



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Игор Кумбуровић

Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед Гвозден Росић, редовни професор

Крагујевац, 2020.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Игор Кумбуровић
Датум и место рођења: 08.03.1975., Котор, Црна Гора
Садашње запослење: Специјалиста опште хирургије, ЈЗУ Општа болница Котор
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Ефекти примене екстракта биљке <i>Satureja hortensis</i> L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова
Број страница: 158
Број слика: 32 (26 графикона и 6 слика)
Број библиографских података: 222
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): медицина
Ментор: проф. др Гвозден Росић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 28.08.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-910/11 од 13.11.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан; 3. доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан; 3. доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.
Датум одбране дисертације:

Сажетак

Увод: У овој студији су испитивани ефекти екстракта биљке *Satureja hortensis* L. (SHL) на бихевиорлане манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова.

Материјал и методе: Студија је спроведена на 35 пацова Wistar albino соја, старости 2 месеца, телесне масе 200-250 g, подељених у 7 група: контролна, цисплатина, цисплатина+SHL 50 mg/kg, цисплатина+SHL 100 mg/kg, цисплатина+SHL 200 mg/kg, цисплатина+силимарин 100mg/kg и SHL 200 mg/kg. Цисплатина је примењивана у појединачној дози (7.5 mg/kg), док је антиоксидантна суплементација спровођена орално током 10 дана. Бихевиорални тестови су извођени десетог дана протокола, након чега су животиње жртвоване у циљу добијања узорака хипокампуса за одређивање маркера оксидативног стреса и апоптозе.

Резултати: Резултати бихевиоралног испитивања су показали анксиогени ефекат цисплатине који је био ублажен применом SHL екстракта (100 mg/kg) при чему је слабији одговор био у групама третираним екстрактом SHL у дозама од 50 и 200 mg/kg. Такође, смањење неуротоксичности изазвано цисплатином, у смислу повећања маркера оксидативног стреса и апоптозе, је остварено применом екстракта у дози од 100 mg/kg. Неуропротективни ефекат SHL је био сличан дејству силимарина у истој дози. Екстракт SHL није узроковао значајне промене испитиваних параметара када је примењиван самостално.

Закључак: Анксиогени ефекат, као манифестација неуротоксичности изазване цисплатином, је у бихевиоралним тестовима био успешно умањен оралном применом екстракта SHL у оптималној дози (100 mg/kg). Корисни ефекти ове врсте антиоксидантне суплементације су такође потврђени смањењем оксидативног оштећења и апоптотских механизма.

Кључне речи: цисплатина, *Satureja hortensis* L., бихевиорални тестови, оксидативни стрес, апоптоза, хипокампус

Abstract

Introduction: In this study we evaluated effects of *Satureja hortensis* L. (SHL) extract on behavioral manifestations of cisplatin-induced neurotoxicity in rats.

Material and methods: The study was performed on 35 Wistar albino rats, 2 months old, weighting 200-250 g, divided into 7 groups: control, cisplatin, cisplatin+SHL 50 mg/kg, cisplatin+SHL 100 mg/kg, cisplatin+SHL 200 mg/kg, cisplatin+silymarin 100 mg/kg, and SHL 200 mg/kg. Cisplatin was administered in a single dose of 7.5 mg/kg and antioxidant supplementation was performed orally for 10 days. Behavioral testing was performed on 10th day and then the animals were sacrificed in order to obtain the samples for oxidative stress and apoptotic markers in hippocampus.

Results: The results of behavioral testing showed cisplatin-induced anxiogenic effect, that was diminished with SHL extract in a dose of 100mg/kg, with much weaker responses to SHL extracts in doses of 50 and 200 mg/kg. Also, the attenuation of cisplatin-induced neurotoxicity, by means of increased oxidative stress and apoptotic markers, was successfully achieved with SHL extract in a dose of 100 mg/kg. The neuroprotective effect of SHL was similar to silymarin action in the same dose. When applied alone, SHL extract induced no significant effect in any of parameters followed.

Conclusion: Cisplatin-induced neurotoxicity manifested by anxiogenic response in behavioral testing can be successfully attenuated by oral administration of SHL extract in an optimal dose (100 mg/kg). The beneficial effects of this kind of antioxidant supplementation were also confirmed by decreased oxidative damage and apoptotic mechanisms.

Key words: cisplatin, *Satureja hortensis* L., behavioral tests, oxidative stress, apoptosis, hippocampus

ЗАХВАЛНИЦА

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Цисплатина	2
1.1.1. Терапијске индикације за примену цисплатине.....	4
1.1.2. Механизам антитуморског дејства цисплатине	6
1.1.3. Нежељена дејства цисплатине	8
1.1.3.1. Неуротоксичност цитостатика на бази платине	10
1.2. Антиоксиданси	14
1.2.1. Класификација антиоксиданаса	17
1.2.2. Механизам дејства антиоксиданаса.....	19
1.2.3. Антиоксидантна суплементација природним препаратима у клиничкој пракси	21
1.2.4. Антиоксидантна суплементација екстрактом биљке <i>Satureja hortensis</i> L.	25
1.2.4.1. Антиоксидантна својства екстракта <i>S. hortensis</i> L.	26
1.2.4.2. Антимикробна својства екстракта <i>S. hortensis</i> L.	27
1.2.4.3. Остала биолошка својства екстракта <i>S. hortensis</i> L.....	28
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1. Третман животиња	33
3.1.1. Кондиционирање анималног узорка.....	33
3.1.2. Припрема екстракта	34
3.1.3. Протокол и дизајн истраживања	35
3.2. Бихевиорална тестирања.....	36
3.2.1. <i>Open field</i> тест (OF тест)	36
3.2.2. <i>Elevated plus maze</i> тест (EPM тест)	38
3.2.3. <i>Tail suspension</i> тест (TS тест).....	40
3.2.4. Примена софтвера у обради бихевиоралних тестова.....	40
3.3. Семпловање материјала за детерминацију оксидативног оштећења и апоптотске активности	41
3.3.1. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса	41
3.3.1.1. Одређивање количине укупних протеина у ткиву хипокампуса	41
3.3.1.2. Одређивање активности каталазе (CAT) у ткиву хипокампуса	42
3.3.1.3. Одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD) у ткиву хипокампуса	42

3.3.1.4. Одређивање укупног глутатиона (GSH) у хипокампусу	42
3.3.1.5. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у хипокампусу.....	42
3.4. Квантификација индикатора апоптотске активности у ткиву хипокампуса	43
3.4.1. Изолација РНК из ткива хипокампуса.....	43
3.4.2. Реверзна транскрипција РНК	43
3.4.3. Квантификација експресије гена.....	44
3.5. Статистичка обрада добијених резултата	46
4. РЕЗУЛТАТИ	47
4.1. Бихевиорални тестови.....	48
4.1.1. <i>Open field</i> тест	48
4.1.1.1. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене УВЦЗ током OF теста	48
4.1.1.2. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене БУ у централну зону током OF теста.....	50
4.1.1.3. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене УПП током OF теста	52
4.1.1.4. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене процента времена кретања OF теста.....	54
4.1.1.5. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене БУ у OF тесту.....	56
4.1.2. <i>Elevetad plus maze</i> тест	58
4.1.2.1. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене УВОК током ЕРМ теста.....	58
4.1.2.2. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене БУ у отворене краке током ЕРМ теста	60
4.1.2.3. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене УПП током ЕРМ теста	62
4.1.2.4. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене процента времена кретања у ЕРМ тесту	64
4.1.2.5. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене БН у ЕРМ тесту.....	66
4.1.2.6. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене БУ током ЕРМ теста.....	68
4.1.2.7. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на дисплатином изазване промене ТЕА епизода током ЕРМ теста.....	70
4.1.3. <i>Tail suspension</i> тест	72

4.1.3.1. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене ВПИ у TST	72
4.1.3.2. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене БЕИ у TST	74
4.1.3.3. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене УТИ у TST.....	76
4.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампуса	78
4.2.1. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене индекса липидне пероксидације у ткиву хипокампуса.....	78
4.2.2. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса	80
4.2.3. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене активности каталазе у ткиву хипокампуса.....	82
4.2.4. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса.....	84
4.3. Маркери апоптотске активности.....	86
4.3.1. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса	86
4.3.2. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса.....	88
4.3.3. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса	90
4.3.4. Утицај примене екстракта <i>Satureje hortensis</i> L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у ткиву хипокампуса	92
4.4. Испитивање међусобне повезаности фактора укључених у контролу понашања након спроведених експерименталних протокола	94
4.4.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса	94
4.4.2. Анализа међусобне повезаности антиоксидантног капацитета (изражен кроз активност супероксид дисмутазе) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса	95
4.4.3. Анализа међусобне повезаности квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса и степена анксиозности (изражен преко УВОК током ЕРМ теста)	96
5. ДИСКУСИЈА	97

Примена цитостатика представља једну од стандардних и најчешће примењиваних процедура у терапији бројних малигнитета. Ипак, спровођење хемиотерапије се обично повезује са испољавањем већег броја нежељених ефеката, јачег или слабијег интензитета.	98
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	120
На основу анализе резултата добијених у овом истраживању може се закључити следеће:.....	121
7. ЛИТЕРАТУРА.....	122
СКРАЋЕНИЦЕ.....	145
8. ПРИЛОГ.....	148

1. УВОД

1.1. Цисплатина

Малигни тумори представљају један од највећих проблема савремене медицине и на другом месту су по учесталости као узрок смрти у развијеним земљама. У зависности од врсте и стадијума малигне болести, пацијенти се третирају било традиционалним терапијским методама (хирургија, хемио и радиотерапија) или применом нових терапијских приступа, као што су имунотерапија (1), циљна терапија (2), хормонска терапија (3), генска терапија (4) и фотодинамска терапија (5). Хемиотерапија већ више деценија представља ефикасан и широко распрострањени начин лечења малигнух тумора уз примену једног или више цитостатика (6).

Цисплатина је један од најбољих и први цитостатик на бази метала (7). О широкој употреби овог цитостатика најбоље говоре подаци да готово 50% пацијената са дијагнозом малигне болести који се лечи хемиотерапијом добија препарате на бази платине, што представља величину промета која на годишњем нивоу износи 2 милијарде USD (7). Једињење $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ је први синтетисао Микеле Пејроне 1845. године (*“Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür”*), због чега се већ дуже време назива Пејронова со. Структура Пејронове соли је први пут дефинитивно утврђена од стране Алфреда Вернера 1893. године (8). Ипак, чудесна способност да инхибира деобу ћелија је случајно откривена од стране Барнета Розенберга 1965. године (9). До открића је дошло тако што је овај биофизичар, проучавајући утицај електричног поља на раст бактерија, користио платину за електроде и амонијум хлорид као медијум. Током ових експеримената, Розенберг је уочио да, уместо да се бактеријске ћелије деле, долази до повећања њихове величине и до 300 пута. Нарочито индикативно је било то што се овакав ефекат губио прекидом електричног поља. Иако је прва претоставка била да се ћелијска деоба прекида деловањем електричног поља, накнадно је утврђено да је то ефекат једињења платине који се ослобађају са електрода. У наставку ових истраживања, Розенберг је 1969. године први пут доказао да цисплатина има способност инхибиције ћелија саркома и леукемије код мишева (10). Овакви резултати су потом потврђени на већем броју туморских ћелија животиња (11). Резултати ових иницијалних истраживања су

били толико добри да је амерички Национални институт за рак одлучио да се започне преклиничко, фармаколошко и токсиколошко, испитивање овог препарата (12). Коначно, 1971. године је Национални институт за рак започео прву клиничку студију, да би након седам година (1978. године) цисплатина била одобрена од стране америчког FDA као терапија у лечењу карцинома тестиса и оваријума.

Иницијална еуфорија током које је цисплатина називана „леком 20. века“ ипак није дуго трајала. Наиме, терапија цисплатином није постигла максимално очекиване резултате из два основна разлога – резистенција према терапији и бројни нежељени ефекти. Ипак, цисплатина је и до данашњих дана, захваљујући значајним модификацијама у терапијском приступу (примена аналога цисплатине и комбиновање са другим цитостатицима), остала један од главних цитостатика који се користе и у савременој терапији малигних обољења.

1.1.1. Терапијске индикације за примену цисплатине

Цисплатина се у облику монотерапије (ређе) или у комбинацији са другим цитостатицима примењује у терапији већег броја малигнух тумора. Понекад ова врста терапије представља једину каузалну терапију која се примењује у лечењу малигнитета.

Као индикације за примену цисплатине, у облику монотерапије или у комбинацији са другим хемиотерапeticима, се према подацима из литературе најчешће наводе:

Карциноми плућа – који се убрајају у најчешће малигне тумора са фаталним исходом (13). Микроцелуларни карцином плућа, који учествују са око 15% у укупном броју карцинома плућа, су један од најмалигнијих облика малигнитета плућа. Од пре десетак година, препарати на бази платине (најчешће цисплатина и карбоплатина) представљају основну терапију у лечењу микроцелуларних карцинома плућа (14). Резултати клиничких студија добијених на пацијентима оболелих од ове болести показују снажан антитуморски ефекат цисплатине, који је, нажалост, праћен бројним нежељеним ефектима ове терапије. Као најчешћа нежељена дејства примене терапије цисплатином код микроцелуларних карцинома плућа се наводе нефротоксичност (15), мучнина и повраћање (16). У циљу смањења оштећења бубрега се током овакве терапије врши континуирани мониторинг продукције урина, уз обавезну (велику) супституцију течности инфузионим растворима. Треба напоменути да се у кљичкој пракси, код тежих манифестација нефротоксичности цисплатине, прелази на терапију карбоплатином, која омогућава (уз приближно исти антитуморски ефекат) да се избегне (проблематична) агресивна хидратација каква је неопходна у циљу очувања бубрежне функције код терапије цисплатином. Иако хируршки приступ у третману локализованих не-микроцелуларних карцинома плућа представља терапију избора, у стадијумима II и III ове болести се, као адјувантна терапија, примењује хемиотерапија на бази цисплатине. Овакав терапијски приступ омогућава да се стопа петогодишњег преживљавања повећа за 5.3% (17).

Карциноми јајника – који представљају туморе са највећом стопом морталитета у гинекологији. Дијагноза се углавном поставља у касним стадијумима болести због

недостатка ефикасне стратегије скрининга, као и због изостанка специфичне симптоматологије у раним фазама болести. Стандардни терапијски протокол за касне фазе ове болести представља хемиотерапија комбинацијом цисплатине и таксана, али болест добија рекурентни ток код 75% пацијената. Упркос бројним нежељеним ефектима и развоју резистенције (18), цисплатина је и даље први избор у терапији ове болести, чак и код резистентних облика. У циљу смањивања резистенције, цисплатина у терапији карцинома јајника примењује у комбинацији са витаферином (19), трихостатином А или 5-аза-2'-деоксицитином (20).

Сквამозни карциноми главе и врата – који представљају веома честу врсту малигнитета (21). Упркос унапређењу терапијског приступа (укључујући хирургију, зрачење и хемиотерапију), ови карциноми и даље имају високу стопу морталитета (петогодишња стопа је око 50%) која се, нажалост, већ годинама не смањује. Иако се самостална примене цисплатине није показала ефикасном у овој врсти терапије, код примене цисплатине у комбинацији са метотрексатом, винбластином, доксорубицином или гемцитабином су потврђени бољи резултати у третману метастатског уротелијалног карцинома (22, 23).

Карциноми дојке – који се сматрају једним од најчешћих узрока смрти у женској популацији. Сматра се да је хемиотерапија кључна у терапији карцинома дојке и продужењу живота оболелих. У терапији ове болести се, у зависности од специфичних облика, примењују различити цитостатици, укључујући и цисплатину. Механизам антитуморског ефекта цисплатине у терапији карцинома дојке се приписује инхибицији репликације ДНК и индукцији апоптозе (24). Нажалост, ову врсту терапије прати велики број озбиљних нежељених ефеката.

1.1.2. Механизам антитуморског дејства цисплатине

Цисплатине се транспортује у ћелију преко различитих механизма (25, 26) који укључују ефлуксне АТРаза (MRPs, АТР7А/В) и носаче јонских транспортера (CTR1, SLCs, AQP2 и AQP9). Уласком у ћелију, цисплатина се активира тако што се атоми хлорида замењују молекулима воде. Овакав метаболит постаје веома електрофилан што му омогућава везивање за нуклеофиле, укључујући и сулфхидрилне групе протеина и аминок групе нуклеинских киселина. Везивање цисплатине за N7 реактивни центар на пуринским остацима је разлог оштећења ДНК туморских ћелија и прекид ћелијске деобе. 1,2-унакрсне везе између пуринских база унутар ланца ДНК са цисплатином (формирање адукта) представља највидљивију промену коју цисплатина остварује на туморској ДНК (око 90%), док се 1,3-унакрсне везе уочавају много ређе. Управо формирање оваквих веза зауставља ћелијски циклус у фазама S, G1 или G2-M (27), што за последицу има спречавање оштећења ДНК, аберантну митозу и покретање апоптотских механизма (24).

Описано оштећење ДНК изазвано цисплатином, преко активације p53 која је посредована већим бројем фактора (Вах, каспаза-6/у...), доводи до ослобађања цитохрома-с из митохондрија. Цитохром-с у интеракцији са *apoptosis promoting activating* фактором 1 (АРАФ-1) доводи до активације прокаспазе-9 и формирања апоптозомног комплекса, односно активације каспазе-3. Симултано долази, такође због оштећења ДНК, до смањења транскрипције антиапоптотских фактора из породице Bcl-2.

Паралелно са променама које остварује везивањем за нуклеарни ДНК, цисплатина делује и друге ћелијске структуре, укључујући и митохондрије. Иницијалне последице деловања на митохондрије су описане као губитак сулфхидрилних група митохондријалних протеина, инхибиција преузимања калцијума и смањење потенцијала митохондријалне мембране (28). Постоје подаци и да цисплатина повећава продукцију реактивних облика кисеника (29), што уз смањење антиоксидантног капацитета (смањење активности антиоксидантних ензима и количине глутатиона) за последицу има оксидативно оштећење које примарно настаје у митохондријама (највулнерабилнији део ћелије за настанак оксидативног стреса), а потом и на нивоу читаве ћелије.

Важно је напоменути да оксидативни стрес може негативно деловати на ћелију, сумарно гледано, на два начина – директним деловањем слободних радикала на ћелијске структуре, као и преко дејства на ДНК које услед изазваног оштећења ДНК иницира низ каскадних реакција са покретањем проапоптотских каскадних реакција и, коначно, доводи до ћелијске смрти.

1.1.3. Нежељена дејства цисплатине

Основни механизам антитуморског дејства који се остварује примарно преко оштећења ДНК се, нажалост, не ограничава само на циљно ткиво (туморске ћелије), већ су у мањој или већој мери овим цитотоксичним ефектом цисплатине погођене и здраве ћелије у различитим органским системима. Према клиничким манифестацијама, уз готово исту патофизиолошку основу, токсични ефекти цисплатине су систематизовани тако да се као нежељени ефекти примене цисплатине у литератури наводе различити типови токсичности.

Мучнина и повраћање се сматрају најчешћим нежељеним ефектом цисплатине који настаје током хемиотерапије. Статистички подаци показују да се овај тип токсичности цисплатине (након примењене дозе од 120 mg/m^2), без примене антиеметика, манифестује просечним бројем од 11 епизода (30). У циљу спречавања ових манифестација токсичности цисплатине се у пракси примењују 5-НТЗ рецепторски антагонисти (31). Велике клиничке студије су потврдиле да је вероватноћа настанка овог нежељеног ефекта већа код терапије цисплатином него код терапије другим препаратима на бази платине, као што је карбоплатина (32).

Нефротоксичност цисплатине је веома често главни разлог за компромитовање терапијских протокола у којима се примењује овај цитостатик. Бубрези представљају главни систем за екскрецију цисплатине, па зато не чуди тенденција акумулације веома високих концентрација цисплатине у бубрезима, у поређењу са другим органима укључујући и јетру (33). Највећи степен акумулације цисплатине се уочава у проксималним тубулима, где се постиже пет пута већа концентрација од оне која постоји у серуму (34). Претпоставка је да овако велика акумулација цисплатине доводи до смањења концентрације карнитина у тубулским ћелијама, што изазива читав низ метаболичких консеквенци (35). Елиминисање цисплатине у бубрезима се одвија процесима гломерулске филтрације и тубулске секреције (36, 37). Цисплатина акумулирана у бубрежним тубулима подлеже процесима биотрансформације при чему настају коњугати цистеинил глицина и других тиола, за које се сматра да могу бити непосредни узроци токсичности.

Хепатотоксичност се описује као један од честих нежељених ефеката терапије цисплатином који настаје при уносу великих доза (38). Претпоставља се да је повећање оксидативног стреса основни механизам хепатотоксичности цисплатине. Потврђено је да цисплатина доводи до смањења редукованог глутатиона (39), као и активности антиоксидантних ензима, при чему као последица настаје повећање липидне пероксидације (40). Ензими јетре (уз билирубин) се сматрају најсензитивнијим индикаторима оштећења јетре изазваног цисплатином, јер њихова цитоплазматска локализација омогућава брзо повећање концентрације у плазми након оштећења хепатоцита (41). Хепатотоксичност цисплатине се појачава са повећањем експресије цитохром Р450-2Е1 ензима (42). Морфолошке промене повезане са хепатотоксичним ефектима цисплатине су описане као некроза и дегенерација хепатоцита, са запаљенском инфилтрацијом око портних крвних судова уз дилатацију синусоида (43, 44).

Неуротоксичност представља трећи најтежи облик токсичности цисплатине, и клинички ентитет који најчешће лимитира примену цисплатине у терапији малигних болести. Највише података постоји о токсичности која се испољава као периферна неуропатија или енцефалопатија (45). Клиничке студије су показале да се овај тип токсичности цисплатине повећава са терапијском дозом, и нарочито је заступљен када кумулативна доза прелази $300\text{mg}/\text{m}^2$, уз забележену акумулацију у ткиву (46). Интересантно је да су неуропатске промене изазване цисплатином иреверзибилне код 30-50% пацијената. Сензоричке манифестације неуропатије изазване цисплатином (47) су често удружене и са манифестацијама ототоксичности због оштећења рецепторских ћелија Кортијевог органа.

Кардиотоксичност изазвана применом цисплатином се повезује са отпуштањем LDH и СК из кардиомиоцита, које настаје као последица повећања липидне пероксидације у мембранама срчаних ћелија (48). Морфолошке манифестације кардиотоксичности изазване цисплатином се уочавају у форми дегенерације и некрозе срчаних мишићних влакана, са појачаном фиброзном реакцијом и вакуолизацијом цитоплазме у кардиомиоцитима (48).

Према подацима из литературе, у нежељене ефекте цисплатине који се ређе срећу у клиничкој пракси се убрајају манифестације токсичности везане за функционалне

поремећаје гастроинтестиналног тракта, токсичне ефекте на репродуктивном систему, мијелосупресију и алергијске реакције (49).

1.1.3.1. Неуротоксичност цитостатика на бази платине

Терапија хемиотерапеутицима на бази платине, укључујући и цисплатину (*cis-diamminedichloroplatinum II*), карбоплатину (*cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum II*) и оксалиплатину (*trans-R,R-cyclohexane-1,2-diamineoxalatoplatinum II*), је често повезана и са веома озбиљним клиничким манифестацијама неуротоксичности (50).

Иако карбоплатина изазива значајно мање манифестације неуротоксичности у поређењу са цисплатином и оксалиплатином (51), нежељени ефекти на нервни систем су уочени када се примењује у високим дозама. Разлог за ову разлику се може пронаћи у резултатима *in vitro* студије у којој је показано да се исти ефекат, какав се уочава код цис- и оксалиплатине, на дозно-зависно повећање апоптозе, дешава тек при десет пута већим концентрацијама карбоплатине, што се објашњава значајно мањом продукцијом кисеоничких радикала и смањеним оштећењем ДНК (52).

Насупрот томе, стандардна терапијска примена цисплатине и оксалиплатине понекад доводи до неуропатских симптома који се тешко подносе, што ограничава њихову примену у смислу оптималних ефективних доза и трајања терапије. Показано је да се највеће промене уочавају код сензорних нервних влакана највећег дијаметра, уз бројне морфофункционалне промене праћене одговарајућим субјективним осећајима (53). Симптоматологија ове етиологије може понекад трајати јако дуго (месецима, па чак и годинама). Интересантно је да се овакве субјективне манифестације понекад могу појачати након прекида терапије (54). Значајно је напоменути да одређене генетске и клиничке предиспозиције повећавају вероватноћу за настанак тешких манифестација неуротоксичности током третмана препаратима на бази платине (55).

Највећи број студија у којима су испитивани директни механизми неуротоксичности препарата на бази платине је спроведен на периферним нервима. Сматра се да је акумулација платине у ганглионима задњих коренова, уз формирање веза

између платине и ДНК, кључни разлог за развој неуротоксичности (56). Штавише, потврђена је директна корелација између броја ових веза и тежине неуротоксичности (57). Претпоставка је да је један од фактора који фаворизује ову врсту промена чињеница да на нивоу ганглиона задњих коренова не постоји препрека, у виду хемато-енцефалне баријере, за трансфер цисплатине (58). Ову претпоставку појачавају скорашњи подаци да се преузимање препарата платине из крви у нервно ткиво повећава са прекомерном експресијом специфичних транспортера - CTR1 и OCT2 (59). Било како било, након уласка у неуроне, и *in vivo* и *in vitro* студије су потврдиле да цисплатина иницира неколико проапоптотских феномена, међу којима треба издвојити активацију p53, Вах транслокацију, ослобађање митохондријалног цитохрома c, као и активацију каспаза-3 и 9 (60).

Промене које су веома сличне онима које се уочавају на нуклеарној ДНК се након терапије цисплатином срећу и код митохондријалне ДНК. Успостављање веза између цисплатине и ДНК у митохондријама је доводило до инхибиције транскрипције и репликације, што је праћено низом морфолошких и функционалних промена у митохондријама. Као последица тога је долазило до прекида ланца за транспорт електрона и смањене продукције АТР уз настанак енергетског дефицита. Коначно, митохондријална дисфункција изазвана цисплатином је узроковала повећану продукцију слободних радикала и повећану акумулацију калцијума (61).

Као посебан механизам неуротоксичности цисплатине који је детектован у ганглионима задњих коренова треба поменути и промене на нивоу проводљивости јонских канала. Након примене цисплатине долази до повећаног инфлуksа калцијума преко калцијумских N канала услед њихове *up*-регулације индуковане цисплатином. Повећање концентрације интрацелуларног калцијума се повезује са активацијом каспазе-3 и последичним повећањем апоптозе (62). Такође, у литератури је описан још један трансмембрански механизам којим се могу објаснити манифестације неуротоксичности цисплатине. Наиме, показано је да примена цисплатине доводи до повећане експресије TRPA1 рецептора у ганглионима задњих коренова, чиме се објашњава хипералгетски одговор на хладноћу и деловање механичких дражи код пацијената на терапији цисплатином (63). На анималном експерименталном моделу је потврђено да се сличне

манифестације неуротоксичности са хипералгетским ефектом уочавају и у ЦНС-у. Конкретно, у неуронима тригеминалног ганглиона је након примене цисплатине детектовано повећање релативне генске експресије за високоспецифичне рецепторе типа TRPV1 и TRPA1 (64).

За разлику од бројних подата о неуротоксичности цисплатине и осталих препарата на бази платине који су добијени у истраживањима спроведеним на периферним нервима, подаци о нежељеним дејствима цисплатине који настају деловањем на ЦНС су далеко оскуднији. Иако у иницијално физиолошким условима (при првом контакту) цисплатина готово не пролази хематоенцефалну баријеру, поновљена и/или продужена администрација цисплатине у експерименталним условима је омогућила бољи увид у неуротоксичност цисплатине која се манифестује преко ЦНС-а. Могуће објашњење за овај парадокс треба тражити у чињеници да администрација цисплатине веома брзо доводи до тешких оштећења церебралне васкуларизације, што за последицу може имати повећање васкуларне пропустљивости и појачано преузимање цисплатине у ткиво. Утицај који цисплатина, као и поједини други цитостатици (кармустин, цитозин арабинозид...), има на ћелије ЦНС-а свакако није занемарљив. Штавише, показано је да примена цисплатине показује већи негативан утицај на прогениторне ћелије ЦНС-а и олигодендроците него на малигне ћелије (65). У истој студији је показано да администрација цисплатине повећава ћелијску смрт у дентатном гирусу хипокампуса и ћелијама *corpus callosum*-а. Дегенеративне промене у ЦНС-у настају свега неколико сати након примене цисплатине.

Уз веома оскудне податке о непосредним механизмима токсичности цисплатине у ЦНС-у (који укључују повећање оксидативног стреса, инфламације и апоптозе), описано је да, између осталог, примена цисплатине узрокује читав низ бихевиоралних манифестација неуротоксичности, као што су когнитивна дисфункција (66), повећање степена депресивности (67), односно повећање степена анксиозности код глодара (68). Уз оградом да су сви наведени подаци о непосредним механизмима централне неуротоксичности цисплатине и њиховим последицама добијени на анималним експерименталним моделима, у реалним условима се морамо ослонити искључиво на њихову валидност, односно транслационом методологијом покушавати да се направи аналогија са људском популацијом. Наиме, из недвосмислених разлога који су базирани на основним

принципима етичности, у клиничким студијама није могуће испитивати нежељене ефекте цитостатика независно од могућих (очекиваних и вероватних) симултаних утицаја основне болести која је и индиковала примену такве терапије.

1.2. Антиоксиданси

У биолошким системима се континуирано дешава оксидативни стрес, сложени процес који карактеришу антагонистичке акције два система – система за продукцију слободних радикала и система који омогућава елиминацију ових реактивних форми, у чему учествују ендогени и егзогени антиоксиданси.

У свим организмима који функционишу у аеробним условима, кисеоник представља есенцијални елемент за одвијање метаболичких функција. Истовремено, кисеоник представља и реалну опасност за све структуре у којима се одвијају метаболички процеси захваљујући особини да формира делимично оксидиране елементе који имају висок степен реактивности. Ова једињења, која представљају високо реактивне форме кисеоника, се називају *reactive oxygen species* (ROS) и убрајају се у слободне радикале или њихове прекурсоре. Механизам њихове токсичности је последица постојања неспарених електрона у орбитама, што захваљујући њиховој тежњи за прелазак у стабилну форму, у контакту са различитим биомолекулима ћелије доводи до нежељене трансформације ћелијских структура (69). Наведени процеси имају респектабилни интензитет у свакој појединачној ћелији захваљујући чињеници да у њима континуирано функционишу системи за трансфер неспарених електрона, нарочито у процесима при којима се енергија добија у аеробним условима (доминантно у митохондријама). Истине ради, мора се поменути и да слободни радикали имају читав низ корисних (чак и есенцијалних) улога у организму, попут реакције полимеризације аминокиселина у синтези протеина, реакције полимеризације глукозе у синтези гликогена и бројне катализаторске улоге у ензимским реакцијама интермедијарног метаболизма (70).

Током процеса који се нормално одвијају у организму (неуротрансмисија, релаксација мишића, перисталтика, агрегација тромбоцита, фагоцитоза...) настају и мале количине реактивних азотних форми – *reactive nitrogen species* (RNS) (71). Читав низ молекула који припадају овој врсти слободних радикала такође може изазвати значајне негативне трансформације интраћелијских биомолекула.

Континуирана продукција слободних радикала је у ћелијама које функционишу у присуству кисеоника довела до неопходног постојања система за одбрану од оксидативног оштећења. Систем одбране од прекомерног оксидативног стреса чини низ различитих хемијских форми са антиоксидантним карактеристикама, који се заједнички називају антиоксиданси. Дакле, по дефиницији, антиоксиданси представљају велику групу супстанци које и у малим количинама спречавају или умањују оксидацију супстрата.

Сумарно гледано, у организму (у физиолошким условима) постоји равнотежа између продукције слободних радикала и капацитета антиоксидантне заштите. Нарушавање овог еквилибријума, у смислу повећаног оксидативног стреса и настанка оксидативног оштећења, може бити узрок, али и последица низа различитих механизма који финално за резултат имају морфолошко и функционално оштећење ћелије.

Слободни радикали настају услед дејства егзогених и ендогених фактора. Соларна радијација, као пример егзогеног фактора, доводи до оштећења веза између биомолекула под утицајем ултраљубичастих зрака. Поред физичких егзогених фактора, и бројни хемијски утицаји могу довести до поремећаја оксидативног еквилибријума. Тако је описано да до оштећења морфо-функционалног интегритета хепатоцита може доћи услед прекомерног уноса етил алкохола или се хепатотоксичност може развити као последица деловања јатрогених фактора (72). У овим околностима је детектовано значајно повећање оксидативног стреса које се манифестује повећаном продукцијом слободних радикала, али и критичним смањењем капацитета антиоксидантне заштите. Поред директно хемијски индукованог повећања оксидативног стреса, и сами одбрамбени (антиоксидантни механизми), у циљу детоксикације спроводе конверзију токсичних супстанци у мање токсичне при чему, као пратећи ефекат настаје повећана продукција слободних радикала.

И развој многих обољења се узрочно-последично може повезати са нарушавањем оксидативног баланса. Запаљенски процеси индукују повећану продукцију слободних радикала од стране специјализованих ћелија. Ефекторне ћелије имунског система имају велику способност продукције слободних радикала, као део природног одбрамбеног система, која се може значајно повећати у контакту са патогеним микроорганизмима. Тако различите ћелије са фагоцитном способношћу (неутрофили, моноцити или макрофаги) користе систем NADPH за стварање супероксид анјона, као примарне реактивне форме, у

циљу елиминисања патогена. Супероксид анијон потом генерише низ каскадних ензимских реакција са продукцијом секундарних реактивних форми (попут H_2O_2 и HO_2^\bullet), што за финалну последицу, поред жељеног утицаја на патогени микроорганизам, има и оксидативно оштећење околног ткива (73).

Интересантно је да и нарушавање физиолошких услова у ткивима може само по себи да буде узрок повећаног оксидативног оштећења. На пример, током инфаркта миокарда, при оклузији коронарних крвних судова, иницијално долази до смањења протока крви и последичне хипоксије у иригационом подручју. Непосредно након што наступи хипоксија, јавља се „парадоксално“ повећање продукције реактивних форми кисеоника, што за последицу може имати чак и веће оштећење ткива него што је иницијално изазвано хипоксијом. Да парадокс буде још већи, познато је и да у случају поновног успостављања протока може доћи до „реперфузионе повреде“ која за последицу може имати далеко веће оксидативно оштећење ткива миокарда (74). Веома сличан редослед догађаја, током кога постоји специфична динамика интеракције између патофизиолошког догађаја и поремећаја оксидативног еквилибријума, се уочава и код других поремећаја изазваних акутном исхемијском реакцијом, попут одговарајућих врста цереброваскуларних инсульта. Веома фреквентни клинички ентитети који се срећу у савременој пракси, као што су метаболички синдром, дијабетес типа 2, атеросклероза и хипертензија, се такође карактеришу значајним нарушавањем оксидативног баланса у смислу преминације продукције слободних радикала која превазилази капацитете антиоксидантне заштите у ћелијама (75).

Посебно место у потенцирању значаја оксидативног оштећења у ћелији, као и улоге антиоксидантних механизма, представља веза између оксидативног стреса и карциногенезе. Хемијски индукована карциногенеза представља сложени процес у коме током више фаза долази до мутација и повећања пролиферације ћелија. Нерегулисана и/или повећана продукција слободних радикала (реактивне форме кисеоника и азота које настају под утицајем егзогених или ендогених фактора) може довести до мутација преко оксидативним стресом изазваног оштећења ДНК и промена у генској експресији. Познато је да се сигнални путеви, укључујући AP-1 и NFκB, активирају реактивним формама кисеоника што доводи до промене транскрипције гена који контролишу ћелијски раст (76).

1.2.1. Класификација антиоксиданаса

Било да се дефинишу као супстанце које неутралишу слободне радикале и њихове ефекте (77), или као било која супстанца спречава реакције слободних радикала (78), или пак као супстанце које се супростављају слободним радикалима и спречавају оштећења која они изазивају (79), јасно је да антиоксиданси представљају велику групу једињења која је веома хетерогена према критеријумима хемијског састава, порекла, механизма деловања, као и према месту где остварују своје антиоксидантне ефекте.

Из наведеног разлога се, према подацима из литературе (80), антиоксиданси могу класификовати на следеће начине:

А. Према механизму дејства:

- Превентивни антиоксиданти
- Ензими: супероксид дисмутаза (1, 2 и 3), каталаза, глутатион пероксидаза, ензими за репарацију ДНК
- Секвестратори металних јона: албумин, лактоферин, трансферин, хаптоглобин, церулоплазмин, хемопексин, каротеноиди, супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, мокраћна киселина, полифенолни флавоноиди
- Сквенцери: аскорбат, каротеноиди, мокраћна киселина, α -токоферол, полифеноли, билирубин, албумин, убикинон, редуковани глутатион и други тиоли

Б. Према месту деловања:

- Интраћелијски: супероксид дисмутаза 1 и 2, каталаза, глутатион пероксидаза, ензими за репарацију ДНК (поли (ADP-рибозо) полимераза, редуковани глутатион, убикинон (редуковани облик))
- Екстраћелијски: супероксид дисмутаза 3, селен, глутатион пероксидаза, лактоферин, трансферин, аскорбат, мокраћна киселина, каротеноиди, церулоплазмин

В. Према растворљивости:

- Липосолубилни: хаптоглобин, церулоплазмин, албумин, аскорбат, мокраћна киселина, полифенолни флавоноиди, редуковани глутатион и остали тиоли
- Хидросолубилни: α -токоферол, каротеноиди, билирубин, кинини

Г. Према структурама у чијој заштити учествују:

- ДНК-протективни: супероксид дисмутаза 1 и 2, глутатион пероксидаза, ензими за репарацију ДНК (поли (ADP-рибозо) полимераза, редуковани глутатион, цистеин
- Протеин-протективни: секвестрација прелазних метала превентивним антиоксидансима, антиоксиданси са компетитивним (за супстрат) скевенџерским механизмом, антиоксидантни ензими
- Липид-протективни: α -токоферол, аскорбат, каротеноиди, редуковани глутатион, глутатион пероксидаза, билирубин

Д. Према пореклу/изворима (порекло из хране):

- Егзогени: каротеноиди, аскорбинска киселина, токофероли (a, b, c, d), полифеноли, фолна киселина, цистеин
- Ендогени: каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион –S-трансфераза, редуковани глутатион, церулоплазмин, трансферин, феритин, гликозилазе
- Синтетски: N-ацетилцистеин, пенициламин, тетрациклини.

