



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милица Г. Пауновић

**КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА АНТИТУМОРСКОГ
И РЕДОКС ПОТЕНЦИЈАЛА ОДАБРАНИХ
ПЛАТИНА(IV) КОМПЛЕКСА И РЕСВЕРАТРОЛА
У *IN VITRO* И *IN VIVO* ТРЕТМАНИМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Milica G. Paunović

**COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTITUMOR
AND REDOX POTENTIAL OF SELECTED
PLATINUM(IV) COMPLEXES AND RESVERATROL
IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* TREATMENTS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

Аутор
Име и презиме: Милица Г. Пауновић
Датум и место рођења: 6.10.1986. године у Крагујевцу
Садашње запослење: асистент на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Компаративна анализа антитуморског и редокс потенцијала одабраних платина(IV) комплекса и ресвератрола у <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> третманима
Број страница: 164
Број слика: 20 слика, 45 графика, 13 табела
Број библиографских података: 262
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биологија, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија (591.1:577.2(043.3))
Ментор: др Милош Матић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 23.10.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-6/3; 22.01.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ul style="list-style-type: none"> 1. Др Бранка Огњановић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 2. Др Милош Матић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 3. Др Светлана Ивановић-Матић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, научна област: Биологија.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ul style="list-style-type: none"> 1. Др Бранка Огњановић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 2. Др Перица Васиљевић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу, ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија; 3. Др Верица Јевтић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Неорганска хемија.
Датум одбране докторске дисертације:

Софији и Петру

Захвалница

Експериментални део истраживања ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за молекуларну биологију и физиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, као и у Лабораторији Института за патологију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Истраживање је представљало део пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору проф. др Милошу Матићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на стручним саветима и пренетом знању, на посвећености у заједничком раду, пруженој подршци и несебичној помоћи од реализације првих експеримената па до данас. Његови пријатељски савети, разумевање и поверење омогућили су успешност у мом досадашњем раду.

Посебну захвалност дугујем својој професорки др Бранки Огњановић, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на пруженој помоћи, залагању и личној ангажованости у експерименталном раду, на неусисрпним разговорима и свим искреним саветима и корисним сугестијама који су значајно олакшали пут израде ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем проф. др Перици Васиљевић, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу и проф. др Верици Јевтић, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на сарадњи, стручним саветима и сугестијама који су допринели квалитету и садржајности ове дисертације.

Захваљујем се свим својим колегама и пријатељима који су на било који начин допринели реализацији овог рада, а посебно се захваљујем Ани на корисним методолошким саветима, и наравно хвала Драгани која је увек била ту у право време.

На крају, највећу захвалност дугујем својој породици. Хвала вам што сте веровали у мене. Николи посебно хвала на разумевању мојих амбиција и безграничној љубави, стрпљењу и подршци. Неизмерно хвала мојој деци, Софији и Петру, за сваки измамљен осмех, за сваки улепшан дан, за безусловну љубав која ми је дала снагу да истрајем до краја.

Милица Пауновић

АПСТРАКТ

Глобални пораст инциденце туморских болести, развој резистенције канцерних ћелија на хемотерапеутике, као и неселективност хемотерапеутика, усмерили су истраживања ка проналаску ефикасних природних и синтетисаних једињења са антитуморским својствима. У овој дисертацији евалуирани су механизми антитуморског деловања и токсичних/протективних ефеката новосинтетисаних платина(IV) комплекса са одређеним естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) ацетата и ресвератрола. Испитивани комплекси испољавају интензивнији антипролиферативни ефекат од цисплатине према хуманим ћелијама тумора дојке (MDA-MB-231), тумора плаценте (JEG-3) и здравим фибробластима плућа (MRC-5). Комплекс са етил супституентом редукује миграторни потенцијал туморских ћелија и индукује оксидативни стрес у свим коришћеним ћелијама. Комбиновани третман ресвератролом интензивира антипролиферативни, антимиграторни и прооксидативни потенцијал платина(IV) комплекса лимитирајући негативне ефекте према здравим ћелијама. Испитивани платина(IV) комплекси у односу на цисплатину испољили су интензивније токсичне ефекте потврђене индукованим променама хематолошких и биохемијских параметара крви и оксидативним оштећењима еритроцита, ћелија јетре и бубрега третираних женки Wistar albino пацова. Антиоксидативни ефекти ресвератрола након комбинованих третмана испољени су супримирањем оксидативних оштећења еритроцита, док су у ткиву јетре и бубрега детектовани прооксидативни ефекти овог полифенола. Добијени резултати доприносе расветљавању механизма дејства испитиваних једињења указујући на њихов изузетан антитуморски потенцијал, али и потребу проналажења новог варијетета платина(IV) комплекса са редукованом токсичношћу и/или ефикаснијег антиоксиданса као потенцијалних хемотерапеутских агенаса.

Кључне речи: цисплатина, платина(IV) комплекси, ресвератрол, тумор дојке, тумор плаценте, оксидативни стрес, природни агенс, антиоксиданс, хепатотоксичност, нефротоксичност.

ABSTRACT

The global increase in the incidence of tumor diseases, the development of resistance of cancer cells to chemotherapeutics, as well as the non-selectivity of chemotherapeutics, directed research to the discovery of effective natural and synthetic compounds with antitumor properties. This study evaluates the mechanisms of antitumor action and toxic/protective effects of newly synthesized Pt(IV) complexes with certain esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl) acetate and resveratrol. The examined complexes exhibit a more intense antiproliferative effect than cisplatin against human breast tumor (MDA-MB-231), placental tumor (JEG-3) and healthy lung fibroblasts (MRC-5) cells. The complex with an ethyl substituent reduces the migratory potential of tumor cells and induces oxidative stress in all used cells. Combined treatment with resveratrol intensifies the antiproliferative, antimigratory and prooxidative potential of the Pt(IV) complex, limiting the negative effects on healthy cells. Compared to cisplatin, the tested Pt(IV) complexes exhibited more intense toxic effects confirmed by induced changes in hematological and biochemical parameters and oxidative damage of erythrocytes, liver and kidney cells of treated female Wistar albino rats. The antioxidant effects of resveratrol were manifested after combined treatments by suppressing oxidative damage of erythrocytes, while the prooxidative effects of this polyphenol were expressed on liver and kidney tissues. The obtained results contribute to elucidating the mechanisms of action of the investigated compounds, indicating their exceptional antitumor potential, but also the need to find a new variety of Pt(IV) complexes with reduced toxicity and/or more effective antioxidants as potential chemotherapeutic agents.

Keywords: cisplatin, platinum(IV) complexes, resveratrol, breast tumor, placental tumor, oxidative stress, natural agent, antioxidant, hepatotoxicity, nephrotoxicity.

САДРЖАЈ

I УВОД	1
1. Настанак и прогресија малигног тумора	1
1.1. Тумор дојке	4
1.2. Тумор плаценте.....	6
2. Редокс хомеостаза	7
2.1. Реактивне врсте кисеоника и азота.....	10
2.2. Ефекти оксидативног/нитрозативног стреса на биомолекуле	14
2.3. Антиоксидативни одбрамбени систем	16
2.3.1. Ензими антиоксидативног заштитног система	18
2.3.2. Глутатион – главни представник неензимских компоненти AOS-а	20
2.4. Улога оксидативног стреса у процесу развоја тумора.....	21
2.4.1. Редокс хомеостаза туморских ћелија	24
3. Антитуморска терапија и хемотерапеутски медикаменти	25
3.1. Биомедицинска употреба комплекса метала	26
3.1.1. Антитуморска активност и механизам деловања платина(II) комплекса	26
3.1.2. Платина(IV) комплекси – потенцијални антитуморски агенси	30
3.2. Комбинована антитуморска терапија.....	31
4. Биомедицинска примена природних полифенолних једињења	32
4.1. Ресвератрол	33
4.1.1. Метаболизам и биодоступност ресвератрола	34
4.1.2. Биолошки ефекти ресвератрола	35
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	39
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА	41
1. Хемикалије и реагенси	41
2. Ћелијске линије као модел системи	42
2.1. Коришћене ћелијске линије и методе манипулације	43
2.2. Третмани <i>in vitro</i>	44
2.2.1. Појединачни и комбиновани третмани.....	45
2.3. Испитивање ефеката третмана на вијабилност, цитотоксичност, миграторни потенцијал и редокс статус ћелија	46
2.3.1. Испитивање вијабилности ћелија	46
2.3.2. Испитивање миграторног потенцијала ћелија.....	46
2.3.3. Одређивање параметара редокс статуса ћелија.....	47
2.3.3.1. Квантификација концентрације супероксид анјон радикала.....	47
2.3.3.2. Квантификација концентрације нитрита и водоник пероксида	48
2.3.3.3. Квантификација концентрације редукованог и оксидованог глутатиона	48

3. Лабораторијски пацови као модел системи	49
3.1. Третмани <i>in vivo</i>	49
3.2. Жртвовање животиња и припрема узорака	51
3.2.1. Процесуирање крви	51
3.2.2. Припрема ткива за хистопатолошку опсервацију	51
3.2.3. Поступак хомогенизације ткива	52
3.3. Евалуација хематолошких и биохемијских параметара	52
3.3.1. Квантификација концентрације хемоглобина у лизату еритроцита	53
3.3.2. Квантификација концентрације протеина у ткивним узорцима	54
3.3.3. Одређивање параметара редокс статуса	54
3.3.3.1. Квантификација концентрације супероксид анјон радикала	55
3.3.3.2. Квантификација концентрације водоник пероксида	55
3.3.3.3. Квантификација концентрације нитрита	55
3.3.3.4. Квантификација концентрације липидних пероксида	56
3.3.3.5. Квантификација концентрације редукованог и оксидованог глутатиона	56
3.3.4. Одређивање активности ензима АОС-а	56
3.3.4.1. Одређивање активности супероксид дисмутазе	57
3.3.4.2. Одређивање активности каталазе	57
3.3.4.3. Одређивање активности глутатион пероксидазе	58
3.3.4.4. Одређивање активности глутатион редуктазе	58
3.3.4.5. Одређивање активности лутатион-S-трансферазе	59
4. Статистичка обрада података	59
IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	60
1. Евалуација ефеката испитиваних једињења у <i>in vitro</i> условима	60
1.1. Процена вијабилности ћелија и цитотоксични ефекат третмана (МТТ тест)	60
1.1.1. Цитотоксичност третмана и вијабилност MDA-MB-231 ћелија	61
1.1.2. Цитотоксичност третмана и вијабилност JEG-3 ћелија	63
1.1.3. Цитотоксичност третмана и вијабилност MRC-5 ћелија	65
1.1.4. Ефекти комбинованих третмана на вијабилност ћелија	66
1.1.4.1. Вијабилност MDA-MB-231 ћелија	67
1.1.4.2. Вијабилност JEG-3 ћелија	67
1.1.4.3. Вијабилност MRC-5 ћелија	68
1.2. Утицај комплекса C1 и ресвератрола на миграторни потенцијал ћелија	69
1.3. Утицај комплекса C1 и ресвератрола на редокс статус ћелија	70
1.3.1. Продукција супероксид анјон радикала	71
1.3.2. Продукција водоник пероксида	72
1.3.3. Продукција азот монооксида	73
1.3.4. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона	74

2. Евалуација ефеката испитиваних једињења у <i>in vivo</i> условима	77
2.1. Утицај третмана на тежину животиња и испитиваних органа	77
2.2. Утицај третмана на хематолошке и биохемијске параметре	78
2.2.1. Хематолошки параметри	78
2.2.2. Биохемијски параметри	82
2.2.2.1. Активност ензима јетре	82
2.2.2.2. Метаболизам глукозе, протеина и липида и функционалност бубрега	83
2.3. Утицај третмана на редокс хомеостазу еритроцита, ћелија јетре и бубрега	85
2.3.1. Продукција реактивних врста кисеоника и азота и липидних пероксида у еритроцитима	86
2.3.2. Утицај третмана на компоненте AOS-а еритроцита	89
2.3.2.1. Продукција редукованог глутатиона	89
2.3.2.2. Активност ензима	90
2.3.3. Продукција реактивних врста кисеоника и азота и липидних пероксида у јетри	94
2.3.4. Утицај третмана на компоненте AOS-а јетре	97
2.3.4.1. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона	97
2.3.4.2. Активност ензима	99
2.3.5. Продукција реактивних врста кисеоника и азота и липидних пероксида у бубрегу	103
2.3.6. Утицај третмана на компоненте AOS-а бубрега	106
2.3.6.1. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона	106
2.3.6.2. Активност ензима	108
2.4. Утицај третмана на хистопатолошке промене ткива јетре и бубрега	112
2.4.1. Морфолошки параметри јетре	112
2.4.2. Морфолошки параметри бубрега	113
V ДИСКУСИЈА	118
1. Ефекти испитиваних једињења након <i>in vitro</i> третмана	120
2. Ефекти испитиваних једињења након <i>in vivo</i> третмана	124
2.1. Промене телесне тежине и релативне тежине јетре и бубрега	125
2.2. Промене хематолошких и биохемијских параметара крви	125
2.3. Утицај третмана на редокс хомеостазу и морфологију испитиваних ткива	129
2.3.1. Утицај на редокс статус еритроцита	129
2.3.2. Утицај на редокс статус и морфолошке карактеристике јетре	134
2.3.3. Утицај на редокс статус и морфолошке карактеристике бубрега	136
VI ЗАКЉУЧЦИ	141
VII ЛИТЕРАТУРА	145



I УВОД

1. Настанак и прогресија малигног тумора

Током процеса канцерогенезе нормалне ћелије подлежу бројним метаболичким променама које су условљене акумулацијом модификација регулаторних гена одговорних за одржавање хомеостазе ћелијског циклуса. Модификације подразумевају активацију гена који су у физиолошким околностима у неактивном облику јер промовишу ћелијски раст и пролиферацију - онкогени, или инактивацију гена одговорних за регулацију ћелијског циклуса и супресију ћелијског раста - тумор супресор гени, за регулацију програмиране ћелијске смрти и за репарацију оштећене ДНК. Ове генетске промене, настале спонтаним мутацијама или мутацијама индукованим деловањем неког генотоксичног агенса, изазивају дерегулацију строго контролисаних процеса ћелијске деобе, диференцијације и програмиране ћелијске смрти - апоптозе, водећи до неконтролисане пролиферације и клонске експанзије мутиране ћелије, као и перманентног преживљавања таквих ћелија услед њихове ефикасности у заобилажењу напада од стране имуних ћелија и у инхибицији апоптозе (Јуришић и Živančević-Somonović, 2002; Hanahan и Weinberg, 2011; Botelho и сар., 2014).

Табела 1. Упоредне карактеристике бенигнух и малигнух тумора (Botelho и сар. 2014)

	Бенигни тумор	Малигни тумор
Карактеристике и ефекти тумора	Углавном нису летални	Уколико се не третирају доводе до смрти домаћина
	Занемарљиве повреде ткива домаћина, стварањем притиска може ометати витално ткиво	Индукује деструкцију виталног ткива водећи до смрти домаћина
	Спорорастући	Брзорастући
	Инкапсулиран, остаје локализован на месту порекла	Инфилтрацијом и инвазијом се шири на околна и удаљена ткива
	Обично расте ширењем и померањем околног ткива	Врши инвазију и деструкцију околног ткива
	Ћелије и ћелијске структуре личе на нормалне ћелије и ткива	Видљиве анапластичне, диспластичне и плеоморфне промене; могу бити повезани са крварењем, некрозом и упалом
	Митозе ретке; облик и боја нуклеуса нормални; нуклеолус није упадљив	Абнормална и честа митоза; Нуклеус и нуклеолус неправилног облика, увећани и хиперхроматични
Осетљивост на зрачење слична оној код нормалног ткива; ретко се лечи зрачењем	Осетљивост на зрачење је пропорционално повећана сходно степену малигнитета; често се лечи зрачењем	

Тумори се могу класификовати према ембрионалном пореклу и хистогенези ћелија и ткива из кога су настали на епителне, мезенхималне, и специјализоване туморе, а према карактеристикама раста и развоја, као и тенденцији ширења (дисплазије) туморског ткива, на бенигне и малигне туморе (Табела 1) (Botelho и сар., 2014). Бенигни (епителиоми и аденоми) и малигни (карциноми и аденокарциноми) епителни тумори могу настати у епителном ткиву усне дупље, ларингса, респираторних путева, дигестивног тракта,

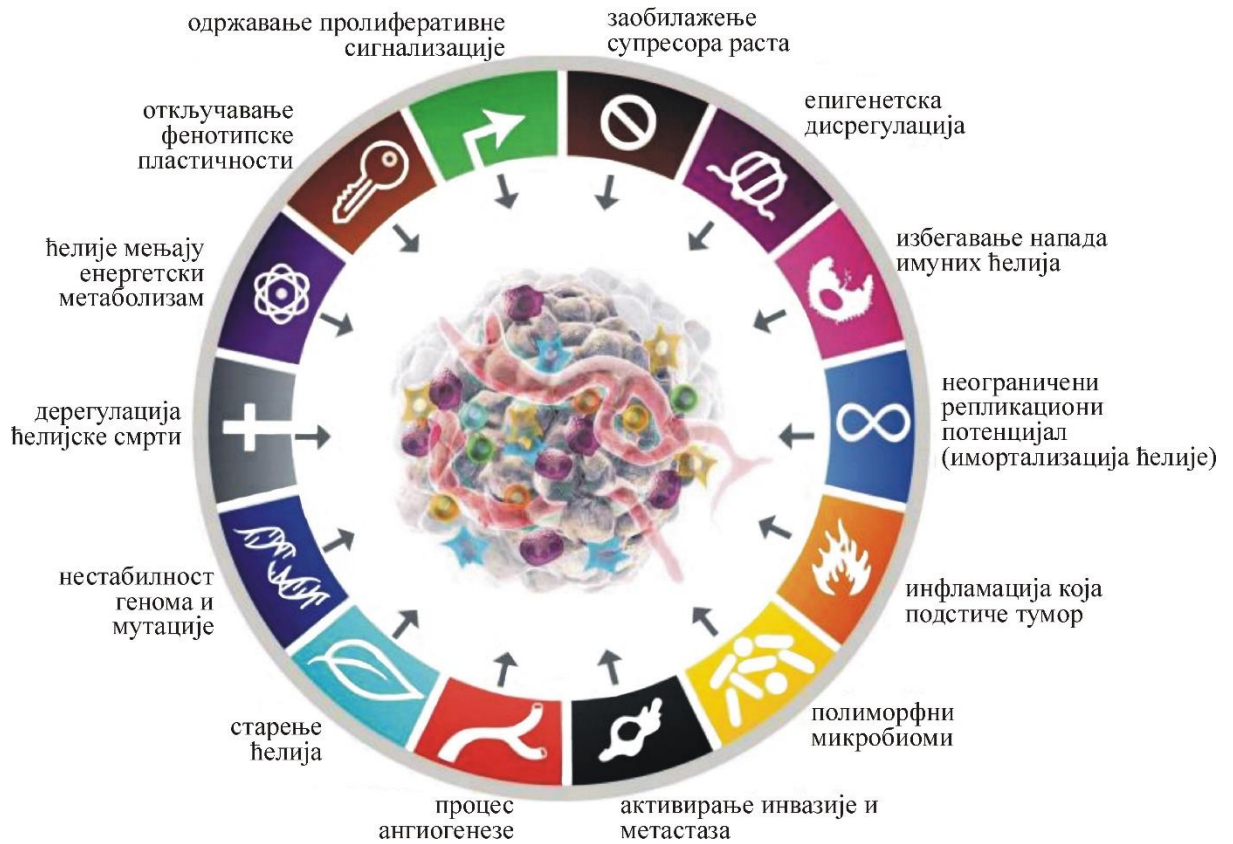
панкреаса, епидермиса коже итд. Мезенхимални бенигни (фиброми, остеоми, хемангиоми) и малигни тумори (фибросаркоми, остеосаркоми, хемангиосаркоми) настају у различитом везивном ткиву, док специјализовани тумори настају у ткиву нервних и чулних ћелија (астроцитом, глиом, шваном, ретинобластом).

Даљи развој малигне туморске ћелије (неоплазме) условљен је њеном способношћу заобилажења и модификације процеса есенцијалних за одржавање динамичке равнотеже ћелијског циклуса. Особине малигне туморске ћелије које јој омогућавају развој, опстанак и пропагацију су следеће (Hanahan и Weinberg, 2011; Fouad и Aanei, 2017; Stewart, 2019):

- У нормалним физиолошким околностима ћелија улази у деобу тек пошто је стимулирана митогенима, хормонима и факторима раста продукованих од стране суседних ћелија, док је за туморске ћелије специфична стална прогресија кроз ћелијски циклус и улазак у деобу (перзистентна пролиферација) услед продукције ових сигналних молекула путем аутокрине сигнализације и/или одсуства реакције на сигнале који органићавају раст и деобу ћелија.
- Уколико дође до оштећења гена услед дејства стресних агенаса и репарација није могућа, нормалне ћелије заустављају репликацију оштећеног ДНК молекула активирајући процес самоуништења, а у циљу спречавања преноса насталих мутација на наредне генерације. У туморским ћелијама долази до мутације тумор супресорних гена чиме оне добијају могућност неконтролисаног раста и деобе мутиране ћелије као и способност избегавања апоптозе.
- Специфичност нормалних ћелија је органичен капацитет деоба кодиран малим секвенцама ДНК које се налазе на теломерама (регион понављајућих секвенци). Након завршеног предодређеног броја деобних циклуса, нормална ћелија улази у апоптозу услед старости (која повећава могућност настанка мутираних гена), док ћелија тумора превазилази програмиран број дељења посредством теломеразе, ензима који додаје понављајуће секвенце на 3' крај теломере, обезбеђујући ћелији неограничени репликациони потенцијал (имортализација ћелије).
- Да би обезбедиле потребу за енергијом која је неопходна да подржи сталну пролиферативну активност, малигне туморске ћелије мењају свој енергетски метаболизам.
- Једна од карактеристика есенцијалних за одрживост тумора је и способност стимулације околних ендотелских (нетуморских) ћелија на процес ангиогенезе у циљу обезбеђивања континуираног снабдевања кисеоником и хранљивим материјама.
- Малигне туморске ћелије слабљењем међућелијских контаката се могу одвојити од ткива у коме су настале и инвадирати у околна ткива посредством активације хидролитичких ензима који деградују међућелијски матрикс и базалну мембрану. Након продирања у крвоток и лимфоток поједине малигне ћелије успевају да заобиђу активирани имуног система и да се пренесу у друга ткива где формирају метастазе - секундарне туморе.

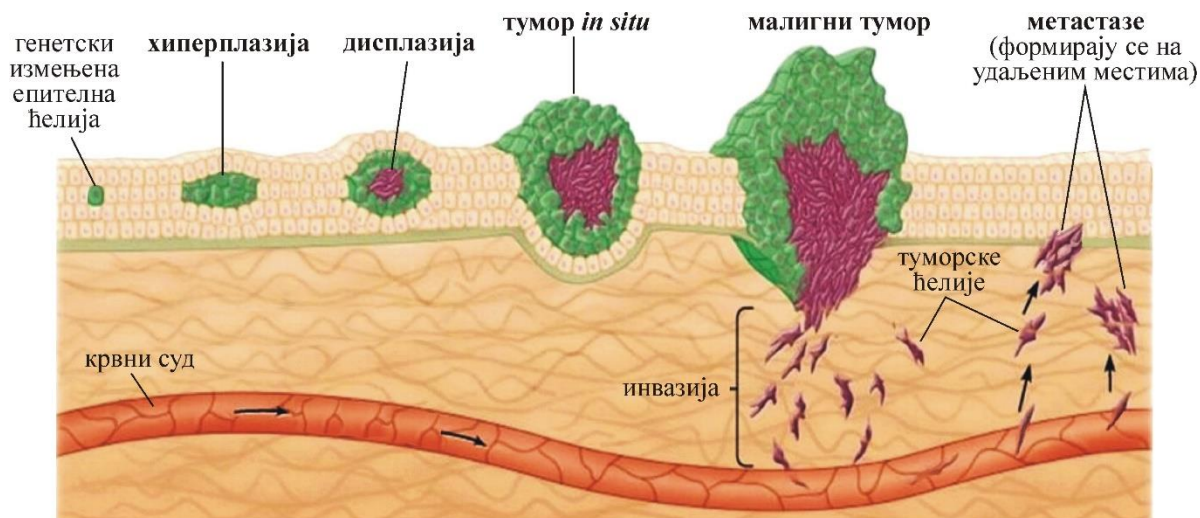
Наведеним карактеристикама малигног тумора, напредовањем науке у овом пољу, додају се нова обележја чије би детаљније познавање потенцијално користило као средство за побољшање терапијског исхода. Нека од нових обележја се односе на повећање пролиферативног капацитета и осигуравање опстанка туморске ћелије преко њене итерације са микроокружењем (трансдиференцијација и епигенетска дисрегулација,

измењен микробиом и измењена неуронска сигнализација) (Senga и Grose, 2021; Hanahan, 2022). Обележја малигнух туморских ћелија са најскорије откривеним описаним карактеристикама приказани су на **Слици 1**.



Слика 1. Карактеристике малигнух тумора (модификовано из Hanahan, 2022)

Вешто избегавање и способност модификације ових процеса од стране туморских ћелија последично доводи до формирања неопластичне (туморске) масе. Први корак малигне трансформације ћелије је иницијација тумора током кога канцероген узрокује оштећења генетског материјала нормалне ћелије. Ове промене су иреверзибилног карактера док су раст и деоба ћелија још увек оптимално регулисани. Даље генске и молекуларне промене у иницираној ћелији доводе до њеног интензивног раста и развоја и до формирања туморске лезије (хиперплазије, дисплазије, тумора *in situ*). Ова фаза означена је као фаза промоције тумора. Прогресивна фаза (формирање малигног тумора) наступа након додатне акумулације генетских и епигенетских модификација што доводи до агресивнијег развоја тумора, стицања способности инвазије околног ткива, као и метастазирања услед продирања туморских ћелија у крвоток и лимфоток (**Слика 2**) (Botelho и сар., 2014; Klainig, 2018; Stewart, 2019).



Слика 2. Развојне фазе епителног малигног тумора и механизам метастазирања (модификовано из Kanwal, 2013) **Хиперплазија** - Мутирана ћелија и њени клонови и даље имају карактеристике нормалне ћелије, али им се повећава пролиферативни капацитет. Након одређеног времена једна у милион ових ћелија трпи још једну мутацију која доводи до супресије контроле раста; **Дисплазија** - неконтролисаном пролиферацији ћелија придружује се и губитак нормалне морфолошке структуре ћелија као и њене оријентације; **Тумор *in situ*** - даљом акумулацијом мутација, ћелије постају све више абнормалне у динамици раста и изгледу. Уколико такве ћелије остану ограничене околним ткивом формира се тумор *in situ*; **Малигни тумор** - додатним генетским променама туморске ћелије започињу инвазију околног ткива, продиру у крв и лимфу чиме стичу могућност преношења на друге органе и формирања метастаза широм тела.

1.1. Тумор дојке

Тумор дојке је најчешће дијагностикован малигни тумор а уједно и водећи узрочник смртности узроковане малигнитетом код жена широм света. Значајне варијације у дистрибуцији ове болести у различитим деловима света, као и у смртном исходу и стопи преживљавања, могу бити зависне од структуре становништва, начина живота, генетских фактора и окружења. У развијеним земљама услед побољшања терапија, стопа смртности од малигног тумора дојке има тенденцију опадања. Међутим, инциденца ове болести је и даље у порасту, што се може приписати примени програма скрининга за рано детектовање асимптоматске болести. Претежно се манифестује код жена у староској доби изнад 50 година, док је развој тумора у млађој популацији релативно низак (Momenovahed и Salehiniya, 2019; Britt и сар., 2020). Повећан ризик од настанка тумора дојке у млађим годинама повезан је са раном појавом менархе док је у старијим годинама повезан са касном менопаузом. Са друге стране, рађањем деце до одређене старосне доби, као и дојењем деце, ризик од настанка тумора дојке се смањује (код жена које нису рађале, или рађају у каснијим годинама, или нису дојиле, овај ризик је повећан). Употреба егзогених женских хормона као контрацептивних средстава и хормонске терапије у менопаузи такође може допринети развоју тумора дојке. Фактори који нису повезани са репродукцијом а повећавају ризик од настанка тумора дојке су старост, гојазност, стил живота и лоша исхрана, прекомерно излагање зрачењу, повећана конзумација алкохола, пушење, смањена физичка активност, као и лоша информисаност о превентиви и нередовни прегледи. Наведени фактори ризика доприносе развоју приближно 4% од укупно дијагностикованих тумора дојке, док се 5-10%

тумора дојке развија код жена са генетском предиспозицијом или наследним преношењем мутираних *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB-2* тумор супресор гена на следеће генерације (Britt и сар., 2020; WHO, 2021; Wilkinson и Gathani, 2022). Успешно смањење инциденце и морталитета могуће је постићи кориговањем фактора који доприносе ризику настанка ове болести и превентивном стратегијом која подразумева употребу различитих лекова, природних деривата, витамина и антиоксиданаса (Britt и сар., 2020).

Према подацима Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization* - WHO) у 2020. години тумор дојке је дијагностикован код 2.3 милиона, док је код 685 000 жена широм света ова болест имала леталан исход. Скоро две трећине од укупно забележених смртних случајева регистровано је у слабије развијеним регионима, док је проценат преживљавања жена из развијених региона приближно 80. Висок проценат излечења приписује се раној дијагностици и ефикаснијим третманима. Закључно са 2020. годином, на основу пописа спроведеним на петогодишњем нивоу, број оболелих жена је био 7.8 милиона (WHO, 2021; Wilkinson и Gathani, 2022).

Као и код свих тумора, примарна фаза (иницијација) развоја тумора дојке је трансформација једне епителне или лобуларне ћелије жлезданог ткива. Даља развојна фаза тумора (промоција) углавном је праћена формирањем тумора *in situ* који је локализован у каналу или лобулу, међутим, уколико дође до додатних мутација, може се развити инвазивни дуктални или инвазивни лобуларни карцином. Током финалне фазе развоја (прогресија) малигне туморске ћелије стичу интензиван метастатски потенцијал помоћу кога се дисеминују, пре свега на околне лимфне чворове (локалне метастазе), а касније и на друге органе (удаљене метастазе), углавном доводећи до смртог исхода (Britt и сар., 2020). У основи патогенезе малигног тумора дојке, у приближно 70% инвазивних тумора дојке, забележена је експресија естроген зависних (енгл. *Estrogen receptor* - ER (ER α и ER β)) и прогестерон зависних (енгл. *Progesteron receptor* - PR) рецептора. Везивањем естрогена за ER α иницира се раст туморских ћелија услед активације онкогена. Тумори са позитивном експресијом поменутих ER α рецептора категорисани су као хормон рецептор позитивни тумори (HR⁺). На основу овог механизма деловања заснована је и примарна системска терапија базирана на употреби ендокриних агенаса који деградацијом ER рецептора или модулацијом продукције естрогена блокирају активацију онкогена. Око 20% инвазивних тумора дојке припада типу тумора позитивних на епидермални фактор раста (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor* - 2HER2), трансмембрански рецептор тирозин-киназе, одговоран за трансдукцију сигнала и регулацију ћелијске активности. Његова експресија је у туморским ћелијама појачана, те су стога у терапији овог типа тумора укључени инхибитори тирозин-киназе. Постоје и тумори са позитивном експресијом сва три рецептора (ER+ PR+ HER2+). Најређи (до 15% инвазивних тумора), али и најагресивнији тип тумора дојке са високим ризиком од појаве удаљених рецидива, је троструко-негативан (енгл. *Triple-Negative*) тумор дојке, који карактерише недостатак експресије естрогенских и прогестеронских рецептора као и епидермалног фактора раста (Waks и Winer, 2019; Kumar и сар., 2022).

Рана детекција болести води ка ефикасном лечењу које се у зависности од стадијума тумора спроводи на више начина. Најчешћа терапија је хируршко локализовано одстрањивање туморске промене или масектомија, уколико је тумор у одмаклој развојној фази, након којих се у зависности од патохистолошког налаза, степена проширености болести и присуства хормонских рецептора, примењују радиотерапија, хемотерапија, хормонска и биолошка терапија или њихова комбинација.

1.2. Тумор плаценте

Тумор плаценте (хориокарцином) је малигни трофобластни тумор, најагресивнији облик гестациске трофобластне болести (енгл. *Gestational trophoblast disease – GTD*) са високим потенцијалом метастазирања. Настаје услед абнормалног раста трофобласта (цитотрофобласта и синциотиотрофобласта без хорионских ресица), ћелија одговорних за формирање плаценталног ткива, адекватну имплантацију ембриона у зид утеруса и снабдевање ембриона кисеоником и хранљивим материјама. Инвазивна способност је нормална карактеристика ових ћелија, међутим, услед насталих мутација долази до неконтролисаних деобе и раста ћелија, а тиме и до развоја хиперплазија и анаплазија које се најчешће дешавају након хидатидиформног младежа - моларне трудноће (немалигни облик GTD). Абнормалан раст ових ћелија праћен је порастом продукције хуманог хорионског гонадотропина (hCG) чија је повећана концентрација у односу на референтне вредности овог хормона током здраве трудноће један од маркера за дијагностиковање и праћење прогресије плаценталног тумора. Забележено је да се хориокарцином може развити и након спонтаних побачаја, ванматеричне трудноће, па чак и након нормалне трудноће. Овај тумор карактерише крварење и некроза захваћеног ткива који ремете биопсију и хистолошке анализе ткива. Висока стопа васкуларне инвазије, обезбеђује брзо хематогено ширење метастаза хориокарцинома до плућа, вагине, јетре и мозга. (Cheung и сар., 2009; Coletta и сар., 2018; Bishop и Edemekong, 2022; Ngan и сар., 2021; Yuseran и сар., 2021). Поред гестациског, хориокарцином може бити и негестациског порекла. Такав тип хориокарцинома је ређи и није повезан са трудноћом већ настаје од плурипотентних герминативних ћелија. Иако изузетно ретко, хориокарцином герминативних ћелија се може развити и код мушкараца. Такође ретко, код старијих пацијената хориокарцином се може јавити у паренхимским органима, плућима и гастроинтестиналном тракту, придружен слабо диференцираном карциному (Cheung и сар., 2009; Bishop и Edemekong, 2022).

Широка географска варијација инциденце је карактеристична за овај тип тумора. Заправо, у Северној Америци и Европи инциденца је ниска, тумор плаценте се развија у једној од 40000 трудноћа, док је стопа развоја ове болести у Азији и Јапану већа и креће се од 3.3 до 9.2 на 40000 трудноћа (Ngan и сар., 2021).

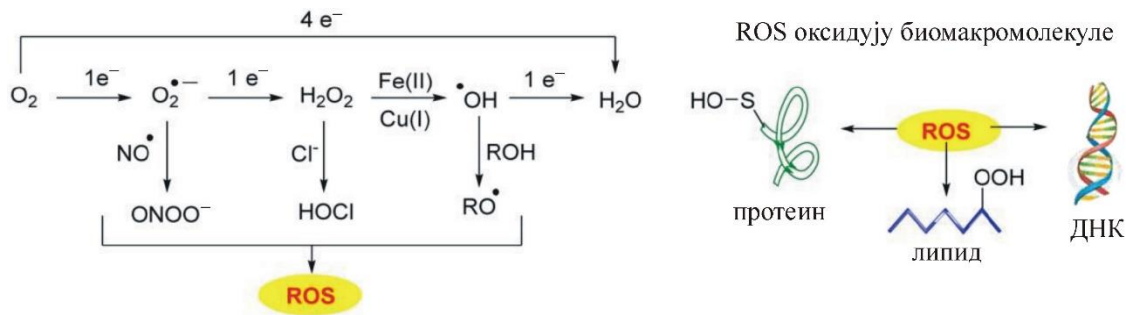
Патогенеза тумора плаценте није у потпуности разјашњена. Цитогенетским студијама идентификовани су одређени региони на којима је дошло до делеције (7p12-7q11.2), амплификације (7q21-q31) и/или губитка гена (8p12-p21) појединих генских локуса за које се претпоставља да су региони тумор супресорних гена. Литературни подаци указују на специфичну дерегулацију експресије тумор супресор гена у ћелијама плаценталног тумора. Забележена је повећана експресија p53, p21 и RB1 тумор супресор гена, која се објашњава као способност ћелија хориокарцинома да врше ауторегулацију прекомерног раста и поремећеног ћелијског циклуса, репарацију оштећене ДНК и супресију онкогена, док је са друге стране експресија других тумор супресор гена смањена (DOC-2/hDab2, Maspin, NECC1, каспаза 8 и 10, TIMP3, Е-кадхерин, RASSF1A и др.). Један од предложених молекуларних механизма патогенезе плаценталног тумора је губитак функције NECC1 који доводи до малигне трансформације ћелија трофобласта. Експериментално индукована повећана експресија NECC1 гена у хориокарциному утицала је на смањење туморигености и обезбедила је нормално диференцирање матичних ћелија трофобласта. Улога транскрипционих фактора неопходних за нормалну регулацију процеса плацентације у патогенези тумора плаценте је такође истраживана. Забележен је повећан ниво експресије

NANOG иРНК у плаценталном тумору у односу на здраво плацентално ткиво, који је повезан са способношћу избегавања апоптозе туморских ћелија, а такође и са индукцијом миграције и инвазије ових ћелија. Са регулацијом апоптозе ћелија хориокарцинома повезана је и повећана експресија STAT3, такође забележена у овим туморским ћелијама (Cheung и сар., 2009).

Уколико се открије у раној фази и адекватно третира, тумор плаценте се може ефикасно лечити. Прогнозе за излечење зависе од тога да ли је гестацијског или негестацијског типа. Заправо, гестацијски хориокарцином поред мајчине има и очеву гарнитуру хромозома те је услед имуногености осетљивији на хемотерапију, док ДНК негестацијског тумора у потпуности одговара ДНК пацијента уз присутне кариотипске абнормалности, што смањује имуногеност а тиме и осетљивост на хемотерапију (Savage и сар., 2017). Сходно значајном напретку у спровођењу адекватне хемотерапије у односу на стандардизоване стадијуме тумора, ова изузетно малигна метастатска болест се сматра излечивом болешћу. Систем по коме се одређује прогноза и бира одговарајућа терапија на основу клиничких и хистопатолошких критеријума, у сарадњи са WHO, развила је Међународна федерација гинекологије и акушерства (енгл. *International Federation of Gynecology and Obstetrics - FIGO*). Овај систем базира се на неколико фактора ризика: старост пацијента, претходница хориокарцинома (моларна трудноћа, абортус, термински порођај), гестацијска фаза, ниво hCG хормона, анатомија тумора (величина, метастазе), претходна хемотерапија; на основу којих, заједно са дефинисаним стадијумом развоја тумора, је извршена даља категоризација на нискоризичну гестацијску трофобластну неоплазију (укупан скор <6) и високоризичну гестацијску трофобластну неоплазију (укупан скор >6) (Ngan и сар., 2021).

2. Редокс хомеостаза

Енергија за функционисање аеробних организама обезбеђује се оксидацијом органских супстрата у присуству кисеоника. Оксидација органских молекула се превасходно обавља у митохондријама током процеса оксидативне фосфорилације. Као последица оксидо/редукционог метаболизма, више од 90% молекулског кисеоника (O₂) се уз каталитичку активност митохондријалног комплекса цитохром-оксидаза сукцесивним везивањем 4 електрона редукује до два молекула воде. Уколико се у процесу редукције за O₂ веже мање од 4 електрона, продукују се реактивни инетмедијери (Слика 3), слободни радикали, атоми, јони или молекули са једним или више неспарених електрона у атомској или молекулској орбитали, који у малом проценту заступљености чине веома битан функционални фактор одржавања физиолошке редокс хомеостазе. Фаза настанка слободних радикала означена је као фаза иницијације. Најзначајније врсте слободних радикала су реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species - ROS*) и реактивне врсте азота (енгл. *Reactive Nitrogen Specises - RNS*) (Lushchak, 2014; Halliwell и Gutteridge, 2015).

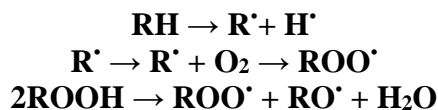


Слика 3. Редукција кисеоника и формирање реактивних врста (модификовано из Dharmaraja, 2017)

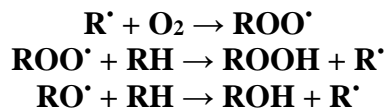
Услед постојања једног или више неспарених валентних електрона у електронском омотачу, слободни радикали су изузетно нестабилни и високо реактивни те стога интерагују међусобно, као и са другим мање реактивним продуктима тако што формирају ковалентну везу или предају електроне (редукујући агенс), примају електроне (оксидујући агенс), преузимају јоне водоника или ступају у реакцију адиције. Ове реакције воде до низа ланчаних оксидо/редукујућих процеса који су означени као фаза пропације. Узастопни оксидо/редукујући процеси се прекидају реакцијом неутрализације слободних радикала неензимским или ензимским антиоксидансима, који чине ћелијски антиоксидативни одбрамбени систем (енгл. *Antioxidative Defence System*, AOS). Процес неутрализације радикала означен је као фаза терминације (Halliwell и Gutteridge, 2015; Costa и сар., 2021).

Ланчано формирање слободних радикала (Hamid и сар., 2010):

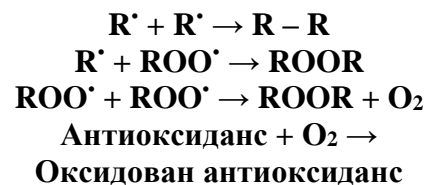
1) Иницијација:



2) Пропагација:



3) Терминација:



Одржавање редокс хомеостазе подразумева уравнотежену продукцију и елиминацију ROS-а и RNS-а чији је низак базални ниво од суштинског значаја за регулацију ћелијског циклуса, ћелијског раста, процеса апоптозе, као и за ћелијску сигнализацију посредством модулације активности јонских канала, киназа и фосфатаза (Gaikwad и Srivastava, 2021). Пример регулације ових процеса је фосфорилација различитих протеина као што су протеин киназа C (енгл. *protein kinase C* - PKC), p38 митоген-активирана протеин киназа (енгл. *mitogen-activated protein kinase* - MAPK), екстрацелуларним сигналом регулисана киназа (енгл. *extracellular signal-regulated kinase* - ERK1/2) и стимулација експресије гена који кодирају антиоксидансе, активаторе транскрипционих фактора Nrf2 (енгл. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), AP-1 (енгл. *activator protein 1*), NF-κB (енгл. *nuclear factor kappaB*) и тумор супресор протеина p53 (Marengo и сар., 2016). Такође, реактивне врсте, продукване од стране активираних макрофага и неутрофила, имају важну улогу у одбрани организма од инвазивних патогена. Биолошка активност реактивних врста зависна је од просторне дистрибуције, места субцелуларних компартмана и нивоа њиховог генерисања. Ендогена продукција реактивних врста је последица активности различитих ензимских и неензимских комплекса који се налазе у митохондријама, пероксизомима, микрозомима, ендоплазматичном ретикулуму, у цитоплазми и у ћелијској мембрани. Ензимске реакције продукције реактивних врста укључују активацију комплекса митохондријалног респираторног ланца, цитохрома P450, никотинамид аденин динуклеотид фосфат-оксидаза (NADPH оксидаза (NOX)), ксантин оксидаза, синтезу простагладина, и фагоцитозу, док су неензимски извори реактивних врста редокс активни метали Cu и Fe (Halliwell и Gutteridge, 2015; Ghoneim и сар., 2020; Gupta и сар., 2020).

Еволутивним развојем и фаворизацијом аеробног метаболизма, живи организми су перманентно изложени ROS-посредованим оксидативним процесима који представљају потенцијалну опасност. Изложеност егзогеном утицају различитих токсичних агенаса (хемикалије, полутанти, тешки метали, ксенобиотици, UV и јонизујуће зрачење), активација имуних ћелија и инфламација као и дисфункција појединих метаболичких процеса, могу пореметити редокс равнотежу у корист повећане продукције ROS/RNS која превазилази антиоксидативне капацитете ћелије. Нарушеном равнотежом између стварања слободних радикала и њихове неутрализације антиоксидансима настаје оксидативни/нитрозативни стрес. Овакав редокс дисбаланс може бити последица прекомерне продукције реактивних врста настале деловањем неког егзогеног агенса, када се премашују антиоксидативни капацитети ћелије и онемогућава адекватна одбрана, а такође може бити последица инхибиране активности антиоксиданаса, или пак њихове смањене *de novo* синтезе. Услед тенденције за електронском стабилношћу орбитала, реактивне врсте даље оксидују виталне ћелијске биомолекуле, протеине, угљене хидрате, липиде и нуклеинске киселине, изазивајући њихову структурну и функционалну дестабилизацију. Оштећене ћелије улазе у процес апоптозе или некрозе, водећи ка прогресији ткивних оштећења, што доприноси патофизиологији широког спектра болести. Хронично повишен ниво продукције реактивних врста и оксидативни/нитрозативни стрес су индуктори биолошког старења, дисфункције имуног система и инфламације и повезани су са развојем дијабетеса, малигних, кардиоваскуларних и многих неуродегенеративних болести (Halliwell и Gutteridge, 2015; Pisoschi и Поп, 2015; Gupta и сар., 2020; Costa и сар., 2021).

2.1. Реактивне врсте кисеоника и азота

У реактивне врсте кисеоника спадају супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), који настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника, водоник пероксид (H_2O_2), који настаје двоелектронском редукцијом кисеоника (нерадикалски облик), хидроксил радикал (OH^{\cdot}), који настаје троелектронском редукцијом кисеоника или разградњом H_2O_2 . Остале форме су секундарни радикали кисеоника (хидропероксил радикал - HO_2^{\cdot} , пероксил радикал - ROO^{\cdot} , алкоксил радикал - RO^{\cdot}) и нерадикалске врсте кисеоника (синглет кисеоник - 1O_2 , органски пероксиди - $ROOH$, озон - O_3), настали услед високог степена електрофилности примарних реактивних врста. Донирањем или преузимањем електрона са других реактивних молекула, примарне реактивне врсте иницирају каскадну реакцију оксидо/редукујућих процеса.

У реактивне врсте азота спадају азот моноксид (NO^{\cdot}) и азот диоксид (NO_2^{\cdot}) који су радикалски облици RNS, док су нерадикалски облици ових реактивних врста, пероксинитрит ($ONOO^-$), пероксинитритна киселина ($ONOOH$), алкил пероксинитрит ($ROONO$) и др. (Табела 2) (Halliwell и Gutteridge, 2015; Gupta и сар., 2020). Наведене реактивне врсте сведоче о уској функционалној повезаности ROS и RNS, односно њиховим унакрсним реакцијама.

Табела 2. Приказ реактивних врста кисеоника и азота

Слободни радикали	Нерадикалске реактивне врсте
<i>ROS</i>	
Супероксид анјон радикал, $O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид, H_2O_2
Хидроксил радикал, OH^{\cdot}	Синглет кисеоник, 1O_2
Хидропероксил радикал, HO_2^{\cdot}	Органски пероксиди, $ROOH$
Пероксил радикал, ROO^{\cdot}	Озон, O_3
Алкоксил радикал, RO^{\cdot}	Хипохлорна киселина, $HOCl$
Угљен диоксид радикал, $CO_2^{\cdot-}$	Хипобромна киселина, $HOBr$
Карбонатни радикал, $CO_3^{\cdot-}$	
<i>RNS</i>	
Азот моноксид радикал, NO^{\cdot}	Пероксинитрит, $ONOO^-$
Нитрат радикал, NO_3^{\cdot}	Пероксинитрат, O_2NOO^-
Азот диоксид радикал, NO_2^{\cdot}	Пероксинитритна киселина, $ONOOH$
	Алкил пероксинитрит, $ROONO$
	Алкил пероксинитрат, RO_2ONO

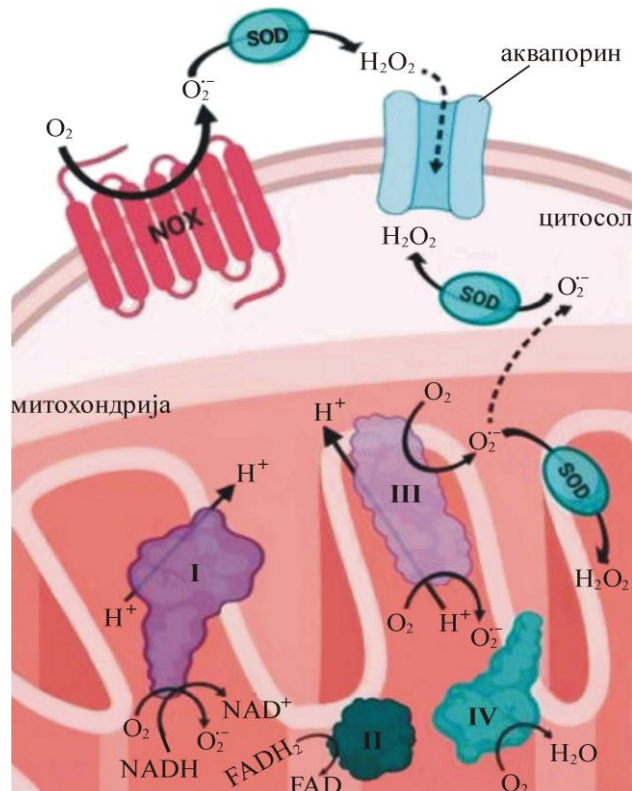
Поремећаји оксидативног метаболизма у организму укључују хипоксију, ендоплазматично-ретикуларни стрес, оксидативну дисфункцију митохондрија и оксидативни, нитрозативни и карбонилни стрес. Нитрозативни стрес је у блиској корелацији са оксидативним стресом. Реактивни кисеонични метаболити могу интераговати са азотним сигналним мполекулима, у првом реду азот моноксидом и појачати формирање слободнорадикалских врста базираних на азоту. Азотни радикали, пре свега NO^{\cdot} и нитрити (NO_2^-), воде даљој продукцији секундарних азотних и кисеоничних слободних радикала, као што су $ONOO^-$, OH^{\cdot} , и нерадикалских токсичних молекула попут H_2O_2 , динитродиоксида (N_2O_2) и азотасте киселине (HNO_2) (Stykel и Ryan, 2022).

У складу са својом функцијом обезбеђивања енергије кроз процесе оксидативне фосфорилације, митохондрије са својим ензимским комплексима респираторног ланца су примарни генератори реактивних врста, а тиме и оксидативног стреса. Висок проценат ROS се такође генерише активношћу трансмембранске NOX.

Почетак каскаде оксидативног стреса је „цурење“ електрона током ензимске активности комплекса митохондријалног респираторног ланца и то комплекса I (NADH дехидрогеназа), који оксидује никотинамид аденин динуклеотид (NADH) а као акцептор електрона користи коензим Q, и комплекса III (убихинон-цитохром c редуктаза) који оксидује коензим Q, а као акцептор електрона користи цитохром c (енгл. *Cytochrome c* - Cyt c). Супероксид анјон радикал продукован активношћу комплекса I налази се искључиво у митохондријалном матриксу, док се $O_2^{\cdot-}$ продукован активношћу комплекса III налази и у митохондријалном матриксу и у ћелијском цитосолу. Даљом редукцијом носача електрона, флавин аденин динуклеотида (FAD) и NADH, електрони се преносе до комплекса IV, где се услед каталитичке активности цитохром-с-оксидаза (COX) врши тетравалентна редукција O_2 до H_2O .

Продукција ROS од стране NOX ензимског комплекса примарно локализованог на плазмемембрани, али и на мембрани нуклеуса, митохондрија и ендоплазматичног ретикулума, настаје активацијом NOX ензимског комплекса цитокинима, факторима раста или агонистима рецептора спрегнутих за G-протеин. Као нуспродукт наведених процеса формира се $O_2^{\cdot-}$, а његовом дисмутацијом, катализованом супероксид дисмутазом (SOD), настаје H_2O_2 који се посредством трансмембранских аквапорина транспортује у интрацелуларну средину (Ghoneim и сар., 2020). Продукција ROS путем активације митохондријалног респираторног ланца и NOX приказана је на Слици 4.

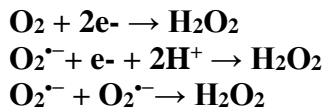
Поред наведених, продукција $O_2^{\cdot-}$ је могућа и у ендоплазматичном ретикулуму у реакцијама оксидаза као што су NADPH оксидаза, ксантин оксидаза, циклооксигеназа, липооксигеназа, као и у процесима фагоцитозе и деградације ксенобиотика активношћу ензимског комплекса цитохрома P450 (Pisoschi и Pop, 2015). У цитосолу $O_2^{\cdot-}$ се може наћи у протонизованом облику означеном као HO_2^{\cdot} који је интензивнији оксидо/редукујући агенс од $O_2^{\cdot-}$ и у биолошким системима може иницирати ланчану реакцију липидне пероксидације. Међутим, HO_2^{\cdot} је изузетно нестабилан и при физиолошкој pH вредности од 7.4 брзо дисоцира на $O_2^{\cdot-}$ (Pisoschi и Pop, 2015). На ћелијском нивоу, физиолошки стабилна концентрација $O_2^{\cdot-}$ је пикомоларног опсега, док је концентрација H_2O_2 наномоларног



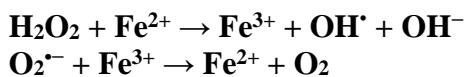
Слика 4. Примарни ендегени генератори ROS (модификовано из Ghoneim и сар., 2020)

опсега. Разлог оваквих концентрационих разлика може бити висока нестабилност $O_2^{\cdot-}$ који подлеже реакцији дисмутације када два молекула $O_2^{\cdot-}$ међусобно реагују спонтано или уз каталитичку активност SOD, производећи H_2O_2 (Ghoneim и сар., 2020). Додатно, у присуству прелазних метала $O_2^{\cdot-}$ се конвертује у изузетно реактиван OH^{\cdot} , а такође веома брзо реагује са NO где се као продукт реакције формира високо токсичан прооксиданс, $ONOO^-$ (Costa и сар., 2021). $O_2^{\cdot-}$ се сматра примарним реактивним молекулом који у даљим реакцијама индукује формирање секундарних токсичнијих реактивних врста, те стога минимална одступања од физиолошки стабилних концентрација могу покренути биолошки одговор каскадне продукције ROS водећи до оксидативног стреса и ћелијске смрти (Ghoneim и сар., 2020).

Водоник пероксид је најстабилнији облик ROS који нема неспарене електроне, али услед хидрофилности лако дифундује кроз ћелијске мембране путем аквапорина и оксидује ћелијске биомакромолекуле који могу бити удаљени од места његовог генерисања. Примарна места продукције H_2O_2 су пероксисоми у којима је изражена инхибиторна активност каталазе (CAT) у циљу спречавања оксидативног оштећења овог ћелијског компартмана. Такође, H_2O_2 може настати и у митохондријама, митохондријама и на ћелијској мембрани преважно деловањем оксидаза (Nimse и Pal, 2015). Као што је већ поменуто, до продукције H_2O_2 може доћи директно двоелектронском редукцијом молекуларног кисеоника, редукцијом $O_2^{\cdot-}$, или у реакцији дисмутације $O_2^{\cdot-}$ катализоване ензимом SOD:



Неутрализација H_2O_2 врши се ензимском активношћу CAT и глутатион-пероксидазе (GSH-Px) које катализују редукцију H_2O_2 до воде (Halliwell и Gutteridge, 2015). Уколико до неутрализације не дође, H_2O_2 директним ефектима врши деградацију хема у протеинима и ослобађа гвожђе, инактивира поједине ензиме, оксидује ДНК, липиде и тиолне и сулфхидрилне протеинске групе (Pisoschi и Pop, 2015). Овакав начин деловања дешава се када је концентрација H_2O_2 четири пута већа него концентрација у нормалним физиолошким условима (Nimse и Pal, 2015). Стога је токсичност H_2O_2 преважно последица индиректног деловања које подразумева конвертовање овог молекула у присуству редуктованих прелазних метала (Fe^{2+} или Cu^+) у високо реактивни OH^{\cdot} (Фентонова реакција):



OH^{\cdot} је такође продукт Хабер-Вајсове реакције која подразумева интеракцију између H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ и захтева присуство метала са променљивом валенцом (Halliwell и Gutteridge, 2015):



Хидроксил радикал је молекул са изузетно кратким *in vivo* полуживотом ($\sim 10^{-9}$ секунди) али високим афинитетом према генерално свим ћелијским органским молекулима, услед чега је реакција брза и локализована на околне биомолекуле. Међутим, оксидацијом

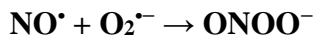
биомолекула, превасходно мембранских полинезасићених масних киселина, овај молекул иницира ланчану реакцију липидне пероксидације у којој долази до продукције хидропероксида, нарушава се интегритет ћелијске мембране и продукују секундарни слободни радикали различитих реактивних способности (Halliwell и Gutteridge, 2015; Costa и сар., 2021). Овим начином деловања OH^\bullet изазива оштећења ћелија и ткива и може индуковати ћелијску смрт, а такође и иницирати канцерогенезу (Klaunig и Wang, 2018). Неутрализација овог високо реактивног молекула није могућа директном реакцијом антиоксиданаса, те је стога стратегија заштите од токсичних ефеката OH^\bullet усмерена на сузбијање његове продукције које је могуће постићи неутрализацијом и разлагањем $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 активношћу ензима SOD, CAT, GSH-Px, а такође и елиминацијом јона Fe^{2+} или Cu^+ (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Поред ROS, за одржавање редокс хомеостазе битна је и контролисана продукција RNS. Ови радикали могу да оксидују, нитрирају и нитрозилирају биомолекуле чиме доводе до нарушавања њихове функције. У основи продукције свих RNS налази се NO^\bullet , неполаран интраћелијски сигнални молекул са израженом дифузибилном способношћу, који у својој структури има један неспарени електрон (Halliwell и Gutteridge, 2015). NO^\bullet учествује у регулацији многих основних ћелијских процеса као што су пролиферација, транскрипција и регулација енергетског метаболизма (Chirino и Pedraza-Chaverri, 2009), а такође и у регулацији вазодилатације, неуротрансмисије, имунске реакције настале као одговор домаћина на присуство различитих врста патогена (Costa и сар., 2021). Синтеза NO^\bullet врши се ензимском активношћу азот оксид синтаза (енгл. *Nitric Oxide Synthase*, NOS) у присуству O_2 и NADPH оксидазе као косупстрата, док као супстрат, NOS користе аминокиселину L-аргинин (L-Arg) коју оксидују до цитрулина (Nimse и Pal, 2015).



NOS постоје у три различите ензимске изоформе назване у зависности од ткива у коме су први пут идентификоване: неурална (nNOS), индуцибилна (iNOS) и ендотелна (eNOS) (Chirino и Pedraza-Chaverri, 2009; Costa и сар., 2021).

Поремећај у регулацији синтезе NO^\bullet који доводи до његове прекомерне продукције може индуковати испољавање токсичних ефеката овог молекула. Цитотоксичност NO^\bullet је заснована на његовој изузетно брзој интеракцији са O_2 и ROS. Оксидацијом NO^\bullet продукују се нитрати (NO_3^-) и NO_2^- , који се користе као биоиндикатори NO^\bullet и чија повећана концентрација указује на настанак нитрозативног стреса. Брзом интеракцијом NO^\bullet са $\text{O}_2^{\bullet-}$, која превазилази брзину SOD посредоване дисмутације $\text{O}_2^{\bullet-}$, продукује се ONOO⁻, високо реактиван молекул чији су токсични ефекти према биолошким молекулима интензивнији од ефеката NO^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Chirino и Pedraza-Chaverri, 2009, Halliwell и Gutteridge, 2015; Di Meo и Venditti, 2020).



Овом реакцијом редукује се ниво $\text{O}_2^{\bullet-}$ али се повећава концентрација ONOO⁻ који у протонизованој форми (ONOOH) може да реагује са сулфхидрилним (-SH) групама, а такође и да индукује оксидацију и нитрацију липида и протеина, фрагментацију ДНК молекула, нитрацију и деаминацију азотних база, као и оксидацију цистеина, метионина, и других протеинских резидуа, изазивајући њихову структурну дестабилизацију и инактивацију (Halliwell и Gutteridge, 2015). У присуству прелазних метала долази до реакције разлагања

ONOO⁻ која је катализована ензимском активношћу SOD, а чији су продукти NO[•]₂ + OH[•] (Di Meo и Venditti, 2020):

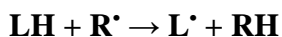


Иако кратак (~ 10-20 ms), полуживот ONOO⁻ је довољан да обезбеди дифузију овог молекула кроз ћелијске мембране и интеракцију са биомолекулима локализованим даље од иницијалног места његовог настанка, чиме се повећава могућност индуковања оксидативних оштећења околних ћелија (Szabó и саp, 2007). Цитотоксични ефекти пероксинитрита испољавају се преко могућности иницијације липидне пероксидације, директне инхибиције активности ензима митохондријалног респираторног ланца, инхибиције АТР-азне активности Na⁺/K⁺ пумпе, као и инактивације трансмембранских натријумових канала (Szabo, 2003).

2.2. Ефекти оксидативног/нитрозативног стреса на биомолекуле

Као последица редокс дисбаланса проузрокованог повећаном продукцијом ROS и RNS или смањеном активношћу ензима AOS, развија се оксидативни/нитрозативни стрес који фаворизује даљу продукцију секундарних и терцијарних реактивних молекула индукујући оксидативна оштећења ћелијских биомолекула (липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина), ћелија и ткива, а тиме и њихову дисфункцију, убрзавајући на тај начин процес старења и водећи до развоја бројних патолошких стања (Halliwell и Gutteridge, 2015; Nimse и Pal, 2015; Chesa и Aran, 2020).

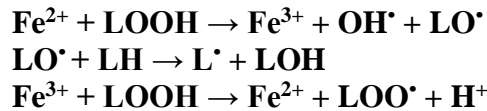
Слободни радикали најчешће реагују са полинезасићеним масним киселинама (енгл. *polyunsaturated fatty acids* – PUFA) ћелијске мембране, чијом оксидацијом се иницира процес липидне пероксидације која за последицу има редуковање флуидности ћелијске мембране, неадекватну семипермеабилност, а такође и поремећену функционалност мембранских протеина (ензима, рецептора и транспортних протеина). У складу са физиолошким потребама, наведеним процесима се регулише пермеабилност ћелијске мембране, врши метаболизам липидних и протеинских молекула, и контрола пролиферације и апоптозе ћелија (Halliwell и Gutteridge, 2015). Липидна пероксидација је високо деструктиван аутокатализован процес који се одвија у виду ланчане реакције током које се продукују липидни пероксиди (LPO). Иницијација липидне пероксидације врши се одузимањем H⁺ из метиленске групе незасићене масне киселине липида (LH) од стране радикала (R[•]), најчешће OH[•], услед чега се генерише липидни радикал (L[•]) (Nimse и Pal, 2015):



У аеробним условима липидни радикал реагује са O₂ формирајући изузетно реактиван пероксил радикал (LOO[•]) који преузимањем H⁺ атома са другог липидног молекула продукује нов липидни радикал и липидни хидропероксид (LOOH):



Липидни хидропероксиди се у присуству Fe^{2+} или Cu^+ разлажу на реактивније радикалске врсте, алкоксил радикал (LO^\bullet) или LOO^\bullet , који могу реаговати са другим липидима формирајући L^\bullet и липидне алдехиде (LOH):



Услед могућности поновног оксидовања PUFA и продуковања секундарних и терцијерних радикала, пероксил радикал и липидни хидропероксид, чијом дисоцијацијом настаје изузетно реактиван алкоксил радикал, су носиоци ланчане реакције липидне пероксидације. Уколико дође до међусобних интеракције два L^\bullet , два LOO^\bullet или L^\bullet и LOO^\bullet липидна пероксидација се може прекинути. Поједини антиоксиданси, као што су глутатиони, ензими глутатион редокс циклуса, аскорбинска киселина (Vit C), поједини полифеноли, такође имају могућност прекида ланчане реакције липидне пероксидације услед директне неутрализације ових липидних радикала. Поред нарушавања интегритета ћелијске мембране, последица липидне пероксидације је и генерисање алдехида, биолошки активних једињења која дифундују са првобитног места настанка у друге ћелијске компартмане, где могу индуковати оштећења ДНК и протеина (Nimse и Pal, 2015). Најтоксичнији међу њима су 4-хидрокси-2,3-трансноненал (HNE) и малондиалдехид (MDA) на основу чијих измерених концентрација се може одредити степен оштећења ћелијских мембрана (Valko и сар., 2007). Акумулацијом оксидативних оштећења у ткивима, насталих као последица липидне пероксидације, долази до дисфункције ћелија и ткива услед чега се убрзава старење организма и индукује развој многих болести као што су кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести, дијабетес и атеросклероза, болести јетре и бубрега и развој тумора (Negre-Salvayre и сар., 2010).

Због укључености у многобројне есенцијалне ћелијске функције као што су трансдукција сигнала, деоба, и ћелијски транспорт, протеини, главне компоненте биолошких система, су такође циљни молекули реактивних врста. Слободни радикали у присуству јона прелазних метала, могу интераговати са готово свим аминокиселинама протеина, од којих су бочне аминокиселинске секвенце, посебно метионин, цистеин, лизин, пролин, хистидин и аргинин, изузетно осетљиве на оксидативна оштећења (Вокон и сар., 2004; Nimse и Pal, 2015). Реакције којима се индукују оксидативна оштећења протеина могу бити различите: одузимање H^+ , реакција адиције, губитак хистидинске резидуе, унакрсно повезивање два тирозина, настанак хидроксилних и карбонилних група, формирање димера као и фрагментација протеина; и углавном су инициране молекулом OH^\bullet . Хидроксил радикал, одузимањем јона H^+ из протеинске полипептидне кичме, индукује формирање великог броја протеинских радикала који у аеробним условима могу интераговати са O_2 и продукovati пероксил радикале, који се даље у реакцији са хидропероксил радикалом конвертују до алкил, алкоксил и алкилпероксил радикала. Ови радикали су способни да цепањем пептидних веза индукују секундарна оштећења на другим протеинским молекулима (Valko и сар., 2007). Поједина оксидативна оштећења протеина су реверзибилна и могу се репарирати, док су поједина иреверзибилна те се стога такви протеини морају елиминисати из ћелије. Као последица индукованих оштећења, нарушава се структура протеина чиме он постаје нефункционалан. Губитак функције појединих протеина, нпр. рецептора, сигналних протеина, ензима, транспортних и структурних

протеина, антитела, може имати озбиљне последице на функционисање организма (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Хидроксил радикал, као најреактивнија слободнорадикалска врста, има висок афинитет према молекулу ДНК и реагује са свим његовим саставним компонентама, пуринским и пиримидинским базама, као и са дезоксирибозом нуклеотида. Хидроксилни радикал је способен да реакцијом адиције интерагује са базним паровима ДНК, док се његова инеракција са метил групом тимина и са угљениковим атомима 2'-дезоксирибозе заснива на одузимању H^+ , при чему се формирају радикали ДНК база и алилни радикали тимина и 2'-дезоксирибозе (Nimse и Pal, 2015). Настали радикали даље модификују базне и шећерне компонента ДНК индукујући промене на ДНК молекулу у виду лезија азотних база, унакрсног повезивања ДНК са протеинима као и прекида једноланчане и дволанчане структуре. Ови типови оштећења ДНК молекула могу да зауставе или убрзају транскрипцију, индукују различите путеве трансдукције сигнала, грешке током процеса репликације и геномску нестабилност. Уколико не дође до репарације оштећеног дела ДНК молекула активацијом компоненти система за поправку ДНК, генетски материјал се трајно модификује водећи ка развоју мутација које су предуслов за канцерогенезу (Valko и сар., 2007).

2.3. Антиоксидативни одбрамбени систем

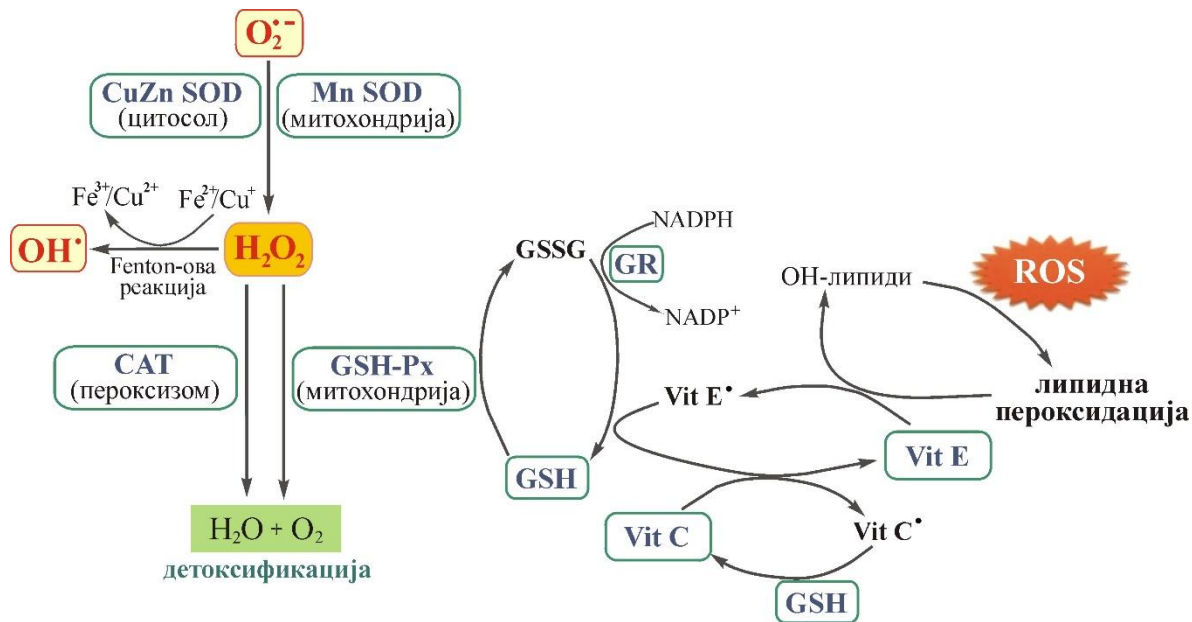
Перманентна изложеност аеробних организама оксидативном деловању кисеоника условила је развој антиоксидативног заштитног система који „хватањем“ реактивних врста неутралише њихово дејство чиме одлаже, спречава или уклања оксидативна оштећења ћелијских биомолекула (Halliwell и Gutteridge, 2015). Постојање овог система заштите обезбеђује одржавање редокс хомеостазе, односно продукције реактивних врста на физиолошком нивоу неопходном за правилно функционисање ћелије. Да би антиоксиданс ефикасно оджавао ћелијску редокс стабилност потребно је да поседује способност:

- директне неутрализације реактивних врста;
- хелирања металних прооксиданаса;
- интеракције са другим антиоксидансима које регенерише;
- позитивног утицаја на генску експресију;
- варирања концентрације у телесним течностима и ткивима у складу са физиолошким потребама организма;
- олакшане апсорпције;
- активације како у воденим тако и у липидним ћелијским конституентима (Valko и сар., 2007).

