентрације натријума у ћелији и успоравање размене  $Ca^{2+}$  у замену за  $Na^+$ , који функционише уз помоћ градијента. Вишак  $Ca^{2+}$  у ћелији се скалдишти у саркоплазматични ретикулум одакле се отпушта са сваком следећом деполаризацијом мобилишући више мишићних влакана у контракцији [133].

Срце има један од најважнијих енергетских захтева у организму. Снабдевање великом количином АТФ-а потребне за контракцију и релаксацију срца зависи од оксидативне фосфорилације [121].

Квантитативном хистохемијском анализом показано је да фактори који потичу из коронарних крвних судова утичу на активност АТФ-азе актомиозина у миокарду [123]. АТФ-аза, један од најважнијих мембранских протеина који је интегрални део натријум-калијумове пумпе. Она је одговорна за успостављање и одржавање електрохемијског градијента у ћелији, [136-138] контролу волумена, транспорт угљених хидрата и аминокиселина кроз мембрану, као и екситацију нервне и мишићне ћелије [138]. Такође, недавне студије су показале да  $Na^+/K^+$ -АТФ-аза интерагује са мембранским протеинима и организује каскаду сигналних протеина у цитозолу за пренос информација интраћелијским органелма [139,140]. Трансдукцију сигнала остварује путем интеракције са тирозин киназом и рецептором за епидермални фактор раста у срчаним миоцитима [139,142]. Све ово, чини је значајном метом за многа органска и неорганска фармаколошка једињења, антитуморке агенсе, биолошки значајне металне јоне, и др. [143].

Митохондрије имају важну улогу у метаболичким процесима. Ове органеле генеришу преко 90% ћелијске АТФ преко оксидативне фосфорилације, користећи енергију добијену при оксидацији у респираторном ланцу [144]. За овај процес троши се молекулски кисеоник. То значи да митохондрије имају важну улогу у

преживљавању ћелија, тако да могу да служе као мете за токсична једињења и антитуморске агенсе [145].

Калијум-тетрахлороплатинат(II) селективно оштећује митохондрије услед чега се смањује количина АТП-а у ћелији [146,147]. Претходне студије показују да су митохондрије туморских ћелија вероватно биле једна од мета за цисплатину [148]. Овај цитостатик значајно смањује функцију митохондрија у ћелијама меланома [149]. Промене у функцији митохондрија повезане су са резистенцијом туморских ћелија на цитостатик [150]. Одређивање да ли су митохондрије примарни циљеви цисплатине важно је за разумевање основног механизма кардиотоксичног дејство овог цитостатика и сродних агенса. Међутим, ефекат цисплатине на функцију митохондрија кардиомиоцита остаје нејасан.

Познато је да је стрес ендоплазматичног ретикулума (ЕР) уско повезан са функцијом митохондрија и да доприноси контрактилној дисфункцији миокарда [151]. Постоји али врло мало доказа да ЕР стрес посредује токсичне ефекте цисплатине у кардиомиоцитима [121].

Етилендиамин (EDA) који се користи и у комплексу као лиганд од раније је познат по токсичности о чему говоре бројни радови (DePass et al., 1984,1987; Leung, 1994; Pozzani and Carpenter, 1954; Slesinski et al., 1983; Yang et al., 1983, 1984a,b; Yang and Tallant, 1982) [152], тако да су наши резултати у корелацији са истраживањима која су истакла токсичност ове супстанце према другим органским системима [153-155]. И поред доказане токсичности EDA у бројним органским системима (хепатобилијарни, респираторни и уринарни систем) [152] нисмо наишли на сазнања о штетним ефектима на срце поготову у комплексу са Pt(IV).

Тетраплатина (ормоплатин) [PtCl<sub>4</sub>(dach)] поседује нефротоксичност, мијелотоксичност [156] и неуротоксичност [157] док нема података о кардиотоксичности, која се на нашем експерименталном моделу манифестовала дозно-зависним снижењем коронарног протока у односу на контролу.

Калијум-тетрахлороплатинат(II) је супстанца која поседује цитотоксичност, то је доказана на *in vitro* и *in vivo* експерименталним моделом [146,147]. Резултати добијени у овој студији после перфузије калијум-тетрахлороплатината(II) су у корелацији са поменутом чињеницом.

Супстанца која при перфундовању срца није изазвала значајне ефекте на параметре кардиодинамике била је **1,2-диамино-циклохексан**. То би се вероватно могло приписати волуминозности молекула ове супстанце [157].

Резултати добијени у овој студији указују да је перфузија **цисплатине** изазвала кардиодепресивни ефекат, који се манифестовао дозно-зависним снижењем вредности контрактилности, коронарног протока и смањењем фреквенце срца у односу на контролу. Клиничке студије су показале да терапија цисплатином може бити удружена са кардиотоксичношћу, до те мере да може бити један од главних ограничавајућих фактора у терапији [158,159]. Нежељена кардиоваскуларна дејства обухватају појаву аритмија, миокардитис, кардиомиопатије, конгестивну срчану слабост итд. [159]. Експерименталне студије такође, истичу штетни ефекат овог цитостатика на срце. Ма и коатори су указали да цисплатина доводи до смањења контрактилне способности изолованог срца миша [121], што је у складу са нашим резултатима.