1.2.2. Механизам дејства антиоксиданаса

Бројни антиоксиданси остварују своје антиоксидантне ефекте делујући на различите начине, који укључују и следеће механизме: скевенцерска активност према слободним радикалима, хелација јона метала, инхибиција ензима за продукцију слободних радикала, активација интараћелијских антиоксидантних ензима, превенција липидне пероксидације, превенција оштећења ДНК и превенција модификације протеина (81). У наставку текста биће представљени механизми дејства неких од најзначајнијих антиоксиданаса.

Фенолна једињења чине широку групу (преко 8000) супстанци са различитим хемијским структурама и биолошким ефектима (82). Ови антиоксиданси смањују, или потпуно елиминишу, слободне радикале трансфером водониковог атома из хидроксилне групе. Овај механизам укључује реакцију фенолних једињења са пероксил радикалом (ROO^{\cdot}) и омогућава трансфер водониковог јона од фенола до слободног радикала при чему настаје прелазно стање Н-О везе са једним електроном. Осим као донори водоникових јона, фенолна једињења могу учествовати и у хелацији јона метала (гвожђе, бакар) што омогућава инхибицију оксидације липопротеина мале густине. Оваква својства фенолних једињења омогућавају смањење ризика за неуродегенеративне и кардиоваскуларне болести (83), туморе дигестивног тракта (84, 85), карцинома дојке и јајника (86) и леукемија (87).

Каротеноиди се налазе у готово свим биљкама, животињама и микроорганизмима, са преко 700 категорисаних врста (88). Базичну структуру каротеноида која је одговорна за биолошку активност представља коњуговани полинезасићени ланац. Управо овај фрагмент омогућава антиоксидантна својства, и уз присуство хидроксилних група дефинише реактивност каротеноида. Као липофилни скевенцери пероксил радикала, каротеноиди имају значајну улогу у заштити ћелијских мембрана. Делујући као донори електрона, антиоксидантне карактеристике каротеноида су показале корисне ефекте нарочито код обољења која представљају најчешћи узрок смрти у савременој цивилизацији – кардиоваскуларне болести и малигни тумори (89). Примена каротеноида (у већим дозама од стандардне исхране) омогућава смањење морбидитета у смислу бројних кардиоваскуларних поремећаја, укључујући и исхемијску болест срца, односно настанак

првог срчаног удара (90). Такође, потврђен је и користан ефекат примене β -каротена (у комбинацији са ацетилсалицилном киселином) код пацијената где је претходно потврђена исхемијска болест срца (91). Резултати клиничких студија показују да повећан унос каротеноида показује веома добре ефекте у превенцији појединих малигних обољења, са нарочито добрим статистичким подацима код карцинома усне дупље, фаринкса и ларинкса (92). Каротеноиди су се потврдили као корисна суплементација и код већ потврђених туморских лезија простате (93).

Витамин С представља назив за групу аналога аскорбинске киселине који могу бити природног порекла или синтетски. Аскорбинска киселине је хидросолубилни кетолактон са две хидроксилне групе које се могу јонизовати (анјонски аскорбат је доминантни облик при физиолошким рН вредностима), што омогућава снажна редукујућа својства уз два надовезујућа губитка електрона, при чему настаје аскорбат-радикал и дехидроаскорбинска киселина. На тај начин се уместо високо реактивних форми слободних радикала добија релативно стабилни облик аскорбат-радикала. При физиолошким вредностима концентрације аскорбата у плазми (приближно 10 $\mu\text{g/ml}$), аскорбат делује као коантиоксиданс са витамином Е и спречава реакцију LDL са пероксил радикалима (94). Аскорбат-радикал који настаје у овим реакцијама је слабо реактиван и најчешће се поново редукује до аскорбата у присуству редуктаза-зависне NADH и NADPH (95). Захваљујући способности витамина С да неутралише већину најзначајнијих слободних радикала (пероксил радикал, синглет или молекуларни кисеоник), примена аскорбата се показала веома ефикасном у превенцији (96) и третману читавог низа патолошких стања (97). Резултати клиничких студија нарочито потенцирају значај уноса витамина С код хроничних болести повезаних са оксидативним оштећењем ткива, попут реуматоидног артритиса (97). Велики значај се придаје и корисним ефектима примене аскорбата у превенцији и третману малигних болести. Потврђено је да унос витамина С спречава оштећење ДНК, у форми премутагених оксидативних лезија ДНК, као и репарацију оштећене ДНК, па на тај начин и спречава настанак тумора. С друге стране, велике дозе аскорбата могу да спрече синтезу фактора раста за бројне туморске ћелије. Треба напоменути и да се појачана антиоксидантна суплементација витамином С нарочито препоручује код пушача у циљу смањивања оксидативног стреса изазваног дуванским

димом (повећана липидна пероксидација) и супституције пада концентрације (40%) аскорбата у плазми пушача (98).

1.2.3. Антиоксидантна суплементација природним препаратима у клиничкој пракси

Зачинске биљке и зачини се по традиционалној дефиницији сматрају за делове биљака који се користе у исхрани због својих ароматичних карактеристика, при чему немају (или имају врло малу) калоријску вредност (99). Ипак, у последње време, откривено је да зачинске биљке и зачини садрже различите састојке са антиоксидантним својствима (100), те се стога све чешће користе у циљу појачавања антиоксидантне заштите (101).

Имајући у виду да је примена зачинских биљака, као саставног дела исхране, са медицинским импликацијама новијег датума, неопходно је отклонити и неке распрострањене дилеме у вези са могућом интеракцијом различитих биљних извора антиоксиданаса (102). Тако је релативно скоро показано да каротеноиди (бета каротен) показују интеракцију са витаминима Е и С, при чему могу спречити оксидативно оштећење липопротеина мале густине и при ниским серумским концентрацијама витамина Е (103), што представља потврду синергистичког дејства различитих антиоксиданаса. Исто тако, антиоксиданси из биљака, попут фенола и биофлавоноида, могу појачати антиоксидантна својства витамина. Тако, рутин појачава скевенцерску активност витамина Е и С, при чему је укупни ефекат већи од простог збира од појединачних ефеката појединачних антиоксиданаса (103).

Састојци биљака који имају антиоксидантна својства припадају групама скевенцера слободних радикала, мада могу бити и невитаминске или минерални антиоксиданси. Поред алфа-токоферола, аскорбинске киселине, каротеноида и цинка, природни препарати могу да садрже флавоноиде, полифеноле и флавопротеине. Поједине биљке или комбинације зачинских биљака своју антиоксидантну активност остварују преко различитих биохемијских механизма - кроз скевенцерску активност за супероксид анјон или преко повећања активности SOD (104). Осим директне антиоксидантне активности у

многим биљкама које се користе у исхрани (воће, поврће, зачини) се налазе фактори који превенирају онкогенезу. Ово својство се приписује следећим састојцима биљака: полифеноли, тиоли, каротеноиди и ретиноиди, одређени угљени хидрати, олигоелементи, терпени, токофероли и продукти глукозионалта. Антикancerски ефекат ових супстанци се манифестује на различите начине који (у зависности од врсте антиоксидантне компоненте) укључују антигенотоксичке ефекте, смањење оксидативног оштећења које за последицу има инцијацију онкогенезе, као и стимулацију репарације оштећене ДНК (104).

Антиоксидански пореклом из биљака не представљају само споредне факторе против оштећења ћелија и болести. На пример, за силимарин је потврђено да поседује моћан антиоксидантни капацитет, између осталог и као скевенџер слободних радикала, који омогућава хепатопротективни ефекат код алкохолног или јатрогеног оштећења јетре (72). Интересантно је да примена силимарина представља третман избора код тровања чији је узрок *Amanita phalloides*, где се ефекат не остварује преко антиоксидантне скевенџерске активности, већ компетитивном рецепторском инхибицијом на ћелијској мембрани (72), што се у традиционалној медицини користи вековима.

Иако у литератури постоји велики број података о широкој клиничкој примени природних препарата са антиоксидантним карактеристикама, веома је тешко систематизовати ова сазнања. Зато је у овом тексту направљен сумарни кратки осврт само на поједине зачинске биљке и зачине који се најчешће примењују са циљем решавања здравствених проблема. Један од додатних критеријума је, поред валидности презентованих података, био и историјат примене ове врсте препарата у традиционалној медицини појединих земаља, народа или култура.

Ђумбир (*Zingiber officinale*), поред широке примене у третману оксидативног оштећења различите етиологије у бројним органским системима (хепатотоксичност, нефротоксичност...), у последње време се сматра и потенцијално новим препаратом за друге медицинске индикације. Обећавајући резултати се наговештавају у превенцији кинетоза, као и мучнине у трудноћи (105) поред већ потврђених корисних ефеката у третману кашља и астматичних тегоба повезаних са алергијским и запаљенским процесима. Примењује се и у циљу олакшања стомачних тегоба, опекотина изазваних сунцем, као и главобоље и зубобоље. На основу механизма антиинфламаторне активности,

Ћумбир се може сврстати у класичну категорију нестероидних антиинфламаторних препарата. Ћумбир се показао као далеко ефикаснији инхибитор простагландина (инхибиција циклооксигеназе) у поређењу са црним и белим луком, уз смањење продукције тромбоксана за 60%, што за последицу има смањење агрегације тромбоцита (уз смањење липидне пероксидације) и ризика за срчани и мождани удар (106, 107). Осим тога, терпеноид и 6-цинцерол из ыумбира се сматрају најважнијим активним супстанцама у третману лезија слузнице желуца.

Гинко (*Ginkgo biloba*), чија се скевенцерска својства сматрају јачим у поређењу са мокраћном киселином (ендогени антиоксиданс), је показао значајан терапијски капацитет код васкуларних (укључујући и еректилну) и можданих (пре свега когнитивних) дисфункција (108), поремећаја синтезе допамина, астме и запаљенских процеса (109).

Сладић (*Glycyrrhiza glabra*), чији се главни фармаколошки ефекти приписују глициризину, је 50 пута слађи од кухињског шећера и показује снажан *cortisone-like* ефекат, што може да доведе до настанка клиничке слике „тровања шећером, након прекомерног и дугог конзумирања. У комбинацији са високим муцилагеним садржајем, ова биљка има благотворан утицај на иритиране мукусне мембране горњих делова респираторног и дигестивног тракта, па се између осталог користи и у третману кашља ове етиологије (замена за кодеин). Због снажног антиинфламаторног ефекта се примењује и као (безбеднија) замена за кортико-препарате у третману Адисонове болести и чира желуца, нарочито у дугим терапијским протоколима (110). Треба напоменути и да се замена кортико-терапије овим природним препаратом препоручује и због смањене конверзије кортизола у кортизон (биолошки инактивни облик), као и због појачања слабог антиинфламаторног ефекта хидрокортизона. Осим тога, због антивирусне активности, сладић се показао корисним и у третману последица изазваних Епштајн-Баровим, цитомегало и хепатитис В вирусом, због чега се сматра и потенцијалном терапијом за лечење HIV инфекције (111).

Шисандра (*Schizandra chinensis*) има плодове чији састојци показују бројне корисне биолошке ефекте: антибактеријски, хепатопротективни, антиалергијски и, наравно, антиоксидантни (112). Нарочито је интересантно да конзумирање ове биљке има бројне позитивне утицаје на ЦНС. Показано је да тонички ефекат ове биљке помаже код

наркотичких и седативних ефеката алкохола и пентобарбитала у токсичним дозама, те да помаже у опоравку ЦНС-а. Показала се корисном и код депресије изазване тешким адренергичким исцрпљивањем током психогеног стреса, преко механизма који личе на ефекте примене МАО инхибитора (113). За разлику од амфетамина, шисандра доводи до стимулаторног ефекта без претеране ексцитације ЦНС-а.

Куркума (*Curcuma longa*) се у индијској традиционалној медицини користи у третману читавог низа поремећаја здравља (анорексија, кашаљ, ране код дијабетичара, обољења јетре...). Експерименталне студије на анималним моделима су показале антиканцерогени и антимулагени ефекат куркуме. Антиоксидантни ефекти куркуме (38, 114), који укључују скевенџерски ефекат за епоксиде што спречава везивање за макромолекуле, су се показали ефективним у смислу смањења мутагености и броја тумора изазваних бензопиреном, као и са друга два потентна мутагена (4-нитро-о-фенилендиамин и диметилбензантрацен). Осим тога, куркума показује и снажан антиинфламаторни потенцијал који се може карактерисати нестероидним антиинфламаторним механизмима: антиоксидантна активност, инхибиција липоксигеназе и инхибиција циклооксигеназе (115). Описани су и корисни ефекти примене куркуме у клиничким студијама код пацијената са артритисом и остеоартрозом (116).

1.2.4. Антиоксидантна суплементација екстрактом биљке *Satureja hortensis* L.

Чубар, *Satureja hortensis* L. (SHL, енгл. *summer savory*), је једногодишња зачинска биљка из породице уснатица (*Lamiaceae*). Порекло ове биљке је из области Јужне Европе и области Медитерана, мада се данас може наћи у одговарајућем климатском подручју по читавом свету, где се надземни део ове биљке (углавном лист) традиционално користи као кулинарски додатак и биљка са лековитим својствима (117).

Најзначајнији биомолекули који се могу наћи у екстракту SHL су: испарљива уља, фенолна једињења, флавоноиди, танини, стероиди, киселине, смоле, муцилазе и пирокатехоли (118). Овако разнолик састав омогућава потенцијалну примену у третману различитих поремећаја здравља (попут дијабетеса, кардиоваскуларних обољења, малигних тумора, Алцхајмерове болести) захваљујући потврђеним антиоксидантним, антикробним и антиинфламаторним својствима (119).



Слика 1. *Satureja hortensis* L.

1.2.4.1. Антиоксидантна својства екстракта *S. hortensis* L.

Присуство полифенолних једињења је одговорно за антиоксидантну активност екстракта SHL, која је потврђена у више *in vitro* студија (120). Антиоксидантне карактеристике екстракта SHL су потврђене и у истраживањима у којима су коришћени делови ове биљке пореклом из Србије (121). Резултати наведене студије су показали повећање укупног антиоксидантног капацитета, смањивање липидне пероксидације, скевецерску активност за хидроксил радикал, као и повећање DPPH. Наведени антиоксидантни ефекти екстракта SHL су се показали значајно јачим у поређењу са екстрактом друге биљке са антиоксидантним својствима (*Artemisia dracunculus*), што је у складу са већим укупним садржајем фенола и флавоноида (122). И резултати *in vivo* студије (123) су показали да метанолски екстракт надземних делова SHL доводи до смањења оксидативног оштећења јетре, бубрега и тестиса пацова изазваног применом цисплатине. Антиоксидантни ефекат екстракта SHL се манифестовао кроз смањење цисплатином изазваног повећања липидне пероксидације, уз повећање антиоксидантног капацитета израженог преко повећања активности SOD и CAT, односно глутатиона (GSH).

Упоређујући антиоксидантна својства екстракта SHL са хемијским саставом, протективни ефекат поједини аутори приписују високом садржају компоненти са потврђеним антиоксидантним својствима, као што су карвакрол, γ -терпинен, р-цимен и тимолна једињења (124, 125). С друге стране, поједине студије у анализи антиоксидантних ефеката екстракта SHL велики значај придају другим састојцима који имају потврђени антиоксидантни потенцијал, попут рузмаринске и кофеинске киселине, нарингенина, кверцетина, апигенина, кемпферола, лутеолина, хлорогеничне киселине, рутина и апигенин-гликозида (126, 127).

1.2.4.2. Антимикробна својства екстракта *S. hortensis* L.

Сматра се да је присуство монотерпена (карвакрол, цимен и тимол) у есенцијалним уљима одговорно за антимикробну активност екстракта SHL (128). Примена екстракта SHL је показала снажнији ефекат од препарата који се стандардно користе за испитивање антимикробне активности (ванкомицин, гентамицин и амфотерицин), осим за *P. aeruginosa* (129). На основу резултата наведене студије се претпоставља да су основни механизми антимикробног ефекта оштећење ћелијске мембране, промене пропустљивости јонских канала и ћелијска смрт, при чему се најјачи ефекат приписује тимолу и карвакролу, уз индиректни ефекат р-цимена.

Антимикробна активност екстракта SHL је потврђена на културама: *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. typhimurium* и *P. aeruginosa* (130), као и код бактерија пореклом из хране - *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* (131). И комерцијални препарат уља екстракта SHL је показао значајну антимикробну активност када се ради о бактеријама пореклом из рибљег меса - *L. innocua*, *P. fluorescens* и *A. hydrophila/caviae* (132). Антимикробни ефекат екстракта SHL је потврђен и код примена екстракта биљке пореклом са простора Србије (121).

Поред антибактеријских ефеката, резултати добијени на *R. stolonifer*, *P. digitatum*, *Aspergillus niger* и *Botrytis cinerea*, наговештавају и потенцијални антифугални ефекат екстракта SHL (133), који је већ потврђен код *Candida-e albicans* (134).

Антипаразитски ефекат екстракта SHL је описан на цистама *Giardia-e*, као и *Leishmania-e major* (135, 136).

Потенцијални антивирусни потенцијал екстракта SHL је потврђен код вируса HIV (137).

1.2.4.3. Остала биолошка својства екстракта *S. hortensis* L.

За неколико природних препарата са екстрактом SHL (есенцијално уље, хидроалкохолни и полифенолни екстракт) је показано да имају антиинфламаторни ефекат у експериментима спроведеним на анималним моделима (138). Описани антиинфламаторни одговор на екстракт SHL је био праћен антиноцицептивним ефектом. Поред тога, хидроалкохолни екстракт SHL се показао корисним и код смањења знакова синдрома одбацивања морфина у одговарајућем тесту (139).

Поред поменутог хепатопротективног ефекта екстракта SHL, описаног код хепатотоксичности индуковане применом цисплатине (123), у литератури постоје подаци о антидијабетском и антихолестеролемисјком ефекту (120), што се може сматрати веома корисним ефектом у смислу кардиоваскуларног морбидитета (118) и даје шире клиничке импликације за потенцијалну примену екстракта SHL (128). Претпоставка је да су активне компоненте екстракта SHL одговорне за ову врсту ефеката карвакрол и тимол (смањење серумског холестерола), као и флавоноиди (антихиперлипидемијски ефекат).

Значајна антиоксидантна активност екстракта SHL је била непосредни повод за испитивања утицаја ове биљке код сојева мишева са високим ризиком за малигне туморе (140). Продужена примена (10 месеци) есенцијалних уља екстракта SHL је за последицу имала поправљање односа између мононезасићених и засићених, односно полинезасићених, масних киселина у мозгу и јетри, што је довело до смањења липидне пероксидације. Интересантно је да су, иако постоји велики број студија (118, 128) у којима је испитиван ефекат других биљака из фамилије *Satureja* на различитим културама туморских ћелија (са веома добрим ефектом), резултати јединог познатог истраживања о антимулагеним ефектима екстракта SHL показали значајни антимулагени потенцијал ове биљке, који се кретао у рангу од 8.15 до 33% (141).

На крају, треба поменути и остале (несистематизоване) ефекте екстракта SHL, у које се према подацима из литературе убрајају: антигенотоксични ефекат на људским лимфоцитима који је био праћен смањењем оксидативног стреса (142), смањење адхезије тромбоцита (118), спазмолитички и антидиуретски ефекат (127), бронходилатацијски и

експекторантни ефекат (143, 144), као и протективни ефекат код гениталних дисфункција, попут дисменореје и еректилне дисфункције (145).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Према анализи одговарајућих литературних јединица, у овој студији су дефинисани потенцијални истраживачки циљеви:

1. Дефинисање бихевиоралних консеквенци примене цисплатине код пацова.
2. Дефинисање бихевиоралних консеквенци примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. код пацова.
3. Дефинисање бихевиоралних консеквенци симултане администрације цисплатине и екстракта биљке *Satureja hortensis* L.
4. Квантификација индикатора ткивног оксидативног оштећења хипокампуса након спровођења наведених терапијских третмана.
5. Квантификација индикатора апоптозе хипокампадног ткива након спровођења наведених терапијских третмана.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Третман животиња

3.1.1. Кондиционирање анималног узорка

Кондиционирање анималног узорка је реализовано према претходно више пута верификованом програму бихевиоралних испитивања на анималним експерименталним моделима који се користе за глодаре (146-149), уз поштовање свих одговарајућих процедура о добробити животиња и у складу са ARRIVE упутствима, и након сагласности надлежних тела за контролу етичких принципа.

3.1.2. Припрема екстракта

Надземни делови биљке чубар (*Satureja hortensis* L). сакупљени су у селу Борач, у околини Крагујевца, Србија, у августу 2015. године. Након идентификације биљка је систематисана и депонована са систематским бројем ваучера 121/15 у Хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Осушени и уситњени биљни материјал је коришћен за припрему екстракта применом методе мацерације. Измерено је 73 g биљног материјала и преливено растварачем за екстракцију. У припреми екстракта *S. hortensis* употребљен је метанол као поларни растварач чије особине могу утицати на бољу екстракцију активних компоненти из биљног материјала. Метанол је коришћен у 10 пута већој количини у односу на количину биљке. Након 24 h екстракције мацерацијом, екстракт је процеђен филтрацијом, филтрат је сачуван, а биљни материјал је поново преливен истом количином метанола. Овај поступак екстракције поновљен је укупно три пута у трајању од укупно 72 h, а на крају су сви филтрати спојени и добијени екстракт је упараван коришћењем ротационог вакуум упаривача до сува.

Крајњи производ екстракције је суви екстракт надземног дела биљке *S. hortensis* масе 20 g, из кога је уклоњена комплетна количина растварача. Добијени екстракт је чуван у фрижидеру на температури од око 4°C. Све концентрације екстракта примењене за *in vivo* тестове базиране су на сувој маси екстракта.

3.1.3. Протокол и дизајн истраживања

Студија је реализована на узорку од 35 животиња, у седам једнаких група:

1. група интактних животиња (n=5) – интраперитонеална администрација физиолошког раствора у запремини од 1 ml, петог дана протокола

2. цисплатина група (CIS, n=5) – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе), петог дана протокола;

3. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 50 mg група (CIS+E50, n=5) – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 50 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;

4. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 100 mg група (CIS+E100, n=5) – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 100 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;

5. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 200 mg група (CIS+E200, n=5) – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 200 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;

6. цисплатина и силимарин група (CIS+SIL, n=5) – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена силимарина раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 100 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;

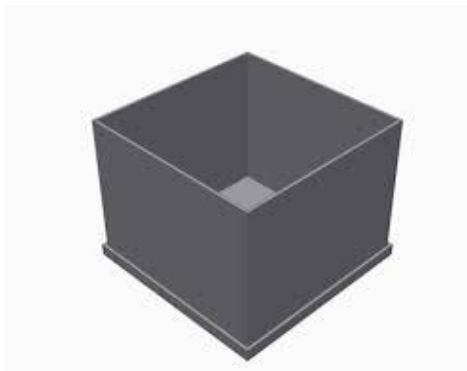
7. екстракт биљке *Satureja hortensis* L. група (E200, n=5) – орална администрација екстракта биљке *Satureja hortensis* L., раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 200 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана.

3.2. Бихевиорална тестирања

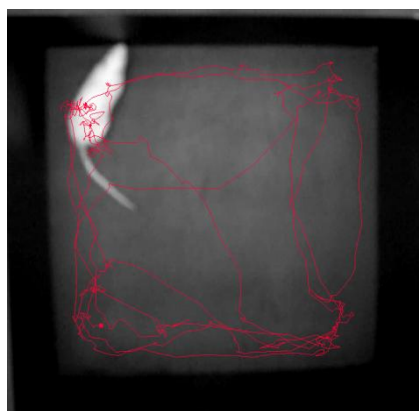
Бихевиорална тестирања су спроведена према претходно утврђеној процедури (146-150).

3.2.1. *Open field* тест (OF тест)

Open field тест се најчешће користи за скрининг алтерација понашања глодара (151, 152). У овом истраживању тест отвореног поља (OF тест) је извођен у квадратном лавиринту сачињеном од дрвета црне боје чије су димензије 60x60x30 cm (Слика 3.1.), прем претходно описаној процедури и уз квантификацију (Слика 3.2.) одговарајућих индикатора промене понашања (146-148).



Слика 3.1. Апаратуре за извођење *open field* теста.



Слика 3.2. Приказ утврђивања параметара у тесту отвореног поља на примеру укупног пређеног пута (*Ethovision software version XT 12*).

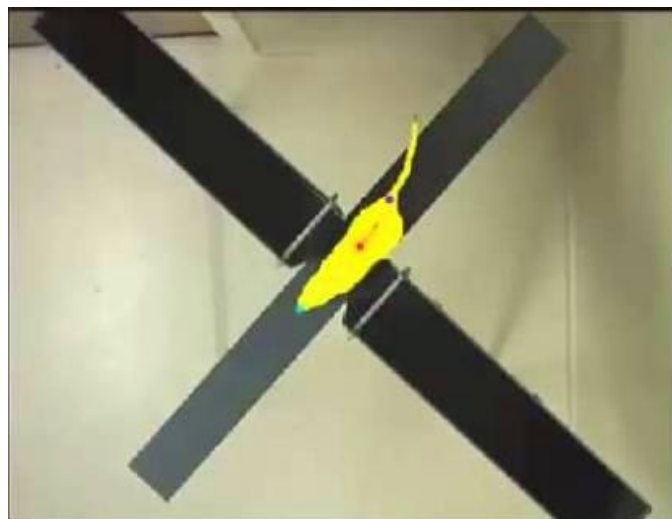
Анализом кретања у арени теста отвореног поља добијају се подаци о анксиозном статусу животиње. Мањи степен анксиозности показују животиње које се слободно крећу кроз све зоне арене и које улазе и бораве у самом центру арене (повећање укупног времена проведеног у централној зони, као и број посета централном делу лавиринта). Супротно томе, уколико животиње дуже бораве у периферним зонама арене може се закључити да имају повећан степен анксиозности. Локомоторна активност се процењује на основу укупног пређеног пута и процента времена кретања који када су смањени говоре у прилог смањене локомоторне активности, а уједно и о (индиректно) повећаном степену анксиозности. У тесту отвореног поља експлоративна активност животиње се процењује преко број усправљања (БУ). Смањење БУ се може протумачити као индиректно повећање степена анксиозности.

3.2.2. *Elevated plus maze* тест (EPM тест)

Још прецизнији подаци о процени степена анксиозности се добијају у тесту уздигнутог крстастог лавиринта - EPM тест (153). Као што је претходно описано (146-149), овај тест је погодан и за процену укупне локомоторне, као и експлоративне активности код глодара (Слика 3.3.), уз квантификацију (Слика 3.4.) одговарајућих индикатора промене понашања (146-148, 154).



Слика 3.3. Апаратура *elevated plus maze* теста.



Слика 3.4. Приказ утврђивања параметара у тесту уздигнутог крстастог лавиринта на примеру дефинисања боравка животиње у отвореним/затвореним крацима (*Ethovision software version XT 12*).

Смањен степен анксиозности животиње се манифестовао кроз елонгацију временског интервала и фреквенцу у отвореним крацима. Смањење параметара који детерминишу експлоративну активност (број нагињања, усправљања, као и број епизода укупне експлоративне активности) потврђује повећан степен анксиозности. Смањење вредности параметара који описују локомоторну активност (укупни пређени пут и проценат времена кретања) индиректно указује на присуство анксиогеног ефекта.

3.2.3. *Tail suspension* тест (TS тест)

Tail suspension тест (Слика 3.5.) је најчешће коришћени метод квантификације депресивног понашања (155), и показао се применљивим у тестирању на глодарима, уз квантификацију одговарајућих индикатора промене понашања (146-148, 156).

Повећан степен депресивности код животиња се манифестовао кроз повећање број епизода имобилности, укупног трајања имобилности, као и кроз скраћење времена до појаве прве имобилности.



Слика 3.5. *Tail suspension* тест.

3.2.4. Примена софтвера у обради бихевиоралних тестова

Примена софтвера у обради бихевиоралних тестова је спроведена према претходно установљеној процедури (146-149).

3.3. Семпловање материјала за детерминацију оксидативног оштећења и апоптотске активности

После завршеног бихевиоралног тестирања, животиње су, након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина – 10 mg/kg и ксилазина – 5 mg/kg) жртвоване декапитацијом на гиљотини. Узорци хипокампуса су узимани ради одређивања параметара оксидативног стреса, у складу са раније стандардизованим протоколом (146, 148), као и маркера апоптотске активности.

3.3.1. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса

Како би се добили хомогенати ткива хипокампуса, узорцима добијеним након дисекције на леду је најпре дефинисана величина (запремина у ml), а потом додат раствор фосфатног пуфера (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) припремљеног додавањем 138 mM NaCl и 2.7 mM KCl у 10 mM фосфатни пуфер и pH вредност је подешена на 7.4. Добијени хомогенати ткива су подвргнути центрифугирању на 4000 rpm (15 min., 4°C). Процес центрифугирања доводи до издвајања супернатаната који су у целости пренесени у стерилне епендорф тубе и замрзнути до даљег анализирања параметара оксидативног стреса у хипокампусу. У том циљу испитивани су: активности ензима каталазе (CAT) и супероксид-дисмутазе (SOD), количина укупног глутатиона (GSH) у узорцима и ниво индекса липидне пероксидације.

3.3.1.1. Одређивање количине укупних протеина у ткиву хипокампуса

Укупан садржај протеина у добијеним узорцима одређен је спектрофотометријском методом која се заснива биуретској и *Folin–Ciocalteu* реакцији (156).

3.3.1.2. Одређивање активности каталазе (CAT) у ткиву хипокампуса

Активност ензима каталазе (CAT) у хомогенатима ткива хипокампуса одређивана је методом коју су описали Beers и Sizer (157).

3.3.1.3. Одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD) у ткиву хипокампуса

Метода коришћена за одређивање активности супероксид-дисмутазе (SOD) у хомогенатима ткива хипокампуса заснива се на способности овог ензима да неутрализује супероксид анјон радикал (158).

3.3.1.4. Одређивање укупног глутатиона (GSH) у хипокампусу

Количина глутатиона у хомогенату ткива хипокампуса одређена је по методи коју је описао Ellman (159), а која се заснива на реакцији GSH са 2,2'-динитро-5,5'-дитио-дибензоевом киселином (DTNB).

3.3.1.5. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у хипокампусу

Ниво липидне пероксидације у узорку ткива хипокампуса одређен је по методи која се заснива на реакцији производа липидне пероксидације са 2-тиобарбитурном киселином (160).

3.4. Квантификација индикатора апоптоцке активности у ткиву хипокампуса

3.4.1. Изолација РНК из ткива хипокампуса

Изолација укупне рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid, RNA*) из ткива хипокампуса пацова изведена је коришћењем раствор фенола и гуанидин изотиоцианата, комерцијалног назива *TRI reagent (TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)* а којим се разграђује биолошки материјал и денатуришу протеини.

Ткиво хипокампуса је (100 mg) је непосредно након изолоације замрзнуто, а потом потпуно механички хомогенизовано у 1 ml *TRI reagent*-а помоћу ручног хомогенизатора. Даља процедура је изведена по упутству произвођача. Хомогенати ткива су пребачени у нове епрувете запремине 1.5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубирани 5 минута на собној температури, а потом центрифугирани 10 минута на 12000 rpm на +4°C. Затим је на супернатант додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich*). Након вортексовања, узорци су инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 20 минута на 12000 rpm на +4°C. Након центрифугирања, горњи провидни слој у ком се налази РНК је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 µl хладног изопропил алкохола. Овај корак је омогућио преципитацију РНК. Узорци су благо промешани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на +4°C. Талог је опран два пута са по 1 ml хладног 70% етил алкохола. Након прања, талог РНК је осушен 5 минута на собној температури. Талог изоловане РНК је затим растворен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*). Концентрација RNA и чистоћа изолованог узорка је одређена спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280 nm помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

3.4.2. Реверзна транскрипција РНК

Процес реверзне транскрипције омогућава преписивање јендоланчане РНК у компламентарни, стабилнији молекул ДНК. Ова процедура је изведена коришћењем комерцијалног комплета *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems,*

Foster City, California, USA), по упутству произвођача. Реверзна транскрипција је изведена по следећој процедури: 10 μl узорка који садржи 2 μg укупне РНК изоловане из ткива хипокампуса инкубирано је са 10 μl главне мешавине (енгл. *master mix*).

Све процедуре су изведене на леду. Главна мешавина је садржала: 2 μl пуфера (*RT Buffer*), 0.8 μl dNTP *Mix*-а, 2 μl хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1 μl реверзне транскриптазе (*Multi ScribeTM Reverse Transcriptase*) и 3.2 μl воде која не садржи нуклеазе (*Nuclease-free H₂O*). У епрувете са изолованом РНК поменуте концентрације додата је главна мешавина, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C, након чега је реакција заустављена грејањем 5 минута на 85°C. У последњем кораку узорци су охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Овако добијена комплементарна ДНК је након тога коришћена за квантификацију експресије гена.

3.4.3. Квантификација експресије гена

Експресија гена од интереса испитивана је методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*). Реакција qRT-PCR је изведена коришћењем *Mastercycler® ep realplex* апарата (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у плочама са 96 комора (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Реакциона смеша запремине 20 μl по комори, садржала је: 2 μl узорка комплементарне ДНК, 10 μl главне мешавине (*Power SYBR Green PCR Master Mix(2x), Applied Biosystems*), 2 μl смеше парова прајмера за ген од интереса („*forward*“ и „*reverse*“) и 6 μl воде. Претходно су концентрације прајмера за испитиване гене појединачно оптимизоване. На плоче са узорцима је стављена оптичка адхезивна фолија (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), и оне су затим центрифугиране 1 минут на 3000 rpm. У складу са упутством произвођача qRT-PCR реакција је изведена у следећем температурном профилу апарата: 4 минута на 95°C, затим 60 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. На крају реакције је изведена графичка крива топљења (енгл. *Melting Curve*) по следећем протоколу: 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. За сваки испитивани узорак, есеј је изведен у трипликату. Прајмери који су коришћени за испитивање релативне експресије гена су приказани у табели (Табела 1).

Табела 1. Прајмери коришћени у qRT-PCR анализи.

	forward	reverse
β-actin	AAGATCCTGACCGAGCGTGG	CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG
Bax	CGGCGAATTGGAGATGAACTGG	CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
Bcl-2	TGTGGATGACTGACTACCTGAACC	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
Caspase-3	GTGGAACTGACGATGATATGGC	CGCAAAGTGACTGGATGAACC

Релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле је је одређена компаративном C_T (енгл. *Cycle threshold*, C_T) методом ($\Delta\Delta C_T$). Као референтни ген у односу на ког је нормализован ниво експресије анализираних гена коришћен је β -актин. За калибрацију изабран је један узорак из контролне групе који је био најприближнији средњој вредности свих узорака контролне групе. Коначан резултат приказан је у релативним јединицама као N -пута (енгл. *Fold change*) у односу на калибратор према следећој једначини:

$$N_{\text{узорка}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{\text{узорка}}} - \Delta C_{T_{\text{калибратора}}}$$

$$\Delta C_{T_{\text{узорка}}} = C_{T_{\text{узорка}}} - C_{T_{\beta\text{-актина}}}$$

$$\Delta C_{T_{\text{калибратора}}} = C_{T_{\text{калибратора}}} - C_{T_{\beta\text{-актина}}}$$

Поред релативне експресије гена, резултати су приказани и као интрацелуларни однос експресије Bax и Bcl-2. У складу са анатагонистичком улогом ова два гена у контроли апоптозе, њихов однос се интерпретира као способност ћелије да одговори на апоптотски сигнал (161-163).

3.5. Статистичка обрада добијених резултата

Статистичка обрада добијених резултата је реализована уз коришћење методологије дефинисане у претходним студијама (146-149).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Бихевиорални тестови

4.1.1. *Open field* тест

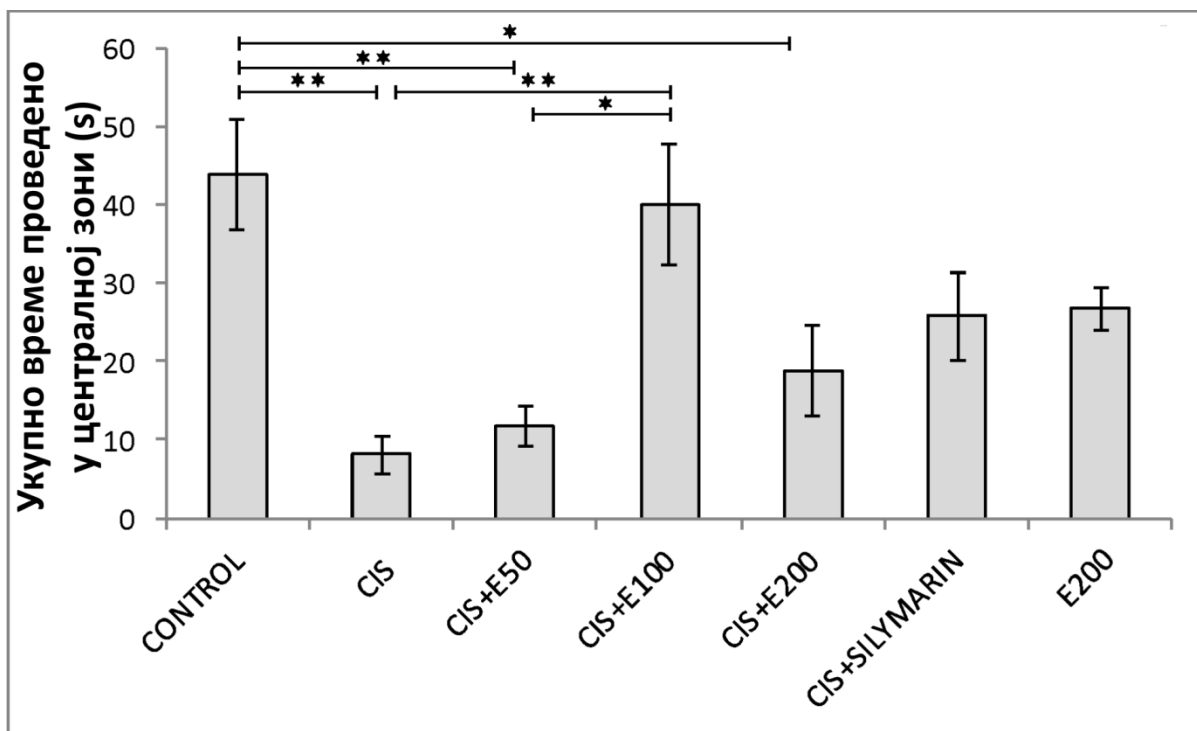
4.1.1.1. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УВЦЗ током OF теста

Протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене УВЦЗ током OF теста ($F=6.527$, $df=6$, $p<0.01$).