У зависности од места порекла антиоксиданси су подељени на егзогене (спољашње антиоксидансе који се у организам уносе исхраном; природни и синтетички антиоксиданси) и ендogene (синтетисане унутар организма), док је подела на примарну и секундарну антиоксидативну заштиту заснована на механизму њиховог деловања. Примарну заштиту обезбеђују ензимске и неензимске компоненте АОС-а које функционишу како при физиолошки стабилним, тако и у условима дестабилизације редокс равнотеже индуковане повећаном продукцијом ROS-а (Слика 5). Секундарна заштита, репарација насталих

оксидативних оштећења биомолекула, обезбеђена је активношћу ензима којима улога антиоксиданаса није примарна. Такви ензими су поједине протеин-специфичне оксидоредуктазе (протеин-ADP-рибозил-трансфераза, тиолтрансфераза и АТР и Ca^{2+} независна протеаза) (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Ензимске компоненте обухватају неколико изузетно значајних ензима: SOD, CAT, GSH-Px, глутатион редуктаза (GR), глутатион-S-трансфераза (GST). Активношћу ових ензима обезбеђује се редукција реактивних врсте до воде вишестепеним процесима који захтевају присуство прелазних метала (Fe, Cu, Zn, Mn) као кофактора. Неензимске компоненте AOS обухватају супстанце мале молекулске масе чија је даља подела одређена на основу афинитета и растварљивости у ћелијским липидним конституентима, те стога оне могу бити липосолубилне (витамини А и Е (Vit E), коензим Q и β -каротен) и хидросолубилне (глутатион, аскорбинска киселина, албумин, цистеин, метионин, трансферин, церулоплазмин, билирубин, биливердин, хистидин, феритин, мокраћна киселина). Од растварљивости зависи и њихово место деловања које може бити везано за ћелијске мембране или ћелијске течности. Активност неензимских компоненти заснива се на прекидању ланчаних реакција слободних радикала (Nimse и Pal, 2015).



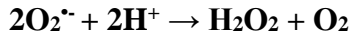
Слика 5. Механизам дејства антиоксидативног заштитног система (модификовано из Kurutas 2016)

Услед хроничног излагања негативном утицају спољашњих прооксидативних фактора, рад ендемог антиоксидативног система бива недовољан да одржи оптималан физиолошки ниво продукције радикала, те је стога неопходно исхраном унети егзогене антиоксидансе који би помогли у превенцији и евентуалној санацији оксидативних оштећења. Као што је поменуто, егзогени антиоксиданси могу бити природног порекла, превасходно биљног, какви су феноли, флавоноиди и њихови деривати, или синтетског порекла, који се најчешће користе као стабилизатори у прехранбеној индустрији (Hamid и сар., 2010).

2.3.1. Ензими антиоксидативног заштитног система

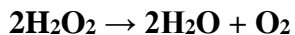
Прву линију антиоксидативне одбране чине три ензима, SOD, CAT, и GSH-Px који узајамним деловањем регулишу производњу ROS/RNS и њихових метаболита одржавајући ћелијску редокс хомеостазу.

Супероксид дисмутаза (EC 1.15.1.1) је металопротеин углавном локализован у цитосолу и у митохондријама чијом се каталитичком активношћу одиграва реакција дисмутације високо реактивног $O_2^{\bullet -}$ до мање реактивног H_2O_2 и молекулског кисеоника:



SOD постоји у четири изоформе које се примарно разликују на основу прелазних метала које садрже у активном центру: моноклеарне Fe SOD, Ni SOD, Mn SOD и динуклеарна CuZn SOD. Код сисара постоје три изоформе овог ензима са различитом интрацелуларном локализацијом: цитосолна CuZn SOD, митохондријална Mn SOD и екстрацелуларна EC SOD. CuZn SOD (молекулска тежина 32 kDa), локализована у цитосолу, лизозомима, једру и митохондријском интермембранском простору, је хомодимер састављен од две идентичне протеинске субјединице од којих свака у активном центру садржи оба јона метала, Cu и Zn. Јон бакра је активни метал који током каталитичких реакција мења оксидационо стање (Cu^{2+}/Cu^{3+}), док цинк ензиму обезбеђује стабилну конформацију и функционисање у ширем опсегу pH вредности (5 – 9.5). Mn SOD (молекулска тежина 96 kDa), локализована углавном у митохондијама, је хомотетрамерни протеин састављен од четири субјединице које у активном центру садрже по један атом мангана. Каталитичка активност ове форме ензима заснива се на оксидо-редукцији јона мангана (Mn^{2+}/Mn^{3+}). EC SOD (молекулска тежина 135 kDa), локализована у екстрацелуларној течности, интерстицијалним ткивним просторима, плазми, лимфи и синовијалној течности, је тетрамерни гликопротеин који у свом саставу садржи Cu и Zn. За разлику од других, активност ове изоформе ензима SOD кординисана је цитокинима а не прооксидативним агенсима, и усмерена је превасходно на инактивацију NO (Valko и сар, 2007; Patlevič и сар., 2016).

Каталаза (EC 1.11.1.6) је хемохромопротеид локализован углавном у пероксизомима, чијом је активношћу катализована реакција дисмутације H_2O_2 до воде и молекулског кисеоника:



CAT је тетрамерни протеин састављен од четири субјединице (молекуларна тежина сваке је 60 kDa) које у активном центру садрже Hem групу (са Fe^{3+}) и молекул NADPH. Активност CAT зависна је од концентрације H_2O_2 . При високој концентрацији H_2O_2 , CAT манифестује каталитичку активност и редукује H_2O_2 до воде и молекулског кисеоника. Каталитичка активност CAT заснива се на реакцији H_2O_2 са Fe^{3+} у активном центру, при чему настаје високо валентни Fe-интермедијер. Fe-интермедијер оксидује други молекул водоник пероксида и тиме се враћа у првобитан CAT- Fe^{3+} облик (Patlevič и сар., 2016). При ниској концентрацији H_2O_2 , CAT манифестује пероксидазну активност, при чему се такође редукује H_2O_2 , али уз присуство одговарајућег органског или неорганског супстрата (алкохоли, пирогалол, нитрити, аскорбинска киселина) као донора H^+ јона. Продукт ове

реакције је нативни облик ензима, оксидовани супстрат и вода (Valko и сар, 2007; Ali и сар., 2020).

Глутатион пероксидаза (EC 1.11.1.9) је селенопротеин локализован у пероксизомима, митохондријама, цитосолу и интермембранском простору, чијом активношћу је катализована редукција H_2O_2 и органских хидропероксида до воде и одговарајућих алкохола уз присуство редукованог глутатиона (GSH) као кофактора:



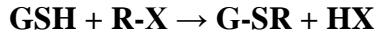
Ензим GSH-Px је тетрамерни протеин састављен од четири идентичне субјединице (молекуларна тежина сваке је 21 kDa) које у активном центру садрже селеноцистеин. Класификује се на две главне ензимске изоформе: селен-независна, која катализује редукцију органских пероксида и селен-зависна изоформа, која катализује редукцију и органских и неорганских пероксида. У оквиру селен-зависне изоформе код сисара су присутна четири типа овог ензима: GSH-Px1 (цитосолна GSH-Px) најчешће је заступљена у еритроцитима, јетри и бубрезима, GSH-Px2 (гастроинтестинална GSH-Px) такође локализована у цитосолу али преваходно гастроинтестиналних ћелија, GSH-Px3 (екстрацелуларна GSH-Px) налази се у плазми у форми гликопротеина и GSH-Px4 (фосфолипидна GSH-Px) локализована у митохондријама. Антиоксидативна активност GSH-Px је веома значајна јер услед већег афинитета према H_2O_2 у односу на CAT учествује у примарној одбрани од ниског нивоа оксидативног стреса. Такође неутрализацијом пероксида елиминише потенцијални супстрат за Фентонову реакцију спречавајући настанак липидне пероксидације (Valko и сар, 2006; Patlević и сар., 2016; Ali и сар., 2020).

Глутатион редуктаза (EC 1.6.4.2) је димерни флавопротеин састављен од две субјединице (молекуларна тежина 58 kDa) које у активном центру садрже по један молекул FAD (Adwas и сар, 2019). GR је локализована у митохондријама и цитосолу и есенцијална је за одржавање ћелијске редокс хомеостазе. Активност GR усмерена је на редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) продукованог у реакцији елиминације пероксида од стране GSH-Px. Редуковани глутатион (GSH) се у поновном циклусу користи као донор јона H^+ за GSH-Px. Овом реакцијом GR одржава висок однос GSH/GSSG у корист редукованог облика глутатиона доприносећи ефикасној одбрани од оксидативног стреса. Каталитичка активност GR зависна је од NADPH и одвија се у две фазе. У првој, редуктивној фази, NADPH редукује FAD молекул у оквиру езимског активног центра, који затим улази у другу, оксидативну фазу, где реагује са дисулфидним глутатионом формирајући два молекула GSH (Patlević и сар., 2016):



Глутатион-S-трансфераза (EC 2.5.1.18) обухвата мултигенску фамилију структурно и функционално различитих протеина локализованих у цитосолу и у непосредној близини мембране, на основу чега су груписане у три фамилије: цитосолне, митохондријалне и микрозомалне GST. Код сисара је идентификовано седам класа GST означених као α , μ , π , σ , θ , ζ , ω . GST су димерни ензими углавном састављени од две идентичне субјединице, али забележени су и хетеродимерни облици. Ови ензими имају есенцијалну улогу у детоксификацији широког спектра агенаса. Сходно томе, ова група ензима се преваходно налази у јетри, бубрезима и еритроцитима. Процес детоксификације различитих токсина

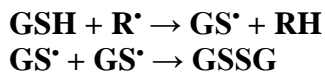
(лекови, канцерогени агенси, пестициди) преко GST заснива се на каталитичкој реакцији коњугације сулфхидрилних група молекула GSH са електрофилним супстратом (R-X) при чему настају мање реактивни хидрофилни коњугати (G-SR) који се могу екскретовати из организма:



Поред детоксификације токсина, GST каталише разградњу високо реактивних ендогених продуката какви су незасићени алдехиди, епоксиди, хидро и липидни пероксиди, пружајући заштиту ћелији од оксидативног стреса (Halliwell и Gutteridge, 2015; Allocati и сар., 2018).

2.3.2. Глутатион – главни представник неезимских компоненти AOS-а

Глутатион (L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glycine) је најзначајнији нискомолекулски тиолни антиоксиданс у ћелији. То је трипептид који се налази готово у свим ћелијама, локализован у цитосолу, једру, митохондријама и ендоплазматичном ретикулуму у високим концентрацијама (милимоларног ранга) (Valko и сар, 2007). Биосинтеза глутатиона из три аминокиселине, цистеин, глутамат и глицин, обавља се искључиво у цитосолу деловањем два АТР-зависна ензима, γ -глутамилцистеин синтетазе и глутатион синтетазе. Основна улога глутатиона је регулација ћелијске редокс хомеостазе неутрализацијом реактивних врста путем трансформације редуковане у оксидовану форму која је реверзибилног карактера. Оксидована дисулфидна форма глутатиона је потенцијално токсична за ћелију те се стога елиминише из ћелије или редукује назад у GSH деловањем ензима GR уз присуство NADPH као кофактора. Одржавање односа GSH/GSSG у корист редуковане форме која је заступљена у ћелији са преко 98% је од круцијалног значаја за правилно функционисање ћелије. У условима оксидативног стреса долази до дестабилизације односа и повећања процентуалне заступљености дисулфидне форме која може узроковати оксидативна оштећења биомолекула (Sreekumar и сар, 2021). Антиоксидативна активност GSH заснива се на способности сумпора из сулфхидрилне групе цистеина да у реакцији са слободним радикалима (R \cdot) отпушта електрон формирајући тиолне радикале (GS \cdot) који су стабилнији. Тиолни радикали даље могу интераговати и формирати глутатион дисулфид:



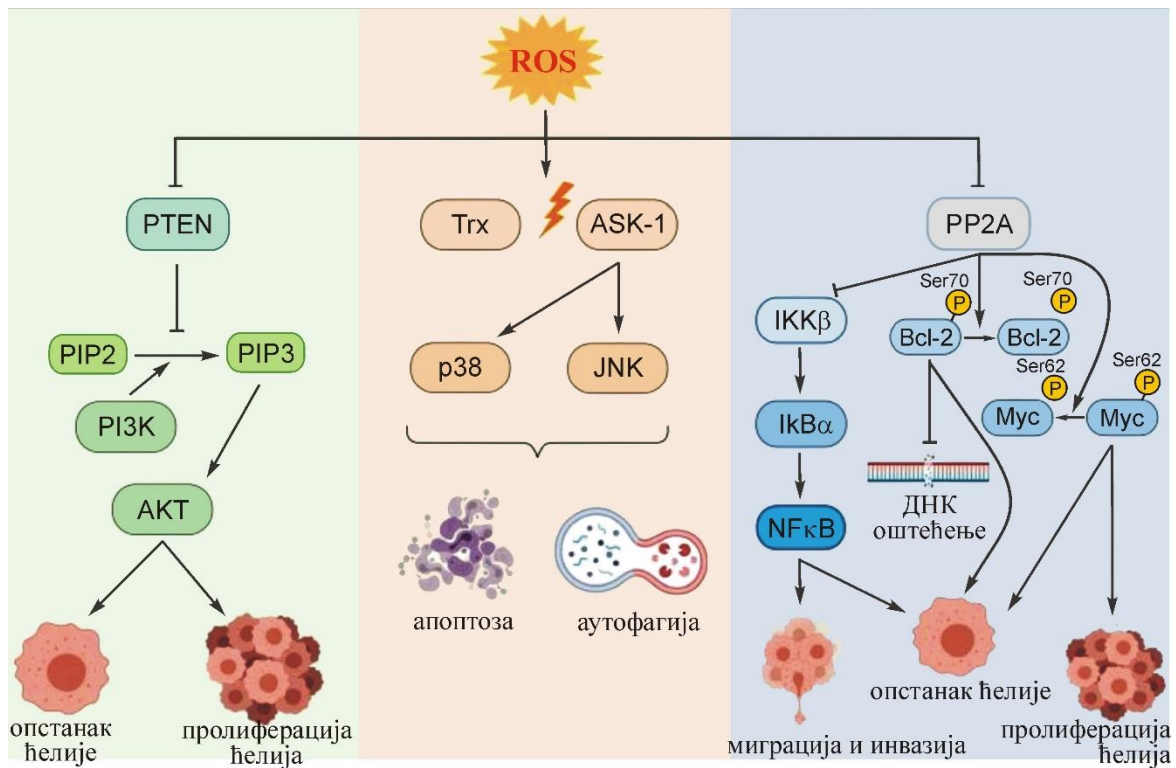
Поред наведене директне неутрализације реактивних врста, GSH своју антиоксидативну функцију испољава и индиректно као кофактор у реакцији редукције H₂O₂ и органских хидропероксида која је катализована ензимом GSH-Px, а такође и као детоксификујући коњугујући агенс у реакцији са електрофилним молекулима и ксенобиотцима која је катализована ензимом GST. Друге такође физиолошки важне улоге су мембрански транспорт појединих аминокиселина, регенерација неензимских антиоксиданаса, Vit C и Vit E назад у активне форме (Valko и сар, 2007), регулација функције ћелијских протеина, регулација ROS-зависних транскрипционих фактора, регулација пролиферације, диференцијације и апоптозе ћелије. Сходно функцијама које обавља, смањен ниво GSH повезан је са патологијом различитих неуродегенеративних и

кардиоваскуларних болести, а такође и са хепатичним поремећајима и развојем дијабетеса и тумора (Giustarini и сар., 2015; Bansal и Simon, 2018). Међутим, насупрот детоксикујућег ефекта глутатиона којим се спречава потенцијална мутација ћелија и индукција тумора, показано је да повишени нивои глутатиона у туморским ћелијама доприносе појави резистенције ових ћелија на хемотерапију (Bansal и Simon, 2018).

2.4. Улога оксидативног стреса у процесу развоја тумора

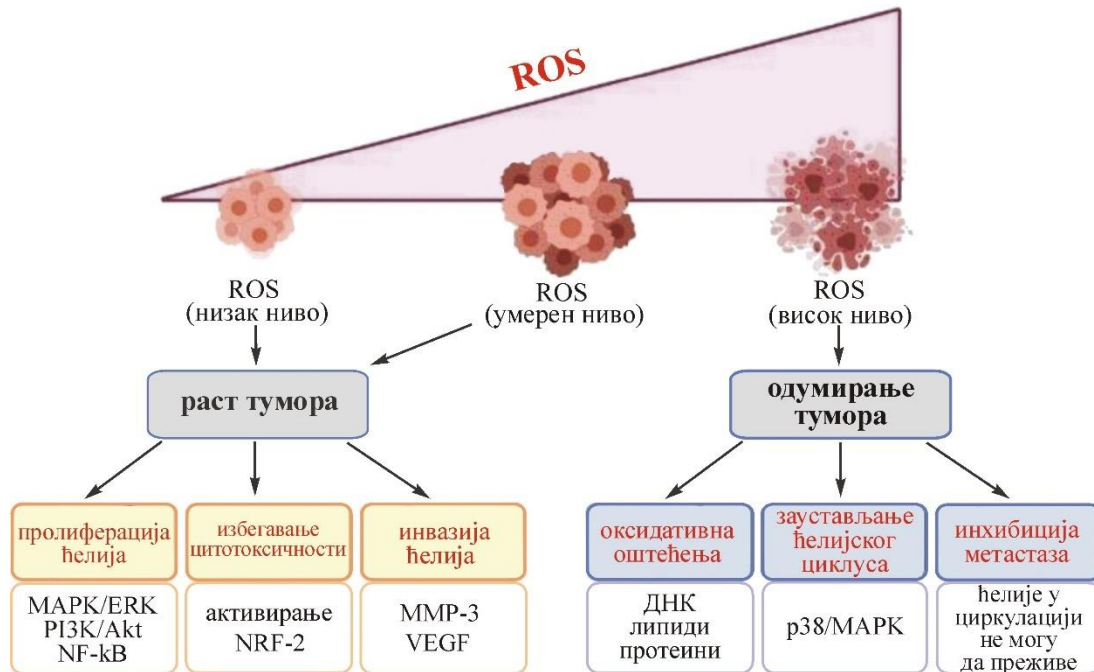
Иако физиолошки нивои реактивних врста регулишу поједине субћелијске процесе, експресију гена, синтезу протеина и активност ензима, повишени нивои реактивних врста могу мењати и оштетити многе интрацелуларне молекуле нарушавајући њихову структуру и функцију, а последично хомеостазу и интегритет ћелије. Ћелије које су погођене оксидативним стресом улазе у процес апоптозе, некрозе или мутагенезе, доприносећи старењу организма и патологији различитих болести укључујући и развој тумора (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Апоптоза је строго регулисан процес програмиране ћелијске смрти посредован активношћу протеаза названих каспазе којом се одржава физиолошка стабилност на нивоу целог организма. Њоме се елиминишу оштећене, потенцијално штетне ћелије, услед чега се спречава прогресија оштећења на околне ћелије и ткива, или опстанак мутираних ћелија. У физиолошким условима, апоптотски сигнални путеви су строго контролисани и повезани су са регулацијом нивоа оксидативног стреса. Неправилности у преносу сигнала овим путевима могу изазвати дерегулацију апоптозе и индуковати развој тумора. Апоптоза може бити иницирана спољашњим сигналним путем, везивањем адекватног лиганда за рецептор смрти (рецептор фактора некрозе тумора – TNFR и Fas рецептор - FasR), и унутрашњим сигналним путем, посредством ослобођеног *Cyt c* из митохондријалног лумена. Повећана пермеабилност митохондријалне мембране је повезана са продукцијом реактивних врста. Регулација апоптотских сигналних путева такође је зависна од степена продукције ROS/RNS. Реактивне врсте врше оксидацију тиолних протеина активирајући бројне сигналне путеве и транскрипционе факторе повезане са активацијом/супресијом апоптозе. Уколико апоптоза није адекватно регулисана, ћелијска смрт може наступити прерано или пак може доћи до супресије апоптозе а тиме и неконтролисаног раста и абнормалне пролиферације ћелија (**Слика 6**) (Matés и сар., 2012; Galadari и сар., 2017). Активирани фосфоинозитид 3-киназа (PI3K)/протеин киназа В (Akt), MAPK/екстрацелуларним сигналом регулисана киназа (ERK), NF-κB, као и тумор супресор протеин p53, даље индукују ћелијску смрт (активацијом проапоптотских путева Bax, Bid, Puma, Noxa, Araf-1, Fas, и FasL) или супримирају апоптозу фаворизујући ћелијско преживљавање (активацијом антиапоптотских протеина Bcl-2, Bcl-XL, IAP и Mcl-1), омогућавајући опстанак трансформисане ћелије (Marengo и сар., 2016; Moldogazieva и сар., 2018; NavaneethaKrishnan и сар., 2019; Hayes и сар., 2020; Kong и Chandel, 2020).



Слика 6. ROS регулација ћелијских сигналних путева и транскрипционих фактора укључених у иницијацију и прогресију тумора (модификовано из Foo и сар., 2021).

Оксидативни стрес је повезан са иницијацијом, промоцијом и прогресијом великог броја тумора укључујући леукемију, глиом, меланом, хепатом, тумор дојке, бешике, простате, дебелог црева, панкреаса и плућа (Galadagi и сар., 2017). Док повишен ниво продукције ROS/RNS активацијом процеса апоптозе или некрозе спречава трансформацију оксидативно оштећене ћелије у туморску ћелију, умерени, али хронични ниво продукције може да допринесе канцерогенези индуковањем ДНК мутација (Слика 7). Реактивне врсте у реакцији са ДНК молекулом углавном изазивају оксидативне модификације гуанина у 8-оксо-7-хидродеоксигуанозин (8-OhdG) који узрокује трансверзију гуанина у тимин (Klaunig и Wang, 2018; Kong и Chandel, 2020). Иако неопходна, оксидативна оштећења ДНК су недовољна да доведу до развоја тумора. Поред тога што утичу на геномску нестабилност, ROS/RNS модификацијом редокс осетљивих аминокиселинских остатака у регулаторним протеинима, укључујући оксидацију цистеина, сулфенилацију, С-глутатионилацију, С-нитрозилацију и нитрацију тирозина, посредују у различитим сигналним путевима који контролишу пролиферацију туморских ћелија (Moldogazieva и сар., 2018).



Слика 7. ROS-посредована канцерогенеза (модификовано Foo и сар., 2021). Ниво продукције ROS условљава различите догађаје у ћелији. Умерени и ниски нивои ROS-а промовишу раст ћелија али могу индуковати и неконтролисану пролиферацију, и иницијацију тумора. Са друге стране, високи нивои ROS-а доводе до дестабилизације редокс хомеостазе туморских ћелија индукујући апоптозу чиме се спречава даље напредовање тумора.

Иницијални процеси туморогенезе подразумевају учестале промене на ДНК молекулу које воде неопластичним трансформацијама. Даљи развој трансформисаних ћелија повезан је са способношћу ROS/RNS да координирају сигналним путевима који су посредовани преvasходно транскрипционим факторима NF-κB и STAT3, хипоксијом индукованим фактором-1α (HIF-1α), цитокинима, факторима раста и осталим протеинима и ензимима одговорним за активацију онкогена и подстицање митозе. Кординацијом наведеним сигналним путевима стимулише се неконтролисани раст, преживљавање и пролиферација трансформисаних ћелија. Са друге стране, оксидативни стрес у околним здравим ћелијама може смањити антиоксидативни капацитет ћелија, доприносећи ангиогенези, инвазији и ширењу метастаза а тиме и прогресији тумора (Galadari и сар., 2017; Prasad и сар., 2017; Calaf и сар., 2018; Moldogazieva и сар., 2018; NavaneethaKrishnan и сар., 2019).

Реактивне врсте такође могу реаговати са полинезасићеним масним киселинама ћелијске мембране иницирајући липидну пероксидацију, док се као продукти ове ланчане реакције генеришу генотоксична једињења као што су малондиалдехиди, 2-алкенали и 4-хидрокси-2-алкенали. Липидна пероксидација са својим финалним продуктима, може довести до структурних промена у ћелијској мембрани и нарушавања мембранске пермеабилности, што онемогућава препознавање таквих ћелија од стране имуног система водећи до иницијације и прогресије тумора (Gupta и сар., 2020).

2.4.1. Редокс хомеостаза туморских ћелија

Услед повећане метаболичке активности и митохондријалне дисфункције брзорастућих трансформисаних туморских ћелија, ниво продукције ROS код ових ћелија је знатно виши од нивоа код суседних нормалних ћелија. Сходно повећаној продукцији реактивних врста, активацијом транскрипционог фактора Nrf2 (нуклеарни еритроидни фактор 2), повећава се експресија антиоксиданаса (Klaunig и Wang, 2018), а тиме и антиоксидативни капацитет туморских ћелија који им обезбеђује преживљавање и опстанак у наведеним условима. Упркос ефикасном одржавању високих нивоа продукције реактивних врста, дисбаланс редокс хомеостазе туморских ћелија се догађа са релативно малим повећањем интрацелуларне концентрације ових молекула. Редокс дисбаланс у продукцији реактивних врста може покренути процес липидне пероксидације и продукцију цитотоксичних липидних радикала. За разлику од нетрансформисаних ћелија, туморске ћелије знатно брже достижу праг оксидативног стреса и тиме су у већем ризику од индукције ћелијске смрти, апоптозе, некрозе или аутофагије, којом би се потенцијално ограничио њихов прогресивни раст (NavaneethaKrishnan и сар., 2019; Gupta и сар., 2020; Hayes и сар., 2020).

Један од највећих изазова са којима се сусреће данашња медицина је проналазак ефикасне терапије са високом селективношћу према туморским ћелијама уз истовремено смањење или потпуно елиминисање системске токсичности. Антитуморски лекови који су у употреби, услед стицања резистентности туморских ћелија, резултују негативним исходом деловања, односно преживљавању туморских ћелија. Такође, поједини антитуморски лекови данашњице не показују селективност, те стога индукују оштећења и смрт здравих ћелија, посебно ћелија са високим пролиферативним потенцијалом, а забележена је и могућност формирања секундарних тумора индукованих хемотерапијом (Ciccagrese и сар., 2020). Специфичност туморских ћелија да продукују ROS у знатно већој концентрацији него здраве ћелије, искоришћена је у развоју бројних антитуморских лекова чије се дејство заснива на регулацији продукције реактивних врста и/или ензимске активности антиоксиданаса (Gupta и сар., 2020). Антитуморско деловање појединих лекова, као што су цисплатина, доксорубицин, митомицин Ц, винбластин, иностамидин, неокарзиностаин, и камптотецин, испољава се преко индукције оксидативног стреса у туморским ћелијама, („оксидативна терапија“), као и преко ROS посредоване активације апоптотских сигналних путева (Barrera, 2012). Поред хемотерапеутика, способност индукције ћелијске смрти путем модулације нивоа ROS-а и активности AOS-а испољавају и поједини природни агенси, антиоксиданси, чија је примена у циљу превенције настанка тумора, јачања антитуморских ефеката хемотерапеутика па чак и индукција смрти туморских ћелија у експанзији. Наведене стратегије су темељ за даљи развој нових ефикаснијих превентивних и терапеутских агенаса са израженим селективним деловањем, а такође су и стратегије које би потенцијално обезбедиле превазилажење резистентности туморских ћелија на комерцијалне хемотерапеутике (Galadari и сар., 2017; Calaf и сар., 2018; Moldogazieva и сар., 2018; NavaneethaKrishnan и сар., 2019; Gupta и сар., 2020). Међутим, потребно је истаћи и могућност испољавања потенцијалних нежељених ефеката коришћења редокс активних супстанци у превенцији и антитуморској терапији. Док хемотерапија агенсима са прооксидативном активношћу за циљ има повећање продукције ROS-а, смањење активности AOS-а и последичну активацију ћелијске смрти, хемопревентивна примена антиоксиданаса за циљ има спречавање малигних трансформација нормалних ћелија путем смањења продукције реактивних врста и супресије оксидативног стреса.

Неконтролисана употреба антиоксиданаса може да изазове контраефекат и да смањењем нивоа ROS-а спречи индукцију апоптозе преканцерозних и трансформисаних ћелија, фаворизујући промоцију тумора (Gupta и сар., 2020). Такође, неадекватна употреба антиоксиданаса би могла да ремети ефикасност радио и хемотерапије чије се антитуморско деловање базира на индукцији апоптозе туморских ћелија путем повећања нивоа ROS-а (Xu и сар., 2017; Hayes и сар., 2020). Пролонгирана хемотерапија може утицати на стицање отпорности туморских ћелија, а такође и индуковати додатне генетске мутације услед повећане продукције ROS, доприносећи формирању секундарних, хетерогених тумора отпорних на лекове и са истакнутим метастатским потенцијалом (Yang и сар., 2018). Сходно наведеном, од изузетне важности је одабир антиоксиданса који би се потенцијално користио као хемопревентивно средство, дозе у којима би био примењен, и као најважније, са којим би хемотерапеутиком у комбинованим антитуморским третманима постигао највећу ефикасност.

3. Антитуморска терапија и хемотерапеутски медикаменти

Терапијски приступи лечења малигнитета разликују се у зависности од развојног стадијума болести и типа тумора. Најчешћи приступи су хируршко уклањање тумора, радиотерапија, хемотерапија, хормонална и имунотерапија. Њихова примена је врло често комбинована са циљем постизања што делотворнијег ефекта. Хемотерапија се најчешће спроводи као адјувантна, након оперативног захвата. Спровођење овог типа терапије смањује могућност дисеминације тумора и учесталост метастаза, док се као третман већ дисеминоване болести спроводи са циљем ублажавања симптома малигнитета и продужавања живота.

Цитостатици своје деловање испољавају на нивоу регулације ћелијског метаболизма, спречавају раст ћелија инхибицијом ензимске активности, пролиферацију ћелија инхибицијом деобе и индукују оштећења ДНК молекула водећи до апоптозе. И поред велике ефикасности, примењена хемотерапија може резултовати неуспелим исходом услед стицања резистентности туморских ћелија на цитостатике, а такође се могу испољити и нежељени ефекти на здраве ћелије организма.

На основу механизма деловања и према Америчкој агенцији за храну и лекове, FDA организацији (енгл. *Food and Drug Administration*), дефинисане су основне категорије хемотерапеутика: алкилирајући агенси (циклофосфамид и деривати платине (Pt)); антимицротубулни и антимицитички агенси (винка алкалоиди и таксани); антиметаболити (метотрексат, 5-флуороурацил, гемцитабин); антитуморски антибиотици (актиномицин Д, митомицин Ц, блеомицин, антрациклини: доксорубицин, даунорубицин, подофилотоксин, етопозид, тенипозид и камптотецини: иринотекан, топотекан); и други (природни производи, моноклонска антитела, лекови за антиангиогенезу, инхибитори топоизомеразе, инхибитори митозе, инхибитори протеина топлотног шока (енгл. *Heat shock protein*) итд.) (Boulikas, 2009; Espinosa и Raposo, 2010). Цисплатина и њени деривати сврстани су у алкилирајуће агенсе чије је деловање усмерено на ДНК и РНК молекуле услед постојања алкил радикала који имају висок афинитет према азотовим атомима пуринских и пиримидинских база. Везивањем ових агенаса за азот онемогућава се правилно спаривање база новог ДНК молекула током процеса репликације, што узрокује апоптозу ћелије. Предност алкилирајућих агенаса је што се њихово деловање испољава у свим фазама

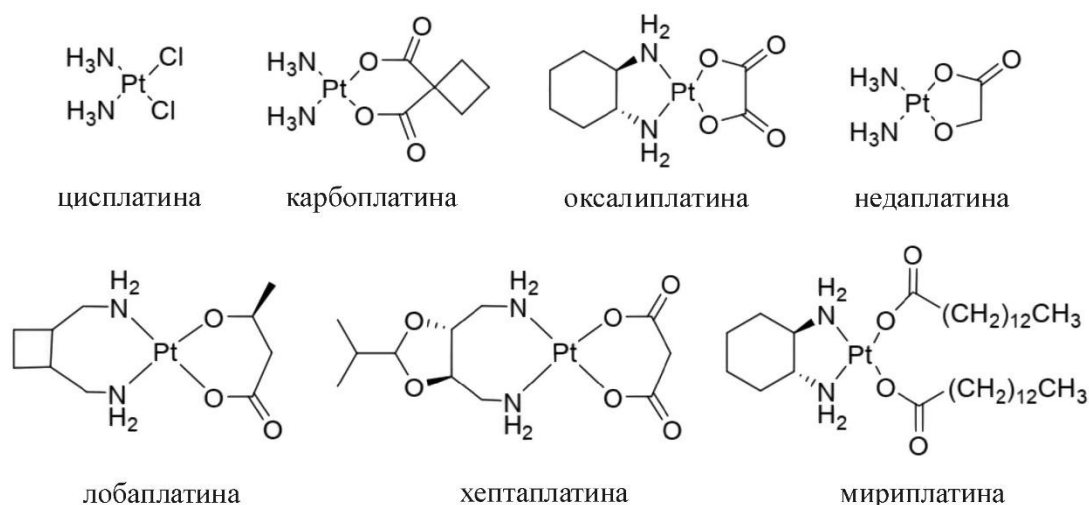
ћелијског циклуса те се стога могу користити у терапији различитих врста тумора, преваходно брзорастућих тумора. Испољавање нежељених ефеката у виду системске токсичности и резистенције туморских ћелија су главне препреке које лимитирају клиничку употребу ових агенаса (Ralhan и Kaur, 2007).

3.1. Биомедицинска употреба комплекса метала

Због својих специфичних карактеристика у реакцији са биолошким супстратима, као и испољавању антибактерицидног, антифугалног, антиинфламаторног и антитуморског деловања, комплекси метала су постали применљиви у терапији широког дијапазона болести. Њихова биолошка активност заснива се на високом редокс потенцијалу и спопобности отпуштања електрона, чиме се формирају позитивно наелектрисани јони који су лако растворљиви у биолошким течностима. Узимајући у обзир да већина биолошких ентитета носи негативно наелектрисање (протеини, нуклеинске киселине као и њихове саставне компоненте), метални јони имају тенденцију да интерагују са њима ометајући пролиферативну активност ћелије. Особина интеракције металних јона са органским молекулима такође је послужила као основ за развој нових потенцијалних медикамената у виду комплекса метала са различитим једињењима у функцији лиганата. Велики број металних комплекса је већ уведен у клиничку праксу (Hossain и сар., 2018). Међутим, услед могућности акумулације метала у организму и испољавања потенцијално опасних нежељених ефеката ове врсте лекова, неопходна је њихова даља евалуација, а такође и дизајнирање нових комплекса са селективним ефектом. Употреба специфичних лиганата, супституција јона Pt другим јонима прелазних метала, испитивање природних једињења и њихових комбинованих ефеката су стратегије за развој нових антитуморских агенаса. Њихове потенцијалне карактеристике биле би повећана селективност у односу на цисплатину, већи терапеутски индекс и висок проценат ефикасности примарне терапије, нарочито против тумора резистентних на цисплатину као и рекурентних тумора.

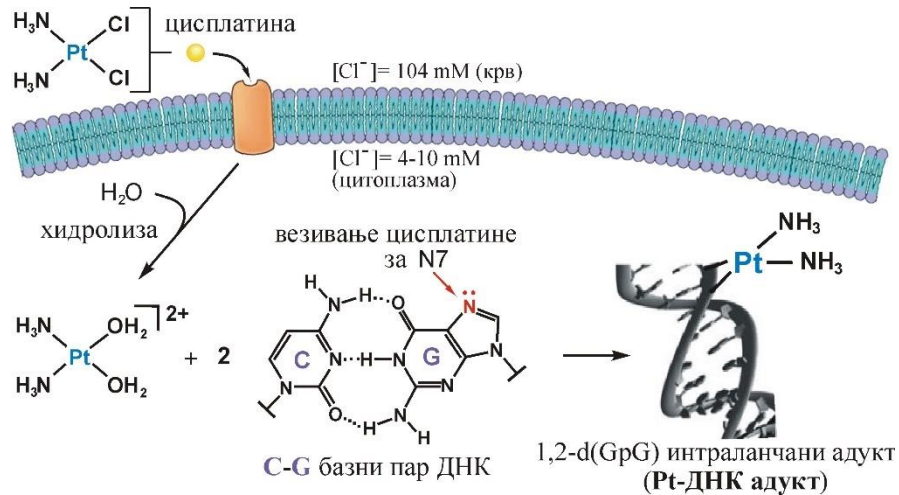
3.1.1. Антитуморска активност и механизам деловања платина(II) комплекса

Најзначајније револуционарно откриће које је обележило борбу против малигних болести је случајно откриће антитуморског потенцијала цисплатине од стране Розенберга 1965. године. Од идентификације 1969. године и увођења у клиничку праксу почетком 70-тих година прошлог века, цисплатина је најчешће употребљиван цитостатик, како у појединачним тако и у комбинованим третманима који се спроводе приликом лечења различитих врста тумора са високим пролиферативним потенцијалом (тумор плућа, једњака, бешике, бубрега, простате, тестиса, оваријума, цервикса, дојке, панкреаса, гастроинтестинални тумор, колоректални тумор, хепатоцелуларни тумор, као и против глиобластома, метастатских меланома и перитонеалних или плеуралних мезотелиома) (Boulikas, 2009; Ghosh, 2019). До данас је откривен и тестиран велики број антитуморских агенаса на бази платине, али само седам једињења је укључено у клиничку примену (**Слика 8**) од којих се три употребљавају широм света (цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина), док је примена осталих одобрена само у појединим земљама (недаплатина - Јапан, лобаплатина - Кореја, хептаплатина - Кина, мириплатина - Јапан) (Sun и сар., 2021).



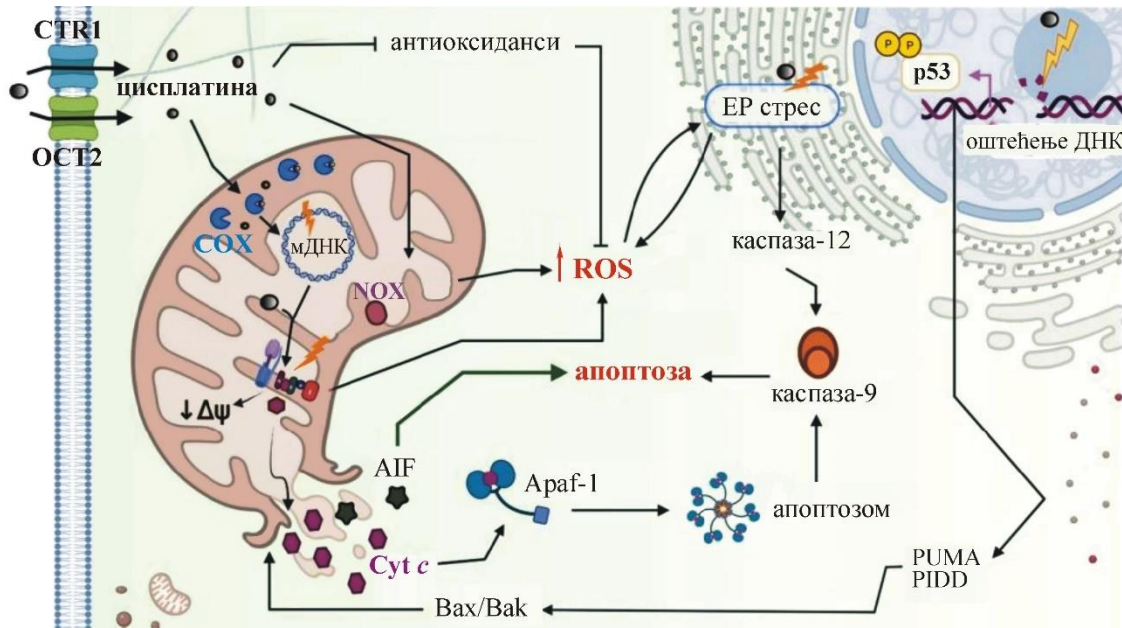
Слика 8. Структурне формуле лекова на бази платине одобрених за клиничку употребу (модификовано из Sun и сар., 2021)

Цисплатина ($\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$; *cis*-диаминдихлороплатина (II)) је квадратно планарни координациони комплекс са атомом Pt(II) у координационом центру за који су везана два молекула амонијака и два атома хлора у *cis* положају. Молекули амонијака са атомом Pt формирају стабилне везе, док су везе између хлоридних јона и Pt слабе везе чијом се хидролизом врши активација овог лека (Dasari и сар., 2022). Апликација цисплатине се спроводи интравенски, инјекцијом или путем инфузионог раствора. Унутар циркулације цисплатина се везује за серумске протеине, углавном хумани албумин, чиме се врши деактивација великог процента унетог лека. Структурно неизмењени молекули цисплатине долазе до циљане ћелије и у њу се уносе пасивном дифузијом или уз помоћ АТФ-зависног транспортера бабра (енгл. *high affinity copper transporter 1* - hCTR1) и базолатералног транспортера органских катјона (енгл. *organic cation transporter 2* - OCT2) (Oun и сар. 2018; Amador-Martínez и сар., 2021; Hussain и сар., 2021). По уласку у ћелију, услед ниске концентрације хлоридних јона у интрацелуларној течности, долази до хидролизе цисплатине, односно супституције хлоридних јона молекулима воде, при чему настају електрофилни моноаква $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ и диаква $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекси. Ови високо реактивни молекули имају афинитет према тиолним протеинима, и према нуклеинским киселинама као донорима азотних јона. Приликом интеракције са протеинима који садрже сулфхидрилне групе, превасходно са глутатионом, али и са металотионеинима, метионином и протеинима који садрже цистеин, долази до инактивације цисплатине чиме се лимитира њена биоискористивост. Интеракција са тиолним протеинима је основ развоја резистенције ћелија на ову врсту антитуморских лекова (Ghosh, 2019; Raudenska и сар., 2019). Додатно, као производ ових реакција настају високо реактивни адукти који уколико се не елиминишу из ћелије могу да индукују даља оксидативна оштећења биомолекула доприносећи цитотоксичним ефектима цисплатине. Ефлукс Pt-GSH адукта из ћелије врши се путем АТФ зависних транспортера бабра означених као АТФ7А, АТФ7В и MRP2. Повећана експресија ових АТФ-аза у туморским ћелијама такође доприноси развоју резистенције на терапију цисплатином (Hussain и сар., 2021).



Слика 9. Механизам настанка Pt-ДНК адукта (модификовано из Johnstone и сар., 2016)

Услед антиоксидативног капацитета туморских ћелија, само 1 до 10% од укупне примењене дозе цисплатине долази до циљаног ћелијског компартмана, једра ћелије (Raudenska и сар., 2019). Унутар једра, хидролизованa цисплатина се услед високог афинитета према атомима азота ковалентно везује за пуринске базе ДНК молекула, преваходно за имидазол гуанина на позицији N7, примарно формирајући моноPt-ДНК адукте. Након тога, овај адукт се везује за N7 атом суседног гуанина и формира 1,2-интраланчане адукте. Формирани Pt-ДНК адукти узрокују дисторзије ДНК молекула које подразумевају савијање и одмотавање хеликса, као и локалну денатурацију ланца, онемогућавајући транскрипцију и репликацију и следствено доприносећи индукцији спољашњег и унутрашњег апоптотског пута (Amador-Martínez и сар., 2021; Dasari и сар., 2022). Међутим, висок степен ефикасности антитуморске терапије цисплатином није повезан само са њеном способношћу индукције оштећења нуклеарне ДНК. Литературни подаци указују на значајан ниво продукције ROS-а у митохондријама туморских ћелија након третмана цисплатином што доприноси интензивирању цитотоксичног ефекта овог лека. Унутар ћелије, цисплатина се у већем проценту у односу на друге ћелијске компартмане акумулира у митохондријама, где индукује оштећења митохондријалне ДНК. Мањи митохондријални капацитет ензима за репарацију ДНК омогућава акумулацију формираних адукта у овим органеллама. Акумулирани адукти индукују поремећај електрон транспортног система и активацију NOX, фаворизујући пропацију оксидативних оштећења и последичну нефункционалност митохондрија. Реактивне врсте даље могу проузроковати оштећења ендоплазматичног ретикулума у коме се стимулише додатно генерисање ROS-а. Хиперпродукција реактивних врста може узроковати активацију каспаза и фаворизовати пероксидацију липида водећи до оштећења осталих ћелијских биомолекула и следствено до индукције апоптозе (Ghosh, 2019; Raudenska и сар., 2019; Amador-Martínez и сар., 2021).



Слика 10. Механизам цитотоксичног деловања цисплатине (модификовано из Amador-Martínez и сар., 2021)

Поред цитотоксичних ефеката према туморским ћелијама, цисплатина услед неспецифичног деловања индукује оштећења здравих ћелија на нивоу организма. Дистрибуцијом аплицираног лека системским крвотоком омогућено је неселективно деловање цисплатине на велики број ткива и органа које за последицу има нарушавање њихове структуре и виталне функције. Ниска селективност према туморским ћелијама у односу на здраве ћелије заснива се на деловању цисплатине које је усмерено ка ћелијама са повећаним енергетским билансом, брзорастућим ћелијама какве су туморске ћелије, те се стога нежељени ефекти овог лека испољавају на метаболички активнијим ткивима. Ови ефекти цисплатине преваходно су повезани са индукцијом оксидативног стреса у здравом ткиву и могу узроковати системску или токсичност појединих органа. У зависности од циљног ткива, деловање цисплатине за последицу може имати развој нефротоксичности, хепатотоксичности, ототоксичности, неуротоксичности, гастроинтестиналне токсичности, алопеције, хематотоксичности, кардиотоксичности (Ghosh, 2019).

Интравенском апликацијом цисплатине, прве ћелије које бивају изложене негативним ефектима овог лека су еритроцити. Претходно је наглашено да по усласку у крвоток, цисплатина реагује са тиолним протеинима формирајући адукте који могу индуковати оштећења крвних ћелија. Хематотоксични ефекти цисплатине испољавају се на нивоу функционалности хематопоезног ткива. Заправо, цисплатина индукује мијелосупресију, смањену активност коштане сржи, која резултира редукованим бројем крвних ћелија услед чега долази до развоја леукопеније, тромбоцитопеније, неутропеније и анемије. Даље, системска циркулација дистрибуира ксенобиотике до јетре где се врши њихова метаболичка обрада, те је стога овај орган подложен нежељеним ефектима цисплатине. Хепатотоксичност индукована цисплатином је последица хиперпродукције ROS-а у митохондријама епителних ћелија синусоида. Додатно, ефлукс цисплатине из организма путем гломеруларне филтрације крви и тубуларне секреције доводи до акумулације цисплатине у бубрезима и последичног оштећења нефрона и ћелија бубрежног ткива,

доприносећи развоју акутне бубрежне инсуфицијенције (Oun и сар., 2018; Dasari и сар., 2022).

Сходно наведеним нежељеним ефектима цисплатине, индуковане цитотоксичности многих органа и система органа, као и повећана учесталост развоја резистенције туморских ћелија, њена клиничка ефикасност и терапијска примена је лимитирана. Стога је фокус новијих истраживања усмерен ка проналаску металних комплекса који би потенцијално превазишли резистенцију туморских ћелија на комерцијалне хемотерапеутике и уједно испољили високу селективност, чиме би се редуковале или у потпуности елиминисале нус појаве у виду индуковане цитотоксичности.

3.1.2. Платина(IV) комплекси – потенцијални антитуморски агенси

Стратегија развоја нових антитуморских лекова обухвата и испитивања платина(IV) комплекса као агенаса са обећавајућим потенцијалом у превазилажењу недостатака терапије постојећим хемотерапеутицима. Литературни подаци указују да је синтетисано на стотине различитих Pt(IV) комплекса чијом је евалуацијом биолошке активности показан антитуморски ефекат према великом броју различитих туморских ћелијских линија. Поједини Pt(IV) комплекси, као што су ипроплатина, тетраплатина и сатраплатина, су ушли у одређене фазе клиничког испитивања. Међутим, сваки од ових потенцијалних лекова је имао своје недостатке: слабија активност ипроплатине у односу на цисплатину, интензивна неуротоксичност тетраплатине и отежано преузимање сатраплатине од стране ћелија, те су њихова даља клиничка испитивања обустављена (Dilruba и Kalayda, 2016; Johnstone и сар., 2016). Стога постоји потреба за даљим истраживањима у оквиру овог поља и дизајнирању нових Pt(IV) једињења.

Платина(IV) комплекси су координациони комплекси који настају оксидацијом квадратно планарних Pt(II) комплекса, при чему се за координациони центар везују два аксијална лиганда формирајући октаедарску структуру комплекса. Услед нискоспинске d_6 конфигурације, Pt(IV) комплекси показују већу инертност од Pt(II) аналога, што између осталог омогућава њихову оралну примену. Наиме, њихови аксијални лиганди су отпорнији на супституцију која се дешава код Pt(II) комплекса чиме је повећана могућност дистрибуције платине до циљане ћелије без претходне инактивације у крви приликом реакције са циркулишућим протеинима. По уласку у туморску ћелију, ослобађањем два аксијална лиганда, Pt(IV) комплекс се активира и редукује глутатионом или Vit C до Pt(II) комплекса који даље интерагује са интраћелијским биомолекулима изазивајући њихова оштећења, а такође индукује продукцију ROS-а и последичну апоптозу или некрозу ћелије (Kaludjerović и сар., 2005; Tolan и сар., 2016; Gibson, 2019). Услед наведеног начина деловања повећава се проценат активног лека који доспева до циљане туморске ћелије, а такође се смањује могућност испољавања токсичних ефеката на здрава ткива. Додатно, широк спектар аксијалних лиганда обезбеђује велику флексибилност у дизајну Pt(IV) комплекса са могућношћу модификације фармакокинетичких својстава, при чему активни део комплекса остаје непромењен. Манипулацијом аксијалним лигандима може се допринети развоју повољних фармаколошких својстава Pt(IV) комплекса, какви су повећана липофилност и олакшана апсорпција од стране ћелија, као и побољшана редукциона способност (Zheng и сар., 2014; Gibson, 2019).

Због показане изузетне антитуморске активности према великом броју туморских ћелијских линија, неретко интензивније од цисплатине, Pt комплекси са диамин лигандима,

посебно комплекси Pt(II/IV) са edda (етилендиамин-*N,N'*-диацетат)-типом лиганда, последњих година постављени су у центар испитивања од стране хемичара, биолога и медицинара (Stojković и сар., 2014; Jurišević и сар., 2016; Petrović и сар., 2020). Додатно, евалуацијом активности Pt(IV) комплекса са eddp (етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропаноат)-лигандима дошло се до сазнања да се супституцијом eddp тетрадентатних лиганда одговарајућим бидентатним естарским лигандом вишеструко повећава цитотоксичност испитиваних комплекса. Такође, за поменуте комплексе је показано да су високо реактивни и да идукују некрозу посредовану интензивираним продукцијом реактивних врста кисеоника са значајно бржим цитотоксичним деловањем од цисплатине (Kaludjerović и сар., 2005). Имајући у виду наведена открића, синтетисани су и окарактерисани Pt(IV) комплекси са прекурсорима бидентатног *N,N'*-лиганда, *O,O'*-диалкил естрима (алкил = етил, пропил, бутил) етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) сирћетне киселине (Pt(IV) eddba комплекси), који су показали интензивнију цитотоксичност од цисплатине према свеже изолованим ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (енгл. *Chronic lymphocytic leukemia cells* - CLL) (Dimitrijević и сар., 2013) и тиме завредели даљу евалуацију.

3.2. Комбинована антитуморска терапија

Током протеклих деценија у клиничку праксу уведена је комбинована антитуморска терапија која синергистичким деловањем одређених природних биоактивних супстанци са хемотерапеутицима за циљ има минимализацију нежељених ефеката на здраве ћелије уз истовремено појачавање сензитивности туморских ћелија на хемотерапију. Поједине биоактивне биљне супстанце као што су винкристин, винбластин, таксол, топотекан, иринотекан, деривати камптотецина и епиподофилотоксини, су одобрене за клиничку употребу. Због безбедности коришћења, изузетне ефикасности и економичности, увођење фитохемикалија као додатног агенса у антитуморској терапији задобија значајно место у преклиничким и клиничким испитивањима. Бенефитни ефекти природних фитохемикалија у антитуморским комбинованим третманима су вишеструки, а између осталог обухватају цитотоксичне ефекте према туморским ћелијама посредоване дестабилизацијом редокс хомеостазе, инхибирањем прекомерне пролиферације, заустављањем ћелијског циклуса, активацијом проапоптоских сигналних путева; и ефекте на нивоу јачања антиоксидативног капацитета здравих ћелија. Резултати многих студија указују на успешност фитохемикалија у комбинованом лечењу различитих малигнитета попут тумора хематопоезног ткива, гастроинтестиналног тракта, дојке, коже, плућа, панкреаса, бубрега, јетре, дебелог црева и простате. Имајући у виду да је за туморске ћелије карактеристична хиперпродукција ROS-а и да су стога осетљивије на дестабилизацију редокс хомеостазе од нормалних ћелија, модулација нивоом продукције ROS-а у туморским ћелијама употребом фитохемикалија је обећавајућа стратегија за развој успешније антитуморске терапије. Додатно, ниска учесталост нежељених ефеката ових природних агенаса доприноси чињеници да су фитохемикалије значајан ресурс у превазилажењу проблема резистенције и ниске селективности хемотерапеутика (Gaikwad и Srivastava, 2021; Ayaz и сар., 2022).

4. Биомедицинска примена природних полифенолних једињења

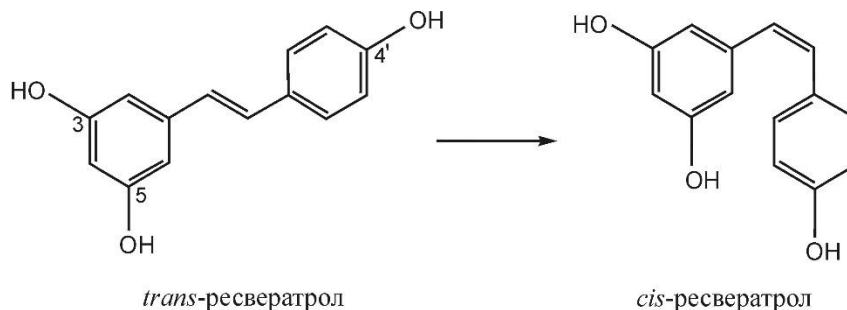
Полифеноли су класа биљних једињења карактеристична по фенолним компонентама у хемијској структури. То су фитохемикалије најзаступљеније у људској исхрани. Такође је еминентна њихова употреба у традиционалној медицини која датира хиљадама година и заснива се на антибактеријским, антивирусним, антиинфламаторним и антиалергијским својствима ових једињења (Avtanski и Poretsky, 2018). Литературни подаци указују да дугорочно повећање уноса полифенола путем исхране пружа заштиту од развоја тумора, дијабетеса, кардиоваскуларних, гастроинтестиналних и неуродегенеративних болести (Cory и сар., 2018). Полифеноли су секундарни метаболити биљака чија је генерална функција у обезбеђивању заштите, а продуковани су као одговор биљке на UV зрачење, оксидативни стрес и инфекцију различитим патогенима. Такође, они учествују у регулацији раста, регулацији хормонске активности, рН вредности, и индукцији периода дорманције (Olszowy, 2019). Подела полифенола извршена је на основу броја фенолних прстенова и на основу структурних елемената који их повезују. Стога су главне класе полифенола флавоноиди (флавоноли, флаваноли, флаволи, флаванони, изофлаволи и антоцијанини) и фенолне киселине (деривати бензоеве киселине и деривати цинаминске киселине), лигнани и стилбени (Lin и сар., 2021).

Из широког спектра биолошких својстава полифенолних једињења, последњих година истраживања су фокусирана на њихову антиоксидативну и антитуморску активност. Антиоксидативна активност заснована је на: постојању хидроксилних група на ароматичним прстеновима које интерагују са слободним радикалима неутралишући их и прекидајући пропагацију липидне пероксидације; лако формирању водоничних веза; хелирању и редукцији јона метала чиме инхибирају генерисање хидроксил радикала путем Фентонове реакције; формирању адуката; редуктивном потенцијалу и способности редукције антиоксидативних ензима чиме одржавају и јачају антиоксидативни капацитет ћелије и доприносе успостављању редокс хомеостазе (Avtanski и Poretsky, 2018). Међутим, у зависности од примењене концентрације, рН средине као и присуства редокс-активних метала, полифеноли могу да испоље прооксидативну активност и да продукују ароксил радикале и нестабилне комплексе са металима. Ови продукти даље индукују стварање $O_2^{\cdot-}$, ДНК адукта, семихинона и хинона, који промовишу оксидативни стрес. Благотворно антитуморско дејство засновано је на њиховим плејотропним ефектима и испољава се превасходно способношћу супресије трансформације нормалне ћелије у малигну, а затим и способношћу регулације сигналних путева пролиферације, диференцијације и апоптозе туморских ћелија. Велики број ових једињења је ушао у одређену фазу клиничких испитивања, а поједини од њих, куркумин, епигалотехин и ресвератрол, испољили су изузетан антитуморски потенцијал (Olszowy, 2019). Имајући у виду да селективна цитотоксичност туморских ћелија може бити индукована применом прооксидативних агенаса, а такође и значајан утицај полифенола у регулацији великог броја сигналних путева, ова једињења се сматрају перспективним кандидатима у развоју нових терапеутских приступа лечењу тумора.

4.1. Ресвератрол

Ресвератрол (*trans*-3,5,4'-трихидрокси-стилбен) је природни полифенол, представник класе стилбена. Први пут га је изоловао Michio Takaoka 1940. године из корена биљке чемерике (*Veratrum grandiflorum*) која је била позната по својим лековитим својствима и традиционалној употреби у лечењу гљивичних инфекција, инфламације, дерматитиса, хипертензије и хиперлипидемије. Показано је да повећан унос ресвератрола утиче на побољшање квалитета живота и продужавање животног века услед модулације процеса повезаних са старењем организма, какви су инфламација, митохондријална дисфункција, оксидативни стрес, фиброза, скраћивање теломера и ћелијско старење, ангиогенеза и агрегација тромбоцита. Због вишеструких бенефитних ефеката у лечењу многих болести укључујући велики број тумора, дијабетес, гојазност, инфламаторне, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести и болести бубрега, ресвератрол је једна од најиспитиванијих полифенолних супстанци у биомедицинским истраживањима спроведеним у протеклих десет година (Uddin и сар., 2021, Haunschild и Marx, 2022).

Ресвератрол је фитоалексин који биљкама обезбеђује заштиту и синтетише се у одговору на механички стрес или стрес проузрокован UV зрачењем, хемијским агенсима или одређеним микробним инфекцијама. Заступљен је у великом броју биљака које се користе у исхрани, попут грожђа (првенствено у кожици плода), кикирикија, дудиња, хмеља, соје, и бобичастог воћа (Leischner и сар., 2021). Основна структура ресвератрола садржи два фенолна прстена повезана двоструком стиренском везом која формира 3,5,4'-трихидроксистилбен заступљен у два стереоизомерна облика, *trans*- и *cis*- (Слика 11). У природним условима *trans*- изомер се може конвертовати у *cis*- форму под дејством светлости и UV зрачења. Биолошка активност карактеристична је за обе изоформе, али због изразите стабилности, *trans*- изомер је одговоран за већину биолошких функција ресвератрола (Gambini и сар., 2015; Lin и сар., 2021).



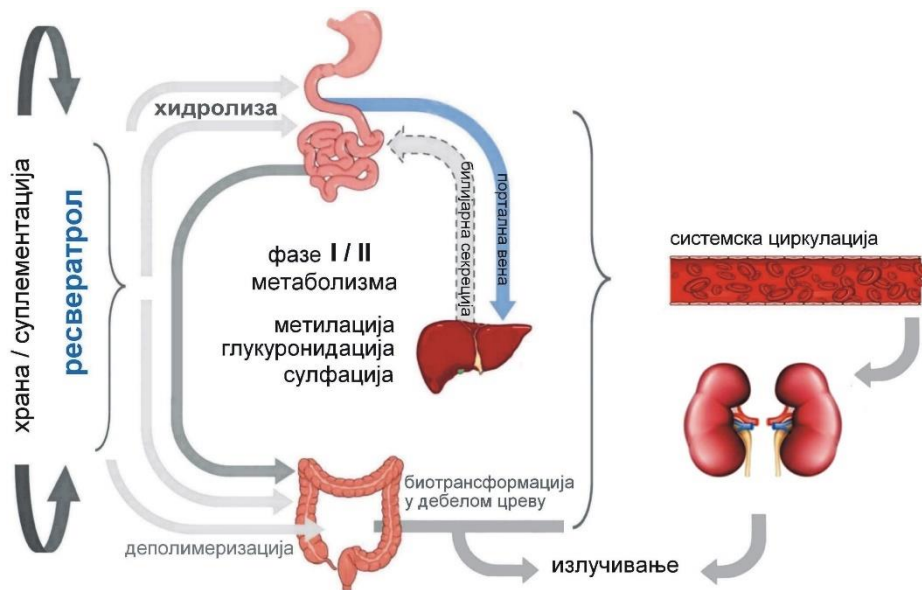
Слика 11. Структурне формуле изоформи ресвератрола (преузето из Leischner и сар., 2021)

Иако је рано откривен, ресвератрол је привукао пажњу јавности тек 1992. године, када су уочени кардиопротективни ефекти црног вина. Повећана концентрација ресвератрола у црном вину и свакодневна конзумација оптималне количине вина уз оброк, повезана је са „Француским парадоксом“, термином који описује појаву смањене инциденце и морталитета од кардиоваскуларних болести француске популације упркос повећаном уносу хране богате zasiћеним мастима. Додатно, црно вино обилује *trans*-ресвератролом, за разлику од белог вина у коме се ресвератрол налази у *cis*- облику и генерално нижој концентрацији, што је последица начина производње ове врсте вина која искључује употребу кожеце грожђа (Carrizzo и сар., 2013; Leischner и сар., 2021). Још већу пажњу

светске научне јавности ресвератрол добија 1997. године када су Jang и сарадници указали на његов изузетан антитуморски потенцијал и способност вишестепене инхибиције канцерогенезе (Cargizzo и сар., 2013).

4.1.1. Метаболизам и биодоступност ресвератрола

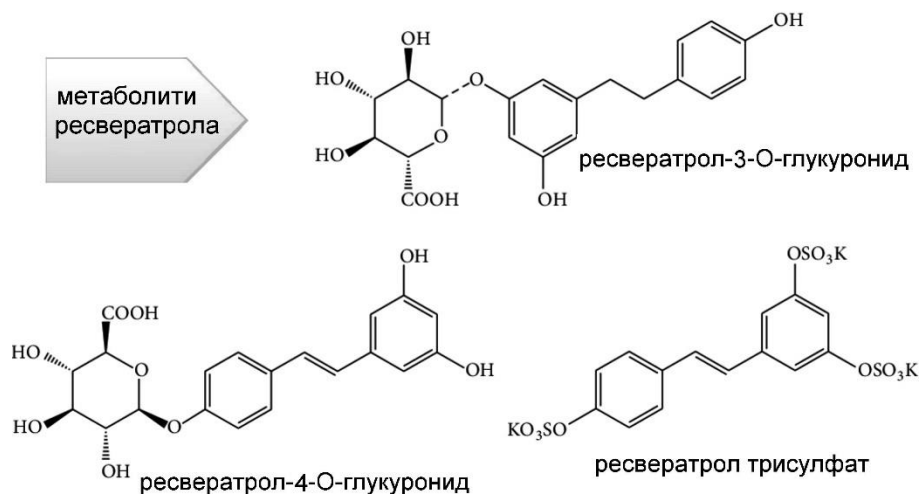
Хемијска структура ресвератрола условљава његову слабу хидрофилност. Међутим, постојање ОН група обезбеђује овом молекулу могућност интеракције са широким спектром биомолекула, тако да естерификација и гликозилација са алифатичним молекулима повећава растворљивост и спречава оксидацију ресвератрола. Ови процеси олакшавају апсорпцију ресвератрола након оралне ингестије од стране ентероцита и омогућавају очување биолошких ефеката овог молекула уз повећање његове стабилности и биорасположивости (Gambini и сар., 2015; Salehi и сар., 2018). Иако апсорбован у великој количини, мали проценат ресвератрола долази до крвотока и ткива (Meng и сар., 2021). Пре апсорпције, ресвератрол подлеже хидролизи од стране цревне микрофлоре и цревних ензима. Уласком у системску циркулацију, ресвератрол интерагује са албуминима и липопротеинима који врше његову акумулацију и дистрибуцију, обезбеђујући биодоступност.



Слика 12. Метаболички пут ресвератрола (модификовано из Guegheiro и сар., 2022)

За разлику од *in vitro* третмана спроведених на ћелијским линијама где је показана изузетна ефикасност ресвератрола у модулацији појединих биолошких функција, услед ограничене дистрибуције до циљних ткива *in vivo*, посебна пажња се посвећује механизмима деловања овог молекула унутар организма (Gambini и сар., 2015). С обзиром да се ресвератрол у јетри интензивно и брзо метаболише процесима метилације, глукуронидације и сулфације, концентрација слободног ресвератрола у плазми након оралне ингестије једног грама чистог ресвератрола је изузетно ниска, детектована у наномоларном опсегу. Форме ресвератрола које се превасходно налазе у крви су метаболити ресвератрола, 3- и 4'-О-глукурониди и 3-сулфати (Слика 13), и њихове мерне

јединице у плазми су у микромоларном опсегу (Calamini и сар, 2010; de Sá Coutinho и сар., 2018; Meng и сар., 2021).



Слика 13. Структурне формуле метаболита ресвератрола (преузето из Gambini и сар., 2015)

За ове метаболите је показано да испољавају приближно сличне ефекте као и слободан ресвератрол, те се благотворно дејство ресвератрола поистовећује са ефектима његових метаболита и стога је његова ефикасност *in vivo* упркос смањеној биорасположивости, изузетно значајна (Calamini и сар, 2010). Једнократном оралном ингестијом радиоактивно обележеног ресвератрола од стране мушких јединки Valb/c мишева, показано је да су органи у којима долази до одређеног процента акумулације ресвератрола у сва три метаболичка облика, органи хепатореналног система и гастроинтестиналног тракта (Athar и сар., 2007). Као резултат фармакокинетичких студија истиче се повећана акумулација овог полифенола у ткиву јетре и бубрега, што може допринети испољавању протективних својстава ресвератрола преваходно на нивоу ових органа (Valentović и сар., 2014).

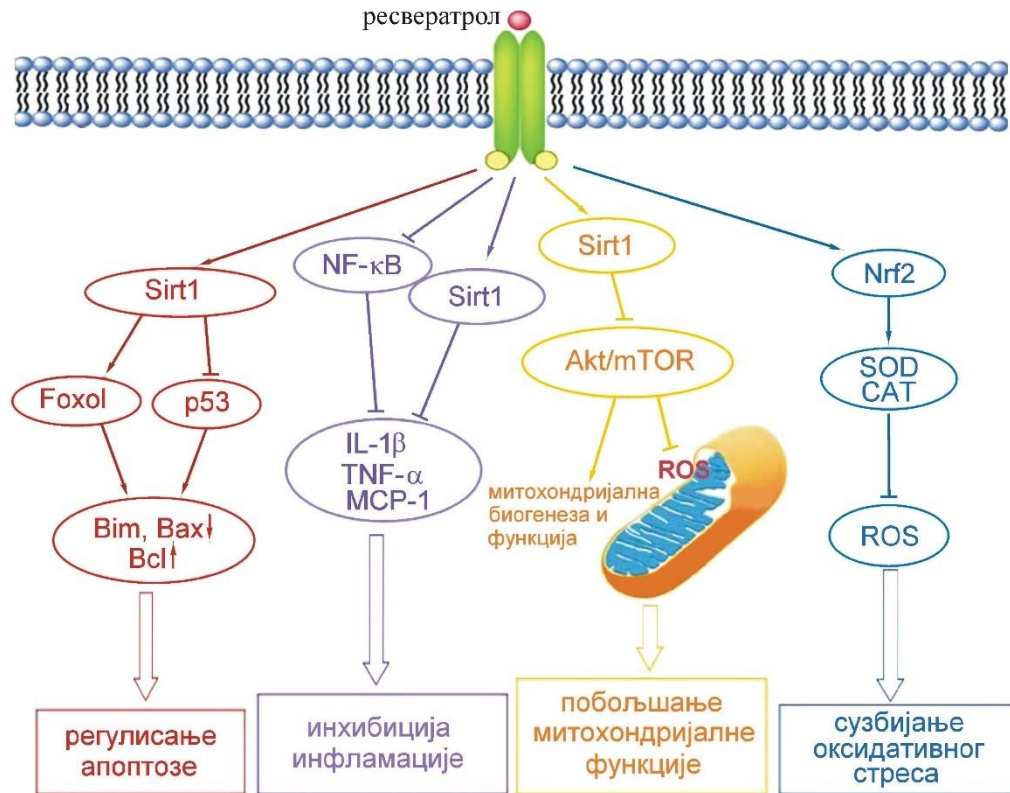
4.1.2. Биолошки ефекти ресвератрола

Сходно хемијским и физичким карактеристикама које испољава, ресвератрол може интераговати са мембранским рецепторима делујући екстрацелуларно, или може пасивним транспортом проћи кроз ћелијску мембрану и остварити интрацелуларну интеракцију са цитоплазматским и једарним молекулама, чиме модулира активност многобројних сигналних путева (Poschner и сар., 2019).