Супстанце које су при перфундовању срца показале кардиодепресивни ефекат који се односио само на дозно-зависно снижење коронарног протока у односу на контролу биле су: **етилендиамин-Pt(IV) комплекса; 1,2-диамино-циклохексан-Pt(IV) комплекса; калијум-тетрахлороплатинат(II) и етилендиамин.**

Кардиодепресивни ефекат цисплатине у овој студији испољио се преко снижења вредности контрактилности, коронарног протока и смањењем фреквенце срца у односу на контролу. На основу ових резултата поменута инхибиција транспортних јонских канала могла би се претпоставити као механизам кардиотоксичног дејства цисплатине на изолованом срцу пацова. Кардиодепресивни ефекат етилендиамина-Pt(IV) комплекса; 1,2-диамино-циклохексана-Pt(IV) комплекса; калијум-тетрахлороплатината(II) и етилендиамин у овој студији испољио се само преко снижења вредности коронарног протока у односу на контролу. Ова



чињеница упућује на то да би механизам кардиотоксичности на изолованом срцу пацова ових супстанци могао бити преко вазоконстрикције коронарних крвних судова.

Вазоконстрикторни ефекат платина комплекса може бити последица апоптотичне дејства платине на ендотелне ћелије [160].

Открића ове студије могу бити од велике користи за даља истраживања која се тичу ефеката нових платина комплекса на срцу, са циљем процене сврсисходности евентуалне клиничке употребе ових лекова. Резултати садашње студије могу помоћи у расветљавању штетних кардиоваскуларних ефеката свих цитостатика на бази платине, а тиме и њиховој рационалној употреби, као и синтези потенцијално бољих лекова из ове групе.

## **2. Утицај платина комплекса на оксидативно оштећење миокарда**

Специфични циљеви овог истраживања били су да се испита учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

Током аеробног начина живота оксидативна оштећења су неизбежна појава. Доказано је да је оксидативни стрес поред канцерогенезе одговоран за настанак великог броја дегенеративних процеса и болести (атеросклероза, исхемијска болест срца, исхемија-реперфузија, хроничне инфламаторне болести, акутни инфламаторни поремећаји, фотооксидативна оштећења ока, обољења централног нервног система и мноштво поремећаја везаних за старење) Неки од ових поремећаја могу бити погоршани или иницирани дејством бројних прооксидативних агенаса из средине или лекова [161].

Прекомерна производња *ROS* и *RNS*, или њихов неодговарајући однос (посебно супероксид анјон радикала и нитрита) или недостатак антиоксидативне заштите могу изазвати оксидативни стрес. Ако је оксидативни стрес прекомеран или

ако су одбрамбени или репаративни одговори неадекватни, долази до оштећења ћелије. Ћелијска оштећења могу бити изазвана механизмима као што су оксидативно оштећење протеина, липидна пероксидација, прекиди ланаца ДНК и модификација нуклеинских база и пораст концентрације интрацелуларног слободног  $\text{Ca}^{2+}$ . Најбоље проучена штетна последица деловања ROS на живе организме је липидна пероксидација, односно низ ланчаних реакција слободних радикала које доводе до разарања полинезасићених масних киселина, што има за последицу разарање ћелијских мембрана и смрт ћелија [162].

Резултати добијени у овој студији који се односе на оксидативни стрес показују да није дошло до значајног оксидативног оштећења кардиомјоцитима после перфундовања срца са: **цисплатином; етилендиамином-Pt(IV) комплекса; 1,2-диамино-циклохексаном-Pt(IV) комплекса и етилендиамином.**

Перфундовање срца са **калијум-тетрахлороплатинатом(II)** индуковало је значајно оксидативно оштећење кардиомјоцитима. Кардиотоксичност се манифестовала статистички значајним повећањем вредности нитрита и индекса липидне пероксидације у односу на контролу.

Цисплатина се акумулира у митохондријама и може изазвати производњу ROS тако што смањује активност антиоксиданаса [163]. Повећање оксидативног стреса укључено је у кардиотоксичност која ограничава клиничку употребу цисплатине као цитостатика [164]. Познато је да цисплатина може индуковати акутну кардиотоксичност [165]. Доказано је на ћелијама астроцитома код људи и ћелијама фибросаркома код миша да је цисплатина изазвала оксидативни стрес и апоптотичку ћелијску смрт. На истим ћелијама, прекомерна производња ROS откривена је после третмана са једињењима платина (IV) комплексима. Ова једињења индукују вишу цитотоксичност у односу на цисплатину и изазивају некрозу. Наши резултати који се односе на параметре оксидативног стреса нису у корелацији са овим чињеницама. Међутим повезаност оксидативног метаболизма са деловањем цитостатика на бази метала је још увек доста контроверзна. Производња ROS и липида пероксида, а тиме и индукција оксидативног стреса, сматрају се једним од главних узрока токсичности (посебно нефротоксичности и

хепатотоксичности) једињења на бази метала. Изгледа да производња и улога ROS и липидне пероксидације у ефектима платине лекова може зависити од концентрације лека, капацитета антиоксиданса, и може се модулисати присуством фактора који може да промени оксидативну или антиоксидативну равнотежу [166].