Као што је приказано на Слици 4.1., једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења УВЦЗ ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на смањење УВЦЗ изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$ за дозу од 50 mg/kg и $p<0.05$ за дозу од 200 mg/kg). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности УВЦЗ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Повећање вредности УВЦЗ у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групом где је симултано са цисплатином примењивана и доза од 50 mg/kg ($p<0.05$).

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, није значајно утицала на вредности УВЦЗ. Имајући у виду да је се овај параметар сматра кључним за процену степена анксиозности у тесту отвореног поља, наведени резултати дају квантитативну потврду да силимарин, примењен у истој дози као и екстракт SHL, показује слабији анксиолитики ефекат на основу резултата овог теста.



Слика 4.1. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УВЦЗ (s) током OF теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

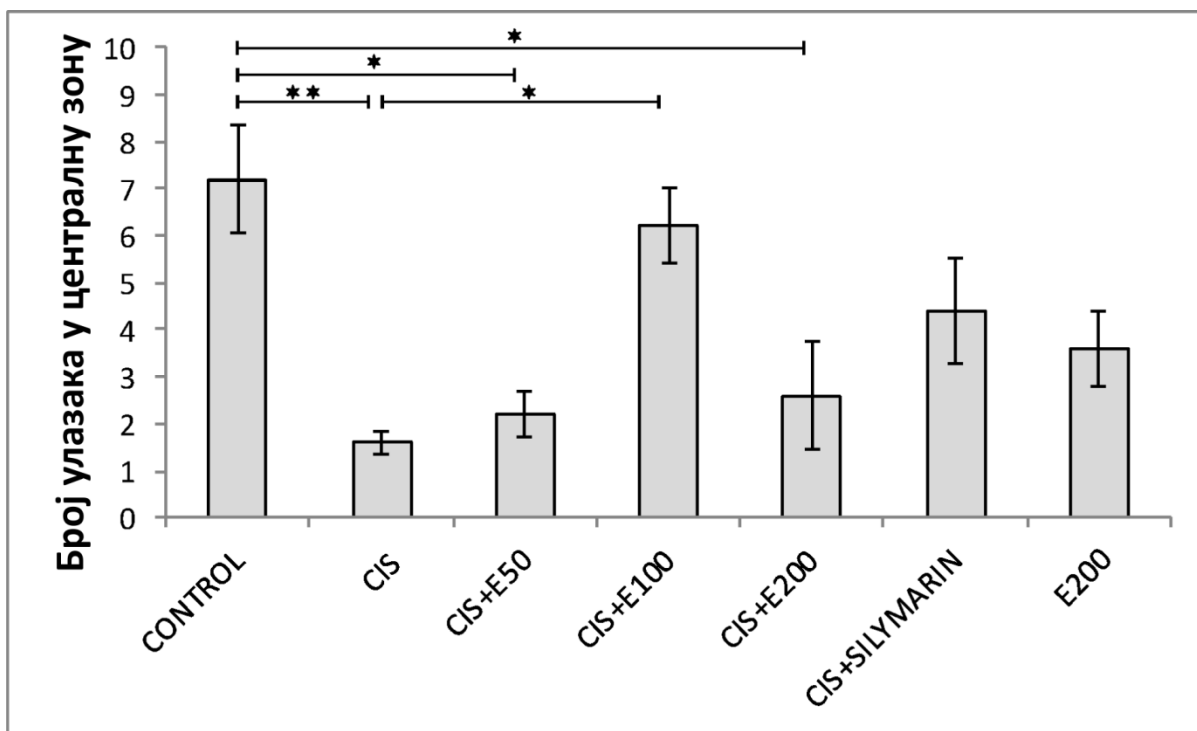
4.1.1.2. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ у централну зону током OF теста

Као што је приказано на Слици 4.2., бихевиорално испитивање спроведено у овој студији је показало да су акутни и пролонгирани протоколи спроведени у овој студији узроковали значајне промене БУ у централну зону током OF теста ($F= 5.530$, $df=6$, $p<0.01$).

Администрација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења БУЦЗ ($p<0.01$). Орална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg , при контролним условима, није утицала на вредност овог параметра у поређењу са контролним вредностима.

Резултати добијени након континуираног уноса екстракта SHL, пре и после третмана цисплатином, упућују на закључак да примена овог екстракта у најмањој и највећој дози (50 и 200 mg/kg) није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење БУЦЗ, тако да су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.05$). Насупрот томе, свакодневна орална примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности БУЦЗ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$). Иако БУЦЗ у овој групи није био статистички значајно већи од група са 50 и 200 mg/kg , вредности овог параметра се биле једнаке оствареним у контролним условима.

Примењивана као „златни стандард“ за поређење са протективним ефектима SHL, како се према подацима из литературе често користи за квантитативно детерминисање ефелата препарата са високим садржај компоненти са антиоксидантним својствима, десетодневна администрација силимарина у дози од 100 mg/kg , пре и након појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на вредности УВЦЗ.



Слика 4.2. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ у централну зону током OF теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

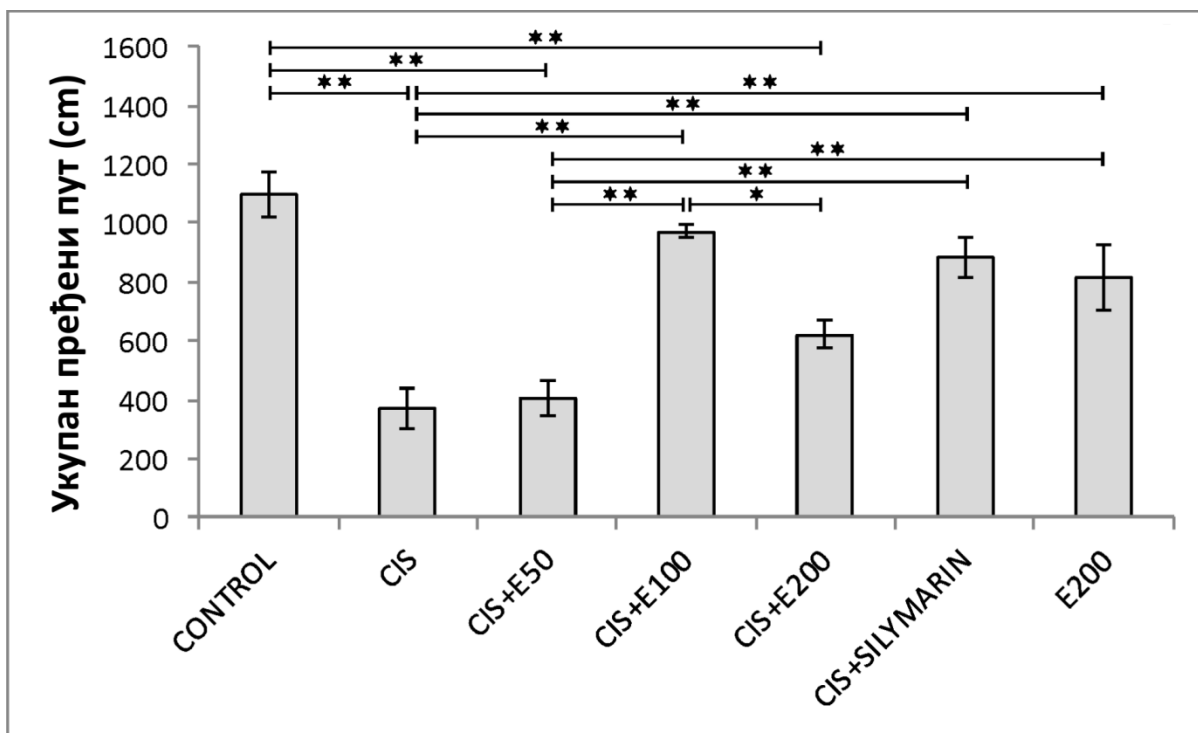
4.1.1.3. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УПП током OF теста

На Слици 4.3. су представљени ефекти протокола спроведених у овој студији, који су значајно утицали на промене УПП током OF теста ($F= 16.064$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна примена цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења УПП ($p<0.01$). Насупрот томе, континуирани орални унос екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg, током десет дана, при контролним условима, није значајно утицао на вредност овог параметра у поређењу са вредностима оствареним у контролној групи.

Свакодневна орална примена екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење УПП, што потврђује податак да су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Међутим, орална апликација екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, под истим условима (симултано са цисплатином), је за резултат имала повећање вредности УПП у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$). Снажан ефекат остварен са овом дозом се манифестовао и кроз статистички значајно повећање УПП у поређењу са групама где је екстракт SHL примењиван у дозама од 50 и 200 mg/kg ($p<0.01$ за дозу од 50 mg/kg и $p<0.05$ за дозу од 200 mg/kg).

Континуирана администрација силимарина у дози од 100 mg/kg, током десет дана (симултано са цисплатином), је показала протективни ефекат који се манифестовао кроз статистички значајно повећање УПП у поређењу са групом која је третирана искључиво цисплатином ($p<0.01$). Такође, утицај силимарина на вредност овог параметра се детектовао и преко статистички значајног повећања УПП у поређењу са групама најмањом (50 mg/kg) и највећом (200 mg/kg) дозом екстракта SHL ($p<0.01$), при чему су вредности УПП биле готово идентичне вредностима оствареним у контролној, односно групи са екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg.



Слика 4.3. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УПП (cm) током OF теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

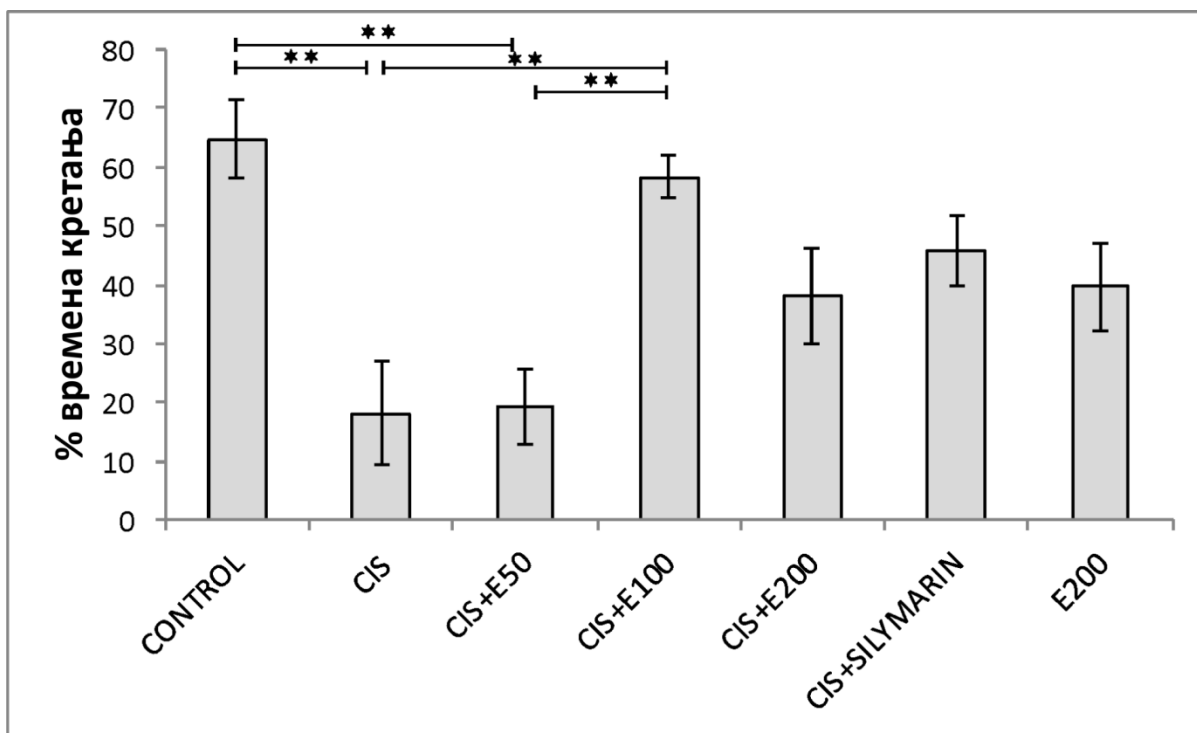
4.1.1.4. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене процента времена кретања OF теста

Као што је представљено на Слици 4.4., примењени протоколи су имали значајан утицај и на други праћени параметар локомоторне активности у OF тесту - проценат времена кретања ($F= 6.609$, $df=6$, $p<0.01$).

Апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење %ВК ($p<0.01$). Истовремено, испитивање ефеката антиоксидантне суплементације је показало да континуирани орални унос екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg , током десет дана, у контролним условима, није значајно утицао на вредност овог параметра у поређењу са контролним вредностима.

Свакодневна орална примена екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, у најмањој дози (50 mg/kg) није значајно утицала на смањење %ВК изазвано цисплатином, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Супротно томе, континуирани орални унос екстракта SHL у дозама од 100 и 200 mg/kg , под истим условима (симултано са цисплатином), је за последицу имао повећање вредности УПП, односно постизање вредности %ВК које су приближно исте контролним вредностима, при чему је %ВК у групи где је примењиван екстракт у дози од 100 mg/kg био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.01$).

Орална примена силимарина у дози од 100 mg/kg , током десет дана (симултано са цисплатином), није доводила до статистички значајних промена %ВК у поређењу са осталим групама. Анализирајући квантитавне разлике у бихевиоралним последицама примене два препарата са антиоксидантним својствима, силимарина и екстракта SHL, у истим дозама (100 mg/kg) и током истоветих експерименталних протокола, а имајући у виду да се смањење локомоторних образаца понашања у литератури сматра манифестацијом повећане анксиозности, уочава се да екстракт SHL има јачи анксиолитички ефекат од силимарина.



Слика 4.4. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене процента времена кретања током OF теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

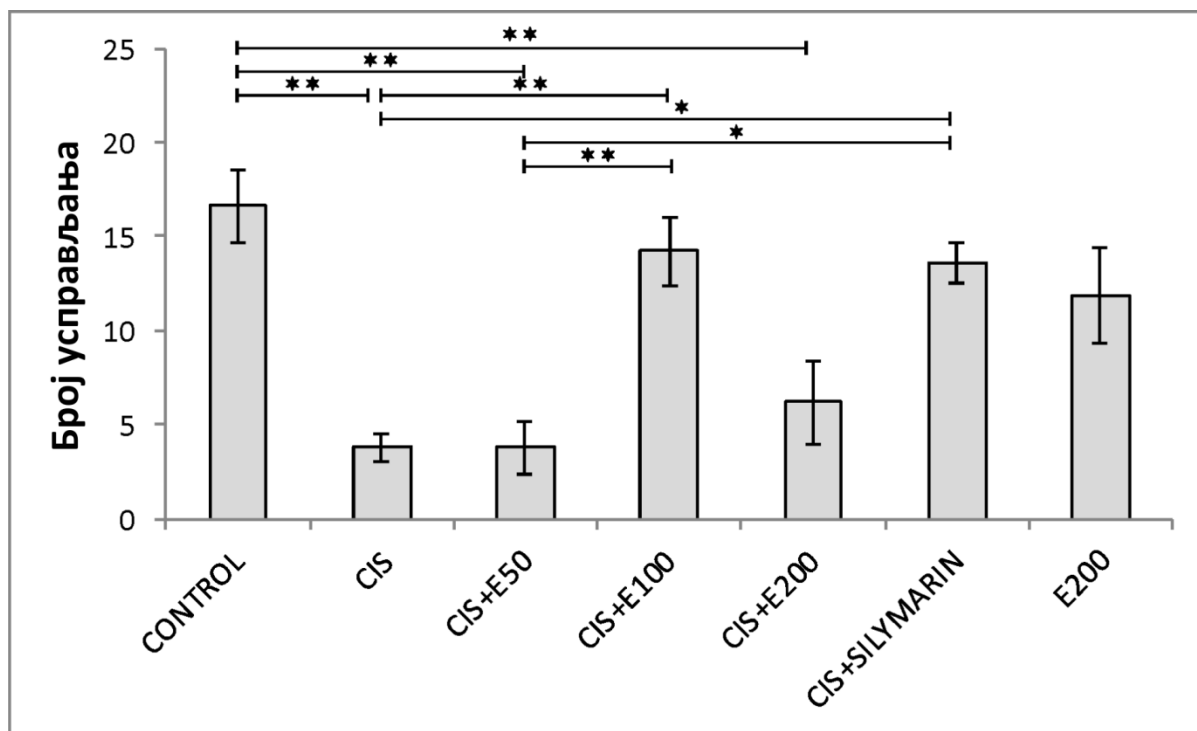
4.1.1.5. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ у OF тесту

На Слици 4.5. се приказани ефекти протокола спроведених у овој студији на БУ у OF тесту, за које је потврђено да су имали значајан утицај на вредност овог показатеља експлоративне активности ($F= 8.980$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна администрација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење БУ ($p<0.01$). Међутим, антиоксидантна суплементација која је у контролним условима спровођена континуираним оралним уносом екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg, током десет дана, није самостално показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са контролом.

Десетодневна орална администрација екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине у најмањој (50 mg/kg), као и у највећој примењеној дози (200 mg/kg), није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење експлоративне активности које је квантификовано преко БУ, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). За разлику од тога, континуирани орални унос екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, под истим условима (симултано са цисплатином), је доводио до повећања експлоративне активности код животиња третираних цисплатином, односно постизање вредности БУ које су сличне контролним вредностима. БУ у групи са дозом екстракта SHL од 100 mg/kg је био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.01$).

Силимарин, који се често примењује као „златни стандард“ за квантификацију ефеката препарата са антиоксидантним својствима, након десетодневне адмистрације у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је показао ефекте сличне екстракту SHL у дози од 100 mg/kg, који се манифестовао кроз анулирање смањења експлоративне активности у поређењу са групама третираним цисплатином самостално и уз симултану администацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.05$), уз постизање вредности БУ које су приближно једнаке контролним, односно вредностима у групи са екстраком SHL у дози од 100 mg/kg.



Слика 4.5. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ током OF теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.1.2. *Elevetad plus maze* тест

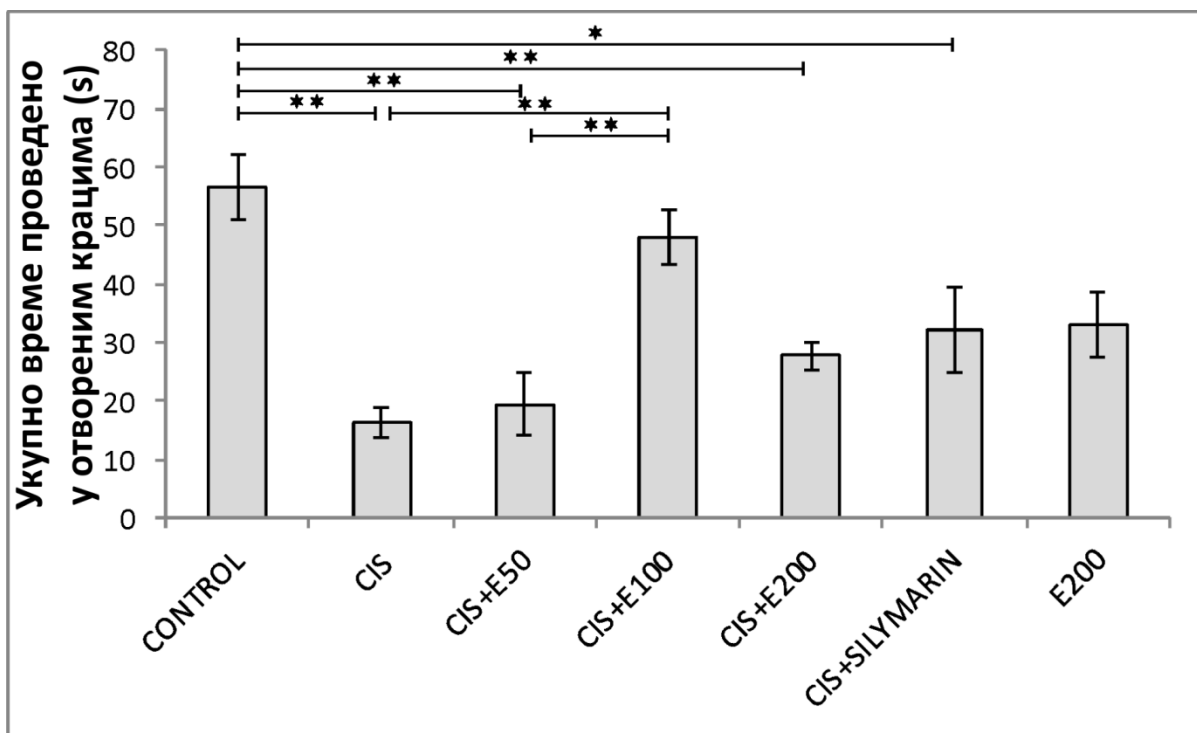
4.1.2.1. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УВОК током ЕРМ теста

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су доводили до значајне промене УВОК током ЕРМ теста ($F=8.204$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је, као што је приказано на Слици 4.6., доводила до значајног смањења УВОК ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Резултати добијени у тесту уздигнутог крстастог лавиринта, такође, показују и да је симултана администрација екстракта SHL са цисплатином показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на смањење УВОК изазвано цисплатином. Вредности овог параметра су обе наведене експерименталне групе остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg током десет дана, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности УВОК у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Повећање вредности УВОК у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу где је симултано са цисплатином примењивана и доза од 50 mg/kg ($p<0.01$).

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, није значајно утицала на промену вредности (смањење) УВОК узроковано цисплатином, тако да је вредност овог параметра остала значајно мања у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.05$).



Слика 4.6. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УВОК (s) током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

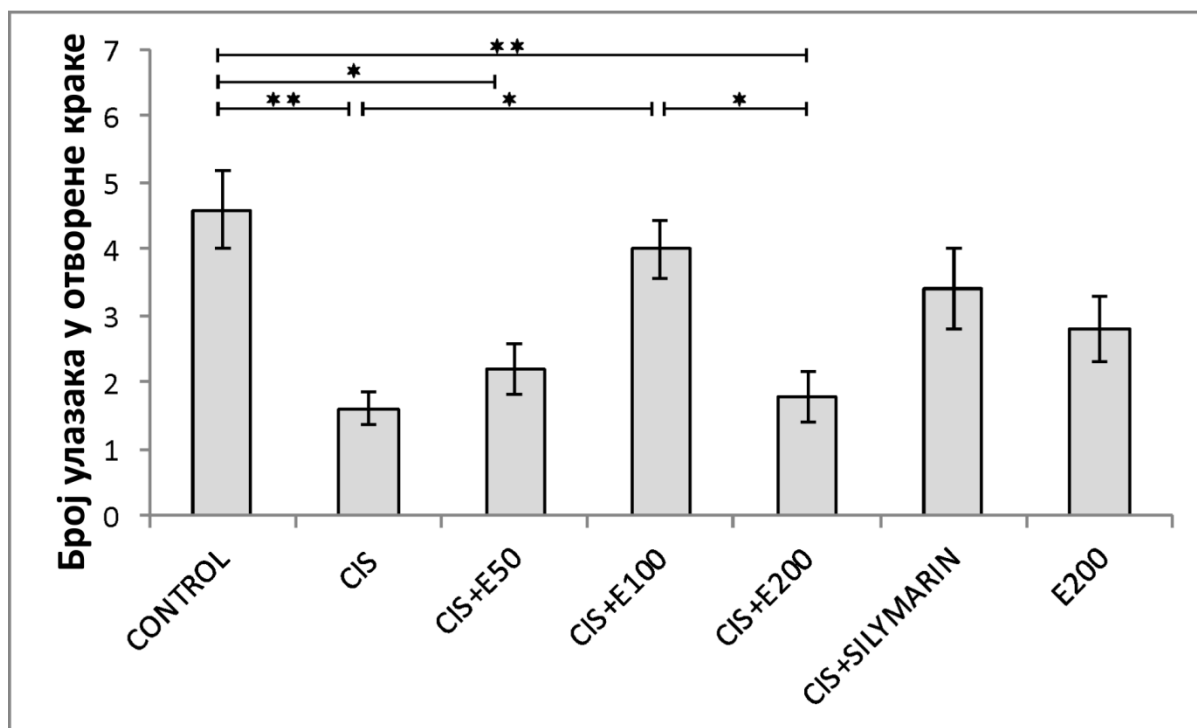
4.1.2.2. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ у отворене краке током ЕРМ теста

Као што је приказано на Слици 4.7., акутни и пролонгирани протоколи спроведени у овој студији су за последицу имали значајне промене БУ у отворене краке током ЕРМ теста ($F= 6.027$, $df=6$, $p<0.01$).

Администрација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења БУОК ($p<0.01$). С друге стране, орална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg током десет узастопних дана, при контролним условима, није утицала на вредност овог параметра у поређењу са контролним вредностима.

Континуирани десетодневни унос екстракта SHL, пре и после третмана цисплатином, је указао да примена екстракта у најмањој и највећој дози (50 и 200 mg/kg) није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење БУОК, тако да су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.05$ за дозу од 50 mg/kg и $p<0.01$ за дозу од 200 mg/kg). Насупрот томе, свакодневна орална примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности БУЦЗ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$). Иако БУОК у овој групи није био статистички значајно већи него у групи са 50 mg/kg, вредности овог параметра се биле једнаке оствареним у контролним условима. Интересантно је да је БУОК у групи са применом екстракта SHL у дози од 100 mg/kg био значајно већи него у групи где је, симултано са администрацијом цисплатине, десетодневна антиоксидантна суплементација спровођена уз примену двоструко веће дозе (200 mg/kg) екстракта SHL ($p<0.05$).

Примењивана као „златни стандард“ за поређење са протективним ефектима SHL, десетодневна администрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на вредности УВЦЗ, што се може окарактерисати и као слабији анксиолитички ефекат у поређењу са бихевиоралним последицама примене екстракта SHL у истој дози.



Слика 4.7. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ у отворене краке током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

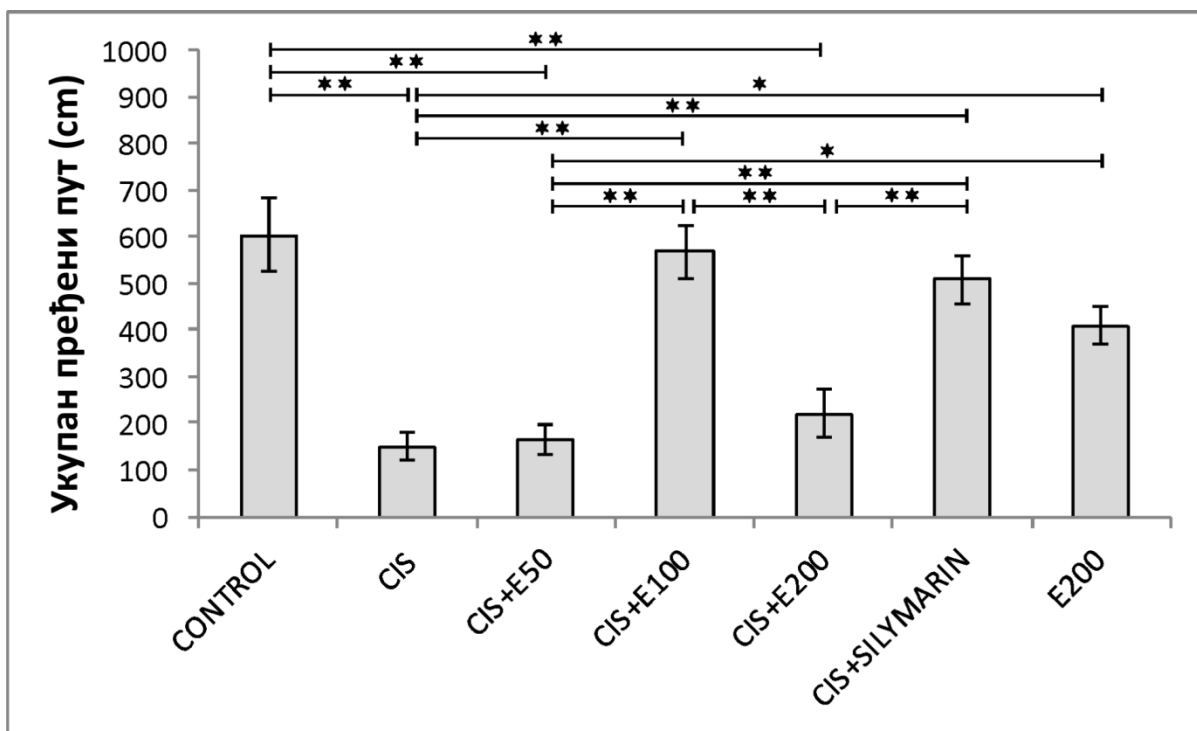
4.1.2.3. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УПП током ЕРМ теста

На Слици 4.8. су представљени ефекти протокола спроведених у овој студији, који су значајно утицали на промене локомоторних карактеристика прећених преко УПП током ЕРМ теста ($F= 14.693$, $df=6$, $p<0.01$).

Примењена петог дана протокола, једнократна апликације цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења УПП ($p<0.01$). За разлику од тога, континуирани орални унос екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg, током десет дана, при контролним условима, није значајно утицао на вредност овог параметра у поређењу са вредностима оствареним у контролној групи.

Свакодневна орална примена екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење УПП, што потврђује податак да су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Међутим, орална апликација екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, под истим условима (симултано са цисплатином), је за резултат имала повећање вредности УПП у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$). Снажан ефекат остварен са овом дозом се манифестовао и кроз статистички значајно повећање УПП у поређењу са групама где је екстракт SHL примењиван у дозама од 50 и 200 mg/kg ($p<0.01$).

Континуирана администрација силимарина у дози од 100 mg/kg, током десет дана (симултано са цисплатином), је показала протективни ефекат који се манифестовао кроз статистички значајно повећање УПП у поређењу са групом која је третирана искључиво цисплатином ($p<0.01$). Такође, утицај силимарина на вредност овог параметра се детектовао и преко статистички значајног повећања УПП у поређењу са групом у којој је примењивана највећа доза (200 mg/kg) екстракта SHL ($p<0.01$), при чему су вредности УПП биле готово идентичне вредностима оствареним у контролној, односно групи са екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg.



Слика 4.8. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УПП (cm) током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

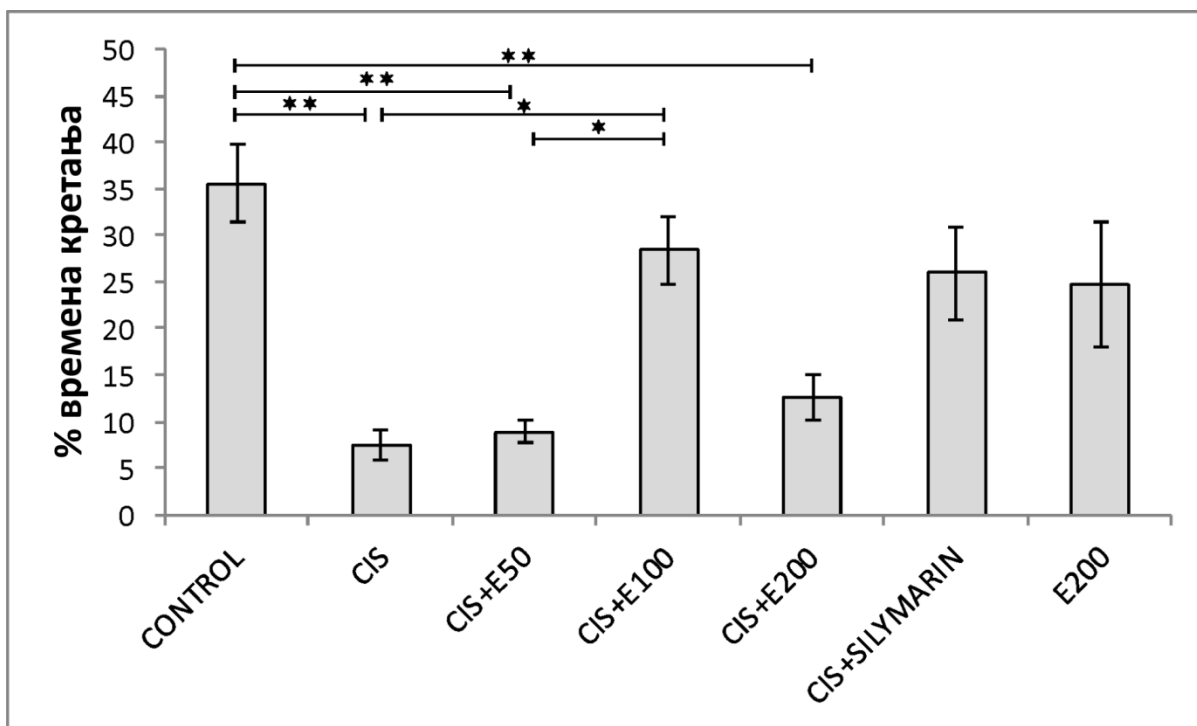
4.1.2.4. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене процента времена кретања у ЕРМ тесту

Као што је представљено на Слици 4.9., експериментални протоколи примењени у овој студији су имали значајан утицај и на други праћени параметар локомоторне активности у ЕРМ тесту - проценат времена кретања ($F= 7.441$, $df=6$, $p<0.01$).

Апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење %ВК у тесту уздигнутог крстастог лавиринта ($p<0.01$). Истовремено, испитивање ефеката антиоксидантне суплементације је показало да континуирани десетодневни орални унос екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg, у контролним условима, није значајно утицао на вредност овог параметра у поређењу са контролним вредностима.

Свакодневна орална примена екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине, у најмањој дози (50 mg/kg) и највећој дози (200 mg/kg) није значајно утицала на смањење %ВК изазвано цисплатином, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Супротно томе, континуирани орални унос екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, под истим условима (симултано са цисплатином), је за последицу имао повећање вредности УПП, односно постизање вредности %ВК које су приближно исте контролним вредностима, при чему је %ВК био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.05$).

Орална примена силимарина у дози од 100 mg/kg, током десет дана (симултано са цисплатином), није доводила до статистички значајних промена %ВК у поређењу са осталим групама. И овде, анализирајући квантитавне разлике у бихевиоралним последицама примене два препарата са антиоксидантним својствима, силимарина и екстракта SHL, у истим дозама (100 mg/kg) и током истоветих експерименталних протокола, а имајући у виду да се смањење локомоторних образаца понашања у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (као и тесту отвореног поља) сматра манифестацијом повећане анксиозности, примећује се да екстракт SHL показује јачи анксиолитички ефекат од силимарина.



Слика 4.9. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене процента времена кретања током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

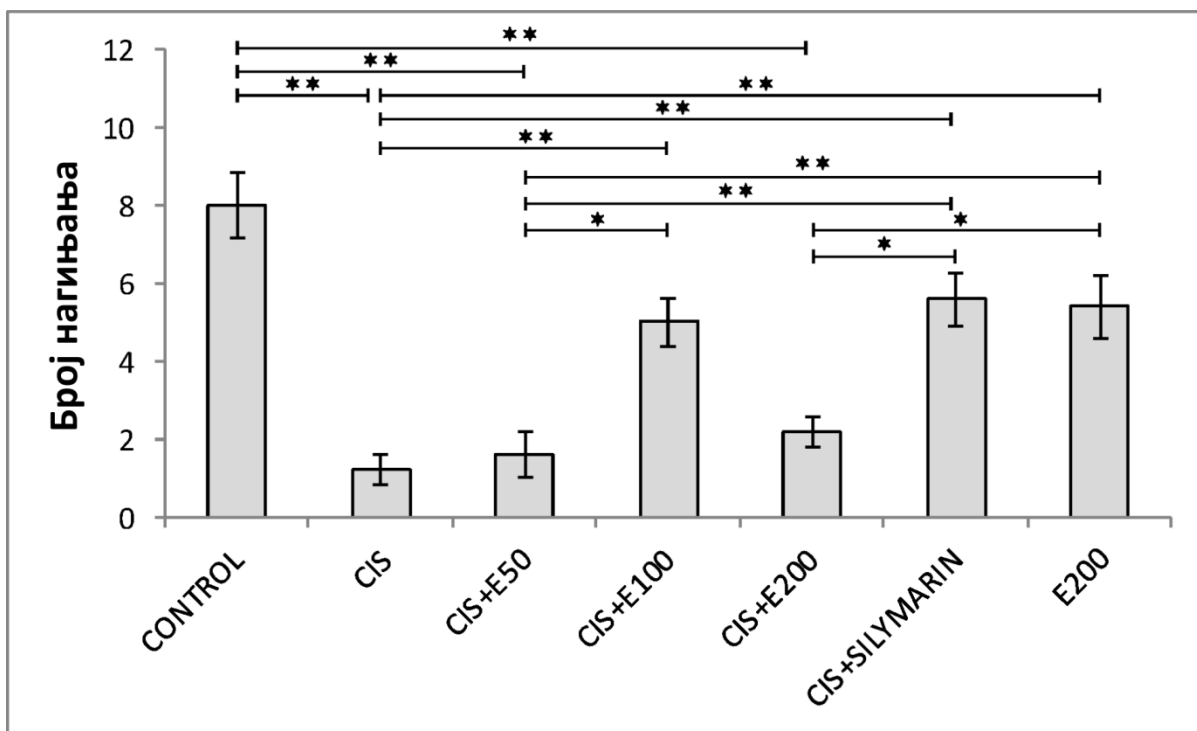
4.1.2.5. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БН у ЕРМ тесту

На Слици 4.10. се приказани ефекти протокола спроведених у овој студији на БН у ЕРМ тесту, за које је потврђено да су имали значајан утицај на вредност овог показатеља експлоративне активности ($F= 15.590$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна администрација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење БН ($p<0.01$). Међутим, антиоксидантна суплементација која је у контролним условима спровођена континуираним оралним уносом екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg , током десет дана, није самостално показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са контролном групом.

Десетодневна орална администрација екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине у најмањој (50 mg/kg), као и у највећој примењеној дози (200 mg/kg), није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење експлоративне активности које је квантификовано преко броја нагињања, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). За разлику од тога, континуирани орални унос екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , под истим условима (симултано са цисплатином), је доводио до повећања експлоративне активности код животиња третираних цисплатином, односно постизање вредности БН које су сличне контролним вредностима. Број нагињања у групи са дозом екстракта SHL од 100 mg/kg је био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.05$).

Силимарин, који се често примењује као „златни стандард“ за квантификацију ефеката препарата са антиоксидантним својствима, након десетодневне адмистрације у дози од 100 mg/kg , пре и након поједначне дозе цисплатине, је показао ефекте сличне екстракту SHL у дози од 100 mg/kg , који се манифестовао кроз анулирање смањења експлоративне активности у поређењу са групама третираним цисплатином самостално и уз симултану администацију екстракта SHL у дозама од 50 mg/kg ($p<0.01$) и 200 mg/kg ($p<0.05$), уз постизање вредности БН које су приближно једнаке контролним, односно вредностима у групи са екстраком SHL у дози од 100 mg/kg .