Антиоксидативне ефекте у биолошким системима ресвератрол може испољити директним и индиректним механизмима деловања. Раније је наглашено да је интеракција ресвератрола са великим бројем биомолекула омогућена постојањем функционалних хидроксилних група у његовој структури. Способност преноса водоникових јона као и секвенцијални губитак протона праћен трансфером електрона са хидроксилних група ресвератрола на радикалске молекуле доводи до директне неутрализације ROS/RNS као и секундарних органских радикала и последично до прекидања оксидативних каскада и липидне пероксидације. Такође ресвератрол у реакцији са јонима метала, услед изражене хелирајуће активности, може супримирати продукцију хидроксил радикала и редуковати оксидативни стрес (Truong и сар., 2018). Индиректно антиоксидативно деловање

ресвератрола огледа се у инхибицији продукције реактивних врста супресијом активности митохондријалног ензимског комплекса III (Gambini и сар., 2015). Литературни подаци указују на то да антиоксидативна својства ресвератрола такође могу бити посредована активацијом Nrf2/ARE (енгл. *antioxidant response element*) сигналног пута помоћу PI3K/Akt зависаног механизма. Фосфорилација Nrf2 индукује његову транслокацију у једро где се везује за ДНК и активира транскрипцију гена одговорних за синтезу ензимских антиоксиданаса, као што су GST, SOD, CAT, GSH-Px (Gambini и сар., 2015; Truong и сар., 2018; Woo, 2019). Забележен је и утицај ресвератрола на одржавање нивоа глутатиона приликом индукованог оксидативног стреса, као и на смањење брзине оксидације Су_t с узроковане хидроксилним радикалом (Carrizzo и сар., 2013). Даље, инхибицију оксидативног стреса остварује и активацијом NAD⁺-зависних хистон деацетилаза, протеинских молекула који припадају класи сиртуина (SIRT - енгл. *silent information regulators*), одговорних за регулацију појединих сигналних путева који кординишу процесима транскрипције, апоптозе и енергетског метаболизма ћелије. Активација ових протеина супримира експресију NF-κB чиме се спречава транскрипција гена који регулишу апоптозу зависну од повећане продукције реактивних врста и посредно настанак оксидативног стреса (Truong и сар., 2018; Uddin и сар., 2021). Такође, путем активације SIRT1, ресвератрол инхибира апоптозу посредовану оксидативним стресом индукованим фактором некрозе тумора, TNF-α. Смањење оксидативног стреса индукованог TNF-α, ресвератрол остварује и инхибицијом активности NADPH оксидаза и продукције O₂⁻ и H₂O₂ (Carrizzo и сар., 2013). Антиинфламаторни ефекат ресвератрол остварује инхибицијом циклооксигеназе 2 (COX2) чија повећана активност током инфламаторних процеса утиче на формирање простагландина фаворизујући пролиферацију туморских ћелија (Meng и сар., 2021).

Наведена антиоксидативна и антиинфламаторна својства ресвератрола доприносе хемопревенцији, али и испољавању антитуморских ефеката овог полифенолног једињења који су последица супримирања оксидативних оштећења ДНК молекула и редукције пролиферативног капацитета туморских ћелија (Poschner и сар., 2019). Литературни подаци указују на изузетан антитуморски потенцијал ресвератрола према многобројним туморским ћелијама као што су ћелије тумора дојке, плућа, јетре, простате, панкреаса, желуца, дебелог црева и коже (Kuršvietienė и сар., 2016; Rauf и сар., 2018). Деловање ресвератрола усмерено је на интрацелуларне медијаторе заступљене у све три фазе канцерогенезе: иницијацију, промоцију и прогресију. Бројним *in vitro* истраживањима показано је да ресвератрол инхибицијом експресије антиапоптотских протеина и активацијом проапоптотских сигналних путева (PI3K, Akt, p53, NF-κB, Bcl-2, и Bax) супримира преживљавање ћелије тумора (**Слика 14**). Поред наведених, интрацелуларни циљни молекули ресвератрола у зависности од врсте туморских ћелија, могу бити и NO, циклооксигеназе, катепсина, каспазе, интерлеукини, циклини, тумор супресорни протеин p53, као и многи други транскрипциони фактори и регулатори ћелијског циклуса и апоптозе (Kuršvietienė и сар., 2016; de Sá Coutinho и сар., 2018; Salehi и сар., 2018; Poschner и сар., 2019). Такође је забележен и инхибиторни ефекат ресвератрола на ангиогенезу и активност матриксних металопроотеиназа, чиме супримира инвазију и метастазирање туморских ћелија у друга ткива (Shindikar и сар., 2016; Sun и сар., 2019).



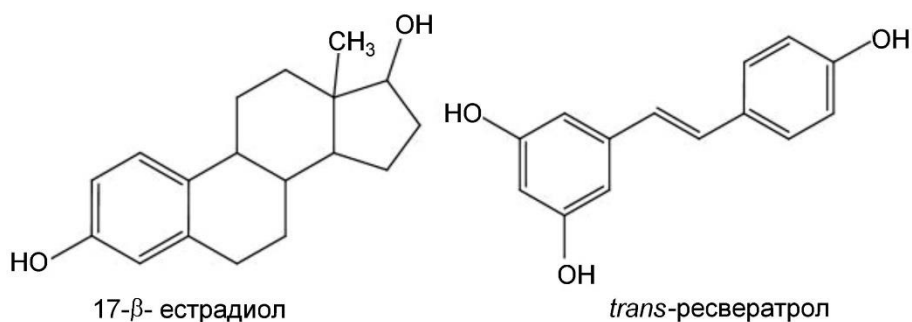
Слика 14. Шематски приказ могућих механизма антиоксидативног, антиинфламаторног и антитуморског деловања ресвератрола (модификовано из Zhou и сар., 2021)

Примена ресвератрола као адјуванса у комбинацији са различитим хемотерапеутицима, укључујући и цисплатину, омогућила је повећање сензибилизације туморских ћелија на деловање појединих хемотерапеутика, а тиме и њихове антитуморске ефикасности уз редукцију системске токсичности (Hamlaoui и сар, 2012; Sinha и сар., 2016; Sun и сар, 2019; Xiao и сар., 2019; Yang и сар, 2021). Многе студије указују на протективне ефекте ресвератрола према цисплатином индукованој органo-токсичности (Ince и сар., 2014; Özcan и сар., 2015; Darwish и сар, 2018; Ibrahim и сар., 2018; Lee и сар., 2020; Okafor, 2021). На основу литературних података ресвератрол се може употребљавати као:

- хемотерапеутски агенс пре оперативног захвата услед тенденције смањења волумена тумора повезане са његовим антипролиферативним и проапоптотским ефектима;
- адјуванс, у циљу смањења дисеминације тумора након операције;
- агенс у комбинованој хемотерапији у циљу побољшања антитуморских ефеката хемотерапеутика;
- превентивни агенс код људи са генетском предиспозицијом за развој тумора;
- протективни агенс који би елиминисао или ублажио нежељене ефекте хемотерапеутика (Salehi и сар., 2018)

Једно од специфичних места везивања ресвератрола представљају естрогени рецептори ER- α и ER- β , те је стога овај полифенол прилично испитиван у својству

фитоестрогена. Везивање ресвератрола за естрогене рецепторе омогућено је његовом хемијском структуром која је слична структури 17- β -естрадиола (Слика 15), а такође и синтетичког естрогена, диетилстилбестрола. У зависности од примењених доза и присуства 17- β -естрадиола, ресвератрол се може понашати као агонист или антагонист естрогена, односно може превенирати развој тумора и инхибирати естроген-зависну ћелијску пролиферацију и трансформацију или фаворизовати даљи развој тумора (Gambini и сар., 2015, Sinha и сар., 2016; Alamolhodaei и сар, 2017). У појединим *in vitro* студијама показано је да ресвератрол инхибицијом активности ароматазе, ензима укљученог у синтезу естрогена, може да редукује локализовану производњу естрогена лимитирајући пропацију тумора (Sinha и сар., 2016). Међутим, поред наведеног, показано је да ниске дозе ресвератрола, за разлику од високих доза, могу индуковати синтезу додатних нивоа стероидних прекурсора естрогена и уједно инхибирати конверзију активних стероидних облика у неактивне коњугате, доприносећи повећању нивоа активног естрогена, а тиме и прогресији тумора (Poschner и сар., 2019).



Слика 15. Упоредни приказ структурних формула 17- β -естрадиола и *trans*-ресвератрола (преузето из Gambini и сар., 2015)

Поред израженог антиоксидативног потенцијала, ресвератрол, сходно примењеној дози и времену излагања, рН вредности средине, као и старости организма, може испољити прооксидативно дејство. Наиме, аплициран у ниским концентрацијама, ресвератрол испољава антиоксидативне ефекте и редукује оксидативна оштећења ћелијских биомолекула, док у високим концентрацијама делује као прооксиданс и индукује оксидативна оштећења ћелије. Прооксидативни ефекти ресвератрола предложени су као могући механизам супресије развоја тумора и индукције апоптозе туморских ћелија путем активације ROS-зависних сигналних путева (Salehi и сар., 2018). Rodríguez-Enríquez и сар. (2019) су показали да ресвератрол индукује хиперпродукцију реактивних врста водећи до оксидативног стреса и индукције смрти туморских ћелија. Такође је показано да поред индукције смрти туморских ћелија, ресвератрол не остварује штетне ефекте на ћелије околних здравих ткива (Van Ginkel и сар., 2007). Међутим, документовани су и резултати који указују на ихибицију раста и индукцију апоптозе ћелија здравих ткива применом виших доза ресвератрола (Ferry-Dumazet и сар., 2002). Услед двофазног ефекта ресвератрола и опречних литературних података о његовом антиоксидативном/прооксидативном деловању, неопходна су даља истраживања којима би се одредила ефективна доза ресвератрола чијом применом би значајан антитуморски и антиоксидативни потенцијал овог полифенола био најефикасније искоришћен.



II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Услед повећане инциденце туморских болести, нежељених ефеката регистрованих хемотерапеутика који лимитирају њихову употребу, као и развоја резистенције туморских ћелија, постоји значајна потреба за проналажењем нових терапијских комбинација са антитуморским потенцијалом чије би дејство било високо селективно према ћелијама тумора, са редукованим токсичним ефектима на здраве ћелије и ткива. Истраживања су такође усмерена и ка употреби различитих природних биоактивних једињења као могућих протективних агенаса чије би дејство уједно било усмерено и на супресију развоја тумора.

Новосинтетисани и окарактерисани Pt(IV) комплекси са прекурсорима бидентатног *N,N'*-лиганда, *O,O'*-диалкил естрима (алкил = етил, пропил, бутил) етилендиамин- *N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) сирћетне киселине (Pt(IV) eddba комплекси), испољили су израженије цитотоксично дејство од цисплатине према CLL ћелијама (Dimitrijević и сар., 2013) те су стога издвојени за даљу евалуацију њихових биолошких ефеката. Увидом у доступне литературне податке, један од могућих механизма токсичности цисплатине и њених деривата је нарушавање редокс хомеостазе ћелија индуковањем оксидативног стреса.

Предмет научних истраживања ове студије је евалуација антитуморске активности новосинтетисаних Pt(IV) комплекса и ресвератрола, биљног полифенола, као и њихових комбинованих ефеката према две хумане ћелијске линије хуманих тумора, тумора дојке (MDA-MB-231) и тумора плаценте (JEG-3). Основни циљ студије је поређење антитуморских ефеката нових Pt(IV) комплекса и селекција једињења са снажнијим антитуморским деловањем у односу на цисплатину. Такође, истраживања ове студије обухватају и процену потенцијалне протективне улоге ресвератрола у оштећењима здравих хуманих фибробласта (MRC-5) и циљних органа пацова, индукованих неселективним деловањем наведених једињења.

Постављене су следеће хипотезе:

- Новосинтетисани Pt(IV) комплекси са естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) ацетата могу испољити снажнији антитуморски потенцијал у поређењу са цисплатином;
- Ресвератрол као полифенол са познатим антитуморским својствима може појачати цитотоксичне ефекте испитиваних деривата цисплатине током њиховог комбинованог деловања према различитим туморским ћелијским линијама;
- У поређењу са цисплатином, употреба Pt(IV) комплекса у лечењу малигнитета може имати слабије токсичне ефекте на здрава ткива;

- Примена ресвератрола у одабраној дози може заштитити здрава ткива оштећена услед потенцијалног неселективног токсичног дејства Pt(IV) комплекса.

У складу са основним циљем и радним хипотезама студије, постављени су следећи циљеви:

- Процена потенцијалних антипролиферативних ефеката испитиваних супстанци у *in vitro* условима према хуманим ћелијским линијама тумора дојке (MDA-MB-231), плаценте (JEG-3) и здравих фибробласта плућа (MRC-5), помоћу МТТ (мерење вијабилности ћелија) есеја и антимигранторних ефеката према наведеним туморским ћелијским линијама применом Transwell (мигранторни потенцијал ћелија) есеја;
- Евалуација цитотоксичних ефеката испитиваних третмана према туморским и здравим ћелијским линијама путем одређивања нивоа оксидативног стреса мерењем параметара редокс статуса (продукције реактивних врста кисеоника и азота, и концентрације редукованог и оксидованог глутатиона)
- Спровођење *in vivo* акутних третмана на пацовима и одређивање ефеката испитиваних супстанци на системску хомеостазу организма преко хематолошких и биохемијских параметара у крви и серуму третираних пацова: број еритроцита, леукоцита и тромбоцита, хемоглобин, хематокрит, просечни волумен еритроцита, триглицериди, холестерол, глукоза, албумини, тотални протеини, билирубин, аланин трансминаза, аспартат трансминаза, алкална фосфатаза, гама глутамил трансфераза, креатинин, уреа; као и утврђивањем промене укупне тежине експерименталних животиња и промене у тежини одабраних органа након третмана;
- Евалуација токсичних/протективних ефеката испитиваних супстанци мерењем параметара оксидативног стреса у одабраним здравим ткивима експерименталних животиња (продукције реактивних врста кисеоника и азота, липидних пероксида и активности ензимских и неензимских компоненти AOS-a);
- Евалуација утицаја испитиваних супстанци на морфолошке промене ткива јетре и бубрега третираних пацова хистопатолошким анализом.



III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања *in vitro*, који је захтевао стерилне услове рада, као и *in vivo* експерименти, реализовани су у Лабораторији за молекуларну биологију и физиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

1. Хемикалије и реагенси

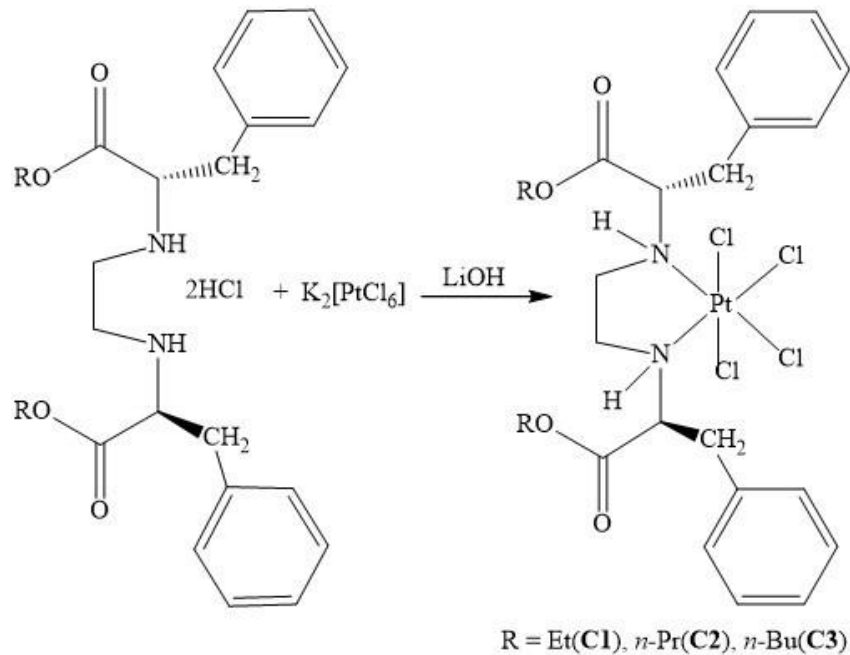
Хемикалије и реагенси коришћени током израде експеримената набављени су од неколико различитих произвођача, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Serva (Heidelberg, Germany) и Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Цисплатина (cis-Diammineplatinum(II) dichloride) је набављена од Sigma-Aldrich а ресвератрол од Abcam (Cambridge, UK). Све хемикалије и реагенси били су највишег комерцијално доступног степена чистоће.

Платина(IV) (Pt(IV)) комплекси, добијени у чврстом стању од др Верице Јевтић, синтетисани су у Лабораторији за неорганску хемију, Института за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Коришћена су три новосинтетисана Pt(IV) комплекса окарактерисана као Pt(IV) комплекси са одређеним естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-дибензил) ацетата:

1. Pt(IV) комплекс 1 (C1)- тетрахлоридо(*O,O'*-диетил-етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-дибензил) ацетат)-платина(IV), [PtCl₄(det-*S,S*-eddba)]
2. Pt(IV) комплекс 2 (C2)- тетрахлоридо(*O,O'*-дипропил-етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-дибензил) ацетат)-платина(IV), [PtCl₄(dpr-*S,S*-eddba)]
3. Pt(IV) комплекс 3 (C3)- тетрахлоридо(*O,O'*-дибутил-етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-дибензил) ацетат)-платина(IV), [PtCl₄(dbu-*S,S*-eddba)]

Комплекси су синтетисани у реакцији калијум-хексахлороплатината са одређеним естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-дибензил) ацетата према процедури коју су описали Dimitrijević и сар. (2013) (Слика 16).



Слика 16. Шематски приказ припреме $[PtCl_4(R_2-S,S-eddba)]$ комплекса

2. Ћелијске линије као модел систем

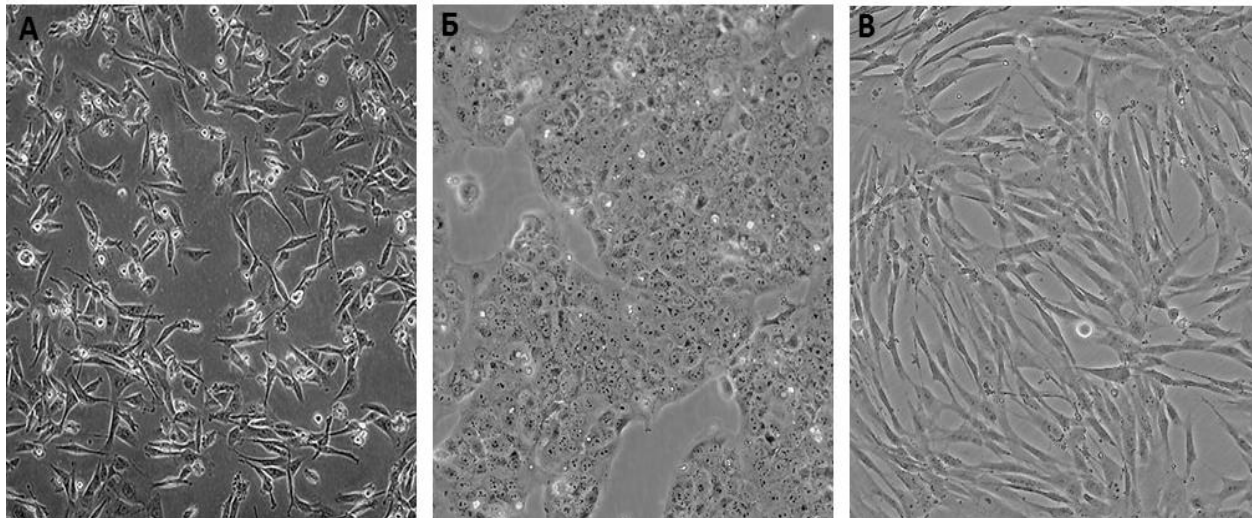
Свака новосинтетисана супстанца са потенцијалним антитуморским деловањем мора проћи низ преклиничких испитивања која између осталог подразумевају евалуацију њихових ефеката у *in vitro* условима на различитим ћелијским линијама. Култивисање ћелија се спроводи у строго контролисаним условима који обезбеђују оптималну средину за раст и развој ћелија најсличнију средини из које су ћелије потекле. Примарни услов за адекватно гајење ћелија је спречавање контаминације другим микроорганизмима која се постиже коришћењем адекватно стерилисаног посуђа и прибора за рад и стерилисањем радних површина 96% етанолом и UV лампом. Свака манипулација ћелијама обавља се у ламинарној комори са обезбеђеном вертикалном циркулацијом ваздуха преко филтера за његово пречишћавање, чиме се такође смањује могућност контаминације.

Током трајања експеримената ћелије су култивисане у стерилним фласковима (T-25 и T-75 cm²) у хранљивом медијуму DMEM (енгл. *Dublecco's Modified Eagle's Medium*) са додатком 10% FBS (енгл. *Fetal Bovine Serum*) и комбинације антибиотика (100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина). Параметри окружења, прецизно дефинисани и подешени у инкубатору, подразумевали су влажну атмосферу, 5% концентрацију CO₂ и оптималну температуру од 37 °C.

2.1. Коришћене ћелијске линије и методе манипулације

Експерименталне модел системе коришћене у оквиру *in vitro* дела дисертације представљале су три имортализоване адхерентне ћелијске линије набављене од енгл. *American Type Culture Collection* (ATCC) (Слика 17):

- MDA-MB-231, ћелијска линија изолована из хуманог тумора дојке. Ове ћелије имају епителну морфологију и врло изражен инвазивни потенцијал и прогресиван раст. Троструко су негативне јер не поседују рецепторе за естроген, прогестерон и HER-2.
- JEG-3, ћелијска линија хуманог хориокарцинома (тумор плаценте) изолована из плаценталног ткива. Ове ћелије имају епителну морфологију, изражен миграторни и инвазивни потенцијал и експримиране гене за hCG, хумани плацентални лактоген (hPL) и прогестерон.
- MRC-5, ћелијска линија је имортализована адхерентна ћелијска линија изолована из здравих хуманих фибробласта плућа. Одликује их вретенаст облик као и способност брзог мултиплицирања.



Слика 17. Морфолошки изглед А) MDA-MB-231; Б) JEG-3; В) MRC-5 ћелија
(преузето са: <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

➤ **Одмрзавање ћелија:** криовајлице са ћелијама су смештене у специјализоване контејнере са течним азотом који обезбеђује ниску температуру од $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и чувају се дубоко замрзнуте у медијуму за криопрезервацију чији су састојци 20% FBS и 5% DMSO (диметил-сулфоксид). Услед потребе експеримената одмрзава се криовајлица у којој се налази садржај запремине 1 mL. С обзиром на токсичност медијума за криопрезервацију, корак одмрзавања је неопходно брзо урадити и ћелије ресуспендовати у 5 mL медијума, након чега се ћелијска суспензија центрифугира (1200 rpm/10 min). Супернатант се аспирира док се ћелијски талог ресуспендује у свежем хранљивом медијуму и целокупан садржај се засејава у $T-25\text{ cm}^2$ фласк. Након 24 h медијум се мења свежим (Mazur, 1970).

➤ **Трипсинизација и пасажирање ћелија:** када се ћелије у култури намноже и достигну конфлуентност од 80-90%, услед недостатка хранљиве супстанце из медијума, потребно их је пасажирати у нов фласк и при томе смањити њихову концентрацију (Freshney, 1987). Адхерентност ових ћелија подразумева њихову способност пријањања и формирања веза са дном фласка у коме се гаје помоћу адхезионих протеина. Да би се ћелије пасажирале, неопходно је прекинути адхерентне везе са подлогом као и међућелијске везе, а то се постиже трипсинизацијом. Трипсинизација се спроводи са 1 или 2 mL (у зависности од димензије фласка) 0.25% трипсина у претходно испраним ћелијама са 1 mL истог. Оптимално време деловања трипсина, у оквиру кога се ћелије одлепе са подлоге и бивају слободне у суспензији, је 3-5 минута након чега се у суспензију додаје свеж медијум који неутралише дејство трипсина и разређује концентрацију ћелија. Пасажирањем ове суспензије у нов фласк у одређеној запремини са додатком свежег медијума постиже се континуирано гајење ћелија у култури.

➤ **Одређивање броја ћелија:** број ћелија је одређиван применом боје трипан плаве (енгл. *Trypan Blue Solution*). Тест се базира на способности боје да продре у цитоплазму ћелија са оштећеном мембраном (мртве ћелије) и обоји ћелијски садржај чиме су овакве ћелије видљиве под микроскопом као плаво обојене за разлику од живих које остају необојене и јасно су ограничене неоштећеном мембраном. За потребе експеримената броје се само вијабилне ћелије. Ћелијска суспензија се са трипан плавом бојом меша у односу 1:1 након чега се 20 μL смеше налива на хемоцитометар у оквиру кога се налазе посебне Neubauer-ове коморе за бројање ћелија. Ћелије су детектоване под светлосним инвертним микроскопом и бројане у пет различитих квадрата површине 0.0003 mm^2 . Из добијеног броја ћелија у оквиру пет квадрата прерачунава се средња вредност која се поред разблажења и димензије коморе узима у обзир за одређивање броја ћелија по милилитру суспензије.

Број ћелија/mL = средња вредност броја ћелија из пет квадрата \times разблажење $\times 10^4$ (корекциони фактор - дубина коморе и запремина у 1 mL)

2.2. Третмани *in vitro*

Испитиване супстанце у 500 μM концентрацији (шток) су растваране у 0.1% DMSO (v/v) разблаженом помоћу медијума за гајење ћелија. Стабилност цисплатине растворене у 0.1% DMSO-у праћена је снимањем UV-vis спектра на Perkin–Elmer Lambda 35 спектрометру. С обзиром да је шток коришћен за серијско разблаживање којим су добијане ниже концентрације супстанци коришћене током израде експеримената (почетна највиша концентрација била је 250 μM), концентрација DMSO-а у раствору је додатно опадала пропорционално размери разблажења. Финална концентрација DMSO-а била је значајно нижа од 0.1% и као таква потпуно нетоксична за ћелије. Сходно томе нетретирани (контролне) ћелије служиле су као референтна вредност у поређењу са испитиваним третманима.

У експериментима су коришћени како појединачни третмани тако и комбиновани третмани одабрани на основу резултата добијених применом појединих есеја. Појединачни третмани су били следећи:

- Цисплатина (CP) – коришћена као референтни цитостатик
- Новосинтетисани Pt(IV) комплекс C1
- Новосинтетисани Pt(IV) комплекс C2
- Новосинтетисани Pt(IV) комплекс C3
- Ресвератрол (Res)

Након серије одрађених експеримената селектовано је неколико нижих доза које су аплициране у комбинованим третманима, и то комбинације ресвератрола са одабраним комплексима. Третмани су спроведени као три независна експеримента на све три ћелијске линије, у зависности од есеја, у периоду трајања инкубације од 24 и/или 72 h .

2.2.1. Појединачни и комбиновани третмани

Антипролиферативни потенцијал испитиваних супстанци одређиван је применом МТТ теста на MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијске линије. Ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 бунарића (1×10^5 ћелија по бунарићу) и остављене у инкубатору на 24 h на 37 °C да би адхерирале на подлогу. Након тога, ћелије су третиране са 100 μ L раствора испитиваних супстанци у растућим концентрацијама (0.1, 1, 10, 25, 50, 100, и 250 μ M), док је нетретираним (контролним) ћелијама наливен свеж медијум, и враћене су на инкубацију у трајању од 24 и 72 h.

Антипролиферативни потенцијал комбинованих третмана одређиван је применом МТТ теста на све три ћелијске линије. Након засејавања ћелија у микротитар плоче са 96 бунарића (1×10^5 ћелија по бунарићу) и 24 h инкубирања, ћелије су третиране растворима два одабрана комплекса (C1 и C3) у три ниже концентрације (1, 10 и 25 μ M) појединачно и комбиновано са ресвератролом у концентрацији од 25 μ M (Wang и сар., 2008). Ћелије су овим третманима биле изложене 72 h.

Миграторни потенцијал MDA-MB-231 и JEG-3 ћелија након третмана испитиваних супстанци одређиван је применом Transwell есеја. Ћелије су третиране раствором комплекса C1 у 10 μ M концентрацији као појединачним третманом и раствором комплекса C1 у 10 μ M концентрацији комбинованим са ресвератролом у 25 μ M концентрацији у два различита времена излагања (24 и 72 h).

Концентрација параметара редокс статуса одређивана је у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама применом различитих есеја. Ћелије су третиране растворима цисплатине и комплекса C1 у 10 μ M концентрацијама као појединачним третманима и раствором комплекса C1 у 10 μ M концентрацији комбинованим са ресвератролом у 25 μ M концентрацији у два различита времена излагања (24 и 72 h).

2.3. Испитивање ефеката третмана на вијабилност, цитотоксичност, миграторни потенцијал и редокс статус ћелија

2.3.1. Испитивање вијабилности ћелија

За процену вијабилности ћелија и одређивање потенцијалних антипролиферативних ефеката испитиваних супстанци, коришћен је МТТ колориметријски тест који се заснива на детекцији формазана произведеног само у живим ћелијама. Интензитет боје може се квантификовати на ELISA читачу за микротитар плоче (ELISA reader Optic System RT2100-C) на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$ и директно је пропорционалан количини вијабилних ћелија. Након периода излагања испитиваним супстанцама, медијум је замењен са $100 \mu\text{L}$ свежег медијума допуњеног са $25 \mu\text{L}$ МТТ-а (3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид – жуто обојена тетразолијумова со) (финална концентрација 5 mg/mL), а затим су ћелије инкубирани на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ током четири сата. Боја која се развија потиче од редукције тетразолијумове соли у љубичасто обојене кристале формазана у живим ћелијама деловањем митохондријалних редуктаза. Обојени кристали формазана растворени су додавањем $150 \mu\text{L}$ DMSO-а након аспирирања медијума (Mosmann, 1983). Ћелије које нису биле третиране служиле су као контрола. Процент ћелијске вијабилности добијен је као однос апсорбанци третираних ћелија и апсорбанци контролних ћелија помножен са 100.

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = \frac{A_{\text{третиране ћелије}}}{A_{\text{контролне ћелије}}} \times 100\%$$

На основу процената вијабилности ћелија које су третиране испитиваним супстанцама у различитим концентрацијама а помоћу CalcuSyn софтвера (CalcuSyn, BIOSOFT, Cambridge, UK) преко дозно зависне криве, добијена је IC_{50} вредност за сваку испитивану супстанцу. IC_{50} вредност, која показује цитотоксични ефекат, дефинисана је као концентрација испитиваних супстанци која инхибира раст ћелија за 50% у поређењу са контролним ћелијама.

2.3.2. Испитивање миграторног потенцијала ћелија

Да би се утврдио утицај испитиваних супстанци на покретљивост (миграторни потенцијал) MDA-MB-231 и JEG-3 ћелија, коришћен је Transwell тест (Chen, 2005). Принцип методе заснива се на способности ћелија да прођу кроз поре поликарбонатне мембране ($8 \mu\text{m}$ пречник поре; Greinerbio-one, Switzerland) које се налазе на дну коморица за миграцију. Коморице за миграцију смештају се у плоче са 24 бунарића непосредно пре постављања теста. После периода излагања испитиваним супстанцама, ћелије су трипсинизоване, ресуспендоване у DMEM-у са 10% FBS-ом и засејане ($500 \mu\text{L}$ ћелијске суспензије) у коморице са мембранским дном у концентрацији од 1×10^5 ћелија по бунарићу. Доње коморе (плоче са 24 бунарића) испуњене су са $750 \mu\text{L}$ DMEM-а са 10% FBS-ом, коме је у зависности од третмана додат комплекс C1 у концентрацији од $10 \mu\text{M}$ или комбинација $10 \mu\text{M}$ комплекса C1 и $25 \mu\text{M}$ ресвератрола, док су коморе контролних ћелија садржале само DMEM-а са 10% FBS-ом. После 6 h инкубације на $37 \text{ }^\circ\text{C}$, ћелије су три пута испране PBS-ом и затим фиксиране са 4% параформалдехидом 20 минута на собној температури. Након фиксације, преостале ћелије са горњег слоја мембране уклоњене су лаганим брисањем

памучним штапићем, док су ћелије које су прешле на доњу страну мембране наливене 0,1% кристал виолет бојом раствореном у 200 mM MES пуферу (pH = 6.0) (2-(N-morpholino) етан сулфонска киселина) и инкубирани 10 минута на собној температури. Мембране су пажљиво исечене жилетом и стављене у микротитар плочу где је додато 100 μL 10% HCl која раствара боју. Апсорбанца је очитана на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 595 \text{ nm}$. Процент (индекс) миграције изражен је као однос апсорбанце третираних и контролних ћелија помножених са 100.

$$\text{Индекс миграције} = \frac{A_{\text{третиране ћелије}}}{A_{\text{контролне ћелије}}} \times 100\%$$

2.3.3. Одређивање параметара редокс статуса ћелија

Параметри редокс статуса мерени су у ћелијском лизату добијеном разарањем ћелијских мембрана на различите начине, а у зависности од примењеног есеја. Након периода излагања испитиваним супстанцама, ћелије су трипсинизоване, испране у хладном PBS-у и финално ресуспендоване у запремини PBS-а у којој је концентрација ћелија подешена на $1 \times 10^6/\text{mL}$. Овако добијена ћелијска суспензија коришћена је за евалуацију наредних есеја. Разблажења узорака у току спровођења протокола узета су у обзир приликом прерачунавања концентрација.

2.3.3.1. Квантификација концентрације супероксид анјон радикала

Концентрација $\text{O}_2^{\cdot-}$ квантификована је колориметријски применом NBT-а (нитроблу-тетразолијум) који се у живим ћелијама редукује до нитроблу-формаза у присуству $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Auclair и Voisin, 1985). У реакцији редукције обојеност NBT-а се мења из жуте до тамно плаве боје (боја нитроблу-формаза). Претходно направљеном ћелијском суспензијом (1×10^6 ћелија/mL) наливене су микротитар плоче са 96 бунарића (100 μL по бунарићу) и додат је 0.1% NBT у запремини од 100 μL након чега су плоче инкубирани 45 минута на 37 °C. Боја развијена по завршетку инкубације растварана је додавањем 60 μL 2 M KOH и 60 μL DMSO-а након чега је апсорбанца очитавана на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$. Концентрација $\text{O}_2^{\cdot-}$ изражена је као μM NBT у 10^6 ћелија/mL, а добијена је дељењем очитаних апсорбанци са моларним коефицијентом екстинкције који за 1 $\mu\text{mol/mL}$ моноформаза износи $15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на 550 nm.

$$\mu\text{M NBT} = \frac{A}{15 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}}$$

A = апсорбанца; V_{tot} = укупна запремина раствора у бунарићу и V_{ex} = запремина ћелија са третманом.

2.3.3.2. Квантификација концентрације нитрита и водоник пероксида

Концентрација NO_2^- и H_2O_2 квантификована је колориметријски у ћелијском лизату добијеном разбијањем ћелијских мембрана ултразвучним сонификатором (серија од 10 ултразвучних удара од 20 kHz) на леду. Након излагања ултразвучним таласима, суспензија је центрифугирана (10000 rpm/20 min) да би се издвојио чист лизат без фрагмената ћелијских мембрана.

Одређивање концентрације NO_2^- као индикатора NO базирано је на диазотизационој реакцији у којој сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид и нитрити реагују, формирајући азотно једињење пурпурне боје (Green и сар., 1982). У микротитар плоче наливено је 50 μL по бунарићу претходно добијеног лизата ћелија третираних свим испитиваним супстанцама, али и серије узорака са познатим концентрацијама NaNO_2 (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.13 μM и 1.56 μM) због конструисања стандардне криве. У исте бунариће додато је 50 μL 1% сулфаниламидног реагенса раствореног у 5% фосфорној киселини након чега је следила инкубација од 10 min на собној температури. По истеку времена инкубирања, свим узорцима је додато 50 μL 0.1 % NED-а (N-1- нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса) и поново су инкубирани 10 минута без светлосног излагања. Интезитет пурпурне боје која се развила, детектован је на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$ и директно је пропорционалан концентрацији NO_2^- . Концентрација нитрита прерачуната је на основу добијене калибрационе криве и изражена је као μM у 10^6 ћелија/mL.

Концентрација H_2O_2 колориметријски је квантификована у узорцима лизата ћелија добијеног сонификацијом. Метода је заснована на способности H_2O_2 да у присуству пероксидазе рена оксидује фенол црвено (енгл. *Phenol Red*) (Pick и Keisari, 1980). У одређене бунариће микротитар плоче наливено је 50 μL ћелијског лизата испитиваних третмана, као и серије стандардних раствора познатих концентрација H_2O_2 (опсег 100 μM - 1.56 μM). Испитиваним узорцима и стандардима додато је 50 μL реакционе смеше која је садржала 0.28 mM *Phenol Red* и пероксидазу рена – HRPO тип II ензим (1 U/ml). Након инкубације од 60 min на 37 °C, развила се боја која је прочитана на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 600 \text{ nm}$. Концентрација H_2O_2 прерачуната је на основу добијене калибрационе криве и изражена је као μM у 10^6 ћелија/mL.

2.3.3.3. Квантификација концентрације редукованог и оксидованог глутатиона

Концентрација GSH и GSSG квантификована је колориметријски у ћелијском лизату добијеном разбијањем ћелијских мембрана излагањем ћелијске суспензије наизменичним циклусима ниске и високе температуре. Након подешавања бројности ћелија по mL PBS-а (1×10^6 ћелија/mL), суспензија ћелија је центрифугирана (2500 rpm/10 min/4 °C) и супернатант је замењен 2.25% сулфосалицилном киселином (4 °C, 1 mL сулфосалицилне/1 mL PBS-а). Ћелијске мембране су разаране помоћу 3 циклуса промене температуре спољашње средине (наизменично петнаестоминутно излагање ћелија температури од -80 °C и 37 °C). Остаци ћелијских мембрана су уклоњени центрифугирањем (2500 rpm/30 min/4 °C). Изолован супернатант – ћелијски лизат, коришћен је за одређивање концентрације GSH и GSSG.

Концентрација GSH/GSSG квантификована је колориметријски употребом методе заснованој на оксидацији GSH сулфидним реагенсом DTNB (5,5'-дитио-бис(2-

нитробензоева киселина) при чему се формира жуто обојен TNB (5'-тио-2-нитробензоева киселина) који у реакцији са GSH даје GS-TNB дисулфид (Baker и сар., 1990). У одређене бунариће микротитар плоче наливено је 20 μL хелијског лизата испитиваних третмана, као и серије стандардних раствора познатих концентрација GSH (од 100 μM до 1.56 μM). Испитиваним узорцима и стандардима додато је 160 μL 0.3 M Na_2HPO_4 и 20 μL DTNB-а раствореног у 1% натријум цитрату. Након инкубације од 10 минута на собној температури, апсорбанце су читаване на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 405 \text{ nm}$. Концентрација GSSG прерачунава се као разлика укупног и редукованог глутатиона, а мерена је додавањем GR која у присуству NADPH конвертује GSSG поново у редуковану форму глутатиона. Концентрације редукованог и оксидованог глутатиона прерачунате су на основу добијене калибрационе криве и изражене као μM у 10^6 хелија/mL.

3. Лабораторијски пацови као модел систем

Етички комитет за заштиту добробити експерименталних животиња Природно-математичког факултета у Крагујевцу, поступајући у складу са законом о добробити животиња („Службени гласник РС“, број 41/09) и према принципима Добре лабораторијске праксе, енгл. *European Council Directive* (86/609/EEC) и регулаторним прописима, одобрила је све експерименте на животињама спроведене у овој студији (Одлука број: 1-10/2017). Женке пацова соја Wistar albino набављене су од Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња Војномедицинске академије (ВМА), Београд, Србија. Старост јединки била је од 8 до 10 недеља а телесна маса кретала се од 200 до 250 g. Животиње су гајене у пластичним кавезима у виваријуму Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу током трајања експеримента. Пре аплицирања третмана, животиње су адаптиране на лабораторијске услове који су подразумевали константну температуру од $22 \pm 2^\circ\text{C}$, влажност ваздуха од 50 до 70% и дефинисан дневно/ноћни циклус са дванаесточасовном сменом. Храњене су комерцијалном брикетираним храном за глодаре (Ветеринарски завод Суботица, Србија) једном дневно у преподневним часовима, док им је приступ води обезбеђен *ad libitum*.

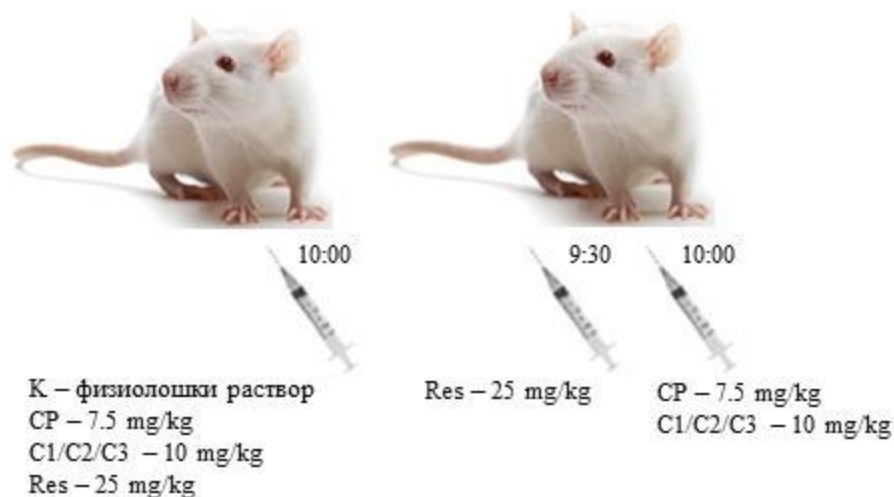
3.1. Третмани *in vivo*

Испитиване супстанце су растваране у DMSO-у разблаженом физиолошким раствором до финалне концентрације од 5% (v/v).

По адаптацији на лабораторијске услове, 60 јединки је насумично подељено у 10 група (6 животиња по групи). Након мерења тежине, животиње су третиране једном дозом интраперитонеално аплициране инјекције волумена 0.5 mL на следећи начин (Слика 18):

- **I група (K):** контрола - јединке третиране физиолошким раствором;
- **II група (CP):** позитивна контрола – јединке третиране цисплатином у концентрацији од 7.5 mg/kg телесне масе;
- **III група (C1):** јединке третиране комплексом C1 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе;
- **IV група (C2):** јединке третиране комплексом C2 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе;
- **V група (C3):** јединке третиране комплексом C3 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе;
- **VI група (Res):** јединке третиране ресвератролом у концентрацији од 25 mg/kg телесне масе;
- **VII група (Res+CP):** јединке третиране ресвератролом у концентрацији од 25 mg/kg телесне масе пола сата пре третмана цисплатином у концентрацији од 7.5 mg/kg телесне масе;
- **VIII група (Res+C1):** јединке третиране ресвератролом у концентрацији од 25 mg/kg телесне масе пола сата пре третмана са комплексом C1 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе;
- **IX група (Res+C2):** јединке третиране ресвератролом у концентрацији од 25 mg/kg телесне масе пола сата пре третмана са комплексом C2 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе;
- **X група (Res+C3):** јединке третиране ресвератролом у концентрацији од 25 mg/kg телесне масе пола сата пре третмана са комплексом C3 у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе.

У току експерименталног периода, праћен је унос хране за сваку животињу у свакој испитиваној групи. Аплициране дозе су одабране на основу доступних литературних података, као дозе (CP и Pt(IV) комплекса) које изазивају оксидативна оштећења појединих ткива пацова и доза (Res) са потенцијалним протективним дејством на индукована оштећења ткива (Do Amaral и сар., 2008; Ciftci и сар., 2011; Osman и сар., 2015; Вороја и сар., 2018).



Слика 18. Шематски приказ експерименталних група.

3.2. Жртвовање животиња и припрема узорака

Петог дана од аплицирања испитиваних супстанци, животиње су поново мерене, анестезиране етром и жртвоване брзом декапитацијом. Дисекција животиња вршена је на леду и том приликом издвојено је ткиво јетре и бубрега. Након испирања у физиолошком раствору (0.9% NaCl, 4 °C) ткива су измерена, део ткива је одмах фиксиран у 4% пуферизованом формалину због добијања узорака за хистопатолошку обраду, док је други део ткива замрзнут на -80 °C до следећих анализа. Крв је сакупљана у епрувете са и без антикоагуланса ради добијања серума и хемолизата.

3.2.1. Процесуирање крви

У микротубама са антикоагулансом сачувана је пуна крв из које су се одређивали хематолошки параметри. Серум у коме су одређивани биохемијски параметри, добијен је из узорака крви без примене антикоагуланса након центрифугирања (4000 rpm/10 min). Наведени параметри мерени су у биохемијској лабораторији „Medico lab Marković“ у Крагујевцу. За испитивање параметара оксидативног стреса и компоненти антиоксидативног одбрамбеног система коришћен је лизат еритроцита. Крв сакупљена у епрувете са антикоагулансом је центрифугирана (5000 rpm/10 min/4 °C). Плазма је издвојена а еритроцити су три пута испрани охлађеним физиолошким раствором. Након последњег циклуса испирања, на 1 mL суспензије еритроцита додато је 3 mL хладне дестиловане воде (dH₂O). Добијен лизат еритроцита чуван је на температури од -80 °C до следећих анализа.

3.2.2. Припрема ткива за хистопатолошку опсервацију

Да би се очувала морфолошка структура ћелија и ткива, свеже изолован део ткива јетре и један бубрег фиксирани су у 4% пуферизованом формалину током 24 h. Узорци

тквива су најпре испрани водом а затим пребачени у ткивни процесор (TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) где су дехидратисани растућим концентрацијама етанола (50%, 70%, 96%, 100%) и подвргнути стандардном протоколу за парафинску обраду ткива. Употребом микротоме (Leica RM2035, Austria) ткивни парафински блокови су фино исечени на делове дебљине 4-6 μm који су затим депарафинисани у ксилолу, рехидратисани у серији опадајуће концентрације етанола (100%, 96%, 70%), испрани у dH_2O , а затим обојени хематоксилин-еозином (Х&Е). Овако добијени препарати су накнадно анализирани на микроскопу (Zeiss, Axioskop40) и рачунару коришћењем софтвера AxioVs40 V 4.8.2.0 помоћу којих је вршена детекција хистопатолошких промена испитиваних ткива. Фотографије сваког узорка снимљене су на $100\times$ увећању. Хистопатолошке анализе ткива одрађене су у Институту за патологију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

3.2.3. Поступак хомогенизације ткива

За испитивање параметара оксидативног стреса и компоненти антиоксидативног одбрамбеног система коришћени су 10% (w/v) хомогенати јетре и бубрега. Свеже изолована ткива јетре и бубрега су мацерирана на леду након чега је вршена хомогенизација ткива (*IKA ULTRA-TURRAX T18 basic* (Germany)) у сахарозном пуферу који је садржао 0.25 М сахарозу, 0.05 М Tris, 1 mM EDTA (pH 7.4) у односу 1:10 (маса ткива : запремина растварача), три циклуса у трајању од по 15 секунди на леду. Хомогенати су додатно сонификовани (Bandelis Sonoplus), три циклуса од 10 ултразвучних удара од 20 kHz на леду и центрифугирани, 15000 g у току 15 min на 4 °C. Добијени супернатанти су чувани до будућих анализа на температури од -80 °C.

3.3. Евалуација хематолошких и биохемијских параметара

Евалуација хематолошких параметара вршена је у пуној крви употребом стандардних метода на аутоматизованом хематолошком анализатору (Horiba Medical ABX Micros 60, Japan). Мерени параметри обухватали су одређивање броја еритроцита (RBC - енгл. *Red Blood Cells*), леукоцита (WBC - енгл. *White Blood Cells*), лимфоцита (Lym - енгл. *Lymphocytes*), моноцита (Mon - енгл. *Monocytes*), гранулоцита (Gra - енгл. *Granulocytes*) и тромбоцита (Plt - енгл. *Platelet*), концентрације хемоглобина (Hb - енгл. *Hemoglobin*), хематокрита (Hct - енгл. *Hematocrit*), тромбокрита (Pct - енгл. *Platelet count*), просечног волумена еритроцита (MCV - енгл. *Mean Corpuscular Volume*), просечне концентрације хемоглобина (MCH - енгл. *Mean Cell Hemoglobin*), просечне концентрације хемоглобина по еритроциту (MCHC - енгл. *Mean Cell Hemoglobin Concentration*), расподеле еритроцита по волумену (RDW - енгл. *Red Cell Distribution Width*), просечног волумена тромбоцита (MPV - енгл. *Mean Platelet Volume*), расподела тромбоцита по волумену (PDW - енгл. *Platelet Distribution Width*).

Евалуација биохемијских параметара вршена је у серуму на аутоматском анализатору Roche Cobas® Mira (Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска) коришћењем стандардних дијагностичких колориметријских китова BioSystems (BioSystems S.A., Барселона, Шпанија) и Human GmbH (Wiesbaden, Germany). Мерени параметри обухватали су одређивање концентрације триглицерида (TG - енгл. *Triglycerides*), холестерола (Chl -

енгл. *Cholesterol*), глукозе (Gl - енгл. *Glucose*), протеина (TP – енгл. *Total proteins*), билирубина (Bl - енгл. *Bilirubin*), креатинина (Cre - енгл. *Creatinine*), урее и активности аланин аминотрансферазе (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST), алкалне фосфатазе (ALP), лактат дехидрогеназе (LDH) и γ -глутамил трансферазе (GGT).

Одређивање концентрације холестерола вршено је помоћу методе засноване на способности холестеролестеразе да хидролизује холестерол естре до холестерола и масних киселина. Детекција глукозе заснива се на способности глукозооксидазе да оксидише глукозу до глуконске киселине уз ослобађање водоник пероксида који даље у реакцији са фенолима уз присуство пероксидазе продукује хромоген хинонимин. Квантификација концентрације укупних протеина вршена је Биуретском колориметријском методом. Концентрација билирубина пропорционална је интезитету детектованог црвеног обојења које продукује азобилирубин настао као продукт реакције билирубина са диазотованом сулфанилном киселином. Концентрација креатинина такође је одређена на основу интезитета црвене боје Јановског комплекса продукованог у реакцији креатинина са пикринском киселином. Метода квантификације урее заснована је на реакцији амонијака (продукт разлагања урее) са α -кетоглутаратом. Реакција је катализована глутамат дехидрогеназом и приликом одигравања реакције долази до оксидације NADH у NAD⁺. Концентрација урее пропорционална је потрошњи редукованог NADH.

Одређивање активности тренасфераза у серуму је од дијагностичког значаја. Ови ензими се генерално синтетишу у ћелијама јетре и њихова повећана активност у серуму указују на поремећену функционалност јетре. AST је ензим чијом активношћу је каталисана реакција трансминације у којој се продукује оксалацетат и глутамат. Награђени оксалацетат се редукује NADH-зависном реакцијом до малата уз помоћ малат дехидрогеназе. Активност AST пропорционална је брзини оксидације NADH. Мерење активности ALT заснива се на способности овог ензима да приликом реакције трансминације продукује пируват који се даље редукује у лактат у присуству NADH, а уз помоћ ензима лактат дехидрогеназе. Активност ALT пропорционална је брзини оксидације NADH. ALP је ензим чијом активношћу се врши хидролиза естара органских фосфата, а као продукти реакције настају слободни фосфати. Концентрација слободних фосфата квантификује се спектрофотометријски уз помоћ амонијум молибдата. Мерење активности LDH заснива се на способности овог ензима да каталише реакцију редуције пирувата до лактата у присуству NADH. Активност LDH пропорционална је брзини оксидације NADH. GGT је ензим који катализује реакцију транспептидације, односно пренос γ -глутамил групе на глицил-глицин који се користи као акцептор. Продукт ове реакције је L- γ -глутамил глицилглицин и 5-амино-2-нитробензоева киселина чијом се спектрофотометријском квантификацијом индиректно мери активност GGT.

3.3.1. Квантификација концентрације хемоглобина у лизату еритроцита

Концентрација хемоглобина квантификована је употребом Драбкинове методе (Drabkin и Austin, 1935) засноване на оксидацији хемоглобина фероцијанидом у метхемоглобин који даље у реакцији са калијум цијанидом даје обојено једињење цијанметхемоглобина.

У 2.5 mL Драбкиновог реагенса додато је 10 μ L хемолизата и после мешања на Вортекс мешалици узорци су инкубирани 15 минута на собној температури заштићени од утицаја светлости. Након периода инкубирања прочитана је апсорбанца на спектрофотометру

(UV/vis, Jenway 6105, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) на таласној дужини $\lambda = 545$ nm.

Концентрација хемоглобина добијена је на основу очитане апсорбанце помножене са 36.77 и изражена је као g% (g Hb/100 mL крви).

3.3.2. Квантификација концентрације протеина у ткивним узорцима

Концентрација протеина одређивана је методом по Lowry-ју (Lowry и сар., 1951). Ова метода примарно се заснива на биуретској реакцији у којој се купри јони (Cu^{2+}) у реакцији са пептидним везама протеина (у алкалној средини) редукују у купро јоне (Cu^+) а купро јони потом са протеинима граде комплекс Cu -протеин, након чега следи реакција Folin-Ciocalteu (фосфомолибденско-фосфоволфрамског) реагенса са тирозином и триптофаном, аминокиселинама из насталих комплекса, у којој се развија плаво обојење.

У 50 μL испитиваних узорака додато је 1.5 mL реакционе смеше у чији састав су улазила следећа једињења: 2% Na_2NO_3 , 0.06 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 0.09 M K, Na-тартарат. Након инкубације од 15 минута на собној температури, узорцима је додато 0.3 mL Folin-Ciocalteu реагенса. После 30 минута инкубирања спектрофотометријски је очитана апсорбанца на таласној дужини $\lambda = 500$ nm.

Концентрација протеина је прерачуната на основу калибрационе криве која је одрађена са серијом раствора албумина говеђег серума (BSA - *Bovine Serum Albumin*) финалних концентрација од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и изражена је у $\mu\text{g}/\text{mL}$ хомогената.

3.3.3. Одређивање параметара редокс статуса

Концентрације испитиваних реактивних врста кисеоника и азота квантификоване су у хемолизату и хомогенатима јетре и бубрега. За екстракцију поменутих параметара у 200 μL хемолизата/хомогената додато је 100 μL 3 M PCA (перхлорна киселина) и 400 μL 20 mM EDTA а затим је смеша остављена на леду 15 минута. Након екстраховања узорци су центрифугирани (10000 rpm/5 min/4 °C), а затим је супернатант неутрализован са 2 M K_2CO_3 .

Екстракција LPO вршена је у узорцима хемолизата и хомогената јетре и бубрега. У 300 μL хемолизата/хомогената додато је 100 μL 40% TCA (трихлорсирћетна киселина) и узорци су остављени на леду 15 минута, након чега је следило центрифугирање (10000 rpm/10 min/4 °C). Добијени супернатант је коришћен за квантификовање концентрације LPO.

Екстракти за квантификовање концентрације GSH и GSSG из хемолизата добијени су применом преципитационог раствора (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA и 30 g NaCl растворених у 100 mL dH₂O). У 100 μL хемолизата додато је 400 μL 0.1% EDTA и 750 μL преципитационог раствора. Након екстракције у трајању од 15 минута на леду, узорци су центрифугирани (10000 rpm/5 min/4 °C). Екстракција GSH и GSSG из хомогената ткива јетре и бубрега вршена је додавањем 125 μL 10% сулфосалицилне киселине у 250 μL хомогената након чега су узорци центрифугирани (10000 rpm/5 min/4 °C). Добијени супернатант је коришћен за даље анализе.

Разблажења узорака у току спровођења протокола узета су у обзир приликом прерачунавања концентрација мерених параметара.

3.3.3.1. Квантификација концентрације супероксид анјон радикала

Квантификовање концентрације $O_2^{\cdot-}$ у узорцима одрађено је применом методе (Auclair и Voisin, 1985) засноване на редукцији жутог NBT-а до плаво обојеног нитроблу-формаза на као мере продукције $O_2^{\cdot-}$ у хемијским и биолошким системима.

190 μL реакционе смеше састављене од 50 mM TRIS-а, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NBT-а и 0.1 mg/mL гелатина (pH 8.6) сипано је у бунариће микротитар плоче. Након 5 минута од наливања плоча, апсорбанце (A_1) су читаване колориметријски на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$. У сваки од бунарића, реакционој смеши додато је 10 μL супернатанта (екстраховани узорци) и по истеку 5 минута читавана је апсорбанца (A_2) на истој таласној дужини.

Концентрација $O_2^{\cdot-}$ добијена је дељењем разлике читаних апсорбанци ΔA ($A_2 - A_1$) са моларним коефицијентом екстинкције који за 1 $\mu\text{mol/mL}$ моноформаза износи $15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на 550 nm и изражена је као nmol/mg Hb односно nmol/mg ткива.

$$\text{nmol NBT/mg} = \frac{\Delta A}{15 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}} \times F$$

ΔA = разлика апсорбанци; V_{tot} = укупна запремина раствора у бунарићу и V_{ex} = запремина узорка; F = фактор разблажења.

3.3.3.2. Квантификација концентрације водоник пероксида

Концентрација H_2O_2 колориметријски је квантификована у екстрактима узорака применом методе засноване на способности H_2O_2 да у присуству пероксидазе рена оксидује *Phenol Red* (Pick и Keisari, 1980).

У бунариће микротитар плоче наливено је 50 μL екстракта узорака и 50 μL реакционе смеше која је садржала 0.28 mM *Phenol Red* и пероксидазу рена – HRPO тип II ензим (1 U/mL). Након инкубације од 60 минута на температури од 37 °C читавана је апсорбанца на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Концентрација H_2O_2 прерачуната је на основу калибрационе криве формиране читавањем апсорбанци стандарда са познатим концентрацијама у опсегу 100 μM , - 1.56 μM . Добијена концентрација H_2O_2 изражена је као nmol/mg Hb односно nmol/mg ткива.

3.3.3.3. Квантификација концентрације нитрита

Концентрација NO_2^- (индикатор NO) квантификована је коришћењем методе Green-а и сарадника (1982) засноване на примарној оксидацији NO у NO_2^- који у реакцији са N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлоридом даје пурпурно обојено азотно једињење.

У бунариће микротитар плоче сипано је 50 μL екстракта узорака и 50 μL сулфаниламидног реагенса (1% сулфаниламид у 5% фосфорној киселини) и вршена је инкубација узорака на собној температури у трајању од 10 минута. Затим је узорцима додато 50 μL NED-а и враћени су на инкубацију у трајању од 10 минута без излагања светлости. Апсорбанца је читана на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$.

Концентрација нитрита прерачуната је на основу калибрационе криве формиране читавањем апсорбанци стандарда са познатим концентрацијама у опсегу 100 μM , - 1.56 μM и изражена је као nmol/mg Hb односно nmol/mg ткива.

3.3.3.4. Квантификација концентрације липидних пероксида

Концентрација LPO квантификована је у узорцима екстрахованим применом 40% TCA. Примењена метода (TBARS-есеј) заснива се на реакцији тиобарбитуратне киселине (TBA) са продуктима липидне пероксидације малондиалдехидима формирајући реактивне врсте тиобарбитуратне киселине (TBARS) (Rehncrona и сар., 1980).

У епендорфе је сипано 300 μL претходно добијеног екстракта и додато је 100 μL 0.6% TBA растворене у 0.3% NaOH. Узорци су вортексовани и инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 $^{\circ}\text{C}$. По завршеној инкубацији узорци су охлађени до собне температуре а затим је апсорбанца очитана на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Концентрација LPO добијена је дељењем очитаних апсорбанци са моларним коефицијентом екстинкције који износи $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 530 nm и изражена је као nmol/g Hb односно nmol/g ткива.

$$\text{nmol MDA/g} = \frac{A}{1.56 \times 10^5} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}} \times F \times 10^6$$

A = апсорбанца; V_{tot} = укупна запремина раствора у бунарићу и V_{ex} = запремина узорка; F = фактор разблажења.

3.3.3.5. Квантификација концентрације редукованог и оксидованог глутатиона

Концентрација GSH/GSSG одређиване су у претходно екстрахованим узорцима методом заснованој на оксидацији –SH групе глутатиона DTNB-ом (Baker и сар., 1990).

У 20 μL екстракта испитиваних узорака додато је 160 μL 0.3 M Na_2HPO_4 и 20 μL DTNB-а раствореног у 1% натријум цитрату. Микротитар плоча са узорцима је инкубирана 10 минута на собној температури након чега су очитаване апсорбанце на ELISA читачу на таласној дужини $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Концентрација GSH прерачунате су на основу добијене калибрационе криве формиране на основу вредности апсорбанци стандарда са познатим концентрацијама у опсегу 100 μM , - 1.56 μM . Додавањем GR која у присуству NADPH редукује GSSG у 2 GSH у протокол, добијена је вредност укупног глутатиона. С обзиром да укупни глутатион представља суму GSH и GSSG, одузимањем вредности GSH од вредности укупног глутатиона добијена је концентрација GSSG. Концентрације су изражаване као nmol/mg Hb односно nmol/mg ткива.

3.3.4. Одређивање активности ензима AOS-а

Одређивање активности ензима антиоксидативног одбрамбеног система вршено је у хемолизату и хомогенатима јетре и бубрега. Промене апсорбанци праћене су спектрофотометријски. Разблажења узорака у току спровођења протокола узета су у обзир приликом прерачунавања концентрација мерених параметара.

3.3.4.1. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Активност укупне SOD одређена је применом пирогалолске методе (Marklund и Marklund, 1974) засноване на способности SOD да инхибира спонтану аутооксидацију пирогалолола у алкалној средини.

Из узорака хемолизата у којима је одређивана активност SOD уклоњен је хемоглобин. У 0.25 mL хемолизата додато је 1.5 mL dH₂O и узорци су држани 30 минута на леду. Након тога додато је по 0.5 mL 96% етанола охлађеног на -20 °C, и такође охлађеног на -20 °C, 0.3 mL хлороформа, уз енергично мешање на вортексу. Узорци су враћени 10 минута на лед, а затим центрифугирани (7000 rpm/10 min/4 °C). Добијени супернатант коришћен је за одређивање активности SOD.

Промена апсорбанце је праћена спектрофотометријски током 4 минута на таласној дужини $\lambda = 420 \text{ nm}$. Реакциона смеша сачињена је од 100 μL Tris-HCl пуфера (1M Tris + 5 mM EDTA pH 8 подешена са 10% HCl), 20 μL узорка екстракта (за мерење активности ензима у ткивима коришћено је 10 μL узорка хомогената), 20 μL 10 mM пирогалолола у 10 mM HCl и допуњена са dH₂O до 1 mL. Слепа проба је мерена у одсуству узорка.

Активност ензима је прерачуната на основу промене апсорбанци узорака и слепе пробе по минути. Једна SOD јединица (U) је дефинисана као количина SOD која инхибира 50% аутооксидације пирогалолола и изражена је као U/mg Hb односно U/mg протеина.

$$U/mg = \frac{\Delta B/min - \Delta A/min}{\Delta B/min} \times 2 \times \frac{V_{tot}}{V_{ex}} \times F$$

ΔA = промена апсорбанце; ΔB = промена бланка; V_{tot} = укупна запремина раствора и V_{ex} = запремина узорка; F = фактор разблажења.

3.3.4.2. Одређивање активности каталазе

Активност САТ одређена је применом методе по Beutler-у (1982) засноване на разградњи H₂O₂ до H₂O и O₂, у присуству САТ као катализатора, при чему је пад апсорбанце услед потрошње H₂O₂ пропорционалан активности САТ у узорку.

Узорци хемолизата (10 μL) су непосредно пре мерења разређени 100 x додавањем 10 μL апсолутног етанола и dH₂O до 1 mL.

Промена апсорбанце је праћена спектрофотометријски током 3 минута на таласној дужини $\lambda = 230 \text{ nm}$. Реакциона смеша сачињена је од 50 μL Tris-HCl пуфера (1M Tris + 5 mM EDTA pH 8 подешена са 10% HCl), 15 μL разређеног узорка хемолизата, односно 10 μL узорка хомогената и 1 mL 10 mM H₂O₂ (претходно направљеног разблаживањем 30% H₂O₂ тако да апсорбанца раствора буде између 0.8 – 0.86 на таласној дужини од 230 nm).

Активност ензима је прерачуната на основу промене апсорбанци узорака по минути и милимоларног коефицијента екстинкције за H₂O₂ који износи 71 M⁻¹cm⁻¹ на 230 nm и изражена је као U/mg Hb односно U/mg протеина. Једна САТ јединица дефинисана је као количина ензима која редукује 1 μmol H₂O₂/min.

$$U/mg = \frac{\Delta A/min}{71 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{tot}}{V_{ex}} \times F$$

ΔA = промена апсорбанце; V_{tot} = укупна запремина раствора у бунарићу и V_{ex} = запремина узорка; F = разблажење приликом екстракције.

3.3.4.3. Одређивање активности глутатион пероксидазе

Активност GSH-Px одређена је применом методе (Maral и сар., 1977; Tamura и сар., 1982) засноване на повезаном дејству GSH-Px и GR. Редуkcијом H_2O_2 , коју каталише GSH-Px користећи GSH као косупстрат, настаје GSSG који се даље деловањем GR редукује назад у GSH уз оксидацију NADPH као коензима. Брзина оксидације NADPH у NADP⁺ пропорционална је активности GSH-Px.

У узорцима хемолизата, пре одређивања активности ензима, концентрација Hb је разблаживањем узорака подешена на 5 g%.

Промена апсорбанце је праћена спектрофотометријски током 3 минута на таласној дужини $\lambda = 340 \text{ nm}$. Реакциона смеша сачињена је од 25 μL хемолизата (5 g% Hb), 25 μL Драбкиновог реагенса, 800 μL dH₂O, 300 μL 1 mM NADPH (у 1% NaHCO₃), 150 μL 0.5 M K-PO₄ пуфера (pH 7.0), 150 μL 10 mM GSH, и 50 μL 0.03 M раствора t-бутил хидропероксида. Реакција је иницирана додавањем 10 μL GR (100 U/ml). Слепа проба је мерена у одсуству узорка.

Реакциона смеша за детектовање активности GSH-Px у хомогенатима ткива била је следећег састава: 10 μL хомогената, 750 μL dH₂O, 300 μL 1 mM NADPH (у 1% NaHCO₃), 50 μL 1 mM NaN₃, 50 μL 1 mM EDTA, 150 μL 0.5 M K-PO₄ пуфера (pH 7.0), 150 μL 10 mM GSH, и 50 μL 0.03 M раствора t-бутил хидропероксида. Реакција је иницирана додавањем 10 μL GR (100 U/ml). Слепа проба је мерена у одсуству узорка.

Активност ензима је прерачуната на основу промене апсорбанци узорака и следеће пробе по минути и моларног коефицијента екстинкције за NADPH ($6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на 340 nm), и изражена је као mU/mg Hb односно mU/mg протеина. Једна GSH-Px јединица дефинисана је као количина ензима која оксидује 1 μmol NADPH/min.

$$\text{mU/mg} = \frac{\Delta A/\text{min} - \Delta B/\text{min}}{6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}}$$

ΔA = промена апсорбанце; ΔB = промена бланка; V_{tot} = укупна запремина раствора и V_{ex} = запремина узорка.

3.3.4.4. Одређивање активности глутатион редуктазе

Активност GR одређена је применом методе (Glatzle и сар., 1974) засноване на реакцији редуkcије GSSG у GSH коју каталише GR, а при којој се врши оксидација коензима NADPH до NADP⁺. Брзина оксидације NADPH у NADP⁺ пропорционална је активности GR.

Промена апсорбанце је праћена спектрофотометријски током 3 минута на таласној дужини $\lambda = 340 \text{ nm}$. Мерење је вршено у узорцима хемолизата и хомогената ткива јетре и бубрега. Реакциона смеша сачињена је од 300 μL 0.5 M K-PO₄ пуфера (pH 7.4), 50 μL 4 mM GSSG, 50 μL 45 mM EDTA, 990 μL dH₂O и 10 μL узорка. Реакција је иницирана додавањем 50 μL 2 mM NADPH раствореног у 1% NaHCO₃. Слепа проба је мерена у одсуству узорка.