Као што је већ поменуто на основу овог истраживања дошли смо до сазнања да је **калијум-тетрахлороплатинат(II)** индуковао статистички значајним повећањем вредности нитрита и индекса липидне пероксидације.

Познато је да нитрити у крви оксидују хемоглобин у метхемоглобин који није преносилац кисеоника до ткива, то за последицу може имати асфиксију. При високим дозама нитрити испољавају вазодилаторни кардиоваскуларни ефекат [167,168]. То у нашем истраживању није био случај, калијум-тетрахлороплатинат(II) био је у групи супстанци за које се предпоставља да имају вазоконстрикторни ефекат на коронарну циркулацију.

До повећања индекса липидне пероксидације доводи и употреба доксорубицина (*DOX*). Он је најчешће употребљавани антрацилински медикамент а самим тим и највише ипитан, из тог разлога осврнућемо се на његов механизам токсичности. Користи се у терапији различитих неоплазми (лимфоми, акутне леукемије, карциноми дојке, микроцелуларни карцином плућа, карциноми мокраћне бешике, штитњаче, желуца, саркоми меких ткива и костију, неуробластоми, Вилмсов тумор). У току терапије могу се испољити и нежељени ефекти на: срцу, јетри, плућима, бубрезима, ћелијама крви. Нежељени ефекти на нивоу органа последица су промена на нуклеинским базама у самим ћелијама, као и услед продукције слободних радикала који доводе до појаве липидне пероксидације а тиме и до оштећења ћелијске мембране. Интеракција *DOX*-а са топоизомеразом (II) даје веома стабилан комплекс Доксорубицин-ДНК-топоизомераза (II) који је најважнији механизам за цитостатску активност неких антрацилинских медикамената. Топоизомераза има веома важну улогу у процесу транскрипције ДНК у периоду ћелијске деобе. Посе терапије *DOX*-ом на ћелијама су примећене морфолошке промене удружене са апоптозом. *DOX*-ом изазвана апоптоза може бити најбитнији механизам за терапијски и/или токсични ефекат овог медикамента. Код пацијената

који су излечени од тумора уз помоћ терапије са *DOX*-ом главни нежељени ефекат јесте оштећење срчаног мишића. *DOX*-ом изазвана кардиотоксичност може бити акутна или хронична. Доказано је да оксидативни стрес као и функција митохондрија јесу кључно место у процесу штићења ткива [160, 169-71]. Енергетски метаболизам, регулација нивоа калцијума и индукција апоптозе, главна су улога митохондрија у ћелији. Потребе за енергијом диктирају број митохондрија у ћелији. Срчани и скелетни мишић, мозак и јетра имају највише митохондрија због њиховог високог енергетског метаболизма. Такође, ове ћелије су изложене високом оксидативном стресу, што условљава и већи број митохондрија [172-174]. *DOX*-ом индуковани оксидативни стрес објашњава се хемијском структуром овог медикамента који стимулише настанак *ROS*. Интрацелуларна концентрација *DOX*-а два пута је већа од екстрацелуларне, доказано је на *in vitro* експерименталним моделима. На нивоу митохондрија долази до реакције између *DOX*-а и митохондријалног ензима *NADH*-дехидрогеназе услед чега долази до ланчане реакције *ROS*. Последица тога је смањење нивоа ендогених антиоксиданаса што доводи до оксидативног стреса и оштећења ткива [160, 169-71].

*DOX* интерагује са  $Ca^{2+}$  и утиче на његову хомеостазу, то доводи до промена у контракцији срчаног мишића [175]. То није у корелацији са нашим резултатима који се односе на перфундовање срца са калијум-тетрахлороплатинатом (II).

## ЗАКЉУЧЦИ

1. На основу дозно-зависног снижења коронарног протока, можемо закључити да су директни ефекти Pt(IV)-комплекса ( $[PtCl_4(en)]$  и  $[PtCl_4(dach)]$ ) и етилендиамина на изоловано срце пацова били доминантно ограничени на коронарни ендотел, а мање на срчани мишић.
2. Перфундовање срца калијум-тетрахлороплатинатом(II) је поред вазоконстрикторног ефекта (дозно-зависан пад коронарног протока) показало прооксидативно дејство (повећање вредности нитрита и индекса липидне пероксидације).
3. Цисплатина је индуковала депресију функције изолованог срца пацова што се манифестовало дозно-зависним снижењем вредности контрактилности, коронарног протока и смањењем фреквенце срца.
4. Перфундовање срца са 1,2-диамино-циклохексаном није изазвало значајне ефекте на срчани мишић у нашем експерименталном моделу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenberg B. Some Biological Effects of Platinum Compounds. *Platinum Metals Rev.* 1971; 15, (2): 42-51.
2. Elhusseiny AF, Hassan HH. Antimicrobial and antitumor activity of platinum and palladium complexes of novel spherical aramides nanoparticles containing flexibilizing linkages: structure-property relationship. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013 Feb; 15, 103: 232-45.
3. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 146: 1-53.
4. 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: 12329-54.
5. Lee YA, Lee SS, Kim KM, Lee CO, Sohn YS. Synthesis and oral antitumor activity of tetrakis(carboxylato)platinum(IV) complexes. *J Med Chem.* 2000 Apr 6; 43(7): 1409-12.
6. Shi Y, Liu S-A, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC. Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin. *J Inorg Biochem* 2012; 107: 6-14.
7. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present cancer treatments. *Crit Rev Oncol Hemat* 2002; 42: 317-25.
8. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature* 1965; 698-99.