Слика 4.10. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БН током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

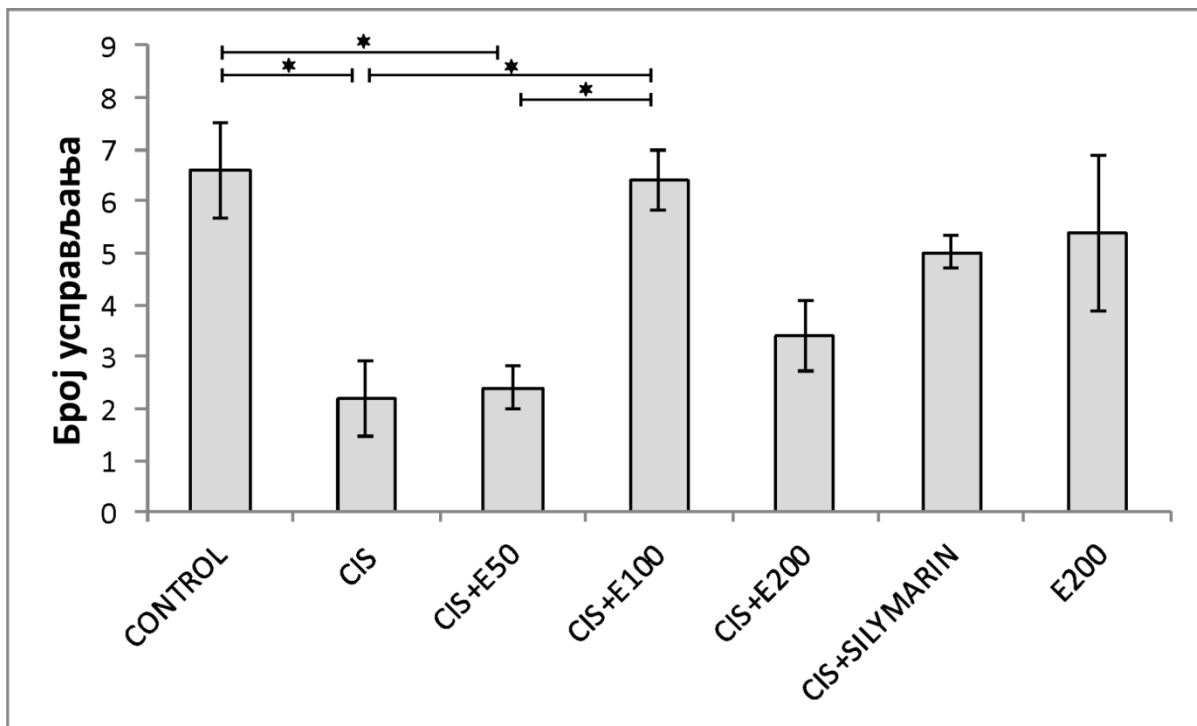
4.1.2.6. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ током ЕРМ теста

На Слици 4.10. се приказани ефекти протокола спроведених у овој студији на БУ у ЕРМ тесту, за које је потврђено да су имали значајан утицај на вредност овог показатеља експлоративне активности ($F= 4.920$, $df=6$, $p<0.05$).

Једнократна администрација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење БУ ($p<0.05$). Међутим, антиоксидантна суплементација која је у контролним условима спровођена континуираним оралним уносом екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg , током десет дана, није самостално показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са контролном групом.

Десетодневна орална администрација екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине у најмањој (50 mg/kg), као и у највећој примењеној дози (200 mg/kg), није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење експлоративне активности које је квантификовано преко БУ, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.05$). За разлику од тога, континуирани орални унос екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , под истим условима (симултано са цисплатином), је доводио до повећања експлоративне активности код животиња третираних цисплатином, односно постизање вредности БУ које су сличне контролним вредностима. БУ у групи са дозом екстракта SHL од 100 mg/kg је био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.05$).

Силимарин, који се често примењује као „златни стандард“ за квантификацију ефеката препарата са антиоксидантним својствима, након десетодневне адмистрације у дози од 100 mg/kg , пре и након поједначне дозе цисплатине, није изазвао значајне промене овог модалитета експлоративне активности који се уочава како у отвореним, тако и у затвореним крацима уздигнутог крстастог лавиринта. Такав податак се са квантитативног аспекта може тумачити и као слабији анксиолитички силимарина ефекат у поређењу са истом дозом екстракта SHL, имајући у виду да је смањење експлоративне активности директно пропорционално повећању степена анксиозности.



Слика 4.11. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БУ током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05.

4.1.2.7. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене ТЕА епизода током ЕРМ теста

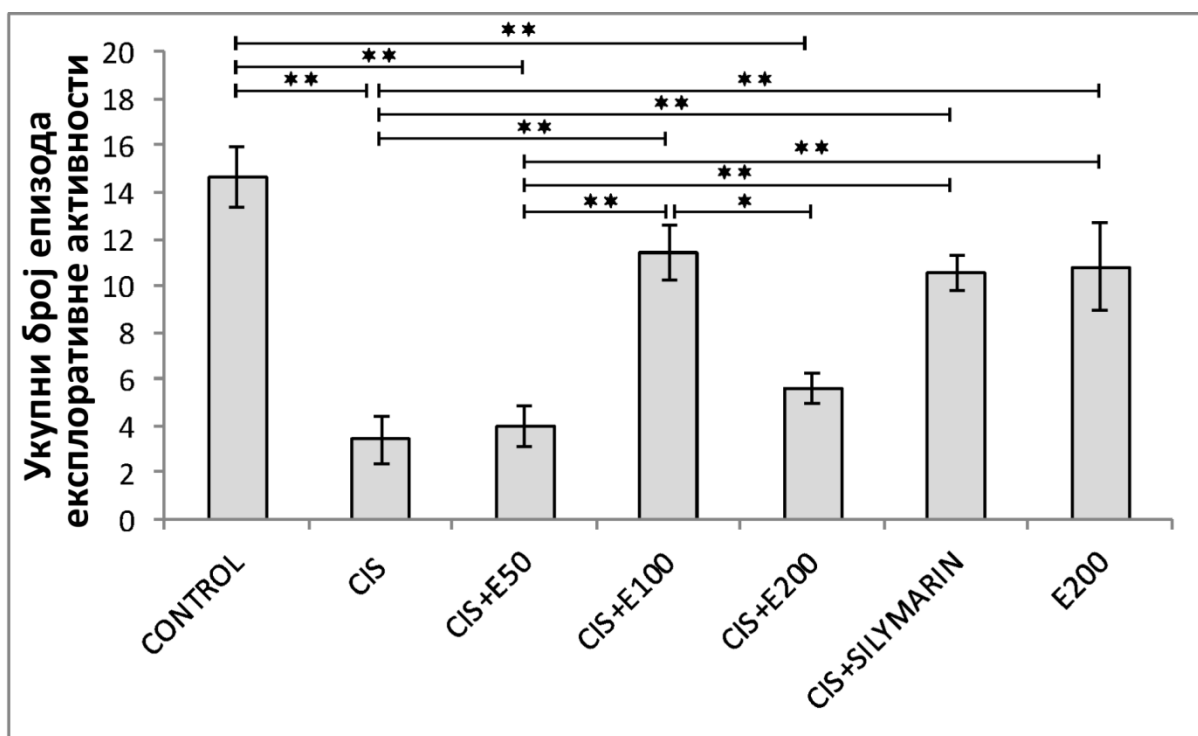
На Слици 4.10. се приказани ефекти протокола спроведених у овој студији на укупни број ТЕА епизода током ЕРМ теста, за које је потврђено да су имали значајан утицај на вредност овог показатеља експлоративне активности ($F= 13.437$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна администрација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је узроковала значајно смањење УБЕЕА ($p<0.01$). Међутим, антиоксидантна суплементација која је у контролним условима спровођена континуираним оралним уносом екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg , током десет дана, није самостално показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са контролном групом.

Десетодневна орална администрација екстракта SHL, пет дана пре и пет дана након администрације појединачне дозе цисплатине у најмањој (50 mg/kg), као и у највећој примењеној дози (200 mg/kg), није значајно утицала на цисплатином узроковано смањење експлоративне активности које је квантификовано преко укупног броја епизода експлоративне активности, па су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). За разлику од тога, континуирани орални унос екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , под истим условима (симултано са цисплатином), је доводио до повећања експлоративне активности код животиња третираних цисплатином, односно постизање вредности УБЕЕА које су сличне контролним вредностима. Укупни броја епизода експлоративне активности у групи са дозом екстракта SHL од 100 mg/kg је био статистички значајно већи у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине, односно након примене цисплатине уз симултану администрацију екстракта SHL у дозама од 50 mg/kg ($p<0.01$) и 200 mg/kg ($p<0.05$).

Силимарин, који се често примењује као „златни стандард“ за квантификацију ефеката препарата са антиоксидантним својствима, након десетодневне администрације у дози од 100 mg/kg , пре и након појединачне дозе цисплатине, је показао ефекте сличне екстракту SHL у дози од 100 mg/kg , који се манифестовао кроз анулирање смањења укупног броја епизода експлоративне активности у поређењу са групама третираним цисплатином самостално и уз симултану администрацију екстракта SHL у дози од 50 mg/kg

($p < 0.01$), уз постизање вредности БН које су приближно једнаке контролним, односно вредностима у групи са екстраком SHL у дози од 100 mg/kg.



Слика 4.12. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене укупног броја ТЕА епизода током ЕРМ теста. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.3. *Tail suspension* тест

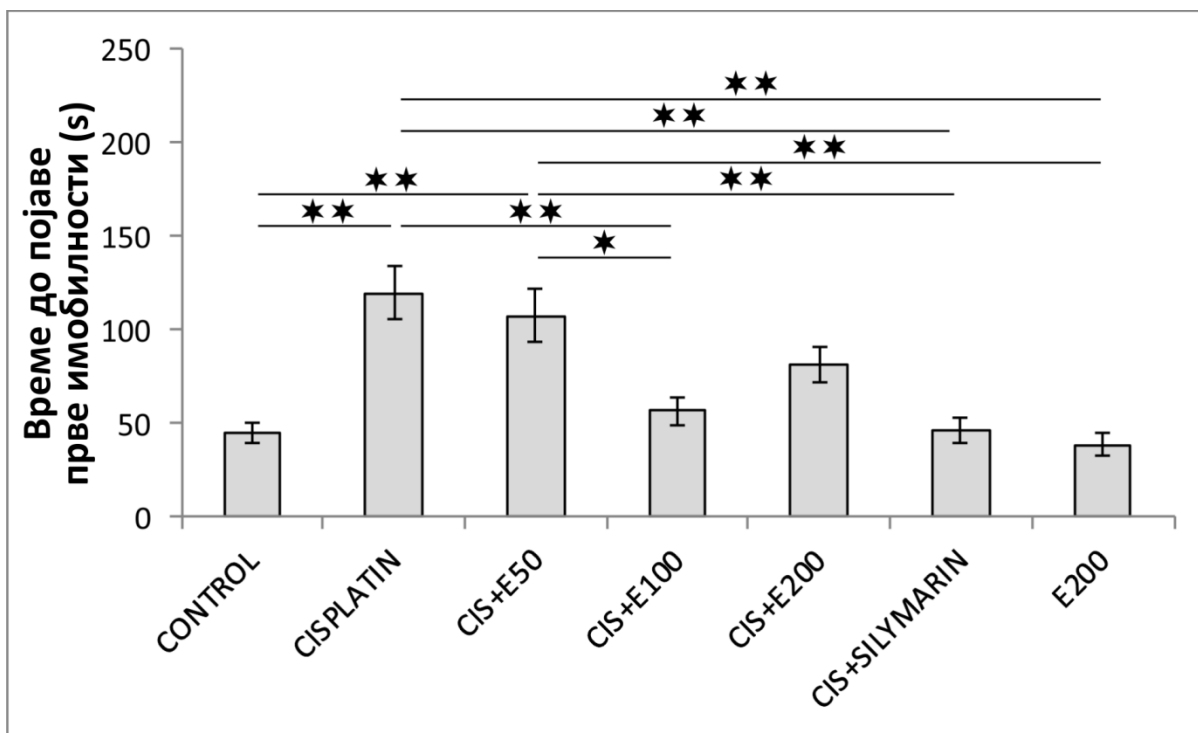
4.1.3.1. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене ВПИ у TST

Протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене ВПИ у TST ($F=11.539$, $df=6$, $p<0.01$).

Као што је приказано на Слици 4.13., једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног повећања ВПИ ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на повећање ВПИ изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра остале значајно веће у поређењу са контролним вредностима за дозу од 50 mg/kg ($p<0.01$), док за дозу од 200 mg/kg повећање вредности овог параметра није било статистички значајно у односу на контролу. Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до смањења вредности ВПИ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Смањење вредности ВПИ у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групом где је симултано са цисплатином примењивана и доза екстракта SHL од 50 mg/kg ($p<0.05$).

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је значајно смањивала вредност ВПИ чије је повећање било узроковано једнократном дозом цисплатине од 7.5 mg/kg ($p<0.01$). Попут екстракта SHL у истоветној дози, антиоксидантна суплементација силимарином је доводила до значајној смањења ВПИ и поређењу са групом у којој је, симултано са цисплатином, примењиван и екстракт SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.01$).



Слика 4.13. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене ВПИ (s) у TST. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

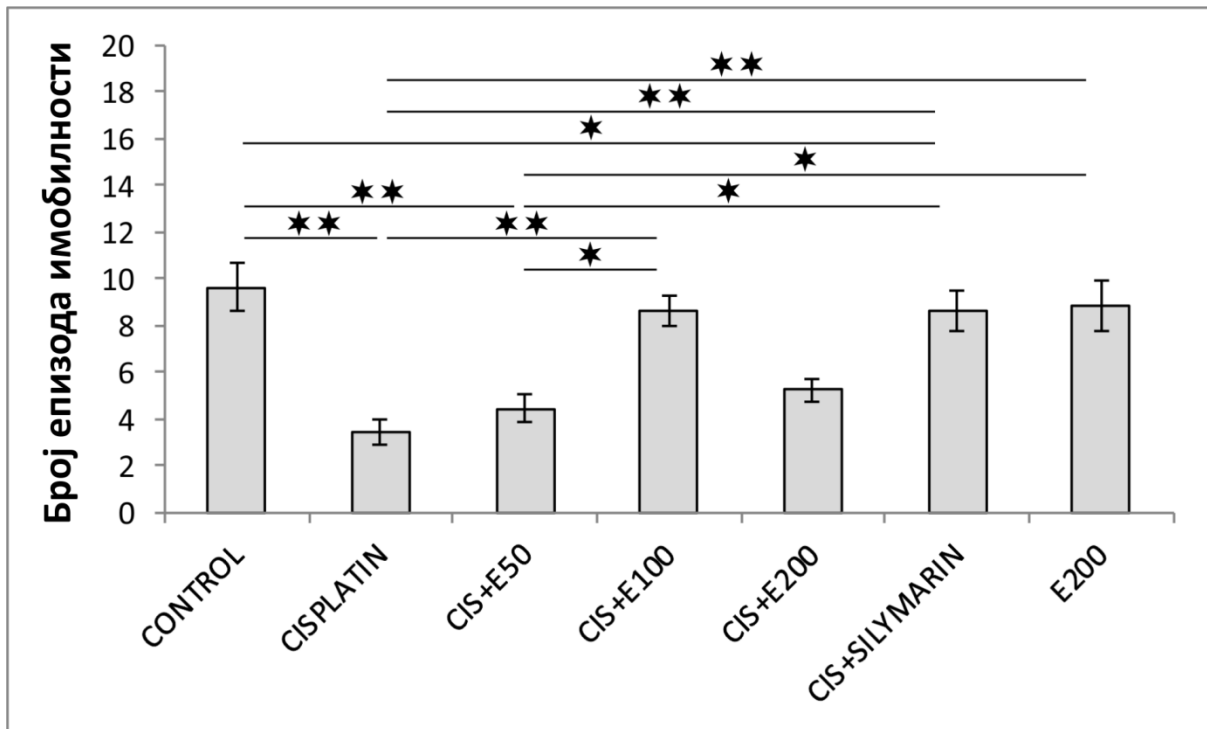
4.1.3.2. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БЕИ у TST

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене БЕИ у TST ($F=10.137$, $df=6$, $p<0.01$).

Као што је приказано на Слици 4.14., једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења БЕИ ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg током десет дана није значајно утицала на смањење БЕИ изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима, како за дозу од 50 mg/kg ($p<0.01$), тако и за дозу од 200 mg/kg ($p<0.05$). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједначне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности БЕИ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Повећање вредности БЕИ у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групом где је симултано са цисплатином примењивана и доза екстракта SHL од 50 mg/kg ($p<0.05$), док је ово повећање било статистички инсигнификантно у поређењу са групом где је примењивана доза екстракта SHL од 200 mg/kg.

Десетодневна администрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједначне дозе цисплатине, је значајно повећавала вредност БЕИ чије је смањење било узроковано једнократном дозом цисплатине од 7.5 mg/kg ($p<0.01$). Попут екстракта SHL у истоветној дози, антиоксидантна суплементација силимарином је доводила до значајној повећања ВПИ и поређењу са групом у којој је, симултано са цисплатином, примењиван и екстракт SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.05$).



Слика 4.14. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене БЕИ у TST. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

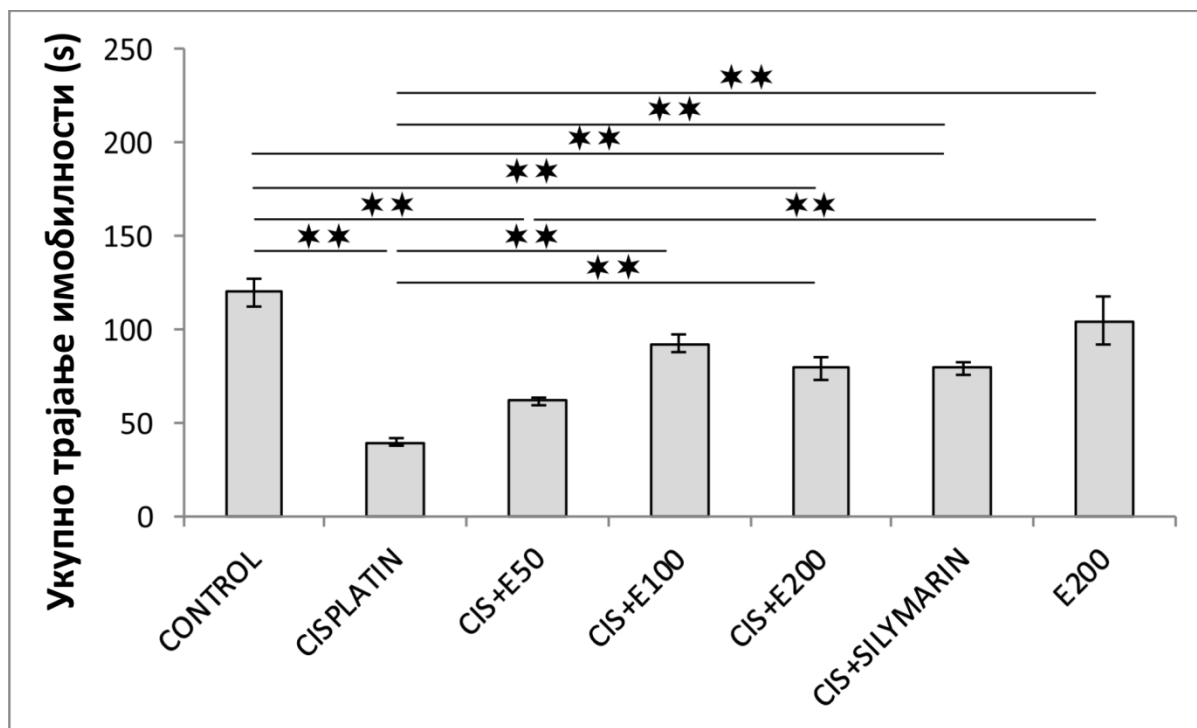
4.1.3.3. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УТИ у TST

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене УТИ у TST ($F=16.271$, $df=6$, $p<0.01$).

Као што је приказано на Слици 4.15., једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења УТИ ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg током десет дана није значајно утицала на смањење УТИ изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима, како за дозу од 50 mg/kg, тако и за дозу од 200 mg/kg ($p<0.01$). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до повећања вредности УТИ у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Повећање вредности УТИ у групи са дозом од 100 mg/kg је није било статистички значајно и у поређењу са групама где је симултано са цисплатином примењивана и доза екстракта SHL од 50 и 200 mg/kg.

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је значајно повећавала вредност УТИ чије је смањење било узроковано једнократном дозом цисплатине од 7.5 mg/kg ($p<0.01$). Ипак, како се силимарин користи као „златни стандард“ за квантитативну компарацију ефеката препарата са значајним садржајем антиоксидантних компоненти, значајно је напоменути да симултана примена силимарина, за разлику од екстракта SHL у истој дози, није била довољна да се УТИ повећа до нивоа вредности које су остварене у контролној групи ($p<0.01$).



Слика 4.15. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене УТИ (s) у TST. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампуса

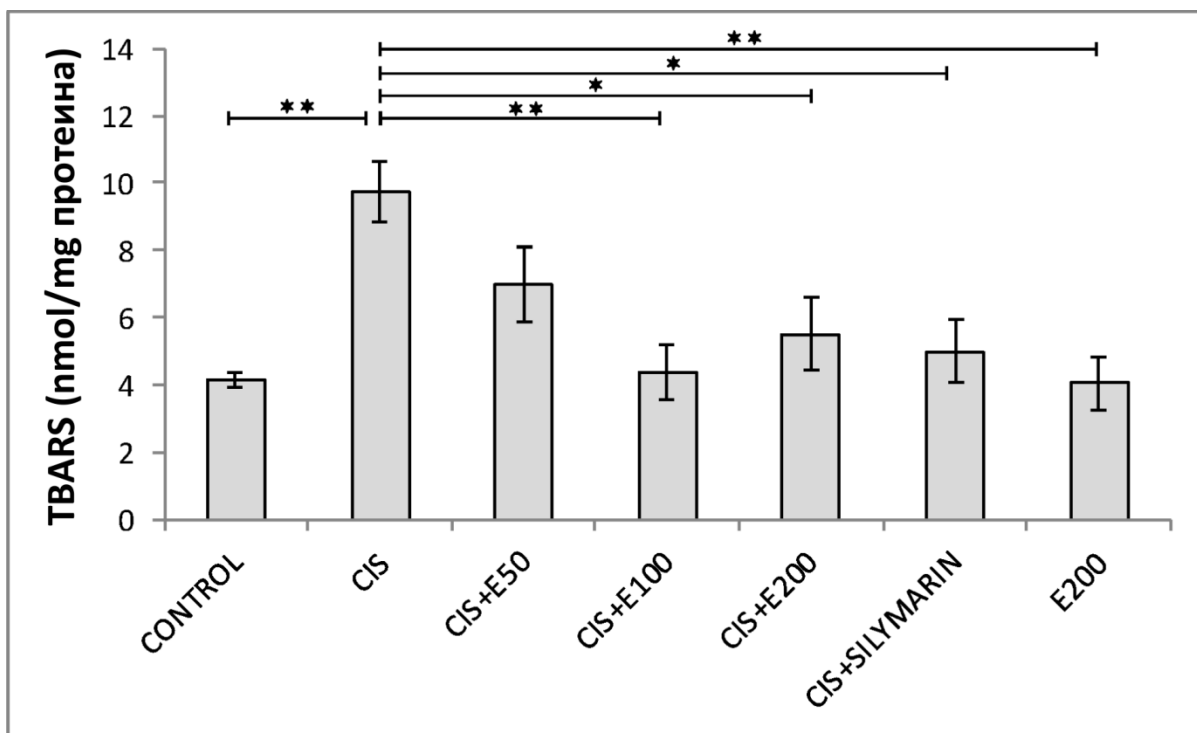
4.2.1. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене индекса липидне пероксидације у ткиву хипокампуса

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене индекса липидне пероксидације израженог као TBARS ($F=5.400$, $df=6$, $p<0.01$).

Као што је приказано на Слици 4.16., једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног повећања TBARS ($p<0.01$). Десетодневна самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на овај квантитативни показатељ липидне пероксидације у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дози од 50 mg/kg, пет дана пре и пет дана након апликације појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на повећање TBARS изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дозама од 100 и 200 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до смањења овог индикатора липидне пероксидације у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$ за дозу од 100 mg/kg и $p<0.05$ за дозу од 200 mg/kg), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Вредности TBARS у групама са различитим дозама екстракта SHL примењиваног симултано са цисплатином се нису међусобно статистички значајно разликовале.

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је значајно смањивала вредности TBARS повећане услед третмана цисплатином ($p<0.05$). Наведени резултати дају квантитативну потврду да силимарин, примењен у истој дози као и екстракт SHL, показује нешто слабији протективни ефекат на превенцију повећања липидне пероксидације у ткиву хипокампуса.



Слика 4.16. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене индекса липидне пероксидације израженог као TBARS (nmol/mg протеина) у ткиву хипокамуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

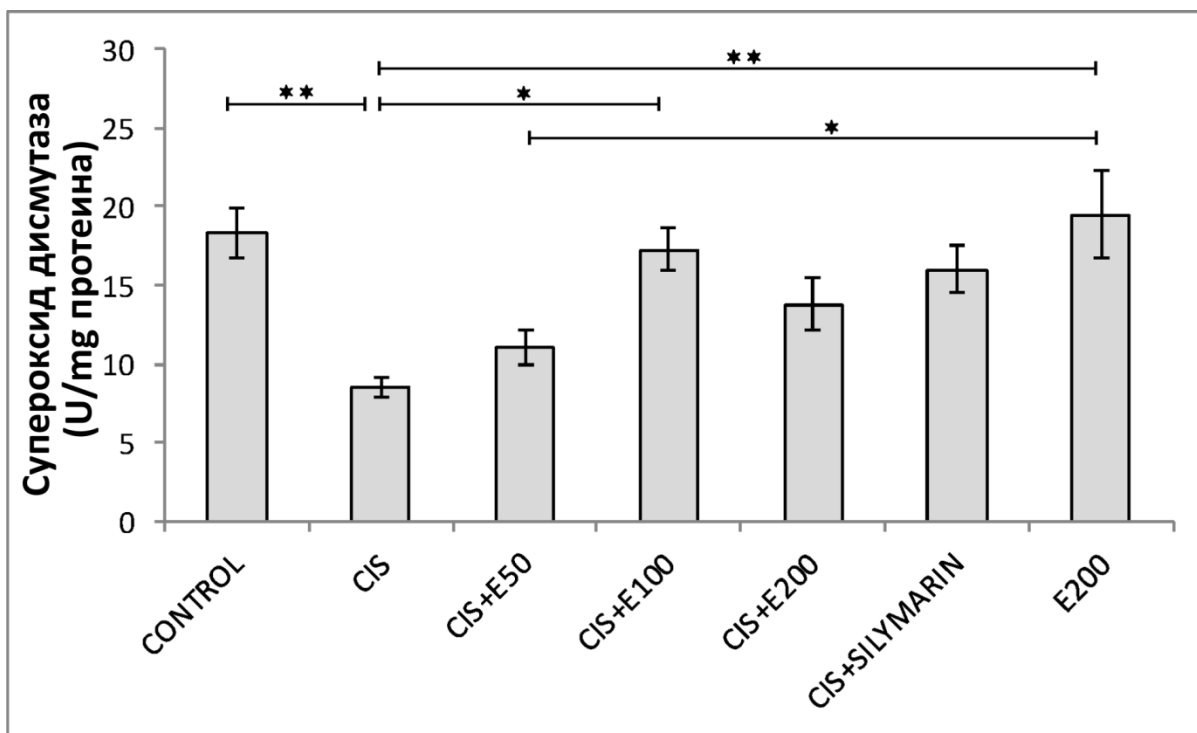
4.2.2. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса

Десетодневни протоколи спроведени у овој студији су доводили до значајних промена активности супероксид дисмутазе у ткиву хипокампуса ($F=6.103$, $df=6$, $p<0.01$).

Апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.), Слика 4.17., је доводила до значајног активности SOD ($p<0.01$). Континуирана самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) током десет дана није утицала на квантитативни показатељ активности овог антиоксидантног ензима у поређењу са контролном групом.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg , пет дана пре и пет дана након апликације појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на смањење активности SOD у хипокампусу изазвано цисплатином, иако се вредности овог параметра антиоксидантне заштите нису значајно разликовале у поређењу са контролним вредностима. Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , пре и након појединачне дозе цисплатине, је доводила до повећања активности SOD у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.05$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Активност SOD у групама са различитим дозама екстракта SHL примењиваног симултано са цисплатином се нису међусобно статистички значајно разликовале.

Десетодневна администрација силимарина у дози од 100 mg/kg , пре и након појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на активност SOD чак ни након смањења изазваног третманом цисплатином. Анализирајући квантитавне разлике у последицама примене два препарата са антиоксидантним својстима, силимарина и екстракта SHL, у истим дозама (100 mg/kg) и током истоветих експерименталних протокола, а имајући у виду да се смањење активности SOD сматра потенцијалним механизмом настанка оксидативног оштећења, примећује се да екстракт SHL показује јачи антиоксидантни ефекат од силимарина.



Слика 4.17. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене активности супероксид дисмутаза (U/mg протеина) у ткиву хипокамуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

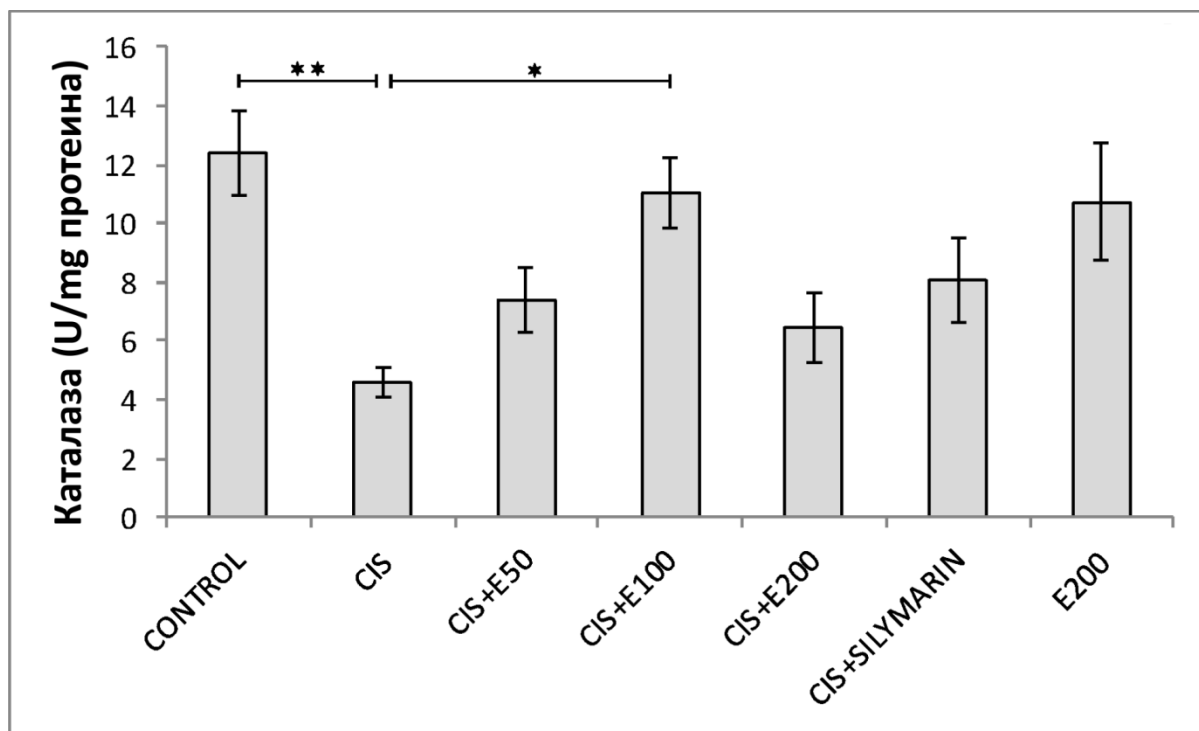
4.2.3. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене активности каталазе у ткиву хипокампуса

Резултати ове студије показују да су спроведени десетодневни експериментални протоколи доводили до значајних промена активности каталазе у ткиву хипокампуса ($F=4.396$, $df=6$, $p<0.01$).

Апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.), као што је приказано на Слици 4.19., је доводила до значајног активности САТ у ткиву хипокампуса ($p<0.01$). Континуирана самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално, у води за пиће) током десет дана није утицала на квантитативни показатељ активности овог антиоксидантног ензима у поређењу са контролном групом.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg , пет дана пре и пет дана након апликације појединачне дозе цисплатине, није значајно утицала на смањење активности каталазе у хипокампусу изазвано цисплатином, иако се вредности овог параметра антиоксидантне заштите нису значајно разликовале у поређењу са контролним вредностима. Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg , пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до повећања активности САТ у поређењу са вредностима за активност овог антиоксидантног ензима добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.05$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Активност SOD у групама са различитим дозама екстракта SHL примењиваног пре и после третмана цисплатином се нису међусобно статистички значајно разликовале.

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg , пре и након поједничне дозе цисплатине, није значајно утицала на активност САТ чак ни након смањења изазваног третманом цисплатином. Упоређујући квантитавне разлике у последицама примене два препарата са антиоксидантним својстима, силимарина и екстракта SHL, у истим дозама (100 mg/kg) и током истоветих експерименталних протокола, а имајући у виду да се смањење активности антиоксидантних ензима, попут каталазе, сматра потенцијалним механизмом настанка оксидативног оштећења, примећује се да екстракт SHL показује јачи антиоксидантни ефекат од силимарина.



Слика 4.18. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене активности каталазе (U/mg протеина) у ткиву хипокамуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.2.4. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса

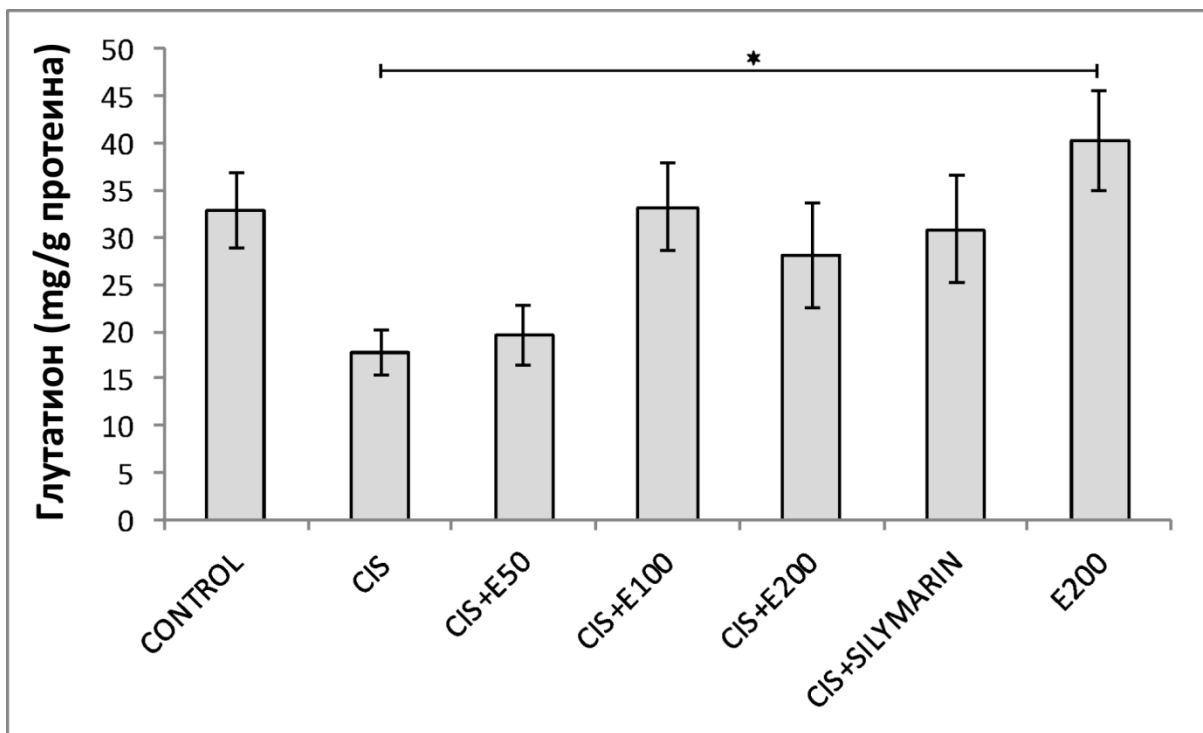
Резултати ове студије показују да су спроведени десетодневни експериментални протоколи нису доводили до значајних промена активности каталазе у ткиву хипокампуса ($F=3.034$, $df=6$, $p>0.05$).

Апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg (i. p.), као што је приказано на Слици 4.19., је доводила до смањења концентрације укупног глутатиона у ткиву хипокампуса које није било статистички значајно. Континуирана самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално, у води за пиће) током десет дана је доводила до умереног повећања GSH које, такође, није било статистички значајно у поређењу са контролном групом. Ипак, уочено дискретно повећање концентрације укупног глутатиона у групи где је самостално примењиван екстракт SHL је било довољно велико да се уочи статистички значајна разлика у поређењу са групом која је третирана искључиво цисплатином, без антиоксидантне суплементације ($p<0.05$).

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg, пет дана пре и пет дана након апликације појединачне дозе цисплатине, је повећавала вредност овог маркера антиоксидантног капацитета у хипокампусу након смањења изазваног цисплатином (највеће вредности се уочавају са дозом од екстракта од 100 mg/kg), иако се вредности овог параметра антиоксидантне заштите нису значајно разликовале у поређењу са контролним вредностима. Концентрација укупног глутатиона у групама са различитим дозама екстракта SHL примењиваног пре и после третмана цисплатином се нису међусобно статистички значајно разликовале.

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, није значајно утицала на вредност GSH чак ни након смањења изазваног третманом цисплатином. Упоређујући квантитавне разлике у последицама примене два препарата са антиоксидантним својстима, силимарина и екстракта SHL, у истим дозама (100 mg/kg) и током истоветих експерименталних

протокола, да се претпоставити да промена концентрације укупног глутатиона не представља значајан механизам антиоксидантне заштите у датим околностима.



Слика 4.19. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене концентрације укупног глутатиона (mg/g протеина) у ткиву хипокамуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05.