Активност ензима је прерачуната на основу промене апсорбанци узорака и слепе пробе по минути и моларног коефицијента екстинкције за NADPH ($6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на 340 nm) и изражена је као mU/mg Hb односно mU/mg протеина. Једна GR јединица дефинисана је као количина ензима која оксидује $1 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}$.

$$\text{mU/mg} = \frac{\Delta A/\text{min} - \Delta B/\text{min}}{6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}}$$

ΔA = промена апсорбанце; ΔB = промена бланка; V_{tot} = укупна запремина раствора и V_{ex} = запремина узорка.

3.3.4.5. Одређивање активности глутатион-S-трансферазе

Активност GST одређена је применом методе (Habig и сар., 1974) засноване на способности GST да катализује реакцију везивања 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) за сулфхидрилну -SH групу GSH при чему настаје CDNB-GSH коњугат. Пораст апсорбанце услед продукције CDNB-GSH коњугата пропорционалан је активности GST.

Промена апсорбанце је праћена спектрофотометријски током 3 минута на таласној дужини $\lambda = 340 \text{ nm}$. Мерење је вршено у узорцима хемолизата и хомогената ткива јетре и бубрега. Реакциона смеша сачињена је од $980 \mu\text{L dH}_2\text{O}$, $50 \mu\text{L } 30 \text{ mM CDNB}$ (у апсолутном етанолу), $300 \mu\text{L } 0.5 \text{ M K-PO}_4$ пуфера (pH 6.5) и $150 \mu\text{L } 20 \text{ mM GSH}$. Реакција је иницирана додавањем $20 \mu\text{L}$ узорка. Слепа проба је мерена у одсуству узорка.

Активност ензима је прерачуната на основу промене апсорбанци узорака и слепе пробе по минути и моларног коефицијента екстинкције за CDNB-GSH коњугат који износи $9.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на 340 nm, и изражена је као U/mg Hb односно U/mg протеина. Једна GST јединица дефинисана је као количина ензима која оксидује $1 \text{ nmol CDNB-GSH}/\text{min}$.

$$\text{U/mg} = \frac{\Delta A/\text{min} - \Delta B/\text{min}}{9.6 \times 10^{-3}} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ex}}}$$

ΔA = промена апсорбанце; ΔB = промена бланка; V_{tot} = укупна запремина раствора и V_{ex} = запремина узорка.

4. Статистичка обрада података

Сва мерења вршена су у трипликату. Добијени подаци су анализирани употребом SPSS for Windows, version 20 софтвера за статистичку обраду података (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) и изражени су као средња вредност \pm стандардна грешка (SEM – енгл. *Standard Error of the Mean*). Нормалност расподеле променљивих варијабли анализирана је применом Kolmogorov-Smirnov теста. За утврђивање значајности разлика између средњих вредности испитиваних група, примењена је једносмерна анализа варијансе (ANOVA) праћена употребом post-hoc тестова за вишеструко поређење података (Bonferroni/Dunnnett's, примењени у зависности од хомогености података и Least Significant Difference (LSD)). Као непараметарски тест коришћен је Kruskal-Wallis (за поређење разлика између испитиваних група) и Mann-Whitney U - тест (за поређење разлике између две одабране групе). Критеријум за статистичку значајност постављен је на $p < 0.05$. Резултати су приказани табеларно и графички док су резултати хистопатолошке анализе приказани у виду микрофотографија и табеларно.



IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Евалуација ефеката испитиваних једињења у *in vitro* условима

У оквиру ове студије испитивани су различити биолошки ефекти цисплатине, три новосинтетисана Pt(IV) комплекса са одређеним естрима етилендиамин-*N,N'*-*di-S,S*-(2,2'-дибензил) ацетата (C1 [PtCl₄(det-*S,S*-eddba)], C2 [PtCl₄(dpr-*S,S*-eddba)] и C3 [PtCl₄(dbu-*S,S*-eddba)]) и ресвератрола у *in vitro* и *in vivo* условима.

In vitro анализе обухватале су процену ефеката испитиваних једињења на хумане ћелијске линије тумора дојке (MDA-MB-231) и плаценте (JEG-3), а такође је испитан њихов ефекат на ћелијску линију здравих хуманих фибробласта плућа (MRC-5). Након евалуације дејстава серијских концентрација (од 0.1 μM до 250 μM) испитиваних супстанци, одабрана су једињења у концентрацијама 10 μM за комплекс са етил супституентом (C1) и 25 μM за ресвератрол, која су коришћена током даљих *in vitro* истраживања.

Добијени резултати *in vitro* експерименталног дела пружају увид у могући механизам деловања новосинтетисаних једињења, као и деловања комбинованог третмана ресвератролом и одабраним Pt(IV) комплексима на коришћене ћелијске линије.

1.1. Процена вијабилности ћелија и цитотоксични ефекат третмана (МТТ тест)

Процена потенцијалних антипролиферативних ефеката испитиваних супстанци вршена је применом МТТ теста (преко ћелијске вијабилности) на туморске ћелијске линије MDA-MB-231 и JEG-3 и на здравој ћелијској линији MRC-5. Ћелије су најпре третиране растућим концентрацијама (0.1, 1, 10, 25, 50, 100, и 250 μM) испитиваних супстанци у два временска интервала (24 h - краткотрајни и 72 h - дуготрајни третман). На основу добијених резултата одабране су концентрације и једињења коришћена у даљим истраживањима у виду комбинованих третмана.

Стабилност цисплатине у раствору који садржи одређену концентрацију DMSO-а као неопходног растварача испитиваних комплекса, одређивана је мерењем UV-vis спектра. Добијени UV-vis спектар цисплатине растворене у 0.1% раствору DMSO-а (v/v) у концентрацији од 500 μM , приказан је на **Графику 1**.

Поређењем спектра снимљених непосредно након растварања цисплатине у 0.1% раствору DMSO-а и спектра снимљених 72 h након растварања, евидентирана је стабилност цисплатине у раствору наведене концентрације DMSO-а. Добијени резултати UV-vis спектра цисплатине одговарају студији Lai и сар. (2018) у којој је цисплатина растворена у 0.9% раствору NaCl.

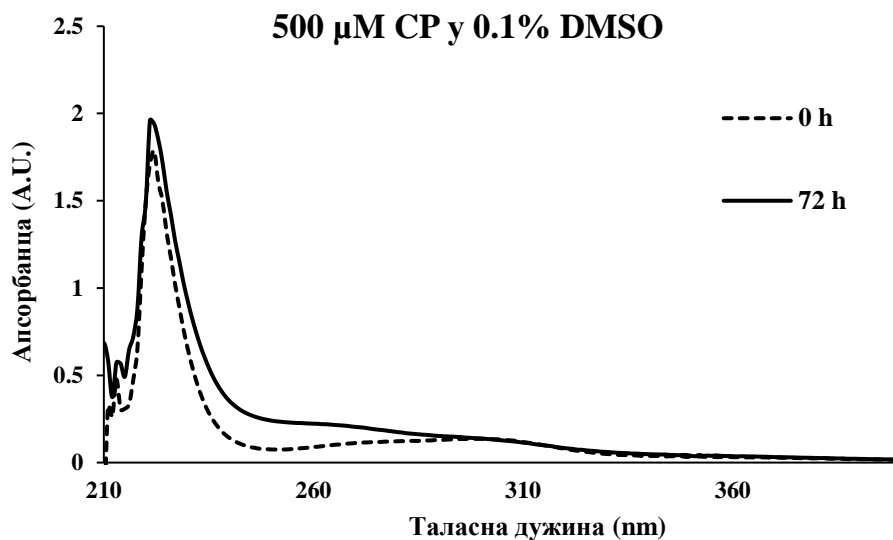


График 1. UV-vis спектар цисплатине растворене у 0.1% DMSO-у

1.1.1. Цитотоксичност третмана и вијабилност MDA-MB-231 ћелија

Ефекат испитиваних једињења на вијабилност MDA-MB-231 ћелија након периода излагања од 24 h и 72 h, приказан је на **Графику 2**.

На основу добијених резултата сва три испитивана комплекса (C1, C2, C3) испољила су значајно интензивнију инхибицију пролиферације MDA-MB-231 ћелија од CP након оба временска интервала у односу на нетретирани (контролне) ћелије. Услед интензивног смањења ћелијске вијабилности, која је била дозно и временски зависна, утврђено је да испитивана једињења поседују изражене антипролиферативне ефекте. Ниже концентрације испитиваних једињења (0.1 и 1 μ M) нису довеле до значајне инхибиције пролиферације MDA-MB-231 ћелија, док су више концентрације (25, 50, 100, 250 μ M) показале изузетно снажан антипролиферативни ефекат у односу на контролне ћелије након оба временска интервала излагања. Испитивана једињења аплицирана у 10 μ M концентрацији показала су значајан антипролиферативни ефекат према MDA-MB-231 ћелијама, посебно након дуготрајног третмана комплексом C1 (75.27% \pm 2.4 вијабилних ћелија) и комплексом C3 (28.69% \pm 0.95 вијабилних ћелија) у односу на контролу (100% вијабилних ћелија), док је C2 комплекс показао приближно исти ефекат као CP (80.75% \pm 4.35 вијабилних ћелија). Уједно, 10 μ M концентрација била је најнижа концентрација са показаним значајним антипролиферативним ефектом. Ресвератрол је такође утицао на вијабилност MDA-MB-231 ћелија значајно инхибирајући њихову пролиферацију приликом апликације виших концентрација и ефективније услед дуготрајног третмана. Најниже концентрације Res које су имале значајан антипролиферативни ефекат у односу на контролу (100% вијабилних ћелија) на ове туморске ћелије биле су 10 μ M (68.42% \pm 6.20 вијабилних ћелија) и 25 μ M (57.38% \pm 3.04 вијабилних ћелија).

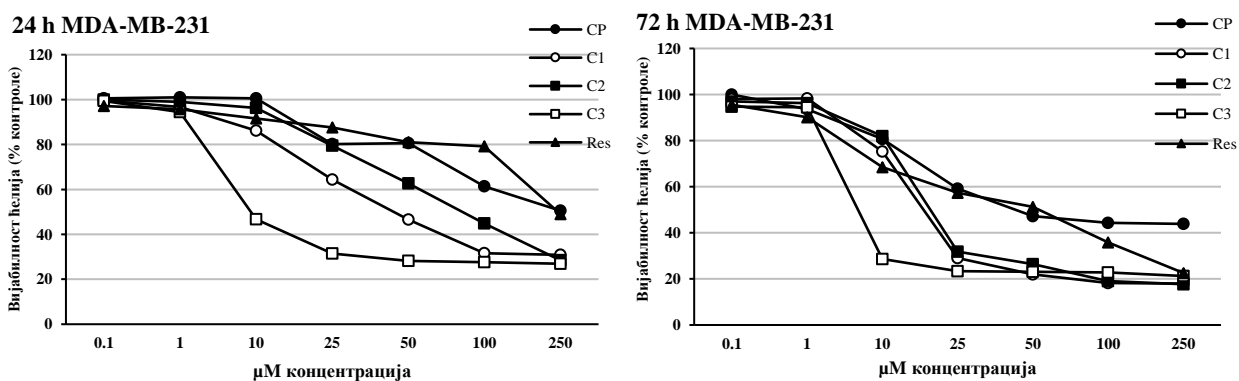


График 2. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност MDA-MB-231 ћелија након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка

Цитотоксични ефекти третмана изражени су преко IC_{50} вредности која представља концентрацију једињења која инхибира раст ћелија за 50% у односу на контролне ћелије. У Табели 3 приказане су IC_{50} вредности испитиваних једињења након краткотрајног и дуготрајног периода излагања MDA-MB-231 ћелија. Као што је показано, сва три нова Pt(IV) комплекса су испојила изузетно јачу цитотоксичну активност према MDA-MB-231 ћелијама у односу на CP. Сви третмани имали су интензивнију цитотоксичну активност након дуготрајног периода излагања. Најефикаснији у инхибицији пролиферације ових туморских ћелија био је комплекс C3, чија је вредност IC_{50} 3.9 пута нижа од IC_{50} вредности CP измерене након 72 h, док су комплекси C1 и C2 имали IC_{50} вредности ~ 2 пута ниже од IC_{50} вредности CP. Res није показао цитотоксичну активност према MDA-MB-231 након 24 h, док је након дуготрајног третмана његова IC_{50} вредност била 1.16 пута нижа од IC_{50} вредности CP измерене након 72 h.

Табела 3. Антипролиферативни ефекти, изражени као IC_{50} вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на MDA-MB-231 ћелије након 24 и 72 сата

		IC_{50} (μM)	
Ћелије/третмани		24 h	72 h
MDA-MB-231	CP	>250	45.51 ± 2.10
	C1	58.71 ± 2.53	22.51 ± 0.93
	C2	118.07 ± 4.41	23.25 ± 1.02
	C3	23.81 ± 2.08	11.65 ± 0.84
	Res	>250	39.12 ± 1.36

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка

1.1.2. Цитотоксичност третмана и вијабилност JEG-3 ћелија

Ефекат испитиваних једињења на вијабилност JEG-3 ћелија након периода излагања од 24 h и 72 h, приказан је на **Графику 3**.

На основу приказаних резултата сва три испитивана Pt(IV) комплекса испољила су значајно интензивнију инхибицију пролиферације JEG-3 ћелија од CP, након оба временска интервала излагања у односу на контролне ћелије. Изузетак су били комплекси C1 и C2, који у концентрацији од 10 μM , након дуготрајног третмана нису показали јачи антипролиферативни потенцијал од CP у односу на JEG-3 нетретиране ћелије.

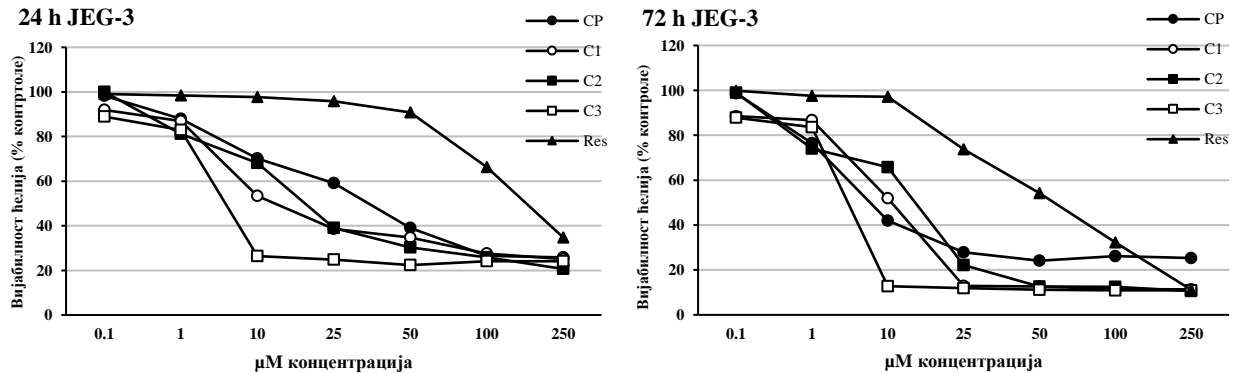


График 3. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност JEG-3 ћелија након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка

Ипак, испитивана једињења су показала дозу и временску зависност. Једина концентрација која није показала значајну инхибицију пролиферације JEG-3 ћелија била је 0.1 μM , док су остале концентрације (1, 10, 25, 50, 100, 250 μM) показале изузетно снажан антипролиферативни ефекат у односу на контролне ћелије након оба временска интервала излагања. Испитивана једињења аплицирана у 10 μM концентрацији (најнижа концентрација са приказаним изразито значајним антипролиферативним ефектом) интензивно су смањила вијабилност JEG-3 ћелија. Након 24 h третмана са наведеном концентрацијом једињења, забележене су следеће вредности ћелијске вијабилности: третман комплексом C1 смањило је ћелијску вијабилност на $53.42\% \pm 2.31$ вијабилних ћелија, третман комплексом C3 на $26.34\% \pm 0.81$ вијабилних ћелија, а третман CP $70.12\% \pm 6.98$ вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија) (третман комплексом C2 је имао приближно исти ефекат као CP). Након 72 h третмана са једињењима у концентрацији од 10 μM , забележене су следеће вредности ћелијске вијабилности: третман комплексом C3 смањило је ћелијску вијабилност на $12.78\% \pm 0.42$ вијабилних ћелија а третман CP $41.95\% \pm 2.10$ вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија). Комплекси C1 ($51.94\% \pm 3.35$ вијабилних ћелија) и C2 ($65.8\% \pm 6.7$ вијабилних ћелија) су након дуготрајног третмана показали слабији антипролиферативни ефекат од CP у наведеној концентрацији. Ресвератрол је такође утицао на вијабилност JEG-3 ћелија значајно инхибирајући њихову пролиферацију приликом апликације виших концентрација и ефективније услед дуготрајног третмана. Најнижа концентрација Res која је имала

значајан антипролиферативни ефекат у односу на контролу (100% вијабилних ћелија), на ове туморске ћелије, била је 25 μM (73.8% \pm 7.10 вијабилних ћелија).

Табела 4. Антипролиферативни ефекти, изражени као IC_{50} вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на JEG-3 ћелије након 24 и 72 сата

		IC_{50} (μM)	
		24 h	72 h
JEG-3	CP	27.86 \pm 2.41	16.66 \pm 1.32
	C1	16.38 \pm 1.03	4.64 \pm 0.50
	C2	18.05 \pm 1.17	10.02 \pm 0.61
	C3	5.14 \pm 0.98	2.64 \pm 0.2
	Res	>250	60.73 \pm 5.12

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка

У Табели 4 приказане су IC_{50} вредности испитиваних једињења након краткотрајног и дуготрајног третмана JEG-3 ћелија. Као што је приказано, сва три нова Pt(IV) комплекса су испољила изузетно јачу цитотоксичну активност на JEG-3 ћелије у односу на CP. Сви третмани имали су интензивнију цитотоксичну активност након дуготрајног третмана. Најефикаснији у инхибицији пролиферације ових туморских ћелија био је комплекс C3, чија је вредност IC_{50} 6.31 пута нижа од IC_{50} вредности CP измерене након 72 h. Комплекс C1 је такође манифестовао изузетно јаку цитотоксичност након дуготрајног третмана, забележена је IC_{50} вредност 3.59 пута нижа од IC_{50} вредности CP, док је IC_{50} вредност за комплекс C2 била 1.66 пута нижа од IC_{50} вредности CP. Res није показао цитотоксичну активност према JEG-3 ћелијама након 24 h, док је након дуготрајног третмана његов ефекат био слабији од ефекта CP.

Резултати приказани на Графику 2 и 3 и Табелама 3 и 4 указују на то да су JEG-3 ћелије сензитивније од MDA-MB-231 ћелија на испитивана једињења са Pt, док су MDA-MB-231 биле сензитивније на утицај ресвератрола у односу на JEG-3 ћелије.

1.1.3. Цитотоксичност третмана и вијабилност MRC-5 ћелија

Ефекат испитиваних једињења на вијабилност MRC-5 ћелија након периода излагања од 24 и 72 h, приказан је на **Графику 4**.

На основу добијених резултата сва три испитивана Pt(IV) комплекса испољила су значајно интензивнију инхибицију пролиферације MRC-5 ћелија од CP након оба временска интервала излагања у односу на нетретирание ћелије. И код ове ћелијске линије изузетак су били комплекси C1 и C2 који, у концентрацији од 10 μM , након дуготрајног третмана нису показали јачи антипролиферативни ефекат од CP у односу на нетретирание ћелије. Испитивана једињења су показала дозну и временску зависност. Концентрације које нису показале значајну инхибицију пролиферације MRC-5 ћелија биле су 0.1 и 1 μM , док су остале концентрације (10, 25, 50, 100, 250 μM) показале значајан антипролиферативни ефекат у односу на контролне ћелије након оба временска интервала излагања.

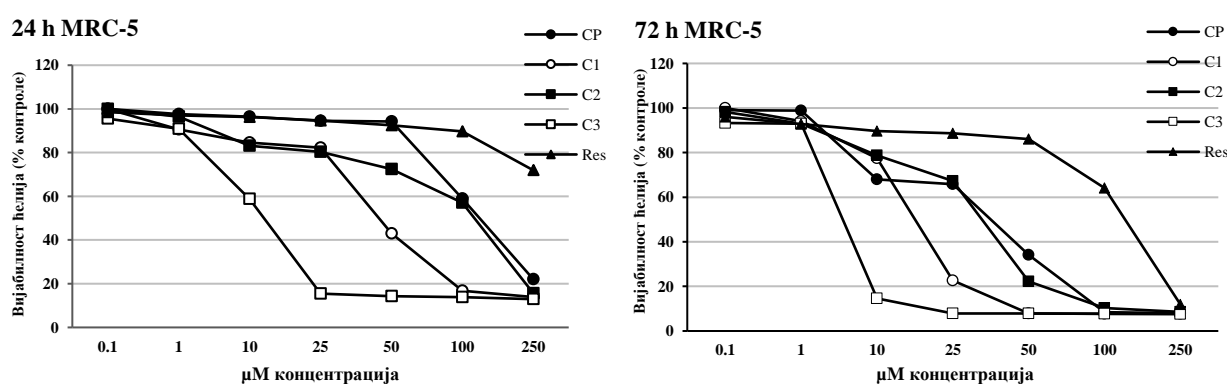


График 4. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност MRC-5 ћелија након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка

10 μM концентрација испитиваних једињења са Pt и за ове ћелије је била најнижа концентрација са показаним значајним антипролиферативним ефектом. Употребом поменуте концентрације вијабилност MRC-5 ћелија била је значајно смањена и то након 24 h третмана комплексом C1 - $84.53\% \pm 2.81$ вијабилних ћелија, третмана комплексом C2 - $83.13\% \pm 1.26$ вијабилних ћелија, третмана комплексом C3 - $58.8\% \pm 2.18$ вијабилних ћелија и третмана CP - $96.44\% \pm 2.95$ вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија), а након 72 h третмана комплексом C3 - $14.59\% \pm 0.61$ вијабилних ћелија и третмана CP - $68.02\% \pm 1.71$ вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија). Комплекси C1 ($77.4\% \pm 1.34$ вијабилних ћелија) и C2 ($78.81\% \pm 1.54$ вијабилних ћелија) су испољили блажи ефекат од CP. За разлику од интензивног антипролиферативног утицаја на туморске ћелијске линије коришћене у овој студији, ресвератрол је изазвао смањену вијабилност MRC-5 ћелија, али са већим процентом вијабилних ћелија приликом апликације виших концентрација након оба времена излагања. Концентрација од 100 μM индуковала је смањену вијабилност MRC-5 ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија), где су забележене вредности након 24 h - $89.71\% \pm 1.83$ вијабилних ћелија, а након 72 h - $64.13\% \pm 0.64$ вијабилних ћелија. Наведена концентрација Res имала је ~ 2 пута блажи

ефекат на MRC-5 ћелије у односу на обе коришћене туморске ћелијске линије након дуготрајног периода излагања.

Табела 5. Антипролиферативни ефекти, изражени као IC_{50} вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на MRC-5 ћелије након 24 и 72 сата

		IC_{50} (μM)	
Ћелије/третмани		24 h	72 h
MRC-5	CP	235.36 \pm 11.09	21.22 \pm 1.24
	C1	35.3 \pm 3.41	12.84 \pm 1.16
	C2	128.36 \pm 8.63	21.72 \pm 2.05
	C3	8.56 \pm 0.74	3.79 \pm 0.37
	Res	>250	176 \pm 5.23

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка

У Табели 5 приказане су IC_{50} вредности испитиваних једињења након краткотрајног и дуготрајног периода излагања MRC-5 ћелија. На основу резултата, сва три нова Pt(IV) комплекса поседују цитотоксичну активност према MRC-5 ћелијама која је интензивнија у поређењу са CP. Сви третмани имали су појачану цитотоксичну активност након дуготрајног третмана. Разлика између IC_{50} вредности испитиваних комплекса и CP након 24 h третмана била је значајно већа него разлика након дуготрајног третмана. И овог пута као комплекс са најјачим цитотоксичним ефектом издвојио се комплекс C3, чија је вредност IC_{50} 27.5 пута нижа од IC_{50} вредности CP. За комплекс C1 забележена је IC_{50} вредност 6.66 пута нижа од IC_{50} вредности CP, док је за комплекс C2 забележена вредност 1.83 пута нижа од IC_{50} вредности CP. Res није показао цитотоксичну активност према MRC-5 ћелијама након 24 h, док је након продуженог излагања, његов ефекат био слабији од ефекта CP.

1.1.4. Ефекти комбинованих третмана на вијабилност ћелија

Након евалуације цитотоксичности појединачних третмана, издвојена су једињења коришћена у даљим истраживањима утицаја комбинованих третмана. У циљу испитивања узајамних ефеката, а на основу добијених резултата, одабрана су два комплекса за спровођење даљих анализа: C1 и C3. Ови комплекси су издвојени као комплекси са израженијим антипролиферативним потенцијалом на коришћене туморске ћелије. За комбиноване третмане одабране су три ниже концентрације комплекса C1 и комплекса C3 које су показале најслабији цитотоксични ефекат на MRC-5 ћелије (1, 10, 25 μM). Концентрација ресвератрола (25 μM) коришћена у комбинованим третманима издвојена је као концентрација која је индуковала снажну инхибицију пролиферације MDA-MB-231 (График 2) и JEG-3 (График 3) ћелија, а притом није имала значајан ефекат на MRC-5 (График 4) ћелије. Ћелије су излагане третманима у трајању од 72 h (дуготрајни третман) због ефективнијег деловања одабраних једињења.

1.1.4.1. Вијабилност MDA-MB-231 ћелија

На **Графику 5** приказани су ефекти појединачних и комбинованих третмана одабраних једињења на MDA-MB-231 ћелије након 72 h.

Резултати анализе вијабилности ћелија показују да постоји значајна разлика у поређењу са контролом (100% вијабилних ћелија) након генерално свих третмана, осим након третмана комплексом C1 и комплексом C3 у најнижој примењеној концентрацији од 1 μM . Поређење комбинованих третмана у односу на појединачне третмане показало је значајан пад у ћелијској вијабилности. Стога можемо претпоставити да је употреба 25 μM Res у комбинацији са комплексима C1 и C3 појачала њихов антипролиферативни ефекат на ове туморске ћелије. Најинтензивнији антипролиферативни ефекат имао је комбиновани третман 25 μM C3 и 25 μM Res где је вијабилност ћелија смањена на 11.41% \pm 0.37 вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија).

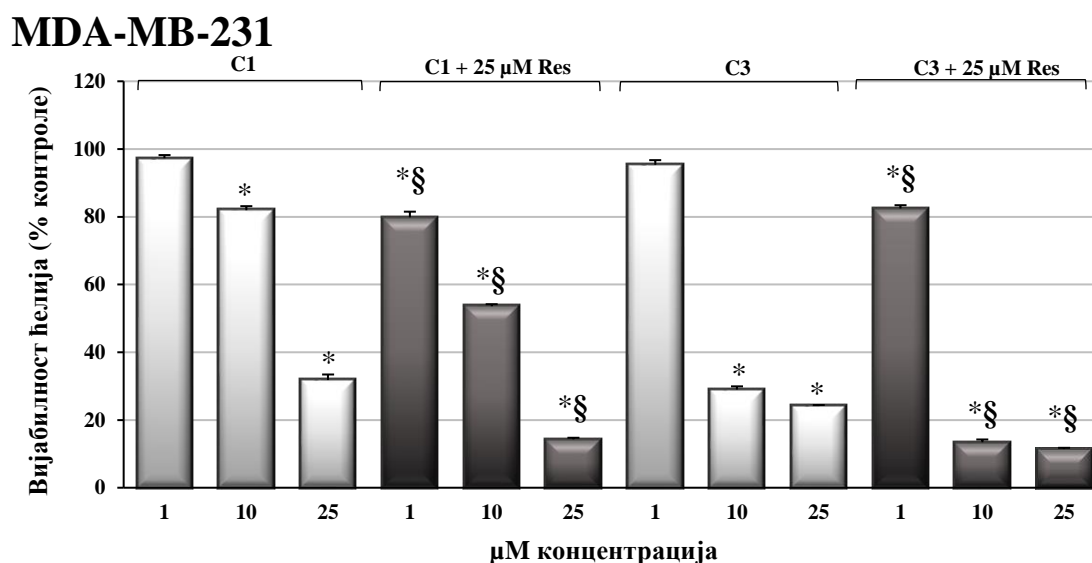


График 5. Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност MDA-MB-231 ћелија након 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1/C3 третмана са одговарајућим комбинованим Res + C1/C3 третманом.

1.1.4.2. Вијабилност JEG-3 ћелија

На **Графику 6** приказани су ефекти појединачних и комбинованих третмана одабраних једињења на JEG-3 ћелије након 72 h.

Резултати анализе вијабилности ћелија показују да постоји значајна разлика у поређењу са контролом (100% вијабилних ћелија) у свим третманима, са поновним изузетком третмана комплексом C1 и третмана комплексом C3 у концентрацији од 1 μM . Поређењем комбинованих третмана са појединачним третманима показан је значајан пад у ћелијској вијабилности, чиме се потврђује да 25 μM Res у комбинацији са комплексима C1

и С3 појачава антипролиферативни ефекат наведених комплекса. Најинтензивнији антипролиферативни ефекат поново је имао комбиновани третман 25 μM С3 и 25 μM Res где је вијабилност ћелија смањена на $10.05\% \pm 1.00$ вијабилних ћелија у односу на контролу (100% вијабилних ћелија).

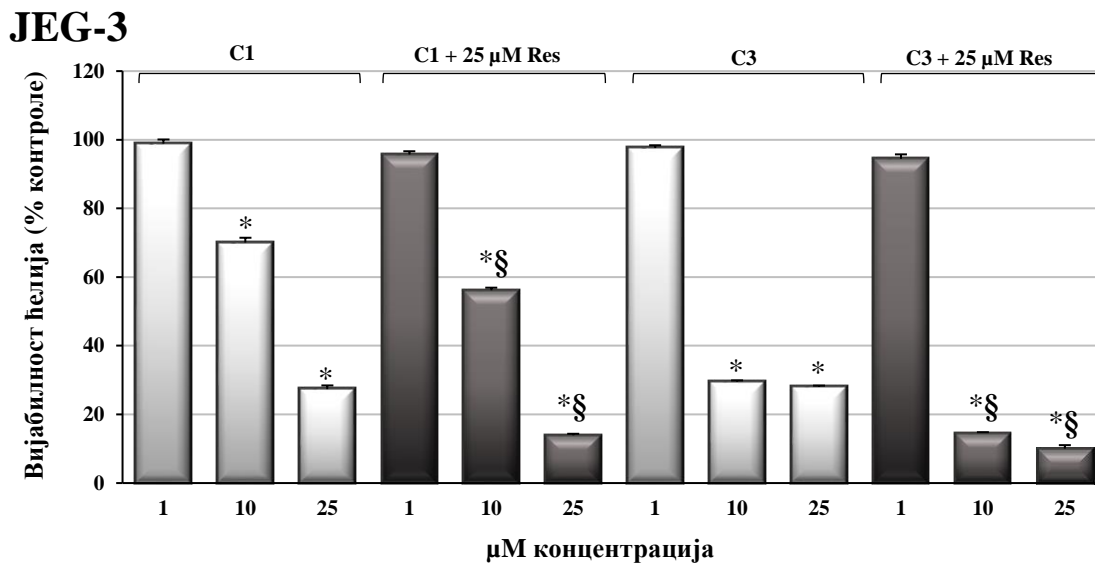


График 6. Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност JEG-3 ћелија након 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1/C3 третмана са одговарајућим комбинованим Res + C1/C3 третманом.

1.1.4.3. Вијабилност MRC-5 ћелија

На **Графику 7** приказани су ефекти појединачних и комбинованих третмана одабраних једињења на MRC-5 ћелије након 72 h.

Резултати анализе вијабилности ћелија показују да постоји значајна разлика у поређењу са контролом (100% вијабилних ћелија) у свим појединачним третманима. Комбиновани третмани утицали су на значајно смањену вијабилност приликом апликације виших концентрација (25 μM C1, 10 μM и 25 μM C3 у комбинацији са 25 μM Res), док комбиновани третман 1 μM комплекса (C1 и C3) и 25 μM Res није имао ефекта на вијабилност MRC-5. Такође, за разлику од показаног значајног антипролиферативног ефекта на туморске ћелије, комбиновани третман 10 μM C1 и 25 μM Res није утицао на вијабилност здравих MRC-5 ћелија. Вијабилност ћелија измерена након наведеног третмана била је чак $98.8\% \pm 0.77$ вијабилних ћелија у односу на контролне ћелије (100% вијабилних ћелија). Поређењем комбинованих третмана са појединачним третманима уочен је значајан пораст у ћелијској вијабилности MRC-5 ћелија, што указује на могући протективни ефекат ресвератрола.

Добијени резултати показују да Res појачава антипролиферативни ефекат C1 и C3 на коришћене туморске ћелије (MDA-MB-231 и JEG-3) (**График 5 и 6**), док је вијабилност

здравих MRC-5 ћелија (**График 7**) значајно повећана у поређењу са појединачним третанима испитиваних комплекса. Сходно томе, забележен цитотоксични ефекат комплекса на MRC-5 ћелије значајно је ублажен употребом Res у котретману, указујући на побољшану селективност котретмана.

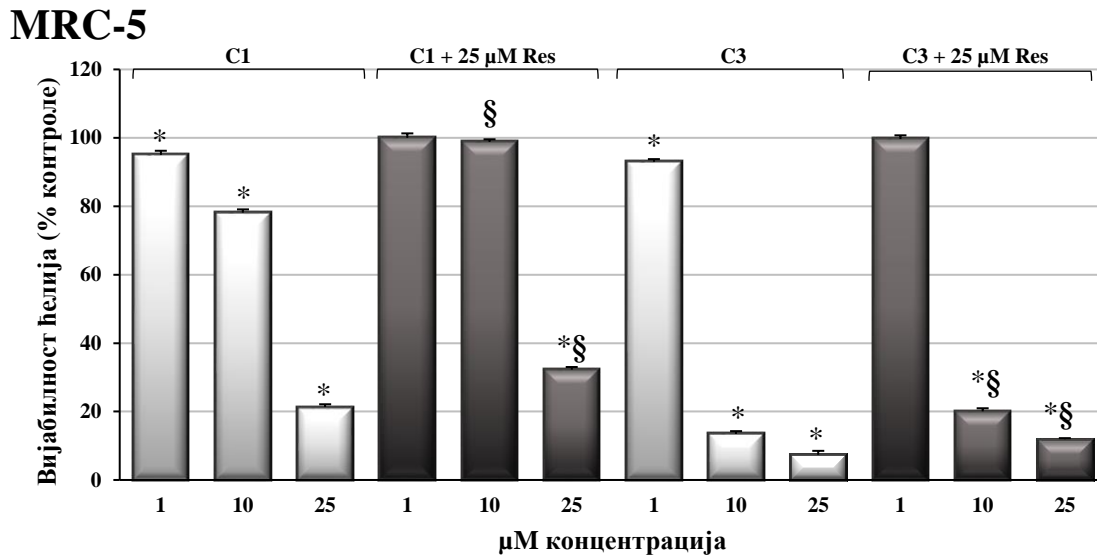


График 7. Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност MRC-5 ћелија након 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1/C3 третмана са одговарајућим комбинованим Res + C1/C3 третманом.

Као што је приказано на **Графиконима 5, 6 и 7**, комбиновани третман 10 µM C1 и 25 µM Res индуковао је значајно смањену вијабилност обе тумоске ћелијске линије, приближно око 50% у односу на контролу (100%), док исти третман није утицао на вијабилност MRC-5 ћелија. Ова комбинација третмана показала се као адекватна за даља испитивања ћелијског одговора.

1.2. Утицај комплекса C1 и ресвератрола на миграторни потенцијал ћелија

Након интензивне, неконтролисане пролиферације, малигне ћелије тумора могу доспети у циркулацију и бити пренете на друга места у организму на којима формирају секундарни тумор (метастазе). Способност метастазирања (инвазивност тумора) једна је од малигнућих одлика коришћених туморских ћелија (тумора дојке и плаценте). Сходно томе, евалуација потенцијалних антимиграторних ефеката испитиваних супстанци вршена је применом Transwell теста на две туморске ћелијске линије (MDA-MB-231 и JEG-3).

Утицај одабраног комплекса C1 као и његове комбинације са Res на миграторни потенцијал MDA-MB-231 и JEG-3 ћелија након 72 h приказан је на **Графику 8**.

Приказани резултати указују да примена комплекса C1 значајно редукује миграцију JEG-3 ћелија, за 12% у односу на контролне ћелије (нетретиране ћелије), док исти третман није значајно утицао на миграторни потенцијал MDA-MB-231. Применом комбинованог третмана 10 μ M C1 и 25 μ M Res, миграторни потенцијал обе туморске ћелијске линије значајно је инхибиран. Као што је приказано на **Графику 8**, комбинован третман је смањио миграцију MDA-MB-231 ћелија, за ~ 50%, и JEG-3 ћелија, за ~ 40% у односу на контролне, нетретиране ћелије. Добијени резултати указују да комбиновани третман доводи до значајног смањења миграторне способности ових туморских ћелија.

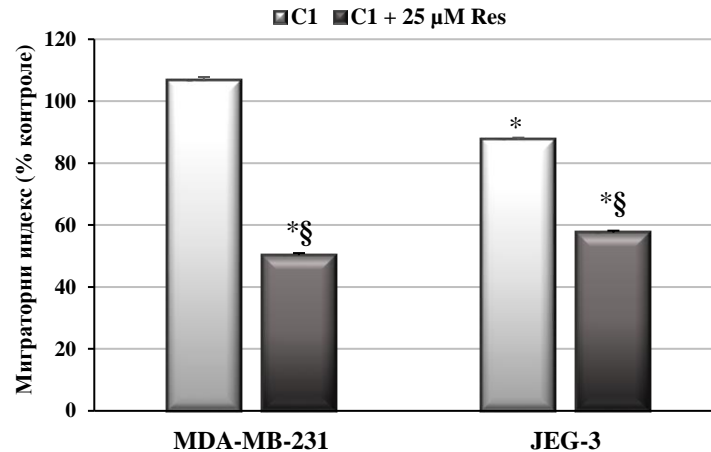


График 8. Ефекти комбинованог третмана C1 и ресвератрола на миграторни потенцијал MDA-MB-231 и JEG-3 ћелија након 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1 третмана са комбинованим Res + C1 третманом.

1.3. Утицај комплекса C1 и ресвератрола на редокс статус ћелија

Нарушена редокс хомеостаза и оксидативни стрес могу довести до малигне трансформације здравих ћелија, туморогенезе. Међутим, повећана продукција реактивних врста и настанак оксидативног стреса код туморских ћелија може утицати на смањен раст ћелија, нарушену пролиферацију и миграцију, а такође може индуковати ћелијску смрт. Многи антитуморски агенси могу да поремете редокс баланс туморских ћелија чиме последично индукују апоптозу и некрозу. Сходно томе, испитиван је утицај комплекса C1 и Res на редокс статус туморских ћелија (MDA-MB-231 и JEG-3) и здравих ћелија (MRC-5). Мерена је продукција супероксид анјон радикала, водоник пероксида и нитрита, а такође и редукованог и оксидованог глутатиона као маркера оксидативног стреса у наведеним ћелијама.

1.3.1. Продукција супероксид анјон радикала

Концентрација $O_2^{\cdot-}$ квантификована је након краткотрајног (24 h) и дуготрајног (72 h) третмана у свим коришћеним ћелијским линијама. Утицај одабраних једињења на продукцију $O_2^{\cdot-}$ у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама приказан је на **Графику 9**.

Добијени резултати показују да је концентрација $O_2^{\cdot-}$ била значајно повећана (за 8.45%) након 24 h комбинованог третмана Res и комплексом C1 у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије. У JEG-3 ћелијама евидентирана је повећана концентрација $O_2^{\cdot-}$ након 72 h третмана комплексом C1 (за 28.26%) у односу на контролне ћелије, док је комбиновани третман након истог времена излагања индуковао смањење концентрације $O_2^{\cdot-}$ (за 21.29%) у поређењу са C1 третираним ћелијама. Статистички значајна разлика у продукцији $O_2^{\cdot-}$ није утврђена у MRC-5 ћелијама.

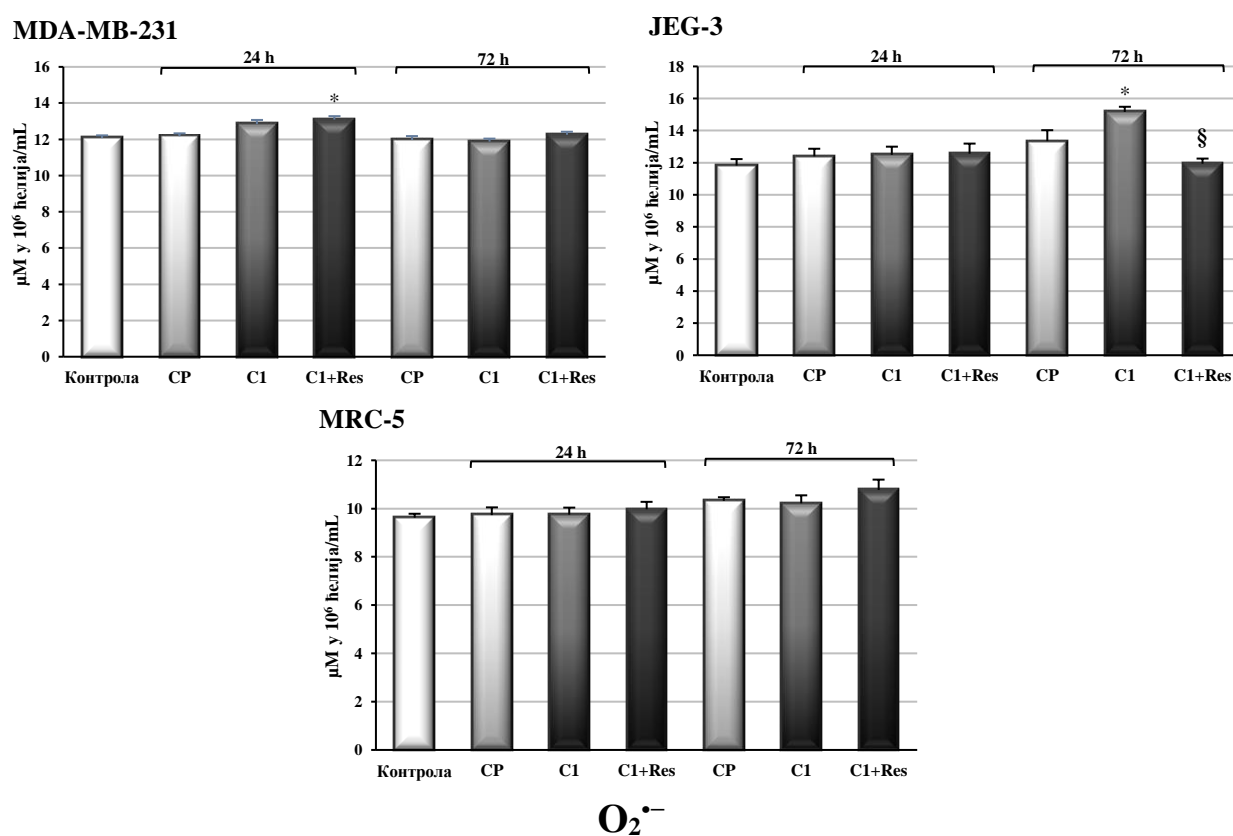


График 9. Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са C1 третманом са комбинованим Res + C1 третманом.

1.3.2. Продукција водоник пероксида

Концентрација H_2O_2 квантификована је након краткотрајног (24 h) и дуготрајног (72 h) третмана у свим коришћеним ћелијским линијама. Утицај одабраних једињења на продукцију H_2O_2 у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама приказан је на **Графику 10**.

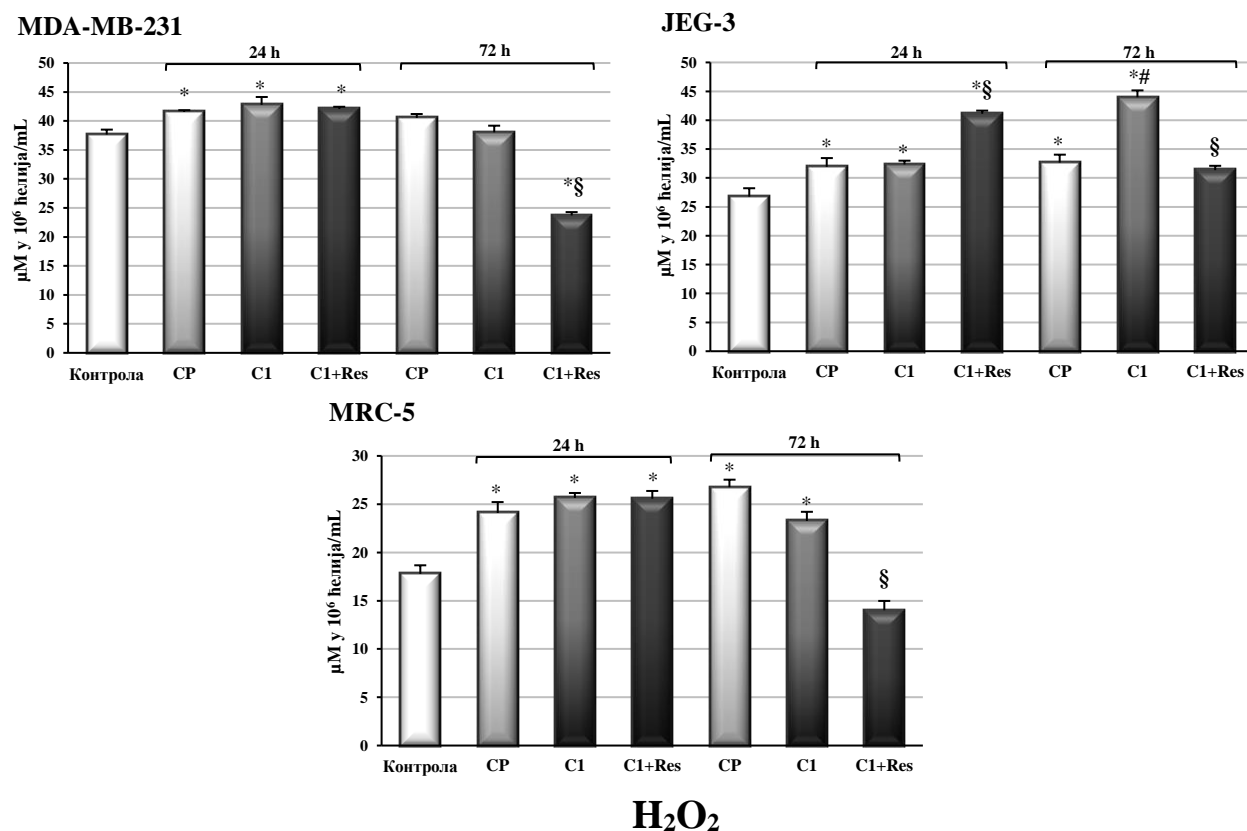


График 10. Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1 третмана са комбинованим Res + C1 третманом.

Добијени резултати показују да је концентрација H_2O_2 у MDA-MB-231 ћелијама након 24 h излагања свим испитиваним једињењима значајно повећана у односу на концентрацију детектовану у контролним ћелијама (након третмана CP за 10.41%, након третмана комплексом C1 за 13.59%, након комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 11.68%). Након 72 h излагања комбинованом Res и C1 третману, евидентирано је значајно смањење концентрације овог параметра у односу на контролне ћелије (за 37.07%), а такође и у односу на ћелије третиране комплексом C1 (за 37.7%). У JEG-3 ћелијама концентрација H_2O_2 била је значајно повећана након примене генерално свих третмана у поређењу са контролним ћелијама (након 24 h третмана CP за 19.27%, третмана комплексом C1 за 20.81%, комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 53.56%, а након 72 h третмана CP за 22% и третмана комплексом C1 за 64.25%). Комбиновани третман Res и C1 је након 24 h индуковао повећану продукцију H_2O_2 у JEG-3 ћелијама, за 27.11% већу у односу на ћелије

третиране комплексом C1. Након 72 h комбинованог третмана евидентиран је пад концентрације H_2O_2 (за 28.7%) у JEG-3 ћелијама у односу на концентрацију детектовану након третмана комплексом C1. Такође, концентрација H_2O_2 била је значајно повећана (за 34.63%) након дуготрајног третман комплексом C1 у односу на третман CP. Концентрација H_2O_2 у MRC-5 ћелијама након оба времена излагања свим испитиваним једињењима била је значајно повећана у односу на контролне ћелије (након 24 h третмана CP за 35.49%, третмана комплексом C1 за 44.26%, комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 43.81%, а након 72 h третмана CP за 50.56% и третмана комплексом C1 за 30.82%). Изузетак је био дуготрајни комбиновани третман Res и C1, где је утврђена смањена концентрација овог параметра за 39.77% у односу на концентрацију измерену у ћелијама третираним C1.

1.3.3. Продукција азот монооксида

Концентрација NO_2^- , као индикатора NO, квантификована је након краткотрајног (24 h) и дуготрајног (72 h) третмана у свим коришћеним ћелијским линијама. Утицај одабраних једињења на продукцију NO_2^- у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама приказан је на **Графику 11**.

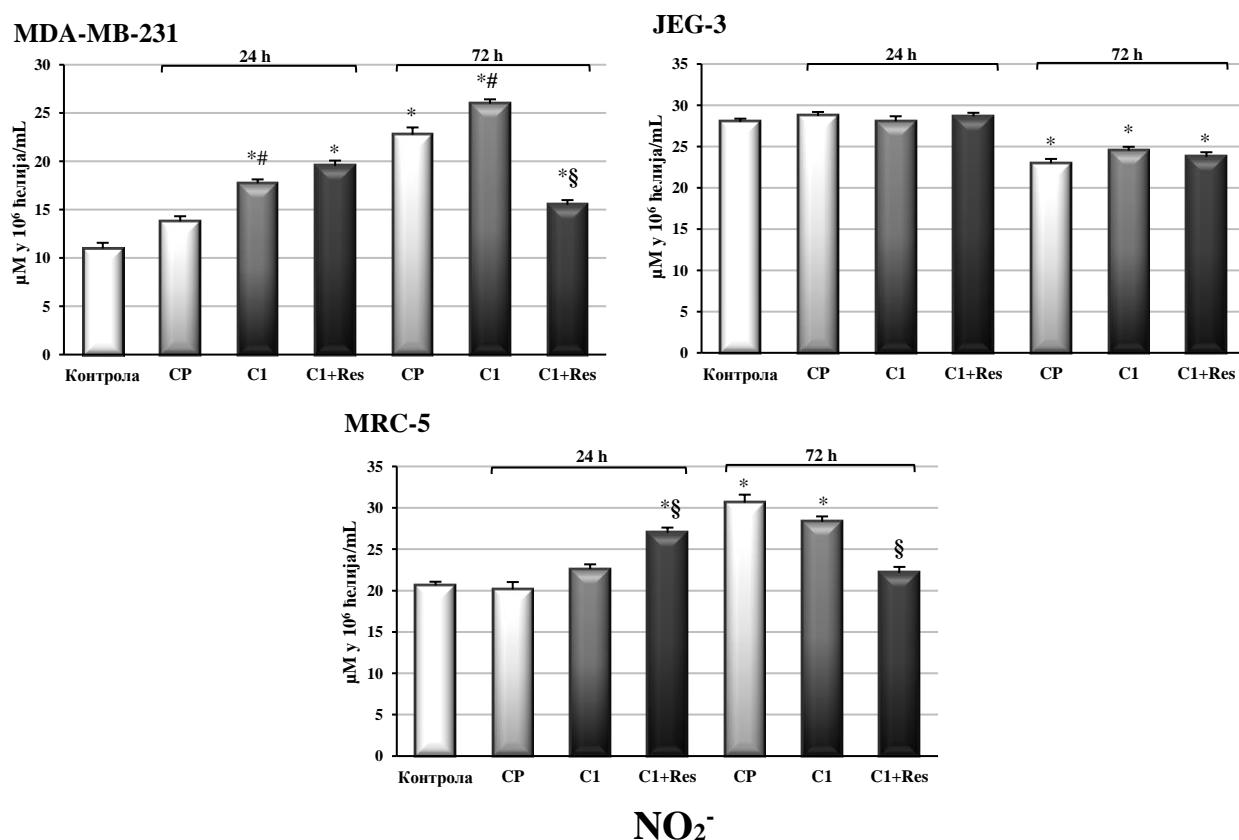


График 11. Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату \pm стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1 третмана са комбинованим Res + C1 третманом.

Добијени резултати показују да је примена генерално свих третмана (изузев краткотрајног третмана CP) у оба испитивана временска интервала индуковала повећану продукцију NO_2^- у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије (након 24 h третмана комплексом C1 за 61.47% и комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 77.78%, а након 72 h третмана CP за 107.19%, третмана комплексом C1 за 136.61%, и комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 41.26%). Такође, забележена је повећана продукција NO_2^- од стране ћелија изложених комплексу C1 24 h (за 28.66%) и 72 h (за 14.2%) у односу на ћелије третиране CP. Дуготрајни комбиновани третман Res и комплексом C1 утицао је на значајно смањење концентрације NO_2^- (за 40.3%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на дуготрајни третман комплексом C1. Статистички значајна разлика у продукцији NO_2^- у JEG-3 ћелијама након 24 h третмана у односу на контролне ћелије није утврђена, док је након 72 h примене свих третмана, концентрација NO_2^- смањена у односу на контролне ћелије (након третмана CP за 17.88%, комплексом C1 за 12.37% и након комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 15.16%). Продукција NO_2^- у MRC-5 ћелијама значајно је повећана након 24 h комбинованог третмана Res и комплексом C1 у односу на контролне (за 30.84%) и ћелије третиране комплексом C1 (за 19.38%). Дуготрајни третмани CP и комплексом C1 индуковали су повећану продукцију NO_2^- у MRC-5 ћелијама, чије су вредности биле значајно веће (за 48.5% и за 37.24%) у односу на вредности измерене у контролним ћелијама, док је дуготрајни комбиновани третман Res и комплексом C1 утицао на смањење концентрације NO_2^- (за 21.84%) у MRC-5 ћелијама у односу на третман комплексом C1.

1.3.4. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона

Продукција GSH квантификована је након краткотрајног (24 h) и дуготрајног (72 h) третмана у свим коришћеним ћелијским линијама. Утицај одабраних једињења на продукцију GSH у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама приказан је на **Графику 12**.

Добијени резултати показују да су третман комплексом C1 и комбиновани третман Res и комплексом C1 након 24 h излагања индуковали повећану продукцију GSH (за 20.83% и 52.76%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије. Такође, евидентиран је значајан пораст концентрације GSH (за 33.42%) након третмана комплексом C1 у односу на ћелије третиране CP, као и значајан пораст концентрације GSH (за 26.42%) након комбинованог третмана Res и комплекса C1 у односу на ћелије третиране комплексом C1. Дуготрајни третман CP и комплексом C1 утицао је на повећану продукцију GSH (за 71.88% и за 63.3%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије. Комбиновани третман Res и комплексом C1 након 72 h излагања утицао је на смањење концентрације GSH (за 26.52%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на ћелије третиране комплексом C1. Статистички значајна разлика у продукцији GSH од стране JEG-3 ћелија након 24 и 72 h третмана у односу на контролне ћелије није утврђена, изузев након дуготрајног комбинованог третмана Res и комплексом C1 где је забележена смањена концентрација GSH у односу на контролне ћелије (за 18.68%) и у односу на ћелије третиране комплексом C1 (за 13.34%). Концентрација GSH у MRC-5 ћелијама након оба временска интервала и генерално свих третмана била је значајно смањена у односу на концентрацију измерену у контролним ћелијама (након 24 h третмана CP за 19.67%, комплексом C1 за 25.18% и комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 19.91%, а након 72 h третмана CP за 31.33% и комплексом C1 за 22.64%). Након дуготрајног третмана комплексом C1, концентрација

GSH у MRC-5 ћелијама је била значајно повећана (за 25.44%) у односу на концентрацију забележену након третмана CP. Комбиновани третман Res и комплексом C1 након 72 h индуковао је повећану продукцију GSH (за 28.31%) у MRC-5 ћелијама у односу на ћелије третиране комплексом C1.

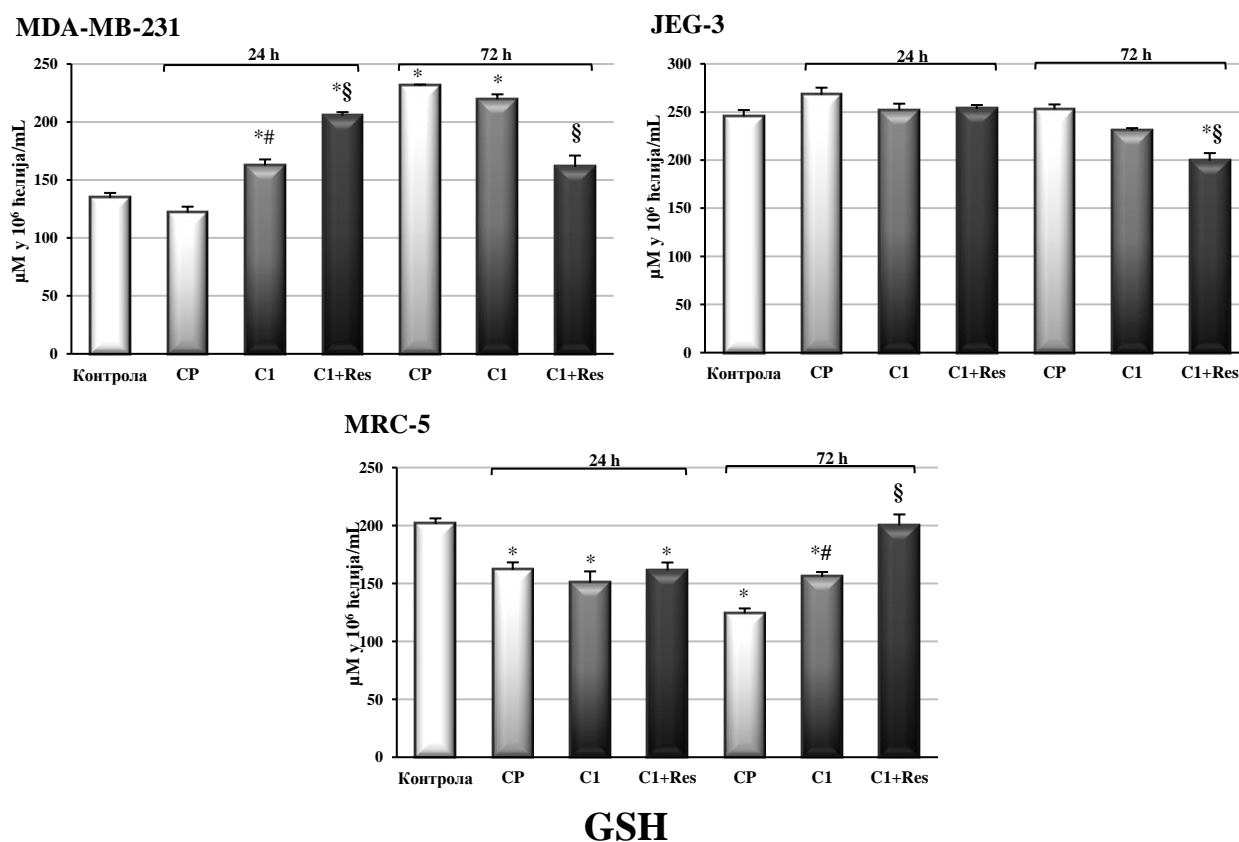


График 12. Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1 третмана са комбинованим Res + C1 третманом.

Продукција GSSG квантификована је након краткотрајног (24 h) и дуготрајног (72 h) третмана у свим коришћеним ћелијским линијама. Утицај одабраних једињења на продукцију GSSG у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама приказан је на **Графику 13**.

Добијени резултати показују да је након 24 h само третман CP индуковао повећану продукцију GSSG (за 40.9%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије, док је третман комплексом C1 након истог временског периода утицао на смањење продукције наведеног параметра у MDA-MB-231 ћелијама за 40.86% у односу на ћелије третиране CP. Дуготрајни третмани са генерално свим испитиваним једињењима утицали су на изузетно повећану продукцију GSSG у MDA-MB-231 ћелијама у односу на контролне ћелије (третман CP за 56.06%, комплексом C1 за 83.33% и комбиновани третман Res и комплексом C1 за 151.51%), док је комбиновани третман Res и комплексом C1 након 72 h индуковао повећану продукцију GSSG (за 37.19%) у MDA-MB-231 ћелијама у односу на ћелије третиране комплексом C1. Сличан пораст концентрације евидентиран је и у JEG-3 ћелијама,

где је након 24 h третмана CP, концентрација GSSG била већа за 54.38% у односу на концентрацију утврђену у контролним ћелијама. Дуготрајни третмани свим испитиваним једињењима и код ових туморских ћелија изазвали су изузетно повећану продукцију GSSG у односу на контролне ћелије (третман CP за 124.56%, комплексом C1 за 98.24% и комбиновани третман Res и комплексом C1 за 175.44%), док је комбиновани третман Res и комплексом C1 након 72 h индуковао повећану продукцију GSSG (за 38.94%) у JEG-3 ћелијама у односу на ћелије третиране комплексом C1. Концентрација GSSG у MRC-5 ћелијама након оба временска периода излагања била је изузетно повећана након генерално свих третмана у односу на концентрацију измерену у контролним ћелијама (након 24 h третмана CP за 88.06%, третмана комплексом C1 за 150.74%, и комбинованог третмана Res и комплексом C1 за 101.49% а након 72 h третмана CP за 122.39% и третмана комплексом C1 за 94.03%). Краткотрајни третман комплексом C1 индуковао је додатно повећање концентрације GSSG за 33.33% у MRC-5 ћелијама у односу на ћелије третиране CP, док је комбиновани третман Res и комплексом C1 утицао на смањење концентрације GSSG за 19.64% у односу на ћелије третиране комплексом C1. Након дуготрајног комбинованог третмана Res и комплексом C1, забележена концентрација GSSG у MRC-5 ћелијама је била значајно смањена, за 47.69% у односу на концентрацију забележену након третмана комплексом C1, док у поређењу са контролним ћелијама није постојала разлика у продукцији овог параметра.

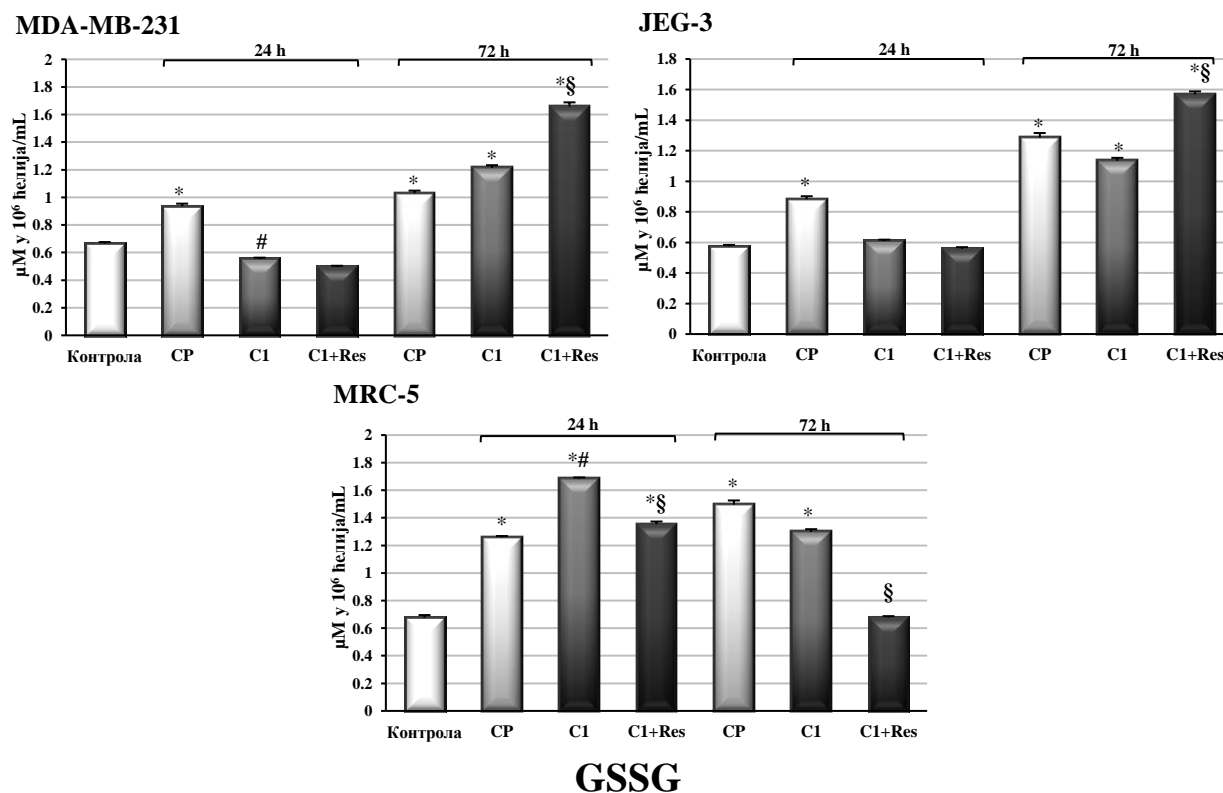


График 13. Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатиона у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка.

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу C1 третмана са комбинованим Res + C1 третманом.

2. Евалуација ефеката испитиваних једињења у *in vivo* условима

Током *in vivo* експерименталног дела ове студије, испитивани су биолошки ефекти цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе), три новосинтетисана Pt(IV) комплекса (C1, C2, C3) (10 mg/kg телесне масе) и ресвератрола (25 mg/kg телесне масе) на женке пацова соја Wistar albino.

In vivo анализе обухватале су процену ефеката испитиваних једињења на одабрана ткива пацова. Евалуација њиховог утицаја на редокс хомеостазу вршена је у крви и на ткиву јетре и бубрега експерименталних животиња.

Добијени резултати *in vivo* експерименталног дела доприносе будућим студијама у расветљавању механизма деловања Pt(IV) комплекса на функцију здравих ћелија одабраних ткива као и њиховог узајамног деловања са ресвератролом.

Резултати су приказани табеларно и графички као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Свака експериментална група састојала се од 6 насумично изабраних јединки.

2.1. Утицај третмана на тежину животиња и испитиваних органа

Телесна маса животиња измерена је на почетку експеримента, непосредно пре аплицирања испитиваних једињења, као и по истеку периода третмана, непосредно пре жртвовања животиња. По завршеној дисекцији, изолована су ткива јетре и бубрега, чија је тежина измерена након испирања у физиолошком раствору.

Ефекти испитиваних једињења у појединачним и третманима комбинованим са ресвератролом на промену телесне тежине експерименталних животиња, уноса хране и релативне тежине органа приказани су у **Табели 6**.

Добијени резултати показују да су сви испитивани третмани значајно утицали на унос хране (изузев комбинованих третмана Res и комплекса C1 и C2), а такође и на тежину експерименталних животиња (изузев комбинованог третмана Res и комплексом C1) у односу на контролну групу животиња. Третмани CP и комплексом C3 индуковали су значајан губитак тежине и смањен унос хране (до ~ 40%) експерименталних животиња у односу на контролну групу. Третмани испитиваним комплексима изазвали су мањи проценат промене тежине животиња у односу на групу третирану CP, док је и унос хране био оптималнији, повећан у односу на групу третирану CP. Res је у комбинованим третманима како са комплексима тако и са CP изазвао повећан унос хране (до ~ 28%) и телесну тежину експерименталних животиња у односу на групе животиња третиране само одређеним комплексом или CP. Релативна тежина јетре и бубрега након третмана комплексима значајно је повећана у односу на контролну групу (до ~ 28%), а такође и у односу на групу третирану CP, са статистичком значајношћу у групи третираној комплексом C3 (релативна тежина јетре, за 21%), и комплексом C1 (релативна тежина бубрега, за 18%). Комбиновани третмани Res и комплексима углавном су утицали на додатно повећање релативне тежине јетре и бубрега у односу на контролу (до 63.7% повећана релативна тежина јетре и до 41.68% повећана релативна тежина бубрега) и у односу на групе третиране дериватима Pt (до 27.5% повећана релативна тежина јетре и до 21.25% повећана релативна тежина бубрега).

Табела 6. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на промену тежине животиња и органа у контролној и експерименталним групама

Групе	Параметри			
	Промена тежине (%)	Унос хране (g/пацов/дан)	Релативна тежина јетре (mg/g)	Релативна тежина бубрега (mg/g)
Контрола	4.57 ± 0.13	14.92 ± 0.11	23.33 ± 1.17	4.87 ± 0.01
CP	-9.61 ± 0.16*	9.01 ± 0.46*	24.76 ± 0.99	5.17 ± 0.06
C1	1.94 ± 0.11*#	11.68 ± 0.45*#	29.25 ± 1.17*	6.11 ± 0.04*#
C2	2.58 ± 0.18*#	12.43 ± 0.44*#	27.28 ± 1.58	5.59 ± 0.02*
C3	-4.89 ± 0.16*#	10.45 ± 0.48*#	29.97 ± 1.98*#	5.69 ± 0.21*
Res	2.28 ± 0.04*	12.24 ± 0.44*	30.16 ± 1.14*	5.54 ± 0.13
Res+CP	1.50 ± 0.13*§	11.42 ± 0.45*§	30.92 ± 2.28*§	5.49 ± 0.05
Res+C1	4.41 ± 0.20§	14.96 ± 0.27§	38.21 ± 2.25*§	5.68 ± 0.03*
Res+C2	3.83 ± 0.21*§	14.19 ± 0.26§	27.35 ± 1.22	5.33 ± 0.04
Res+C3	1.30 ± 0.25*§	11.26 ± 0.31*§	30.87 ± 0.83*	6.90 ± 0.08*§

Резултати су приказани као средња вредност три мерења ± стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.2. Утицај третмана на хематолошке и биохемијске параметре

Процена утицаја испитиваних једињења на опште стање организма експерименталних животиња вршена је путем анализе хематолошких и биохемијских параметара. Ефекти испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на промену хематолошких и биохемијских параметара приказани су у **Табелама 7-11**.