9. Wong E, Giandomenico CM. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* 1999; 2451-66.
10. Lippert B. (Ed.): *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, Switzerland, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 1999; pp.563.
11. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 2007; 9-23.
12. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chemical Reviews* 2003; 645-61.
13. Hussein A, Ahmed AE, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of dlipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2012; 6: 147-56.
14. Loehrer PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med.* 1984; 100: 704-13.
15. Raschi E, Vasina V, Ursino MG, Boriani G, Martoni A, De Ponti F. Anticancer drugs and cardiotoxicity: insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 125: 196–218.
16. Yolanda I, Chirino J, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009; 61: 223-42.

17. El-Awady ES, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 335-41.
18. Bree E, Ruth S, Schotborgh CE, Baas P, Zoetmulder FA. Limited Cardiotoxicity after Extensive Thoracic Surgery and Intraoperative Hyperthermic Intrathoracic Chemotherapy with Doxorubicin and Cisplatin. *Annals of Surgical Oncology* 2007; 14: 3019-26.
19. Liaw CC, Wang CH, Chang HK, Kao CY, Huang JS. Prevention of acute and delayed cisplatin-induced nausea and vomiting with intravenous ondansetron plus intravenous dexamethasone. *Chang Gung Med J*. 2000 Jul; 23(7): 413-19.
20. Hayes DM, Cvitkovic E, Golbey RB, Scheiner E, Helson L, Krakoff IH. High dose cis-platinum diammine dichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis. *Cancer* 1977, 39: 1372–81.
21. McWhinney RS, Goldberg MR. and McLeod LH. Platinum Neurotoxicity Pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther*. 2009 January ; 8(1): 10–16.
22. Jamesdaniel S, Coling D, Hinduja S, Ding D, Li J, Cassidy L, Seigel GM, Qu J, Salvi R. Cisplatin-induced ototoxicity is mediated by nitroxidative modification of cochlear proteins characterized by nitration of Lmo4. *J Biol Chem*. 2012 May 25; 287(22): 18674-86.
23. Cleare MJ, Hoeschele JD. Antitumor platinum compounds. Relation between structure and activity. *Plat Met Rev*. 1973a; 17:2–13.
24. Cleare MJ, Hoeschele JD. Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum(II) complexes. *Bioinorg Chem*. 1973b; 2:187–210.



25. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol.* 1999; 17:409–422.
26. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical status of cisplatin, carboplatin, and other platinum-based antitumor drugs. In: Lippert B (ed) *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug.* Verlag Helvetica Chimica Acta. 1999; Wiley-VCH, Weinheim, pp 31–69.
27. Highley MS, Calvert AH. Clinical experience with cisplatin and carboplatin. In: Kelland LR, Farrell N (eds) *Platinum-based drugs in cancer therapy.* Humana. 2000; Totowa, pp 171–94.
28. Blommaert FA, van Dijk-Knijenburg HCM, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F, Fichtinger-Shepman AMJ. Formation of DNA adducts by the drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* 1995; 34: 8474–80.
29. Gill I, Muggia FM, Terheggen PM, Michael C, Parker RJ, Kortés V, Grunberg S, Christian MC, Reed E, den Engelse L. Dose-escalation study of carboplatin (day 1) and cisplatin (day 3): tolerance and relation to leukocyte and buccal cell platinum-DNA adducts. *Ann Oncol.* 1991; 2: 115–21.
30. Blommaert FA, Michael C, Terheggen PMAB, Muggia FM, Kortés V, Schornagel JH, Hart AAM, den Engelse L. Drug-induced DNA modification in buccal cells of cancer patients receiving carboplatin and cisplatin combination chemotherapy, as determined by an immunocytochemical method: interindividual variation and correlation with disease response. *Cancer Res.* 1993; 53: 5669–75.
31. Sasaki Y, Tamura T, Eguchi K, Shinkai T, Fujiwara Y, Fukuda M, Ohe Y, Bungo M, Horichi N, Niimi S, Minato K, Nakagawa K, Saijo N. Pharmacokinetics of