4.3. Маркери апоптотске активности

4.3.1. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса

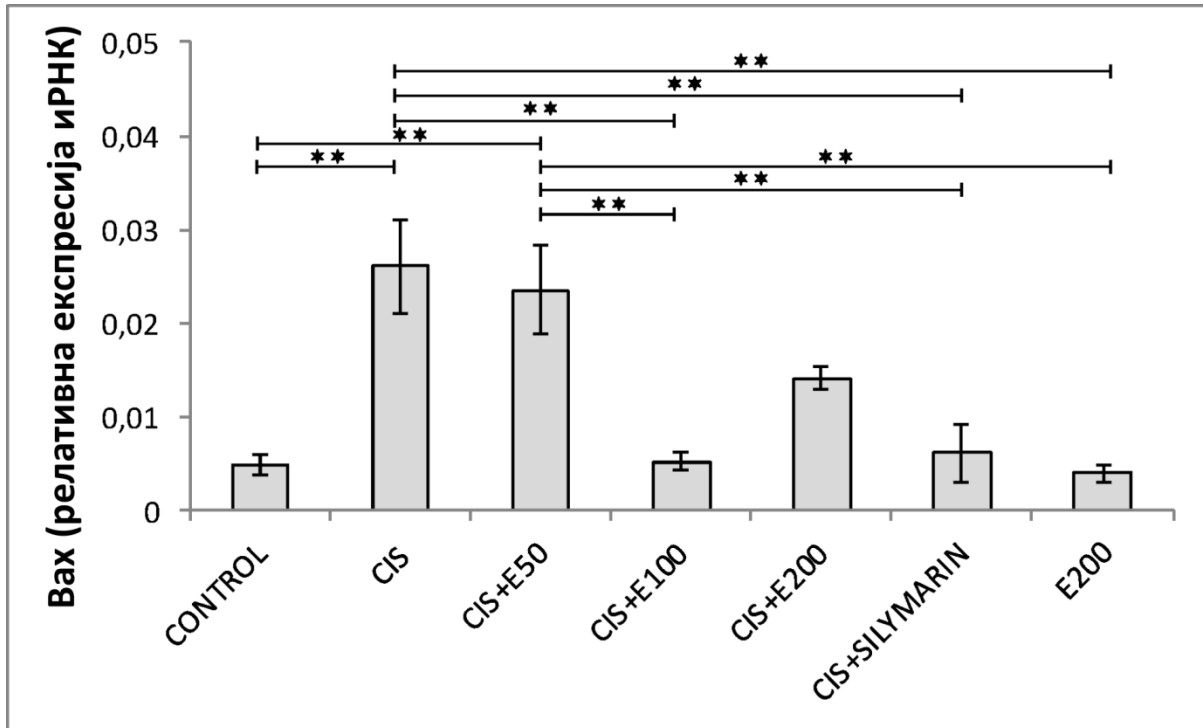
Експериментални протоколи спроведени у овој студији су за последицу имали значајне промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса ($F=10.165$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна апликација цисплатине (Слика 4.20.) у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног повећања релативне генске експресије иРНК за Вах ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на повећање релативне генске експресије иРНК за Вах изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра за дозу од 50 mg/kg остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$), без значајне разлике за дозу од 200 mg/kg. Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједначне дозе цисплатине, је доводила до смањења релативне генске експресије иРНК за Вах у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Смањење величине релативне генске експресије иРНК за Вах у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групом где је симултано са цисплатином примењивана и доза од 50 mg/kg ($p<0.01$).

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједначне дозе цисплатине, је имала значајан утицај на величину релативне генске експресије иРНК за Вах у хипокампусу. Орална примена силимарина је доводила до значајног смањења релативне генске експресије иРНК за Вах, како у поређењу са групом

која је третирана цисплатином без антиоксидантне суплементације ($p < 0.01$), тако и у поређењу са групом која је симултано третирана екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg ($p < 0.01$).



Слика 4.20. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Вах у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, ** $p < 0.01$.

4.3.2. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса

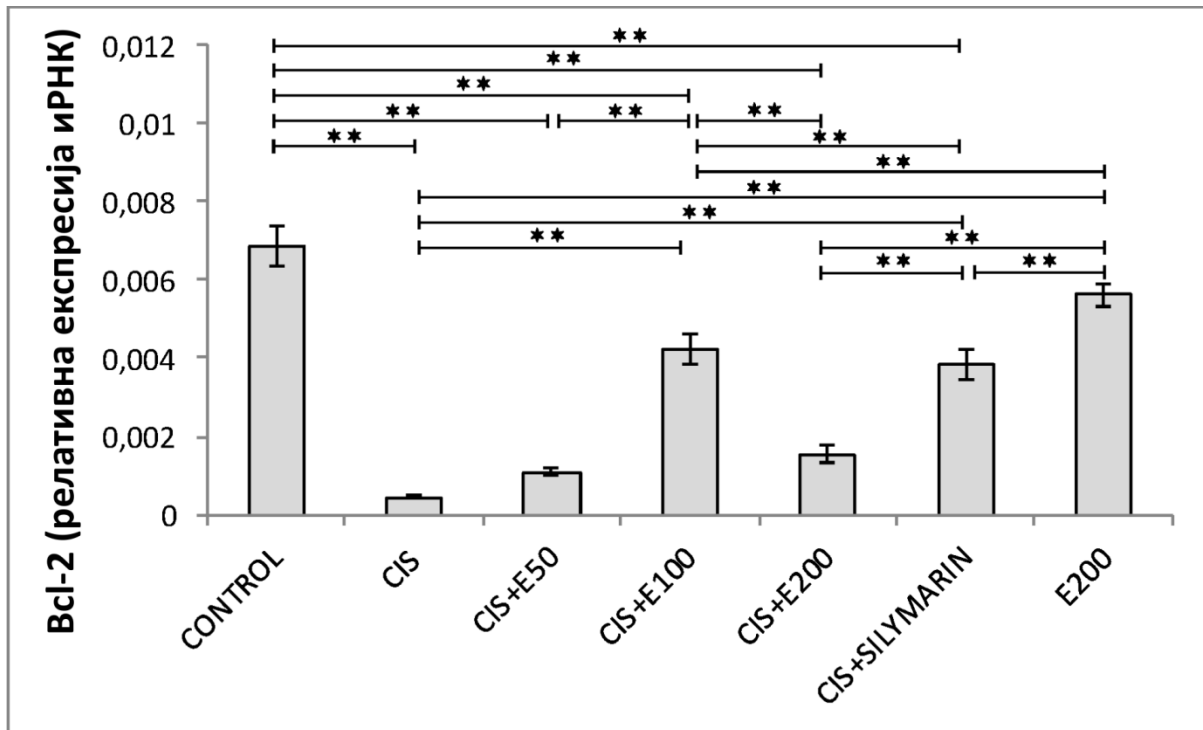
Експериментални протоколи спроведени у овој студији су за последицу имали значајне промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса ($F=58.950$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна апликација цисплатине (Слика 4.21.) у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног смањења релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50 и 200 mg/kg није значајно утицала на повећање релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра за обе наведене дозе остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је доводила до повећања релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Повећање величине релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у групи са дозом од 100 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групама где је симултано са цисплатином примењивана и доза од 50, односно 200 mg/kg ($p<0.01$).

И десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након поједничне дозе цисплатине, је имала значајан утицај на величину релативне генске експресије иРНК за Вах у хипокампусу. Орална примена силимарина је доводила до значајног повећања релативне генске експресије иРНК за Bcl-2, како у поређењу са групом која је третирана цисплатином без антиоксидантне суплементације ($p<0.01$), тако и у поређењу са групом која је симултано третирана екстракта SHL у дози од 200 mg/kg ($p<0.01$). Ипак, уочава се да је величина релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 након третмана силимарином остала значајно мања у поређењу са контролном групом ($p<0.01$), за разлику од групе третиране истом дозом екстракта SHL. Штавише, поредећи ефекте

истих доза два различита извора антиоксиданаса на величину релативне генске експресије иРНК за Bcl-2, јасно се примећује значајно већи антиапоптозни ефекат екстракта SHL ($p < 0.01$).



Слика 4.21. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, ** $p < 0.01$.

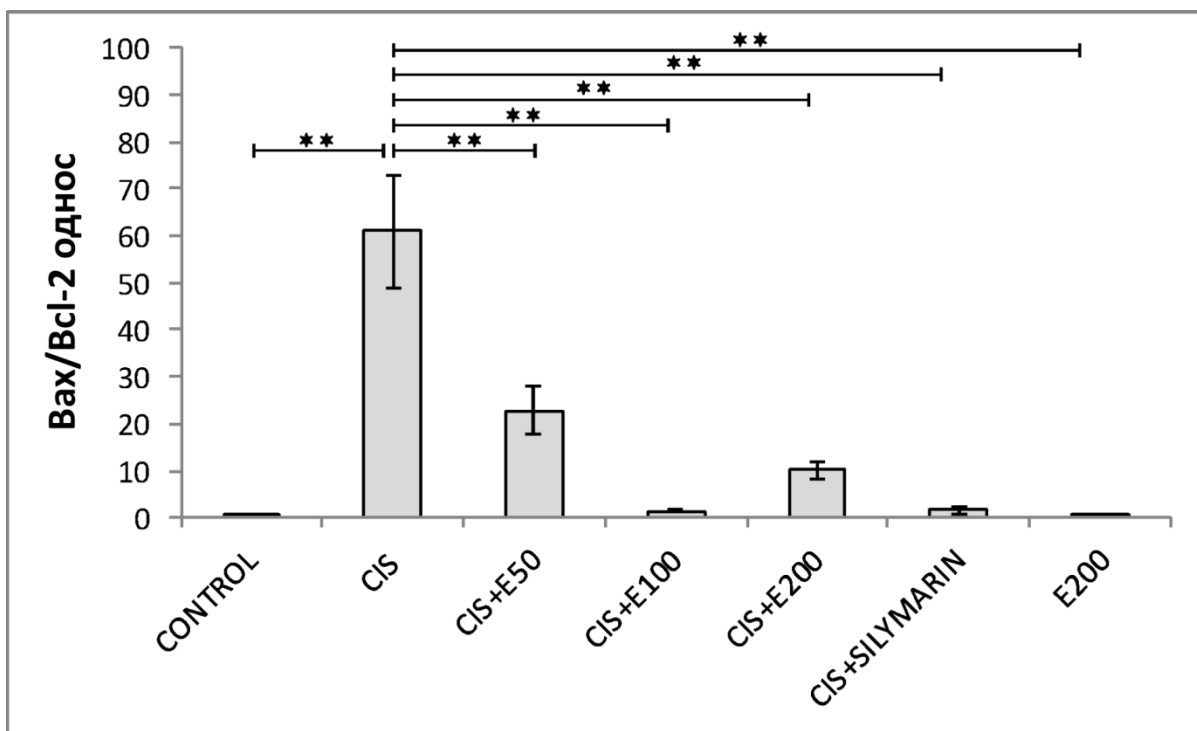
4.3.3. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су за последицу имали значајне промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса ($F=19.754$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна апликација цисплатине (Слика 4.22.) у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног повећања квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg је значајно утицала на смањење квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазваног цисплатином, тако да се вредности овог параметра за све три примењене дозе екстракта SHL нису статистички значајно разликовале у односу на контролну групу. Уочава се и да је ефекат смањења квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазваног цисплатином био највећи у групи третираној екстрактом у дози од 100 mg/kg, али разлике у јачини ефеката између група са различитим дозама екстракта SHL нису биле статистички значајне.

Слично томе, и десетодневна администрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након појединачне дозе цисплатине, је показала значајан утицај на квантитативни однос релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у хипокампусу. Орална примена силимарина је доводила до значајног смањења квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 ($p<0.01$). Промена квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазваног цисплатином се након администрације силимарином враћала на ниво квантитативног односа између про- и антиапоптотских гена какав је постојао у контролној групи. Поредићи ефекте истих доза два различита извора антиоксиданаса на квантитативни однос релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2, уочава се веома сличан интензитет ефекта на про-/антиапоптотски еквилибријум у хипокампусу.



Слика 4.22. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Vcl-2у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, **p<0.01.

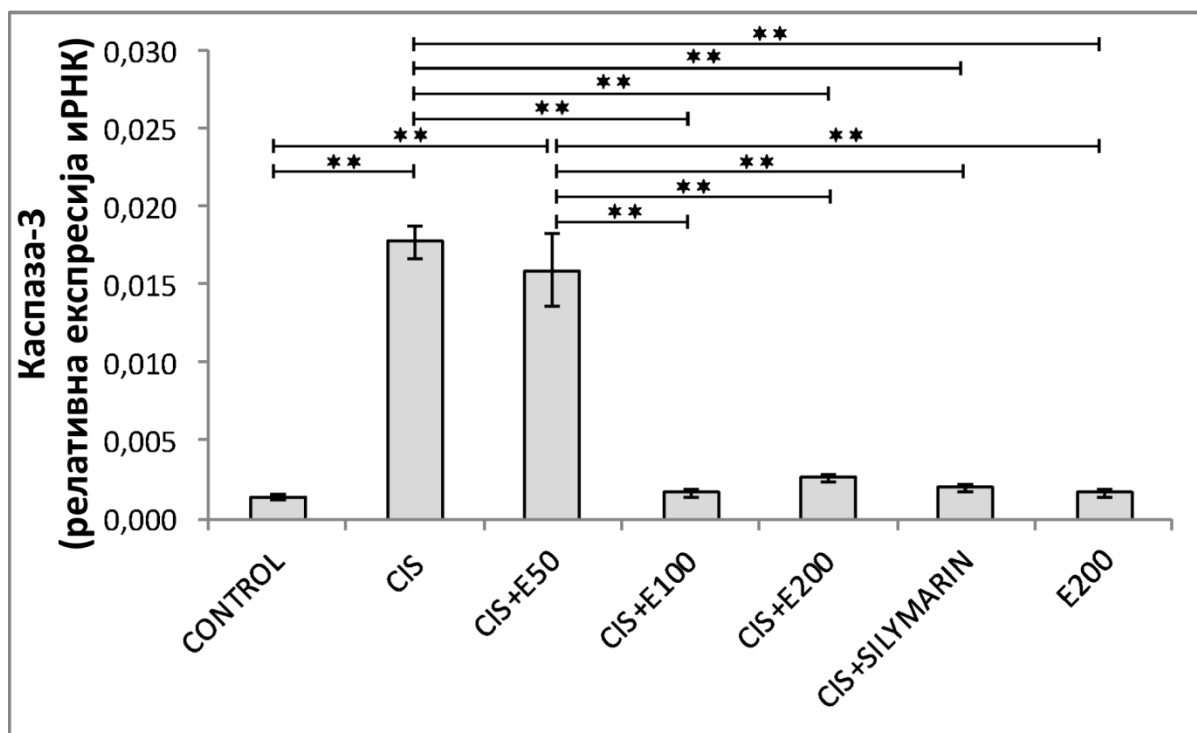
4.3.4. Утицај примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у ткиву хипокампуса

Експериментални протоколи спроведени у овој студији су за последицу имали значајне промене релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у ткиву хипокампуса ($F=53.467$, $df=6$, $p<0.01$).

Једнократна апликација цисплатине (Слика 4.23.) у дози од 7.5 mg/kg (i. p.) је доводила до значајног повећања релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 ($p<0.01$). Самостална примена екстракта *Satureje hortensis* L. у дози од 200 mg/kg (орално) није утицала на вредност овог параметра у контролним условима.

Симултана администрација екстракта SHL са цисплатином је показала да примена екстракта у дози од 50 mg/kg није значајно утицала на повећање релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 изазвано цисплатином, при чему су вредности овог параметра за дозу од 50 mg/kg остале значајно мање у поређењу са контролним вредностима ($p<0.01$). Десетодневна свакодневна примена екстракта SHL у дозама од 100 и 200 mg/kg, пре и након појединачне дозе цисплатине, је доводила до смањења релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у поређењу са вредностима овог параметра добијеним након самосталне примене цисплатине ($p<0.01$), достижући вредности једнаке оствареним у контролним условима. Смањење величине релативне генске експресије иРНК за Вах у групама са дозом од 100 и 200 mg/kg је било статистички значајно и у поређењу са групом где је симултано са цисплатином примењивана и доза од 50 mg/kg ($p<0.01$).

Десетодневна адмистрација силимарина у дози од 100 mg/kg, пре и након појединачне дозе цисплатине, је имала значајан утицај на величину релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у хипокампусу. Орална примена силимарина је доводила до значајног смањења релативне генске експресије иРНК за каспазу-3, како у поређењу са групом која је третирана цисплатином без антиоксидантне суплементације ($p<0.01$), тако и у поређењу са групом која је симултано третирана екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg ($p<0.01$).

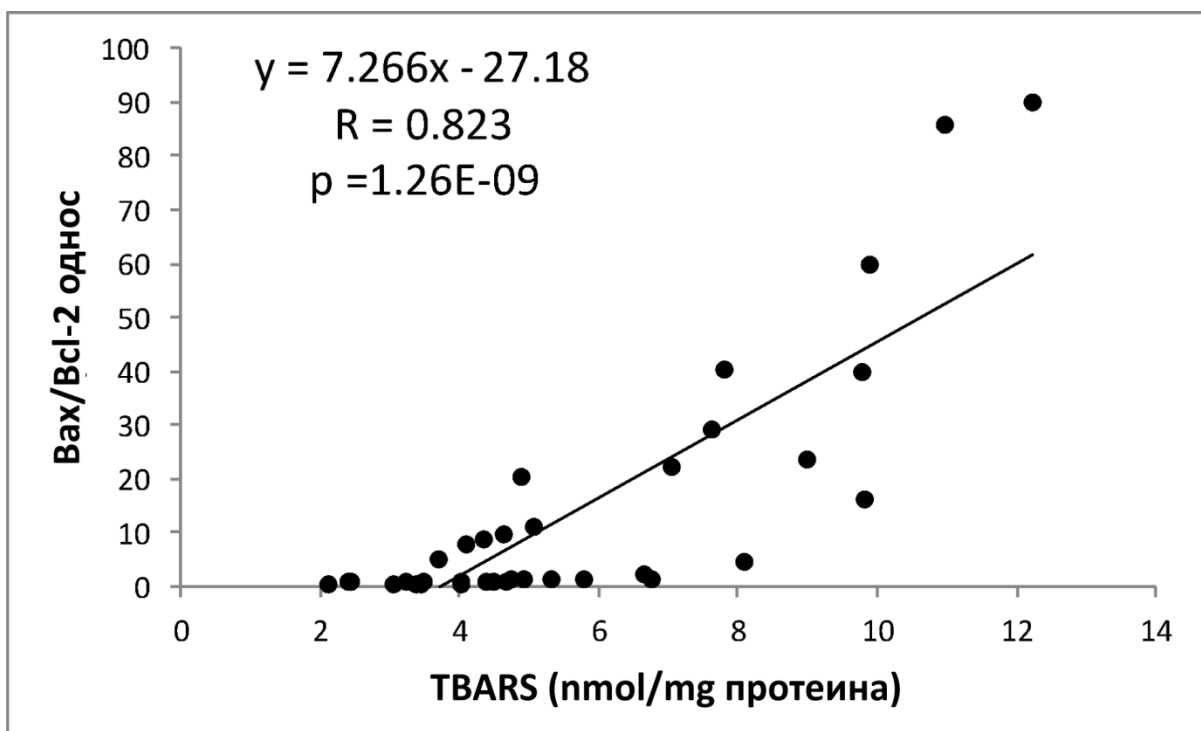


Слика 4.23. Ефекти примене екстракта *Satureje hortensis* L. на цисплатином изазване промене релативне генске експресије иРНК за каспазу-3 у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+E50 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 50 mg/kg, CIS+E100 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg, CIS+E200 – група са цисплатином и екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg, CIS+SILYMARIN – група са цисплатином и силимарином у дози од 100 mg/kg, E200 – група са екстрактом SHL у дози од 200 mg/kg; n=5 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, **p<0.01.

4.4. Испитивање међусобне повезаности фактора укључених у контролу понашања након спроведених експерименталних протокола

4.4.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса

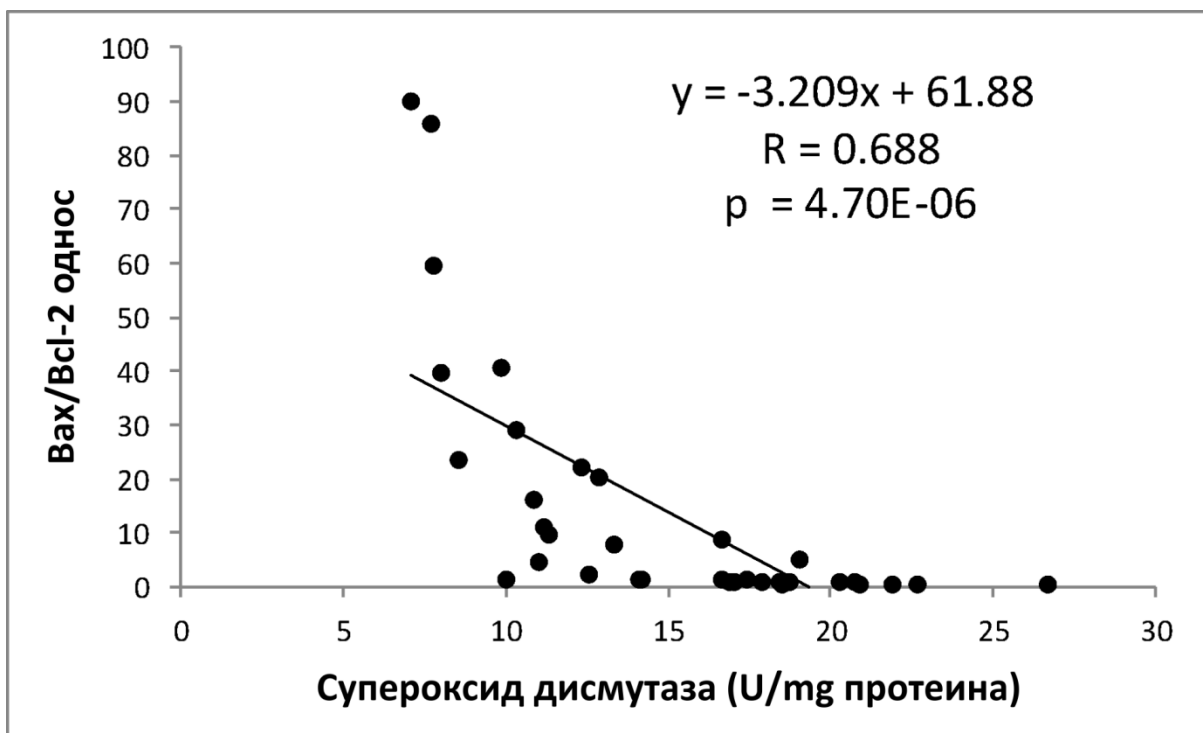
На Слици 4.24. је приказана међусобна повезаност индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса. Анализом је потврђено да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између индекса липидне пероксидације и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса ($R=0.823$, $p=1.26 \times 10^{-9}$).



Слика 4.24. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса (n=35).

4.4.2. Анализа међусобне повезаности антиоксидантног капацитета (изражен кроз активност супероксид дисмутазе) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса

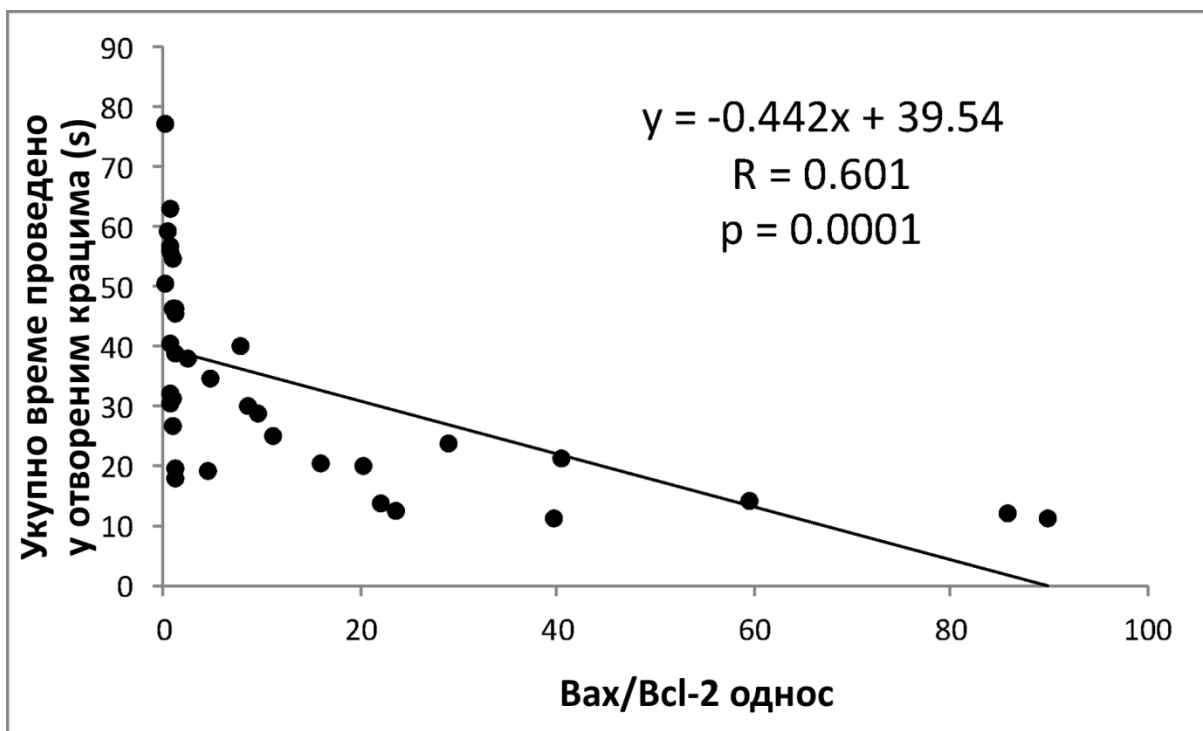
На Слици 4.25. је приказана међусобна повезаност антиоксидантног капацитета (изражен кроз активност супероксид дисмутазе) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса. Анализом је потврђено да у базалним условима постоји јака, негативна корелација између активности SOD и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса ($R=0.688$, $p=4.70 \times 10^{-6}$).



Слика 4.25. Анализа међусобне повезаности антиоксидантног капацитета (изражен кроз активност супероксид дисмутазе) и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса ($n=35$).

4.4.3. Анализа међусобне повезаности квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Vcl-2 у ткиву хипокампуса и степена анксиозности (изражен преко УВОК током ЕРМ теста)

На Слици 4.26. је приказана међусобна повезаност квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Vcl-2 у ткиву хипокампуса и степена анксиозности (изражен преко УВОК током ЕРМ теста). Анализом је потврђено да у базалним условима постоји јака, негативна корелација између квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Vcl-2 у ткиву хипокампуса и УВОА ($R=0.601$, $p=1 \times 10^{-4}$).



Слика 4.26. Анализа међусобне повезаности квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Vcl-2 у ткиву хипокампуса и степена анксиозности (изражен преко УВОК током ЕРМ теста) ($n=35$).

5. ДИСКУСИЈА

Примена цитостатика представља једну од стандардних и најчешће примењиваних процедура у терапији бројних малигнитета. Ипак, спровођење хемиотерапије се обично повезује са испољавањем већег броја нежељених ефеката, јачег или слабијег интензитета.

Цисплатина представља један од најстаријих и у клиничкој пракси најчешће примењиваних цитостатика. Иако је вишедеценијска пракса потврдила значајан антитуморски потенцијал овог препарата (164), било да се примењује у облику монотерапије (165) или у комбинацији са другим цитостатацима (19, 20), при чему се сматра леком избора у третману појединих солидних тумора (14), описано је да је спровођење ове врсте терапије често повезано са читавим низом тешких клиничких манифестација као последица нежељених ефеката. Поред најчешће описиваних последица нефротоксичности (15) и хепатотоксичности (38, 39), уочени су и други нежељени ефекти цисплатине, укључујући и неуротоксичност (50), који (иако се ређе јављају) доводе до озбиљних поремећаја који често резултирају скраћењем или прекидањем терапије.

Интересантно је да системска примена цисплатине у терапијске сврхе, иако је потврђено да у физиолошким условима овај молекул веома мало пролази кроз хематоенцефалну баријеру (166), доводи до значајних и тешких манифестација неуротоксичности. Најчешће описивани клинички ентитети који настају као последица терапијске примене цисплатине се испољавају у форми психолошких, перцептуалних и когнитивних оштећења (167-169). Базична истраживања, спроведена на анималним експерименталним моделима, су потврдила значајне облике испољавања неуротоксичности препарата на бази платине. Примена цисплатине на анималним моделима је за последицу имала читав низ манифестација неуротоксичности. Поред најчешће описиваних нежељених дејстава која се повезују са оштећењима периферних нерава, примена цисплатине у дозама које су еквивалентне терапијским дозама код људи је доводила и до значајних штетних ефеката који потврђују поремећаје на нивоу ЦНС-а. Тако је описано, између осталог, да администрација цисплатине доводи и до значајних бихевиоралних манифестација неуротоксичности. Према подацима из литературе, у бихевиоралне последице примене цисплатине, добијене на анималним моделима, се убрајају: когнитивна дисфункција (66), као и повећање степена депресивности (170), односно повећање степена анксиозности код глодара (68). Резултати наведених студија на анималним моделима су посебно значајни са аспекта чињенице да су цитостатици који садрже платину аплицирани код здравих животиња (без примарних или секундарних туморских лезија), чиме је потврђено да се ради о директним нежељеним дејствима услед

примене препарата на бази платине, без могућности да се бар део манифестација неуротоксичности припише патофизиолошким механизмима који су повезани са основном болешћу. На тај начин се потврђује значај коришћења анималних експерименталних модела у испитивању токсичности цитостатика, имајући у виду да се на тај начин могу добити информације о нежељеним дејствима хемиотерапеутика *per se*, што је (из разумљивих разлога) немогуће остварити у клиничким студијама.

Промене степена анксиозности изазване цисплатином

Резултати ове студије потврђују јасан анксиогени ефекат цисплатине. Повећање степена анксиозности, настало као последица примене цисплатине, се манифестовало преко значајног смањења најдиректнијих показатеља нивоа анксиозности у тесту отвореног поља, као и у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Тако је једнократна администрација цисплатине (7.5 mg/kg тм) доводила до израженог смањења УВЦЗ, као и БУЦЗ за тест отвореног поља (Слике 4.1 и 4.2). Истоветан тип утицаја који се манифестовао на повећање степена анксиозности након апликације цисплатине је уочен и у тесту уздигнутог крстастог лавиринта, и квантификован кроз значајно смањење два најсензитивнија индикатора – УВОК и БУОК (Слике 4.6 и 4.7). Резултати који упућују на закључак да једнократна примена цисплатине повећава степен анксиозности код пацова, добијени на основу наведених директних индикатора анксиозности, су потврђени преко промена нивоа локомоторне и експлоративне активности. Наиме, смањење локомоторне и експлоративне активности се, према подацима из литературе, може сматрати потврдом анксиогеног ефекта неког третмана (171). Тако је појединачна доза цисплатине доводила до смањења локомоторне активности у тесту отвореног поља, изражено кроз смањење укупног пређеног пута (Слика 4.3), као и смањење процента времена кретања у тесту отвореног поља (Слика 4.4). Потврда анксиогеног ефекта цисплатине је добијена и преко смањења параметара локомоторне активности, укупног пређеног пута (Слика 4.8) и процента времена кретања (Слика 4.9) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Додатно, повећање степена анксиозности након једнократне администрације цисплатине је верификовано и преко смањења експлоративне активности (број усправљања) у тесту отвореног поља (Слика 4.5). Смањење експлоративне активности, настало као последица анксиогеног ефекта цисплатине, је нумерички богатије квантификовано у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Наиме, сва три параметра за евалуацију експлоративне активности у овом тесту, број нагињања, број усправљања, као и број епизода укупне експлоративне активности (Слике 4.10-4.12), су била значајно смањена након примене цисплатине.

Остварени резултати, који се односе на промене индикатора анксиозности у одговарајућим бихевиоралним тестовима (ОП и УКЛ тест), неспорно потврђују анксиогени ефекат примене цисплатине. Ипак, ови резултати се не могу поредити са подацима из

литературе јер није описан ниједан експериментални дизајн где је испитиван утицај појединачне дозе цисплатине на промену степена анксиозности. Уместо тога, резултати ове студије се могу посматрати у светлу презентованих података који такође потврђују да примена цисплатине, овога пута у облику хроничног третмана, има анксиогени ефекат који се добија након администрације нешто мање дозе (5 mg/kg) од примењене у овој студији током пет (172), односно седам недеља (173) код пацова.

Анализирајући резултате добијене у тесту качења за реп, уз занемаривање резултата претходно спроведених бихевиоралних тестова (ОП и УКЛ тест), као интегралних делова сета бихевиоралних тестова, дошло би се до закључка да примена цисплатине доводи до антидепресантног ефекта. Наиме, једнократна администрација цисплатине је у овој студији за резултат имала продужење ВПИ (Слика 4.13), као и смањење БЕИ (Слика 4.14), уз скраћење УВИ у TST (Слика 4.15). Свака од описаних промена параметара у ТКР појединачно, а нарочито збирно, би ишла у прилог закључку да цисплатина примењена у овој дози за резултат има смањење степена депресивности. Ипак, имајући у виду резултате претходних тестова (ОП и УКЛ тест), а у контексту у литератури недавно наведене могућности да експериментално испитивање степена депресивности може бити суштински значајно маскирано значајним променама у степену анксиозности, треба бити врло критичан у дефинитивном закључивању по питању квалификације типа промене понашања које се везује за степен депресивности у овој студији. Конкретно, специфични поремећаји понашања које карактеришу елементи са снажним анксиогеним манифестацијама могу надјачати појавне облике продепресантног понашања у смислу моторичке експресије, те се из тог разлога могу погрешно прогласити за антидепресантни ефекат (174). У прилог ове тезе иду и резултати из литературе који потврђују продепресантни ефекат примене цисплатине (150).

Ипак, чини се да кључно место у дефинисању финалног типа промене понашања у студијама овог типа има утврђивање стандардизованог експерименталног дизајна. Наиме, продепресантни ефекат је описан у студији где је примењиван хронични, десетонедељни третман цисплатином (174), за разлику од овог истраживања које је подразумевало једнократну администрацију цисплатине. Резултати обе студије се могу у закључку сублимирати кроз могућност да је утицај примене цисплатине на специфичне регионе мозга, који су укључени у контролу понашања, веома комплексан јер укључује бројне биохемијске и морфолошке промене које се развијају у функцији времена. Добијени резултати сугеришу да се утицај цисплатине на понашање иницијално манифестује кроз

снажан анксиогени одговор, што се у овој студији уочава као снажно акутно повећање анксиозности након појединачне дозе цисплатине, да би се након продужетка третмана цисплатином постепено успостављала доминација продепресантних манифестација неуротоксичности изазване цисплатином. Колико год да, у теоријском смислу, ова хипотеза може изазвати конфузију, практични значај који проистиче из ове претпоставке је од потенцијално великог клиничког значаја јер се нагло појачање анксиозности може тумачити као један од раних знакова прогресије поремећаја расположења, што се касније може препознати и облику повећања степена депресивности. На тај начин, захваљујући раном препознавању карактеристичне промене у понашању изазване цисплатином, добија се значајан временски простор за примену одговарајуће терапије. Коначно, квалификација типа бихевиоралне промене која настаје након примене цисплатине директно зависи од дужине трајања експозиције.

Промене параметара оксидативног стреса изазване цисплатином

Према подацима из литературе, описане бихевиоралне манифестације неуротоксичности су удружене са развојем читавог низа механизма патофизиолошких процеса који се одвијају у специфичним регионима мозга одговорним за контролу понашања. Нарочито се потенцира значај промена које се након примене цитостатика дешавају у хипокампусу, при чему се експлицитно описују инхибиција ћелијске пролиферације, диференцијације и неурогенезе, повезане са дисбалансом метаболизма неуротрансмитера, што се морфолошки верификује у форми оштећења неурона (175-177). Између осталог, наводи се да примена цисплатине код пацова доводи до промена концентрација 5-хидрокстриптамина у хипокампусу (као и у хипоталамусу и продуженој моздини) код пацова (177). Исто тако, у потврђене патофизиолошке основе неуротоксичности хемиотерапеутика се убрајају и алтерације на нивоу прогениторних ћелија ЦНС-а и олигодендроцита (176). Подаци о потенцијалном корисном ефекту неуропротектаната након примене цитостатика упућују на закључак да се, бар делом, механизми неуротоксичности изазване хемиотерапијом базирају и на поремећајима сигналних механизма који се остварују преко G-протеина (177).

Један од најчешће описиваних механизма токсичности цисплатине је базиран на поремећају оксидативног баланса, као и потенцирање иницијалних фаза инфламације у афектираном ткиву (178). Повећано оксидативно оштећење након администрације цисплатине описано у литератури (179) је утврђено и резултатима ове студије. Једнократна примена цисплатине (7.5 mg/kg тм) је доводила до значајног повећања липидне пероксидације у хомогенату ткива хипокампуса пацова. Резултати ове студије показују да је као последица апликације цисплатине дошло до двоструког повећања вредности TBARS (Слика 4.16). Повећање липидне пероксидације уочено у овој студији је у складу са претходно описаним повећањем вредности MDA, такође двоструко, након примене цисплатине према другачијем протоколу - 5 mg/kg тм недељно током седам недеља (173). Такође, резултати нашег истраживања који описују прооксидантни ефекат цисплатине су по истом типу као и резултати добијени у студији коју су спровели Turan и сарадници, у којој су забележене значајно мање вредности индекса липидне пероксидације у мозданом ткиву у групи пацова третираних цисплатином у односу на контролне услове (180). Истраживање спроведено на одраслим женкама пацова којима је

аплицирана једнократна доза цисплатине (као у нашој студији) је показало да је у можданом ткиву степен липидне пероксидације значајно виши у односу на нетретирани животиње (181). У студији у којој је спроведен једнократни третман цисплатином, у дози од 5 mg/kg, праћен је степен липидне пероксидације у периоду од две недеље, показано је да се најинтензивније промене у смислу повећања липидне пероксидације дешавају првог, а нарочито четвртог дана након апликације цитостатика (182).