2.2.1. Хематолошки параметри

У **Табели 7** приказани су ефекти третмана на број еритроцита и тромбоцита, концентрацију хемоглобина, хематокритску и тромбокритску вредност.

Након третмана испитиваним једињењима Pt, забележен је смањен број еритроцита у односу на контролну групу. Третмани CP и комплексом C3 изазвали су статистички значајно смањење у односу на контролну групу (за ~ 13%). Након комбинованих третмана Res, број RBC приближно је враћен на ниво детектован у контролној групи. У односу на групе животиња третиране комплексима и CP, комбиновани третмани Res индуковали су благо повећање броја RBC, статистички значајно након примене комбиновомог третмана Res и CP (за 15.18%).

Табела 7. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на хематолошке параметре контролне и експерименталних група

Групе	Параметри				
	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Plt ($\times 10^9/L$)	Hb (g/L)	Hct (L/L)	Pct ($\times 10^{-2}/L$)
Контрола	7.47 \pm 0.28	953.50 \pm 7.67	124.00 \pm 0.58	0.41 \pm 0.01	0.66 \pm 0.01
CP	6.52 \pm 0.18*	1137.60 \pm 10.02*	116.33 \pm 1.90*	0.33 \pm 0.01*	0.75 \pm 0.02*
C1	6.88 \pm 0.09	1047.00 \pm 16.01*#	114.75 \pm 1.46*	0.36 \pm 0.00*#	0.67 \pm 0.02#
C2	6.84 \pm 0.29	1135.16 \pm 16.07*	116.28 \pm 3.73*	0.35 \pm 0.01*	0.72 \pm 0.02
C3	6.68 \pm 0.19*	1076.66 \pm 32.73*	115.57 \pm 0.99*	0.35 \pm 0.01*	0.68 \pm 0.01#
Res	7.71 \pm 0.33	818.00 \pm 29.27*	128.20 \pm 2.15	0.43 \pm 0.01*	0.56 \pm 0.01*
Res+CP	7.51 \pm 0.41§	1051.00 \pm 38.47*§	127.25 \pm 2.05§	0.41 \pm 0.01§	0.63 \pm 0.01§
Res+C1	7.25 \pm 0.13	782.00 \pm 28.27*§	125.80 \pm 1.80§	0.42 \pm 0.01§	0.53 \pm 0.01*§
Res+C2	7.20 \pm 0.11	934.00 \pm 17.74§	127.16 \pm 2.94§	0.41 \pm 0.01§	0.58 \pm 0.02*§
Res+C3	6.75 \pm 0.06*	1175.33 \pm 28.79*§	122.83 \pm 1.79§	0.37 \pm 0.01*	0.72 \pm 0.02

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Концентрација хемоглобина у крви животиња третираних једињењима Pt била је значајно снижена у односу на контролну групу (за $\sim 6\%$). Након комбинованих третмана Res, концентрације Hb приближно су враћене на ниво измерен у контролној групи. У односу на групе животиња третиране комплексима и CP, комбиновани третмани Res индуковали су повећање концентрације Hb (за $\sim 9\%$).

Након третмана CP и комплексима, забележена је смањена хематокритска вредност у односу на контролну групу (до 19%), док је третман Res индуковао пораст хематокритске вредности у односу на контролну групу (за 23.25%). У односу на CP, третман комплексом C1 изазвао је значајно повећање хематокритске вредности (за 9%). Након комбинованих третмана Res, Hct вредности приближно су враћене на ниво измерен у контролној групи. У односу на групе животиња третиране комплексима и CP, комбиновани третмани Res индуковали су повећање Hct (до 20%).

Број тромбоцита у крви животиња био је значајно повећан након примене углавном свих третмана у односу на контролну групу животиња (до 23.26%). У односу на третман CP, само је након третмана комплексом C1 забележен смањен број Plt (за 7.96%). Након комбинованих третмана Res, број Plt је углавном био смањен у односу на групе животиња третиране комплексима и CP (до 25.31%).

Након третмана CP и комплексима, забележено је благо повећање тромбокритске вредности, статистички значајно у односу на контролну групу, само након третмана CP (за

13.63%). Вредности Pct биле су значајно ниже након третмана комплексом C1 и комплексом C3 у односу на вредности измерене након третмана CP (за ~ 10%). Третман Res, у појединачном и комбинованом третману (Res и комплекс C1 и Res и комплекс C2) утицао је на смањење тромбокритске вредности у односу на контролну групу (до 20%). У односу на групе животиња третиране комплексима и CP, комбиновани третмани Res утицали су на смањену Pct вредност (до 20.89%).

У **Табели 8** приказани су ефекти третмана на број леукоцита и леукоцитарну формулу.

Број леукоцита у крви животиња значајно је повећан након примене свих испитиваних третмана у односу на контролну групу животиња (до 164%). Комбиновани третман Res индуковао је додатно повећање WBC у односу на групе животиња третиране CP или комплексима (до 38%). Статистички значајна разлика забележена је након комбинованог третмана Res и CP и Res и комплексом C2 у односу на групе животиња третиране само CP и комплексом C2. Процентуално најзаступљеније ћелије белих крвних зрнаца биле су лимфоцити, чија је концентрација била значајно повећана након примене свих испитиваних третмана у односу на контролу (до 20.92%), док су концентрације осталих ћелија (моноцити и гранулоцити) углавном биле непромењене у односу на контролу.

Табела 8. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на број леукоцита и параметре леукоцитарне формуле контролне и експерименталних група

Групе	Параметри			
	WBC ($\times 10^9/L$)	Lym (%)	Mon (%)	Gra (%)
Контрола	1.23 \pm 0.09	68.54 \pm 1.90	9.00 \pm 1.11	11.25 \pm 0.23
CP	2.10 \pm 0.34*	75.55 \pm 2.03*	11.83 \pm 0.60*	14.28 \pm 1.02*
C1	2.14 \pm 0.24*	76.80 \pm 0.59*	12.43 \pm 0.93*	13.20 \pm 0.82
C2	2.34 \pm 0.25*	79.96 \pm 0.85*#	10.50 \pm 0.54	11.38 \pm 0.84#
C3	2.11 \pm 0.14*	81.97 \pm 1.21*#	10.36 \pm 0.52	11.18 \pm 1.15#
Res	2.65 \pm 0.27*	73.96 \pm 0.96*	10.20 \pm 1.02	12.26 \pm 0.78
Res+CP	2.90 \pm 0.33*§	78.72 \pm 2.63*	10.27 \pm 0.91	11.72 \pm 1.25§
Res+C1	2.16 \pm 0.28*	75.75 \pm 0.79*	9.73 \pm 0.66§	13.93 \pm 0.41
Res+C2	3.25 \pm 0.15*§	82.88 \pm 0.95*	8.08 \pm 0.47§	10.38 \pm 0.53
Res+C3	2.32 \pm 0.17*	81.32 \pm 1.05*	9.67 \pm 0.64	8.95 \pm 0.77

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

У Табели 9 приказани су ефекти третмана на вредности хематолошких индекса.

Просечни волумен еритроцита значајно је повећан након примене генерално свих испитиваних третмана у односу на контролну групу животиња (до 9%). Статистички значајна разлика није забележена након третмана CP, комплексом C1 и комплексом C2 у односу на контролну групу. MCV је био повећан у групама животиња третираних комплексима у односу на групу третирану CP (до 6.59%). Комбиновани третман Res и једињењима Pt индуковао је додатно повећање MCV у односу на групе животиња третиране CP или комплексима (до 8.84%).

Табела 9. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на хематолошке индексе контролне и експерименталних група

Параметри						
Групе	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)	MPV (fl)	PDW (%)
Контрола	52.25 ± 0.63	16.65 ± 0.10	311.25 ± 4.82	13.02 ± 0.15	7.32 ± 0.14	6.72 ± 0.27
CP	52.00 ± 0.63	18.16 ± 0.23*	348.00 ± 5.61*	13.58 ± 0.14*	6.60 ± 0.08*	9.58 ± 0.63*
C1	54.33 ± 1.05#	17.16 ± 0.18#	316.43 ± 3.29#	13.68 ± 0.18*	6.35 ± 0.07*	9.28 ± 0.85*
C2	54.40 ± 1.36#	17.01 ± 0.16#	321.50 ± 2.72#	13.77 ± 0.22*	6.36 ± 0.19*	9.38 ± 0.61*
C3	55.43 ± 1.21*#	18.84 ± 0.61*	325.62 ± 4.44*#	13.90 ± 0.24*	6.14 ± 0.17*#	10.27 ± 0.41*
Res	55.80 ± 0.37*	17.45 ± 0.24*	309.17 ± 3.12	12.07 ± 0.14*	6.82 ± 0.08*	6.90 ± 0.74
Res+CP	56.60 ± 0.24*§	17.40 ± 0.22*§	306.67 ± 3.86§	11.96 ± 0.23*§	6.03 ± 0.14*§	9.40 ± 0.64*
Res+C1	55.67 ± 0.33*	17.40 ± 0.13*	305.20 ± 2.42§	11.66 ± 0.07*§	6.80 ± 0.31*	7.50 ± 0.74
Res+C2	57.00 ± 0.63*§	17.70 ± 0.20*§	308.00 ± 4.89§	11.98 ± 0.18*§	6.23 ± 0.10*	9.48 ± 0.49*
Res+C3	55.76 ± 0.24*§	19.38 ± 0.12*	334.67 ± 2.39*	13.08 ± 0.22*§	5.89 ± 0.06*	9.70 ± 0.49*

Резултати су приказани као средња вредност три мерења ± стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Просечна количина хемоглобина по еритроциту значајно је повећана након примене скоро свих испитиваних третмана у односу на контролну групу животиња (до 16.39%). Статистички значајна разлика није забележена након третмана комплексом C1 и комплексом C2 у односу на контролну групу. MCH је био снижен у групама животиња третираних комплексима C1 и C2 у односу на групу третирану CP (до 5.5%). Комбиновани третман Res и комплексом C2 индуковао је додатно повећање MCH у односу на групе животиња третиране комплексом C2 (за 4.12%).

Просечна концентрација хемоглобина у еритроцитима значајно је повећана само након примене CP (за 11.8%), комплекса C3 (за 4.62%) и комбинованог Res и комплекс C3 третмана (за 7.5%) у односу на контролну групу. Након третмана са испитиваним

комплексима, МСНС била је значајно смањена у односу на групу животиња третираних СР (до 9%). Комбиновани третмани Res и СР, Res и комплексом С1, као и Res и комплексом С2 утицали су на смањење просечне концентрације хемоглобина у еритроцитима у односу на групе животиња третиране СР, комплексом С1, и комплексом С2 (до 5.4%).

Након третмана СР и комплексима, забележена је повећана ширина дистрибуције еритроцита по волумену у односу на контролну групу (до 6.9%), док су третмани Res и испитивани комбиновани третмани утицали на смањење ширине дистрибуције еритроцита у односу на контролну групу (до 10.44%). Такође, у односу на групе животиња третиране комплексима и СР, комбиновани третмани Res индуковали су смањење RDW (до 10.85%).

Просечан волумен тромбоцита значајно је смањен након примене свих испитиваних третмана у односу на контролну групу животиња (до 19.53%). Третман комплексом С3 као и комбиновани третман Res и СР индуковали су значајно смањење MPV у односу на групу животиња третираних СР (за 6.96% и за 8.63%).

Након примене генерално свих испитиваних третмана (изузев третмана Res и комбинованог Res и комплекс С1 третмана) забележена је повећана ширина дистрибуције тромбоцита по волумену у односу на контролну групу (до 52.83%). Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и третмана СР, као и комбинованих третмана у односу на третмане дериватима Pt није забележена.

2.2.2. Биохемијски параметри

2.2.2.1. Активност ензима јетре

У Табели 10 приказани су ефекти третмана на активност ензима јетре као показатеља функционалног стања јетре.

Активност ALT била је повећана након примене свих испитиваних третмана, али статистичка значајност евидентирана је само након третмана комплексом С1 у односу на контролу (повећана активност ензима за 31.79%) и у односу на СР (за 23.88%) и након третмана комплексом С3 (23.52%) у односу на контролу. Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и СР и комбинованих третмана није забележена.

Активност AST била је значајно повећана након третмана СР и комплексима (за ~ 6%) (изузев након третмана комплексом С2), и након комбинованог Res и СР третмана (за 8%) у односу на контролу. Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и третмана СР, као и комбинованих третмана у односу на третмане дериватима Pt није забележена.

Након примене третмана комплексима и комбинованих третмана Res и комплексима забележена је значајно повећана активност ALP у односу на контролу (до 92.41%). Сви испитивани комплекси индуковали су значајно повећање активности ALP у односу на третман СР (до 81%). Такође, комбиновани третман Res и СР утицао је на повећање активности наведеног ензима (за 23%) у односу на третман СР. Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и комбинованих третмана није забележена.

Након примене скоро свих испитиваних третмана (изузев третмана Res) евидентирана је повећана активност GGT (до 91.5%) и повећана активност лактат LDH (до

94%) у односу на контролну групу. Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и третмана CP, као и комбинованих третмана у односу на третмане дериватима Pt није забележена.

Табела 10. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активности ензима јетре мерене у серуму контролне и експерименталних група

Групе	Параметри				
	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)
Контрола	58.75 ± 2.23	149.60 ± 3.27	275.60 ± 47.43	2 ± 0.36	73.85 ± 3.51
CP	62.50 ± 2.42	159.40 ± 2.28*	292.83 ± 23.06	3.16 ± 0.47*	133.95 ± 8.22*
C1	77.43 ± 2.97*#	157.00 ± 2.03*	514.00 ± 17.48*#	3.83 ± 0.31*	134.13 ± 12.99*
C2	66.50 ± 3.24	153.30 ± 3.69	428.00 ± 35.94*#	3.33 ± 0.21*	120.92 ± 10.64*
C3	72.57 ± 2.17*	155.67 ± 1.03*	530.30 ± 46.3*#	3.33 ± 0.3*	139.38 ± 7.11*
Res	63.50 ± 3.57	154.25 ± 4.53	325.60 ± 23.81	2.17 ± 0.3	96.68 ± 5.81
Res+CP	70.00 ± 6.67	162.00 ± 2.72*	360.17 ± 15.30§	3 ± 0.26*	140.17 ± 15.3*
Res+C1	67.20 ± 2.61	151.50 ± 3.66	473.17 ± 15.20*	3.33 ± 0.42*	126.5 ± 10.2*
Res+C2	65.25 ± 3.75	150.60 ± 2.01	438.50 ± 18.94*	3.67 ± 0.21*	118.32 ± 9.04*
Res+C3	71.80 ± 2.80	152.60 ± 1.96	478.33 ± 22.15*	3 ± 0.36*	143.33 ± 15.25*

Резултати су приказани као средња вредност три мерења ± стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.2.2.2. Метаболизам глукозе, протеина и липида и функционалност бубрега

У Табели 11 приказани су ефекти испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на метаболизам глукозе, протеина и липида, као и на биомаркере оштећења бубрега.

Након акутног третмана испитиваним једињењима концентрација глукозе била је углавном смањена (изузев након третмана CP и комбинованог Res и CP третмана). Третмани комплексом C1 и комплексом C2 као и комбиновани третмани Res и комплексима C1, C2 и C3 индуковали су статистички значајно смањење концентрације глукозе (до 14%) у односу на контролну групу животиња. У односу на третман CP, након третмана испитиваним комплексима ниво глукозе је био значајно снижен (до 16.6%). Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и комбинованих третмана није забележена.

Примена свих испитиваних третмана довела је до значајно смањеног нивоа билирубина у односу на контролу (до 63.16%). Статистички значајна разлика између третмана испитиваним комплексима и третмана СР, као и комбинованих третмана у односу на третмане дериватима Рт није забележена.

Табела 11. Ефекти цисплатине, Рт(IV) комплекса и ресвератрола на биохемијске параметре мерене у серуму контролне и експерименталних група

Параметри							
Групе	Gl (mM)	B1 (μ M)	TP (g/L)	TG (mM)	Chl (mM)	Cre (μ M)	Urea (mM)
Контрола	9.13 \pm 0.21	0.95 \pm 0.06	66.68 \pm 0.87	0.65 \pm 0.10	1.42 \pm 0.05	64.00 \pm 2.43	6.26 \pm 0.43
СР	9.42 \pm 0.43	0.50 \pm 0.08*	70.13 \pm 0.66	0.57 \pm 0.03	1.68 \pm 0.07*	75.20 \pm 3.37*	9.47 \pm 0.14*
С1	7.85 \pm 0.21*#	0.35 \pm 0.07*	65.37 \pm 0.47#	0.66 \pm 0.04	1.78 \pm 0.09*	57.20 \pm 1.91#	2.68 \pm 0.17**
С2	8.35 \pm 0.24**	0.44 \pm 0.04*	64.87 \pm 1.08#	0.55 \pm 0.02	1.53 \pm 0.09	59.00 \pm 1.58#	3.49 \pm 0.16**
С3	8.43 \pm 0.17#	0.35 \pm 0.05*	61.50 \pm 1.26**	0.54 \pm 0.07	1.66 \pm 0.09*	61.57 \pm 2.35#	2.38 \pm 0.28**
Res	8.98 \pm 0.19	0.53 \pm 0.05*	68.98 \pm 1.22	0.55 \pm 0.08	1.40 \pm 0.05	65.60 \pm 2.08	5.52 \pm 0.21
Res+СР	9.27 \pm 0.36	0.53 \pm 0.04*	66.24 \pm 1.22	0.62 \pm 0.05	1.64 \pm 0.05*	61.00 \pm 1.22§	5.85 \pm 0.44§
Res+С1	8.02 \pm 0.14*	0.40 \pm 0.05*	69.14 \pm 2.50	0.68 \pm 0.07	1.48 \pm 0.05§	67.80 \pm 2.85§	4.65 \pm 0.10**§
Res+С2	8.28 \pm 0.13*	0.52 \pm 0.04*	67.10 \pm 0.85	0.47 \pm 0.05	1.42 \pm 0.03	65.80 \pm 0.80	4.72 \pm 0.42**§
Res+С3	8.37 \pm 0.21*	0.43 \pm 0.05*	64.56 \pm 2.04	0.35 \pm 0.02**§	1.56 \pm 0.03	66.30 \pm 1.14	4.86 \pm 0.37**§

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране СР са групама третираним С1/С2/С3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу СР/С1/С2/С3 групе са одговарајућом Res + СР/С1/С2/С3 групом.

Ниво тоталних протеина у односу на контролу остао је непромењен у свим испитиваним групама, изузев у групи третираној комплексом С3 где је забележен смањен ниво тоталних протеина за 7.77%. У односу на третман СР, третмани комплексима изазвали су смањење нивоа ТР до 12.3%.

Испитивани третмани такође нису имали утицаја на ниво триглицерида, изузев комбинованог третмана Res и комплексом С3 који је индуковао смањење нивоа ТГ у односу на контролу (за 46.15%) и у односу на третман комплексом С3 (за 35.18%).

Концентрација холестерола била је повећана након примене свих испитиваних третмана. Статистички значајно повећање нивоа Chl у односу на контролу (до 25.35%) индуковали су третмани СР, комплексом С1, комплексом С3 и комбиновани третман Res и СР. Комбиновани третмани Res и дериватима Рт утицали су на благо смањење нивоа Chl у односу на третмане СР и комплексима, са статистичком значајношћу забележеном само у групи животиња третираних комбинацијом Res и комплекса С1 (смањен ниво Chl за 16.85% у односу на групу третирану комплексом С1).

Концентрација креатинина измерена у серуму третираних животиња, није била значајно промењена у односу на контролу, изузев након третмана CP који је индуковао повећање концентрације Cre за 17.5%. Акутни третмани комплексима утицали су на смањење нивоа Cre у односу на третман CP до 23.93%, док су комбиновани третмани Res индуковали благи пораст у концентрацији Cre, статистички значајан након комбинованог третмана Res и комплексом C1 (за 10.12%) у односу на третман комплексом C1.

Након третмана испитиваним једињењима концентрација урее била је углавном значајно смањена у односу на контролу (до 61.98%). Изузетак је био третман CP који је утицао на значајан пораст концентрације урее (за 51.28%). У односу на третман CP, након третмана испитиваним комплексима концентрација урее је била значајно снижена (до 74.86%). Комбиновани третмани Res и комплексима у односу на групе животиња третиране само комплексима, индуковали су значајно повећање нивоа урее (до 104.2%), док је комбиновани третман Res и CP утицао на смањење концентрације урее (за 38.22%) у односу на третман CP.

2.3. Утицај третмана на редокс хомеостазу еритроцита, ћелија јетре и бубрега

Одржавање редокс хомеостазе неопходно је за нормално функционисање свих ћелија и ткива. Примена већине цитостатика у хемотерапији као контраиндикацију може имати нарушавање равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса. Као последица оксидативног дисбаланса јавља се оксидативни стрес који ланчаном продукцијом слободних радикала нарушава нормално функционисање здравих ћелија и ткива, изазивајући оштећења многих виталних органа.

У овој студији вршена је евалуација редокс потенцијала испитиваних једињења у еритроцитима, јетри и бубрезима експерименталних животиња. Мерена је продукција O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и липидних пероксида а такође и GSH и GSSG као маркера оксидативног стреса, као и активност ензима AOS-а у наведеним ткивима. Добијени резултати представљени су на **Графицима 14-45**.

2.3.1. Продукција реактивних врста кисеоника и азота и липидних пероксида у еритроцитима

Утицај испитиваних третмана на биомаркере оксидативног стреса у еритроцитима пацова приказан је на **Графицима 14-17**.

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана са ресвератролом на продукцију $O_2^{\cdot-}$ у еритроцитима експерименталних животиња приказан је на **Графику 14**.

Добијени резултати показују да је продукција $O_2^{\cdot-}$ након генерално свих испитиваних третмана (изузев комбинованог Res и комплекс C1 третмана) била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третмани CP, комплексом C2 и комплексом C3 који су индуковали повећање продукције $O_2^{\cdot-}$ за ~ 111%. Третмани комплексима су испољили исти ефекат као и третман CP, изузев третмана комплексом C1 који је индуковао значајно смањење концентрације $O_2^{\cdot-}$ за 15.11% у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и комплексима у односу на групе животиња третиране само комплексима, значајно су утицали на смањење концентрације $O_2^{\cdot-}$ (до 31.58%).

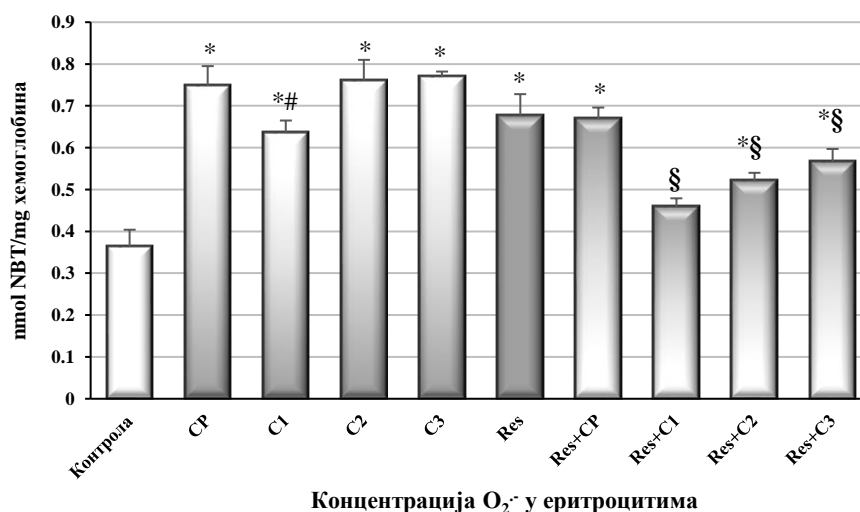


График 14. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију H_2O_2 у еритроцитима приказан је на **Графику 15**.

Добијени резултати показују да је продукција H_2O_2 након свих испитиваних третмана била значајно инхибирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат остварили су комбиновани третмани Res и комплексима C1, C2 и C3 који су снизили концентрацију H_2O_2 за ~ 47%. Третмани комплексима C2 и C3 су индуковали значајно смањење концентрације H_2O_2 (за 17.99% и за 25.28%) у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt (изузев комбинованог третмана Res и комплекса C3) значајно су смањили концентрације H_2O_2 (до 28.75%) у односу на групе животиња третиране само CP и комплексима.

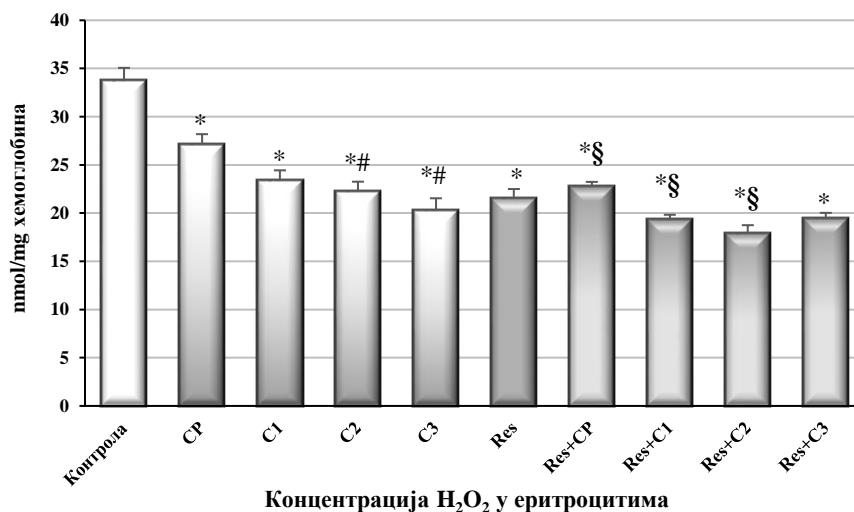


График 15. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију NO_2^- (индикатор NO) у еритроцитима приказан је на **Графику 16**.

Добијени резултати показују да је продукција NO_2^- након свих испитиваних третмана била значајно инхибирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третмани комплексом C2 и комплексом C3 који су снизили концентрацију NO_2^- за ~ 49%. Исти третмани индуковали су смањење концентрације NO_2^- за ~ 30% у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt нису значајно утицали на промену концентрације NO_2^- у односу на групе животиња третиране само CP и комплексима.

Утицај третмана на продукцију LPO у еритроцитима приказан је на **Графику 17**.

Добијени резултати показују да је концентрација LPO након третмана са комплексима као и након комбинованих третмана Res и комплексима била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C1 који је утицао на пораст концентрације LPO за 40.56%. Третман комплексом C1 такође је

индуковао значајно повећање концентрације LPO (за 19.11%) у односу на третман CP. Комбиновани третман Res и комплексом C1, као и третман Res и комплексом C3 утицали су на значајно смањење концентрације LPO (за 15.32% и за 19.43%) у односу на групе животиња третиране само комплексима C1 и C3.

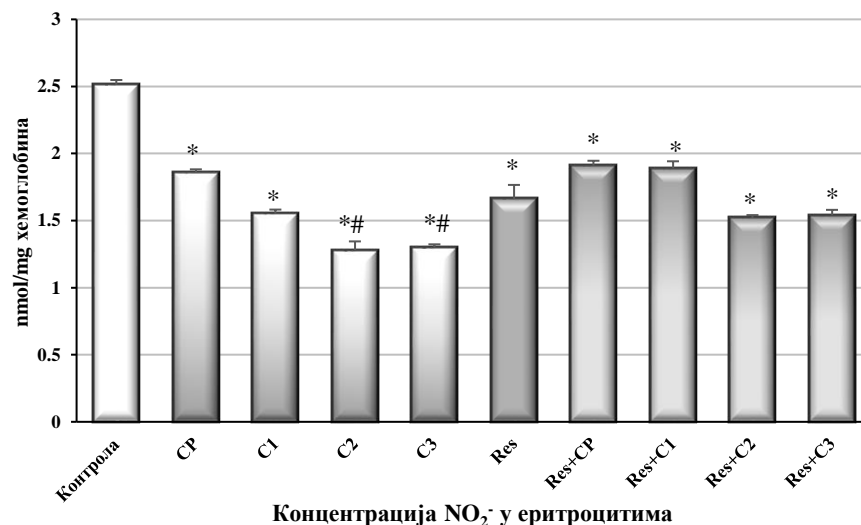


График 16. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења ± стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

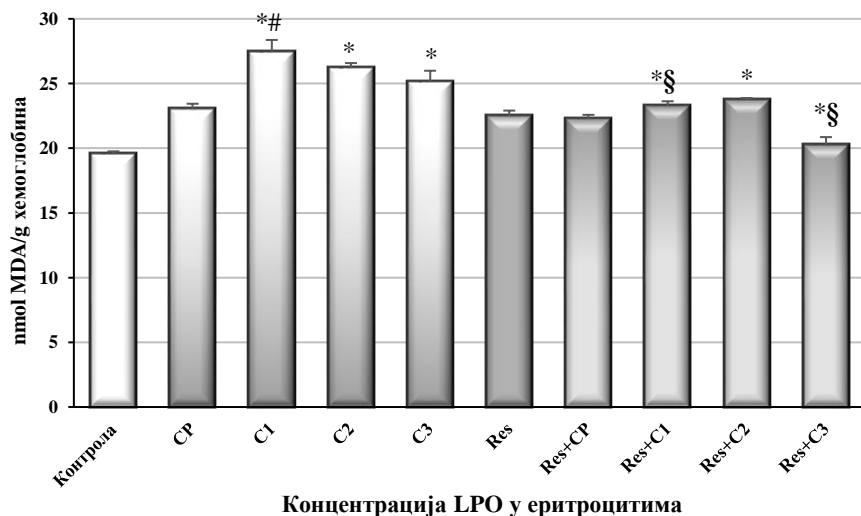


График 17. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења ± стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.2. Утицај третмана на компоненте AOS-а еритроцита

2.3.2.1. Продукција редукованог глутатиона

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на продукцију GSH у еритроцитима експерименталних животиња приказан је на **Графику 18**.

Добијени резултати показују да је продукција GSH након свих испитиваних третмана била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третман комплексом C3 и комбиновани третман Res и комплексом C2 који су утицали на повећање концентрације GSH за 105.49% и за 189.9%. Третмани комплекса индуковали су значајно повећање концентрације GSH у односу на третман CP. Највећи пораст концентрације од 94.87% евидентиран је након третмана комплексом C3. Комбиновани третмани Res и CP, као и Res и комплекса у односу на групе животиња третиране само CP и комплекса, утицали су на значајно повећање концентрације GSH. Највећа разлика у концентрацији (68.2%) забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C2.

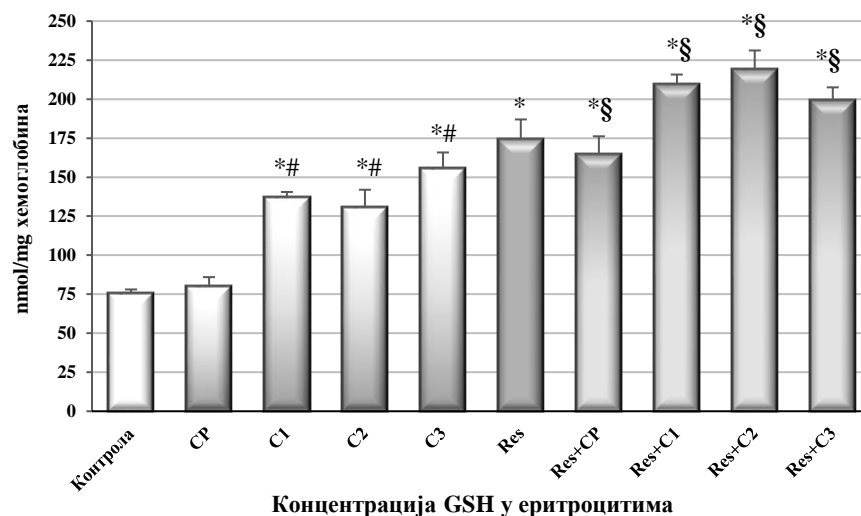


График 18. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.2.2. Активност ензима

Утицај испитиваних третмана на активност ензима AOS-а у еритроцитима приказан је на **Графицима 19-23**.

Резултати добијени мерењем активности SOD у еритроцитима третираних животиња приказани су на **Графику 19**. Резултати показују да је активност SOD након генерално свих испитиваних третмана била значајно инхибирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третман CP и комбиновани третман Res и комплексом C1 који су супримирали активност SOD за ~ 56%. Третмани комплекса C1 и C2 индуковали су значајно повећање активности SOD (за 37.41% и за 46.19%) у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и комплекса C1 и C2 значајно су смањили активност SOD (за 28.46% и за 27.41%) у односу на активност измерену у групама животиња третираних само комплекса C1 и C2.

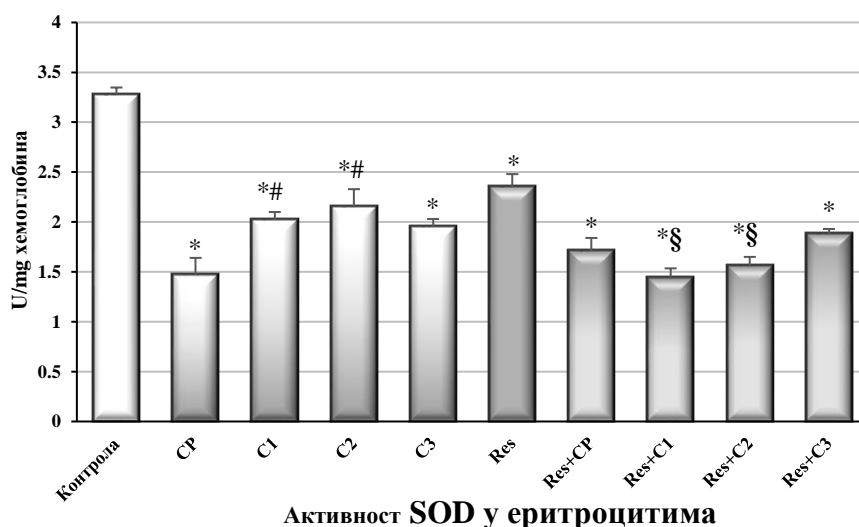


График 19. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност САТ у еритроцитима приказан је на **Графику 20**.

Добијени резултати показују да је активност САТ након третмана CP и комплекса била значајно супримирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C2 који је смањив активност САТ за 33.09%. Статистички значајна разлика у активности САТ након третмана комплекса у односу на третман CP није утврђена. Комбиновани третмани Res и дериватима Pt индуковали су повећану активност овог ензима у односу на третмане CP и комплекса, чиме су ниво активности САТ довели до нивоа измереног у контролној групи животиња. Статистички значајно повећана активност САТ забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C1, као и комбинованог третмана Res и комплексом C2 (за 41.24% и за 30.36%) у односу на третмане комплексом C1 и комплексом C2.

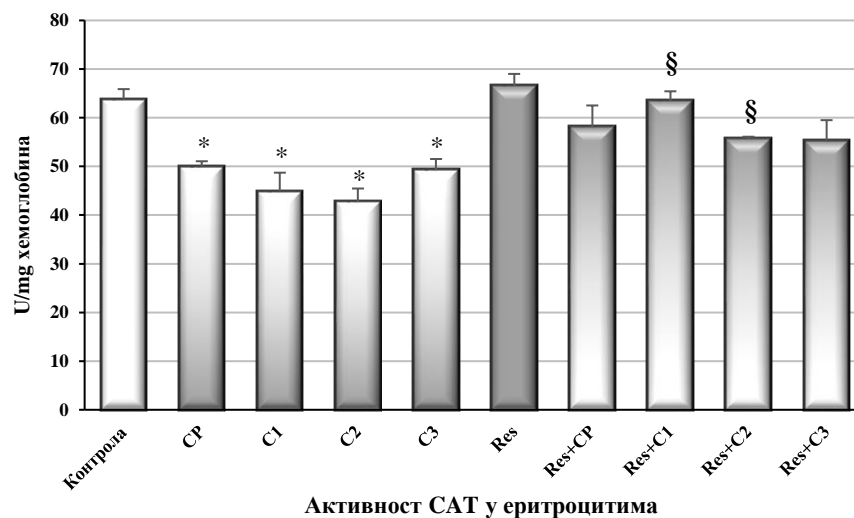


График 20. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност GSH-Px у еритроцитима приказан је на **Графику 21**. Добијени резултати показују да је активност GSH-Px након углавном свих испитиваних третмана (изузев комбинованог третмана Res и комплексом C2) била значајно инхибирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C1 који је супримирао активност GSH-Px за 38.71%. Статистички значајна разлика у активности GSH-Px након третмана комплексима у односу на третман CP није утврђена. Комбиновани третмани Res и комплексима C1 и C2 значајно су повећали активност GSH-Px (за 31.12% и за 32.39%) у односу на активност измерену у групама животиња третираних само комплексима C1 и C2, и тиме, ниво активности поменутог ензима приближили вредностима измереним у контролној групи животиња.

Утицај третмана на активност GR у еритроцитима приказан је на **Графику 22**. Добијени резултати показују да је активност GR након углавном свих испитиваних третмана (изузев третмана CP) била значајно супримирана (до 50.44% након третмана комплексом C3 и чак до 93.17% након комбинованог третмана Res и комплексом C2) у односу на контролу. Активност GR измерена након третмана комплексима C2 и C3 била је значајно снижена (за 24.29% и за 44.6%) у односу на активност измерену након третмана CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt, индуковали су вишеструки пад активности GR у односу на активност измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Најинтензивнија инхибиција активности евидентирана је након комбинованог третмана Res и комплексом C1 у односу на третман C1 (смањена активност за 84.39%).

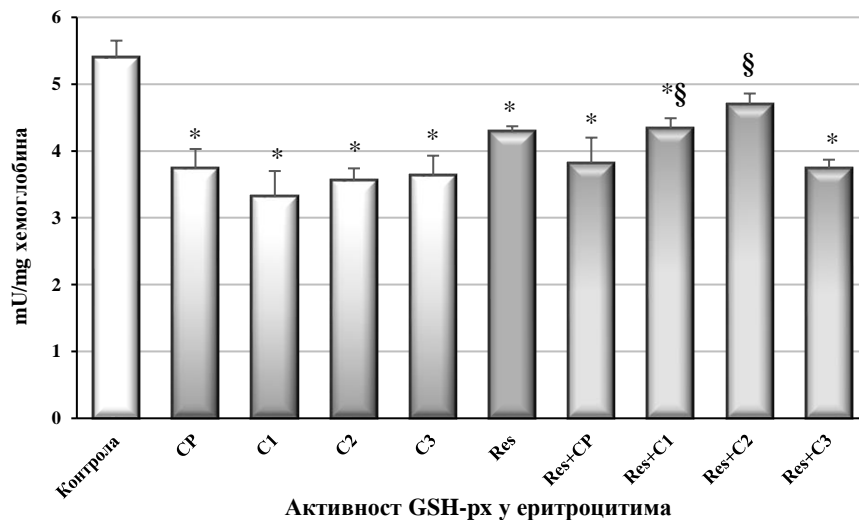


График 21. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

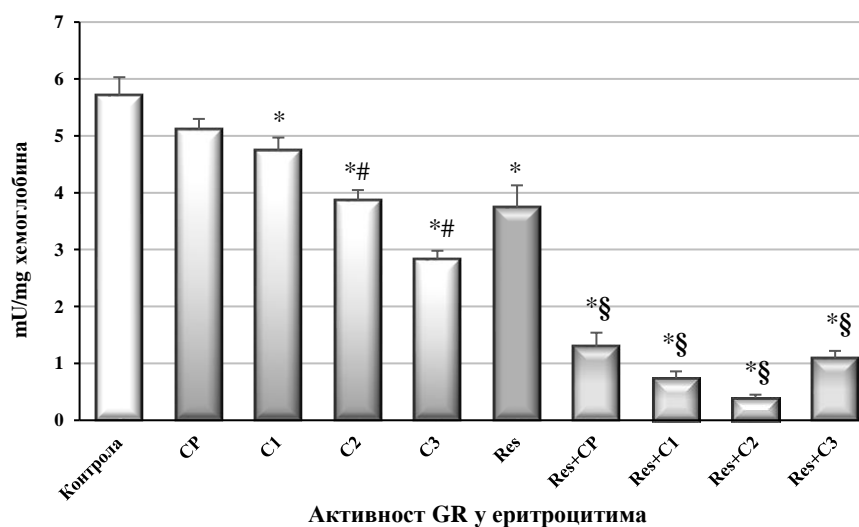


График 22. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност GST у еритроцитима приказан је на **Графику 23**. Добијени резултати су показали исти тренд активности GST након примене свих испитиваних третмана као активност GR. Наиме, активност GST је била значајно снижена у односу на активност измерену у контролној групи животиња. Најинтензивнији ефекат имали су третман комплексом C3 (63.8%) и комбиновани третмани Res и CP и Res и комплексом C2 који су смањили активност GST за ~ 74%. Активност GST измерена након третмана комплекса C2 и C3 била је значајно супримирана (за 33.15% и за 44.2%) у односу на активност измерену након третмана CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt, индуковали су вишеструки пад активности GST у односу на активност измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Највеће снижење активности од 63.53% забележено је након комбинованог третмана Res и CP у односу на третман CP.

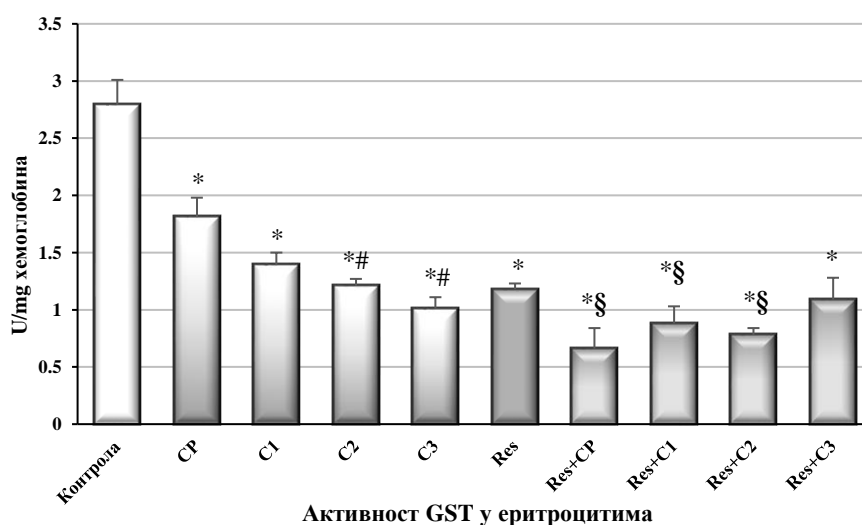


График 23. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.3. Продукција реактивних врста кисеоника и азота и липидних пероксида у јетри

Утицај испитиваних третмана на биомаркере оксидативног стреса у јетри пацова приказан је на **Графицима 24-27**.

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на продукцију $O_2^{\cdot-}$ у јетри експерименталних животиња приказан је на **Графику 24**.

Добијени резултати показују да је продукција $O_2^{\cdot-}$ након генерално свих испитиваних третмана била значајно смањена у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третман комплексом C3 и комбиновани третман Res и C1 који су инхибирали продукцију $O_2^{\cdot-}$ смањујући ниво овог параметра за ~ 38.4%. Третмани комплекса C2 и C3 утицали су на значајно снижење концентрације $O_2^{\cdot-}$ (за 17.24% и за 22.4%) у односу на концентрацију измерену након третмана CP. Комбинован третман Res и CP као и комбиновани третман Res и комплексом C1 индуковали су благи пад у концентрацији $O_2^{\cdot-}$ (за 15.52% и за 20%) у односу на концентрацију измерену у групама животиња третираних само CP и комплексом C1.

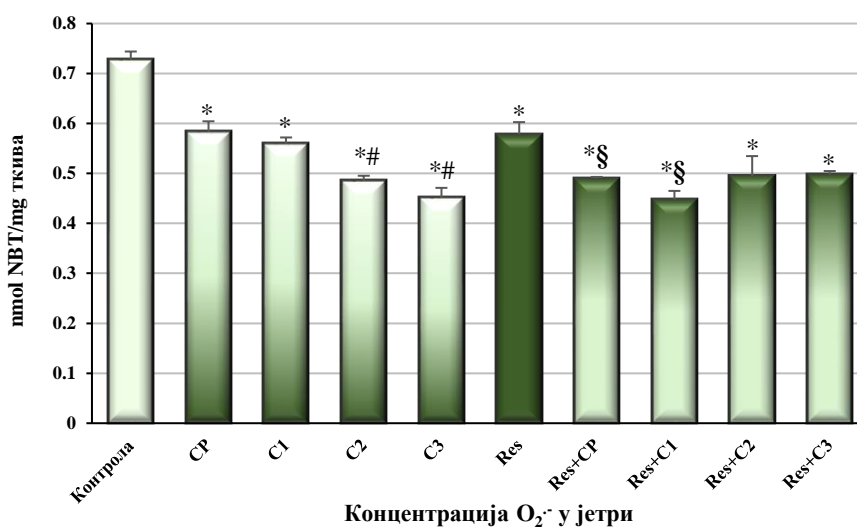


График 24. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију H_2O_2 у јетри приказан је на **Графику 25**.

Добијени резултати показују да продукција H_2O_2 након свих испитиваних третмана није била значајно промењена у односу на контролу, изузев након комбинованог третмана Res и CP где је забележена значајно повећана концентрација H_2O_2 (за 12.8%). Такође, исти третман је индуковао и значајно повећану продукцију H_2O_2 (за 13%) у односу на третман CP.

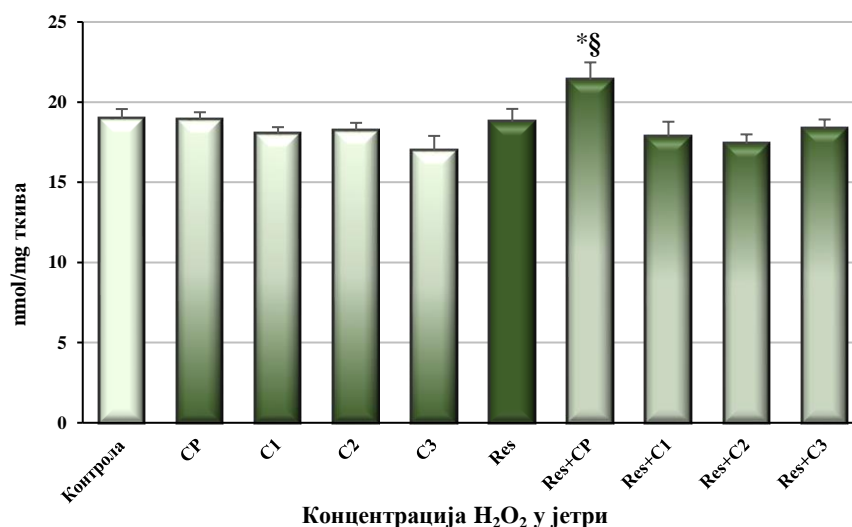


График 25. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију NO₂⁻ у јетри приказан је на **Графику 26**.

Добијени резултати показују да је продукција NO₂⁻ након третмана CP, комплексом C2, комплексом C3, Res, као и након комбинованог третмана Res и комплексом C2, била значајно инхибирана у односу на контролу, док је након комбинованих третмана Res и комплекса C1 и C3 концентрација NO₂⁻ била значајно повећана у односу на контролу. Такође је уочено повећање продукције NO₂⁻ након третмани свим испитиваним комплексима у односу на концентрацију NO₂⁻ детектовану након третмана CP. Највећа разлика у односу на контролу евидентирана је након третмана CP (концентрација NO₂⁻ редукована за 62.11%), док је највећа разлика у деловању комплекса у односу на третман CP забележена након третмана комплексом C1 (повећана продукција NO₂⁻ за 134.43%). Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt индуковали су значајно повећање концентрације NO₂⁻ у односу на групе животиња третиране само CP и комплексима. Најинтензивнији ефекат имали су комбиновани третмани Res и CP у односу на CP (повећана продукција NO₂⁻ за 145.24%) и Res и комплексом C3 у односу на комплекс C3 (повећана продукција NO₂⁻ за 60.17%).

Утицај третмана на продукцију LPO у јетри приказан је на **Графику 27**.

Добијени резултати показују да је концентрација LPO након третмана комплексима била значајно смањена, док је након комбинованих третмана Res и комплексима била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат смањења концентрације LPO (за 48.59%) у односу на контролу имао је третман комплексом C3, док је комбиновани третман Res и комплексом C1 индуковао најзначајнији пораст концентрације LPO (за 39.86%) у односу на контролу. Комбиновани третмани Res и испитиваним комплексима индуковали су значајно повећање концентрације LPO у односу на групе животиња

третиране само комплексима. Најинтензивнији ефекат имао је комбиновани третман Res и C1 у односу на C1 (повећана продукција LPO за 127.23%).

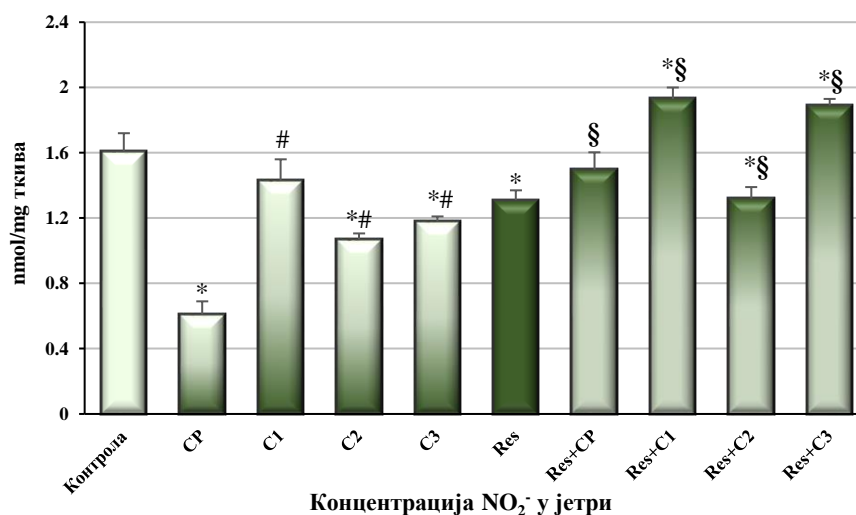


График 26. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

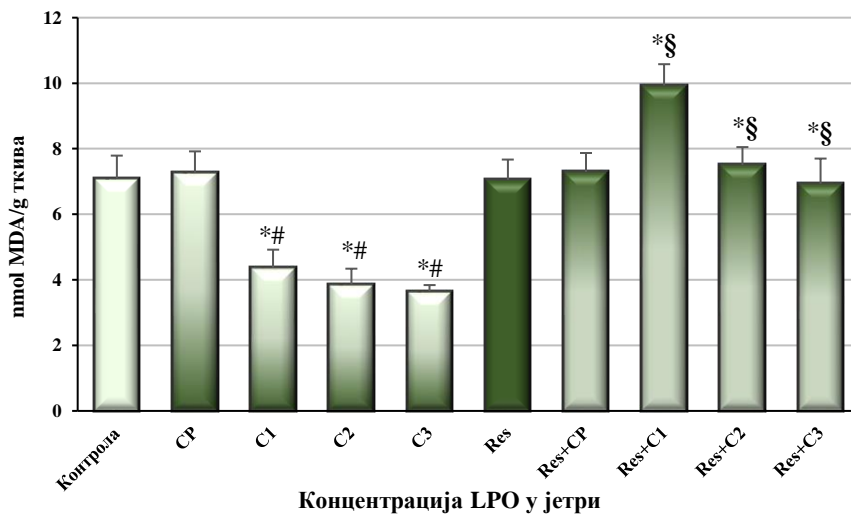


График 27. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.4. Утицај третмана на компоненте AOS-а јетре

2.3.4.1. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на продукцију GSH у јетри експерименталних животиња приказан је на **Графику 28**.

Добијени резултати показују да је продукција GSH након свих испитиваних третмана била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C3 који је индуковао повећање концентрације GSH за 53.61% у односу на контролу. Третмани комплексима утицали су на значајно повећање концентрације GSH у односу на третман CP, где је такође третман комплексом C3 имао најинтензивнији ефекат (забележен је пораст концентрације GSH за 21.7%). Комбиновани третмани Res и испитиваним комплексима у односу на групе животиња третиране сам комплексима, утицали су на значајно смањење концентрације GSH. Највећа разлика у паду концентрације (22.65%) евидентирана је након комбинованог третмана Res и комплексом C3 у односу на третман комплексом C3.

Утицај третмана на продукцију GSSG у јетри експерименталних животиња приказан је на **Графику 29**.

Добијени резултати показују да је концентрација GSSG након генерално свих испитиваних третмана била значајно снижена у односу на контролу. Вишеструки пад концентрације детектован је након третмана комплексима, где је ниво GSSG био смањен за ~ 85% у односу на контролу. Такође, концентрација GSSG измерена након третмана комплексима била је значајно снижена (за ~ 68%) у односу на концентрацију измерену након третмана CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt, индуковали су пораст концентрације GSSG у односу на концентрацију измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Највећа разлика у продукцији GSSG (пораст концентрације за чак 275%) забележена је након комбинованог третмана Res и C3 у односу на третман комплексом C3.

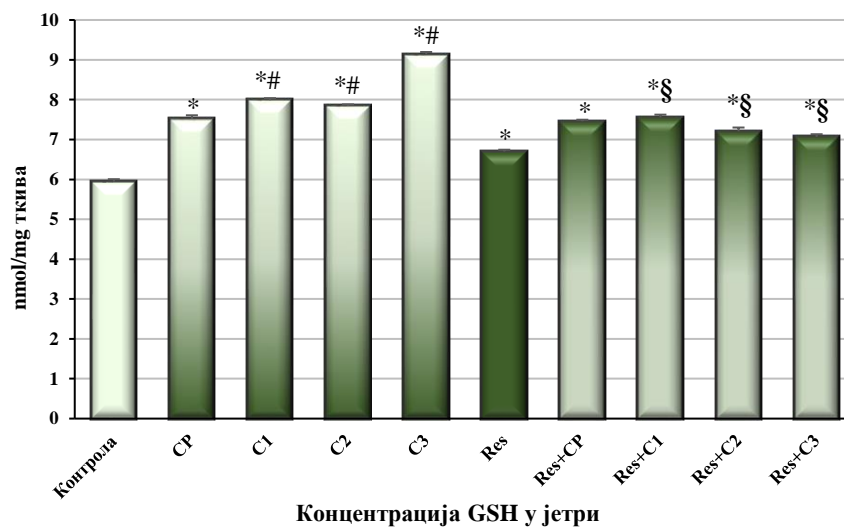


График 28. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

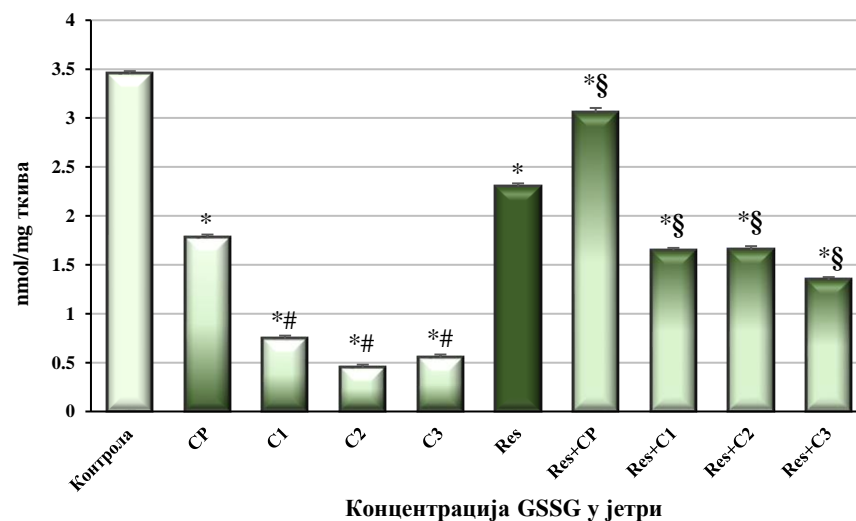


График 29. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатиона у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.4.2. Активност ензима

Утицај испитиваних третмана на активност ензима AOS-а у јетри приказан је на **Графицима 30-34**.

Резултати добијени мерењем активности SOD у јетри третираних животиња приказани су на **Графику 30**. Резултати показују да је активност SOD након третмана комплексима повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C3 који је утицао на повећану активност SOD за 35.61%. Третмани комплексима C1 и C3 такође су индуковали значајно повећање активности SOD (за 17.97% и за 25.17%) у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и комплексима значајно су супримирали активност SOD у односу на активност измерену у групама животиња третираних само комплексима. Највећа разлика у активности овог ензима (смањена активност за 21.92%) забележена је након комбинованог третмана Res и C3 у односу на третман комплексом C3.

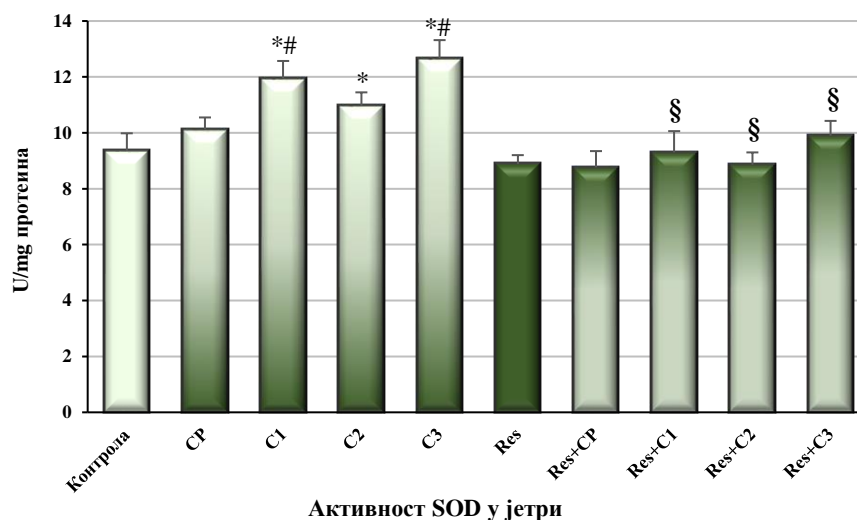


График 30. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност САТ у јетри експерименталних животиња приказан је на **Графику 31**.

Добијени резултати показују да је активност САТ након генерално свих испитиваних третмана (изузев третмана CP) била значајно супримирана у односу на контролу. Значајна промена активности овог ензима након третмана испитиваним комплексима у односу на третман CP није забележена. Комбиновани третмани Res и једињењима Pt индуковали су додатно смањење активност САТ, за $\sim 48.7\%$ у односу на контролу и за $\sim 30\%$ у односу на третмане комплексима. Највећа инхибиција активности САТ (за 45.56%) евидентирана је након примене комбинованог третмана Res и CP у односу на третман CP.

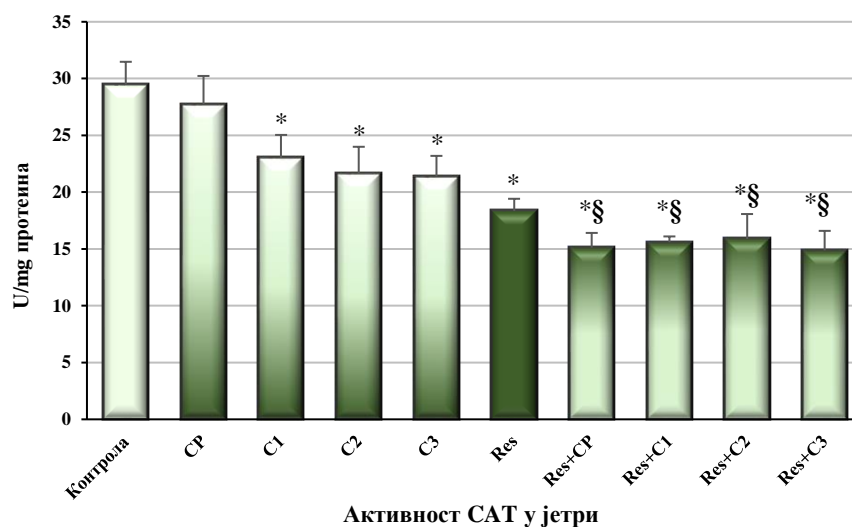


График 31. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност GSH-Px у јетри приказан је на **Графику 32**.

Добијени резултати показују да је активност GSH-Px након свих испитиваних третмана била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C3 који је индуковао повећање активности GSH-Px за 33% у односу на контролу. Третмани комплексима C1 и C3 утицали су на значајно повећање активности GSH-Px у односу на третман CP, где је такође третман комплексом C3 имао најинтензивнији ефекат (евидентан је пораст активности GSH-Px за 12.94%). Комбиновани третмани Res и испитиваним комплексима у односу на групе животиња третиране само комплексима, нису значајно утицали на активност GSH-Px, изузев третмана Res и комплексом C3 након кога је активност овог ензима била супримирана (за 13.59%) у односу на активност измерену након третмана комплексом C3.

Утицај третмана на активност GR у јетри приказан је на **Графику 33**.

Добијени резултати показују да је активност GR након третмана комплексима повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имали су третмани комплексима C1 и C3 који су утицали на повећану активност GR за ~ 41.85%. У односу на третман CP, третмани комплексима нису показали значајну разлику у ефектима на активност овог ензима. Комбиновани третмани Res и комплексима значајно су супримирали активност GR у односу на активност измерену у групама животиња третираних само комплексима, и тиме су активност ензима sveli приближно на ниво активности измерен у контролној групи животиња. Највећа промена у активности овог ензима евидентирана је након комбинованог третмана Res и комплексом C1 у односу на третман комплексом C1 (смањена активност за 36.06%)

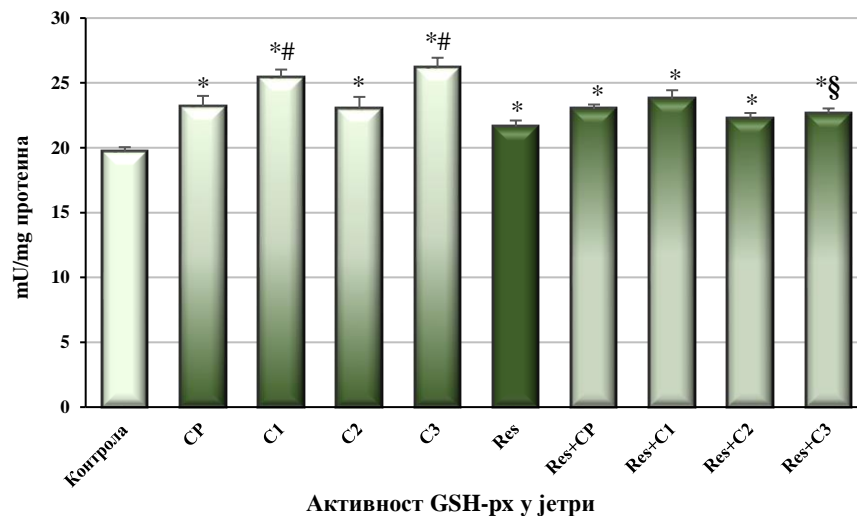


График 32. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

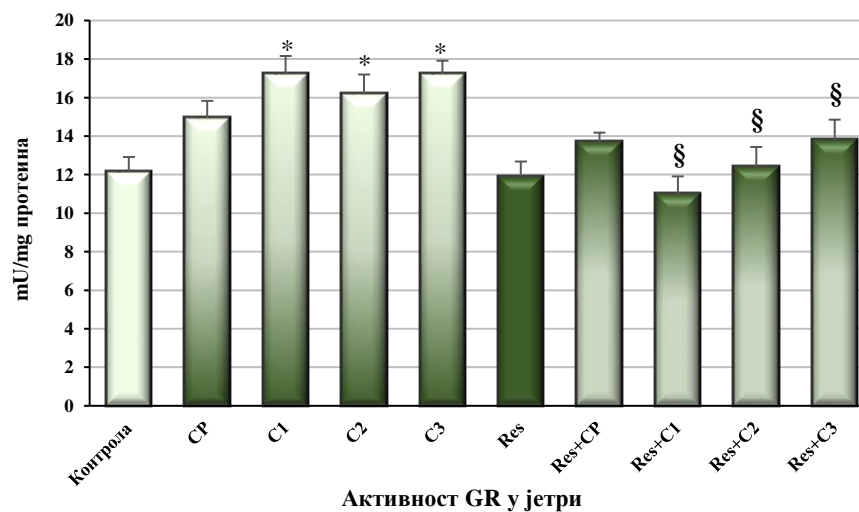


График 33. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност GST у јетри приказан је на **Графику 34**.

Добијени резултати показују да је активност GST након третмана CP и комплексима (изузев комплекса C2) повећана у односу на контролу (за ~ 30%), док је након комбинованог третмана Res и комплексом C3 активност GST била супримирана (за 28.53%) у односу на контролу. У односу на третман CP, третмани комплексима нису показали значајну разлику у деловању на активност овог ензима. Комбиновани третмани Res и CP као и третмани Res и комплексима (изузев комплексом C2) значајно су смањили активност GST у односу на активност измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Највећа промена у активности GST забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C3 (смањена активност за 43.39%) у односу на третман комплексом C3.

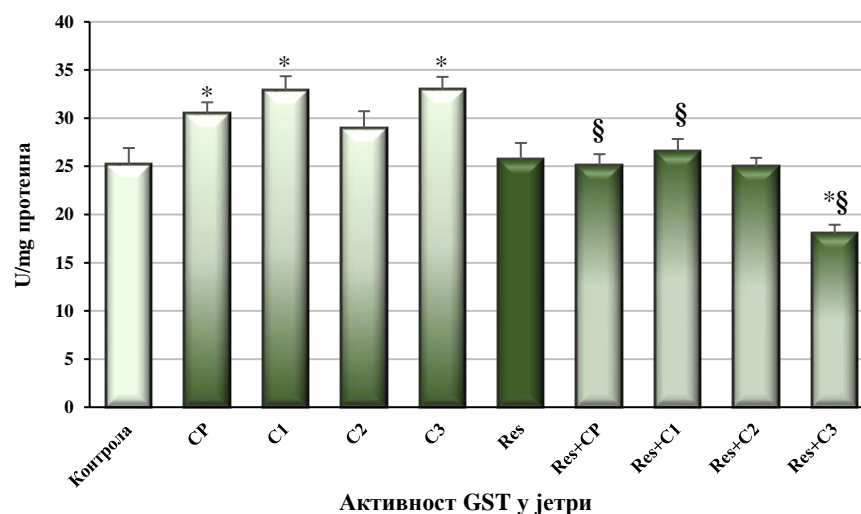


График 34. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у јетри контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.5. Продукција реактивних врста кисеоника и азота у бубрегу

Утицај испитиваних третмана на биомаркере оксидативног стреса у јетри пацова приказан је на **Графицима 35-38**.

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана са ресвератролом на продукцију $O_2^{\cdot-}$ у бубрегу експерименталних животиња приказан је на **Графику 35**.

Добијени резултати показују да је продукција $O_2^{\cdot-}$ након генерално свих испитиваних појединачних третмана била значајно смањена у односу на контролу, док је значајно смањење концентрације након комбинованих третмана забележено само након третмана Res и комплексом C3. Најинтензивнији ефекат у односу на контролу имао је третман комплексом C1 (смањена концентрација $O_2^{\cdot-}$ за 61%). Такође, третман комплексом C1 је једини индуковао статистички значајан пад нивоа $O_2^{\cdot-}$ (за 48%) у односу на ниво измерен након третмана CP. Концентрација $O_2^{\cdot-}$ у бубрезима животиња третираних комбинацијом Res и CP, Res и C1, Res и C2, није била промењена у односу на контролу, док се у односу на концентрацију измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима, концентрација $O_2^{\cdot-}$ вишеструко повећала након примене свих испитиваних комбинованих третмана. Највећа промена у концентрацији $O_2^{\cdot-}$ забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C1 у односу на третман комплексом C1 (повећана концентрација за 176.92%).

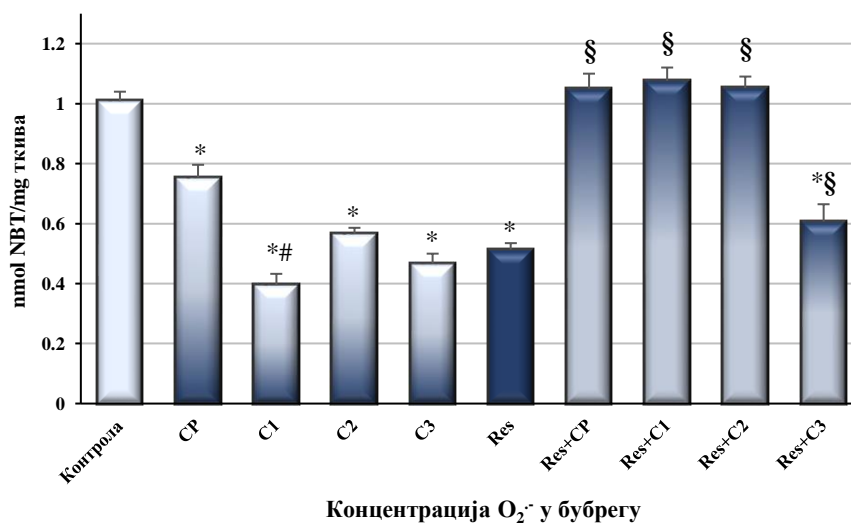


График 35. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију H_2O_2 у бубрегу приказан је на **Графику 36**.