- (glycolato-O,O')-diammine platinum(II), a new platinum derivative, in comparison with cisplatin and carboplatin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 23: 243–46.
32. Sasaki Y, Amano T, Morita M, Shinkai T, Eguchi K, Tamura T, Ohe Y, Kojima A, Saijo N. Phase I study and pharmacological analysis of cis-diammine(glycolato)platinum (254-S; NSC 375101D) administered by 5-day continuous intravenous infusion. *Cancer Res.* 1991; 51: 1472–77.
33. Akaza H, Togashi M, Nishio Y, Miki T, Kotake T, Matsumura Y, Yoshida O, Aso Y. Phase II study of cis-diammine(glycolato)platinum, 254-S, in patients with advanced germ-cell testicular cancer, prostatic cancer, and transitional-cell carcinoma of the urinary tract. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 31: 187–92.
34. Shimada M, Itamochi H, Kigawa J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 2013 May 8; 5: 67-76.
35. Yoshioka T, Gamoh M, Shineha R, Ishibashi S, Shibata H, Suzuki T, Murakawa Y, Kato S, Shimodaira H, Kato S, Ishioka C, Kanamaru R. A new combination chemotherapy with cis-diammine-glycolato platinum (Nedaplatin) and 5-fluorouracil for advanced esophageal cancers. *Internal Med.* 1999; 38: 844–48.
36. Trask C, Silverstone A, Ash CM, Earl H, Irwin C, Bakker A, Tobias JS, Souhami RL. A randomized trial of carboplatin versus iproplatin in untreated advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1991; 9: 1131–37.
37. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1522–34.
38. Oldenburg J, Begg AC, van Vugt MJH, Ruevekamp M, Schornagel JH, Pinedo HM, Los G. Characterization of resistance mechanisms to cis-

- diamminedichloroplatinum(II) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line in vitro. *Cancer Res.* 1994; 54: 487-93.
39. Simmonds AP, McDonald EC. Ovarian carcinoma cells in culture: assessment of drug sensitivity by clonogenic assay. *Br J Cancer* 1984; 50: 317–26.
40. Ali I, Wani WA, Saleem K, Haque A. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Feb; 13(2): 296-306.
41. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. 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.
42. Screnci D, Er HM, Hambley TW, Galettis P, Brouwer W, McKeage MJ. Stereoselective peripheral sensory neurotoxicity of diamminocyclohexane platinum enantiomers related to ormaplatin and oxaliplatin. *Br J Cancer* 1997; 76: 502–10.
43. Gibbons GR, Page JD, Mauldin SK, Husain I, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance in L1210 cells. *Cancer Res.* 1990; 50: 6497–01.
44. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. 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.
45. Schmidt W, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53: 799–805.

46. Page JD, Husain I, Sancar A, Chaney SG. Effect of the diamminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. *Biochemistry* 1990; 29: 1016–24.
47. Gamelin E, Le Brouil A, Boisdron-Celle M, Turcant A, Delva R, Cailleux A, Krikorian A, Brienza S, Cvitkovic E, Robert J, Larra F, Allain P. Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 891–99.
48. Extra JM, Espie M, Calvo F, Ferme C, Mignot L, Marty M. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; 25: 299–03.
49. Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL. Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 1998; 25, Suppl 5:1322.
50. Levi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin. Pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 1–21.
51. Chaney S. The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diamminocyclohexane carrier ligand. *Int J Oncol.* 1995; 6: 1291-305.
52. Rischin D, Ling V. Ormaplatin resistance is associated with decreased accumulation of its platinum (II) analogue, dichloro(D,L-trans)1,2-diamminocyclohexaneplatinum (II). *Brit J Cancer* 1996; 74: 590-96.
53. Screnci D, McKeageMJ, Galettis P, Hambley TW, Palmer BD, Baguley BC. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Brit J Cancer* 2000; 82: 966-72.

54. Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. Pharmacokinetics and biotransformations of oxaliplatin in comparison with ormaplatin following a single bolus intravenous injection in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 19-28.
55. Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. Pharmacokinetics and biotransformations of oxaliplatin in comparison with ormaplatin following a single bolus intravenous injection in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, 44: 19–28.
56. Schilder RJ, LaCreta FP, Perez RP, Johnson SW, Brennan JM, Rogatko A, Nash S, McAleer C, Hamilton TC, Roby D, Young RC, Ozols RF, O'Dwyer PJ. Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule. *Cancer Res.* 1994; 54: 709–17.
57. O'Rourke TJ, Weiss GR, New P, Burris HA, Rodriguez G, Eckhart J, Hardy J, Kuhn JG, Fields S, Clark GM, Von Hoff DD. Phase I clinical trial of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812). *Anti-Cancer Drugs.* 1994; 5: 520–26.
58. Saris CP, van der Vaart PJ, 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: 2763–69.
59. McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001 Jan; 10(1): 119-28.
60. Vouillamoz-Lorenz S, Buclin T, Lejeune F, Bauer J, Leyvraz S, Decosterd LA. Pharmacokinetics of satraplatin (JM216), an oral platinum (IV) complex under daily oral administration for 5 or 14 days. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun; 23(3C): 2757-65.