Поред квантификације оштећења липидних структура ћелије, о чему нам говори вредност липидне пероксидације, што се може сматрати последицом оксидативног оштећења, у циљу утврђивања каузалних механизма за повећање оксидативног стреса се, по правилу, у истраживањима овог типа испитује и ниво антиоксидантне заштите. У том циљу је у овој студији испитиван третман цисплатином на неколико компоненти антиоксидантне заштите у хипокампусу – активност SOD и CAT, као и укупни глутатион. Једнократна администрација цисплатине је доводила до значајног смањења активности SOD у хомогенату ткива хипокампуса (Слика 4.17.). Смањење активности SOD, веће од 100%, забележено у овој студији се подудара са резултатима студије где је спровођен хронични третман цисплатином код пацова (173). Истовремено, под утицајем цисплатине је дошло и до значајног смањења активности CAT (Слика 4.18). Забележено троструко смањење активности CAT је чак интензивније од сличног ефекта описаног у литератури након продуженог третмана нешто мањим дозама цисплатине (173). Резултати нашег истраживања су у складу са резултатима добијеним у студији у којој је, такође, аплицирана цисплатина која је узроковала оштећење ензимске одбрамбене заштите у можданом ткиву, прецизније активности SOD (180).

Једнократна примена цисплатине, за разлику од осталих маркера оксидативног стреса (индекс липидне пероксидације, активност SOD и CAT), у овој студији није доводила значајних промена укупног глутатона у хипокампусу (Слика 4.19). Овакав резултат се разликује од података из литературе који говоре о томе да цисплатина доводи до смањења антиоксидантног капацитета хипокампуса и преко смањења укупног глутатиона (173). Могуће објашњење за уочене разлике би се могло тражити у различитом експерименталном дизајну. Наиме, у поменутој студији је спроведен хронични третман цисплатином, у трајању од седам недеља, за разлику од једнократне примене цисплатине у овој студији. Претпоставка је да нису сви механизми антиоксидантне заштите у ћелијама хипокампуса подједанко осетљиви на утицај цисплатине, односно да до смањења активности антиоксидантних ензима SOD и CAT долази непосредно након

администрације цисплатине, док се негативни утицај овог цитостатика на укупни глутатион уочава тек након продужетка експозиције. У истраживању које је по експерименталном дизајну веома слично са нашим забележено је да је укупни антиоксидантни капацитет у мозданом ткиву изразито смањен код животиња третираних цисплатином (183).

Један од претпостављених механизма неуротоксичних ефеката цисплатине у хипокампусу пацова подразумева и промене на нивоу експресије гена одговорних за генерисање антиоксидантног одбрамбеног одговора. Конкретно, утицај цисплатине на генску експресију повезану са факторима укљученим у одржавање оксидативног еквилибријума се манифестује на различите начине: преко *down*-регулације Nrf2 (кључни регулатор заштите од оксидативног оштећења, 184), као и HO-1 (под контролом гена за Nrf2). Истовремено, измењена генска експресија под утицајем цисплатине доводи и до *up*-регулације експресије NF-κB, који се сматра одговорним за ћелиско оштећење преко низа различитих механизма, укључујући и повећану продукцију проинфламаторних цитокина. Набројани механизми измењене генске експресије могу иницирати неуроинфламаторну каскаду у хипокампусу, што за финалну последицу може имати поремећаје у понашању (185). У овом следу нежељених догађаја, вероватно је да значајно место има и смањење концентрације *brain derived neurotrophic factor*-а (BDNF) у хипокампусу (186). Смањење хипокампадне концентрације BDNF може довести до смањења волумена хипокампуса, за које се сматра да представља основни разлог бројних поремећаја расположења (187), укључујући и анкиогени одговор на цисплатину какав је добијен у овој студији.

Сумирајући резултате добијене у овој студији који се односе на ефекте цисплатине који су удружени са поремећајем равнотеже оксидативног статуса у хипокампусу пацова, а имајући у виду да су ћелијски антиоксидантни механизми, како ензимски тако и неензимски, неопходни у спречавању оксидативног оштећења, могуће је закључити да је један од основних механизма неуротоксичности цисплатине – оксидативни стрес уско повезан са смањењем ћелијског антиоксидантног капацитета у мозгу. Специфичност овог рада је у томе што показује да се прве промене, непосредно након администрације цисплатине, дешавају преваходно на нивоу поремећаја ендогених ензимских антиоксидантних механизма.

Промене параметара апоптотске активности изазване цисплатином

Имајући у виду да широко распрострањена примена цитостатика на бази платине потврђује да је основни антитуморски потенцијал примарно базиран на утицају на оштећење ДНК, и последичну индукцију апоптотских механизма (188), за очекивати је да се овакав, нажалост, неселективни ефекат испољава и у другим ткивима укључујући и ЦНС. Ипак, имајући у виду сложеност апоптотских механизма, испитивање појединачних механизма и даље представља значајно истраживачко поље како у студијама где се утврђују жељени (антинеопластични) ефекти, тако и у испитивањима нежељених ефеката цисплатине.

Резултати ове студије показују да је једнократна примена цисплатине да је узроковала повећање релативне генске експресије проапоптотских маркера у хипокампусу пацова. Као што је представљено на Слици 4.20, администрација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg је доводила до значајног повећања релативне генске експресије за Вах. Уочено петоструко повећање хипокампадне релативне генске експресије за Вах је ускладу са резултатима претходне студије у којој је испитиван утицај цисплатине (појединачна апликација у дози од 12 mg/kg) на хипокампадну експресију проапоптотских гена (189). Слично томе, још снажнији ефекат појединачне дозе цисплатине на релативну експресију хипокампадних проапоптотских гена је детектован преко каспазе-3 (Слика 4.23). У овом случају, десетоструко повећање експресије гена за каспазу-3 се подудара са резултатима студије у којој је, такође једнократно, цисплатина апликована у сличној дози (190). Интересантно је да резултати поменуте студије показују да се релативна генска експресија за каспазу-3 у нервном ткиву постепено повећавала између другог и седмог дана након администрације, што одговара временском периоду у коме су након примене цисплатине животиње жртвоване у нашој студији. Екстензивније студије су показале да је проапоптотски ефекат који цисплатина остварује повезан са повећањем релативне генске експресије чак пет проапоптотских фактора у хипокампусу пацова: Bid, Bcl, Bax, Trp53bp2 и Card6, уз истовремено смањење фактора ћелијске пролиферације - Ki67 (189). Треба поменути да и резултати добијени на различитим културама ћелија мишева, укључујући и нервно ткиво, могу помоћи у појашњењу појачане апоптотске активности изазване цисплатином. Као закључци ових студија се могу сублимирати потенцијални проапоптотски механизми цисплатине који се

доминантно манифестују преко нитратације и *down*-регулације LMO4 (регулатор транскрипције са најважнијом улогом у биологији развој) у ткивима која су нарочито осетљива на токсичност изазвану цисплатином, попут хипокампуса који је испитиван у овој студији (191).

За разлику од ефеката добијених након примене цисплатине за проапоптотске индикаторе у хомогенату ткива хипокампуса, једнократна администрација овог цитостатика у нашој студији је показала супротан ефекат на релативну генску експресију антиапоптотског потенцијала. Пет дана након апликације цисплатине у појединачној дози, регистровано је драматично смањење релативне генске експресије Bcl-2 у хипокампусу пацова (Слика 4.21.), што је у складу са подацима из литературе којима се потврђује негативан утицај цисплатине на генску експресију Bcl-2 (189). Имајући у виду да се механизам дејства Bcl-2, између осталог, састоји и од анулирања штетних ефеката проапоптотских фактора који се манифестују преко губитка интегритета митохондријалних мембрана, ослобађања цитхрома c (уз повећање каспазе-3), претпоставка је да се управо смањење Bcl-2 у хипокампусу може сматрати једним од основних механизма неуротоксичности цисплатине (192). Ову хипотезу потврђује и податак да ћелије које имају прекомерну експресију Bcl2a1 показују резистенцију према проапоптотским ефектима цисплатине и других цитостатика (193).

Сумарни проапоптотски ефекат примене цисплатине је квантитативно потврђен померањем про-/антиапоптотског односа представљеног кроз Bax/Bcl-2 однос (Слика 4.22). Управо се ова нумеричка вредност у литератури најчешће користи за дефинисање капацитета ћелија да одговоре на апоптотски сигнал (162, 163). Финални проапоптотски исход апликације цисплатине у хипокампусу утврђен у овом истраживању се може сматрати основним биолошким механизмом који се повезује са емоционалним поремећајем манифестованим кроз повећање степена анксиозности (167, 172).

Утицај екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на промене параметара оксидативног стреса изазване цисплатином

Екстракт биљке *Satureja hortensis* L., примењиван у овој студији у три различите дозе (50, 100 и 200 mg/kg), је имао висок садржај компоненти са антиоксидантним својствима. Нарочито је био висок садржај фенолних једињења, укључујући и рузмаринску киселину (24.9 mg/g сувог екстракта, 123). Поред тога, овај екстракт је у мањим концентрацијама садржао и неколико фенолних киселина, као што су хлорогенска, кафеинска, сиригинска, *p*-кумаринска, синапинска и изоферулинска киселина, односно флавоноида (кверцетин, апигенин, лутеолин, нарингенин) и њихових деривата (123). Осим највише описаних антиоксидантних својстава (194), рузмаринска киселина има и већи број других биолошких активности укључујући и цитотоксичну, антимикуробну, антивирусну, антидијабетску, антиинфламаторну и антиалергијску активност, уз такође описана имуномодулаторна својства (195-198).

Резултати ове студије су показали да, иако самостална примена екстракта у највећој дози (200 mg/kg) није значајно утицала на величину индекса липидне пероксидације у поређењу са контролном групом, симултана примена екстракта SHL са цисплатином је доводила до значајне промене липидне пероксидације изазване једнократном апликацијом цитостатика у хомогенату ткива хипокампуса пацова (Слика 4.16). Интересантно је да је максималан ефекат на смањење величине липидне пероксидације изазване цисплатином постигнут са средњом дозом (100 mg/kg) екстракта SHL, док најмања и највећа доза екстракта SHL нису доводиле до значајног смањења липидне пероксидације након администрације цисплатине.

Овакви резултати су у складу са подацима из литературе који показују значајан антиоксидативни и антиинфламаторни потенцијал рузмаринске киселине *in vivo* (191). Нарочито снажан антиоксидантни ефекат рузмаринске киселине је описан након примене цисплатине у *in vivo* условима (196, 199). Сматра се да је протективни ефекат рузмаринске киселине према токсичности цисплатине (нефротоксичност), на основу вредности маркера оксидативног стреса, постигнут смањењем липидне пероксидације, као и 4-HNE, CYP2E1 и HO-1 имунореактивности (196). Слично томе, у студији спроведеној на ћелијама нервног ткива, рузмаринска киселина је показала неуропротективна својства у околностима H₂O₂-индукованог оксидативног оштећења астроцита (200). Значај

протективног ефекта екстракта SHL на H₂O₂-индуковано оксидативно оштећење је описан и преко антигенотоксичког ефекта на лимфоцитима пацова (201).

Према подацима из литературе, рузмаринска киселина доводи до смањења оксидативног оштећења ћелије (у овој студији квантификовано преко вредности индекса липидне пероксидације) на два основна начина: смањење концентрације реактивних форми кисеоника и повећање капацитета антиоксидантне заштите. Управо из тог разлога је у овој студији испитиван и утицај екстракта SHL (висок садржај рузмаринске киселине) на поједине компоненте ћелијске антиоксидантне заштите. Резултати ове студије (Слике 4.17 и 4.18) показују да је само примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg доводила до статистички значајног ублажавања цисплатином индукованог смањења активности супероксид-дисмутазе и каталазе (уз напомену да самостална примена екстракта у највећој дози, 200 mg/kg, није значајно утицала ни на један од праћених параметара антиоксидантне заштите у хомогенату ткива хипокампуса). Као што је раније поменуто, имајући у виду да једнократна администрација цисплатине није узроковала значајном променом хипокампадне концентрације глутатиона, очекивано, ни примена екстракта SHL у различитим дозама није значајно утицала на капацитет овог механизма антиоксидантне заштите (Слика 4.19).

Резултати добијени у овој студији потврђују корисне ефекте примене екстракта SHL у циљу превенције смањења активности антиоксидантних ензима, SOD и CAT, изазване цисплатином. Ови подаци су у сагласности са претходно представљеним резултатима који показују да је екстракт SHL, у одговарајућој дози, спречавао смањење активности поменутих антиоксидантних ензима након једнократне апликације цисплатине у ткиву бубрега, јетре и тестиса пацова (123). Наведени резултати су проистекли из једине до сада реализоване *in vivo* студије, тако да се подаци о појачању активности антиоксидантних ензима (након примене цисплатине) још једино могу упоређивати са резултатима *in vitro* студије где је примена екстракта SHL побољшавала антиоксидантни капацитет (изражен кроз активност SOD и CAT) у култури имунских ћелија (202). Анализом података који су добијени у студијама у којима је испитиван ефекат рузмаринске киселине на промене оксидативног статуса индуковане применом процедура које не укључују апликацију цисплатине, долази се и до резултата добијених на моделу експерименталног етил алкохол-индуковане хепатотоксичности код пацова. Примена рузмаринске киселине је, и на бази овако развијеног патофизиолошког модела, смањивала индикаторе оксидативног стреса уз стимулацију активности антиоксидантних ензима,

укључујући и SOD и CAT (203). Имајући у виду евидентни недостатак података у литератури са којима би се упоређивали резултати ове студије који се односе на утицај исте врсте антиоксидантне суплементације на активност антиоксидантних ензима у можданом ткиву, сврсисходно је поменути да је у *in vivo* студији спроведеној на пацовима такође након једнократне администрације цисплатине (веома слична доза, 8 mg/kg), уз примену N-ацетилцистеина (аминокиселине која садржи сумпор) у форми антиоксидантне суплементације добијен истоветан ефекат (поред смањења продукције ROS) – обнављање активности антиоксидантних ензима (SOD и CAT), као и тоталног антиоксидантног капацитета, уз напомену да је уочен дозно зависни ефекат антиоксидантне суплементације (183). Протективни ефекат антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином након примене цисплатине је у можданом ткиву, поред смањења оксидативног стреса и митохондријалног оштећења, потврђен и ублажавањем хистоморфолошких промена изазваних цисплатином које су се манифестовале у форми смањења дендритичке мреже на култури ћелија хипокампуса пацова (66).

Иако досадашња истраживања не омогућавају прецизну дефиницију механизма који доводе до повећања активности антиоксидантних ензима, под утицајем антиоксидантне суплементације, након индукције оксидативног стреса, да се претпоставити да ови сложени процеси представљају комбинацију антиоксидантних и антиинфламаторних утицаја (204).

Важно је напоменути и да, за разлику од претходних студија, екстракт SHL није значајно утицао на концентрацију глутатиона у хомогенату ткива хипокампуса. Разлог са ову дискрепанцу треба тражити у чињеници да ни сама примена цисплатине (једнократна администрација у дози од 7.5 mg/kg) није доводила до значајних промена концентрације глутатиона, па самим тим није преостало довољно простора (у квантитативном смислу) за детекцију ефекта примењеног екстракта. Могуће објашњење се налази у закључку да ткиво хипокампуса вероватно захтева дужу (или већу?) експозицију цисплатини која би довела до статистички значајних промена концентрације овог елемента антиоксидантне заштите. Индиректна потврда за ову тврдњу се може пронаћи у резултатима *in vivo* студије где је концентрација глутатиона у ткиву хипокампуса остала непромењена и након процедуре за индукцију епилептогених промена, односно након примене антиоксидантне суплементације (рузмаринска киселина) у циљу превенције истих (205).

На крају, иако су у екстракту SHL коришћеном у овој студији детектовани у малим концентрацијама, у анализи антиоксидантних својстава SHL потврђен у овој студији, треба поменути и могући утицај осталих компоненти са антиоксидантним својствима. Тако, према подацима из литературе, нарингенин показује јако антиоксидантно дејство, у смислу смањења липидне пероксидације и повећања активности антиоксидативних ензима, код нефротоксичности изазване цисплатином (206). Слично томе, и кверцетин ублажава манифестације нефротоксичности изазване цисплатином преко смањења липидне пероксидације и експресије проинфламаторних цитокина (207), док лутеолин, превасходно смањује нефротоксичност изазвану цисплатином тако што смањује оксидативно/нитритни стрес и ублажава инфламацију у локалном ткиву (208). На основу наведених података се јасно уочава да је највећи број резултата добијен у студијама на бази цисплатином изазване нефротоксичности, што је у приличној мери очекивано имајући у виду да је ово у литератури најчешће обрађивано нежељено дејство терапије цисплатином.

Важно је напоменути да је у циљу квантитативне валоризације антиоксидантних ефеката суплементације екстрактом SHL, у овој студији спроведен и третман силимарином, који се сматра златним стандардом према подацима из литературе. Резултати ове студије недвосмислено показују да су ефекти екстракта SHL на промене параметара оксидативног стреса изазване једнократном применом цисплатине приближно једнаки ефектима орално примењеног силимарина у истој дози (100 mg/kg).

Утицај екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на промене параметара апоптотске активности изазване цисплатином

Међусобно повезани процеси који укључују повећање оксидативног стреса, оштећење митохондријалне мембране и индуковане ћелијске смрти су вероватна патофизиолошка основа неуролошких поремећаја и неуроналне дисфункције (209). Поновно успостављање еквилибријума у унутарћелијском антиоксидантном потенцијалу, након примене антиоксидантне суплементације оралним уносом екстракта *S. hortensis* L., се према подацима из литературе (123) сматра главним механизмом који смањује неуродегенеративне промене (210) изазване применом цисплатине. Према резултатима ове студије, примена екстракта SHL је, очекивано, поред смањења оксидативног оштећења доводила и до смањења апоптотских процеса у хомогенату хипокампалног ткива.

Континуирана антиоксидантна суплементација екстрактом SHL у дози од 100 mg/kg (Слика 4.20. и 4.23.) је анулирала повећање релативне генске експресије за Вах и каспазу-3 изазвано једнократном апликацијом цисплатине (7.5 mg/kg). На поменутих сликама се јасно уочава разлика у ефектима различитих доза екстракта SHL. Наиме, орални унос SHL у најмањој примењеној дози (50 mg/kg) није био довољан за анулирање проапоптотских ефеката цисплатине, док је највећа примењена доза екстракта SHL (200 mg/kg) доводила до смањења релативне генске експресије за каспазу-3, без статистички значајног смањења цисплатином индукованог повећања експресије гена за Вах у ткиву хипокампуса пацова. Интересантно је да се уочава и статистички значајна разлика између ефеката различитих доза екстракта SHL, 50 mg/kg у односу на 100 mg/kg, што сугерише да се оптимални (апоптотски) ефекат екстракта SHL јавља само у одговарајућим ефективним дозама. Како доступни подаци из литературе не омогућавају увид у ефекте екстракта SHL и/или најзаступљеније активне компоненте са антиоксидантним својствима (рузмаринска киселина) на цисплатином изазване утицаје на апоптотску активност у нервном ткиву, резултате добијене у овој студији је могуће поредити са резултатима студије у којој је испитиван утицај таурина на цисплатином индуковане механизме неуротоксичности (211). Подаци из наведеног истраживања показују да је суплементација таурином, у дозама сличним примењеним дозама екстракта SHL у овој студији (100 и 200 mg/kg), ублажавала цисплатином изазване патолошке промене које су се манифестовале преко смањења волумена и кариолизе која је детектована у церебелуму, каудо-путамену,

кортексу и хипокампусу. Као претпостављени механизам цитотоксичности у овим специфичним регионима мозга се наводи оштећење ДНК изазвано применом цисплатине (212). Осим тога, резултати студије која је спроведена на култури ћелија хипокампуса пацова, након стимулације апоптозе администрацијом цисплатине, показују да примена антиоксидантне суплементације у облику N-ацетилцистеина смањује проапоптотски ефекат цисплатине (66). Имајући у виду да повећање оксидативног стреса, уз оштећење мембране митохондрија, доводи до ослобађања цитохрома-с који се потом везује за procaspase/Araf-1 што доводи до активирања каспазе-9 (на Asp315) и каскадне реакције каспаза са коначном апоптозом (209, 210), претпоставка је да је место протективног деловања антиоксидантне суплементације управо у иницијалној фази – спречавање оксидативног оштећења и смањење оштећења митохондрија.

Имајући у виду висок садржај рузмаринске киселине у екстракту SHL, као и чињеницу да ова фенолна киселина, према подацима из литературе, утиче на инфламаторни одговор тако што смањује експресију NF-κB p65 и TNF-α, и на тај начин смањује проапоптотске параметре који се повезују са ћелијском смрти (експресија p53 и p-rp53) након примене цисплатине (196) или неког другог проапоптотског фактора (195) у експерименталном моделу нефротоксичности код глодара. Слични резултати су добијени и на култури људских допаминергичких неурона. И овде је примена рузмаринске киселине доводила до смањења апоптотских процеса са последичним неуродегенеративним променама, након што је претходно умањила H₂O₂-индуковано оксидативно оштећење (210).

На Слици 4.21 је представљен утицај примењених протокола на функционални статус антиапоптотских механизма изражен преко релативне генске експресије Bcl-2 у хомогенату ткива хипокампуса. Примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg је доводила до анулирања цисплатином изазваног супримирања експресије гена за Bcl-2, док ефекти мање (50 mg/kg) и веће (200 mg/kg) дозе показују ублажавање последица једнократне примене цисплатине које није било статистички значајно.

Расположиви подаци из литературе не омогућавају увид у потенцијалне механизме којим би се објаснио утицај антиоксидантне суплементације на експресију овог гена који се сматра есенцијалним у спречавању ћелијске смрти. У расветљавању ове везе нам могу помоћи индиректни подаци који обрађују специфичности možданог ткива у поређењу са другим органима, као и значајне разлике које постоје између појединих региона мозга, у

погледу интензитета одговора на дејство фактора који афектирају физиолошки еквилибријум. Тако је описано да хипокампус представља структуру која је веома осетљива на дејство штетних фактора, који укључују механичке и васкуларне трауме, као и хемијска оштећења (215-218). У поређењу са другим регионима мозга (*colliculus inferior*), ћелије хипокампуса показују веома снажан одговор на дејство токсичних фактора који се манифестује кроз снажно повећање проапоптотске активности, као и непропорционално велико смањење антиапоптотске заштите (189). Претпоставка је да након примене цисплатине и последичног повећања оксидативног оштећења, које је на претходно описани начин повезано са стимулацијом апоптотских механизма, долази до активације бројних неуродегенеративних процеса који укључују и ћелијску смрт. Из наведених разлога, изгледа вероватно да примена антиоксидантне суплементације успорава развој патолошких процеса на тај начин што смањује утицај повећања оксидативног стреса на низ последичних каскадних реакција које финално доводе до трајне неуроналне дисфункције.

Корисни ефекти оралне администрације екстракта SHL на поновно успостављање еквилибријума између про- и антиапоптотских фактора, претходно нарушено једнократном применом цисплатине (у правцу фаворизовања апоптотских механизма) у хомогенату ткива хипокампуса пацова, се јасно уочавају на Слици 4.22. Интересантно је да за разлику од појединачног утицаја на релативну експресију проапоптотских (*Bax* и *каспаза-3*), као и антиапоптотског гена (*Bcl-2*), утицај екстракта SHL се на квантитативни однос експресије гена *Bax/Bcl-2* у хипокампусу испољавао статистички значајно у свим примењеним дозама (50, 100 и 200 mg/kg).

И када се говори о утицају антиоксидантне суплементације екстрактом SHL на апоптотску активност у хипокампусу пацова (након примене цисплатине), значајно је поменути и потенцијални утицај других компоненти овог екстракта са антиоксидантним својствима. Наиме, иако се у екстракту ове биљке налазе у малим концентрацијама у поређењу са значајним уделом рузмаринске киселине (чији су ефекти широко елаборирани у претходном тексту), и поједини други састојци примењиваног екстракта могу имати потенцијалне протективне ефекте код неуротоксичности изазване цисплатином. Иако не постоје подаци о директним ефектима у нервном ткиву, веома је важно поменути да састојци екстракта SHL коришћеног у овој студији, кверцетин (219) и нарингенин (206), ублажавају манифестације нефротоксичности изазване цисплатином,

док лутеолин инхибира накупљање платине, инфламацију и апоптозу у ткиву бубрега након третмана цисплатином (208).

Као и када је анализиран утицај на параметре оксидативног стреса, у циљу поређења нумеричких параметара којима се квантификује утицај спроведених протокола на апоптотску активност у хомогенату ткива хипокампуса пацова, у овој студији је анализиран и третман силимарином, с обзиром да се сматра златним стандардом за испитивање препарата са антиоксидантним својствима. И ови резултати потврђују да су ефекти екстракта SHL на промене параметара апоптотске активности у хипокампусу узроковане појединачном администрацијом цисплатине веома сличне утицају оралног третмана силимарином у истој дози (100 mg/kg).

Утицај екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне промене изазване цисплатином

Претходно описане и анализиране промене понашања изазване једнократном применом цисплатине које су се, према вредностима свих параметара добијеним у спроведеним бихевиоралним тестовима манифестовале у форми јасног и снажног анксиогеног ефекта, су биле значајно измењене (ублажене или, чак, анулиране) након спроведене антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Satureja hortensis* L.

Резултати добијени у тесту отвореног поља показују да је примена екстракта SHL у дози од 100 mg/kg доводила до поништавања анксиогеног ефекта цисплатине који се манифестовао кроз смањење директних индикатора анксиозности у тесту отвореног поља – УВЦЗ и БУЦЗ (Слике 4.1 и 4.2). Администрација екстракта SHL у другим дозама није показала протективни ефекат према вредностима ова два параметра. Наиме, најмања примењена доза екстракта SHL (50 mg/kg) није утицала на вредност УВЦЗ и БУЦЗ, док је највећа примењена доза екстракта (200 mg/kg) доводила до повећања вредности ових параметара које је било мањег интензитета у поређењу са дозом од 100 mg/kg, и статистички значајно мање у односу на контролне вредности. Веома слични одговори на примену екстракта SHL се уочавају и када се ради о утицају на промене локомоторне (УПП и %ВК, Слике 4.3 и 4.4) и експлоративне (БУ, Слика 4.5) активности изазване једнократном применом цисплатине. Имајући у виду да се тест уздигнутог крстастог лавиринта сматра још сензитивнијим за евалуацију анксиозности у поређењу са тестом отвореног поља, у овој студији су детерминисани и параметри УКЛ теста. Очекивано, резултати добијени у УКЛ тесту су у потпуној сагласности са резултатима ОП теста - једнократна примена цисплатине повећава степен анксиозности, према вредностима директних индикатора (УВОК и БУОК, Слике 4.6 и 4.7), као и према вредностима показатеља локомоторне (УПП и %ВК, Слике 4.8 и 4.9) и експлоративне (БН, БУ и УБЕЕА Слика 4.10 - 12) активности (индиректни индикатори анксиозности), док је примена екстракта SHL имала значајан протективни ефекат на промене степена анксиозности изазване цисплатином (без значајног утицаја када је самостално примењиван).

Како подаци из литературе не омогућавају поређење бихевиоралних ефеката екстракта SHL (нити најзначајнијих антиоксидантних компоненти ове биљке) са

результатима ове студије, индикувано је да се у анализи утицаја третмана спроведених у овој студији изврши поређење са резултатима истраживања у којима су испитивани ефекти других извора антиоксиданаса на промене степена анксиозности изазване цисплатином. Тако је примена куркуме, такође након једнократне администрације цисплатине (12 mg/kg), током 14 узастопних дана пре апликације цисплатине и 5 дана након, доводила до статистички значајног побољшања индиректни параметара за процену степена анксиозности који су били драматично смањени применом цисплатине код пацова (219). Побољшање локомоције и експлоративне активности након антиоксидантне суплементације наночестицама куркуме је у овом истраживању било удружено са смањењем липидне пероксидације (изражено преко MDA), као и апоптотске активности (каспаза-3) у хомогенату кортекса пацова.

Примена антиоксидантне суплементације се показала ефикасном у ублажавању анксиогених ефеката цисплатине и након хроничне примене овог цитостатика. У студији где је на пацовима испитиван утицај продужене антиоксидантне суплементације екстрактом добијеним из пистаћа током администрације цисплатине у недељној дози од 5 mg/kg (у трајању од пет недеља), показано је да ова врста суплементације има користан ефекат на анксиозност изазвану применом цисплатине која се манифестовала преко опоравка експлоративне и локомоторне активности (220). Треба напоменути да је резултатима исте студије показано да ова врста антиоксидантне суплементације показује и корисне ефекте и на цисплатином изазване неуродегенеративне промене (у једру и цитоплазми неурона) које су хистолошки верификоване у церебелуму и хипокампусу. Веома слични резултати су представљени и у студији у којој је уз хронични третман цисплатином (5 недеља по 5 mg/kg недељно) спровођена и антиоксидантна суплементација у форми конзумирања плодова ораха (172). И резултати овог истраживања недвосмислено показују да је пролонгирана суплементација овим извором антиоксиданаса показивала користан ефекат у смислу смањивања степена анксиозности изазване цисплатином, што се манифестовало побољшањем локомоторне и експлоративне активности у тесту отвореног поља. За разлику од резултата претходне студије, у овом истраживању није потврђено да су корисни бихевиорални ефекти антиоксидантне суплементације повезани са смањењем неуродегенеративних промена уочених у церебелуму и хипокампусу пацова након третмана цисплатином.

Имајући у виду да резултати добијени у трећем бихевиоралном тесту који је извођен у овом истраживању, тест качења за реп, по својој структури и понуђеним

објашњењима само додатно појачавају тумачење преко доминантног анксиогеног одговора на администрацију цисплатине, као и ублажавању анксиогеног ефекта цисплатине применом екстракта SHL, чини се да и њихова интерпретација, односно поређење са подацима из литературе има исту суштину као и анализа резултата тестова који се изворно примењују за испитивање промена степена анксиозности.

Анализа каузалне повезаности резултата бихевиоралних тестова и оксидативног баланса и апоптотске активности у хипокампусу

Анализирајући међусобну повезаност промена параметара добијених у овом истраживању намеће се неколико правилности које могу бити добра основа за финално извођење закључака о каузалној повезаности процеса испитиваних у овој студији.

Наши резултати недвосмислено показују да једнократна примена цисплатине доводи до повећања оксидативног стреса у хомогенату ткива хипокампуса пацова, што се манифестовало кроз повећање липидне пероксидације (Слика 4.16) и смањење активности антиоксидантних ензима (Слике 4.17 и 4.18). Према подацима из литературе (66), оксидативно оштећење нервног ткива је тригер механизам који отпочиње каскадну реакцију која финално доводи до повећања апоптозе што је квантитативно потврђено и преко повећања липидне пероксидације (Слика 4.24), и преко смањења антиоксидантне заштите (Слика 4.25). Такође, подаци из литературе (221) потврђују и негативну корелацију између садржаја BDNF и апоптотске активности у хипокампусу. Коначно, јасно је потврђено да садржај BDNF у хипокампусу има директне (и позитивне) ефекте на бројне функције које се доминантно контролишу од стране структура у хипокампусу, укључујући и описани анксиолитички ефекат (222).

На основу наведених чињеница се да претпоставити да директно дејство анксиолитичке суплементације (попут оне која је примењена у овој студији) првенствено утиче на смањење оксидативног стреса у хипокампусу, што за последицу има смањење апоптотске активности и, коначно, ублажавање анксиогеног ефекта изазваног цисплатином (Слика 4.26).

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу анализе резултата добијених у овом истраживању може се закључити следеће:

- Једнократна примена цисплатине у дози од 7.5 mg/kg доводи до повећања оксидативног стреса и апоптотске активности у хомогенату ткива хипокампуса пацова
- Апликација цисплатине за последицу има снажно повећање степена анксиозности
- Паралелна примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. у дози од 100 mg/kg спречава оксидативно оштећење и апоптозу изазвану цисплатином у хомогенату ткива хипокампуса пацова
- Симултана антиоксидантна суплементација екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. у дози од 100 mg/kg анулира анксиогени ефекат цисплатине
- Дозе екстракта SHL од 50 и 200 mg/kg нису адекватне за спречавање нежељених неуротоксичних ефеката цисплатине

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer*. 2018; 9(10):1773-1781. doi: 10.7150/jca.24577.
2. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*. 2015; 12(1):3-20.
3. Abraham J, Staffurth J. Hormonal therapy for cancer. *Medicine*. 2011; 39(12):723-727.
4. Das SK, Menezes ME, Bhatia S, Wang X-Y, Emdad L, Sarkar D, Fischer P. Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *J Cell Physiol*. 2015; 230(2):259–271. doi:10.1002/jcp.24791.
5. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4):250-281. doi: 10.3322/caac.20114.
6. Shewach DS, Kuchta RD. Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem Rev*. 2009; 109(7):2859–2861. doi:10.1021/cr900208x.
7. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019; 88:102925. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
8. Barry N, Sadler P. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure Appl. Chem*. 2014, 86:1897-1910.
9. Rosenberg B, VanCamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965; 205:698-699.
10. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222(5191):385-386.
11. Schaeppi U, Heyman IA, Fleischman RW, Rosenkrantz H, Ilievski V, Phelan R, Cooney DA, Davis RD. cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119 875): preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1973; 25(2):230-241.
12. Rosenberg B. Chapter 2 – Cisplatin: Its history and possible mechanisms of action Archie W. Prestayko, Stanley T. Crooke, Stephen K. Carter (Eds.), *Cisplatin*, Academic Press (1980), 9-20.

13. Youlten DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol.* 2008; 3(8):819-831. doi: 10.1097/JTO.0b013e31818020eb.
14. Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(5):471-478.
15. Iwasaki Y, Nagata K, Nakanishi M, Natuhara A, Kubota Y, Ueda M, Arimoto T, Hara H. Double-cycle, high-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide followed by peripheral blood stem-cell transplantation for small cell lung cancer. *Chest.* 2005; 128(4):2268-2273.
16. Kosmas C, Tsavaris NB, Malamos NA, Vadiaka M, Koufos C. Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin as second-line treatment in relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19(1):119-126.
17. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L, Spiro SG, Rolland E, Fossati R, Aubert D, Ding K, Waller D, Le Chevalier T; LACE Collaborative Group. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008; 26(21):3552-3559. doi: 10.1200/JCO.2007.13.9030.
18. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(7):502-516.
19. Kakar SS, Jala VR, Fong MY. Synergistic cytotoxic action of cisplatin and withaferin A on ovarian cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(4):819-825. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.047.
20. Meng F, Sun G, Zhong M, Yu Y, Brewer MA. Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2013; 108(3):579-586. doi: 10.1038/bjc.2013.10.
21. Basu A, Tu H. Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(4):1068-1073.

22. Scher HI. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Urol.* 1992; 148(5):1625-1626.
23. Matsuki M, Takahashi A, Katou S, Takayanagi A, Takagi Y, Kamata K. Pathological complete response to gemcitabine and cisplatin chemotherapy for advanced upper tract urothelial carcinoma: a case report. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 2013; 104(1):33-37.
24. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47):7265-7279.
25. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol.Rev.* 2012; 64:706–721.
26. Johnson SW, Shen D, Pastan I, Gottesman MM, Hamilton TC. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. *Exp.Cell Res.* 1996; 226:133–139.
27. Singh L, Aldosary S, Saeedan AS, Ansari MN, Kaithwas G. Prolyl hydroxylase 2: a promising target to inhibit hypoxia-induced cellular metabolism in cancer cells. *Drug Discov Today.* 2018; 23(11):1873-1882. doi:10.1016/j.drudis.2018.05.016.
28. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 2004; 31:862–867.
29. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev.Toxicol.* 2010; 40:347–359.
30. Jefford M, Michael M, Rosenthal MA, Davis ID, Green M, McClure B, Smith J, Waite B, Zalcborg J. A novel combination of cisplatin, irinotecan, and capecitabine in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs.* 2004; 22(2):185-92.
31. Wang Y, Fang J. P1.17-011 Efficacy and Toxicities of Gemcitabine and Cisplatin Combination Chemotherapy in Advanced Thymoma and Thymic Carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology.* 2017; 12(11):2064-2065.

32. Ai D, Guan Y, Liu XJ, Zhang CF, Wang P, Liang HL, Guo QS. Clinical comparative investigation of efficacy and toxicity of cisplatin plus gemcitabine or plus Abraxane as first-line chemotherapy for stage III/IV non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2016; 9:5693-5698.
33. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin.Nephrol.* 2003; 23:460–464.
34. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1997; 12:2478–2480.
35. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 2010; 10(1):54-61. doi: 10.1038/tpj.2009.45.
36. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am.J.Med.Sci.* 2007; 334:115–124.
37. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99:14298–14302.
38. dos Santos NA, Martins NM, Curti C, Pires Bianchi ML, dos Santos AC. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chem.Biol.Interact.* 2007; 170:177–186.
39. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol.Res.* 2004; 50:287–290.
40. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J.Biochem.Mol.Biol.* 2006; 39:656–661.
41. Iseri S, Ercan F, Gedik N, Yuksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology.* 2007; 230:256–264.
42. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2004; 44:27–42.

43. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp.Toxicol.Pathol.* 2010; 62:45–52.
44. Cetin R, Devrim E, Kilicoglu B, Avci A, Candir O, Durak I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J.Appl.Toxicol.* 2006; 26:42–46.
45. Tlili N, Feriani A, Allagui MS, Saadoui E, Khaldi A, Nasri N. Effects of *Rhus tripartitum* fruit extract on CCl₄-induced hepatotoxicity and cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016; 94(8):801-807. doi:10.1139/cjpp-2016-0029.
46. Karavelioglu E, Boyaci MG, Simsek N, Sonmez MA, Koc R, Karademir M, Guven M, Eser O. Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity. *Acta Cir Bras.* 2015; 30(6):394-400. doi: 10.1590/S0102-865020150060000004.
47. Salman M, Naseem I, Hassan I, Khan AA, Alhazza IM. Riboflavin Arrests Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Ameliorating Cellular Damage in Dorsal Root Ganglion Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 603543. doi: 10.1155/2015/603543.
48. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitinedepleted rat model. *Pharmacol.Res.* 2006; 53:278–286.
49. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert.Opin.Pharmacother.* 2003; 4:889– 901.
50. Avan A, Postma TJ, Ceresa C, Avan A, Cavaletti G, Giovannetti E, Peters GJ. Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. *Oncologist* 2015; 20: 411-432.
51. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother Res Pract* 2011; 2011: 843019. doi: 10.1155/2011/843019.
52. Kelley MR, Jiang Y, Guo C, Reed A, Meng H, Vasko MR. Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. *PLoS One* 2014; 9: e106485. doi: 10.1371/journal.pone.0106485.
53. Chiorazzi A, Semperboni S, Marmiroli P. Current view in platinum drug mechanisms of peripheral neurotoxicity. *Toxics* 2015; 3: 304-321. doi: 10.3390/toxics3030304.