Добијени резултати показују да продукција H_2O_2 након свих испитиваних третмана није била значајно промењена у односу на контролу, изузев након третмана CP и комплексом C2 где је евидентирана значајно смањена концентрација H_2O_2 (за $\sim 21.7\%$). Такође, забележена је значајна разлика у концентрацији овог параметра у бубрезима животиња третираних комплексом C1 и комплексом C3 у односу на третман CP (пораст концентрације за $\sim 29.32\%$).

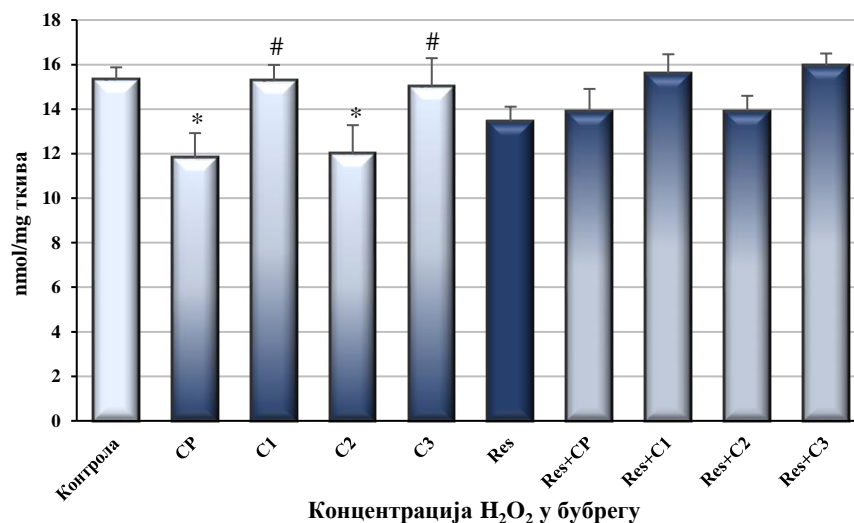


График 36. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију NO_2^- у бубрегу приказан је на **Графику 37**.

Добијени резултати показују да је продукција NO_2^- након третмана CP, комплексом C1, комплексом C3, као и након комбинованих третмана Res и комплексима C1 и C3, била значајно повећана у односу на контролу. Највећа разлика у односу на контролу евидентирана је након третмана комплексом C1 (концентрација NO_2^- повећана за 59.22%). Статистички значајна разлика у концентрацији NO_2^- у односу на третман CP забележена је након третмана комплексом C1 (повећана концентрација за 24.24%) и након третмана комплексом C2 (смањена концентрација за 14.39%). Комбиновани третмани Res и испитиваним једињењима Pt индуковали су значајно смањење концентрације NO_2^- у односу на групе животиња третиране само CP и комплексима (изузев комбинованог третмана Res и комплексом C3). Највећа промена у концентрацији NO_2^- забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C1 у односу на третман комплексом C1 (смањена концентрација за 26.83%).

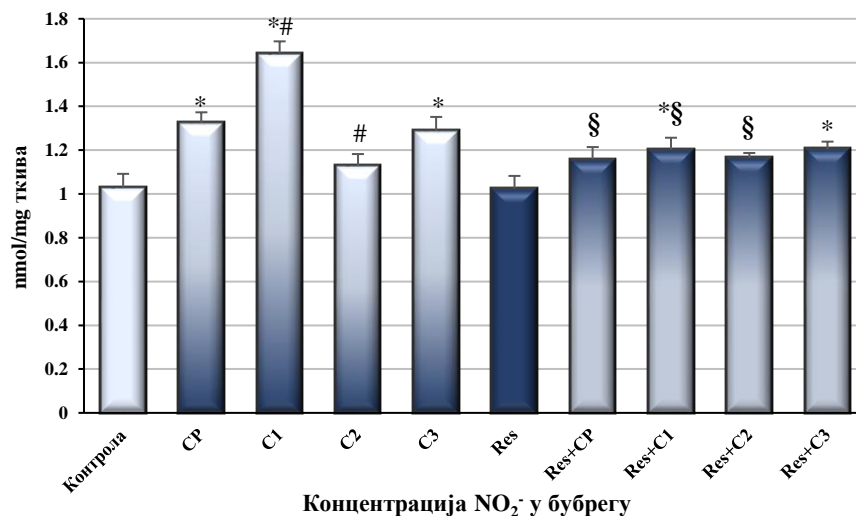


График 37. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију LPO у бубрегу приказан је на **Графику 38**.

Добијени резултати показују да је концентрација LPO након генерално свих третмана (изузев третмана Res) била значајно повећана у односу на контролу. Највећа продукција LPO у односу на контролу, евидентирана је након третмана CP (за 74.27%) и након третмана комплексом C3 (за 57.27%) и комбинованих третмана Res и CP и Res и комплексом C3 (за ~ 79%). Концентрација LPO измерена након третмана комплексима C1 и C2 била је значајно снижена (за 19.77% и за 29.4%) у односу на концентрацију измерену након третмана CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt индуковали су повећање концентрације LPO у односу на групе животиња третиране само комплексима, статистички значајно само након комбинованих третмана Res и комплексима C2 и C3 (повећање концентрације за 28.73% и за 15.08%).

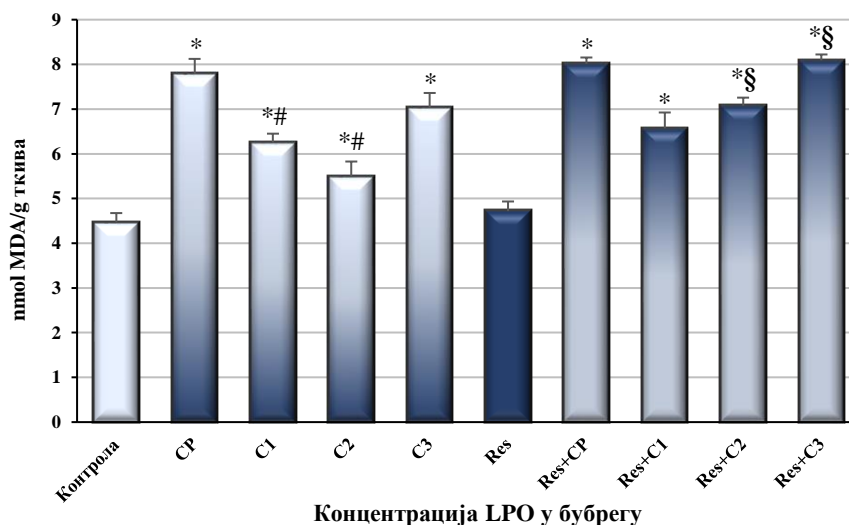


График 38. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.6. Утицај третмана на компоненте AOS-а бубрега

2.3.6.1. Продукција редукованог и оксидованог глутатиона

Утицај испитиваних једињења и њихових котретмана ресвератролом на продукцију GSH у бубрегу експерименталних животиња приказан је на **Графику 39**.

Добијени резултати показују да је продукција GSH након свих испитиваних третмана била значајно повећана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C1 који је индуковао повећање концентрације GSH за 38.5% у односу на контролу, као и комбиновани третмани Res и CP и Res и комплексом C1 који су индуковали повећање концентрације GSH за $\sim 43\%$. Третмани комплекса C1 и C3 утицали су на значајно повећање концентрације GSH у односу на третман CP (за $\sim 16\%$). Комбиновани третмани Res и испитиваним комплексима у односу на групе животиња третиране само комплексима, нису значајно утицали на промену концентрације GSH. Изузетак је био комбиновани третман Res и CP који је утицао на значајно повећан ниво GSH (за 23.82%) у односу на третман CP.

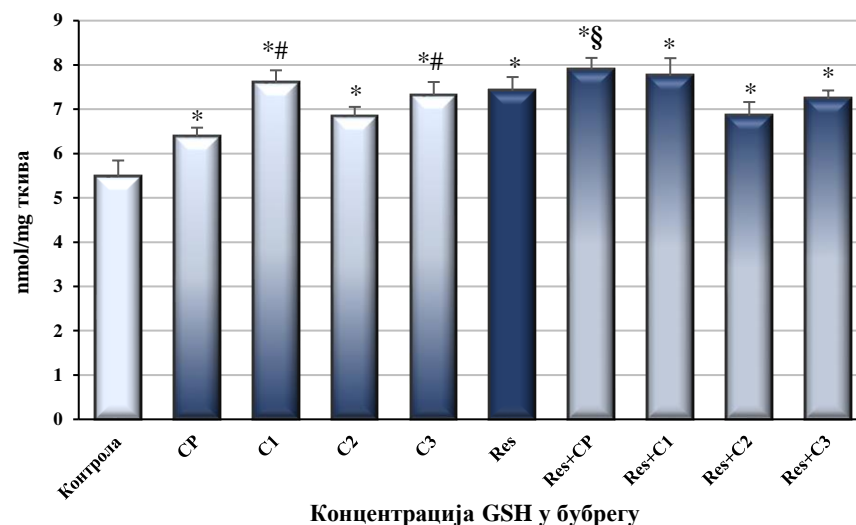


График 39. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на продукцију GSSG у бубрегу експерименталних животиња приказан је на **Графику 40**.

Добијени резултати показују да је концентрација GSSG након генерално свих испитиваних третмана била значајно снижена у односу на контролу. Од испитиваних једињења Pt, најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C1 након кога је концентрација GSSG била смањена за 69.6% у односу на контролу. Вишеструки пад концентрације детектован је и након комбинованих третмана Res и CP и Res и комплексом C1 (за ~ 83.5%). Такође, концентрација GSSG измерена након третмана комплекса C1 и C3 била је значајно снижена (за 47.71% и за 20.18%) у односу на концентрацију измерену након третмана CP. Комбиновани третмани Res и испитиваним једињењима Pt, индуковали су додатни пад концентрације GSSG у односу на концентрацију измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Највећа промена концентрације GSSG забележена је након комбинованог третмана Res и CP у односу на третман CP (пад концентрације за 73.85%).

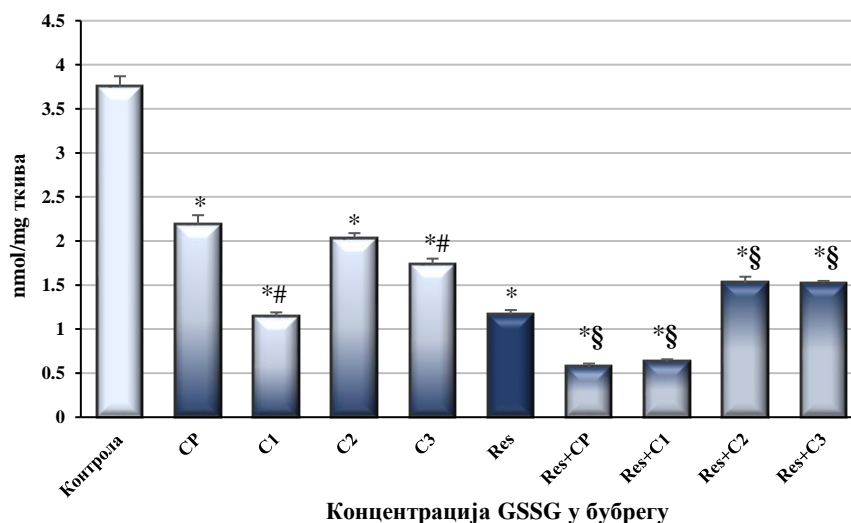


График 40. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатионау бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.3.6.2. Активност ензима

Утицај испитиваних третмана на активност ензима AOS-а у бубрегу приказан је на **Графицима 41-45**.

Резултати добијени мерењем активности SOD у бубрегу третираних животиња приказани су на **Графику 41**. Резултати показују да је активност SOD након третмана CP и комплекса (изузев комплекса C2) повећана у односу на контролу (за од 14.55 до 23.9%). Такође, повећана активност овог ензима у односу на контролу евидентирана је након комбинованих третмана Res и комплексом C1 и Res и комплексом C3 (за ~ 16.5%). У односу на третман CP, третмани комплекса нису показали значајну разлику у деловању на активност овог ензима. Комбиновани третмани Res и испитиваним комплексима у односу на групе животиња третиране само комплексима, нису значајно утицали на промену активности SOD, док је комбиновани третман Res и CP значајно супримирао активност SOD (за 18.25%) у односу на третман CP.

Утицај третмана на активност CAT у бубрегу експерименталних животиња приказан је на **Графику 42**.

Добијени резултати показују да је активност CAT након углавном свих испитиваних третмана (изузев комбинованих третмана Res и комплекса) била значајно инхибирана у односу на контролу. Најинтензивнији ефекат имао је третман комплексом C3 након кога је активност CAT била супримирана за 25.91% у односу на контролу. Значајна промена активности овог ензима након третмана испитиваним комплексима у односу на третман CP није забележена. Комбиновани третмани Res и комплекса C1 и C2 индуковали су значајан пораст активности CAT, у односу на третмане комплекса C1 и C2 (за 17.4% и за

23%), и тиме вратили ниво активности овог ензима приближно нивоу евидентираним у контролној групи животиња.

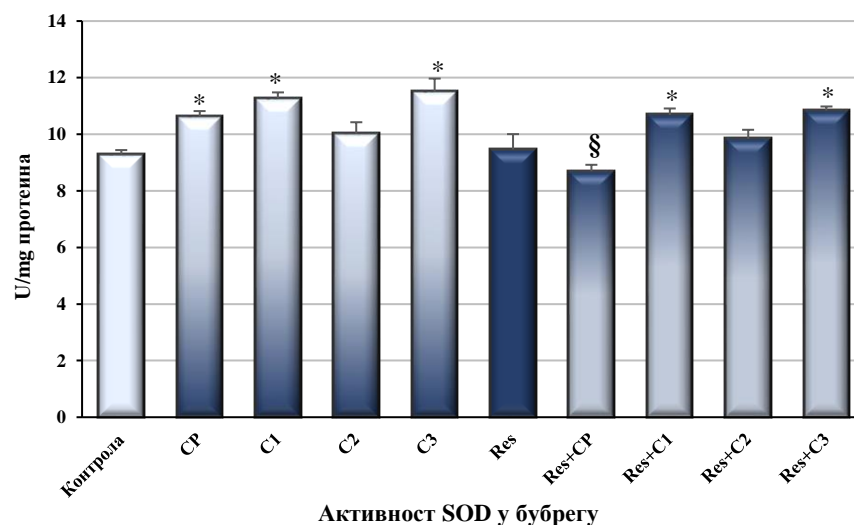


График 41. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

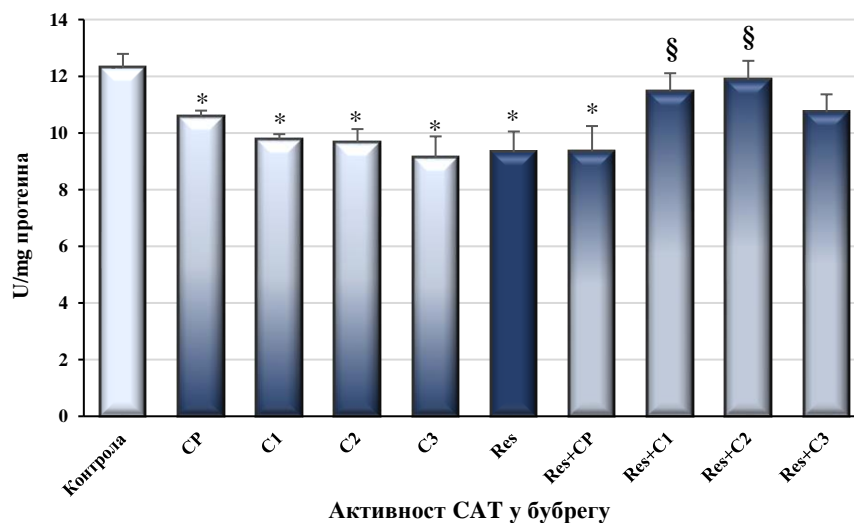


График 42. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

Утицај третмана на активност GSH-Px у бубрегу приказан је на **Графику 43**.

Добијени резултати показују да је активност GSH-Px након третмана комплексима била значајно повећана у односу на контролу (за ~ 21%), док је након третмана CP и свих испитиваних комбинованих третмана активност GSH-Px била инхибирана у односу на контролу (и до 51.87%). Третмани комплексима утицали су на значајно повећање активности GSH-Px у односу на третман CP (за ~ 57%). Комбиновани третмани Res и CP и Res и комплексима, супримирали су активност GSH-Px у односу на групе животиња третиране само CP и комплексима. Највећа промена у активности овог ензима евидентирана је након комбинованог третмана Res и комплексом C3 у односу на третман са комплексом C3 (активност ензима снижена за 42.3%).

Утицај третмана на активност GR у бубрегу приказан је на **Графику 44**.

Добијени резултати показују да је активност GR након третмана CP, комплексима, Res и након комбинованог третмана Res и CP била значајно супримирана у односу на контролу, док је комбиновани третман Res и C2 утицао на повећану активност овог ензима. Најинтензивнији ефекат имао је третман CP који је инхибирао активност GR за 16.08%. У односу на третман CP, третмани са испитиваним комплексима утицали су на значајно повећање активности GR (за ~ 5.5%). Комбиновани третмани Res и испитиваним једињењима, значајно су повећали активност GR у односу на активност измерену у групама животиња третираних само CP и комплексима. Највећа промена у активности овог ензима забележена је након комбинованог третмана Res и комплексом C3 у односу на третман комплексом C3 (повећана активност за 15.11%).

Утицај третмана на активност GST у бубрегу приказан је на **Графику 45**.

Добијени резултати показују да је активност GST након третмана комплексима C1 и C3, као и након комбинованих третмана Res и свим испитиваним комплексима била повећана у односу на контролу (од 13.54% до 27.72%). Преостали третмани нису индуковали значајне промене у активности овог ензима у односу на контролну групу. Такође, значајне промене нису евидентирание ни након третмана комплексима у односу на третман CP. Комбиновани третмани Res и комплексима утицали су на благи пораст активности GST у односу на активност измерену у групама животиња третираних само комплексима, међутим, за наведене промене у активности GST није утврђена статистичка значајност.

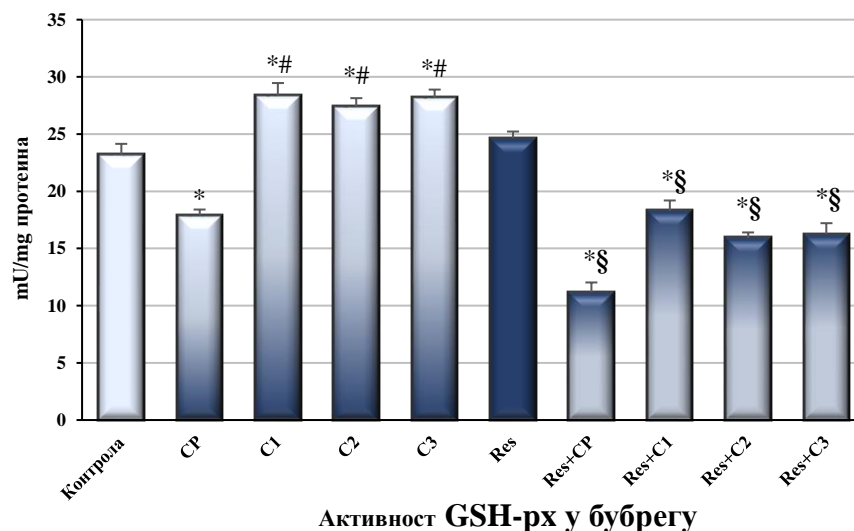


График 43. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

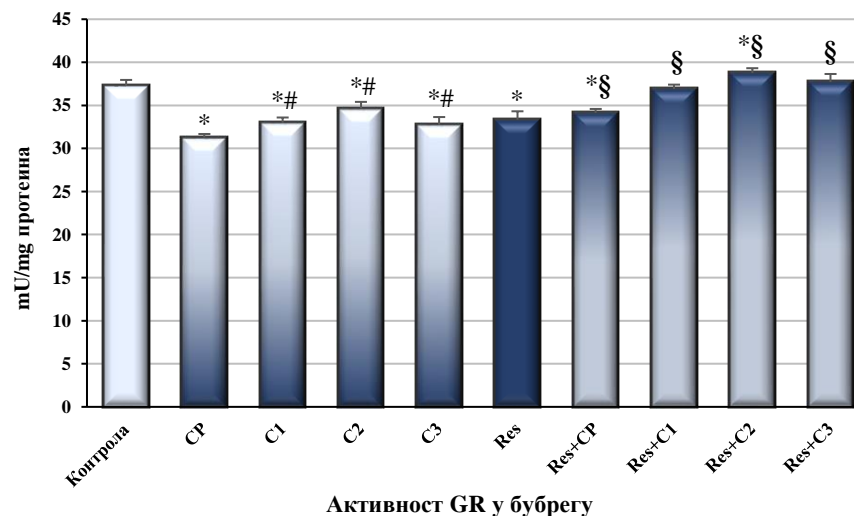


График 44. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

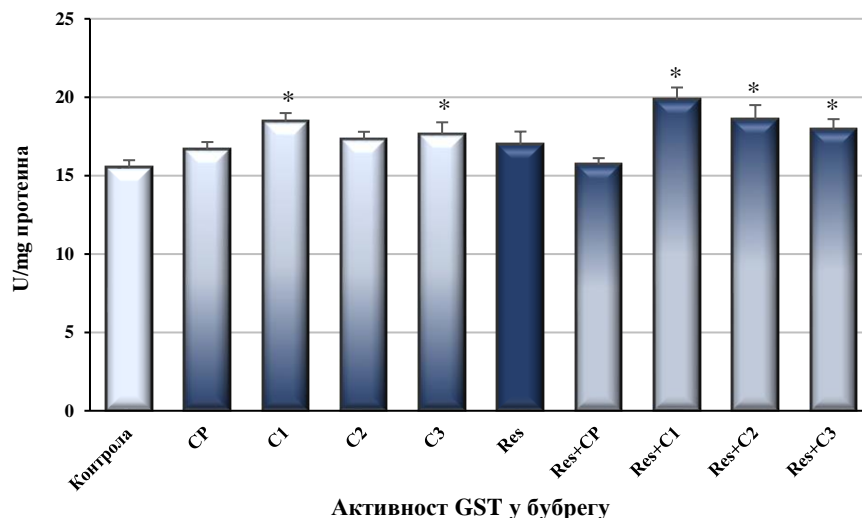


График 45. Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у бубрегу контролне и експерименталних група.

Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка ($n = 6$ животиња).

* $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу са контролом;

$p < 0.05$, статистички значајно у поређењу групе третиране CP са групама третираним C1/C2/C3;

§ $p < 0.05$, статистички значајно у поређењу CP/C1/C2/C3 групе са одговарајућом Res + CP/C1/C2/C3 групом.

2.4. Утицај третмана на хистопатолошке промене ткива јетре и бубрега

Будући да употреба регистриваних хемотерапеутика, на првом месту цисплатине, за последицу има низ нежељених ефеката, као што су нефротоксичност, хепатотоксичност и неуротоксичност (Lomeli и сар., 2017; Вороја и сар., 2018), у овој студији вршена је евалуација ефеката испитиваних једињења на хистопатолошке параметре ткива јетре и бубрега.

Добијени резултати представљени су на **Табелама 12 и 13** и **Сликама 19 и 20**.

2.4.1. Морфолошки параметри јетре

Резултати добијени након хистопатолошке евалуације ткива јетре приказани су у **Табели 12** и на **Слици 19**. Значајне морфолошке и хистолошке промене ткива у контролној групи животиња нису детектоване, док су у групама изложеним испитиваним третманима значајне промене забележене и класификоване на следећи начин: (-) без промене; (+) благо; (++) умерено; (+++) значајно. На основу учесталости промена, одабране су репрезентативне слике које показују хистопатолошке промене ткива јетре у оквиру испитиване групе (**Слика 19**).

Табела 12. Збирне морфолошке промене ткива јетре контролне и експерименталних група.

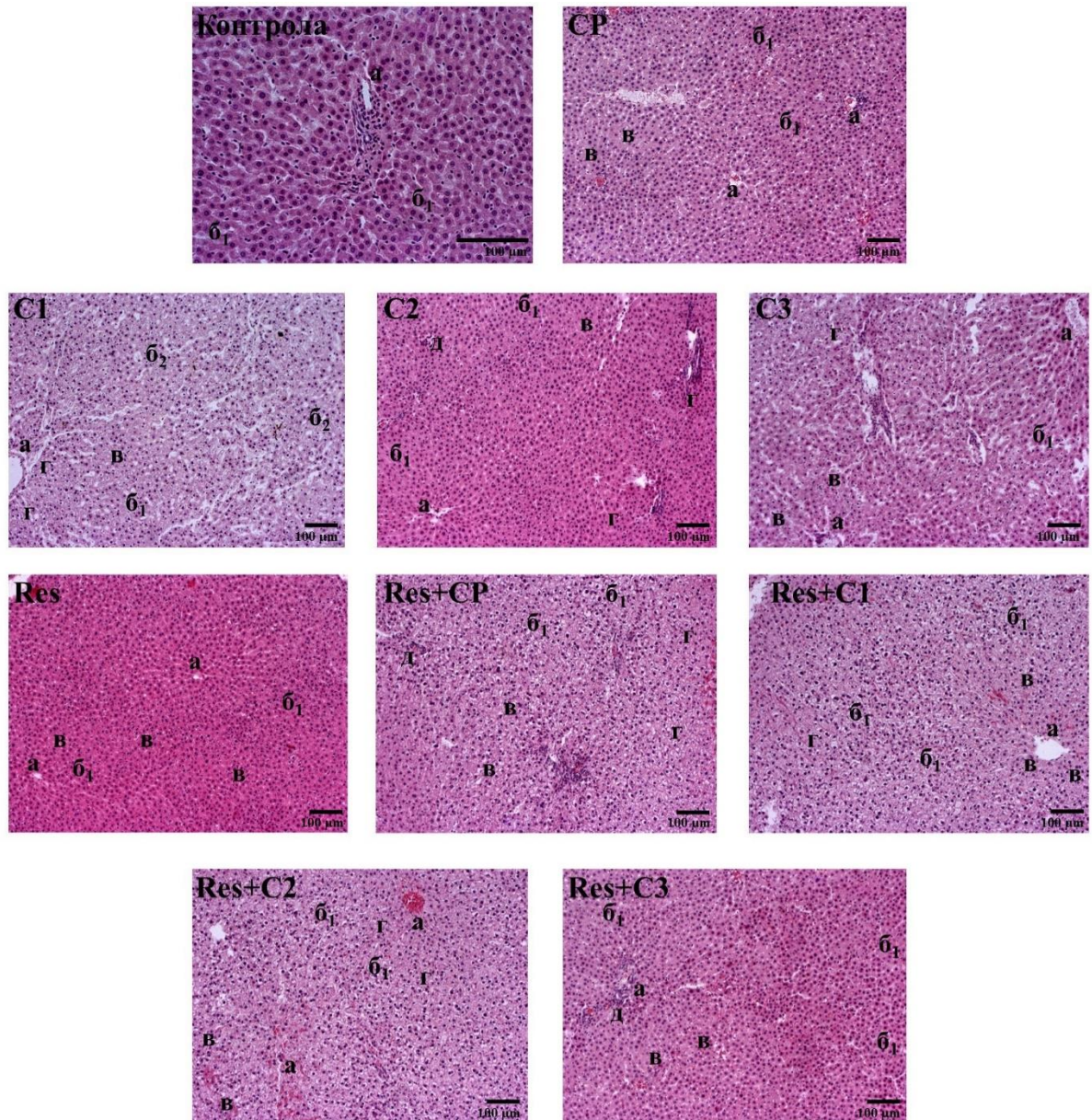
Групе	Хистопатолошке промене ткива						
	Синусоидна дилатација	Хидропсна и балонска дегенерација	Фокална некроза	Конфлуентна некроза	Хиперплазија Купферових ћелија	Инфилтрација лимфоцита	Фиброза
Контрола	+ ^a	+	-	-	-	+	-
CP	++	++	+	-	+	+	-
C1	++	+++	+++	++	+	+	-
C2	++	++	++	++	+	+	-
C3	++	+++	+++	+	+	+	-
Res	++	++	++	++	+	+	-
Res+CP	++	+++	+++	+++	+	+	-
Res+C1	+++	+++	+++	+++	+	+	-
Res+C2	++	+++	++	++	+	+	-
Res+C3	++	++	++	-	+	+	-

^a (-) без промене; (+) благо; (++) умерено; (+++) значајно.

n = 6 животиња

Ткиво јетре контролне групе животиња имало је нормалну структуру ћелија са уоченом благом синусоидном дилатацијом, хидропсном дегенерацијом, лимфоцитном инфилтрацијом. Третман CP индуковао је умерену синусоидну дилатацију, хидропсну и балонску дегенерацију, док су фокална некроза, хиперплазија Купферових ћелија као и лимфоцитна инфилтрација забележени као промене благог интезитета. Фотомикрографије исечака јетре пацова третираних испитиваним комплексима (C1 и C3) указују на значајна оштећења ткива са знацима интензивне хидропсне и балонске дегенерације и фокалне некрозе. Умерена синусоидна дилатација забележена је у свим групама третираним испитиваним комплексима, док је умерена хидропсна и балонска дегенерација и фокална и конфлуентна некроза примећена у групи животиња третираних комплексом C2. Конфлуентна некроза умереног интезитета такође је уочена у групи третираној комплексом C1, док је третман комплексом C3 индуковао благу конфлуентну некрозу ткива јетре пацова. Хиперплазија Купферових ћелија и инфилтрација лимфоцита детектоване су у виду благе промене у ткиву јетре пацова из група третираних испитиваним комплексима. Такође, наведене промене благог интезитета уочене су и у ткиву животиња третираних Res, као и свим испитиваним комбинованим третманима. Третман Res је индуковао и умерене промене на ткиву јетре, и то синусоидну дилатацију, хидропсну и балонску дегенерацију, као и фокалну и конфлуентну некрозу. На основу добијених резултата хистопатолошке анализе, комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt углавном нису неутрализовали токсичне ефекте CP и комплекса. Штавише, значајна хидропсна и балонска дегенерација, као и фокална и конфлуентна некроза ћелија јетре забележене су у групама животиња излаганим комбинованим третманима Res и CP и Res и комплексом C1. Поред тога, значајна синусоидна дилатација уочена је након комбинованог третмана Res и комплексом C1, док је наведена промена у групи животиња изложених комбинованом третману Res и CP била умереног интезитета. Морфолошки параметри групе третиране комбинацијом Res и комплекса C2 били су скоро идентични као у групи која је третирана само комплексом C2. Једини изузетак био је комбиновани третман Res и комплексом C3, који је ублажио оштећења јетре детектована у групи животиња третираних само

комплексом С3. У односу на третман комплексом С3, комбиновани третман Res и комплексом С3 је индуковао умерене морфолошке промене ткива, док су поједини показатељи оштећења јетре, попут конфлуентне некрозе, били чак елиминисани.



Слика 19. Микрофотографије ткивних препарата јетре контролне и експерименталних група.

Увећање 100x; n = 6 животиња

Ознаке: а - синусоидна дилатација; б₁ - хидропсна и б₂ - балонска дегенерација; в - фокална некроза; г - конфлуентна некроза; д - хиперплазија Купферових ћелија; њ - инфилтрација лимфоцита; е - фиброза.

2.4.2. Морфолошки параметри бубрега

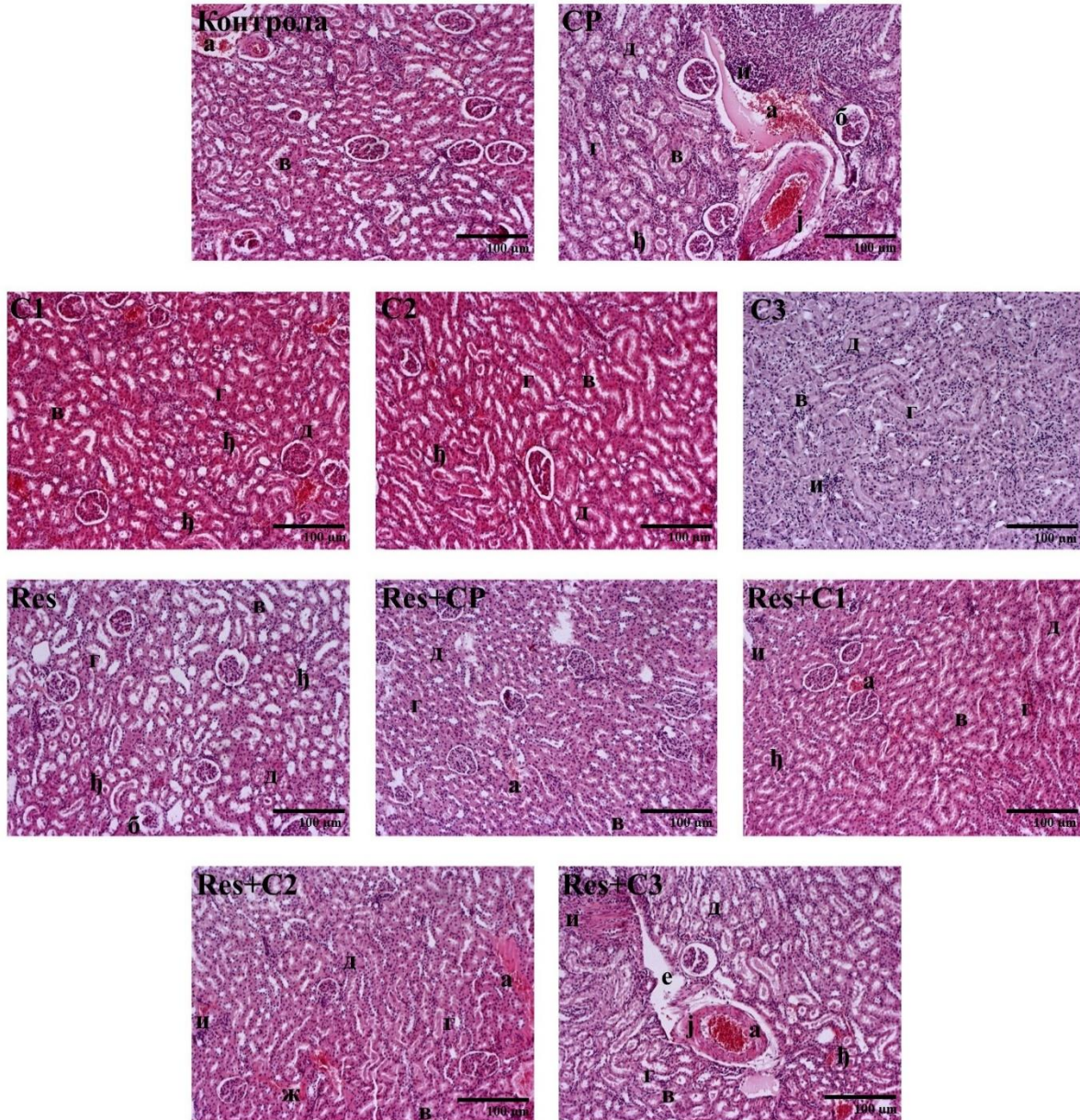
Резултати добијени након хистопатолошке евалуације ткива бубрега приказани су у Табели 13 и на Слици 20. Значајне морфолошке и хистолошке промене ткива у контролној групи животиња нису детектоване, док су у групама изложеним испитиваним третманима значајне промене забележене и класификоване на следећи начин: (-) без промене; (+) благо; (++) умерено; (+++) значајно. На основу учесталости промена, одабране су репрезентативне слике које показују хистопатолошке промене ткива бубрега у оквиру испитиване групе (Слика 20).

Табела 13. Збирне морфолошке промене ткива бубрега контролне и експерименталних група.

Групе	Морфолошке промене ткива										
	Конгестија	Атрофија гломерула - проширење субкапсуларног Боумановог простора	Хидропсна дегенерација тубуларног епитела	Некроза ћелија тубуларног епитела	Атрофија и десквамација тубуларног епитела	Еозинофилни материјал у тубуларном лумену	Интерстицијални едем	Интерстицијално крварење	Интерстицијална фиброза	Интерстицијални инфламаторни инфилтрат	Промене на крвним судовима
Контрола	+ ^a	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CP	+	+	++	++	++	+	+	-	-	++	+
C1	+	+	++	++	++	+	+	-	-	+	+
C2	+	-	++	++	++	+	+	-	-	+	+
C3	+	+	++	++	++	+	+	-	-	+	+
Res	++	+	++	++	++	+	+	+	-	+	+
Res+CP	++	+	++	++	++	++	+	+	-	+	+
Res+C1	++	+	++	++	++	++	+	+	-	+	+
Res+C2	++	+	++	++	++	++	+	+	-	+	+
Res+C3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	++	+

^a (-) без промене; (+) благо; (++) умерено; (+++) значајно.
n = 6 животиња

Ткиво бубрега контролне групе животиња имало је нормалну структуру ћелија са уоченом благом конгестијом, хидропсном дегенерацијом, некрозом ћелија и атрофијом и десквамацијом тубуларног епитела. Третмани СР и испитиваним комплексима индуковали су исте промене на ткиву бубрега које су биле благог до умереног интензитета.



Слика 20. Микрофотографије ткивних препарата бубрега контролне и експерименталних група.

Увећање 100x; n = 6 животиња

Ознаке: **а** - конгестија; **б** - атрофија гломерула - проширење субкапсуларног Боумановог простора; **в** - хидропсна дегенерација тубуларног епитела; **г** - некроза ћелија тубуларног епитела; **д** - атрофија и десквамација тубуларног епитела; **ђ** - еозинофилни материјал у тубуларном лумену; **е** - интерстицијални едем; **ж** - интерстицијално крварење; **з** - интерстицијална фиброза; **и** - интерстицијални инфламаторни инфилтрат; **ј** - промене на крвним судовима.

Анализирањем препарата бубрега животиња изложеним поменутиим третманима, уочене су следеће благе промене: конгестија, атрофија гломерула – проширење субкапсуларног Боумановог простора (изузев након третмана комплексом С2 где ова промена није забележена), еозинофилни материјал у тубуларном лумену, интерстицијални едем интерстицијални инфламаторни инфилтрат (изузев након третмана СР где је забележена ова промена умереног интензитета) и промене на крвним судовима, док су умереног интензитета биле следеће промене: хидропсна дегенерација, некроза ћелија и атрофија и десквамација тубуларног епитела. Третман Res индуковао је генерално исте промене на нивоу бубрежног ткива, са изузетком конгестије која је била за један степен интензивнија (умерена промена) и са благим интерстицијалним крварењем које није било уочено на препаратима животиња третираних дериватима Pt. На основу хистопатолошке опсервације, комбиновани третмани Res и СР, и Res и С1/С2 комплексима, изазвали су врло слична оштећења ткива, благог до умереног интензитета, као и појединачни третмани СР и комплексима. Различит интензитет детектованих промена које су индуковали комбиновани третмани, а у односу на појединачне третмане, односи се на умерену конгестију и појаву еозинофилног материјала у тубуларном лумени, као и благо интерстицијално крварење. На основу добијених резултата, комбиновани третмани Res и испитиваним дериватима Pt углавном нису неутрализовали токсичне ефекте СР и комплекса. Једини изузетак и овде је био комбиновани третман Res и комплексом С3, који је ублажио оштећења бубрега детектована у групи животиња третираним само комплексом С3. У односу на третман комплексом С3, комбиновани третман Res и комплексом С3 је индуковао балге промене углавном свих испитиваних морфолошких параметара изузев интерстицијалног инфламаторног инфилтрата који је био умереног интензитета, док интерстицијално крварење није детектовано.



V ДИСКУСИЈА

Малигне неоплазме су од стране Светске здравствене организације након кардиоваскуларних болести класификоване као други водећи узрочници смрти (Sung и сар., 2021). Од откривања па до данас, најчешће коришћен хемотерапеутик, цисплатина, показала се као прилично делотворан медикамент у лечењу туморских болести. Њеном употребом успешно се третирају превасходно тумори јајника, дојке, тестиса и цервикса (Brown и сар., 2019; Dasari и сар., 2022). Поред цисплатине, седам недавно испитиваних комплекса Pt, одобрених за клиничку примену, су такође евидентирани као ефикасни антинеопластични агенси (Gibson, 2019). Међутим, упркос значајном делотворном ефекту комерцијалних хемотерапеутика, велики медицински проблеми попут појаве туморских рецидива након спровођења хемотерапије, развоја резистенције туморских ћелија на коришћена хемотерапеутска средства, као и неселективно деловање хемотерапеутика праћено интензивним нежељеним ефектима, су и даље нерешени (Sinha и сар., 2016). Додатно, неспецифично деловање цисплатине може пореметити функционалност многих виталних органа и система органа укључујући кардиоваскуларни систем, бубреге, нервни систем, чуло слуха и јетру (Lomeli и сар., 2017; Вороја и сар., 2018; Hussain и сар., 2021; Dasari и сар., 2022). Услед изражене цитотоксичности и наведених недостатака хемотерапеутика коришћених у клиничкој пракси, намеће се потреба за откривањем нових потенцијалних медикамената са селективним дејством и интензивним антитуморским деловањем. С тим циљем продукована су и тестирана многа нова једињења на бази платине (различити Pt(II) и Pt(IV) комплекси) (Fanelli и сар., 2016).

Савремена хемијска истраживања фокусирана су на синтезу нових једињења која ослобађају активну супстанцу у циљном ткиву без њихове претходне инактивације настале услед реакције са протеинима плазме. Октаедарска структура Pt(IV) комплекса обезбеђује две нове аксијалне позиције за везивање различитих лиганата. Тиме су постигнуте веће могућности модификације њихових фармакокинетичких својстава, чинећи Pt(IV) комплексе инертнијим од одговарајућих Pt(II) аналога. Pt(IV) комплекси дизајнирани су да се активирају по уласку у туморску ћелију, смањујући могућност истовременог оштећења здравих ћелија и ткива. Кинетичка инертност може допринети смањењу нежељених ефеката и значајно редукованој деактивацији лека насталој као последица интеракције комплекса са протеинима плазме (Gibson, 2019). До данас је око 30 нових једињења у одређеној фази клиничког испитивања, али релативно мали број је уведен у клиничку праксу (Јуришевић и сар., 2016; Gibson, 2019; Petrović и сар., 2020). У пољу интересовања медицинске хемије нашли су се и Pt комплекси са диамин лигандима а међу њима и комплекси Pt(II/IV) са edda (етилендиамин-*N,N'*-диацетат)-типом лиганда који су показали значајне антитуморске ефекте према различитим туморским ћелијским линијама са потенцијалом превазилажења резистенције на цисплатину. Нека од ових једињења манифестовала су интензивнију антитуморску активност од цисплатине (Dimitrijević и сар., 2013; Stojković и сар., 2014; Јуришевић и сар., 2016; Petrović и сар., 2020)

У овој студији коришћена су три нова Pt(IV) комплекса са прекурсорима бидентатног *N,N'*-лиганда, *O,O'*-диалкил естрима (алкил = етил, пропил, бутил) етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) сирћетне киселине (Pt(IV) eddba комплекси). Значајна антипролиферативна активност ових комплекса, вишеструко интензивнија од цисплатине, претходно је показана на свеже изолованим CLL ћелијама (Dimitrijević и сар., 2013).

Истраживања базирана на решавању проблема ефикасности хемотерапије проширена су и на област фитохемије у смислу употребе различитих биљних антиоксиданаса у котретманима са клинички примењиваним лековима на бази Pt и потенцијалним антитуморским агенсима. Имајући у виду да поједине фитохемикалије испољавају висок антитуморски потенцијал, да имају способност модулације пролиферације и инфламације, а такође и индукције оксидативног стреса и апоптозе туморских ћелија, циљ ових котретмана, поред могућности елиминације и неутрализације нежељених ефеката, је и побољшање ефикасности антитуморског деловања хемотерапеутика (Sinha и сар., 2016; Wang и сар., 2016; Boroja и сар., 2018; Park и сар., 2018; Turkmen и сар., 2019; Akosman и сар., 2020; Prasad и Srivastava, 2020; Ahmed и сар., 2022; Dasari и сар., 2022).

Ресвератрол је полифенол са фитоестрогеним својствима, чији је значајан антитуморски, антиоксидативни, антипролиферативни и антиинфламаторни потенцијал показан у бројним студијама (Sinha и сар., 2016; Alamolhodaei и сар., 2017; Rauf и сар., 2018; Salehi и сар., 2018; Poschner и сар., 2019; Leischner и сар., 2021). С обзиром на способност неутрализације реактивних врста, инхибиције липидне пероксидације као и потенцијације активности антиоксидативног одбрамбеног система (Ko и сар., 2017; Luo и сар., 2020), ефекат ресвератрола у превенцији и санацији оштећења различитих ћелија и ткива индукованих цисплатином и доксорубицином, као и у интензивирању антинеопластичних својстава хемотерапеутика темељно је испитиван (Osman и сар., 2015; Lee и сар., 2016; Sinha и сар., 2016; Alamolhodaei и сар., 2017; Ko и сар., 2017).

Сматра се да ресвератрол има значајну улогу у смањењу инциденце хормонски зависних тумора (тумор дојке, јајника и ендометријума) услед фитоестрогене активности, којом модулира функцију естрогена (van Duursen, 2017). Ресвератрол своја антиестрогена својства може да манифестује у присуству 17- β -естрадиола и на тај начин минимализује могућност настанка тумора дојке што га чини обећавајућим агенсом у хемопревенцији (Bhat и сар., 2001). Међутим, заштитни ефекат ресвератрола би под одређеним околностима могао бити елиминисан уз фаворизовање његовог прооксидативног својства (Nematbakhsh и сар., 2017; Salehi и сар., 2018).

Тумор дојке је прогресивна болест, једна од најчешће дијагностикованих канцерних болести са високом стопом смртности у многим земљама широм света, која се јавља претежно код жена (Suh и сар., 2018; Poschner и сар., 2019). На основу хистопатолошког изгледа, као и присуства рецептора за естроген, прогестерон и хумани епидермални фактор раста разликује се неколико подтипова овог тумора од којих естроген рецептор-позитивни тумори дојке имају највећу инциденцу (Britt и сар., 2020). Хориокарцином, тумор плаценталног ткива, је изузетно редак тип тумора који је такође превалентно заступљен у женској популацији. Најагресивнији је тип гестацијске трофобластне болести са екстензивним метастатским потенцијалом (Yang и сар., 2017; Park и сар., 2018).

Први део ове студије подразумевао је *in vitro* процену и дефинисање ефеката нових Pt(IV) комплекса са одређеним естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) сирћетне

киселине на хуманим ћелијским линијама тумора дојке (MDA-MB-231), тумора плаценте (JEG-3) и здравих фибробласта плућа (MRC-5) у односу на ефекте цисплатине. Такође су испитивани ефекти котретмана ресвератролом у циљу појачавања потенцијалних антитуморских својстава испитиваних једињења и елиминације и сузбијања њихових могућих негативних импликација на здраве ћелије (хумани фибробласти плућа). Сходно томе, евалуирани су ефекти на пролиферацију ћелија, миграторни потенцијал и редокс статус третираних ћелија.

Имајући у виду да лекови на бази Pt својим неселективним деловањем индукују нефротоксичност, хепатотоксичност и хемотоксичност (Вороја и сар., 2018; Вано и Најам, 2019; Erisgin и сар., 2019; Hussain и сар., 2021) други део ове студије био је испитивање *in vivo* ефеката нових Pt(IV) комплекса у поређењу са цисплатином, као и биолошких ефеката њихових котретмана са ресвератролом на три различита ткива (крв, јетра и бубрег) која су због своје метаболичке активности и физиолошке улоге у транспорту, неутрализацији и елиминацији токсина из организма једни од система органа који подлежу неспецифичном дејству хемотерапеутика и потенцијалних антитуморских агенаса (Oun и сар., 2018). У циљу опсежне евалуације вршена је процена биолошких ефеката испитиваних једињења на хематолошке и биохемијске параметре крви, биохемијске маркере оштећења јетре и бубрега, редокс хомеостазу еритроцита, хепатоцита и нефроцита и морфологију ткива јетре и бубрега женки пацова соја Wistar albino.

1. Ефекти испитиваних једињења након *in vitro* третмана

Способност пролиферације је есенцијална за функционисање многих ћелија, укључујући фибробласте плућа, чија је главна улога да регенеришу и одржавају интегритет алвеоларне структуре (Herriges и Morrisey, 2014). Абнормалности у регулацији ћелијског циклуса могу индуковати неконтролисану пролиферацију и иницирати настанак и прогресију тумора (Cooper и Hausman, 2000). Према томе, нови потенцијални хемотерапеутици би требало да испољавају значајну антипролиферативну активност према туморским ћелијама истовремено не делујући на здраве ћелије околног ткива.

Резултати ове студије показују да испитивани Pt(IV) комплекси испољавају значајно интензивнији антипролиферативни ефекат од најчешће коришћеног хемотерапеутика, цисплатине. Инхибиција пролиферације обе коришћене туморске ћелијске линије (MDA-MB-231 и JEG-3) била је у корелацији са примењеном дозом и трајањем третмана. Испитивани Pt(IV) комплекси су испољили интензивнију антипролиферативну активност након примене већих доза и након дужег периода излагања ћелија; међутим, такође су значајно редуковали вијабилност здравих хуманих фибробласта плућа (MRC-5). Иако је зависност антипролиферативне активности од примењене дозе и времена излагања забележена након примене свих третмана са испитиваним Pt(IV) комплексима, зависност од дужине ланца није показана, као што је то претходно забележено за комплексе Pt са edda (етилендиамин-*N,N'*-диацетат) лигандима од стране Јуришевић и сар. (2016). Stojković и сар. (2014) су указали на интензивне антипролиферативне ефекте Pt(IV) комплекса са неким *O,O'*-диалкил естрима (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноичне киселине према ћелијским линијама хуманог колоректалног карцинома (HCT-116) и тумора дојке (MDA-MB-231). Резултати добијени у овој студији показују да ресвератрол значајно инхибира пролиферацију обе туморске ћелијске линије, док је значајан антипролиферативни ефекат

према MRC-5 ћелијама забележен тек након примене високих доза, што је у складу са истраживањем које су спровели Kloesch и сар. (2014). Цитотоксични ефекти испитиваних Pt(IV) комплекса на све три коришћене ћелијске линије, изражен преко IC₅₀ вредности, у овој студији, био је вишеструко интензивнији од цисплатине, нарочито након дуготрајног третмана. Dimitrijević и сар. (2013) су такође показали да су Pt(IV) комплекси, који су коришћени и у овој студији, имали значајно снажнији цитотоксични ефекат од цисплатине према свеже изолованим CLL ћелијама.

Раније је показано да ресвератрол у комбинацији са различитим хемотерапеутицима интензивира њихов цитотоксични потенцијал према туморским ћелијама уз значајно испољавање селективности ка здравим ћелијама (Alamolhodaеi и сар., 2017). На основу значајних антипролиферативних ефеката нових Pt(IV) комплекса према испитиваним туморским ћелијским линијама, али и значајних ефеката према здравој ћелијској линији MRC-5, добијених у овој студији, даљи ток истраживања је усмерен ка процени ефеката комбинованих третмана испитиваних комплекса и ресвератрола. Циљ коришћења ресвератрола у котретману био је интензивирање антитуморских својстава комплекса и минимализација њихових негативних ефеката према здравим ћелијама. У овој студији, а у складу са литературним подацима (Sinha и сар., 2016; Alamolhodaеi и сар., 2017; Ко и сар., 2017; Leischner и сар., 2021), још једном је потврђен снажан антитуморски и антиоксидативни потенцијал ресвератрола. Резултати МТТ теста спроведеном након примене комбинованих третмана, показују да је ресвератрол у одабраној концентрацији од 25 μM значајно супримирао негативан ефекат коришћених Pt(IV) комплекса према MRC-5 ћелијама, истовремено интензивирајући њихов антипролиферативни потенцијал према ћелијским линијама тумора дојке (MDA-MB-231) и плаценте (JEG-3). Добијени резултати су у складу са претходном студијом (Alamolhodaеi и сар., 2017).

С обзиром на то да је појава метастаза потврда малигности одређеног типа тумора која као крајњи исход има висок проценат морталитета пацијената са дијагностикованим туморским обољењем (Guo и сар., 2019), важна карактеристика потенцијалног антитуморског агенса је и антиметастатско деловање. Способност миграције туморских ћелија је један од одлучујућих аспеката прогресије тумора и процеса метастазирања. Сходно томе, у овој студији је тестиран миграторни потенцијал обе инвазивне ћелијске туморске линије (MDA-MB-231 и JEG-3) након третмана одабраним Pt(IV) комплексом са етил субституентом (C1), као и након комбинованог третмана наведеним комплексом C1 и ресвератролом. Добијени резултати су показали да ресвератрол значајно интензивира антимиграторни потенцијал комплекса C1 према коришћеним туморским ћелијама. Suh и сар. (2018) су показали да ресвератрол ефикасно инхибира инвазију и миграцију ћелија тумора дојке. Такође, Sun и сар. (2019) су показали да ресвератрол у три примењене концентрације (12.5, 25 и 50 μM), након третмана од 72 h, значајно смањује миграторни капацитет MDA-MB-231 ћелија са израженом дозном зависношћу, преко директне инхибиције експресије матриксних металопроотеиназа (MMP-2 и MMP-9). Повећана активност ових ензима повезана је са инвазивним и метастатским потенцијалом тумора дојке (Dofara и сар. 2020). Резултати добијени у овој студији указују да комбиновани третман комплексом C1 и ресвератролом при дуготрајној изложености од 72 сата значајно инхибира миграторни потенцијал обе веома инвазивне туморске ћелијске линије (MDA-MB-231 ћелија за ~ 50%, и JEG-3 ћелија за ~ 40%).

Током активности ензимских комплекса митохондријалног респираторног ланца, поред продуката неопходних за нормално функционисање ћелија, генеришу се и слободни

радикали који у оптималним физиолошким концентрацијама учествују у регулацији различитих ћелијских процеса. Прекомерна продукција радикала може надмашити капацитативне способности AOS-а који врши њихову неутрализацију. Нарушена редокс хомеостаза у корист прооксиданаса доводи до оксидативног стреса и могућег развоја различитих болести, укључујући настанак и прогресију тумора (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Познато је да ROS и RNS учествују у ћелијској сигнализацији и да могу утицати на регулацију раста и пролиферацију ћелија активацијом бројних сигналних путева трансдукције као што су HIF1 α , Nrf2, AP-1, и NF- κ B. Оксидативни стрес и оксидативне промене на нивоу макро и микромолекула су често иницијатори дерегулације ћелијске сигнализације и ћелијског циклуса што за последицу може имати абнормално умножавање ћелија које води настанку и развоју тумора (Klaunig и Wang, 2018). Физиолошки повећан ниво производње слободних радикала у туморским ћелијама праћен је повећаном активношћу AOS-а који неутралише прекомерну генезу радикала обезбеђујући опстанак овим ћелијама. Међутим, прекомерна производња слободнорадикалских врста може такође инхибирати раст туморских ћелија и учинити ћелије тумора осетљивим на последице оксидативног стреса (Ruberte и сар., 2020). Стога је стратегија синтетисања многих антитуморских агенаса усмерена ка обезбеђивању њиховог селективног дејства на редокс хомеостазу туморских ћелија. Будући да се активација појединих антитуморских агенаса врши тек по уласку у туморску ћелију, могуће је иницирање оксидативног стреса и индукција ћелијске смрти, апоптозе или некрозе искључиво поменутих ћелија без нарушавања функционалности ћелија здравих ткива (Chaiswing и сар., 2018; Park и сар., 2018; NavaneethaKrishnan и сар., 2019).

Евалуација ефеката одабраних једињења на редокс статус коришћених ћелијских линија подразумевала је квантификовање концентрације $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , и NO, и одређивање нивоа GSH и GSSG као маркера оксидативног стреса. Према литературним подацима одређени Pt(IV) комплекси индукују оксидативни стрес у различитим туморским ћелијским линијама (Lazić и сар., 2010; Tolan и сар., 2016). Такође, показано је да третман ресвератролом, као и његов котретман са неким хемотерапеутицима, испољава антитуморско деловање на неколико ћелијских линија тумора дојке (Rai и сар., 2016; Sinha и сар., 2016). Антитуморски потенцијал ресвератрола се манифестује, између осталог, инхибицијом ћелијске пролиферације као и индукцијом апоптозе посредоване активацијом различитих апоптотских сигналних путева преко ROS-зависних каспаза, протеина p53 или TRAIL и FasL рецептора и модулацијом експресије Bcl-2 и Bax гена (Zhou и сар., 2005; NavaneethaKrishnan и сар., 2019; Rodríguez-Enríquez и сар., 2019; Leischner и сар., 2021). Lee и сар. (2016) су показали да синергистичким дејством ресвератрол и цисплатина индукују апоптозу преко ROS-посредованих механизма у малигним мезотелиомалним ћелијама. Добијени резултати ове студије показују да су испитивана једињења утицала на редокс хомеостазу како туморских (MDA-MB-231 и JEG-3), тако и здраве ћелијске линије (MRC-5). Заправо, у MDA-MB-231 ћелијама забележен је значајан пораст концентрације $O_2^{\cdot-}$ након 24 h од комбинованог третмана ресвератролом и комплексом C1. У JEG-3 ћелијама, после 72 h од третмана комплексом C1, концентрација $O_2^{\cdot-}$ је такође била значајно повишена, док је комбиновани третман ресвератролом и комплексом C1 значајно смањило продукцију $O_2^{\cdot-}$ до нивоа вредности измерених у контролним ћелијама. У MRC-5 ћелијама нису индуковане значајне промене у концентрацији $O_2^{\cdot-}$. Што се тиче концентрације H_2O_2 , добијен је сличан тренд у све три испитиване ћелијске линије. Пораст је забележен у свим

испитиваним ћелијама након излагања третманима у периоду од 24 h, док је значајан пад концентрације H_2O_2 у све три ћелијске линије забележен након 72 h комбинованог третмана ресвератролом и комплексом C1.

Осим тога, повећана концентрација NO_2^- забележена је у ћелијама MDA-MB-231 и MRC-5 након 24 h третмана комплексом C1 или комбинованог третмана ресвератролом и комплексом C1, док је продужено излагање комбинованом третману ресвератролом и комплексом C1 довело до значајног смањења концентрације NO_2^- у све три ћелијске линије. Повишена концентрација NO доводи до инхибиције ћелијског циклуса (Napoli и сар., 2013), што може бити повезано са редукованом пролиферацијом ћелија показаном у овој студији. У присуству Fe^{2+} , Cu^{2+} или неких других прелазних метала као што је Pt (Фентонова реакција), O_2^- и H_2O_2 бивају конвертовани у високо реактивни OH^\bullet или у ONOO^- у реакцији са NO. Такође, H_2O_2 је продукт реакције дисмутације O_2^- катализоване активношћу SOD. Даљи пут реактивних интермедијерних молекула је оксидација липида чиме се дестабилизује липидни двослој ћелијске мембране и као резултат настају липидни радикали. Ове радикалске врсте покрећу процес ланчане реакције липидне пероксидације, доводећи до ћелијске деструкције (Dharmaraja, 2017). Резултати ове студије указују да испитивана једињења, посебно котретман ресвератролом и комплексом C1, изазивају повећану продукцију слободних радикала након краткотрајног периода излагања, што за последицу има дестабилизацију ћелијске редокс равнотеже. Након дуготрајног периода излагања концентрација испитиваних параметара је углавном била у порасту као одговор на третман дисплатином или комплексом C1, док је котретман ресвератролом и комплексом C1 индуковао смањење концентрације наведених параметара. Пад концентрација наведених параметара може указивати на то да је дошло до реакције између NO, H_2O_2 и O_2^- , из које настали $\text{OH}^\bullet/\text{ONOO}^-$ могу даље реаговати са ћелијским липидима, протеинима и ДНК доводећи до оксидативног стреса и индукције ћелијске смрти (Dharmaraja, 2017). У прилог овоме иду и резултати добијени евалуацијом ефеката испитиваних једињења на ћелијску вијабилност и пролиферативни капацитет, на основу којих је утврђено да комбиновани третман ресвератролом и комплексом C1, након 72 h излагања редукује вијабилност ћелија, што би могло бити и последица апоптозе. Додатно, исти третман није значајно утицао на вијабилност MRC-5 ћелија. Поред наведеног, хиперпродукција ROS-а и оксидативни стрес инхибирају миграцију туморских ћелија (Kwiecinski и сар., 2012), која је евидентирана и у овој студији након комбинованог третмана ресвератролом и комплексом C1.

Прва линија ћелијске одбране од слободних радикала је GSH. GSH је углавном у цитоплазми у тиол-редукованом облику, док се у реакцији неутрализације слободних радикала, или у неким процесима детоксикације конвертује у дисулфид-оксидовани облик (GSSG). С обзиром на реактивност и нестабилност дисулфидног облика глутатиона, у ћелијама је присутан ензим GR, чијом се активношћу молекула GSSG-а брзо редукује назад у GSH. Поремећена равнотежа између ова два облика глутатиона у корист GSSG-а доводи до апоптозе ћелије услед немогућности GSH да оствари своју примарну улогу (Filomeni и сар., 2003). Повишен ниво оксидативног метаболизма, а тиме и продукција реактивних врста, једна је од карактеристика туморских ћелија. У циљу заштите ћелија, ниво GSH сразмерно расте доприносећи повећаној отпорности туморских ћелија (Bansal & Simon, 2018). Резултати добијени у овој студији показују да је након изложености од 24 h, као одговор на третман комплексом C1 и комбиновани третман ресвератролом и комплексом C1, ниво GSH у обе туморске ћелијске линије био значајно повишен у поређењу са

контролним ћелијама. Међутим, након пролонгираног (72 h) излагања ћелија комбинованом третману ресвератролом и комплексом C1, евидентиран је снижен ниво GSH. На основу добијених резултата можемо закључити да је у туморским ћелијама примарно дошло до индуковања повећане активности компоненти AOS-а у циљу стабилизације ћелијске интеграције и спречавања настанка оксидативног стреса. Након пролонгираног третмана, антиоксидативни ћелијски капацитет, услед екстензивне производње реактивних врста, није успео да адекватно неутрализује слободне радикале, што је даље довело до индукције апоптозе (Park и сар., 2018). У прилог наведеном, у овој студији забележен је значајан пораст производње GSSG у туморским ћелијским линијама након дуготрајног третмана комплексом C1 и комбинованог третмана ресвератролом и комплексом C1. Потребно је истаћи да је након изложености MRC-5 ћелија комбинованом третману ресвератролом и комплексом C1 у трајању од 72 h, дошло до стабилизације нивоа продукције GSH и GSSG у корист редукованог облика глутатиона. На основу добијених резултата може се закључити да је ресвератрол услед снажног антиоксидативног дејства и способности неутрализације реактивних врста, заштитио MRC-5 ћелије од оксидативног стреса редукацијом реактивних врста чиме је и антиоксидативни капацитет ових ћелија појачан. Резултати ове студије су у складу са резултатима студије спроведене од стране Fu и сар. (2012), где је показано да ресвератрол штити MRC-5 ћелије од оксидативног оштећења смањујући производњу ROS и истовремено повећавајући антиоксидативни капацитет ових ћелија. У овој студији показано је да ресвератрол појачава антипролиферативни, антимиграторни и прооксидативни потенцијал одабраног Pt(IV) комплекса према туморским ћелијама (MDA-MB-231 и JEG-3), испољавајући протективне ефекте према здравим ћелијама фибробласта (MRC-5).

2. Ефекти испитиваних једињења након *in vivo* третмана

Поред снажног својства супресије тумора, индукција токсичности различитих органа, посебно бубрега и нервног система, а такође и јетре и тестиса, ограничила је примену цисплатине у хемотерапији (Osman и сар., 2015; Lomeli и сар., 2017; Вогоја и сар., 2018). Функција јетре и бубрега у метаболизму, детоксификацији и елиминацији многих ксенобиотика праћена је појавом високо реактивних метаболита који могу даље довести до озбиљних оштећења ћелија и ткива.

Након прелиминарних *in vitro* анализа којима је показан значајан антипролиферативни, антимиграторни и прооксидативни потенцијал нових Pt(IV) комплекса у односу на цисплатину, као и способност ресвератрола да интензивира њихов ефекат према ћелијским линијама хуманог тумора дојке и плаценте, истовремено пружајући заштиту ћелијској линији здравих фибробласта плућа (Рауновић и сар., 2022), уследила је евалуација њихових ефеката у *in vivo* условима. Овај део студије се односи на процену утицаја цисплатине и нових Pt(IV) комплекса на специфичне ткивно-функционалне параметре у серуму и крви експерименталних животиња, редокс хомеостазу еритроцита, редокс хомеостазу и морфологију ткива јетре и бубрега као и њихов ефекат у комбинацији са ресвератролом. Због својих биолошких својстава, ресвератрол је коришћен у овој студији као превенција могућег настанка оксидативних оштећења испитиваних ткива услед употребе цисплатине и Pt(IV) комплекса, а због фитоестрогеног својства (van Duursen, 2017), као и због претходних испитивања спроведених на ћелијама тумора

карактеристичних за женску популацију, коришћене су женке пацова соја Wistar albino као модел организми.

2.1. Промене телесне тежине и релативне тежине јетре и бубрега

Током експерименталног периода животиње су имале слободан приступ храни и води. Унос хране праћен је на дневном нивоу. У овој студији забележен је губитак тежине експерименталних животиња индукован третманом испитиваним Pt(IV) комплексима, до ~ 40% у односу на контролне животиње. Забележен пад у телесној тежини може бити последица смањеног уноса хране код третираних пацова, што имплицира могућу токсичност ових једињења. Релативна тежина јетре и бубрега третираних животиња била је повећана до ~ 28% у односу на контролну групу, посебно јетре након котретмана ресвератролом. Забележено повећање релативне тежине јетре и бубрега може бити узроковано инфламацијом која је праћена накупљањем ткивне течности регистроване након хистопатолошких анализа ткива третираних животиња у којима су детектоване умерене и значајне промене на ткиву јетре у виду хидропсне и балонске дегенерације. Друге студије су такође показале да цисплатина индукује губитак тежине експерименталних животиња и утиче на повећање релативне тежине јетре и бубрега (Garcia et al., 2013; Katanić et al., 2017; Voroja et al., 2018; Kaveripakam и Adikay, 2018), док примена ресвератрола редукује губитак телесне тежине (Jalili et al., 2017; Yang et al., 2021; Bulduk et al. 2022), што је у складу са резултатима ове студије.

2.2. Промене хематолошких и биохемијских параметара крви

Један од примарних система који је захваћен нежељеним ефектима хемотерапије је хематопоетски систем. Познато је да антитуморска хемотерапија најчешће резултира појавом анемије код пацијената која може бити индукована различитим механизмима деловања. Анемија може настати услед директног утицаја хемотерапеутика на број еритроцита или проценат хемоглобина у крви, односно на функционалност еритроцита у дистрибуцији кисеоника (Танеја и Shepard, 2021). Индуковање анемије може бити последица деструкције ћелија коштане сржи, поремећене пермеабилности ћелијске мембране праћене хемолизом еритроцита, дерегулације метаболизма Fe или супресије активности хематопоетског ткива. Такође, услед нефротоксичности индуковане цисплатином, инхибира се синтеза реналног еритропоетина чиме се ремети процес еритропоезе (Bhachandra и сар., 2018).

Резултати ове студије показују да акутни третмани цисплатином и испитиваним комплексима доводе до поремећаја вредности појединих хематолошких параметара, маркера анемије, смањеног броја еритроцита, смањене концентрације хемоглобина и смањене хематокритске вредности у односу на вредности измерене у контролној групи животиња. Еритроцитни индекси су углавном били непромењени, са изузетком забележеног пораста MCV након третмана комплексом С3, MCH након третмана цисплатином и комплексом С3, MCHC након третмана цисплатином и комплексом С3, док је у ширини дистрибуције еритроцита забележен пораст након свих третмана. Поремећаји вредности еритроцитних индекса дају информацију о морфолошком и функционалном стању еритроцита и повезани су са различитим обољењима индукованим интоксикацијом,

при чему повећана MCV вредност може бити последица цирозе јетре, повећан ниво MCHC указује на дехидратацију организма, док је повећан RDW индекс показатељ хематолошких болести еритроцитне лозе настале дефицитом Fe (Jaman и сар., 2018). У складу са резултатима ове студије су и резултати студија чији је предмет истраживања хематотоксичност цисплатине, у којима је показано да цисплатина индукује анемију различитим механизмима деловања (Marković и сар., 2011a; Marković и сар., 2011b; Nasr, 2014a; Bhachandra и сар., 2018; Ali, 2019). Потребно је поменути да су еритроцити због функције транспорта кисеоника, у континуираном контакту са ROS који настају као продукти оксидо-редукционих процеса. Услед продукције ROS која превазилази капацитете еритроцитног AOS-а настаје оксидативни стрес. Marković и сар. (2011a, 2011b) су показали да акутни и хронични третмани цисплатином утичу на настанак оксидативног стреса у еритроцитима третираних пацова. Оксидативни стрес индукује ћелијску смрт еритроцита, еритроптозу, што такође доводи до анемије посредоване смањеним бројем еритроцита (Bissinger и сар., 2019).