61. Kelland LR. New platinum drugs. The pathway to oral therapy. In: Kelland LR, Farrell N (eds) *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana, 2000; Totowa, pp 299–319.
62. Raynaud FI, Mistry P, Donaghue A, Poon GK, Kelland LR, Barnard CFJ, Murrer BA, Harrap KR. Biotransformation of the platinum drug JM216 following oral administration to cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38: 155–62.
63. Galanski M, Keppler BK. Searching for the magic bullet: anticancer platinum drugs which can be accumulated or activated in the tumor tissue. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007 Jan; 7(1): 55-73.
64. Rademaker-Lakhai JM, Terret C, Howell SB, Baud CM, De Boer RF, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH, Droz JP. A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2004 May 15; 10(10): 3386-95.
65. Lin X. Zhang Q. Rice JR. Stewart DR. Nowotnik DP. Howel SB. Improved targeting of platinum chemotherapeutics: the antitumour activity of the HPMA copolymer platinum agent AP5280 in murine tumour models. *European Journal of Cancer* 2004 January; 40(2): 291-97.
66. Jovanović S, Petrović B, Bugarčić ŽD. and Van Eldik R. Reduction of some Pt(IV) complexes with biologically important sulfur-donor ligands†. *Dalton Trans*. 2013; 42: 8890–96.
67. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR., Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL4CL2].H2O where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem*. 2001 Jan 15; 83(2-3): 91-100.

68. Kaluđerović NG, Miljković Đ, Momčilović Lj. et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int. J. Cancer* 2005; 116: 479–86.
69. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev.* 2008 Jul; 88(3): 1009-86.
70. Siewnicka A, Fajdek B, Janiszowski K. Simulation of Human Circulatory System with Coronary Circulation and Ventricular Assist Device. *Mechatronics* 2012; 679-83.
71. Richard E, Klabunde D. *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins 2011; 6-97.
72. Teunissen P, Horrevoets A, van Royen N. The coronary collateral circulation: Genetic and environmental determinants in experimental models and humans Review Article. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012 April; 52(4): 897-904.
73. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 2010; 464(7288): 549-53.
74. Fukuta H, Little WC. The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart Fail Clin.* 2008 Jan; 4(1): 1-11.
75. Borlaug BA, Kass DA. Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Nov; 16(8): 273-79.
76. von Spiegel T, Wietasch G, Hoeft A. Basics of myocardial pump function. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Sep; 46 Suppl 2: 237-41.
77. Mikawa T, Hurtado R. Development of the cardiac conduction system. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Feb; 18(1): 90-100.

78. Solaro RJ. Regulation of Cardiac Contractility. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2011.
79. Little WC. The left ventricular dP/dtmax–end-diastolic volume relation in closed-chest dogs. *Circ Res.* 1987; 56: 808-15.
80. Gerald W. Dorn II and Jeffery D. Molkentin. Manipulating Cardiac Contractility in Heart Failure. *Circulation* 2004; 109: 150-58.
81. Sharma S, Jackson PG. and Maken J. Cardiac troponins. *J Clin Pathol.* 2004 October; 57(10): 1025–26.
82. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 423–29.
83. Rüegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften* 1998 Dec; 85(12): 575-82.
84. Hamman BL, Bittl J A, Jacobus WE, Allen PD. Spencer RS. Tian R. Ingwall JS. Inhibition of the creatine kinase reaction decreases the contractile reserve of isolated rat hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* Published 1 September 1995; 269: 1030-36.
85. Drake-Holland AJ, Sitsapesan R, Herbaczynska-Cedro K, Seed WA. and Noble MIM. Effect of adrenaline on cardiac force-interval relationship. *Cardiovasc Res.* 1992; 26(5): 496-501.
86. Farrell AP. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. *Canadian Journal of Zoology* 1984; 62(4): 523-36.



87. Djuric DM, Wisotzki R, Mitrovic V. Homocysteine - A new cardiovascular risk factor? *Herz kreislauf* 1999; 31(12): 485-90.
88. Zivkovic VI, Jakovljevic VLj, Djordjevic DZ, Vuletic MS, Barudzic NS, Djuric DM. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 370(1-2): 59-67.
89. Jakovljevic VLj, Mujovic VM, Novokmet SS, Miloradovic MM, Djuric DM. Different effects of specific phosphodiesterase inhibitors on oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; 34(6): A30-A30
90. Perić T, Jakovljević VLj, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrović ZD, Simijonović D, Novokmet S, Djuric DM, Janković SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. *Med Chem.* 2012; 8: 9-13.
91. Hong RA, Imura T, Sumida KN, Eager RM. Cardio-oncology/oncocardiology. *Clinical Cardiology* 2010; 33(12): 733–37.
92. Mendelsohn M, Karas R. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308(5728): 1583–87.
93. Deng S, Wojnowski L. Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology* 2007; 7(2): 129–3.
94. Schimmel K, Richel D, Brink R, Guchelaar H-J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews* 2004; 30: 181–91.
95. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC. and Perry MC. Cardiotoxicity of Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(30): 7685-96.

96. Dolci A, Dominici R, Cardinale D. et al. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *American Journal of Clinical Pathology* 2008; 130(5): 688–95.
97. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety* 2000; 22(4): 263–302.
98. Albini A, Pennesi G, Donatelli R, Cammarota S, De Flora and Noonan DM. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(1): 14-25.
99. Svoboda M, Poprach A, Dobes S, Kiss I, Vyzula R. Cardiac toxicity of targeted therapies used in the treatment for solid tumors: a review. *Cardiovascular Toxicology* 2012; 12: 191–207.
100. Harbeck N, Ewer MS, De Laurentiis M, Suter TM, Ewer SM. Cardiovascular complications of conventional and targeted adjuvant breast cancer therapy. *Annals of Oncology* 2011; 22: 1250–58.
101. Cardinale D, Bacchiani G, Beggiato M, Colombo A, Cipolla CM. Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients. *Semin Oncol.* 2013, Apr; 40(2): 186-98.
102. Berardi R, Caramanti M, Savini A, Chiellini S, Pierantoni C, Onofri A, Ballatore Z, De Lisa M, Mazzanti P, Cascinu S. State of the art for cardiotoxicity due to chemotherapy and to targeted therapies: A literature review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013; 88: 75–86.

103. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Apr 28; 61(4): 290-302.
104. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2001; 82: 47-95.
105. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007 Sep; 96(9): 2181-96.
106. Rossi F, Fillippelli W, Russo S, Fillippelli A, Berrino L. Cardiotoxicity of doxorubicin: effects of drugs inhibiting the release of vasoactive substances. *Pharm Tox.* 1994; 75: 99-107.
107. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochem.* 1997; 36: 11293-97.
108. Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res.* 1988; 48: 4766-69.
109. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1980; 65: 128-35.
110. Li T, Singal PK. Adriamycin induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000; 102: 2105-10.
111. Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. In: Döring C. *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology. Biological Measurement Techniques.* Berlin, Germany: Biomesstechnik-Verlag, 1988; 1-129.

112. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26: 131–8.
113. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–8.
114. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton (FL, USA): CRC Press, 1985: 177-80.
115. 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.
116. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 335-41.
117. Perić T, Jakovljević VLj, Zivkovic V, Krkeljic J, Petrović ZD, Simijonović D, Novokmet S, Djuric DM, Janković SM. Toxic effects of palladium compounds on the isolated rat heart. *Med Chem* 2012; 8: 9-13.
118. Pouna P, Bonoron-Adèle S, Gouverneur G, Tariosse L, Besse P, Robert J. Evaluation of anthracycline cardiotoxicity with the model of isolated, perfused rat heart: comparison of new analogues versus doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 35(3): 257-61.
119. Wienen W, Jüngling E, Kammermeier H. Enzyme release into the interstitial space of the isolated rat heart induced by changes in contractile performance. *Cardiovasc Res* 1994 (8): 1292-98.

120. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39: 175-91.
121. 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 Apr;37(4):460-5.
122. 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; 41:12329-54.
123. Ramaciotti C, Sharkey A, McClellant G, and Winegrad S. Endothelial cells regulate cardiac contractility. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1992; Vol. 89, pp.4033-4036.
124. Furchgott R. and Vanhoutte P. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal* 1989; vol.3 no.9 2007-2018.
125. Palmer R. M, Ferrige A. G, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)* 1987; 27: 524-526.
126. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12: 365-372.
127. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Comment in Nature* 1988; 32:411-415.
128. Spiers J, Kelso E, McDermott B, Scholfield C, and B. Silke B. Endothelin-1 mediated inhibition of the acetylcholine-activated potassium current from rabbit isolated atrial cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. Dec 1996; 119(7): 1427-1437.

129. Brutsaert LD. The Endocardium. *Annual Review of Physiology*. 1989; 51: 263-273.
130. Smith, J. A., Shah, A. M. & Lewis, M. J. Endothelial Modulation of Cardiac Function. *J. Physiol. (London)* 1991; 439: 1-14.
131. Lin LE, McClellan G, Weisberg A, Winegrad S. Changes in cardiac contractility related to calcium-mediated. *J Physiol*. 1991 Sep;441:73-94.
132. Vasic V, Momic T, Petkovic M, Krstic D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors* 2008; 8: 8321-60.
133. Waldman AS. and Terzic A. Pharmacology and Therapeutics – Principles to Practice. *Ann Pharmacother* 2009; 4: 796-797.
134. Yu PS. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1601-1609.
135. Reuter H. Ion Channels in Cardiac Cell Membranes. *Annual Review of Physiology*. 1984; 46: 473-484.
136. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh JD. Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 817-49.
137. Vasilets LA, Schwarz W. Structure-function relationships of cation binding in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 201-22.
138. Scheiner-Bobis G. The sodium pump, its molecular properties and mechanisms of ion transport. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2424-33.
139. Xie Z, Askari A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2434-9.
140. Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003; 3: 157-68.

141. Vasic V, Momic T, Petkovic M, Krstic D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors* 2008; 8: 8321-60.
142. Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, Kiss R. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 1403–17.
143. Krinulović K, Bugarčić Ž, Vrvic M, Krstić D, Vasić V. Prevention and recovery of ( $\mu$ 3-diethylentriamino)-chloro-palladium(II)-chloride induced inhibition of Na/K-ATPase by SH containing ligands – L-cysteine and glutathione. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 1292–99.
144. 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: 190–98.
145. O'Rourke B, Cortassa S, Akar F, Aon M. Mitochondrial ion channels in cardiac function and dysfunction. *Novartis Found. Symp.* 2007; 287:140–51.
146. Terence S. Herman, Beverly A. Teicher, Victor Chan, et al. Effect of Hyperthermia on the Action of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), Rhodamine 1232 [Tetrachloroplatinum(II)], Rhodamine 123, and Potassium Tetrachloroplatinate *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res* 1988;48:2335-2341.
147. Gulshan Ara, Tetsuya Kusumoto, Timothy T. Korbut, Francisco Cullere-Luengo, and Beverly A. Teicher. *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) Resistant Human Lymphoma Cell Lines Are Collaterally Sensitive to PtCl<sub>4</sub>(Rh-123)<sub>2</sub>: Evidence for Mitochondrial Involvement. *CANCER RESEARCH* 54. 1497-1502. March 15, 1994.
148. 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: 43–50.