54. Park SB, Goldstein D, Krishnan AV, Lin CS, Friedlander ML, Cassidy J, Koltzenburg M, Kiernan MC. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 419-437. doi: 10.3322/caac.21204.
55. Velasco R, Bruna J, Briani C, Argyriou AA, Cavaletti G, Alberti P, Frigeni B, Cacciavillani M, Lonardi S, Cortinovis D, Cazzaniga M, Santos C, Kalofonos HP. Early predictors of oxaliplatin-induced cumulative neuropathy in colorectal cancer patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 392-398. doi: 10.1136/jnnp-2013-305334.
56. Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci Lett* 2015; 596: 90-107.
57. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology* 2006; 27: 992-1002.
58. Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol Pain* 2008; 4:10. doi: 10.1186/1744-8069-4-10.
59. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica (Cairo)* 2012; 2012:473829. doi: 10.6064/2012/473829.
60. McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2005; 18:305-313.
61. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* 2011; 41:661-668.
62. Leo M, Schmitt LI, Erkel M, Melnikova M, Thomale J, Hagenacker T. Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol* 2017; 288:62-74. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.11.003.

63. Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain* 2012; 8:55. doi: 10.1186/1744-8069-8-55.
64. Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain* 2010; 6:15. doi: 10.1186/1744-8069-6-15.
65. Dietrich, J., Han, R., Yang, Y., Mayer-Pröschel, M., Noble M. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol.* 2006; 5:22.
66. Lomeli N, Di K, Czerniawski J, Guzowski JF, and Bota DA. Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 2017; 102: 274-286.
67. Abdelkader NF, Saad MA, and Abdelsalam RM. Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *Journal of Neurochemistry.* 2017; 141(3): 449-460.
68. Pantic M, and Minic M. The evaluation of the effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced alterations in exploratory activity in elevated plus maze test in rats. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2017; 1(1). doi: 10.1515/SJECR-2017-0053.
69. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
70. Fridovich I. *Free Radicals in Biology.* Vol. 1. New York: Academic Press; 1976.
71. Limón-Pacheco J, Gonsebatt Bonaparte ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2009; 674(1-2):137-147. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015 .
72. Saito K, Kohno M, Yoshizaki F, Niwano Y. Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. *Plant Foods Hum Nutr.* 2008; 63(2):65–70.

73. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C and Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In book: Antioxidants. doi: 10.5772/intechopen.85270.
74. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18(6):655-673.
75. Rice-Evans C. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. In: *Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction.* London: Portland Press. 1995; 1-32.
76. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:239-267.
77. Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, Ketaki S, Ghaskadbhi S, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004; 52:794-804.
78. Powell SR. The antioxidants properties of zinc. *J Nutr.* 2000; 130(5S Suppl):1447S-1454S.
79. Venkat Ratnam D, Ankola DD, Bhardwaj V, Shana Dk. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006; 113:189-207.
80. Shastri A, Srivastava R, Jyot B, Gupta M. The antioxidants-scavengers of free radicals for immunity boosting and human health/ overall well being. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2016; 3(10): 2918-2923.
81. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(4):840-860. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
82. Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 2000; 50(1):5-18.
83. Paran E, Novack V, Engelhard YN, Hazan-Halevy I. The effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2009; 23(2):145-151. doi: 10.1007/s10557-008-6155-2.

84. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, Marui N, Matsumoto K, Fujioka A, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Letters*. 1990; 260(1):10-13. doi: 10.1016/0014-5793(90)80053-L.
85. Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, et al. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *International Journal of Cancer*. 1992; 50(3):486-492. doi: 10.1002/ijc.2910500326.
86. Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *British Journal of Cancer*. 1990; 62:942-947.
87. Ren W, Qiao Z, Wang H. Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2001; 23:427-432.
88. Britton S, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editors. *Carotenoids: Handbook*. Boston, MA, USA: Birkhäuser; 2004.
89. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014 Jan 27; 6(2):466-488. doi:10.3390/nu6020466.
90. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(6):1265-1271.
91. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996; 334(18):1145-1149.
92. Mayne ST, Goodwin WJ. Chemoprevention of head and neck cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 1993; 1:126-132.
93. Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol*. 2005; 23(32):8152-8160.

94. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86:6377-6381. doi: 10.1073/pnas.86.16.6377.
95. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal*. 2007; 274:1-22. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x.
96. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22(1):18-35.
97. Griffiths HR, Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century—More than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001; 10:173-182.
98. Rumsey SC, Levine M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *Nutritional Biochemistry*. 1998; 9:116-130.
99. Davidson A. *The Oxford companion to food*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.
100. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr*. 2003; 133(5):1286-1290.
101. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(10):4113–4117.
102. Alok S, Jain SK, Verma A, Kumar M, Mahor A, Sabharwal M. Herbal antioxidant in clinical practice: a review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014; 4(1):78-84. doi:10.1016/S2221-1691(14)60213-60216.
103. Niwano Y, Saito K, Yoshizaki F, Kohno M, Ozawa T Extensive screening for herbal extracts with potent antioxidant properties. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; 48(1):78-84.
104. Sawant O, Kadam VJ, Ghosh R. *In vitro* free radical scavenging and antioxidant activity of *Adiantum lunulatum*. *J Herbal Med Toxicol*. 2009; 3(2):39–44.
105. Fischer R, Kjaer SK, Dahl C, Asping U. Ginger treatment of hyperemesis gravidarum. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991; 38(1):19–24.
106. Balch PA. *Prescription for nutritional healing*. 4th ed. New York, USA: Penguin Books; 2006.

107. Soumyakanti A, Kavirayani IP, Tulsi M. Physico-chemical studies on the evaluation of the antioxidant activity of herbal extracts and active principles of some Indian medicinal plants. *J Clin Biochem Nutr.* 2007; 40(3):174–183.
108. Rai GS, Shovlin C, Wesnes KA. A double-blind, placebo controlled study of *Ginkgo biloba* extract (“tanakan”) in elderly outpatients with mild to moderate memory impairment. *Curr Med Res Opin.* 1991; 12(6):350–355.
109. Chan EWC, Lim YY, Chong KL, Tan JBL, Wong SK. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *J Food Compos Anal.* 2010; 23(2):185–189.
110. Baker ME, Fanestil DD. Licorice, computer-based analyses of dehydrogenase sequences, and the regulation of steroid and prostaglandin action. *Mol Cell Endocrinol.* 1991; 78(1–2):99–102.
111. Wang L, Yang R, Yuan B, Liu Y, Liu C. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5(4):310–315. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.005.
112. Chung MJ, Kim JM, Lee S, Kim T, Kim D, Baek J, Kim T, Lee J, Kim K, Yoon JA, Choe M. Suppressive effects of *Schizandra chinensis* Baillon water extract on allergy-related cytokine generation and degranulation in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells. *Nutr Res Pract.* 2012; 6(2):97-105. doi: 10.4162/nrp.2012.6.2.97.
113. Yan T, He B, Wan S, Xu M, Yang H, Xiao F, Bi K, Jia Y. Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of *Schisandra chinensis* in chronic unpredictable mild stress mice and its related mechanism. *Sci Rep.* 2017; 7(1):6903. doi: 10.1038/s41598-017-07407-1.
114. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules.* 2011; 16(6):4567–4598.
115. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 2009; 14(2):141-153. Erratum in: *Altern Med Rev.* 2009; 14(3):277.
116. Yang M, Akbar U, Mohan C. Curcumin in Autoimmune and Rheumatic Diseases. *Nutrients.* 2019; 11(5). pii: E1004. doi: 10.3390/nu11051004.

117. Ravindran PN, Pillai GS, Divakaran M. Other Herbs and Spices: Mango Ginger to Wasabi. In: Peter K.V., editor. Handbook of Herbs and Spices. Volume 2. Woodhead Publishing; Cambridge, UK: 2012; 557–582.
118. Hamidpour R., Hamidpour S., Hamidpour M., Shahlari M., Sohraby M. Summer Savory: From the Selection of Traditional Applications to the Novel Effect in Relief, Prevention, and Treatment of a Number of Serious Illnesses such as Diabetes, Cardiovascular Disease, Alzheimer's Disease, and Cancer. *J Tradit. Complement. Med.* 2014; 4:140–144. doi: 10.4103/2225-4110.136540.
119. Fierascu I, Dinu-Pirvu CE, Fierascu RC, Velescu BS, Anuta V, Ortan A, Jinga V. Phytochemical Profile and Biological Activities of *Satureja hortensis* L.: A Review of the Last Decade. *Molecules.* 2018; 23(10). pii: E2458. doi: 10.3390/molecules23102458.
120. Momtaz S, Abdollahi M. An Update on Pharmacology of *Satureja* Species; From Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. *Int. J. Pharmacol.* 2010; 6:346–353. doi: 10.3923/ijp.2010.346.353.
121. Mašković P., Veličković V., Mitić M., Đurović S., Zeković Z., Radojković M., Cvetanović A., Švarc-Gajić J., Vujić J. Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity. *Ind. Crop Prod.* 2017; 109:875–881. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.063.
122. Bahramikia S., Yazdanparast R., Nosrati N. A comparison of antioxidant capacities of ethanol extracts of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculus* leaves. *Pharmacologyonline.* 2008; 2:694–704.
123. Boroja T., Katanić J., Rosić G., Selaković D., Joksimović J., Mišić D., Stanković V., Jovičić N., Mihailović V. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 118:252–263. doi: 10.1016/j.fct.2018.05.001.
124. Ramos M., Beltrán A., Peltzer M., Valente A.J.M., del Carmen Garrigós M. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT Food Sci. Technol.* 2014; 58:470–477. doi: 10.1016/j.lwt.2014.04.019.

125. Chen Q., Gan Z., Zhao J., Wang Y., Zhang S., Li J., Ni Y. In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. *LWT Food Sci. Technol.* 2014; 55:632–637. doi: 10.1016/j.lwt.2013.09.017.
126. Chua L.S., Lau C.H., Chew C.Y., Ismail N.I.M., Soontorngun N. Phytochemical profile of *Orthosiphon aristatus* extracts after storage: Rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives. *Phytomedicine.* 2018; 39:49–55. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.015.
127. Lesjak M., Beara I., Simin N., Pintać D., Majkić T., Bekvalac T., Orčić D., Mimica-Dukić N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Food.* 2018; 40:68–75. doi: 10.1016/j.jff.2017.10.047.
128. Jafari F, Ghavidel F, Zarshenas MM. A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular *Satureja* Species. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 2016; 9:118–127. doi: 10.1016/j.jams.2016.04.003.
129. Mahboubi M., Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iran J. Microbiol.* 2011; 3:194–200.
130. Shojaee-Aliabadi S., Hosseini H., Mohammadifar M.A., Mohammadi A., Ghasemlou M., Ojagh S.M., Hosseini S.M., Khaksar R. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013; 52:116–124. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026.
131. Feyzioglu G.C., Tornuk F. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT Food Sci. Technol.* 2016; 70:104–110. doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.037.
132. Iturriaga L., Olabarrieta I., de Marañón I.M. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 1:58–64. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.001.
133. Nabigol A. Chemical composition and anti-fungal activities of three essential oils from *Satureja* spp. on four post-harvest pathogens of strawberry fruit. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2011; 86:371–376. doi: 10.1080/14620316.2011.11512776.

134. Sharifzadeh A, Khosravi AR, Ahmadian S. Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV⁺ individuals. *Microb. Pathogen.* 2016; 96:1–9. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.014.
135. Soosaraei M., Fakhar M., Teshnizi S.H., Hezarjaribi H.Z., Banimostafavi E.S. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Med. Surg. (Lond.)* 2017; 21:63–80. doi: 10.1016/j.amsu.2017.07.057.
136. Pirali KK, Dehghani SA, Adel M, Hoseinpour F. The effect of essential oil of *Nigella sativa* and *Satureja hortensis* on promastigot stage of *Leishmania major*. *Armaghan-e-Danesh.* 2013; 18:687–698.
137. Carvalho Costa D, Costa HS, Gonçalves Albuquerque T, Ramos F, Castilho MC, Sanches-Silva A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* 2015; 45:336–354. doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.009.
138. Hajhashemi V, Zolfaghari B, Yousefi A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Med. Princ. Pract.* 2012; 21:178–182. doi: 10.1159/000333555.
139. Vafaei AA, Miladi-Gorji H, Taherian AA, Bagerian M. Effects of *Valeriana officinalis*, *Satureja hortensis*, and *Mentha piperita* extracts on the withdrawal syndrome signs in mice. *Koomesh.* 2011; 12:342–347.
140. Misharina TA, Burlakova EB, Fatkullina LD, Terenina MB, Krikunova NI, Vorobeva AK, Erokhin VN, Goloshchapov AN. Changes in fatty acid composition in the brain and liver in aging mice of high cancer risk AKR strain and effect of savory essential oil administration on leukemic process. *Biomed. Khim.* 2011; 57:604–614. doi: 10.18097/pbmc20115706604.
141. Caillet S, Lessard S, Lamoureux G, Lacroix M. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. *Food Chem.* 2011; 124:1699–1707. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.082.
142. Ceker S, Agar G, Alpsoy L, Nardemir G, Kizil HE. Antagonistic effects of *Satureja hortensis* essential oil against AFB1 on human lymphocytes in vitro. *Tsitol. Genet.* 2014; 48:65–71. doi: 10.3103/S0095452715010120.

143. Neves JM, Matos C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal) J. Ethnopharmacol. 2009; 124:270–283. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.041.
144. Jarića S, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mitrović M, Kostić O, Karadžić B, Pavlović P. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia) J. Ethnopharmacol. 2015; 174:93–108.
145. Carrio E, Valles J. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea) J. Ethnopharmacol. 2012; 141:1021–1040. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.049.
146. Selakovic, D. (2018). Bihevioralni efekti hronične primene suprafizioloških doza androgenih anaboličkih steroida i programiranog trenažnog procesa kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
147. Joksimovic, J. (2018). Uticaj androgenih anaboličkih steroida na bihevioralne manifestacije uzrokovane restrikcijom unosa hrane kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
148. Mijailovic, N. (2019). Bihevioralni efekti dugotrajne primene dijetetskih protokola sa povećanim sadržajem metionina i nedostatkom folata, piridoksina i kobalamina kod pacova. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
149. Stajic, D. (2019). Uticaj galektina-3 u modulaciji ponašanja. Doktorska disertacija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu.
150. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. Neuro Endocrinol Lett. 2014; 35(8):703-10.
151. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. European Journal of Pharmacology. 2003; 463(1–3):3-33.
152. Bento-Silva MT, Martins MCC, Torres-Leal FL, Barros TL, Carvalho ILNF, Filho HAC, Almeida FRC. Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. Braz J Pharm Sci. 2010; 46(1):79-89.

153. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21(6):801-810.
154. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, Rosic G. The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test - indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for ex. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016; 37(5):383-388.
155. Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol.* 1986; 17(3):348-350.
156. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, and Randall RI. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 1951; 193:265–275.
157. Beers RF and Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry.* 1952; 195(1):133–140.
158. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247:3170-3175.
159. Ellman GL. Tissue sulphydryl group. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82:70-77.
160. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
161. Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6(1):48-54.
162. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 1996; 88(2):386-401.
163. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74(4):609-619.
164. Martinho N, Santos TCB, Florindo HF, Silva LC. Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Front Physiol.* 2019; 9:1898. doi: 10.3389/fphys.2018.01898.

165. McGuire WP 3rd, Markman M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br J Cancer*. 2003; 89 Suppl 3:S3-8.
166. Jacobs S, McCully CL, Murphy RF, Bacher J, Balis FM, Fox E. Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 65(5):817-824. doi: 10.1007/s00280-009-1085-7.
167. Troy L, McFarland K, Littman-Power S, Kelly BJ, Walpole ET, Wyld D, Thomson D. Cisplatin-based therapy: a neurological and neuropsychological review. *Psychooncology*. 2000; 9(1):29-39.
168. Kaasa S, Olsnes BT, Thorud E, Høst H. Reduced short-term neuropsychological performance in patients with nonsmall-cell lung cancer treated with cisplatin and etoposide. *Antibiot Chemother (1971)*. 1988; 41:226-231.
169. Verstappen CC, Heimans JJ, Hoekman K, Postma TJ. Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management. *Drugs*. 2003;63(15):1549-63.
170. Abdelkader NF, Saad MA, Abdelsalam RM. Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *J Neurochem*. 2017; 141(3):449-460. doi: 10.1111/jnc.13978.
171. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol Behav*. 2014; 135:55-71. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.032.
172. Shabani M, Nazeri M, Parsania S, Razavinasab M, Zangiabadi N, Esmailpour K, Abareghi F. Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2012; 33(5):1314-1321. doi: 10.1016/j.neuro.2012.08.004.
173. Jangra A, Kwatra M, Singh T, Pant R, Kushwah P, Ahmed S, Dwivedi D, Saroha B, Lahkar M. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 2016; 791:51-61. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.08.003.
174. Abdelkader NF, Saad MA, Abdelsalam RM. Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *J Neurochem*. 2017; 141(3): 449-460.

175. Liu Y, Hamaue N, Endo T, Hirafuji M, Minami M. 5-hydroxytryptamine (5-HT) concentrations in the hippocampus, the hypothalamus and the medulla oblongata related to cisplatin-induced pica of rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2003; 113-114:97-113.
176. Dietrich J, Han R, Yang Y, Mayer-Pröschel M, Noble M. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol*. 2006; 5(7):22. doi: 10.1186/jbiol50.
177. James SE, Burden H, Burgess R, Xie Y, Yang T, Massa SM, Longo FM, Lu Q. Anti-cancer drug induced neurotoxicity and identification of Rho pathway signaling modulators as potential neuroprotectants. *Neurotoxicology*. 2008; 29(4):605-12. doi: 10.1016/j.neuro.2008.04.008.
178. Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24(10):3012-3020. doi: 10.1093/ndt/gfp242.
179. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 2009; 61(3):223-242. doi: 10.1016/j.etp.2008.09.003.
180. Turan MI, Cayir A, Cetin N, Suleyman H, Siltelioglu Turan I, Tan H. An investigation of the effect of thiamine pyrophosphate on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in rat brain tissue compared with thiamine: thiamine and thiamine pyrophosphate effects on cisplatin neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 33(1):14-21. doi: 10.1177/0960327113485251.
181. Aydin D, Peker EG, Karakurt MD, Gurel A, Ayyildiz M, Cevher ŞC, Agar E, Dane S. Effects of Ginkgo biloba extract on brain oxidative condition after cisplatin exposure. *Clin Invest Med*. 2016; 39(6):27511.
182. Kursunluoglu G, Taskiran D, Kayali HA. The Investigation of the Antitumor Agent Toxicity and Capsaicin Effect on the Electron Transport Chain Enzymes, Catalase Activities and Lipid Peroxidation Levels in Lung, Heart and Brain Tissues of Rats. *Molecules*. 2018; 23(12):E3267. doi: 10.3390/molecules23123267.
183. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther*. 2019; 13:1155-1162. doi: 10.2147/DDDT.S191240.

184. Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2008; 28(50):13574-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4099-08.2008.
185. Wang WF, Wu SL, Liou YM, Wang AL, Pawlak CR, Ho YJ. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav Neurosci*. 2009; 123(6):1261-1270. doi: 10.1037/a0017401.
186. Sulakhiya K, Keshavlal GP, Bezbaruah BB, Dwivedi S, Gurjar SS, Munde N, Jangra A, Lahkar M, Gogoi R. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neurosci Lett*. 2016; 611:106-111. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.031.
187. Eisch AJ. Adult neurogenesis: implications for psychiatry. *Prog Brain Res*. 2002; 138:315-342.
188. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(1):9-23.
189. Manohar S, Jamesdaniel S, Salvi R. Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes. *Neurotox Res*. 2014; 25(4):369-80. doi: 10.1007/s12640-013-9443-y.
190. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C, Cantos B, España P, Verdaguer JM, Trinidad Cabezas A. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(7):1012-1020.
191. Rathinam R, Ghosh S, Neumann WL, Jamesdaniel S. Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. *Cell Death Discov*. 2015; 1:15052.
192. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res*. 2005; 15:749-769.
193. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*. 2012; 19(1):67-74. doi: 10.1038/cdd.2011.158.

194. Adomako-Bonsu AG, Chan SL, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol In Vitro*. 2017; 40:248-255. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.016.
195. Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, Dhama K. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim Health Res Rev*. 2017; 18(2):167-176. doi: 10.1017/S1466252317000081.
196. Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Z, Škoda M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014; 66:321-328. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.002.
197. Iswandana R, Pham BT, van Haaften WT, Luangmonkong T, Oosterhuis D, Mutsaers HA, Olinga P. Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicol In Vitro*. 2016; 32:261-8. doi: 10.1016/j.tiv.2016.01.009.
198. Ngo YL, Lau CH, Chua LS. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem Toxicol*. 2018; 121:687-700. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.064.
199. Tavafi M, Ahmadvand H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue Cell*. 2011; 43(6):392-397. doi: 10.1016/j.tice.2011.09.001.
200. Costa P, Sarmiento B, Gonçalves S, and Romano A. Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line. *Industrial Crops and Products* 2013; 50:361-365.
201. Mosaffa F, Behravan J, Karimi G, Iranshahi M. Antigenotoxic effects of *Satureja hortensis* L. on rat lymphocytes exposed to oxidative stress. *Arch Pharm Res*. 2006; 29(2):159-164.
202. Chkhikvishvili I, Sanikidze T, Gogia N, Mchedlishvili T, Enukidze M, Machavariani M, Vinokur Y, Rodov V. Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:456253. doi: 10.1155/2013/456253.
203. Hasanein P, Seifi R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018; 96(1):32-37. doi: 10.1139/cjpp-2017-0135.

204. Rehman MU, Ali N, Rashid S, Jain T, Nafees S, Tahir M, Khan AQ, Lateef A, Khan R, Hamiza OO, Kazim S, Qamar W, Sultana S. Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers. *Pharmacol Rep.* 2014; 66(6):1050-1059.
205. Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol.* 2015; 53(12):1818-1825. doi: 10.3109/13880209.2015.1010738.
206. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 2005; 76(18):2125-2135.
207. Almaghrabi OA. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22(2):227-231. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.12.008.
208. Domitrović R, Cvijanović O, Pugel EP, Zagorac GB, Mahmutefendić H, Škoda M. Luteolin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of platinum accumulation, inflammation and apoptosis in the kidney. *Toxicology.* 2013; 310:115-123. doi: 10.1016/j.tox.2013.05.015.
209. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2000; 1:120–130.
210. Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, Kim DK, Kim SJ, Chun HS. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology.* 2008; 250(2-3):109-115.
211. Owoeye O, Adedara IA, Farombi EO. Pretreatment with taurine prevented brain injury and exploratory behaviour associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102:375-384. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.051.
212. Krüger K, Thomale J, Stojanović N, Osmak M, Henninger C, Bormann S, Fritz G. Platinum-induced kidney damage: Unraveling the DNA damage response (DDR) of renal tubular epithelial and glomerular endothelial cells following platinum injury. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853(3):685-698. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.033.

213. Kuwahara D, Tsutsumi K, Kobayashi T, Hasunuma T, Nishioka K. Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000; 148(1):65-71.
214. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* 2000; 275(40):31199-31203.
215. Chang LW. The neurotoxicology and pathology of organomercury, organolead, and organotin. *J Toxicol Sci.* 1990; 15(Suppl 4):125–151.
216. Geddes DM, LaPlaca MC, Cargill RS., 2nd Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury. *Exp Neurol.* 2003; 184:420–427.
217. Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci.* 1992; 12:4846–4853.
218. Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F, Morales AI, and Lopez-Novoa JM. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011, 26:3484–3495.
219. Khadrawy YA, El-Gizawy MM, Sorour SM, Sawie HG, Hosny EN. Effect of curcumin nanoparticles on the cisplatin-induced neurotoxicity in rat. *Drug Chem Toxicol.* 2019; 42(2):194-202. doi: 10.1080/01480545.2018.1504058.
220. Golchin L, Shabani M, Harandi S, Razavinasab M. Pistachio supplementation attenuates motor and cognition impairments induced by cisplatin or vincristine in rats. *Adv Biomed Res.* 2015; 4:92. doi: 10.4103/2277-9175.156656.
221. Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, Gidday JM, Srinivasan A, Deshmukh M, Holtzman DM. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis.* 2000; 7(1):38-53.
222. Stajic D, Selakovic D, Jovicic N, Joksimovic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Rosic G. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain Behav Immun.* 2019; 78:177-187. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.019.

СКРАЋЕНИЦЕ

SHL – *Satureja hortensis* L.

SOD – супероксид-дисмутаза

CAT – каталаза

GSH – глутатион

OF тест – *open field* тест, тест отвореног поља

УПП – укупни пређени пут

ВК – време кретања

УВЦЗ – укупно време проведено у централној зони

БУЦЗ – број улазака у централну зону

БУ – број усправљања

ЕРМ – *elevated plus maze*, уздигнути крстасти лавиринт

УВОК – укупно време проведено у отвореним крацима

БУОК – број улазака у отворене краке

БН – број нагињања

УБЕЕА – број епизода укупне експлоративне активности

TST – *tail suspension* тест, тест качења за реп

ВППИ – време до појаве прве имобилности

БЕИ – број епизода имобилности

УВИ – укупно време имобилности

TBARS – тиобарбитурна киселина

BDNF – неуротрофични фактор пореклом из мозга

БИОГРАФИЈА

Игор Кумбуровић рођен је 08.03.1975. године. Завршио је Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу 2002. године са просечном оценом 6.94. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета Крагујевцу, смер Неуронауке, уписао је 2012. године. На Медицинском факултету Универзитета у Београду успешно је положио специјалистички испит из гране медицине Општа хирургија 2011. године. Од 2003. године стално је запослен као лекар у Општој болници Котор – хируршко одељење. Тренутно обавља функцију директора Дома здравља „Котор“.

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у два рада објављена у часописима индексираним на *SCI* листи. Резултати рада наведени под редним бројевима 1 и 2 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану докторске дисертације.

Учесник је интерног јуниор пројекта Факултета медицинских наука ЈП 01/19, „Утицај суплементације мелатонином на смањење токсичности изазваних цисплатином“, чији је руководиоца проф. др Гвозден Росић.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Kumburovic I**, Kumburovic D, Vujovic S, Rajkovic Z, Velickovic S. The effects of *Satureja hortensis* L. extract on cisplatin-induced behavioral alterations in the tail suspension test. *Ser J Exp Clin Res*. 2019. In Press. DOI: 10.2478/sjecr-2019-0029
2. **Kumburovic I**, Selakovic D, Juric T, Jovicic N, Mihailovic V, Stankovic JK, Sreckovic N, Kumburovic D, Jakovljevic V, Rosic G. Antioxidant Effects of *Satureja hortensis* L. Attenuate the Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jul 29;2019:8307196. doi: 10.1155/2019/8307196
3. Vukovic R, **Kumburovic I**, Joksimovic Jovic J, Jovicic N, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Djuric M, Velickovic S, Arnaut A, Selakovic D, Rosic G. N-Acetylcysteine Protects against the Anxiogenic Response to Cisplatin in Rats. *Biomolecules*. 2019; 9(12):892. doi:10.3390/biom9120892

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Игор Кумбуровић

Ментор/коментор - МН: др сци. мед. Гвозден Росић, редовни професор

Наслов рада - НР: Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова

Језик публикације - ЈП: српски/ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2020. година

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: Докторска дисертација садржи 145 страна, 32 слике и 222 библиографска податка

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Физиологија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: цисплатина, *Satureja hortensis* L., бихевиорални тестови, оксидативни стрес, апоптоза, хипокампус

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Србија

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Увод: У овој студији су испитивани ефекти екстракта биљке *Satureja hortensis* L. (SHL) на бихевиорлане манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова.

Материјал и методе: Студија је спроведена на 35 пацова Wistar albino соја, старости 2 месеца, телесне масе 200-250 g, подељених у 7 група: контролна, цисплатина, цисплатина+ SHL 50 mg/kg, цисплатина+SHL 100 mg/kg, цисплатина+SHL 200 mg/kg, цисплатина+силимарин 100mg/kg и SHL 200 mg/kg. Цисплатина је примењивана у појединачној дози (7.5 mg/kg), док је антиоксидантна суплементација спровођена орално током 10 дана. Бихевиорални тестови су извођени десетог дана протокола, након чега су животиње жртвоване у циљу добијања узорака хипокампуса за одређивање маркера оксидативног стреса и апоптозе.

Резултати: Резултати бихевиоралног испитивања су показали анксиогени ефекат цисплатине који је био ублажен применом SHL екстракта (100 mg/kg) при чему је слабији одговор био у групама третираним екстрактом SHL у дозама од 50 и 200 mg/kg. Такође, смањење неуротоксичности изазвано цисплатином, у смислу повећања маркера оксидативног стреса и апоптозе, је остварено применом екстракта у дози од 100 mg/kg. Неуропротективни ефекат SHL је био сличан дејству силимарина у истој дози. Екстракт SHL није узроковао значајне промене испитиваних параметара када је примењиван самостално.

Закључак: Анксиогени ефекат, као манифестација неуротоксичности изазване цисплатином, је у бихевиоралним тестовима био успешно умањен оралном применом екстракта SHL у оптималној дози (100 mg/kg). Корисни ефекти ове врсте антиоксидантне суплементације су такође потврђени смањењем оксидативног оштећења и апоптотских механизма.

Кључне речи: цисплатина, *Satureja hortensis* L., бихевиорални тестови, оксидативни стрес, апоптоза, хипокампус

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 30.10.2019. године

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан;
3. доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual printed material

Contents code - CC: Ph.D. Thesis

Author - AU: Igor Kumburovic M.D.

Menthor/co-mentor - MN: Professor Gvozden Rosic, M.D., Ph.D.

Title - TI:

Language of text - LT: Serbian (Cyrillic)

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2020

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69

Physical description - PD: Ph.D. thesis contains 145 pages, 32 pictures, and 222 citations

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Physiology

Subject/key words - SKW: cisplatin, *Satureja hortensis* L., behavioral tests, oxidative stress, apoptosis, hippocampus

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69

Note - N:

Abstract – AB:

Introduction: In this study we evaluated effects of *Satureja hortensis* L. (SHL) extract on behavioral manifestations of cisplatin-induced neurotoxicity in rats.

Material and methods: The study was performed on 35 Wistar albino rats, 2 months old, weighting 200-250 g, divided into 7 groups: control, cisplatin, cisplatin+SHL 50 mg/kg, cisplatin+SHL 100 mg/kg, cisplatin+SHL 200 mg/kg, cisplatin+silymarin 100 mg/kg, and SHL 200 mg/kg. Cisplatin was administered in a single dose of 7.5 mg/kg and antioxidant supplementation was performed orally for 10 days. Behavioral testing was performed on 10th day and then the animals were sacrificed in order to obtain the samples for oxidative stress and apoptotic markers in hippocampus.

Results: The results of behavioral testing showed cisplatin-induced anxiogenic effect, that was diminished with SHL extract in a dose of 100mg/kg, with much weaker responses to SHL extracts in doses of 50 and 200 mg/kg. Also, the attenuation of cisplatin-induced neurotoxicity, by means of increased oxidative stress and apoptotic markers, was successfully achieved with SHL extract in a dose of 100 mg/kg. The neuroprotective effect of SHL was similar to silymarin action in the same dose. When applied alone, SHL extract induced no significant effect in any of parameters followed.

Conclusion: Cisplatin-induced neurotoxicity manifested by anxiogenic response in behavioral testing can be successfully attenuated by oral administration of SHL extract in an optimal dose (100 mg/kg). The beneficial effects of this kind of antioxidant supplementation were also confirmed by decreased oxidative damage and apoptotic mechanisms.

Key words: cisplatin, *Satureja hortensis* L., behavioral tests, oxidative stress, apoptosis, hippocampus

Accepted by the Scientific Board on - ASB: 30.10.2019

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

1. Full Professor Vladimir Jakovljević, M.D., Ph.D., Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman;
2. Full Professor Tihomir Ilić, M.D., Ph.D., Medical Faculty of Military Medical Academy, University of Defense Belgrade, member;
3. Assistant Professor Dragica Selaković, M.D., Ph.D., Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Игор Кумбуровић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 21.2.2020. године,

Игор Кумбуровић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Игор Кумбуровић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 21.2.2020. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

**РАДОВИ КОЈИ СУ БИЛИ УСЛОВ ЗА ПРИЈАВУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

THE EFFECTS OF *SATUREJA HORTENSIS L.* EXTRACT ON CISPLATIN-INDUCED BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE TAIL SUSPENSION TEST

Igor Kumburović^{1*}, Davor Kumburović^{1*}, Sanja Vujović², Zlata Rajković², Stefan Velicković²
¹Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia
²Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

*Authors Igor Kumburović and Davor Kumburović contributed equally to this study as the first author

EFEKTI PRIMENE EKSTRAKTA BILJKE *SATUREJA HORTENSIS L.* NA BIHEVIORALNE MANIFESTACIJE NEUROTOKSIČNOSTI IZAZVANE CISPLATINOM KOD PACOVA

Igor Kumburović^{1*}, Davor Kumburović^{1*}, Sanja Vujović², Zlata Rajković², Stefan Velicković²
¹Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija
²Katedra za stomatologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received/Primljen: 04.06.2019.

Accepted/Prihvaćen: 08.06.2019.

ABSTRACT

In order to evaluate the effects of *Satureja hortensis L.* extract on cisplatin-induced behavioral alterations in the tail suspension test (TST), we included 35 male Wistar albino rats in this study, divided into 7 equal groups. Cisplatin was administered (single dose of 7.5 mg/kg, i.p., on the fifth day) alone, and in groups with orally administered (for 10 days) *Satureja hortensis L.* extract (50, 100, and 200 mg/kg), and silymarin (100 mg/kg) in individual groups. The behavioral testing was performed in TST, and the following parameters were obtained: the latency to the first immobility, the number of immobility episodes, and the total duration of immobility. Cisplatin application increased the latency to the first immobility, but decreased the number of immobility episodes and the total duration of immobility. Oral administration of *Satureja hortensis L.* extract in a dose of 100 mg/kg attenuated cisplatin-induced alterations, and those effects were similar to silymarin group. The extract in a dose of 200 mg/kg diminished cisplatin-induced effect only for the total duration of immobility, while in a dose of 50 mg/kg, the extract had no impact on cisplatin effects. Although common use of this methodology would lead to a conclusion that cisplatin produced antidepressant effect, comparison with certain literature data allows the conclusion that this action of cisplatin may be attributed to its anxiogenic action that was attenuated by antioxidant supplementation (*Satureja hortensis L.*) in an adequate dose (100 mg/kg).

Keywords: cisplatin, *Satureja hortensis L.*, anxiety, depression, tail suspension test, rats.

SAŽETAK

U cilju ispitivanja efekata ekstrakta *Satureja hortensis L.* na promene ponašanja izazvane cisplatinom u testu kačenja za rep (TKR), u studiju je uključeno 35 muških Wistar albino pacova, podeljenih u 7 jednakih grupa. Cisplatin je primenjivana (pojedinačna doza od 7.5 mg/kg, i.p., petog dana) samostalno, i u grupama sa oralnom primenom (tokom 10 dana) ekstrakta *Satureja hortensis L.* (50, 100 i 200 mg/kg), i silimarina (100 mg/kg) u pojedinačnim grupama. Bihevioralno testiranje je sprovedeno u TKR, uz određivanje sledećih parametara: vreme do prve imobilnosti, broj epizoda imobilnosti i ukupno trajanje imobilnosti. Primena cisplatine je povećavala vreme do prve imobilnosti, dok je skraćivala broj epizoda imobilnosti i ukupno trajanje imobilnosti. Oralna primena ekstrakta *Satureja hortensis L.* u dozi od 100 mg/kg je smanjivala promene izazvane cisplatinom, što je bilo slično efektima u grupi sa silimarinom. Ekstrakt je u dozi od 200 mg/kg umanjio efekat cisplatine samo za ukupno trajanje imobilnosti, dok u dozi od 50 mg/kg ekstrakt nije imao uticaja na efekte cisplatine. Iako bi uobičajena primena ove metodologije dovela do zaključka da cisplatin izaziva antidepressantni efekat, poređenje sa odgovarajućim podacima iz literature omogućava zaključak da se uticaj cisplatine može pripisati njenoj anksioznoj ulozi, što je bilo umanjeno antioksidantnom suplementacijom (*Satureja hortensis L.*) u odgovarajućoj dozi (100 mg/kg).

Ključne reči: cisplatin, *Satureja hortensis L.*, anksioznost, depresivnost, test kačenja za rep, pacovi



DOI: 10.2478/sjcr-2019-0029

Corresponding author:
Stefan Velickovic
velickovicstefan91@gmail.com



INTRODUCTION

Cisplatin is one of the most widely used anticancer drugs worldwide. Alone or along with other cytostatic agents, cisplatin has been considered a first-line therapy in the treatment of various malignancies for decades, especially solid tumors such as ovarian, testicular, head, neck and small cell lung cancers (1).

Despite its well confirmed efficacy in the treatment of a numerous types of cancers, clinical use of cisplatin is often limited because of the dose- and duration-dependent cell resistance. Although, up to date, more than 40 specific types of cisplatin adverse effects have been recognized, according to their incidence and severity, cisplatin side effects have been categorized into seven main groups: nephrotoxicity, ototoxicity, cardiotoxicity, hematological toxicity, hepatotoxicity, gastrointestinal toxicity and neurotoxicity (2). Regardless of the reports that pointed out poor penetration through the blood-brain barrier for the majority of platinum-based compounds (3), it was observed that platinum agents accumulate in the central nervous system (CNS) (4), reaching the highest concentration in specific brain regions such as hippocampus in mice (5). Those findings may be the explanation for the variety of clinical manifestations following cisplatin treatment. Therefore, the following CNS disorders in cisplatin treated patients have been reported: acute blindness and seizures, encephalopathy and stroke-like episodes (6). Also, cisplatin therapy was accompanied with cognitive impairment and emotional dysfunction (7). The cognitive impairment, with the decreased locomotor and exploratory activity, was also observed in cisplatin treated animals (8, 9).

Although all kinds of cisplatin-induced toxicities are connected to specific clinical features, the spectrum of underlying pathophysiological mechanisms can be specified in a few principle categories. The most frequently described processes that could be connected to cisplatin-induced toxicities are: the apoptosis (10), DNA damage (11) and inflammation (12). Also, some investigations confirmed that oxidative stress is the key mechanism that disturbs homeostasis following cisplatin treatment and may be the base of its toxicities (13). The prooxidative action of cisplatin comes as a result of combined effects of increased production of reactive oxygen species, such as hydroxyl radical (14), hydrogen peroxide (15), superoxide anion radical (16), and nitrites (17, 18), and simultaneous decline in cellular antioxidant capacity, manifested as a decrease in antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) activity (19, 20), as well as glutathione (21).