Негативне последице хемотерапије манифестују се и преко поремећеног имуног одговора као и нарушене тромбозе. Показано је да цисплатина има имуносупресивни ефекат (Kim и сар., 2019) и да непосредно путем активације оксидативног стреса доводи до апоптозе леукоцита и тромбоцита (Olas и сар., 2000; Marković и сар., 2011a), смањујући њихов број и тиме узрокујући леукоцитопенију и тромбоцитопенију. Међутим, леукоцитоза и тромбоцитоза као супротна стања, односно повећање броја леукоцита и тромбоцита, такође могу бити одговор организма на третман цисплатином (Nasr, 2014a; Ewees и сар., 2018). Резултати овог истраживања показују да су третмани цисплатином и испитиваним комплексима утицали на повећање броја леукоцита, са разликама у процентуалној заступљености ћелија беле крвне лозе, где су се издвојили лимфоцити као најзаступљенији у одговору организма на испитиване третмане, док је проценат моноцита и гранулоцита углавном био непромењен у односу на нивое ових параметара детектованих код контролних животиња. Повећање броја тромбоцита је такође евидентирано након примене третмана цисплатином и испитиваним комплексима, док је тромбокритска вредност значајно повећана само након третмана цисплатином. До повећања броја тромбоцита може доћи услед ефеката ових једињења на процес настанка тромбоцита. Пролиферација тромбоцита може бити последица акутне инфламације као прве линије одбране (Virk и сар., 2020), дехидратације или индукованих оштећења ткива. Добијени резултати су у складу са студијама које су испитивале ефекат цисплатине на токсичност појединих органа, где је показан повећан ниво леукоцита и тромбоцита (Ewees и сар., 2018; Marković и сар., 2011b).

Услед анемије која је регистрована у овој студији након примене цисплатине и испитиваних комплекса можемо закључити да су поменута једињења изазвала поремећај у функционисању хематопоезног ткива. Доступни литературни подаци указују на ефективан учинак ресвератрола на рад хематопоезног система. Заправо, показано је да ресвератрол повећава потенцијал прогениторних и хематопоетских матичних ћелија и сузбија њихова оштећења индукована јонизујућим зрачењем код мишева (Zhang и сар., 2013; Rimmelé и сар., 2014). У овој студији, анализом хематолошких параметара пацова третираних комбинованим третманима ресвератролом и испитиваним дериватима Pt, показано је значајно редуковање дисбаланса насталог услед третмана цисплатином и испитиваним комплексима. Резултати ове студије су у складу са студијом која је показала да ресвератрол ублажава хематолошке и биохемијске поремећаје индуковане код флуоридом третираних пацова (Atmаса и сар., 2014). Virk и сар. (2020) су такође истакли ефикасан протективни

ефекат ресвератрола на специфичне хематолошке параметре пацова, чију је алтерацију узроковао микотоксин - зераленон.

Анти-инфламаторни потенцијал ресвератрола је опсежно изучаван и широко прихваћен као један од бенефитних ефеката у редуковању инфламације проузроковане како екзогеним тако и ендогеним факторима (Poulsen и сар., 2015; de Sá Coutinho и сар., 2018; Meng и сар., 2021). Резултати добијени у овој студији указују на појачан имуни одговор након суплементације ресвератролом заједно са испитиваним дериватима Pt. Имајући у виду да је повећан број леукоцита примаран одговор на акутну интоксикацију, може се закључити да је ресвератрол стимулисао продукцију белих крвних ћелија са циљем појачане одбране организма.

Као показатељи функционалног стања јетре одређиване су активности ензима ALT, AST, ALP, GGT и LDH, као и концентрација глукозе, билирубина и укупних протеина у серуму експерименталних животиња. Функционалност бубрега је процењивана на основу концентрације триглицерида, холестерола, урее и креатинина у серуму пацова.

Добијени резултати указују на значајну интоксикацију јетре индуковану цисплатином и испитиваним Pt(IV) комплексима а манифестовану повећаном активношћу ензима у серуму експерименталних животиња. Један од механизма токсичности цисплатине и Pt(IV) комплекса посредован је продукцијом слободних радикала, који услед ланчане реакције липидне пероксидације изазивају дестабилизацију ћелијске мембране, водећи до нарушавања њеног интегритета и до ослобађања маркера оштећења хепатоцита у крвоток (Fong, 2016). У овој студији, забележен је повишен ниво активности трансаминаза (ALT и AST), као и значајно повећање нивоа ALP, GGT и LDH у серуму пацова третираних Pt(IV) комплексима. Добијени подаци су у складу са подацима из претходно спроведених студија (Fanelli и сар., 2016; Faroqui и сар., 2016; Katanić и сар., 2017). Алтерације у нивоима билирубина који се ствара у јетри као завршни продукт ериптозе и катаболизма хемоглобина и глукозе која је магационирана у јетри у виду гликогена, указују на нарушену хомеостазу хепатобилијарног система услед повреде ткива јетре. С обзиром на то да се поред наведених функција у јетри обавља и метаболизам протеина, очекивано је да и вредности тоталних протеина буду измењене. Међутим, значајне разлике у концентрацији тоталних протеина након примене испитиваних третмана нису забележене, изузев након примене третмана комплексом С3 који је индуковао благо смањење количине тоталних протеина. Такође нису изазване ни промене у нивоу триглицерида, док је забележен значајан пораст нивоа холестерола у серуму након третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима. У студији која је изучавала протективне ефекте хесперидина на цисплатином индуковану хепатотоксичност забележен је пораст нивоа холестерола у серуму пацова третираних цисплатином (Omar и сар., 2016). Abdel-Gayoum и сар. (1999) су показали да хиперлипидемија узрокована цисплатином може указивати на нефротоксичност, док су Ogbe и сар. (2020) показали да цисплатина, индукујући хепато-реналну интоксикацију, утиче на дестабилизацију хомеостазе липида.

Сходно претходно показаним антитуморским и антиоксидативним својствима ресвератрола (Rauf и сар., 2018; Raunović и сар. 2022), циљ комбинованог третмана био је превенција могућих токсичних ефеката испитиваних Pt(IV) комплекса. У истраживању спроведеном од стране Ince и сар. (2014) показано је протективно дејство полидатина, прекурсора ресвератрола, на хепатотоксичност индуковану цисплатином. Полидатин је у поменутој студији антиоксидативним способностима утицао на смањење нивоа трансаминаза што указује на ефикасну заштиту. Студије које обухватају испитивање

ефеката ресвератрола на санирање оксидативних оштећења јетре проузрокованих употребом CuSO_4 , указују на позитивно дејство суплементације ресвератролом на ниво трансминаза у серуму третираних животиња (Tian и сар., 2019). Поред протективних ефеката на нивоу појединих органа, својим изражених антиоксидативним потенцијалом, ресвератрол нормализује вредности параметара липидног профила пацова са индукованом хиперлипидемијом (Zhu и сар., 2008). Међутим, котретмани ресвератролом и цисплатином или испитиваним Pt(IV) комплексима спроведени у овој студији, нису значајно редуковали ниво маркера оштећења хепатоцита (ALT, AST, ALP, GGT, LDH) у циркулацији. Такође, није забележен ни значајан ефекат на концентрацију глукозе, билирубина, тоталних протеина, триглицерида и холестерола у серуму експерименталних животиња. Ипак, иако нису биле статистички значајне, забележене су благе промене у нивоима свих наведених параметара након комбинованог третмана ресвератролом и испитиваним једињењима на бази платине у односу на појединачне третмане цисплатином и Pt(IV) комплексима, које указују на тенденцију ублажавања токсичних ефеката испитиваних једињења. У складу са добијеним резултатима ове студије су резултати студије Rašković и сар. (2019) у којој није забележен статистички значајан ефекат ресвератрола у редуковању активности трансминаза, алкалне фосфатазе и нивоа тоталног холестерола у серуму пацова којима је индукована хиперлипидемија и дијабет типа 2.

Бубрежна дисфункција као главна последица токсичних ефеката цисплатине, развија се код приближно једне трећине пацијената са спроведеном хемотерапијом (Chen и сар., 2019). Као показатељи функционалног стања реналног система мерени су нивои уреје (крајњи продукт разлагања аминокиселина и протеина) и креатинина (продукт разлагања креатина у мишићима) у серуму експерименталних животиња. Екскреција ових параметара врши се путем бубрега а промена концентрације у серуму сразмерна је брзини и ефикасности гломеруларне филтрације. Повећане вредности уреје и креатинина указују на постојање оштећења ткива или дерегулације процеса секреције (Giordano и сар., 2015; Luft, 2021). Нефротоксичност индукована цисплатином у овој студији потврђена је евидентираним повећањем концентрације креатинина и уреје у серуму експерименталних животиња. За разлику од третмана цисплатином, третмани Pt(IV) комплексима изазвали су благи пад у концентрацији креатинина и значајан пад уреје у серуму пацова у односу на контролне вредности. Будући да је креатинин продукт мишићног метаболизма, његова концентрација у серуму зависна је од мишићне активности и мишићне масе као и од алиментарног уноса протеина (Delanaye и сар., 2017; Diago и Señaris, 2020). Такође, тешка обољења јетре негативно утичу на производњу креатинина (Delanaye и сар., 2017). У јетри се одвија катаболизам аминокиселина и протеина а као финални продукт формира се уреја која се путем крви транспортује до бубрега где бива екскретована из организма. Стога су функционално стање јетре, као и протеинска исхрана у корелацији са концентрацијом уреје у крви (Waring и сар., 2008). У овој студији показано је да третмани испитиваним Pt(IV) комплексима код експерименталних животиња изазивају редукован унос хране и смањен проценат добијања телесне тежине, па чак и губитак телесне тежине, што може бити узрок смањене концентрације креатинина и уреје у серуму пацова. С обзиром да је у овој студији евидентирана интоксикација јетре, може се закључити да је и то један од разлога редуковане концентрације креатинина и уреје у серуму.

У студијама које су изучавале нефропротективне ефекте ресвератрола показано је да ресвератрол редукује нефротоксичност индуковану цисплатином (Do Amaral и сар. 2008; Inse и сар. 2014; Нао и сар., 2016). Применом ресвератрола у комбинованим третманима

цисплатином и Pt(IV) комплексима у оквиру овог истраживања, постигнут је ефекат нормализације вредности креатинина и урее у серуму третираних животиња. Ресвератрол је ублажио дисфункцију бубрега индуковану цисплатином, а такође је утицао на повећање концентрације креатинина и урее у серуму животиња излаганих комбинованим третманима (Res и Pt(IV) комплекси) услед непромењеног уноса хране и мањег процента губитка телесне тежине третираних животиња у односу на контролне животиње и животиње третиране само комплексима. У складу са резултатима ове студије су резултати студије спроведене од стране Нао и сар. (2016) где је показано да ресвератрол у котретману са цисплатином снижава вредности креатинина и урее у крви третираних животиња, и студије спроведене од стране Do Amaral и сар. (2008) у којој је показано да ресвератрол у примењеној дози од 25 mg/kg у котретману са цисплатином смањује ниво креатинина, уринарни волумен и концентрацију уринарних протеина. Ince и сар. (2014) су такође забележили пад концентрације креатинина и урее у крви животиња третираних полидлатином, прекурсором ресвератрола.

2.3. Утицај третмана на редокс хомеостазу и морфологију испитиваних ткива

Клиничком употребом цисплатине јављају се бројне контраиндикације које се између осталог манифестују у виду дисфункције здравих ткива настале као последица поремећене редокс хомеостазе ћелија (Fong, 2016). Употреба цисплатине доводи до продукције слободних радикала, преваходно ROS и RNS, насталих током оксидо-редукционих процеса као молекули са једним или више неспарених електрона који имају висок реактивни потенцијал. У патолошким стањима, ROS и RNS интерагују са функционалним и структурним елементима ћелија, активирајући различите каскадне оксидо-редукционе процесе који могу довести до уочљивих алтерација у раду појединих ткива и органа (Pandir и Kara, 2014). Стога је један од предмета савремених истраживања и евалуација редокс потенцијала комерцијалних и новосинтетисаних Pt-комплекса према различитим здравим ткивима. Додатно, расветљавање механизма редукције токсичних ефеката ових једињења од стране ресвератрола потенцијално би допринело ефективнијој хемотерапији са значајно смањеним нуспојавама. У оквиру ове дисертације вршена је упоредна процена утицаја цисплатине и Pt(IV) комплекса на редокс хомеостазу еритроцита, јетре и бубрега, ткива која су најчешће погођена њиховим неселективним дејством (Nematbakhsh и сар., 2012a), а такође и утицај ресвератрола у котретману са испитиваним једињењима у циљу превенције ткивних оштећења.

2.3.1. Утицај на редокс статус еритроцита

Процесом хематопоезе код здравог човека сваке секунде се генерише око 2 милиона еритроцита чији животни век у циркулацији износи приближно од 100 до 120 дана. Еритроцити током процеса матурације губе једно, рибозоме и митохондрије, а тиме и способност деобе, синтезе протеина и митохондријалне оксидације. Иако су митохондрије због своје функције у оксидацији O₂ главно место продукције ROS-а, њиховим недостатком еритроцити нису заштићени од оксидативног стреса. Напротив, услед физиолошке улоге транспорта O₂, еритроцити су констатно изложени његовим високим концентрацијама у артеријском крвотоку. Као носилац O₂, хемоглобин, уједно и најзаступљенији

цитоплазматски протеин у еритроцитима, у чијој простетичној гупи се налази фери јон, Fe^{2+} , је главни извор ROS-а у еритроцитима. Аутооксидацијом хемоглобина продукује се $O_2^{\bullet-}$, фери јон прелази у феро јон (Fe^{3+}), односно оксихемоглобин прелази у метхемоглобин, чиме губи афинитет према O_2 . Поред аутооксидације хемоглобина, извор ROS-а може бити и гвожђе у слободном облику у чијем присуству се $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 преко Хабер-Вајсове и Фентонове реакције трансформишу у OH^{\bullet} . Да би хемоглобин био функционалан, мора се одржавати у редукованој форми. Међутим, услед матурације, еритроцити губе могућност експресије протеина те је стога њихов капацитет санирања оксидативних оштећења ограничен. Значајност испитивања оксидативног стреса у еритроцитима огледа се и у томе што се настала оштећења не задржавају само на овим ћелијама, већ уколико дође до претеране продукције ROS-а оне могу оштетити и друге елементе циркулације (Çimen, 2008; Kuhn и сар., 2017). Стога, као вид заштите од ланчаних оштећења индукује се ериптоза, програмирана смрт еритроцита, чиме број еритроцита постаје дефицитаран. Оксидативни стрес индукован од стране егзогенних ксенобиотика може бити један од окидача програмиране смрти еритроцита (Bissinger и сар., 2019). Истраживањем спроведеним од стране Mahmud и сар. (2008) показано је да цисплатина у концентрацији која се налази у крви пацијената након примењене хемотерапије, може да индукује ериптозу путем промене интрацелуларне концентрације јона Ca^{2+} . Као крајњи резултат ериптозе, од фосфолипида на површини ћелијске мембране формира се фосфатидилсерин, еритроцити добијају асиметричан облик, и као такви елиминишу се из циркулације фагоцитозом. Међутим, одређени број ериптотичних еритроцита адхерира за унутрашњи васкуларни зид ометајући микроциркулацију, или се пак везује за тромбоците чиме стимулише тромбозу крви (Bissinger и сар., 2019). Претходне студије које су испитивале утицај цисплатине на редокс статус еритроцита, показале су да употреба цисплатине резултира настанком оксидативног стреса у овим ћелијама, испољавајући хематотоксични ефекат (Marković и сар., 2011a; Marković и сар., 2011b; Ince и сар., 2014; Pandir и Кара, 2014). У оквиру истраживања ове студије показано је да третмани цисплатином и третмани испитиваним Pt(IV) комплексима доводе до значајно повећане продукције $O_2^{\bullet-}$ и LPO док је концентрација H_2O_2 и NO_2^{\bullet} била значајно смањена, посебно након третмана комплексом СЗ. Током процеса ћелијског метаболизма долази до продукције мале количине слободних радикала који имају функцију у биолошким процесима фагоцитозе, инфламације, старења и ћелијског сигналинга. Поред O_2 и одређеног процента CO_2 , еритроцити уз помоћ хемоглобина транспортују још један гас, NO, чија је улога превасходно у регулацији васкуларног тонуса, инфламацији, инхибицији адхезије тромбоцита и регулацији ћелијског раста. Осим тога што поседују ендотелну азотмоксид синтазу (e-NOS), еритроцити обезбеђују биодоступност NO његовим везивањем за хемоглобин. Заправо, реакцијом са оксихемоглобином, NO се конвертује у нитрите, док се реакцијом са дезоксихемоглобином формира $HgbFe^{2+}NO$ (Çimen, 2008). Међутим, услед различитих ендогених или егзогених фактора, продукција реактивних врста може превазићи капацитете потребне за испуњавање физиолошких функција, када настале радикалске врсте ($O_2^{\bullet-}$ и NO^{\bullet}) могу реаговати са другим радикалским и нерадикалским молекулима (H_2O_2) продукујући високо реактивне врсте (OH^{\bullet} и $ONOO^-$) које даље индукују оштећења на макромолекуларном нивоу. Такође је показано да H_2O_2 реагује и са фери и фери јонима из хемоглобина (оксихемоглобин и метхемоглобин) продукујући потентни ферилхемоглобин и секундарне слободне радикале. Оксидативни стрес који настаје услед немогућности антиоксидативног система да стабилизује и неутралише прекомерну продукцију реактивних врста, иницира липидну

пероксидацију и денатурацију протеина и нуклеинских киселина. Услед дезинтеграције ћелијске мембране и насталих оксидативних оштећења, долази до лизирања еритроцита и њихове смрти (Çimen, 2008; Kuhn и сар., 2017). Изразито повећана продукција $O_2^{\cdot-}$ и смањена продукција NO и H_2O_2 у еритроцитима животиња третираних цисплатином и испитиваним Pt(IV) комплексима, добијене у овој студији, указују на то да је дошло до реакције формирања високо реактивних врста OH^{\cdot} и $ONOO^-$. Као потврда наведеном је и прекомерна продукција LPO детектована након употребе цисплатине и испитиваних Pt(IV) комплекса у еритроцитима третираних пацова. Повећана продукција LPO непосредно потврђује присутна оштећења липидних молекула ћелијске мембране насталих као поледица липидне пероксидације. У складу са нашим резултатима су резултати претходних студија у којима је показан раст продукције $O_2^{\cdot-}$ и пад у концентracији NO и H_2O_2 (Marković и сар., 2011б) као и повећана продукција MDA као секундарног продукта липидне пероксидације (Ince и сар., 2014; Pandir и Kara, 2014) у еритроцитима пацова третираних цисплатином. На основу наведених резултата може се закључити да је употреба цисплатине и свих испитиваних Pt(IV) комплекса индуковала оксидативни стрес у еритроцитима третираних пацова.

Сходно перманентној изложености реактивним врстама и оксидативном стресу, еритроцити поседују изражен антиоксидативни механизам заштите сачињене од ензимских (SOD, CAT, GSH-Px, GR, GST) и неензимских компоненти (GSH и GSSG) које својим редукционим способностима одржавају ниво оксиданата у физиолошким границама (Bissinger и сар., 2019).

SOD је ензим који је у конкуренцији са NO за $O_2^{\cdot-}$ чиме врши двојну функцију: 1) инхибира синтезу $ONOO^-$ и обезбеђује биодоступност молекула NO и 2) конвертује $O_2^{\cdot-}$ до молекула H_2O_2 смањујући могућност оксидативних оштећења макромолекула. Настали H_2O_2 даље бива редукован деловањем ензима CAT до O_2 и H_2O (Çimen, 2008; Halliwell и Gutteridge, 2015). Услед повећане продукције $O_2^{\cdot-}$ у еритроцитима пацова третираних цисплатином и испитиваним Pt(IV) комплексима у оквиру ове студије, очекиван је и пораст активности ензима SOD. Међутим, активност наведеног ензима, а такође и активност CAT, је била значајно редукована након спроведених третмана. Смањена активност ових ензима довела је до неконтролисане продукције $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , чиме су се створили погодни услови за њихову међусобну реакцију, и продуковање OH^{\cdot} , а такође и $ONOO^-$ услед преваленције молекула NO у конкуренцији за $O_2^{\cdot-}$. Смањење активности ензима SOD и CAT у еритроцитима пацова након третмана цисплатином евидентирано је у студијама спроведеним од стране Ince и сар. (2014), Pandir и Kara (2014) и Mihajlović и сар. (2021).

У неколико скоријих студија показано је да су еритроцити носиоци одређеног депоа GSH, те да су стога означени као главни „чистачи“ циркулишуће крви. Поред улоге у редуковању реактивних врста, GSH врши непосредну детоксификацију лекова на бази Pt. Заправо, након аплицирања цисплатине, у циркулацији она може да реагује са тиолним групама GSH формирајући коњугате који се даље метаболишу радом GST (Çimen, 2008; Wainford и сар., 2008; Dilruba и Kalayda, 2016). У овој студији, концентрација GSH измерена у лизату еритроцита животиња третираних цисплатином била је непромењена у односу на контролу, док је у лизату еритроцита животиња третираних испитиваним Pt(IV) комплексима, концентрација GSH била значајно повишена у односу на контролу и у односу на групу животиња третираних цисплатином. На основу претходно наведеног својства непосредне детоксификације лекова на бази Pt, може се закључити да је пораст нивоа GSH био примаран одговор еритроцита на акутни третман испитиваним Pt(IV) комплексима.

Такође, GSH својим деловањем неутралише радикалске врсте, између осталих и OH^\bullet и ONOO^- (Halliwell и Gutteridge, 2015) чија је прекомерна продукција потврђена насталом пероксидацијом липида. Неутрализацијом оксиданата, GSH прелази у оксидовану форму (GSSG) која може да иницира апоптозу активацијом апоптотских сигналних путева (Filomeni и сар., 2003). Оксидација GSH је такође последица активности ензима GSH-Px и GST чији је рад на елиминацији H_2O_2 и LPO потпомогнут GSH као косупстратом (Џимен, 2008). Конвертовање оксидоване форме настале током метаболичких процеса неутрализације у редуковану форму глутатиона врши се NADPH зависном реакцијом која је катализована ензимом GR (Dilruba и Kalayda, 2016). Активности испитиваних ензима глутатион редокс циклуса у еритроцитима, биле су супримиране након третмана цисплатином и свим испитиваним Pt(IV) комплексима спроведеним у овој студији. У прилог резултатима ове студије су резултати истраживања спроведених од стране Pandir и Кара (2014) који показују пад активности GSH-Px у еритроцитима пацова третираних цисплатином, и резултати студије Marković и сар. (2011b) који указују на смањену активност GSH-Px, GR и GST у еритроцитима пацова након примењеног хроничног третмана цисплатином. Mihajlović и сар. (2021) испитивали су редокс потенцијал нових комплекса са рутенијом у односу на цисплатину у крви и срцу третираних пацова. Резултати наведене студије указују на способност цисплатине да индукује оксидативни стрес у испитиваним ткивима, при чему је забележен сличан утицај цисплатине на параметре редокс статуса као у овој студији. Аутори су показали да третман цисплатином индукује оксидативни стрес у еритроцитима услед смањене активности ензима антиоксидативног заштитног система (GSH-Px, SOD и CAT) чиме долази до хиперпродукције реактивних врста и последично активације процеса липидне пероксидације. На основу резултата добијених у оквиру ове дисертације може се закључити да је GSH прва линија одбране еритроцита од насталих оксидативних оштећења. Међутим, услед прекомерне продукције реактивних врста, утрошени су депои ензима глутатион редокс циклуса (GSH-Px, GST и GR), а због лимитиране *de novo* синтезе у еритроцитима, очекивао би се и смањен ниво GSH након пролонгираног третмана. Повећана продукција LPO након третмана испитиваним дериватима Pt указује на то да иако је концентрација GSH била повећана, ипак није довољна да заустави хиперпродукцију слободних радикала индуковану коришћеним агенсима.

Протективни ефекти ресвератрола на индукован оксидативни стрес у еритроцитима *in vitro* и *in vivo* показани су у бројним студијама (Hamlaoui и сар., 2012; Pandey и Rizvi, 2013; Pignitter и сар., 2016; Wang и сар., 2016a; Turkmen и сар., 2019). Способност ресвератрола да уклања реактивне врсте заснива се на постојању три хидроксилне групе на фенолним прстеновима на позицијама 3, 4 и 5 и могућности трансфера електрона у оквиру структуре самог молекула. Неутрализација реактивних врста посредована је губитком атома водоника или трансфером електрона преко губитка протона са молекула ресвератрола. Као продукти реакција неутрализације реактивних врста ресвератролом, формирају се феноксил радикали који услед способности делокализације електрона у оквиру целог молекула производе још стабилније молекуле – семихиноне. Оваквим механизмом деловања, ресвератрол неутрализује велики број радикалских врста, међу којима су $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^\bullet , NO_2^\bullet , OH^\bullet , ONOO^- и LPO. Поред директне неутрализације, ресвератрол хелирајућим потенцијалом редукује продукцију реактивних врста тако што везује јоне метала и спречава Фентонову и Хабер-Вајсову реакцију а тиме и даље напредовање оксидативног стреса (Truong и сар., 2018). У оквиру ове студије концентрације $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и LPO измерене у лизату еритроцита биле су углавном значајно снижене након

комбинованог третмана ресвератролом и испитиваним једињењима Pt у односу на појединачне третмане цисплатином и Pt(IV) комплексима, док је концентрација NO_2^- била незнатно повишена. Услед антиоксидативне активности ресвератрола и његове могућности директне неутрализације $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 (Truong и сар., 2018), концентрација ових молекула у еритроцитима испитиваних група је смањена и тиме је омогућена њихова даља ефикасна елиминација од стране SOD. Пошто је концентрација $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 редукована, њихове међусобне реакције и реакције са NO су изостале, што је довело до пораста нивоа NO у еритроцитима и до смањене продукције OH^{\cdot} и ONOO^- . Као потврда редуковане продукције OH^{\cdot} и ONOO^- је смањена концентрација LPO која је такође показатељ прекидања ланчане реакције липидне пероксидације у еритроцитима од стране ресвератрола. Способност неутрализације ROS-а од стране ресвератрола показана је у студији у којој је испитиван ефекат ресвератрола на хепатотоксичност CuSO_4 (Tian и сар., 2019), док је способност редуковања нивоа MDA потврђена у бројним *in vitro* и *in vivo* студијама у еритроцитима или у пуној крви (Pandey и Rizvi, 2009; Pandey и Rizvi, 2013; Turkmen и сар., 2019). Hamlaoui и сар. (2012) су показали да вишедневни третман ресвератролом аплицираним интраперитонеално у дози од 25 mg/kg остварује бенефитан ефекат редукујући концентрацију MDA у еритроцитима пацова.

Поред способности ублажавања оксидативних оштећења услед директне неутрализације реактивних врста, ресвератрол својом активношћу повећава капацитет антиоксидативног одбрамбеног система у бројним ћелијама и ткивима (Truong и сар., 2018). Оваквим индиректним механизмом деловања ресвератрол доприноси истом финалном исходу, редукацији и елиминацији оксидативних оштећења. Резултати добијени у овој студији показују да је котретман ресвератролом и испитиваним дериватима Pt генерално индуковао пораст концентрације GSH и активности GSH-Px и CAT у односу на појединачне третмане, док су активности SOD, GR и GST биле смањене. Раније је напоменуто да примарну одбрану еритроцита врши GSH путем реакције са прооксидансима након које он прелази у GSSG (Çimen, 2008; Wainford и сар., 2008; Dilruba и Kalayda, 2016). Повећан ниво GSH у лизату еритроцита након комбинованих третмана ресвератролом и испитиваним дериватима Pt указује на способност ресвератрола да редукује дисулфидну форму назад у GSH обезбеђујући на тај начин адекватну заштиту еритроцитима. Литературни подаци указују да ресвератрол у зависности од примењене концентрације индукује пораст нивоа GSH у хуманим еритроцитима *in vitro* (Pandey и Rizvi, 2010; Pandey и Rizvi, 2013; Wang и сар., 2016a). Такође, показано је да полидатин, прекурсор ресвератрола, повећава ниво GSH у еритроцитима пацова третираних цисплатином (Ince и сар., 2014). Ресвератрол својим антиоксидативним својствима поред директне неутрализације реактивних врста, поспешује активност појединих ензима (Truong и сар., 2018). Међутим, у зависности од примењене дозе, може проузроковати и супресију њихове активности (Pignitter и сар., 2016). У даљем путу неутрализације реактивних врста учествују SOD и CAT које својом активношћу редукују $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 до O_2 и H_2O (Halliwell и Gutteridge, 2015; Truong и сар., 2018). Након комбинованих третмана ресвератролом и Pt(IV) комплексима активност SOD је била смањена док је активност CAT била повећана. Имајући у виду да су концентрације $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 након котретмана биле смањене, док је концентрација NO_2^- била благо повишена, може се закључити да је SOD ефикасно конвертовала $\text{O}_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 , чиме је спречена његова конверзија у ONOO^- у реакцији са NO. Продуковани H_2O_2 даље подлеже активности CAT и бива у потпуности конвертован у молекуле H_2O . Овакав тренд деловања ресвератрола на активност SOD и CAT у еритроцитима показан је у студији у којој је испитиван протективни

ефекат ресвератрола на оксидативна оштећења одабраних ткива пацова третираних глукофосфатним хербицидом (Turkmen и сар., 2019), док већина литературних података антиоксидативни потенцијал ресвератрола доводи у везу са повећаном активношћу поменутих ензима (Hamlaoui и сар., 2012; Wang и сар., 2016a; Farag и сар., 2017).

Због повећане доступности GSH који је кофактор GSH-Px у реакцији редукције H_2O_2 и органских хидропероксида, активност GSH-Px се такође углавном повећава након комбинованог третмана у односу на појединачне третмане. У прилог овоме је и смањена концентрација H_2O_2 измерена у еритроцитима животиња третираних котретманом. Приликом редукције поменутих молекула, продукује се GSSG који бива редукован од стране ензима GR (Halliwell и Gutteridge, 2015). Активност GR у еритроцитима животиња третираних котретманом била је смањена на основу чега се може закључити да је ресвератрол редуковао већински део продукованог GSSG, значајно интензивирајући редукционе способности глутатион циклуса. Такође је забележена смањена активност GST што потврђује чињеницу да ресвератрол примарно појачава редукционе капацитете компоненти GSH редокс циклуса. Стимулаторно дејство ресвератрола на GSH-Px, а такође и на друге испитиване антиоксидансе, показано је на *in vitro* моделу еритроцита којима су индукована оштећења хипоксантин-ксантин оксидазом (Wang и сар., 2016a).

2.3.2. Утицај на редокс статус и морфолошке карактеристике јетре

Упоредо са индукцијом апоптозе у ћелијама тумора, као нусефекат дејства цисплатине долази до оштећења мембрана ћелија здравих ткива, продукције кисеоничних и хидроксилних радикала, иницијације липидне пероксидације и инфламације и до развоја оксидативног стреса. Хепатотоксичност цисплатине повезана је са дисфункцијом митохондријалног респираторног ланца, услед чега долази до нарушавања редокс хомеостазе, дестабилизације ћелијског функционисања и последично до оксидативних оштећења ћелија (Un и сар., 2020; Dasari и сар., 2022). У овој студији као модел организми коришћене су женке пацова због инциденце тумора дојке и плаценте преважно у женској популацији. Сходно томе, неопходно је нагласити карактеристику естрадиола да у концентрацији која је еквивалентна физиолошкој концентрацији естрадиола у крви, може заштитити ћелије јетре од оксидативних оштећења (Surico и сар., 2017).

Резултати добијени у овој студији указују да су третмани цисплатином и испитиваним Pt(IV) комплексима индуковали значајно смањење концентрације GSSG, LPO, $O_2^{\cdot-}$, NO_2^- у односу на концентрације ових параметара детектованих у контролној групи животиња. Насупрот томе, концентрација GSH и активности свих антиоксидативних ензима, осим CAT, биле су у значајном порасту у односу на контролне вредности.

Добро је познато да лекови на бази Pt могу да наруше редокс равнотежу ћелија, подстичући прекомерну продукцију радикалских врста, а као одговор на индуковани дисбаланс долази и до повећања активности компоненти антиоксидативног одбрамбеног система (Fong, 2016). Раније је наглашено да формирану у прекомерној количини, $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 могу реаговати са NO продукујући OH^{\cdot} и $ONOO^-$. Такође, H_2O_2 преко Фентонове реакције, која подразумева присуство неких прелазних метала попут Fe^{2+} , Cu^{2+} или чак Pt, може да произведе OH^{\cdot} . Оба молекула, $ONOO^-$ и OH^{\cdot} , су високо реактивни и даље реагују са липидима ћелијске мембране изазивајући њену дезинтеграцију (Dharmaraja, 2017; Correia и сар., 2018). Генерисање ових високо реактивних молекула може бити разлог смањене концентрације $O_2^{\cdot-}$ и NO_2^- добијене у овој студији. Оштећењима бубрежног ткива претходи

апоптоза ћелија која између осталог може бити индукована цисплатином. Заправо, забележено је да цисплатина поспешује транскрипцију митохондријалне неуралне азот моноксид синтазе (nNOS) повећавајући продукцију NO чиме директно утиче на апоптозу ћелија (Jung и сар., 2009). Имајући у виду да оштећења јетре индукована апоптозом хепатоцита могу бити повезана са повећањем нивоа NO (Liu и сар., 2017), као и директан утицај цисплатине на азот моноксид синтазе, могло би се претпоставити да цисплатина и Pt(IV) комплекси коришћени у овој студији утичу на повећану продукцију NO управо модулацијом нивоа nNOS. Дестабилизација структуре ћелијске мембране и индукција оштећења ткива јетре потврђена је повећаном концентрацијом биомаркера оштећења хепатоцита у крви, као и хистопатолошким резултатима ове студије.

Познато је да у ублажавању токсичности лекова на бази Pt примарну улогу игра ендогени антиоксиданс GSH који приликом неутрализације штетних агенаса прелази у дисулфидну форму, GSSG. GSSG се може поново конвертовати у GSH активношћу ензима из редокс циклуса глутатиона (GR и GST) (Dilruba и Kalayda, 2016). Повећање концентрације супстрата може бити узрок повећане активности ових ензима. Осим тога, у присуству GSH, GSH-Px редукује H_2O_2 и LPO смањујући њихов ниво (Halliwell и Gutteridge, 2015), што је и забележено у овој студији код пацова третираних Pt(IV) комплексима.

На основу чињенице да цисплатина интерагује са женским полним хормонима, као и улоге естрадиола у супресији оксидативног стреса индукованог цисплатином у хепатоцитима, може се закључити да естрадиол може да оствари протективни ефекат у ткивима тако што повећава активност ензима и компоненти редокс циклуса глутатиона (Nematbakhsh и сар., 2017; Surico и сар., 2017). У прилог овом могућем механизму говори студија спроведена од стране Отоуа и сар. (2001), у којој је показано да естрадиол спречава оксидативна оштећења ћелија јетре одржавајући ниво GSH.

Повећана активност SOD, забележена у групама животиња третираних Pt(IV) комплексима, може бити последица улоге овог ензима у конвертовању $O_2^{\cdot-}$ у H_2O_2 . С обзиром да очекивано повећање нивоа H_2O_2 није детектовано, може се закључити да је NO, који је у конкуренцији са SOD за $O_2^{\cdot-}$, био ефикаснији у његовом „хватању“, чиме се уместо неутрализације овог радикала продукује још реактивнији молекул ONOO⁻. Смањена активност CAT, чија је главна улога разградња H_2O_2 до кисеоника (Halliwell и Gutteridge, 2015), може бити последица непромењене концентрације H_2O_2 добијене у овој студији. Резултати показују да је услед дужине трајања третмана, у неким ћелијама успостављена појачана активност антиоксидативних ензима, вероватно под утицајем естрадиола, чиме је омогућена адекватна заштита од генерисаног оксидативног стреса.

Иако многи литературни подаци указују на успешност ресвератрола у санацији или превенцији оштећења различитих органа индукованих цисплатином (Ince и сар., 2014; Osman и сар., 2015), у овој студији, спроведеној на женкама пацова, такви ефекти на индуковану хепатотоксичност нису утврђени. Ресвератрол је углавном испољио ефекте сличне испитиваним Pt(IV) комплексима, чак је утицао и на додатну продукцију NO₂⁻, GSSG и LPO у ткиву јетре животиња изложених комбинованим третманима ресвератролом и цисплатином или испитиваним Pt(IV) комплексима у поређењу са одговарајућим појединачним третманима. Осим тога, у комбинацији са цисплатином и Pt(IV) комплексима, ресвератрол је значајно супримирао активност антиоксидативних ензима као и ниво GSH, и њиховим дефицитом омогућио интензивнију производњу слободних радикала. Настали оксидативни стрес, на који указује приказан редокс дисбаланс, такође је потврђен и хистопатолошким анализом ткива где су значајне и умерене промене

(синусоидна дилатација, хидропсна и балонска дегенерација, фокална и конфлуентна некроза) несумњиво указивале на индукована оштећења ткива. Наведене промене су забележене у групама животиња које су излагане појединачним третманима цисплатином или Pt(IV) комплексима, а такође и у групама животиња изложених комбинованим третманима.

Претходне студије су показале да естроген може да елиминира ефекте неких екзогенних антиоксиданаса (Nematbakhsh и сар., 2017). Услед фитоестрогеног својства ресвератрола (Novaković и сар., 2022), и већ поменутог ефекта естрадиола на токсичност индуковану цисплатином и Pt комплексима (Surico и сар., 2017), повећава се могућност модификације антиоксидативне улоге ресвератрола од стране естрадиола. У зависности од примењене дозе, ресвератрол би могао да утиче на нивое естрадиола у плазми изазивајући свеукупно смањење ефикасности антиоксидативног одбрамбеног система (van Duursen, 2017). Литературни подаци указују да ресвератрол, у одсуству естрадиола, делује као агонист/антагонист естрогена у неким ћелијским линијама тумора дојке, док са друге стране, у присуству естрадиола, ефекти ресвератрола могу бити антиестрогени (Bhat и сар., 2001). Ресвератрол у одређеним условима насталим као последица одвијања ензимских реакција, као што су измењена рН вредност и присуство хидроксилног анјона, може индуковати аутооксидацију ресвератрол-генерисаних семихинона и релативно стабилног феноксил радикала, доприносећи повећању продукције ROS-а (Erlank и сар., 2011; Li и сар., 2012). Такође, потребно је истаћи да у зависности од примењене дозе, начина спровођења третмана и одабира старосних група експерименталних животиња, поред бенефитног антиоксидативног потенцијала, ресвератрол може испољити прооксидативно својство (Gueguen и сар., 2015; Salehi и сар., 2018).

2.3.3. Утицај на редокс статус и морфолошке карактеристике бубрега

Екскреција цисплатине се превасходно врши путем бубрега услед чега су они међу првим органима који подлежу токсичним ефектима овог хемотерапеутика. Након интраперитонеалне апликације, одређена количина цисплатине се инактивира везивањем за протеине плазме, док се остатак врло брзо преноси путем системске циркулације до скоро свих органа. У бубрезима најпре долази до ефикасне елиминације цисплатине, међутим, 72 h након третмана, цисплатина се акумулира у бубрежном ткиву и њена даља елиминација бива успорена (Perše, и Večerić-Haler, 2018). Преузета од стране ћелија проксималних тубула, цисплатина подлеже биотрансформацији путем активације ензима цитохрома P450 у реактивније тиолне метаболите. Ови реактивни метаболити иницирају продукцију ROS-а и RNS-а и утичу на антиоксидативни капацитет ћелија доводећи до оксидативног стреса, једног од механизма нефротоксичности цисплатине (Abdel-Daim и сар., 2019). Оштећења проксималних тубула, примарна фаза токсичности цисплатине, доводе до функционалног поремећаја у хомеостази процеса филтрације, реапсорпције и секреције (Dasari и сар, 2022) а дестабилизација ових процеса индукована повећаном продукцијом ROS-а и RNS-а, до озбиљнијих оштећења бубрега (Guerreiro и сар., 2022).

Интезитет нефротоксичности индуковане цисплатином зависи од полова. Бубрези мушкараца су подложнији негативним ефектима цисплатине вероватно због присуства већег броја OCT2 транспортера хлоридних јона, чији пораст концентрације појачава токсични ефекат цисплатине, а такође и због хормонског дисбаланса индукованог након апликације цисплатине. Код жена кључну улогу у модулацији токсичности цисплатине има

естроген који у већим дозама може додатно да интензивира нефротоксичне ефекте, док у оптималним концентрацијама може да заштити бубрежно ткиво од токсичних ефеката цисплатине (Nematbakhsh и сар., 2017). Ulas и Сау (2011) су показали да третман 17 β -естрадиолом на оваријектомисаним пацовима спречава ренална оштећења путем јачања антиоксидативног капацитета бубрежних ћелија.

Акутни третман цисплатином и Pt(IV) комплексима, спроведен у овој студији, изазвао је дестабилизацију редокс система у бубрежним ћелијама праћену липидном пероксидацијом. Наиме, добијени резултати показују да је продукција O₂^{•-}, H₂O₂ и GSSG била генерално смањена након поменутих третмана у односу на контролу, док су концентрације NO₂⁻ и LPO биле повећане. Неопходно је истаћи да је након третмана Pt(IV) комплексима, продукција LPO, иако значајно повишена у односу на контролу, снижена у поређењу са групом третираном цисплатином, што може указивати на блажи нефротоксични ефекат ових једињења у односу на цисплатину. Међутим, резултати хистопатолошке евалуације указују на сличност морфолошких промена ћелија бубрежног ткива након примене третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима. Промене су биле углавном благог (конгестија, атрофија гломерула - проширење субкапсуларног Боумановог простора, еозинофилни материјал у тубуларном лумену, интерстицијални едем, интерстицијални инфламаторни инфилтрат, промене на крвним судовима) до умереног интензитета (хидропсна дегенерација тубуларног епитела, некроза ћелија тубуларног епитела, атрофија и десквамација тубуларног епитела) чиме је потврђена инфламација и почетна некроза ткива. Хистопатолошке промене ткива бубрега овог интензитета забележене су у студији спроведеној на мужјацима и женама пацова након субхроничног шестодневног третмана нижом дозом цисплатине (2.5 mg/kg). Код женки су примећена блажа оштећења у односу на мужјацима (Gharibi и сар., 2017).

На нивоу бубрежног ткива NO има важну функцију вазодилатора у циљу повећаног протока крви и брзине гломеруларне филтрације, те су стога у овом ткиву присутне све три изоформе NOS ензима. Бубрези су такође главно место анаболизма L-аргинина, есенцијалне аминокиселине која је прекурсор синтезе NO уз помоћ каталитичке активности NOS (Gharibi и сар., 2017). Повезаност NO са нефротоксичним ефектом цисплатине је показана у студији у којој је након употребе инхибитора NOS утврђено веће оштећење бубрежног ткива у односу на оштећење забележено у одсуству инхибитора NOS (Saad и сар., 2002). Сходно наведеном, повећана концентрација NO₂⁻ детектована након третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима може представљати одговор ћелија на индуковану дестабилизацију процеса екскреције. Међутим, повећана продукција NO у бубрежном ткиву може инхибирати активност eNOS и индуковати смањену гломеруларну филтрацију путем вазоконстрикције (Saad и сар., 2002), а такође може имати цитотоксични ефекат према различитим типовима ћелија (Darwish и сар., 2018). Jung и сар. (2009) и Chirino и сар. (2008) су показали да цисплатина утиче на повећану експресију iNOS и nNOS, чиме се повећава концентрација NO а тиме и могућност настанка ONOO⁻ у условима оксидативног стреса као и даља оксидативна оштећења макромолекула. Као финални исход овог механизма може се јавити апоптоза ћелија. Смањене концентрације O₂^{•-} и H₂O₂ забележене у овој студији указују на настанак OH[•] и ONOO⁻ који даље индукују дезинтеграцију ћелијске мембране оксидујући мембранске липиде (Dharmaraja, 2017; Correa и сар., 2018) што за последицу има повећану продукцију LPO која је такође забележена у овој студији. Литературни подаци потврђују повећање концентрације маркера нитрозативног и оксидативног стреса и нивоа липидне пероксидације у ћелијама бубрежног

тквива након третмана цисплатином (Chirino и сар., 2004; Nematbakhsh и сар., 2017; Boroja и сар., 2018; Abdel-Daim и сар., 2019).

Прекомерна продукција слободних радикала и липидна пероксидација надмашују антиоксидативне капацитете ћелија узрокујући промене у експресији и активности појединих ензима. По уласку у ћелије бубрега цисплатина се активношћу цитохрома P450 трансформише у тиолне метаболите, редукујући концентрацију GSH, што даље изазива митохондријалну дисфункцију и слабљење антиоксидативног одбрамбеног система (Abdel-Daim и сар., 2019). Услед директне реакције GSH са цисплатином уместо детоксикације даљим метаболисањем настају реактивни тиолни нефротоксини (Townsend и сар., 2003), док концентрација GSSG опада, како је и показано у овој студији. Смањена активност антиоксидативних ензима као одговор на нефротоксичност цисплатине показана је у многим студијама (Ognjanović и сар., 2012; Nasr и Saleh, 2014б; Boroja и сар., 2018; Abdel-Daim и сар., 2019; Jurić и сар., 2020). Добијени резултати указују на смањену активност CAT и GR након третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима, и GSH-Px након третмана цисплатином, док су испитивани комплекси индуковали значајан пораст активности овог ензима. Са друге стране забележена је повећана активност SOD и повећан ниво GSH као и незнатан пораст активности GST након третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима. У односу на цисплатину, испитивани комплекси су индуковали значајнији пораст нивоа GSH.

Интотоксикација цисплатином и оксидативни стрес могу утицати на пад нивоа GSH у ћелијама што може бити сигнал за његову *de novo* синтезу и повећану апсорпцију тубуларних ћелија чиме се интрацелуларна концентрација GSH повећава доприносећи одржавању редокс статуса (Antunes и сар., 2000). Показано је да је након 24 h од третмана цисплатином спроведеном на адултним јединкама пацова, концентрација GSH у бубрежним ћелијама била повећана у односу на контролу, док се 7 дана након аплицирања цисплатине, концентрација GSH смањила услед његове редуковане активности (Antunes и сар., 2000). Што се тиче повећане активности SOD регистроване у овој студији, Davis и сар. (2001) су истакли значајност SOD, а не CAT у сузбијању токсичних ефеката цисплатине на епителним ћелијама бубрега, те се стога може закључити да је управо овај ензим, заједно са GSH имао примарну улогу у неутрализацији продукованих ROS-а и RNS-а и покушају санације оксидативних оштећења. Дакле, повећана концентрација GSH, SOD, GSH-Px и GST забележена у овој студији након одређених третмана може бити одговор ћелија на оксидативни стрес а такође и последица директног утицаја естрогена на јачање антиоксидативног капацитета ћелија бубрега и у ублажавању токсичности цисплатине и испитиваних комплекса (Ulas и Сау, 2011; Nematbakhsh и сар., 2017).

Услед показане разлике у одговору ћелија бубрега на испитиване агенсе које се односе на смањен ниво продукције LPO и повећану активност појединих ензима након третмана Pt(IV) комплексима у односу на третман цисплатином, може се закључити да би пролонгираним периодом излагања антиоксидативни ензими имали више времена за санацију насталих оштећења и да би токсични ефекти ових једињења у односу на цисплатину били додатно ублажени.

Нефропротективни ефекти ресвератрола су показани на различитим нивоима бубрежних оштећења индукованих употребом лекова, сепсом, исхемијом/реперфузијом, опструкцијом, поремећајем активности алдостерона, као и на дијабет-посредованој нефропатији (Kitada и Коуа, 2013; Shahbazi и сар., 2020). Такође, протективни ефекти су потврђени како код акутне тако и код хроничне бубрежне инсуфицијенције (Guerreiro и сар., 2022). Механизми дејства ресвератрола заснивају се углавном на његовим

антиоксидативним способностима, а такође и на могућности активације SIRT1 протеина који деацетилацијом супстрата врши регулацију бројних ћелијских процеса покренутих као одговор на стрес (митохондријална биогенеза, редокс статус, ћелијско преживљавање и др.). Показано је да путем ова два механизма ресвератрол штити бубреге од оштећења индукованих различитим агенсима међу којима је и цисплатина (Kitada и Коуа, 2013; Shahbazi и сар., 2020). На различитим *in vivo* и *in vitro* модел системима, ресвератрол је испољио изузетан антиоксидативни и антиинфламаторни потенцијал, редукујући продукцију ROS-а, маркере оштећења бубрега и инфламације (KIM-1, TNF- α и IL-1 β) и регулишући експресију протеина одговорних за индуковање/инхибирање апоптозе (Bcl-2 и Bax) (Guerreiro и сар., 2022). Литературни подаци указују на висок степен ефикасности ресвератрола у санацији оксидативних оштећења бубрега индукованих цисплатином (Ince и сар., 2014; Darwish и сар., 2018; Ibrahim и сар., 2018; Turkmen и сар., 2019). У студији у којој је испитиван ефекат једне дозе ресвератрола од 25 mg/kg аплициране интраперитонеално мужјацима пацова соја Wistar albino у котретману цисплатином, забележена је супресија развоја бубрежних оштећења редукацијом апоптозе, инфламације и оксидативног стреса (Do Amaral и сар., 2008). Osman и сар. (2015) су указали на ефикасност ресвератрола (25 mg/kg) у ублажавању нефротоксичности индуковане цисплатином код женки Wistar пацова, а такође и у појачавању цитотоксичних ефеката цисплатине на ћелије *in vivo* индукованог тумора дојке.

У овој студији забележен је пораст у продукцији $O_2^{\cdot-}$ и LPO углавном након свих комбинованих третмана у односу на појединачне третмане; продукција NO_2^- и GSSG била је значајно смањена, док у концентрацији H_2O_2 није било значајних промена. Ресвератрол у условима измењене рН вредност и у присуству хидроксилног анјона и органских база може испољити прооксидативне ефекте, када аутооксидацијом продукује феноксил радикал даље доприноси редокс дисбалансу у корист продукције ROS-а (Erlank и сар., 2011; Li и сар., 2012; Salehi и сар., 2018). Показано је да, на овај начин, ресвератрол прооксидативном активношћу утиче на повећање интацелуларне продукције $O_2^{\cdot-}$ чиме се стварају неадекватни услови за деловање каспазе и последично супримира H_2O_2 -индукована апоптоза (Ahmad и сар., 2003). Прекомерном продукцијом $O_2^{\cdot-}$, а смањеном активношћу SOD, долази до реакције између два слободна радикала и формира се ONOO $^-$ (Halliwell и Gutteridge, 2015). Настали ONOO $^-$ даље оксидују ћелијске макромолекуле водећи између осталог до повећане продукције LPO који су потврда настанка ланчане реакције липидне пероксидације и нарушавања интегритета ћелија бубрежног ткива. Gadacha и сар. (2009) су закључили је да је испољавање антиоксидативног/прооксидативног ефекта ресвератрола повезано са дневно/ноћним термином аплицирања. Заправо, показано је да ресвератрол аплициран током дана индукује пораст концентрације TBARS у срцу, јетри и бубрезима пацова.

Активности/ниво испитиваних антиоксиданаса након комбинованих третмана у односу на појединачне третмане генерално су остале непромењене (GSH, SOD, GST), или значајно снижене (GSH-Px), док је значајан пораст активности забележен само за CAT (након комбинованог третмана ресвератролом и C1/C2 комплексима у односу на одговарајуће појединачне третмане) и GR након свих комбинованих третмана. На основу резултата параметара оксидативног стреса може се закључити да ресвератрол у примењеној дози није остварио протективни ефекат на нивоу бубрежног ткива код женки пацова. Иако је активност појединих ензима била повећана услед аплицирања ресвератрола у котретману са цисплатином и Pt(IV) комплексима, то ипак није било довољно да неутралише

продукцију $O_2^{\cdot-}$ и последично спречи његову реакцију са NO и даљу оксидацију ћелијских структурних и функционалних макромолекула. У прилог наведеном су и резултати хистопатолошких анализа на основу којих забележене морфолошке промене ткива бубрега након комбинованих третмана ресвератролом нису биле ублажене у односу на појединачне третмане. Напротив, поједине промене су биле умереног интензитета (конгестија, еозинofilни материјал у тубуларном лумену), док су те исте промене након појединачних третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима биле незнатне. Изузетак је био комбиновани третман ресвератролом и С3 комплексом након кога су морфолошке карактеристике ткива (хидропсна дегенерација тубуларног епитела, некроза ћелија тубуларног епитела, атрофија и десквamacија тубуларног епитела) биле ублажене у односу на промене детектоване након појединачног третмана са С3.

У истраживањима спроведеним на женкама пацова показано је да се ингестијом ресвератрола може ублажити цисплатином-индукован оксидативни дисбаланс у испитиваним ткивима. Међутим, у поменутих истраживањима забележена је висока стопа mortalитета у оквиру свих испитиваних група, што указује на немогућност ресвератрола да заштити поједине јединке од последица цисплатином-индуковане токсичности (Okafor, 2021). Испољавање протективних ефеката ресвератрола зависи од примењене дозе, начина апликације и трајања третмана (Gueguen и сар., 2015; Salehi и сар., 2018). Поједини литературни подаци показују да ресвератрол није био ефикасан у ублажавању оштећења индукованих цисплатином, док неке студије указују и на интензивирање токсичних ефеката цисплатине применом ресвератрола у вишим концентрацијама (Crowell и сар., 2004; Olgun и сар., 2014; Lee и сар., 2020). Нефропротективна ефикасност егзогенних антиоксиданаса приликом третмана спроведених на женкама може бити лимитирана, док поједини антиоксиданси могу индуковати додатну прогресију бубрежних оштећења (Nematbakhsh и сар., 2017). Будући да је ресвератрол фитоестроген са структурном сличношћу диетилстилбестролу, синтетском естрогену, његово дејство може бити агонистичко/антагонистичко и антиестрогено, и варира у зависности од присуства естрогена (Aggarwal и сар., 2004). Имајући у виду способност естрогена да елиминише нефропротективне ефекте лосартана и Vit E (Nematbakhsh и сар., 2012б; Ghadirian и сар., 2015) може се закључити да су очекивани бенефитни ефекти ресвератрола на нефротоксичност индуковану цисплатином и испитиваним комплексима у овој студији изостали услед присуства естрогенних хормона код експерименталних животиња.



VI ЗАКЉУЧЦИ

На основу експерименталних резултата добијених током израде ове докторске дисертације, а са циљем евалуације *in vitro* и *in vivo* ефеката новосинтетисаних Pt(IV) комплекса са естрима етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) ацетата, као и ефеката комбинованих третмана са ресвератролом, могу се извести следећи закључци:

1. Ефекти испитиваних једињења након *in vitro* третмана.

- Испитивани Pt(IV) комплекси значајно инхибирају пролиферацију хуманих ћелијских линија тумора дојке (MDA-MB-231) и плаценте (JEG-3). Антипролиферативна активност Pt(IV) комплекса интензивнија је након примене виших доза и дужег периода излагања ћелија. Pt(IV) комплекси значајно редукују вијабилност здравих хуманих фибробласта плућа (MRC-5). Антипролиферативни ефекти Pt(IV) комплекса су вишеструко интензивнији од ефеката цисплатине и указују на високу антитуморску активност ових новосинтетисаних једињења.
- Ресвератрол (25 μM) у комбинованим третманима са одабраним Pt(IV) комплексима (1, 10 и 25 μM) интензивира антипролиферативни ефекат комплекса према испитиваним туморским ћелијским линијама, редукујући њихов ефекат према здравим хуманим фибробластима. Посебно се издваја ефекат комбинованог третмана Pt(IV) комплекса са етил супституентом - С1 (10 μM) и ресвератролом (25 μM).
- Pt(IV) комплекс С1 испољава значајан антимиграторни ефекат према ћелијској линији хуманог тумора плаценте, али не и према ћелијској линији хуманог тумора дојке након дуготрајног периода излагања (72 h). Котретман са ресвератролом узрокује вишеструку редукцију миграторног потенцијала обе испитиване туморске ћелијске линије.
- Pt(IV) комплекс С1, цисплатина, као и котретман, индукују дестабилизацију редокс хомеостазе свих испитиваних ћелијских линија. Нарушавање редокс хомеостазе евидентирано је детектованом хиперпродукцијом биомаркера оксидативног стреса ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и NO_2^-) након краткотрајног третмана (24 h). Након дуготрајне изложености (72 h), продукција наведених реактивних врста била је смањена услед њихове међусобне интеракције и продукције секундарних високореактивних радикалских молекула, чијим деловањем долази до нарушавања ћелијског метаболизма и интегритета ћелије.

- Редокс дисбаланс потврђен је и порастом концентрације GSH код туморских ћелијских линија након 24 h. Након комбинованог третмана C1 комплекса и ресвератрола у трајању од 72 h, концентрација GSH у туморским ћелијама била је значајно редукована. Исти третман индуковао је интензивну продукцију GSSG такође у туморским ћелијама. Концентрације наведених параметара у здравој ћелијској линији фибробласта након комбинованог дуготрајног третмана указивале су на стабилизовање односа GSH/GSSG у корист редукованог глутатиона.
- Ресвератрол појачава антипролиферативни, антимиграторни и прооксидативни потенцијал одабраног Pt(IV) комплекса према туморским ћелијама (MDA-MB-231 и JEG-3), испољавајући протективне ефекте према здравим ћелијама (MRC-5).

2. Ефекти испитиваних једињења након *in vivo* третмана.

- Акутни појединачни третмани индуковали су смањење телесне масе експерименталних животиња које може бити последица евидентираног редукованог уноса хране. Комбиновани третмани ресвератролом и испитиваним дериватима Pt су утицали на повећан унос хране од стране експерименталних животиња, редукујући проценат губитка телесне масе. Испитивани третмани утичу на повећање релативне тежине јетре и бубрега услед инфламаторних процеса индукованих интоксикацијом овим једињењима.
- Испитивани појединачни третмани цисплатином и Pt(IV) комплексима индуковали су значајне промене хематолошких и биохемијских параметара који указују на нерегуларности у метаболичким процесима и функционисању организма, хемолизу еритроцита и појаву анемије, као и на индукована оштећења јетре и бубрега, потврђујући токсична својства ових једињења. Котретман ресвератролом стабилизовао је хематолошке промене настале као одговор на примену Pt деривата, док на поједине биохемијске параметре, примена котретмана није имала статистички значајне ефекте. Међутим, тренд промена свих наведених параметара након комбинованог третмана ресвератролом и дериватима Pt у односу на појединачне третмане указује на тенденцију ублажавања токсичних ефеката испитиваних једињења.
- Третмани цисплатином и Pt(IV) комплексима узрокују оксидативни стрес и оштећења еритроцита, ћелија јетре и бубрега, што је потврђено на основу промена у концентрацији параметара редокс статуса. Настале промене фаворизују даље повећање продукције реактивних врста и иницијацију ланчане реакције липидне пероксидације, а уједно и слабљење антиоксидативног капацитета ћелија циљних ткива.
- Одговори организма на испитиване третмане променом концентрације и активности параметара оксидативног/антиоксидативног статуса су ткивно специфични. У еритроцитима се након третмана цисплатином и Pt(IV) комплексима, концентрација $O_2^{\cdot-}$, LPO и GSH повећава, док се продукција NO_2^- и H_2O_2 смањује. Третмани дериватима Pt супримирају активности свих испитиваних ензима AOS-а еритроцита.

У ћелијама јетре, као одговор на интоксикацију појединачним третманима дериватима Pt, индукује се значајан пад концентрације GSSG, LPO, $O_2^{\bullet-}$, NO_2^- , док се концентрација GSH и активности ензима AOS-а повећавају. Акутни третмани дериватима Pt у ћелијама бубрежног ткива генерално смањују концентрацију $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и GSSG, док је продукција NO_2^- , LPO и GSH у значајном порасту. Такође, испитивани третмани супримирају активност CAT и GR, а уједно утичу на повећање активности осталих ензима.

- Новосинтетисани Pt(IV) комплекси су испољили јаче прооксидативне ефекте у поређењу са цисплатином, што указује на њихову интензивнију хематотоксичну, хепатотоксичну и нефротоксичну активност.
- Примена ресвератрола у комбинацији са дериватима Pt индукује различите, ткивно специфичне одговоре. У еритроцитима комбиновани третман ресвератролом, у односу на појединачне третмане, значајно смањује концентрацију $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и LPO, а повећава ниво продукције NO_2^- . Такође индукује пораст концентрације GSH и активности GSH-Px и CAT, а супримира активности SOD, GR и GST. Услед директне неутрализације реактивних врста, ресвератрол смањује супстрат за деловање ендогених антиоксиданаса чиме интензивира редукционе капацитете антиоксидативног заштитног система еритроцита. Хепатопротективни и нефропротективни ефекти ресвератрола у овој студији нису показани. Ресвератрол је индуковао прооксидативне промене у испитиваним ткивима.
- Испољавање прооксидативног својства ресвератрола и изостанак његових бенефитних ефеката у ткиву јетре и бубрега би могли бити повезани са присуством естрогених хормона који елиминишу његове антиоксидативне способности, а такође може бити и последица примењене дозе.
- Регистроване промене морфолошких карактеристика одабраних ткива, указују на приближно исти интезитет деловања свих третмана. Хепатотоксични ефекти Pt(IV) комплекса су израженији од хепатотоксичних ефеката цисплатине. Нефротоксична активност новосинтетисаних комплекса је истог интезитета као и нефротоксична активност цисплатине. Након комбинованих третмана са ресвератролом, морфолошке промене ткива јетре и бубрега нису биле ублажене у односу на појединачне третмане дериватима Pt, те се стога закључује да ресвератрол није испољио протективне ефекте у поменутих ткивима.

Општи закључак

На основу резултата добијених у овој студији може се закључити да новосинтетисани Pt(IV) комплекси испољавају израженији антитуморски потенцијал од цисплатине према хуманим ћелијским линијама тумора дојке и плаценте, што их чини обећавајућим агенсима у унапређивању антитуморских терапија. Међутим, добијени резултати такође указују да ови комплекси негативно утичу на метаболизам здравих ћелија хуманих фибробласта плућа. Употребом ресвератрола у котретману са испитиваним комплексима појачани су њихови антитуморски ефекти и интензивирана ткивна селективност, што указује да комбинована апликација једињења из природних извора може бити добра стратегија у даљем развоју ефикасности третмана. Највећу биокомпатибилност испољио је тетраклоридо(*O,O'*-диетил-етилендиамин-*N,N'*-ди-*S,S*-(2,2'-добензил) ацетат)-платина(IV) комплекс, те се стога може сматрати супстанцом погодном за даље фазе испитивања.

Евалуацијом *in vivo* ефеката испитиваних третмана може се закључити да су новосинтетисани Pt(IV) комплекси испољили интензивније токсичне ефекте од цисплатине према еритроцитима, као и ткиву јетре и бубрега. Протективни ефекти ресвератрола евидентирани су само према еритроцитима, док су хепатопротективни и нефропротективни ефекти изостали. Такође, ресвератрол је у комбинацији са испитиваним дериватима Pt испољио прооксидативни ефекат према ћелијама јетре и бубрега, који је повезан са присуством естрогених хормона и/или аплицираном дозом.

Упркос изостанку његовог протективног ефекта према поменутиим органима, антиоксидативни и антитуморски потенцијал ресвератрола показан у овој студији може имати изузетног значаја за унапређивање ефикасности антитуморских хемотерапија. Сходно наведеном, сугерише се даља евалуација ефеката ових једињења на различитим туморским ћелијама, као и евалуација *in vivo* ефеката на мужјацима пацова и оптимизација примењене дозе. Такође се сугерише и испитивање ефеката новосинтетисаних Pt(IV) комплекса у комбинацији са другим антиоксидативним суплементима како би се пронашли што ефикаснији антитуморски агенси и обезбедила њихова потенцијална хемотерапеутска примена.



VII ЛИТЕРАТУРА

1. Abdel-Daim, M. M., Aleya, L., El-Bialy, B. E., Abushouk, A. I., Alkahtani, S., Alarifi, S., Alkahtane, A.A., AlBasher, G., Ali, D., Almeer, R.S. & Al-Sultan, N.K., Alghamdi, J., Alahmari A., & Bungau, S. G. (2019). The ameliorative effects of ceftriaxone and vitamin E against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Environmental science and pollution research*, 26, 15248-15254.
2. Abdel-Gayoum, A.A., El-Jenjan, K.B., & Ghwarsha, K.A. (1999). Hyperlipidaemia in cisplatin-induced nephrotic rats. *Human and experimental toxicology*, 18, 454-459.
3. Adwas, A.A., Elsayed, A., Azab, A.E., & Quwaydir, F.A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of applied biotechnology and bioengineering*, 6, 43-47.
4. Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*, 24, 2783-2840.
5. Ahmad, K.A., Clement, M.V., & Pervaiz, S. (2003). Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide—induced apoptosis. *Annals of the New York academy of sciences*, 1010, 365-373.
6. Ahmed, O.M., Ahmed, A.A., Fahim, H.I., & Zaky, M.Y. (2022). Quercetin and naringenin abate diethylnitrosamine/acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats: the roles of oxidative stress, inflammation and cell apoptosis. *Drug and chemical toxicology*, 45, 262-273. 1-12.
7. Akosman, M.S., Demirel, H.H., & Turkmen, R. (2020). Protective effect of resveratrol on kidney and liver histopathology induced by NMDA receptor antagonist Mk-801 in mice. *Kafkas universitesi veteriner fakultesi dergisi*, 26, 83-87.
8. Alamolhodaei, N.S., Tsatsakis, A.M., Ramezani, M., Hayes, A.W., & Karimi, G. (2017). Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: An overview. *Food and chemical toxicology*, 103, 223-232.
9. Ali, B.R. (2019). Renal protective effect of quercetin on cisplatin-induced on some blood parameters and nephrotoxicity in male rats. *Indian journal of public health research and development*, 10, 1220-1224.
10. Ali, S.S., Ahsan, H., Zia, M.K., Siddiqui, T., & Khan, F.H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry*, 44, e13145.

11. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7, 1-15.
12. Amador-Martínez, I., Hernández-Cruz, E.Y., Jiménez-Urbe, A.P., Sánchez-Lozada, L.G., Aparicio-Trejo, O.E., Tapia, E., Barrera-Chimal, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2021). Mitochondrial transplantation: Is it a feasible therapy to prevent the cardiorenal side effects of cisplatin?. *Future pharmacology*, 1, 3-26.
13. Antunes, L.M.G., Darin, J.D.A.C., & Bianchi, M.D.L.P. (2000). Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacological research*, 41, 405-411.
14. Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., & Kim, A.L. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and applied pharmacology*, 224, 274-283.
15. Atmaca, N., Yıldırım, E., Güner, B., Kabakçı, R., & Bilmen, F.S. (2014). Effect of resveratrol on hematological and biochemical alterations in rats exposed to fluoride. *BioMed research international*, 2014:698628.
16. Auclair, C., & Voisin, E. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, CRC Press, 123-132.
17. Avtanski, D., & Poretsky, L. (2018). Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. *Molecular medicine*, 24, 1-17.
18. Ayaz, M., Nawaz, A., Ahmad, S., Mosa, O.F., Eisa Hamdoon, A.A., Khalifa, M.A., Sadiq, A., Ullah, F., Wadood, A., Kabra, A., & Ananda Murthy, H.C. (2022). Underlying anticancer mechanisms and synergistic combinations of phytochemicals with cancer chemotherapeutics: potential benefits and risks. *Journal of food quality*, 2022.
19. Baker, M.A., Cerniglia, G.J., & Zaman, A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry*, 190, 360-365.
20. Bano, N., & Najam, R. (2019). Histopathological and biochemical assessment of liver damage in albino Wistar rats treated with cytotoxic platinum compounds in combination with 5-fluorouracil. *Archives of medical science: AMS*, 15, 1092-1103.
21. Bansal, A., & Simon, M.C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of cell biology*, 217, 2291-2298.
22. Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *International scholarly research notices*, 2012, 137289.
23. Beutler, E. (1982). Catalase. In: Beutler E. (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York, 105-106.
24. Bhachandra, W., Alqadhi, Y.A., & Ninawe, A. (2018). Ameliorative role of bee honey and royal jelly against cisplatin induced alteration in hematological parameters in male Wistar albino rat. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 10, 110-114.

25. Bhat, K.P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R.G., Moon, R.C., & Pezzuto, J.M. (2001). Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer research*, 61, 7456-7463.
26. Bishop B.N., & Edemekong P.F. (2022). Choriocarcinoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, PMID: 30571055.
27. Bissinger, R., Bhuyan, A.A.M., Qadri, S.M., & Lang, F. (2019). Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS journal*, 286, 826-854.
28. Bokov, A., Chaudhuri, A., & Richardson, A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of ageing and development*, 125, 811-826.
29. Boo, Y.C. (2019). Human skin lightening efficacy of resveratrol and its analogs: From in vitro studies to cosmetic applications. *Antioxidants*, 8, 332.
30. Boroja, T., Katanić, J., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mišić, D., Stanković, V., Jovičić, N., & Mihailović, V. (2018). Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food and chemical toxicology*, 118, 252-263.
31. Botelho, M., Teixeira, J., & Oliveira, P. (2014). Carcinogenesis. In: Wexler P. (Ed.) Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Academic Press, 713-729.
32. Boulikas, T. (2009). Clinical overview on Lipoplati: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert opinion on investigational drugs*, 18, 1197-1218.
33. Britt, K.L., Cuzick, J., & Phillips, K.A. (2020). Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature reviews cancer*, 20, 417-436.
34. Brown, A., Kumar, S., & Tchounwou, P.B. (2019). Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *Journal of cancer science and therapy*, 11, 97.
35. Bulduk, B., Gokhan, O. T. O., Günbatar, N., Bulduk, M., Koçak, Y., & Elasan, S. (2022). The effect of resveratrol on toxicity caused by cisplatin in rats with experimentally created diabetes by streptozotocin. *Journal of health sciences and medicine*, 5, 124-130.
36. Calaf, G.M., Urzua, U., Termini, L., & Aguayo, F. (2018). Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget*, 9, 23824-23842.
37. Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M.G., Cuendet, M., Pezzuto, J.M., Santarsiero, B.D., & Mesecar, A.D. (2010). Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochemical journal*, 429, 273-282.
38. Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., Maciag, A., Puca, A.A., & Vecchione, C. (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and chemical toxicology*, 61, 215-226.
39. Chaiswing, L., St. Clair, W.H., & St. Clair, D.K. (2018). Redox paradox: A novel approach to therapeutics-resistant cancer. *Antioxidants and redox signaling*, 29, 1237-1272.
40. Checa, J., & Aran, J.M. (2020). Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *Journal of inflammation research*, 13, 1057-1073.