149. Murata T, Hibasami H, Maekawa S, Tagawa T, Nakashima K. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. *Biochem. Int.* 1990; 20:949–55.
150. Garrido N, Perez-Martos A, Faro M et al. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochem. J.* 2008; 414: 93–102.
151. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.* 2006; 12: 908–16.
152. Hermansky J. S, Yang R. S. H, Garman R.H. and Leung H. W. Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of Ethylenediamine Dihydrochloride by Dietary Incorporation in Fischer 344 Rats. *Food and Chemical Toxicology* 37 (1999) 765-76.
153. Slesinski R. S., Guzzie P. J., Hengler W. C., Watanabe P. G., Woodside M. D. and Yang R. S. H. Assessment of genotoxic potential of ethylenediamine: in vitro and in vivo studies. *Mutation Research* 124, (1983) 299-314.
154. DePass L. R., Yang R. S. H. and Woodside M. D. Evaluation of the teratogenicity of ethylenediamine dihydrochloride in Fischer 344 rats by conventional and pair-feeding studies. *Fundamental and Applied. Pharmacology.* 9, (1987) 687-697.
155. Leung H. W. Evaluation of the genotoxic potential of alkyleneamines. *Mutation Research* 320, (1994) 31-43.
156. Chaney S. The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand. *Int J Oncol* 1995; 6: 1291-305.
157. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Physiol Biochem Pharmacol* 2003;1-53.



158. Demkow U, Stelmaszczyk-Emmel A. Cardiotoxicity of cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 187 (2013) 64– 67.
159. Tassinari D, Sartori S, Drudi G et al. Cardiac arrhythmias after cisplatin infusion: Three case reports and a review of the literature. *Ann. Oncol.* 1997; 8: 1263–7.
160. Miroslav M. Mistic, Vladimir L. Jakovljevic, Zivadin D. Bugarcic, Vladimir I. Zivkovic, Ivan M. Srejavic, Nevena S. Barudzic, Dragan M. Djuric, Slobodan S. Novokmet. Platinum Complexes-Induced Cardiotoxicity of Isolated, Perfused Rat Heart: Comparison of Pt(II) and Pt(IV) Analogues Versus Cisplatin. *Cardiovascular Toxicology* 2014; Nov: 767-74.
161. Darley-USmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 1996; 13(5): 649–62.
162. Pešić S, Jakovljević V, Čubrilo D, Živković V, Jorga V, Mujović V, Stojimirović B. Evaluacija oksidativnog statusa kod vrhunskih sportista-karatista u procesu treninga. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(7): 551–555.
163. Yolanda I, Chirino J, José Pedraza Chaverri. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2009;61;223-242.
164. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jan 10;650(1):335-41.
165. Inanç M, Akpek M, Inanç MT, Kaya MG. Acute pericarditis during 5-fluorouracil, docetaxel and cisplatin therapy. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2012 Oct;40(6):532-5.

166. Kozubík A1, Vaculová A, Soucek K, Vondráček J, Turánek J, Hofmanová J. Novel Anticancer Platinum(IV) Complexes with Adamantylamine: Their Efficiency and Innovative Chemotherapy Strategies Modifying Lipid Metabolism. *Met Based Drugs*. 2008;2008:417897.
167. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*. 2005, 5:1232-40.
168. França-Silva M, Balarini C, Cruz J, Khan B, Rampelotto P, Braga V. Organic Nitrates: Past, Present and Future. *Molecules* 2014, 19:15314-15323.
169. Govedarica B, Djordjevic-Milic V, Radic N, Srdjenovic B, Djordjevic A, Influence of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> on enzyme status in serum of rats after single dose administration of doxorubicin, *Hem. Ind*. 2008, 62:191–196.
170. De Vita T, Hellman J, Rosenberg A, *Cancer principles and practice of oncology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 375–512.
171. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, da Silva R, Lucchinetti E, Schaub MC, Wallimann T, Schlattner U. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jul;289(1):H37-47.
172. Beattie DS. Bioenergetics and Oxidative Metabolism. In: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Devlin TM. 5th edition, USA, New York: Wiley-Liss, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2002.
173. Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurons. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 167-85.

174. Tsutsui H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med* 2001; 40; 1177-82.
175. Sliwinska J, Dudka J, Korga A, Burdan F, Matysiak W, Jodlowska-Jedrych B, Mandziuk S, Dawidek-Pietryka K. Tirapazamine-Doxorubicin Interaction Referring to Heart Oxidative Stress and Ca<sup>2+</sup> Balance Protein Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2012, Article ID 890826, 9 pages