41. Chen, H.C. (2005). Boyden chamber assay. In: Guan, J.L. (Ed) Cell migration. Methods in molecular biology, 294. Humana Press. 15-22.
42. Chen, X., Wei, W., Li, Y., Huang, J., & Ci, X. (2019). Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Chemico-biological interactions*, 308, 269-278.
43. Cheung, A.N., Zhang, H.J., Xue, W.C., & Siu, M.K. (2009). Pathogenesis of choriocarcinoma: clinical, genetic and stem cell perspectives. *Future oncology*, 5, 217-31.
44. Chirino, Y.I., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and toxicologic pathology*, 61, 223-242.
45. Chirino, Y.I., Hernández-Pando, R., & Pedraza-Chaverri, J. (2004). Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC pharmacology*, 4, 1-9.
46. Chirino, Y.I., Trujillo, J., Sánchez-González, D.J., Martínez-Martínez, C.M., Cruz, C., Bobadilla, N.A., & Pedraza-Chaverri, J. (2008). Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicology letters*, 176, 48-57.
47. Ciccarese, F., Raimondi, V., Sharova, E., Silic-Benussi, M., & Ciminale, V. (2020). Nanoparticles as tools to target redox homeostasis in cancer cells. *Antioxidants*, 9, 211.
48. Ciftci, O., Beytur, A., Cakir, O., Gurbuz, N., & Vardi, N. (2011). Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-N-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 109, 328-333.
49. Çimen, M.B. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica chimica acta*, 390, 1-11.
50. Coletta, J.M., Hou, J.Y., & D'Alton, M.E. (2018). Choriocarcinoma. In: Copel, J.A., D'Alton, M.E., Feltovich, H., Gratacós, E., Krakow, D., Odibo, A.O., Platt, L.D., Tutschek, B. (Eds) Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care. Elsevier, 439-440.
51. Cooper, G.M., & Hausman, R.E. (2000). A molecular approach. The Cell. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
52. Correa, F., Pavón, N., Buelna-Chontal, M., Chiquete-Félix, N., Hernández-Esquivel, L., & Chávez, E. (2018). Calcium induces mitochondrial oxidative stress because of its binding to adenine nucleotide translocase. *Cell biochemistry and biophysics*, 76, 445-450.
53. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in nutrition*, 5, 87.
54. Costa, T.J., Barros, P.R., Arce, C., Santos, J.D., da Silva-Neto, J., Egea, G., Dantas, A.P., Tostes, R.C., & Jimenez-Altayo, F. (2021). The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free radical biology and medicine*, 162, 615-635.
55. Crowell, J.A., Korytko, P.J., Morrissey, R.L., Booth, T.D., & Levine, B.S. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological sciences*, 82, 614-619.
56. Darwish, M.A., Abo-Youssef, A.M., Khalaf, M.M., Abo-Saif, A.A., Saleh, I.G., & Abdelghany, T.M. (2018). Resveratrol influences platinum pharmacokinetics: A novel

- mechanism in protection against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology letters*, 290, 73-82.
57. Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, C.G., & Tchounwou, P.B. (2022). Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 23, 1532.
 58. Davis, C. A., Nick, H. S., & Agarwal, A. (2001). Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *Journal of the American society of nephrology*, 12, 2683-2690.
 59. de Sá Coutinho, D., Pacheco, M.T., Frozza, R.L., & Bernardi, A. (2018). Anti-inflammatory effects of resveratrol: mechanistic insights. *International journal of molecular sciences*, 19, 1812.
 60. Delanaye, P., Cavalier, E., & Pottel, H. (2017). Serum creatinine: not so simple!. *Nephron*, 136, 302-308.
 61. Dharmaraja, A.T. (2017). Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria. *Journal of medicinal chemistry*, 60, 3221-3240.
 62. Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 9829176.
 63. Diago, C.A.A. & Señaris, J.A.A. (2020). Should we pay more attention to low creatinine levels?. *Endocrinología, diabetes y nutrición (English ed.)*, 67, 486-492.
 64. Dilruba, S. & Kalayda, G.V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77, 1103-1124.
 65. Dimitrijević, D.P., Glodović, V.V., Radić, G.P., García-Granda, S., Menéndez-Taboada, L., Milovanović, M., Volarević, V., Arsenijević, N., Bogdanović, G.A., & Trifunović, S.R., (2013). Stereospecific ligands and their complexes. Part XV. Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with some esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl) acetic acid. Crystal structure of *O,O'*-dipropyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl) acetate dihydrochloride. *Inorganica chimica acta*, 402, 83-89.
 66. Do Amaral, C.L., Francescato, H.D.C., Coimbra, T.M., Costa, R.S., Darin, J., Antunes, L. M.G., & Bianchi, M.D.L.P. (2008). Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Archives of toxicology*, 82, 363-370.
 67. Dofara, S.G., Chang, S.L., & Diorio, C. (2020). Gene polymorphisms and circulating levels of MMP-2 and MMP-9: a review of their role in breast Cancer risk. *Anticancer research*, 40, 3619-3631.
 68. Drabkin, D.L., & Austin, J.H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of biological chemistry*, 112, 51-65.
 69. Erisgin, Z., Atasever, M., Cetinkaya, K., Dizakar, S.Ö.A., Omeroglu, S. & Sahin, H. (2019). Protective effects of *Nigella sativa* oil against carboplatin-induced liver damage in rats. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 110, 742-747.

70. Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R. & Kanner, J. (2011). Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free radical biology and medicine*, 51, 2319-2327.
71. Espinosa, E., & Raposo, C.G. (2010). Classification of anticancer drugs based on therapeutic targets. In: Reddy, L., Couvreur, P. (Eds) *Macromolecular anticancer therapeutics*. Springer, New York, 3-35.
72. Ewees, M.G., Messiha, B.A., Abo-Saif, A.A., Bayoumi, A., & Abdel-Bakky, M.S. (2018). Interference with coagulation cascade as a novel approach to counteract cisplatin-induced acute tubular necrosis; an experimental study in rats. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1155.
73. Fanelli, M., Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Micheloni, M. & Paoli, P. (2016). New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coordination chemistry reviews*, 310, 41-79.
74. Farag, M.R., Alagawany, M., & Tufarelli, V. (2017). *In vitro* antioxidant activities of resveratrol, cinnamaldehyde and their synergistic effect against cyadox-induced cytotoxicity in rabbit erythrocytes. *Drug and chemical toxicology*, 40, 196-205.
75. Farooqui, Z., Afsar, M., Rizwan, S., Khan, A.A. & Khan, F. (2016). Oral administration of *Nigella sativa* oil ameliorates the effect of cisplatin on membrane enzymes, carbohydrate metabolism and oxidative damage in rat liver. *Toxicology reports*, 3, 328-335.
76. Ferry-Dumazet, H., Garnier, O., Mamani-Matsuda, M., Vercauteren, J., Belloc, F., Billiard, C., Dupouy, M., Thiolat, D., Kolb, J.P., Marit, G., & Reiffers, J. (2002). Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis*, 23, 1327-1333.
77. Filomeni, G., Rotilio, G., & Rosa Ciriolo, M. (2003). Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The FASEB Journal*, 17, 64-66.
78. Fong, C.W. (2016). Platinum anti-cancer drugs: free radical mechanism of Pt-DNA adduct formation and anti-neoplastic effect. *Free radical biology and medicine*, 95, 216-229.
79. Foo, B.J.A., Eu, J.Q., Hirpara, J.L., & Pervaiz, S. (2021). Interplay between mitochondrial metabolism and cellular redox state dictates cancer cell survival. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 1341604.
80. Fouad, Y.A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7, 1016.
81. Freshney RI (1987). Culture of animal cells. In: Alan, R.L. (Ed) *A manual of basic techniques*. Inc New York.
82. Fu, X. Y., Xue, J. X., Zhou, L., Wang, Y. S., Huang, M. J., Li, L., & Lu, Y. (2012). The protection effects of resveratrol on irradiated human pneumonic cell lines and its mechanism. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of sichuan university. Medical science edition*, 43, 319-324.
83. Gadacha, W., Ben-Attia, M., Bonnefont-Rousselot, D., Aouani, E., Ghanem-Boughanmi, N., & Toutou, Y. (2009). Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: Pro-oxidant during day-time and antioxidant at night. *Redox report*, 14, 154-158.

84. Gaikwad, S., & Srivastava, S.K. (2021). Role of phytochemicals in perturbation of redox homeostasis in cancer. *Antioxidants*, *10*, 83.
85. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. *Free radical biology and medicine*, *104*, 144-164.
86. Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., & Borras, C. (2015). Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*, 837042.
87. Garcia, J. M., Scherer, T., Chen, J. A., Guillory, B., Nassif, A., Papusha, V., Smiechowska, J., Asnicar, M., Buettner, C., & Smith, R. G. (2013). Inhibition of cisplatin-induced lipid catabolism and weight loss by ghrelin in male mice. *Endocrinology*, *154*, 3118-3129.
88. Ghadirian, F., Nematbakhsh, M., Roozbehani, S., Mazaheri, S., Talebi, A., Pezeshki, Z., & Ashrafi, F. (2015). Nonprotective role of losartan in cisplatin-induced nephrotoxicity in ovariectomized rat model treated with estradiol. *Journal of pharmaceutical negative results*, *6*, 2-6.
89. Gharibi, F., Soltani, N., Maleki, M., Talebi, A., Nasiri, M., Shirdavani, S., & Nematbakhsh, M. (2017). The protective effect of L-arginine in cisplatin-induced nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Advanced biomedical research*, *6*, 100.
90. Ghoneum, A., Abdulfattah, A.Y., Warren, B.O., Shu, J., & Said, N. (2020). Redox homeostasis and metabolism in cancer: a complex mechanism and potential targeted therapeutics. *International journal of molecular sciences*, *21*, 3100.
91. Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, *88*, 102925.
92. Gibson, D. (2019). Multi-action Pt(IV) anticancer agents; do we understand how they work?. *Journal of inorganic biochemistry*, *191*, 77-84.
93. Giordano, C., Karasik, O., King-Morris, K., & Asmar, A. (2015). Uric acid as a marker of kidney disease: review of the current literature. *Disease markers*, *2015*, 382918.
94. Giustarini, D., Galvagni, F., Tesei, A., Farolfi, A., Zanoni, M., Pignatta, S., Milzani, A., Marone, I.M., Dalle-Donne, I., Nassini, R., & Rossi, R. (2015). Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. *Free radical biology and medicine*, *89*, 972-981.
95. Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., & Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, *30*, 665-667.
96. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., & Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, *126*, 131-138.
97. Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessieres, E., Ayer, A., Henrion, D., Lenaers, G. & Reynier, P. (2015). Resveratrol

- directly binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLoS One*, *10*, e0144290.
98. Guerreiro, Í., Ferreira-Pêgo, C., Carregosa, D., Santos, C.N., Menezes, R., Fernandes, A.S., & Costa, J.G. (2022). Polyphenols and their metabolites in renal diseases: An overview. *Foods*, *11*, 1060.
 99. Guo, Y., Zhang, S., Yuan, H., Song, D., Jin, S., Guo, Z., & Wang, X. (2019). A platinum (IV) prodrug to defeat breast cancer through disrupting vasculature and inhibiting metastasis. *Dalton transactions*, *48*, 3571-3575.
 100. Gupta, N., Verma, K., Nalla, S., Kulshreshtha, A., Lall, R., & Prasad, S. (2020). Free radicals as a double-edged sword: The cancer preventive and therapeutic roles of curcumin. *Molecules*, *25*, 5390.
 101. Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological chemistry*, *249*, 7130-7139.
 102. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2015) Antioxidant defences synthesized *in vivo*. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds) Free radicals in biology and medicine, 5th edn. USA, Oxford University Press, 77-151.
 103. Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A., Ameen, O.M., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African journal of pure and applied chemistry*, *4*, 142-151.
 104. Hamlaoui, S., Mokni, M., Limam, N., Carrier, A., Limam, F., Amri, M., Marzouki, L., & Aouani, E. (2012). Resveratrol protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat erythrocyte and plasma. *Journal of physiology and pharmacology*, *63*, 293.
 105. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, *12*, 31-46.
 106. Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*, 646-674.
 107. Hao, Q., Xiao, X., Zhen, J., Feng, J., Song, C., Jiang, B., & Hu, Z. (2016). Resveratrol attenuates acute kidney injury by inhibiting death receptor-mediated apoptotic pathways in a cisplatin-induced rat model. *Molecular medicine reports*, *14*, 3683-3689.
 108. Haunschild, R., & Marx, W. (2022). On health effects of resveratrol in wine. *International journal of environmental research and public health*, *19*, 3110.
 109. Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., & Tew, K.D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, *38*, 167-197.
 110. Herriges, M., & Morrissey, E.E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*, *141*, 502-513.
 111. Hossain, M.S., Zakaria, C.M., & Kudrat-E-Zahan, M. (2018). Metal complexes as potential antimicrobial agent: a review. *American journal of heterocyclic chemistry*, *4*, 1.

112. Hussain, Y., Islam, L., Khan, H., Filosa, R., Aschner, M., & Javed, S. (2021). Curcumin–cisplatin chemotherapy: A novel strategy in promoting chemotherapy efficacy and reducing side effects. *Phytotherapy research*, 35, 6514-6529.
113. Ibrahim, A., Al-Hizab, F.A., Abushouk, A.I., & Abdel-Daim, M.M. (2018). Nephroprotective effects of benzyl isothiocyanate and resveratrol against cisplatin-induced oxidative stress and inflammation. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1268.
114. Ince, S., Acaroz, D.A., Neuwirth, O., Demirel, H.H., Denk, B., Kucukurt, I. & Turkmen, R. (2014). Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats. *Food and chemical toxicology*, 72, 147-153.
115. Jalili, C., Makalani, F., Roshankhah, S., Sohrabi, K., & Salahshoor, M. R. (2017). Protective effect of resveratrol against morphine damage to kidneys of mice. *International journal of morphology*, 35.
116. Jaman, M.S., Rahman, M.S., Swarna, R.R., Mahato, J., Ibrahim, M.A., Siddique, M., Miah, M., & Ayshasiddeka, M. (2018). Diabetes and red blood parameters. *Annals of clinical endocrinology and metabolism*, 2, 1-9.
117. Johnstone, T.C., Suntharalingam, K., & Lippard, S.J. (2016). The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chemical reviews*, 116, 3436-3486.
118. Jung, M., Hotter, G., Viñas, J.L., & Sola, A. (2009). Cisplatin upregulates mitochondrial nitric oxide synthase and peroxynitrite formation to promote renal injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 234, 236-246.
119. Jurić, T., Stanković, J.S.K., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mišić, D., Stanković, V. & Mihailović, V. (2020). Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. *South African journal of botany*, 128, 141-151.
120. Jurišević, M., Radosavljević, G., Arsenijević, A., Milovanović, M., Gajović, N., Djordjević, D., Milovanović, J., Stojanović, B., Ilić, A., Sabo, T., & Kanjevać, T. (2016). Platinum complexes with Edda (Ethylenediamine-*N,N'*-Diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serbian journal of experimental and clinical research*, 17, 285-296.
121. Jurišić, V., & Živančević-Simonović S. (2022). U: Živančević-Simonović S., Đukić, A., Đurđević, P., Jurišić, V., Mijatović, Lj. (Eds) Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 463-485.
122. Kaludjerović, G.N., Miljković, D., Momcilović, M., Djinović, V.M., Stojković, M.M., Sabo, T.J., & Trajković, V. (2005). Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death *in vitro*. *International journal of cancer*, 116, 479-486.
123. Kanwal, S. (2013). Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells (Doctoral dissertation, Paris 5).
124. Katanić, J., Matić, S., Pferschy-Wenzig, E.M., Kretschmer, N., Boroja, T., Mihailović, V., Stanković, V., Stanković, N., Mladenović, M., Stanić, S. & Mihailović, M. (2017). *Filipendula ulmaria* extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress

- in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis. *Food and chemical toxicology*, 99, 86-102.
125. Kaveripakam, S., & Adikay, S. (2018). Development of an experimental model of nephrotoxicity co-existing with obesity in rats. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 80, 844-851.
 126. Kim, S.K., Kwon, D.A., Lee, H.S., Kim, H.K., & Kim, W.K. (2019). Preventive effect of the herbal preparation, HemoHIM, on cisplatin-induced immune suppression. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2019:3494806.
 127. Kitada, M., & Koya, D. (2013). Renal protective effects of resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 568093.
 128. Klaunig, J.E. (2018). Oxidative stress and cancer. *Current pharmaceutical design*, 24, 4771-4778.
 129. Klaunig, J.E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current opinion in toxicology*, 7, 116-121.
 130. Kloesch, B., Dietersdorfer, E., Loebisch, S., & Steiner, G. (2014). Anti-inflammatory and pro-apoptotic effects of curcumin and resveratrol on the human lung fibroblast cell line MRC-5. *Alternative and integrative medicine*, 3, 1-11.
 131. Ko, J.H., Sethi, G., Um, J.Y., Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Kumar, A.P., Bishayee, A., & Ahn, K.S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 18, 2589.
 132. Kong, H., & Chandel, N.S. (2020). Reactive oxygen species and cancer. In: Sies, H. (Ed) *Oxidative Stress*. Academic Press, 619-637.
 133. Kuhn, V., Diederich, L., Keller IV, T.S., Kramer, C.M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B.E., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. (2017). Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxidants and redox signaling*, 26, 718-742.
 134. Kumar, U., Rathi, G., Sharma, L., Fakhri, K. U., Mavi, A. K., Goyal, J., & Kumar, S. (2022). Epigenetic regulation of breast cancer. In: *Research anthology on advancements in women's health and reproductive rights*. IGI Global. 230-260.
 135. Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., & Bernatoniene, J. (2016). Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina*, 52, 148-155.
 136. Kurutas, E.B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15, 71.
 137. Kwiecinski, M.R., Pedrosa, R.C., Felipe, K.B., Farias, M.S., Glorieux, C., Valenzuela, M., Sid, B., Benites, J., Valderrama, J.A., Verrax, J., & Calderon, P.B. (2012). Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 421, 268-273.
 138. Lai, Y.L., Lin, C.C., Hsu, S.R., & Yen, S.K. (2018). Electrochemical deposition of cisplatin on pure magnesium. *Journal of the electrochemical society*, 165, 196-205.

139. Lazić, J.M., Vučićević, L., Grgurić-Šipka, S., Janjetović, K., Kaluđerović, G.N., Misirkić, M., Gruden-Pavlović, M., Popadić, D., Paschke, R., Trajković, V., & Sabo, T.J., (2010). Synthesis and *in vitro* anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N, N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem: Chemistry enabling drug discovery*, 5, 881-889.
140. Lee, C.H., Kim, K.W., Lee, S.M., & Kim, S.Y. (2020). Dose-dependent effects of resveratrol on cisplatin-induced hearing loss. *International journal of molecular sciences*, 22, 113.
141. Lee, Y.J., Lee, G.J., Yi, S.S., Heo, S.H., Park, C.R., Nam, H.S., Cho, M.K. & Lee, S.H. (2016). Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. *Food and chemical toxicology*, 97, 96-107.
142. Leischner, C., Burkard, M., Michel, A., Berchtold, S., Niessner, H., Marongiu, L., Busch, C., Frank, J., Lauer, U.M. & Venturelli, S. (2021). Comparative analysis of the antitumor activity of *cis*- and *trans*-resveratrol in human cancer cells with different p53 status. *Molecules*, 26, 5586.
143. Li, D.D., Han, R.M., Liang, R., Chen, C.H., Lai, W., Zhang, J.P. & Skibsted, L.H. (2012). Hydroxyl radical reaction with *trans*-resveratrol: initial carbon radical adduct formation followed by rearrangement to phenoxyl radical. *The journal of physical chemistry B*, 116, 7154-7161.
144. Lin, M.H., Hung, C.F., Sung, H.C., Yang, S.C., Yu, H.P., & Fang, J.Y. (2021). The bioactivities of resveratrol and its naturally occurring derivatives on skin. *Journal of food and drug analysis*, 29, 15-38.
145. Liu, H., Li, Q., Wang, Y., Hong, H., Chen, M., Wang, Y., Hong, F. & Yang, S. (2017). Elevated nitric oxide levels associated with hepatic cell apoptosis during liver injury. *Hepatology research*, 47, 178-185.
146. Lomeli, N., Di, K., Czerniawski, J., Guzowski, J.F. & Bota, D.A. (2017). Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats. *Free radical biology and medicine*, 102, 274-286.
147. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
148. Luft, F.C. (2021). Biomarkers and predicting acute kidney injury. *Acta physiologica*, 231, e13479.
149. Luo, G., Xiao, L., Wang, D., Wang, N., Luo, C., Yang, X., & Hao, L. (2020). Resveratrol protects against ethanol-induced impairment of insulin secretion in INS-1 cells through SIRT1-UCP2 axis. *Toxicology in vitro*, 65, 104808.
150. Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
151. Mahmud, H., Föllner, M., & Lang, F. (2008). Suicidal erythrocyte death triggered by cisplatin. *Toxicology*, 249, 40-44.

152. Maral, J., Puget, K., & Michelson, A.M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochemical and biophysical research communications*, 77, 1525-1535.
153. Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A.L., Colla, R., Ciucis, C.D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N., & Domenicotti, C. (2016). Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016:6235641.
154. Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47, 469-474.
155. Marković, S.D., Djačić, D.S., Cvetković, D.M., Obradović, A.D., Žižić, J.B., Ognjanović, B.I., & Štajn, A.Š. (2011a). Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biological trace element research*, 142, 660-670.
156. Marković, S.D., Žižić, J.B., Đačić, D.S., Obradović, A.D., Ćurčić, M.G., Cvetković, D.M., Đorđević, N.Z., Ognjanović, B.I., & Štajn, A. Š. (2011b). Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vivo* treatment with cisplatin and selenium. *Archives of biological sciences*, 63, 991-999.
157. Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., & Márquez, J. (2012). Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archive of toxicology*, 86, 1649-1665.
158. Mazur, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168, 939-949.
159. Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules*, 26, 229.
160. Mihajlović, K., Milosavljević, I., Jeremić, J., Savić, M., Sretenović, J., Srejović, I., Živković, V., Jovičić, N., Paunović, M., Bolevich, S., Jakovljević, V., & Novokmet, S. (2021). Redox and apoptotic potential of novel ruthenium complexes in rat blood and heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 99, 207-217.
161. Moldogazieva, N.T., Lutsenko, S.V., & Terentiev, A.A. (2018). Reactive oxygen and nitrogen species-induced protein modifications: Implication in carcinogenesis and anticancer therapy. *Cancer research*, 78, 6040-6047.
162. Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast cancer: Targets and therapy*, 11, 151.
163. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
164. Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., & Ignarro, L. J. (2013). Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *Journal of the American college of cardiology*, 62, 89-95.
165. Nasr, A.Y. (2014a). Protective effect of aged garlic extract against the oxidative stress induced by cisplatin on blood cells parameters and hepatic antioxidant enzymes in rats. *Toxicology reports*, 1, 682-691.

166. Nasr, A.Y., & Saleh, H.A. (20146). Aged garlic extract protects against oxidative stress and renal changes in cisplatin-treated adult male rats. *Cancer cell international*, 14, 1-12.
167. NavaneethaKrishnan, S., Rosales, J.L., & Lee, K.Y. (2019). ROS-mediated cancer cell killing through dietary phytochemicals. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 9051542.
168. Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., & Lengyel, G. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free radical research*, 44, 1125-1171.
169. Nematbakhsh, M., Ashrafi, F., Pezeshki, Z., Fatahi, Z., Kianpoor, F., Sanei, M. H., & Talebi, A. (2012a). A histopathological study of nephrotoxicity, hepatotoxicity or testicular toxicity: Which one is the first observation as side effect of cisplatin-induced toxicity in animal model?. *Journal of nephropathology*, 1, 190-193.
170. Nematbakhsh, M., Ashrafi, F., Safari, T., Talebi, A., Nasri, H., Mortazavi, M., Khazaei, M., & Baradaran-Mahdavi, M.M. (20126). Administration of vitamin E and losartan as prophylaxes in cisplatin-induced nephrotoxicity model in rats. *Journal of nephrology*, 25, 410-417.
171. Nematbakhsh, M., Pezeshki, Z., Jazi, F.E., Mazaheri, B., Moeini, M., Safari, T., Azarkish, F., Moslemi, F., Maleki, M., Rezaei, A. & Saberi, S. (2017). Cisplatin-induced nephrotoxicity; protective supplements and gender differences. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18, 295.
172. Ngan, H.Y., Seckl, M.J., Berkowitz, R.S., Xiang, Y., Golfier, F., Sekharan, P.K., Lurain, J.R., & Massuger, L. (2021). Diagnosis and management of gestational trophoblastic disease: 2021 update. *International journal of gynecology and obstetrics*, 155, 86-93.
173. Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5, 27986-28006.
174. Novaković, R., Rajković, J., Gostimirović, M., Gojković-Bukarica, L., & Radunović, N. (2022). Resveratrol and reproductive health. *Life*, 12, 294.
175. Ogbe, R.J., Agbese, S.P., & Abu, A.H. (2020). Protective effect of aqueous extract of *Lophira lanceolata* leaf against cisplatin-induced hepatorenal injuries and dyslipidemia in Wistar rats. *Clinical phytoscience*, 6, 1-11.
176. Ognjanović, B.I., Djordjević, N.Z., Matic, M.M., Obradović, J.M., Mladenović, J.M., Štajn, A.Š., & Saičić, Z.S. (2012). Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *International journal of molecular sciences*, 13, 1790-1803.
177. Okafor, I.A. (2021). Oxidative stress profile following the co-administration of cisplatin and resveratrol in female rats: a preliminary study. *Physiology and pharmacology*, 25, 134-145.
178. Olas, B., Wachowicz, B., & Buczyn, A. (2000). Vitamin C suppresses the cisplatin toxicity on blood platelets. *Anti-cancer drugs*, 11, 487-493.

179. Olgun, Y., Kırkım, G., Kolatan, E., Kıray, M., Bağrıyanık, A., Olgun, A., Kızmazoğlu, D.C., Ellidokuz, H., Serbetçioğlu, B., Altun, Z. & Aktas, S. (2014). Friend or foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *The laryngoscope*, 124, 760-766.
180. Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant physiology and biochemistry*, 144, 135-143.
181. Omar, H.A., Mohamed, W.R., Arafa, E.S.A., Shehata, B.A., El Sherbiny, G.A., Arab, H.H., & Elgendy, A.N.A. (2016). Hesperidin alleviates cisplatin-induced hepatotoxicity in rats without inhibiting its antitumor activity. *Pharmacological reports*, 68, 349-356.
182. Omoya, T., Shimizu, I., Zhou, Y., Okamura, Y., Inoue, H., Lu, G., Itonaga, M., Honda, H., Nomura, M. & Ito, S. (2001). Effects of idoxifene and estradiol on NF-kappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver international*, 21, 183-91.
183. Osman, A.M.M., Telity, S.A., Damanhoury, Z.A., Al-Harthy, S.E., Al-Kreathy, H.M., Ramadan, W.S., Elshal, M.F., Khan, L.M., & Kamel, F. (2015). Chemosensitizing and nephroprotective effect of resveratrol in cisplatin-treated animals. *Cancer cell international*, 15, 1-8.
184. Oun, R., Moussa, Y.E., & Wheate, N.J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton transactions*, 47, 6645-6653.
185. Özcan, P., Fişicıoğlu, C., Yıldırım, Ö. K., Özkan, F., Akkaya, H., & Aslan, İ. (2015). Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. *Reproductive biomedicine online*, 31, 404-410.
186. Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2009). Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 34, 1093-1097.
187. Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2010). Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative insult. *Phytotherapy research*, 24, 11-14.
188. Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2013). Resveratrol up-regulates the erythrocyte plasma membrane redox system and mitigates oxidation-induced alterations in erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation research*, 16, 232-240.
189. Pandir, D., & Kara, O. (2014). Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. *Biologia*, 69, 811-816.
190. Park, S., Lim, W., Bazer, F.W., & Song, G. (2018). Naringenin suppresses growth of human placental choriocarcinoma via reactive oxygen species-mediated P38 and JNK MAPK pathways. *Phytomedicine*, 50, 238-246.
191. Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., & Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative medicine research*, 5, 250-258.
192. Paunović, M.G., Matic, M.M., Obradović, A.D., Jevtić, V.V., Stojković, D.L., & Ognjanović, B.I. (2022). Antiproliferative, antimigratory, and prooxidative potential of

- novel platinum(IV) complexes and resveratrol on breast cancer (MDA-MB-231) and choriocarcinoma (JEG-3) cell lines. *Drug development research*, 83, 688-698.
193. Perše, M., & Večerić-Haler, Ž. (2018). Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: characteristics and challenges. *BioMed research international*, 2018, 1462802.
194. Petrović, M., Popović, S., Baskic, D., Todorović, M., Djurdjević, P., Ristic-Fira, A., Keta, O., Petković, V., Koricanać, L., Stojković, D., & Jevtić, V., (2020). The effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on cytotoxicity and radiosensitization of human tumour cells *in vitro*. *Anticancer research*, 40, 5001-5013.
195. Pick, E., & Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*, 38, 161-170.
196. Pignitter, M., Schueller, K., Burkon, A., Knorr, V., Esefelder, L., Doberer, D., Wolzt, M., & Somoza, V. (2016). Concentration-dependent effects of resveratrol and metabolites on the redox status of human erythrocytes in single-dose studies. *The journal of nutritional biochemistry*, 27, 164-170.
197. Pisoschi, A.M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
198. Poschner, S., Maier-Salamon, A., Thalhammer, T., & Jäger, W., (2019). Resveratrol and other dietary polyphenols are inhibitors of estrogen metabolism in human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 190, 11-18.
199. Poulsen, M.M., Fjeldborg, K., Ornstrup, M.J., Kjær, T.N., Nøhr, M.K., & Pedersen, S.B. (2015). Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes. *Biochimica et biophysica acta (BBA)- Molecular basis of disease*, 1852, 1124-1136.
200. Prasad, S., & Srivastava, S.K. (2020). Oxidative stress and cancer: Chemopreventive and therapeutic role of triphala. *Antioxidants*, 9, 72.
201. Prasad, S., Gupta, S.C., & Tyagi, A.K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer letters*, 387, 95-105.
202. Rai, G., Mishra, S., Suman, S., & Shukla, Y. (2016). Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* models: A mechanistic insight. *Phytomedicine*, 23, 233-242.
203. Ralhan, R., & Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic patents*, 17, 1061-1075.
204. Rašković, A., Čučuz, V., Torović, L., Tomas, A., Gojković-Bukarica, L., Čebović, T., Milijašević, B., Stilinović, N., & Hogervorst, J.C. (2019). Resveratrol supplementation improves metabolic control in rats with induced hyperlipidemia and type 2 diabetes. *Saudi pharmaceutical journal*, 27, 1036-1043.
205. Raudenska, M., Balvan, J., Fojtu, M., Gumulec, J., & Masarik, M. (2019). Unexpected therapeutic effects of cisplatin. *Metallomics*, 11, 1182-1199.

206. Rauf, A., Imran, M., Butt, M.S., Nadeem, M., Peters, D.G. & Mubarak, M.S. (2018). Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58, 1428-1447.
207. Rehncrona, S., Smith, D. S., Åkesson, B., Westerberg, E., & Siesjö, B.K. (1980). Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺-and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation *in vitro*. *Journal of neurochemistry*, 34, 1630-1638.
208. Rimmelé, P., Lofek-Czubek, S., & Ghaffari, S. (2014). Resveratrol increases the bone marrow hematopoietic stem and progenitor cell capacity. *American journal of hematology*, 89, E235-E238.
209. Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Velázquez, S.C., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J.C., Robledo-Cadena, D.X., Hernández-Reséndiz, I., García-García, J.D., Belmont-Díaz, J., López-Marure, R., Hernández-Esquivel, L., & Sánchez-Thomas, R. (2019). Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*, 370, 65-77.
210. Ruberte, A.C., Ramos-Inza, S., Aydillo, C., Talavera, I., Encío, I., Plano, D., & Sanmartín, C., (2020). Novel N, N'-disubstituted acylselenoureas as potential antioxidant and cytotoxic agents. *Antioxidants*, 9, 55.
211. Saad, S.Y., Najjar, T.A., Daba, M.H., & Al-Rikabi, A.C. (2002). Inhibition of nitric oxide synthase aggravates cisplatin-induced nephrotoxicity: effect of 2-amino-4-methylpyridine. *Chemotherapy*, 48, 309-315.
212. Salehi, B., Mishra, A., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P., Martins, N. & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: a double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*, 6, 91.
213. Savage, J., Adams, E., Veras, E., Murphy, K.M., & Ronnett, B.M. (2017). Choriocarcinoma in women: Analysis of a case series with genotyping. *The American journal of surgical pathology*, 41, 1593-1606.
214. Senga, S.S., & Grose, R.P. (2021). Hallmarks of cancer—the new testament. *Open biology*, 11, 200358.
215. Shahbazi, F., Farvadi, F., Dashti-Khavidaki, S., Ataei, S., & Shojaei, L. (2020). Potential nephroprotective effects of resveratrol in drug induced nephrotoxicity: a narrative review of safety and efficacy data. *Advances in traditional medicine*, 20, 529-544.
216. Shindikar, A., Singh, A., Nobre, M., & Kirolikar, S. (2016). Curcumin and resveratrol as promising natural remedies with nanomedicine approach for the effective treatment of triple negative breast cancer. *Journal of oncology*, 2016, 9750785.
217. Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J., & Bishayee, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in cancer biology*, 40-41, 209-232.
218. Sreekumar, P.G., Ferrington, D.A., & Kannan, R. (2021). Glutathione metabolism and the novel role of mitochondrial GSH in retinal degeneration. *Antioxidants*, 10, 661.

219. Stewart, B.W. (2019). Stewart BW. Mechanisms of carcinogenesis: from initiation and promotion to the hallmarks. In: Baan, R.A., Stewart, B.W., Straif, K. (Eds) Tumour site concordance and mechanisms of carcinogenesis. Lyon, France, International agency for research on cancer, Chapter 11, 93-107.
220. Stojković, D.L., Jevtić, V.V., Radić, G.P., Đačić, D.S., Ćurčić, M.G., Marković, S.D., Đinović, V.M., Petrović, V.P., & Trifunović, S.R. (2014). Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *Journal of molecular structure*, 1062, 21-28.
221. Stykel, M. G., & Ryan, S. D. (2022). Nitrosative stress in Parkinson's disease. *npj Parkinson's disease*, 8, 104.
222. Suh, J., Kim, D.H., & Surh, Y.J. (2018). Resveratrol suppresses migration, invasion and stemness of human breast cancer cells by interfering with tumor-stromal cross-talk. *Archives of biochemistry and biophysics*, 643, 62-71.
223. Sun, Y., Lu, Y., Bian, M., Yang, Z., Ma, X., & Liu, W. (2021). Pt(II) and Au(III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment. *European journal of medicinal chemistry*, 211, 113098.
224. Sun, Y., Zhou, Q.M., Lu, Y.Y., Zhang, H., Chen, Q.L., Zhao, M., & Su, S.B. (2019). Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules*, 24, 1131.
225. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71, 209-249.
226. Surico, D., Ercoli, A., Farruggio, S., Raina, G., Filippini, D., Mary, D., Minisini, R., Surico, N., Pirisi, M. & Grossini, E. (2017). Modulation of oxidative stress by 17 β -estradiol and genistein in human hepatic cell lines *in vitro*. *Cellular physiology and biochemistry*, 42, 1051-1062.
227. Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology letters*, 140-141, 105-112.
228. Szabó, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews drug discovery*, 6, 662-680.
229. Tamura, M., Oshino, N., & Chance, B. (1982). Some characteristics of hydrogen-and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *The journal of biochemistry*, 92, 1019-1031.
230. Taneja, A., & Shepard, D. (2021). Chemotherapy-induced anemia. In: Handbook of cancer treatment-related symptoms and toxicities. 5, 11-16.

231. Tian, Y., Wu, B., Li, X., Jin, X., Zhang, F., Jiang, C., Xu, W., Li, H., & Wang, H. (2019). The resveratrol alleviates the hepatic toxicity of CuSO₄ in the rat. *Biological trace element research*, 187, 464-471.
232. Tolan, D., Gandin, V., Morrison, L., El-Nahas, A., Marzano, C., Montagner, D., & Erxleben, A. (2016). Oxidative stress induced by Pt(IV) pro-drugs based on the cisplatin scaffold and indole carboxylic acids in axial position. *Scientific reports*, 6, 1-13.
233. Townsend, D.M., Deng, M., Zhang, L., Lopus, M.G., & Hanigan, M.H. (2003). Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American society of nephrology*, 14, 1-10.
234. Truong, V.L., Jun, M., & Jeong, W.S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44, 36-49.
235. Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Kabu, M., & Ince, S. (2019). Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicology research*, 8, 238-245.
236. Uddin, M.J., Farjana, M., Moni, A., Hossain, K.S., Hannan, M.A., & Ha, H. (2021). Prospective pharmacological potential of resveratrol in delaying kidney aging. *International journal of molecular sciences*, 22, 8258.
237. Ulas, M., & Cay, M. (2011). 17 β -estradiol and vitamin E modulates oxidative stress-induced kidney toxicity in diabetic ovariectomized rat. *Biological trace element research*, 144, 821-831.
238. Un, H., Ugan, R.A., Kose, D., Bayir, Y., Cadirci, E., Selli, J., & Halici, Z. (2020). A novel effect of aprepitant: Protection for cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity. *European journal of pharmacology*, 880, 173168.
239. Valentovic, M.A., Ball, J.G., Brown, J.M., Terneus, M.V., McQuade, E., Van Meter, S., Hedrick, H.M., Roy, A.A., & Williams, T. (2014). Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidative stress. *Toxicology in vitro*, 28, 248-257.
240. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39, 44-84.
241. van Duursen, M.B. (2017). Modulation of estrogen synthesis and metabolism by phytoestrogens *in vitro* and the implications for women's health. *Toxicology research*, 6, 772-794.
242. Van Ginkel, P.R., Sareen, D., Subramanian, L., Walker, Q., Darjatmoko, S.R., Lindstrom, M.J., Kulkarni, A., Albert, D.M., & Polans, A.S. (2007). Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clinical cancer research*, 13, 5162-5169.
243. Virk, P., Al-Mukhaizeem, N.A.R., Morebah, S.H.B., Fouad, D., & Elobeid, M. (2020). Protective effect of resveratrol against toxicity induced by the mycotoxin, zearalenone in a rat model. *Food and chemical toxicology*, 146, 111840.

244. Wainford, R.D., Weaver, R.J., Stewart, K.N., Brown, P. & Hawksworth, G.M. (2008). Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology* 249, 184–193.
245. Waks, A.G., & Winer, E.P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321, 288-300.
246. Wang, G., Zhang, M., Zhong, Q., Lei, Z., Wu, H., & Lai, F. (2016a). Protective effects of resveratrol against hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity on human erythrocytes. *Journal of functional foods*, 23, 144-153.
247. Wang, K., Zhang, C., Bao, J., Jia, X., Liang, Y., Wang, X., Chen, M., Su, H., Li, P., Wan, J.B., & He, C. (2016b). Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Scientific reports*, 6, 1-14.
248. Wang, T.T., Hudson, T.S., Wang, T.C., Remsberg, C.M., Davies, N.M., Takahashi, Y., Kim, Y.S., Seifried, H., Vinyard, B.T., Perkins, S.N. & Hursting, S.D. (2008). Differential effects of resveratrol on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis*, 29, 2001-2010.
249. Waring, W.S., Stephen, A.F.L., Robinson, O.D.G., Dow, M.A., & Pettie, J.M. (2008). Serum urea concentration and the risk of hepatotoxicity after paracetamol overdose. *QJM: An international journal of medicine*, 101, 359-363.
250. Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*, 95, 20211033.
251. World Health Organization (2021). Breast cancer. Доступно на: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
252. Xiao, Q., Zhu, W., Feng, W., Lee, S.S., Leung, A.W., Shen, J., Gao, L., & Xu, C. (2019). A review of resveratrol as a potent chemoprotective and synergistic agent in cancer chemotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1534.
253. Xu, J., Wise, J.T., Wang, L., Schumann, K., Zhang, Z., & Shi, X. (2017). Dual roles of oxidative stress in metal carcinogenesis. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, 36, 345-376.
254. Yang, C., Lim, W., Bazer, F.W., & Song, G. (2017). Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. *Cancer letters*, 399, 10-19.
255. Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M.J., Roberts, M.S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of experimental and clinical cancer research*, 37, 266.
256. Yang, M.D., Sun, Y., Zhou, W.J., Xie, X.Z., Zhou, Q.M., Lu, Y.Y., & Su, S.B. (2021). Resveratrol enhances inhibition effects of cisplatin on cell migration and invasion and tumor growth in breast cancer MDA-MB-231 cell models *in vivo* and *in vitro*. *Molecules*, 26, 2204.
257. Yuseran, H., Hartoyo, E., Nurseta, T., & Kalim, H. (2021). Genistein inhibits the proliferation of human choriocarcinoma cells via the downregulation of estrogen receptor- α phosphorylation at serine 118. *Clinical nutrition open science*, 35, 77-85.

258. Zhang, H., Zhai, Z., Wang, Y., Zhang, J., Wu, H., Wang, Y., Li, C., Li, D., Lu, L., Wang, X., Chang, J., Hou, Q., Ju, Z., Zhou, D., & Meng, A. (2013). Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free radical biology and medicine*, 54, 40-50.
259. Zheng, Y.R., Suntharalingam, K., Johnstone, T.C., Yoo, H., Lin, W., Brooks, J.G., & Lippard, S.J. (2014). Pt(IV) prodrugs designed to bind non-covalently to human serum albumin for drug delivery. *Journal of the American chemical society*, 136, 8790-8798.
260. Zhou, D.D., Luo, M., Huang, S.Y., Saimaiti, A., Shang, A., Gan, R.Y., & Li, H.B. (2021). Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 9932218.
261. Zhou, H.B., Chen, J.J., Wang, W.X., Cai, J.T., & Du, Q. (2005). Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11, 280.
262. Zhu, L., Luo, X., & Jin, Z. (2008). Effect of resveratrol on serum and liver lipid profile and antioxidant activity in hyperlipidemia rats. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 21, 890-895.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

$^1\text{O}_2$ – синглет кисеоник	Cu – бакар
Akt – протеин киназа B	CuSO_4 – бакар сулфат
ALP – алкална фосфатаза	CuZn SOD – бакар-цинк супероксид дисмутаза
ALT – аланин трансминаза	Cyt c (енгл. <i>Cytochrome c</i>) – цитохром c
AOS (енгл. <i>Antioxidative Defense System</i>) – антиоксидативни одбрамбени систем	DMEM (енгл. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) – хранљиви медијум
AP1 (енгл. <i>Activator Protein 1</i>) – активациони протеин 1	DMSO (енгл. <i>Dimethyl Sulfoxide</i>) – диметилсулфоксид
Araf-1 (енгл. <i>Apoptotic Protease Activation Factor-1</i>) – фактор активације апоптотске протеаза -1	DOC-2/hDab2 – тумор супресор ген
ARE – (енгл. <i>Antioxidant Response Element</i>) – везујући протеин	DTNB – 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)
AST – аспартат трансминаза	DTNB – 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоева киселина)
ATCC (енгл. <i>American Type Culture Collection</i>)	EC SOD – екстрацелуларна супероксид дисмутаза
АТФ (енгл. <i>Adenosine Triphosphate</i>) – аденозин трифосфат	EDTA (енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>) – етилендиаминотетра сирћетна киселина
АТФ7А, АТФ7В, МРР2 – АТФ-зависни транспортери бабра	eNOS (енгл. <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>) – ендотелна азот оксид синтаза
Вах – регулатор унутрашњег пута апоптозе	ERK1/2 (енгл. <i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2</i>) – екстрацелуларним сигналом регулисана киназа 1 и 2
Bcl-2 (енгл. <i>B-cell Lymphoma 2</i>) – антиапоптотски протеин	ER (енгл. <i>Estrogen receptor</i>) – рецептор за естроген
Bcl-XL (енгл. <i>B-cell Lymphoma-extra large</i>) – антиапоптотски протеин	ER α – рецептор за естроген α
Bid (енгл. <i>The BH3 Interacting-domain Death agonist</i>) – проапоптотски протеин	ER β – рецептор за естроген β
В1 – билирубин	FAD (енгл. <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>) – флавин аденин динуклеотид
BRCA1 (енгл. <i>Breast Cancer 1</i>) – ген повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке	Fas (енгл. <i>First Apoptosis Signal</i>) – ген за први апоптотски сигнал
BRCA2 (енгл. <i>Breast Cancer 2</i>) – ген повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке	FasL (енгл. <i>Fas Ligand</i>) – Fas лиганд
BSA (енгл. <i>Bovine Serum Albumin</i>) – албумин говеђег серума	FasR (енгл. <i>Fas Receptor</i>) – Fas рецептор
C1/C2/C3 – испитивани комплекси платине	FBS (енгл. <i>Fetal Bovine Serum</i>) – фетални говеђи серум
Са – калцијум	FDA (енгл. <i>Food and Drug Administration</i>) – америчка агенција за храну и лекове
CAT – каталаза	Fe – гвожђе
CDNB – 1-хлоро-2,4-динитробензен	Fe SOD – гвожђе супероксид дисмутаза
Chl – холестерол	FIGO (енгл. <i>International Federation of Gynecology and Obstetric</i>) – Међународна федерација гинекологије и акушерства
CLL – (енгл. <i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>) – свеже изоловане ћелије хроничне лимфоцитне леукемије	GGT – γ -глутамил трансфераза
CO_2 – угљендиоксид	Gl – глукоза
$\text{CO}_2^{\cdot-}$ – угљен диоксид радикал	GR – глутатион редуктаза
$\text{CO}_3^{\cdot-}$ – карбонатни радикал	Gra (енгл. <i>Granulocytes</i>) – гранулоцити
COX – (енгл. <i>Cytochrome c oxidase</i>) цитохром-c-оксидаза	GS $^{\cdot}$ – тиолни радикал
COX2 (енгл. <i>Cyclooxygenase 2</i>) – циклооксигеназа 2	GSH – редуковани глутатион
CP – дисплатина	GSH- Px1 – цитосолна глутатион пероксидаза
Cre – креатинин	GSH-Px – глутатион пероксидаза

GSH-Px2 – гастроинтестинална глутатион пероксидаза	LH – липидна незасићена масна киселина
GSH-Px3 – екстрацелуларна глутатион пероксидаза	LO [•] – липидни алкоксил радикал
GSH-Px4 – фосфолипидна глутатион пероксидаза	LOH – липидни алдехид
G-SR – коњугат електрофилног супстрата и глутатиона	LOO [•] – липидни пероксил радикал
GSSG – оксидовани глутатион	LOOH – липидни хидропероксид
GST – глутатион-S-трансфераза	LPO – липидни пероксид
GTD (енгл. <i>Gestational trophoblastic disease</i>) – гестацијска трофобластна болест	Lym (енгл. <i>Lymphocytes</i>) – лимфоцити
H ⁺ – јон водоника	MAPK (енгл. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) – митогеном активирани протеин киназе
H ₂ O – вода	MASPIN (енгл. <i>Mammary Serine Protease Inhibitor</i>) – инхибитор серин протеаза
H ₂ O ₂ – водоник пероксид	MCH (енгл. <i>Mean Cell Hemoglobin</i>) – просечна концентрација хемоглобина
Hb – хемоглобин	MCHC (енгл. <i>Mean Cell Hemoglobin Concentration</i>) – просечна концентрација хемоглобина по еритроциту
hCG (енгл. <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>) – хумани хорионски гонадотропин	Mcl-1 (енгл. <i>Myeloid leukemia 1</i>) – антиапоптоски протеин
HCl (енгл. <i>Hydrochloric Acid</i>) – хлороводонична киселина	MCV (енгл. <i>Mean Corpuscular Volume</i>) – просечни волумен еритроцита
Hct – хематокрит	MDA (енгл. <i>Malondialdehyde</i>) – малондиалдехид
hCTR1 (енгл. <i>High affinity Copper Transporter 1</i>) – АТФ-зависни транспортер бакра	MES – 2-(N-morpholino) етан сулфонска киселина
HER2 (енгл. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>) – хумани епидермални фактор раста 2	MMP-2 и MMP-9 – матриксне металопроотеиназе
HIF-1 α (енгл. <i>Hypoxia-Inducible Factor-1α</i>) – индуцибилни фактор хипоксије 1 алфа	Mn – манган
HNE – 4-хидроксил-2,3-трансноненал	Mn SOD – манган супероксид дисмутаза
HNO ₂ – азотаства киселина	Mon (енгл. <i>Monocytes</i>) – моноцити
HOBr – хипобромна киселина	MPV (енгл. <i>Mean Platelet Volume</i>) – просечни волумен тромбоцита
HOCl – хипохлорна киселина	MTT (енгл. <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>) – 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид
HOO [•] – хидропероксил радикал	Na – натријум
hPL – хумани плацентални лактоген	Na ₂ HPO ₄ – натријум хидрогенфосфат
HR ⁺ – хормон рецептор позитивни тумори	Na ₂ NO ₃ – натријум нитрат
HRPO (енгл. <i>Horseradish Peroxidase</i>) – пероксидаза рена	NaCl – натријум хлорид
HOO [•] – хидропероксил радикал	NAD – никотинамид аденин динуклеотид
IAP (енгл. <i>The Inhibitors of Apoptosis Proteins</i>) – антиапоптоски протеин	NAD(P)H – редуковани никотинамид аденин динуклеотид (фосфат)
IL-1B – интерлеукин 1B	NaHCO ₃ – натријум бикарбонат
iNOS (енгл. <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>) – индуцибилна азот оксид синтаза	NaN ₃ – натријум азид
K – калијум	NaNO ₂ – натријум нитрит
K ₂ CO ₃ – калијум карбонат	NANOG – транскрипциони фактор који регулише плурипотентни потенцијал ембрионалних матичних ћелија
KIM-1 (енгл. <i>Urinary kidney injury molecule-1</i>) – молекул оштећења бубрега	NBT (енгл. <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>)
KOH – калијум хидроксид	NECC1 – тумор супресор ген
K-PO ₄ – калијум-фосфатни пуфер	NED – N-1- нафтилетилендиамин дихидрохлорид
L [•] – липидни радикал	NF-kB (енгл. <i>Nuclear Factor Kappa B</i>) – нуклеарни фактор kB
L-Arg – аминокиселина L-аргинин	Ni SOD – никл супероксиддисмутаза
LDH – лактат дехидрогеназа	

nNOS (енгл. <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>) – неурална азот оксид синтаза	RB1 (енгл. <i>The Retinoblastoma Protein</i>) – тумор супресор протеин
NO – азот моноксид	RBC (енгл. <i>Red Blood Cells</i>) – еритроцити
NO [•] – азот моноксид радикал	RDW (енгл. <i>Red Cell Distribution Width</i>) – расподела еритроцита по волумену
NO ₂ [•] – нитрит	Res – ресвератрол
NO ₂ [•] – азот диоксид радикал	RNS (енгл. <i>Reactive Nitrogen Species</i>) – реактивне врсте азота
NO ₃ [•] – нитрат	RO [•] – алкоксил радикал
NO ₃ [•] – нитрат радикал	RO ₂ ONO – алкилпероксинитрат
N ₂ O ₂ – динитродиоксид	ROH – алкохол
NOS (енгл. <i>Nitric Oxide Synthase</i>) – азот оксид синтаза	ROO [•] – пероксил радикал
NOX – NADPH оксидаза	ROOH – органски пероксид
Noxa – проапоптотски протеин	ROONO – алкилпероксинитрит
Nrf2 (енгл. <i>Nuclear Factor erythroid 2-Regulated Factor 2</i>) – транскрипциони фактор	ROS (енгл. <i>Reactive Oxygen Species</i>) – реактивне врсте кисеоника
O ₂ – молекулски кисеоник	R-X – електрофилни супстрат
O ₂ ^{•-} – супероксид ањон радикал	SH – сулфхидрилна група
O ₃ – озон	SIRT – (енгл. <i>Silent Information Regulators</i>) – NAD ⁺ зависне хистон деацетилазе
OCT2 (енгл. <i>Organic Cation Transporter 2</i>) – базолатерални транспортер органских катјона	SOD – супероксид дисмутаза
OH – хидроксилна група	STAT3 (енгл. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>) – транскрипциони фактор
OH [•] – хидроксил радикал	TBA (енгл. <i>Thiobarbituric Acid</i>) – тиобарбитуратна киселина
ONOO ⁻ – пероксинитрит	TBARS (енгл. <i>Thiobarbituric Acid Reactive Species</i>) – реактивне врсте тиобарбитуратне киселине
ONOOH – пероксинитритна киселина	TCA (енгл. <i>Trichloroacetic Acid</i>) – трихлорсирћетна киселина
O ₂ NOO ⁻ – пероксинитрат	TG – триглицериди
p21 – инхибитор циклин-зависне киназе	TIMP3 (енгл. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3</i>) – инхибитор металопротеиназе 3
p38 – класа митогеном активирани протеин киназе	TNB – 5'-тио-2-нитробензоева киселина
p53 – тумор супресор протеин	TNFR (енгл. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>) – рецептор фактора некрозе тумора
PALB-2 (енгл. <i>Partner And Localizer of BRCA2</i>) – ген повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке	TNF α – (енгл. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor α</i>) – фактор некрозе тумора α
PCA (енгл. <i>Perchloric acid</i>) – перхлорна киселина	TP (енгл. <i>Total Proteins</i>) – укупни протеини
Pct (енгл. <i>Platelet count</i>) – тромбокрит	TRAIL (енгл. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>) – TNF-сродни апоптоза-индукујући лиганд
PDW (енгл. <i>Platelet Distribution Width</i>) – расподела тромбоцита по волумену	Vit C – витамин Ц, аскорбинска киселина
PI3K – фосфоинозитид 3 киназа	Vit E – витамин Е, токоферол
PKC (енгл. <i>protein kinase C</i>) – протеин-киназа C	WBC (енгл. <i>White Blood Cells</i>) – леукоцити
Plt (енгл. <i>Platelet</i>) – тромбоцити	WHO (енгл. <i>World Health Organization</i>) – Светска здравствена организација
PR – рецептор за прогестерон	Zn – цинк
Pt – платина	ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина
Pt(IV) – платина(IV) комплекси	иРНК – информациона РНК
PUFA (енгл. <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>) – полинезасићене масне киселине	РНК – рибонуклеинска киселина
Puma (енгл. <i>p53-Upregulated Modulator of Apoptosis</i>) – проапоптотски протеин	
R [•] – радикал	
RASSF1A (енгл. <i>Ras association domain-containing protein 1</i>)	

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	Карактеристике малигнух тумора.....	3
Слика 2.	Развојне фазе епителног малигнух тумора и механизам метастазирања.....	4
Слика 3.	Редукција кисеоника и формирање реактивних врста.....	8
Слика 4.	Примарни ендогени генератори ROS.....	11
Слика 5.	Механизам дејста антиоксидативног заштитног система.....	17
Слика 6.	ROS регулација ћелијских сигналних путева и транскрипционих фактора укључених у иницијацију и прогресију тумора.....	22
Слика 7.	ROS посредована канцерогенеза.....	23
Слика 8.	Структурне формуле лекова на бази платине одобрених за клиничку употребу.....	27
Слика 9.	Механизам настанка Pt-ДНК адукта.....	28
Слика 10.	Механизам цитотоксичног деловања цисплатине.....	29
Слика 11.	Структурне формуле изоформи ресвератрола.....	33
Слика 12.	Метаболички пут ресвератрола.....	34
Слика 13.	Структурне формуле метаболита ресвератрола.....	35
Слика 14.	Шематски приказ могућих механизма антиоксидативног, антиинфламаторног и антитуморског деловања ресвератрола.....	37
Слика 15.	Упоредни приказ структурних формула 17- β -естрадиола и <i>trans</i> -ресвератрола.....	38
Слика 16.	Шематски приказ припреме [PtCl ₄ (R ₂ -S,S-eddba)] комплекса.....	42
Слика 17.	Морфолошки изглед MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелија.....	43
Слика 18.	Шематски приказ експерименталних група.....	51
Слика 19.	Микрофотографије ткивних препарата јетре контролне и експерименталних група.....	114
Слика 20.	Микрофотографије ткивних препарата бубрега контролне и експерименталних група.....	116

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1.	Упоредне карактеристике бенигнух и малигнух тумора.....	1
Табела 2.	Приказ реактивних врста кисеоника и азота.....	10
Табела 3.	Антипролиферативни ефекти, изражени као IC ₅₀ вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на MDA-MB-231 ћелије након 24 и 72 сата.....	62
Табела 4.	Антипролиферативни ефекти, изражени као IC ₅₀ вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на JEG-3 ћелије након 24 и 72 сата.....	64
Табела 5.	Антипролиферативни ефекти изражени као IC ₅₀ вредности, цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на MRC-5 ћелије након 24 и 72 сата.....	66
Табела 6.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на промену тежине животиња и органа у контролној и експерименталним групама.....	78
Табела 7.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на хематолошке параметре контролне и експерименталних група.....	79
Табела 8.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на број леукоцита и параметре леукоцитарне формуле контролне и експерименталних група	80
Табела 9.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на хематолошке индексе контролне и експерименталних група	81
Табела 10.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активности ензима јетре мерене у серуму контролне и експерименталних група.....	83
Табела 11.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на биохемијске параметре мерене у серуму контролне и експерименталних група.....	84
Табела 12.	Збирне морфолошке промене ткива јетре контролне и експерименталних група.....	113
Табела 13.	Збирне морфолошке промене ткива бубрега контролне и експерименталних група.....	115

ЛИСТА ГРАФИКА

График 1.	UV-vis спектар цисплатине растворене у 0.1% DMSO-у.....	61
График 2.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност MDA-MB-231 ћелија након 24 и 72 сата.....	62
График 3.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност JEG-3 ћелија након 24 и 72 сата.....	63
График 4.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на вијабилност MRC-5 ћелија након 24 и 72 сата.....	65
График 5.	Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност MDA-MB-231 ћелија након 72 сата.....	67
График 6.	Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност JEG-3 ћелија након 72 сата.....	68
График 7.	Ефекти комбинованих третмана C1/C3 и ресвератрола на вијабилност MRC-5 ћелија након 72 сата.....	69
График 8.	Ефекти комбинованог третмана C1 и ресвератрола на миграторни потенцијал MDA-MB-231 и JEG-3 ћелија након 72 сата.....	70
График 9.	Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.....	71
График 10.	Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.....	72
График 11.	Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.....	73
График 12.	Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.....	75
График 13.	Ефекти цисплатине, C1 комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатиона у MDA-MB-231, JEG-3 и MRC-5 ћелијама након 24 и 72 сата.....	76
График 14.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	86
График 15.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	87
График 16.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	88
График 17.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	88
График 18.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	89
График 19.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	90

График 20.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	91
График 21.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	92
График 22.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	92
График 23.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у еритроцитима контролне и експерименталних група.....	93
График 24.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у јетри контролне и експерименталних група.....	94
График 25.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у јетри контролне и експерименталних група.....	95
График 26.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у јетри контролне и експерименталних група.....	96
График 27.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у јетри контролне и експерименталних група.....	96
График 28.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у јетри контролне и експерименталних група.....	98
График 29.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатиона у јетри контролне и експерименталних група.....	98
График 30.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у јетри контролне и експерименталних група.....	99
График 31.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у јетри контролне и експерименталних група.....	100
График 32.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у јетри контролне и експерименталних група.....	101
График 33.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у јетри контролне и експерименталних група.....	101
График 34.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у јетри контролне и експерименталних група.....	102
График 35.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију супероксид анјон радикала у бубрегу контролне и експерименталних група.....	103
График 36.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију водоник пероксида у бубрегу контролне и експерименталних група.....	104
График 37.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију нитрита у бубрегу контролне и експерименталних група.....	105
График 38.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију липидних пероксида у бубрегу контролне и експерименталних група.....	106

График 39.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију редукованог глутатиона у бубрегу контролне и експерименталних група.....	107
График 40.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на продукцију оксидованог глутатиона у бубрегу контролне и експерименталних група.....	108
График 41.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност супероксид дисмутазе у бубрегу контролне и експерименталних група.....	109
График 42.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност каталазе у бубрегу контролне и експерименталних група.....	109
График 43.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион пероксидазе у бубрегу контролне и експерименталних група.....	111
График 44.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион редуктазе у бубрегу контролне и експерименталних група.....	111
График 45.	Ефекти цисплатине, Pt(IV) комплекса и ресвератрола на активност глутатион-S-трансферазе у бубрегу контролне и експерименталних група.....	112



Evaluation of Toxic Effects of Novel Platinum (IV) Complexes in Female Rat Liver: Potential Protective Role of Resveratrol

Milica G. Paunović¹ · Miloš M. Matic¹ · Vesna D. Stanković² · Marija D. Milošević¹ · Verica V. Jevtić³ · Srećko R. Trifunović³ · Branka I. Ognjanović¹

Accepted: 12 October 2020

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

The use of cisplatin in chemotherapy may provoke a deteriorating impact in many vital organs, suggesting the need for more selective derivatives and effective protective cotreatments. This study assesses the effects of three novel Pt(IV) complexes containing ethyl-, propyl- and butyl-esters of the ethylenediamine-*N*, *N'*-di-*S*, *S*- (2,2'-dibenzyl) acetic acid on liver injury markers, redox parameters, and cell morphology of female rat liver tissue in comparison to cisplatin. In addition, the study evaluates the possible protective effects of resveratrol as well. The rats were divided into ten groups and were administered intraperitoneally with a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg) or Pt(IV) complexes (10 mg/kg) and/or resveratrol (25 mg/kg). All treatments caused changes in body weight, food intake, and liver/bw ratio. Acute treatment with novel complexes decreased the levels of TB and TP while elevated the activity of ALT, AST, GGT, ALP which subsequently indicated on the liver damage. All three complexes significantly reduced the levels of LPO, O₂⁻, NO₂⁻ and activity of CAT, while increasing the activity of SOD, GSH-Px, GR, GST, and level of GSH, implying that these compounds could provoke redox balance disruption in liver cells. Moreover, according to the histopathological observations, the novel Pt(IV) complexes exerted stronger hepatotoxicity than cisplatin. Possible protective effects of resveratrol were not detected and even combined with examined compounds it abolished the activity of the antioxidative system of the liver cells causing more intense toxicity. Further investigation is required to elucidate the effects of Pt-based drugs and resveratrol in the estradiol-rich environment of female rats as well their influence on male rats' tissues.

Keywords Cisplatin · Hepatotoxicity · Oxidative stress · Platinum (IV) complex · Resveratrol

Introduction

Although cisplatin, (*cis*-Diammineplatinum(II)-dichloride (CP)), has several adverse effects, it is still the most commonly used antineoplastic agent in chemotherapy. Its non-specific acting may induce adverse effects in many vital organs including the kidney, nervous system, and liver [1, 2]. In order to improve the selectiveness and overcome

the resistance of cancer cells to chemotherapy, many novel compounds such as platinum (Pt) (II/IV) were discovered and tested, but relatively small number found a clinical application [3]. The main goal is to synthesize a drug that aims to release the active substance in the target tissue without pre-inactivation due to reaction with other biomolecules. Compared to their Pt(II) analogs, Pt(IV) prodrugs have additional axial position ligands, which can be modified thereby improving pharmacological properties, such as higher stability due to extenuated interaction with plasma proteins [4].

The significant redox potential, with numerous oxidation states, makes a Pt drugs an important contributor to the cell redox disbalance. One of their widely accepted toxicity mechanisms is the disturbed production of free radicals, provoked by the failure of antioxidants to reduced reactive species, leading to lipid peroxidation, oxidative stress, and consequent cell death [5]. In the past few years, Pt complexes with diamine ligands were focused on interest in

✉ Miloš M. Matic
milosmatic@kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac, Republic of Serbia

² Faculty of Medical Sciences, Institute of Pathology, University of Kragujevac, Kragujevac, Republic of Serbia

³ Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Republic of Serbia

Antiproliferative, antimigratory, and prooxidative potential of novel platinum(IV) complexes and resveratrol on breast cancer (MDA-MB-231) and choriocarcinoma (JEG-3) cell lines

Milica G. Paunović¹ | Miloš M. Matic¹ | Ana D. Obradović¹ |
Verica V. Jevtić² | Danijela Lj. Stojković³ | Branka I. Ognjanović¹

¹Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Institute for Information Technologies, Department of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence

Miloš M. Matic, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, Kragujevac 34000, Serbia.
Email: milos.matic@pmf.kg.ac.rs

Funding information

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant/Award Number: 451-03-9/2021-14/200122

Abstract

Platinum(IV) complexes offer the potential to overcome cisplatin resistance of cancer cells, with possible improved selectivity. Resveratrol, a natural polyphenol with anticancer and antioxidant capacity, could limit the possible side effects of chemotherapeutics on healthy cells. This study investigates the effects of platinum(IV) complexes containing some esters of the ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetate acid (H_2 -*S,S*-eddba), and resveratrol on proliferation, migration, and redox balance of breast cancer (MDA-MB-231), choriocarcinoma (JEG-3), and human lung fibroblast (MRC-5) cell line. According to IC_{50} values, all complexes exhibited a significantly stronger antiproliferative effect on tested cell lines compared to cisplatin. Due to reduced adverse effects on MRC-5 cells, the complex containing ethyl-substituent (10 μ M) was selected for further examination with resveratrol (25 μ M) cotreatment. Resveratrol enhanced the survival of MRC-5 cells while diminished the viability of both used cancer cell lines when applied combined with selected complex. Furthermore, cotreatment of these two compounds decreased the migratory potential of tested cancer cell lines. The examined platinum(IV) complex was able to induce oxidative stress in all tested cell lines. Resveratrol proved to be efficient in protecting MRC-5 cells from complex-induced oxidative damage, while it significantly amplified antiproliferative, antimigratory, and prooxidative effects of platinum(IV) complex on both examined cancer cell lines. These findings may be valuable in elucidating the mechanism of action of platinum(IV) drugs, which should be further investigated.

KEYWORDS

cytotoxicity, oxidative stress, platinum(IV) complex, resveratrol

1 | INTRODUCTION

Cisplatin (CP) is a successful anticancer agent, along with seven platinum complexes approved for clinical application (Gibson, 2019). However, a major medical problem regarding the treatment of cancer diseases with platinum (Pt)-based drugs is the unresolved issue of

tumor reoccurrence, cancer cell resistance, and non-selective chemotherapy with severe side effects (Sinha et al., 2016).

Platinum (IV) complexes are designed to be activated when they enter a cancer cell, reducing the possibility of simultaneous damage to healthy cells and tissues. Their octahedral geometry provides two new axial positions for binding a variety of ligands. Thus, modifying their

БИОГРАФИЈА

Милица Г. Пауновић (рођ. Гавриловић) рођена је 6.10.1986. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу „21. Октобар“ завршила је 2001. године у Крагујевцу, Прву крагујевачку гимназију, друштвено-језички смер 2005. године и исте године је уписала Дипломске академске студије Биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Студије је завршила 2011. године са просечном оценом 9.00 и одбрањеним дипломским радом под називом „Протективни ефекти естрадиола у кадмијум индукваној цитотоксичности“ са оценом 10, чиме је стекла звање Дипломирани биолог.

Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2011/2012. године. У звање истраживач-приправник у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу изабрана је у децембру 2011. Од 10.01.2012. ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под насловом "Молекуларно физиолошки биомониторинг аеробних организама заснован на одређивању биохемијских биомаркера оксидационог стреса" - евиденциони број пројекта 173041. 10.12.2014. године изабрана је у звање истраживач-сарадник, а звање асистент за ужу научну област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија стиче 20.06.2018. године у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Милица Г. Пауновић се активно бави научно-истраживачким радом у области физиологије, молекуларне биологије и токсикологије, са фокусом на испитивања утицаја различитих једињења на редокс статус ћелија ткива експерименталних животиња и ћелијских култура, као и на испитивање ефеката потенцијалних антитуморских агенаса.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Компаративна анализа антитуморског и редокс потенцијала одабраних платина(IV) комплекса и ресвератрола у *in vitro* и *in vivo* третманима”

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 6.4.2023. године,

Милица Јауновић

потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Компаративна анализа антитуморског и редокс потенцијала одабраних
платина(IV) комплекса и ресвератрола у *in vitro* и *in vivo* третманима”**

истоветне.

У Крагујевцу, 6.4.2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Г. Пауновић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Компаративна анализа антитуморског и редокс потенцијала одабраних платина(IV) комплекса и ресвератрола у *in vitro* и *in vivo* третманима”

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 6.4.2023. године,

Милица Јауневић
потпис аутора

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