The confirmed strong connection between the chemotherapeutics-induced oxidative damage and the clinical manifestations of toxicities in the specific tissues has targeted an antioxidant supplementation as a potentially useful therapeutic approach in the treatment of numerous anticancer drugs adverse effects. In the last decade, the medicinal plants have been widely confirmed as an important source of dietary antioxidants that showed protective effect when applied along

with anticancer drugs, by means of diminished oxidative damage, which resulted in attenuation of cytostatic-induced toxicities (22, 23, 24). Recent study confirmed that *Satureja hortensis* L., the plant with the high content of antioxidants, such as phenolic compounds, and especially high concentration of rosmarinic acid, showed beneficial antioxidant properties in the treatment of cisplatin-induced nephro- and hepatotoxicity (25).

The aim of this study was to evaluate the behavioral manifestations of cisplatin administration in the TST in rats. Furthermore, we estimated the potential alterations in behavioral outcome following antioxidant supplementation with *Satureja hortensis* L. extract in different doses.

MATERIAL AND METHOD

Animals and treatment

Animals were housed in seven cages (5 per cage), under standard environmental conditions (temperature $23\pm 1^\circ\text{C}$, humidity $55\pm 5\%$, 12/12h light/dark cycle). The animals had access to food and water ad libitum. The rats were randomly divided into 7 experimental groups as follows:

- control group, that received tap water for 10 days and a single dose of 500 μL saline on the day 5;
- cisplatin group that received tap water for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b. w.) on the day 5;
- CIS+E50 group that received *S. hortensis* L. extract (50 mg/kg b. w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b. w.) on the day 5;
- CIS+E100 group that received *S. hortensis* L. extract (100 mg/kg b. w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b. w.) on the day 5;
- CIS+E200 group that received *S. hortensis* L. extract (200 mg/kg b. w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b. w.) on the day 5;
- CIS+SILYMARIN group that received silymarin (100 mg/kg b. w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b. w.) on the day 5;
- E200 group that received *S. hortensis* L. extract (200 mg/kg b. w.) orally for 10 days.

Cisplatin and saline were administered intraperitoneally, while the extracts were dissolved in tap water. Phytochemical characterization of methanolic extract of *S. hortensis* L. was previously described in the study by Boroja et al (25).

After completing the described protocols, the animals were placed in the testing room, at approximately 8 a.m., in order to accommodate for behavioral testing that usually



started at 10 a.m. The testing room was acoustically and visually isolated.

Tail suspension test (TST)

In order to evaluate the behavioral alterations, we performed TST. This test, usually obtained for the estimation of depressive state level, is based on the assumption that the rodents under specific circumstances are expected to put an effort in order to avoid evidently aversive (stressful) stimulus (26). The original apparatus for TST is constructed of metal frame (0.6 x 0.6 m) and circular barrier (25 cm in diameter) with the central hole (the opening of 15 mm in diameter) where the tails were slipped through.

Rats were suspended by the tail attached to the adhesive tape (with the barrier 1 cm below the position of the adhesive tape on the tail, in order to prevent tail climbing), so that they could freely dangle facing downward.

The key point of TST was the quantification of immobility. The immobility was considered as a state with no visible voluntary movement (<1 cm) of head, body or limbs for at least 5 seconds. Expected involuntary swinging was declared as the state of immobility. The test lasted for six minutes, without any experimenter intervention during the testing. The complete testing was recorded by a video camera. The following parameters were analyzed from the recordings: the latency to the first immobility, the number of immobility episodes and the total duration of immobility.

Statistical Analysis

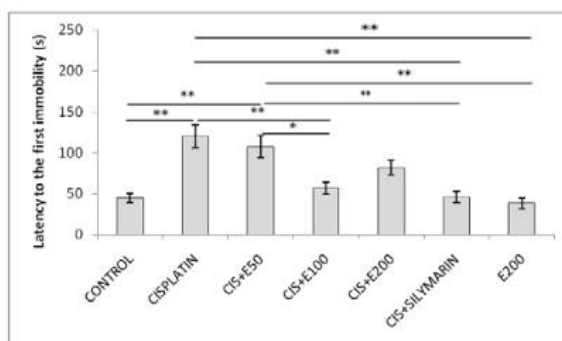
The data were presented as means \pm S.E.M. After completing the tests for homogeneity (Levene's) and normality (Shapiro-Wilk), comparisons between the groups were performed using One-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc analysis. Significance was determined at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with SPSS version 20.0 statistical package (IBM SPSS Statistics 20).

RESULTS

The applied protocols significantly altered the latency to the first immobility ($F=11.539$, $df=6$). As shown in Figure 1, the administration of cisplatin in a single dose significantly increased the latency to the first immobility compared to the control group ($p < 0.01$). *S. hortensis* L. extract, when applied alone, had no effect on this parameter when compared to the control. However, when applied along with cisplatin, *S. hortensis* L. extract in a dose of 100 mg/kg significantly reduced cisplatin-induced augmentation of the latency to the first immobility when compared to the cisplatin group ($p < 0.01$), and the values remained similar compared to the control. On the other hand, both lower (50 mg/kg) and higher (200 mg/kg)

dose of *S. hortensis* L. extract failed to significantly attenuate the cisplatin-induced increase in the latency to the first immobility, and this parameter was still significantly higher compared to the control in CIS+E50 group ($p < 0.01$). Even more, the values of this parameter achieved with the lower dose were statistically below the values observed in the CIS+E100 group ($p < 0.05$). The impact of simultaneous administration of cisplatin and silymarin was very much alike the observed effect in the CIS+E100 group – significant decline of cisplatin-induced increase in the latency to the first immobility, while preserving the values almost equal with the control group.

Figure 1. The latency to the first immobility in the tail suspension test.



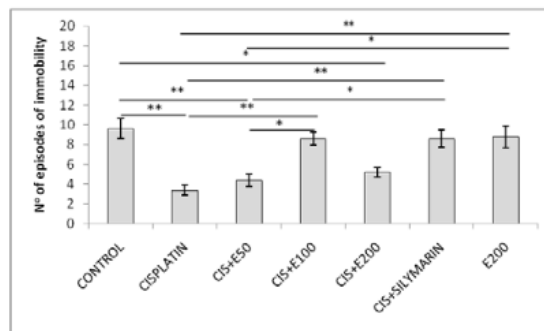
Values are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n=5$ per group, *denotes a significant difference $p < 0.05$, **denotes a significant difference $p < 0.01$.



Like for the latency to the first immobility, the number of immobility episodes in TST was also significantly affected by the applied protocols ($F=10.137$). Cisplatin application resulted in a significant decrease in the number of immobility episodes compared to the control values ($p<0.01$). As shown in Figure 2, the decline in this parameter was compensated ($p<0.01$) with neither the middle dose of *S. hortensis* L. extract (100 mg/kg), nor with the higher (200 mg/kg) or the lower (50 mg/kg) dose of *S. hortensis* L. extract. It should be noticed that the increase in the number of immobility

episodes observed following simultaneous administration of cisplatin and *S. hortensis* L. extract in a dose of 100 mg/kg was even statistically significant when compared to the CIS+E50 group ($p<0.05$). Again, the effect obtained with the middle dose of *S. hortensis* L. extract was very similar to the one achieved with the same concentration of silymarin when applied along with cisplatin. Also, the number of immobility episodes was not significantly affected by *S. hortensis* L. extract in a dose of 200 mg/kg, when applied alone, compared to the control group.

Figure 2. The number of episodes of immobility in the tail suspension test.

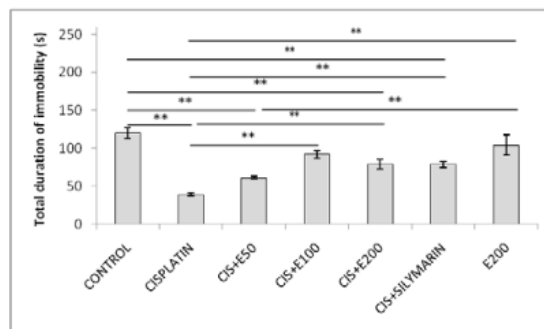


Values are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n=5$ per group, *denotes a significant difference $p<0.05$, **denotes a significant difference $p<0.01$.

Finally, as shown in Figure 3, all the applied protocols also had significant impact on the total duration of immobility ($F=16.271$). Administration of cisplatin in a single dose (7.5 mg/kg) resulted in a significant decline in the immobility duration compared to the control ($p<0.01$). Although the individual administration of *S. hortensis* L. extract did not result in a significant change in the total duration of immobility, the administration of *S. hortensis* L. extract in the doses of 100 and 200 mg/kg significantly augmented the cisplatin-induced decrease in the total immobility ($p<0.01$). Only the values achieved in the CIS+E200 group remained

significantly below the control values ($p<0.01$). The lowest dose of extract (50 mg/kg) failed to reduce the cisplatin-induced reduction in the total duration of immobility. The impact of simultaneous administration of cisplatin and silymarin on the duration of immobility in TST resembled the effects observed with the middle and the highest dose of *S. hortensis* L. extract. However, the total duration of immobility achieved in the CIS+SILYMARIN group, unlike the CIS+E100 group, remained statistically below the control values ($p<0.01$).

Figure 3. The total duration of immobility in the tail suspension test.



Values are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n=5$ per group, **denotes a significant difference $p<0.01$.



DISCUSSION

Beside its unquestionable anticancer properties, cisplatin-based chemotherapy is usually limited by numerous side effects (27), including clinical manifestations of neurotoxicity (28). Many cisplatin-induced toxicities are accompanied with an evident mitochondrial dysfunction and oxidative damage in various tissues (29). Therefore, any of therapeutic approaches that may prevent the cisplatin-induced increase in oxidative stress, as a trigger factor for tissue damage, may be potentially useful as a supplementary treatment along with cisplatin therapy.

One of the most recently reported manifestations of adverse effect of cisplatin on CNS has clinical form with characteristics of increased depressive state level (30). The prodepressant action of cisplatin, by means of behavioral tests results, in that study (performed on rats) was accompanied with prooxidant alterations in both cortex and hippocampus. Also, neuronal degeneration in hippocampus paralleled the decline in BDNF and GABA content, as well as the increase in hippocampal glutamate (30).

However, the results obtained in our study may lead to a conclusion that cisplatin administration had the antidepressant effect by means of behavioral patterns observed in TST. On the other hand, the literature data offer a recently established possibility that the estimation of depressive state level can be substantially mimicked with significant alterations in anxiety levels. Namely, the specific mood disorders that are dominantly characterized with strong anxiogenic features may overcome the prodepressant action resulting in inadequately pronounced antidepressant effect (31). The offered explanation is that increased motor activity observed in the tests for depressive level estimation (such as TST) may rather be considered as the behavioral outcome of anxiety-induced overreacting than antidepressant action. When comparing the results for prodepressant action of cisplatin (30) and increased locomotor response in TST observed in this study, we must take into consideration two important information. Firstly, those two studies were performed with the significantly different protocols: the prodepressant effect was reported in the study with the chronic exposure to cisplatin (10 weeks), while the opposite effect on depressive level was obtained in the study with a single dose of cisplatin. Secondly, the recent study of Kumburovic et al. (32) confirmed the

extremely strong anxiogenic response to a single dose of cisplatin, as the earliest behavioral manifestation of cisplatin administration. Therefore, we can conclude that the results of those two studies are not the opposite or even contradictory. It seems that the cisplatin impact in certain brain regions involved in mood regulation that includes numerous biochemical and morphological alterations is very complex. It seems that the cisplatin action in the CNS, by means of behavioral changes, starts with predominantly anxiogenic response followed by prodepressant action if the cisplatin treatment lasts long enough. Therefore, the behavioral outcome of cisplatin-induced neurotoxicity has strong time dependent characteristics. In addition, it is not surprising that beneficial effects of antioxidant supplementation following cisplatin therapy also strongly depend on the principle behavioral outcome. Namely, the benefits obtained with *S. hortensis* L. extract in this study were manifested not by prodepressant action, but as the clear anxiolytic-like response to antioxidant supplementation. Our results are in line with previously reported beneficial action of various antioxidant sources on cisplatin-induced neurotoxicity with clinical manifestations that involve increased anxiety levels (8, 9).

CONCLUSION

In summary, the neurotoxic manifestations of cisplatin treatment as observed in this study, manifested by anxiogenic response in TST, can be significantly attenuated by *S. hortensis* L. extract supplementation. So, according to the results of our study, it seems that antioxidant supplementation may be useful in diminishing cisplatin-induced neurotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper was supported by the Faculty of Medical Sciences (JP 06/18, 01/19), University of Kragujevac.

CONFLICT OF INTERESTS

None of the authors of the present study have any actual or potential conflicts of interest to disclose, including financial, personal, or other relationships with specific persons or organisations.



REFERENCE

- Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Jakovljevic V, Zivkovic V, Srejsovic I, Djuric M, Djuric D. (2018). The Beneficial Effects of Sulfur-containing Amino Acids on Cisplatin induced Cardiotoxicity and Neurotoxicity in Rodents. *Curr Med Chem*, 25(3), 391-403.
- Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*, 47(19), 6645-53. Erratum in: *Dalton Trans*, 47(23), 7848.
- McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, Haddad G, Baguley BC. (2001). Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. *Br J Cancer*, 85(8), 1219-25.
- Nakagawa H, Fujita T, Kubo S, Tokiyoshi K, Yamada M, Kanayama T, Hagiwara Y, Nakanomyo H, Hiraoka M. (1996). Difference in CDDP penetration into CSF between elective intraarterial chemotherapy in patients with malignant glioma and intravenous or intracarotid administration in patients with metastatic brain tumor. *Cancer Chemother Pharmacol*, 37(4), 317-26.
- Koppen C, Reifschneider O, Castanheira I, Sperling M, Karst U, Ciarimboli G. (2015). Quantitative imaging of platinum based on laser ablation-inductively coupled plasmamass spectrometry to investigate toxic side effects of cisplatin. *Metallomics*, 7(12), 1595-603.
- Gulec M, Oral E, Dursun OB, Yucel A, Hacimuftuoglu A, Akcay F, Suleyman H. (2013). Mirtazapine protects against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in the rat brain. *Psychiatry Clin Neurosci*, 67(1):50-8.
- Filley CM. (1999). Toxic leukoencephalopathy. *Clin Neuropharmacol*, 22(5), 249-60.
- Shabani M, Nazeri M, Parsania S, Razavinasab M, Zangiabadi N, Esmailpour K, Abareghi F. (2012). Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 33(5), 1314-21.
- Golchin L, Shabani M, Harandi S, Razavinasab M. (2015). Pistachio supplementation attenuates motor and cognition impairments induced by cisplatin or vincristine in rats. *Adv Biomed Res*, 4, 92.
- Kong D, Zhuo L, Gao C, Shi S, Wang N, Huang Z, Li W, Hao L. (2013). Erythropoietin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Nephrol*, 26(1), 219-27.
- Li XB, Schluesener HJ. (2006). Therapeutic effects of cisplatin on rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 54(1), 51-3.
- Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W. (2009). Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant*, 24(10), 3012-20.
- Karasawa T, Steyger PS. (2015). An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett*, 237(3), 219-27.
- Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. (2003). Role of poly (ADP-ribose) polymerase in cisplatin induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med*, 35, 966-77.
- Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. (2004). The Effects of desferrioxamine on cisplatin induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol*, 23(1), 29-34.
- Davis CA, Nick HS, Agarwal A. (2001). Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol*, 12(12), 2683-90.
- Rosic G, Srejsovic I, Zivkovic V, Selakovic D, Joksimovic J, Jakovljevic V. (2015). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced cardiotoxicity on isolated rat hearts after short-term global ischemia. *Tox Rep*, 2, 996-1006.
- Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejsovic I, Zivkovic V, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V. (2016). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett*, 242, 34-46.
- Almaghrabi OA. (2015). Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci*, 22(2), 227-31.
- Yuce A, Atessahin A, Ceribasi AO, Aksakal M. (2007). Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101(5), 345-9.
- Noori S, Mahboob T. (2010). Antioxidant effect of carnosine pretreatment on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Indian Clin Biochem*, 25(1), 86-91.
- Moon JH, Shin JS, Kim JB, Baek NI, Cho YW, Lee YS, Kay HY, Kim SD, Lee KT. (2013). Protective effects of 6-hydroxy-1-methylindole-3-acetonitrile on cisplatin-induced oxidative nephrotoxicity via Nrf2 inactivation. *Food Chem Toxicol*, 62, 159-66.
- Singh TD, Meitei HT, Sharma AL, Robinson A, Singh LS, Singh TR. (2015). Anticancer properties and enhancement of therapeutic potential of cisplatin by leaf extract of *Zanthoxylum armatum* DC. *Biol Res*, 48, 46.
- Yadav YC. (2015). Hepatoprotective effect of *Ficus religiosa* latex on cisplatin induced liver injury in Wistar rats. *Rev Bras Farmacogn* 25, 278-83.
- 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 Chem Toxicol*, 118, 252-63.
- Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P. (1986). Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol*, 17(3), 348-50.



27. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, Lelli G, Martini A. (2013). Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation. *Oncol Rep*, 29(4), 1285-92.
28. Kanat O, Ertas H, Caner B. (2017). Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World J Clin Oncol*, 8(4), 329-35.
29. Bobylev I, Joshi AR, Barham M, Neiss WF, Lehmann HC. (2018). Depletion of Mitofusin-2 Causes Mitochondrial Damage in Cisplatin-Induced Neuropathy. *Mol Neurobiol*, 55(2), 1227-35.
30. Abdelkader NF, Saad MA, Abdelsalam RM. (2017). Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *J Neurochem*, 141(3), 449-60.
31. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. (2014). Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuro Endocrinol Lett*, 35(8), 703-10.
32. Kumburovic I, Selakovic D, Boroja T, Jovicic N, Mihailovic V, Katanic J, Sreckovic N, Kumburovic D, Jakovljevic V and Rosic G. Antioxidant effects of *Satureja hortensis* L. attenuate the anxiogenic effect of cisplatin in rats. *Oxid Med Cell Longev*. Accepted for publication.

Research Article

Antioxidant Effects of *Satureja hortensis* L. Attenuate the Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats

Igor Kumburovic,¹ Dragica Selakovic,¹ Tatjana Juric^{1,2}, Nemanja Jovicic^{1,3}, Vladimir Mihailovic,⁴ Jelena Katanic Stankovic,⁴ Nikola Sreckovic,⁴ Davor Kumburovic,¹ Vladimir Jakovljevic^{1,5} and Gvozden Rosic¹

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

³Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁵Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia

Correspondence should be addressed to Gvozden Rosic; grosic@medf.kg.ac.rs

Received 5 April 2019; Revised 13 May 2019; Accepted 26 May 2019; Published 29 July 2019

Guest Editor: Patricia Rijo

Copyright © 2019 Igor Kumburovic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Numerous adverse effects of cisplatin-based therapy are usually accompanied by enhanced oxidative damage and cell apoptosis in various tissues. Even neurotoxic manifestations of cisplatin administration, such as the anxiogenic effect, appear along with the increased oxidative stress and apoptotic indicators in certain brain regions. Thirty-five Wistar albino male rats were divided into seven groups: control, cisplatin (received a single dose of cisplatin: 7.5 mg/kg), three groups with oral administration of *Satureja hortensis* L. methanolic extract (SH) (low: 50 mg/kg, middle: 100 mg/kg, and high dose: 200 mg/kg) along with cisplatin application, a group with the extract in high dose alone, and a silymarin group (cisplatin and silymarin: 100 mg/kg), in order to evaluate the antioxidant effects of SH on cisplatin-induced increase in the anxiety level. After completing 10-day pretreatments, behavioral testing was performed in the open field and the elevated plus maze, followed by an investigation of oxidative stress and apoptosis parameters in hippocampal tissue samples. Cisplatin administration resulted in anxiogenic-like behavior, increased lipid peroxidation, and proapoptotic markers accompanied by the decline in antioxidant and antiapoptotic defense. The administration of extract alone did not significantly alter any of the estimated parameters. When applied along with cisplatin, SH in a dose of 100 mg/kg induced the significant anxiolytic effect with concomitant recovery of antioxidant and antiapoptotic activity indicators, while both lower and higher doses of the extract failed to improve the adverse effects of cisplatin administration. The beneficial effects of the middle dose of SH were equivalent to the same dose of silymarin, as a "golden standard." Our results indicate that the antioxidant supplementation with SH in an optimal dose significantly improved the oxidative status and it had antiapoptotic effect in the rat hippocampus disturbed by cisplatin administration, which was accompanied with attenuation of cisplatin-induced anxiogenic effect.

1. Introduction

Generation of reactive oxygen species (ROS) in brain tissue is considered to be the main process linked to the appearance of a broad spectrum of psychiatric disorders [1]. A chemotherapeutic drug, cisplatin, although considered to be one of the most promising chemotherapeutics in the treatment of various malignancies, exerts morphological or behavioral

impairments in brain tissue [2]. The primary evidence of neurotoxicity of cisplatin is decreased activity of antioxidant enzymes with concomitant depletion in the glutathione level, elevated lipid membrane peroxidation, and mitochondrial dysfunction. This indicates that cisplatin causes overproduction of ROS and imbalance between oxidant-antioxidant levels, consequently leading to the insufficient level of antioxidants to counteract the raised ROS in tissue [3]. Besides,

cisplatin-induced neurotoxicity has been shown to result in numerous clinical forms. Although the majority of the investigated mechanisms focused on the manifestations of peripheral nerve injury [4], recent investigations have paid more attention to the effects on the central nervous system. Therefore, it has been reported that various protocols of cisplatin administration may affect mood regulation [5], as well as cognitive and perceptual impairments [6]. Furthermore, it has been proposed that the described behavioral alterations are connected with an underlying increase of oxidative stress [7] in specific brain regions involved in the control of those features. Also, Manohar and coworkers demonstrated that cisplatin promotes cell death in the hippocampus by increasing the expression of proapoptotic genes while reducing the expression of antiapoptotic genes [8].

Phytochemicals and plant-based products have been widely applied in treatments of various types of neurological disorders, due to their safety and the absence of side effects [9]. *Satureja hortensis* L. (summer savory, garden savory) is an annual shrub belonging to the genus *Satureja* of the Lamiaceae family. Summer savory is native to North America as well as warmer regions, such as the Mediterranean area and Southern Europe [10]. Due to its flavoring properties, the aerial parts of some *Satureja* species are mostly used as a culinary spice [11], but their medical benefits on human health are also remarkable. In traditional medicine, *S. hortensis* has been widely applied to relieve muscle pain, as a carminative and as a medicament in the treatment of diarrhea and digestion impairments [12]. Modern phytochemical analysis revealed a wide range of bioactive constituents in *S. hortensis*: monoterpenoids, carvacrol, thymol, and *p*-cymene as the main compounds in volatile oil [13] and phenolics, especially a high amount of rosmarinic acid, as major active principles in the extract [14]. Considering the different active compounds that are present in *S. hortensis*, the exceptional potential of essential oil and extracts of summer savory has been reported in *in vitro* and *in vivo* studies. Recent studies showed that *S. hortensis* exhibited notable antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, antinociceptive, antiviral, anti-Alzheimer (acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activity), and hepatoprotective properties [15, 16]. Our earlier study showed the amelioration effect of *S. hortensis* methanolic extract against cisplatin-induced hepatorenal and testicular toxicity [17]. Similarly, it was demonstrated that administration of *S. hortensis* extract could prevent alterations in cisplatin-induced oxidative damage in several tissues [18]. There are no studies on toxicity of *S. hortensis* extract, but Fierascu et al. [15] recently reported that *S. hortensis* tea or infusion can be safely consumed, but essential oil of summer savory may cause mild dermal irritations. Previous investigations showed that rosmarinic acid, the main phenolic compound in *S. hortensis* extract, produced antidepressive and anxiolytic effects [19], and therefore, the following investigations were performed in order to evaluate the effects of *S. hortensis* methanolic extract (SH) on the cisplatin-induced increase in the anxiety level and oxidative stress in hippocampal tissue.

2. Materials and Methods

2.1. Extract Preparation. Aerial parts of *Satureja hortensis* L. were collected during the full flowering period in August 2015 in village Borač (municipality of Kragujevac, Republic of Serbia). A voucher specimen (No. 121/15) was deposited in the Herbarium of the Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, after the identification of species. Plant material was air-dried at room temperature. The methanolic extract of *S. hortensis* was prepared according to the previously published procedure [17]. Phytochemical characterization of methanolic extract using HPLC/DAD/(-)HESI-MS/MS analysis was previously published in the study by Boroja and coworkers, and this methanolic extract was investigated in the presented paper, as a part of the same study [17].

2.2. Animals and Treatment. Thirty-five male Wistar albino rats (two months old, 200–250 g, obtained from the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia) were included in this study. The animals were housed in groups of five per cage in suitable environmental conditions ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ and 12/12 h light/dark cycles) and had free access to food and tap water. Animals were divided into seven equal groups and underwent pretreatment protocols, as follows: the control group received water for 10 days and a single intraperitoneal (i.p.) application of 0.5 mL normal saline on the 5th day; the CIS group received water for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b.w., i.p.) on the 5th day; the CIS+E50 group received *S. hortensis* extract (50 mg/kg b.w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b.w., i.p.) on the 5th day; the CIS+E100 group received *S. hortensis* extract (100 mg/kg b.w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b.w., i.p.) on the 5th day; the CIS+E200 group received *S. hortensis* extract (200 mg/kg b.w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b.w., i.p.) on the 5th day; the CIS+silymarin group received silymarin (100 mg/kg b.w.) orally for 10 days and a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg b.w., i.p.) on the 5th day; and the E200 group received *S. hortensis* extract (200 mg/kg b.w.) orally for 10 days.

The final concentration of extract doses was calculated on the basis of average water intake in the previous 24 hours.

2.3. Behavioral Testing. Twenty-four hours after completing the protocols, the animals were allowed to acclimate in a testing room (approximately at 8 am) for at least 1 h, and behavioral testing was performed in an open field (OF) and the elevated plus maze (EPM), as previously described [20]. The following parameters were estimated in the OF test: cumulative duration in the center zone (CDCZ, in seconds), frequency in the center zone (FCZ), total distance moved (TDM, in cm), the percentage of time moving (%TM), and the number of rearings during 5 minutes of testing. Immediately after completing the OF test, the rats were placed in the EPM in order to obtain different parameters: cumulative duration in open arms (CDOA, in seconds), frequency to open arms (FOA), TDM (in cm), %TM, the number of rearings, the number of head-dippings (HD), and the

number of total exploratory activity (TEA) episodes. Both tests were recorded, and video files were analyzed using EthoVision software (XT 12, Noldus Information Technology, The Netherlands).

After completing behavioral testing, the rats were decapitated following a short-term narcosis induced by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), the brains were quickly removed, and hippocampal tissue was isolated for further analysis.

2.4. The Estimation of Oxidative Stress Parameters in the Hippocampus. The hippocampus tissue homogenates were prepared in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4°C. The obtained supernatants were used for the determination of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, as well as reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels. The activity of CAT in tissue homogenates was determined by monitoring the decomposition rate of hydrogen peroxide according to the method described by Beers and Sizer [21]. The measurement of SOD activity in hippocampus tissue homogenates was based on the colorimetric reaction inhibition of adrenochrome formation from adrenalin according to the method of Misra and Fridovich [22]. CAT and SOD activities in tissue homogenates were expressed as unit per milligram of protein (U per mg of proteins). The reduced glutathione (GSH) level in homogenates was estimated by Ellman's procedure and expressed as mg GSH per gram of proteins [23]. The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level in samples was determined by the method of Ohkawa and coworkers and expressed as nmol MDA per mg of proteins [24]. The Lowry et al.'s method [25] was used for the determination of protein concentrations in tissue homogenates, using bovine serum albumin (BSA) as a standard. All spectrophotometric measurements were performed using a UV-Vis double beam spectrophotometer (model Halo DB-20S, with a temperature controller, Dynamica GmbH, Dietikon, Switzerland).

2.5. RNA Isolation and Real-Time PCR Analysis. Total RNA was extracted from hippocampal tissue using the TRIzol reagent (Invitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription, a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA) was used. Quantitative RT-PCR was performed using the Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, CA). Also, mRNA-specific primers for Bax, Bcl-2, caspase-3, and β -actin as a housekeeping gene (Invitrogen, CA) were used (Supplement 1). Quantitative RT-PCR reactions were done in the Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Germany), and after data analysis, relative gene expression was calculated according to Livak and Schmittgen [26].

All research procedures were carried out in accordance with the European Directive for the welfare of laboratory animals No. 86/609/EEC and the principles of Good Laboratory Practice (GLP) and in accordance with the ARRIVE guidelines. All experiments were approved by the Ethical

Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

2.6. Statistical Analysis. The data were presented as means \pm S.E.M. After completing the tests for homogeneity (Levene's) and normality (Shapiro-Wilk), comparisons between groups were performed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc analysis. Simple linear regression analyses were performed to analyze relationships between parameters obtained in behavioral tests and other analyses (oxidative stress and apoptosis indicators). Significance was determined at $p < 0.05$ for all tests. Statistical analysis was performed with SPSS version 20.0 statistical package (IBM SPSS Statistics 20).

3. Results

3.1. Antioxidant Supplementation Attenuates Cisplatin-Induced Anxiogenic Effect. Behavioral testing performed in this study revealed the anxiogenic-like effect of cisplatin in both OF (Figure 1) and EPM (Figure 2) tests. Cisplatin administration significantly decreased the principal indicators of the anxiety level, CDCZ (Figure 1(a)), and FCZ (Figure 1(b)), in the OF test ($F = 6.527$ and 5.530 , respectively; $df = 6$, $p < 0.01$). The similar response to cisplatin, expressed as a significant decline in key parameters for anxiety level estimation in EPM, CDOA and FOA (Figures 2(a) and 2(b); $F = 8.204$ and 6.027 , respectively; $df = 6$, $p < 0.01$) was observed. Also, the overall locomotor activity in OF was significantly reduced following cisplatin application by means of TDM (Figure 1(c)) and %TM (Figure 1(d)) ($F = 16.064$ and 6.609 , respectively; $df = 6$, $p < 0.01$), as it was in the EPM test, by means of the same parameters (Figures 2(c) and 2(d); $F = 14.693$ and 7.441 , respectively; $p < 0.01$). At the same time, the exploratory activity was significantly reduced in OF (Figure 1(e); $F = 8.980$, $p < 0.01$) and EPM (Figures 2(e)–2(g)) that was manifested as decline in the number of HD ($F = 15.590$, $p < 0.01$), rearings ($F = 4.920$, $p < 0.05$), and TEA episodes ($F = 13.437$, $p < 0.01$).

Oral administration of the methanolic extract of *S. hortensis* (200 mg/kg/d), when applied alone, despite the fact that it was not statistically different, decreased all estimated parameters in OF and EPM tests when compared to the control. However, SH, continuously applied before and following cisplatin application in different doses, induced the alteration in cisplatin-induced anxiogenic effect. The attenuation of cisplatin-induced anxiogenic effect in OF and EPM tests was observed only in E100 and was manifested by a significant anxiolytic-like effect when compared to the cisplatin group ($p < 0.01$), reversing CDCZ and FCZ (Figures 1(a) and 1(b)) in OF and CDOA and FOA (Figures 2(a) and 2(b)) in EPM to the control values. SH in the lowest (50 mg/kg/d) and the highest (200 mg/kg/d) applied doses was not sufficient to abolish the anxiogenic effect of cisplatin by means of the principal indicators of anxiety in both tests. The similar consequences of SH were manifested on locomotor activity in both tests. The orally applied extract in a dose of 100 mg/kg/d diminished

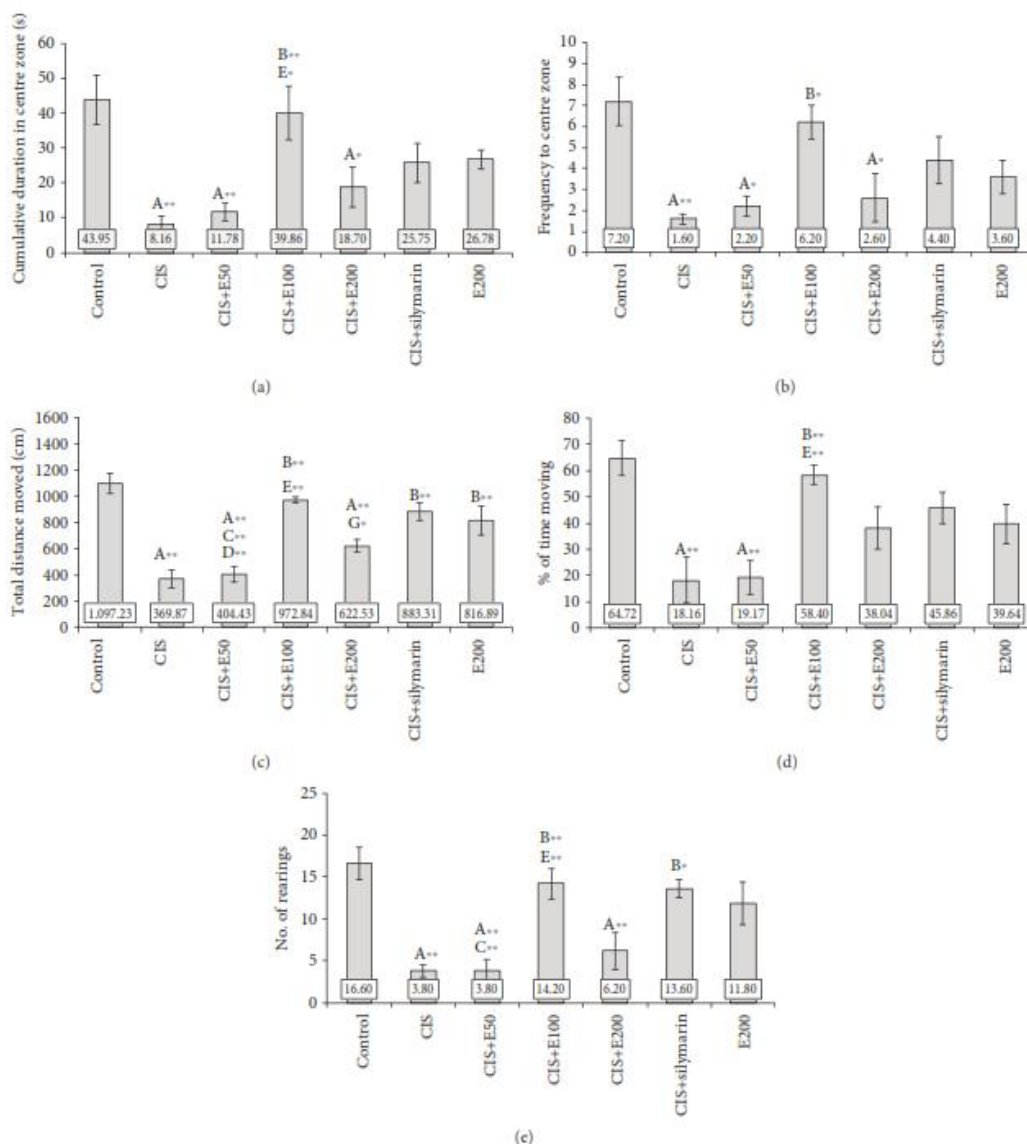
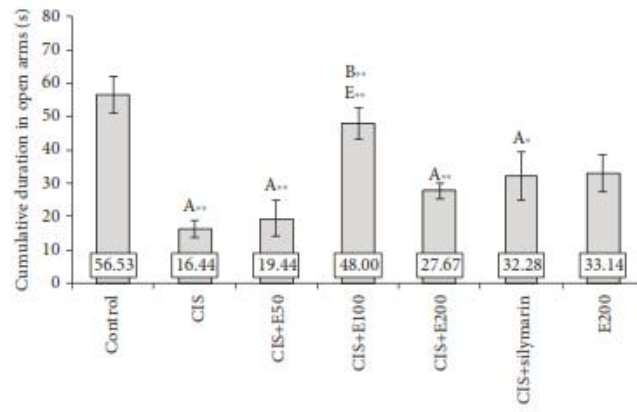


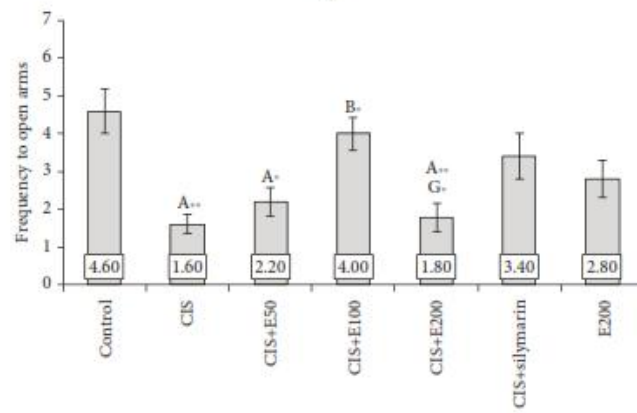
FIGURE 1: Parameters obtained in the open field (OF) test: (a) the cumulative duration in center zone (CDCZ), (b) the frequency to center zone (FCZ), (c) the total distance moved (TDM), (d) the percentage of time moving (%TM), and (e) the number of rearings. Values are the mean \pm standard error of the mean (SEM); $n = 5$ per group. * denotes a significant difference of $p < 0.05$; ** denotes a significant difference of $p < 0.01$. A: control vs. other groups; B: CIS vs. other groups; C: CIS+silymarin vs. other groups; D: E200 vs. other groups; E: CIS+E50 vs. CIS+E100; F: CIS+E50 vs. CIS+E200; G: CIS+E100 vs. CIS+E200.

cisplatin-induced decline in TDM and %TM in both OF (Figures 1(c) and 1(d)) and EPM (Figures 2(c) and 2(d)) tests. SH in this dose applied with cisplatin significantly increased TDM in both tests (Figures 1(c) and 1(d) and Figures 2(c) and 2(d)) compared to the lower and higher doses ($p < 0.01$), while this effect was not significant for

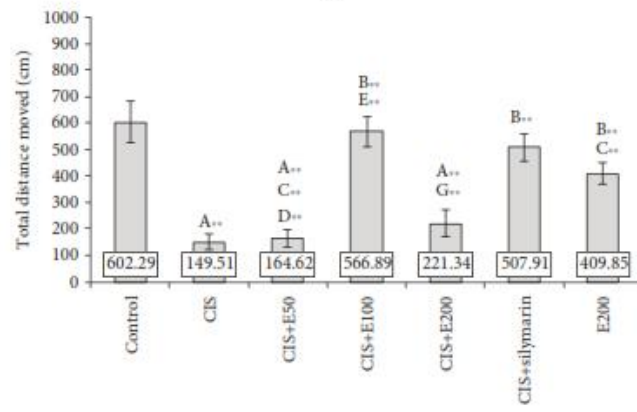
%TM with the extract in a higher dose. However, both the locomotor activities in both tests for the animals treated with the higher and lower doses of the extract remained significantly diminished compared to the control values ($p < 0.01$) except for %TM in EPM for the higher dose. SH, when applied with cisplatin in the dose of 100 mg/kg/d, was



(a)

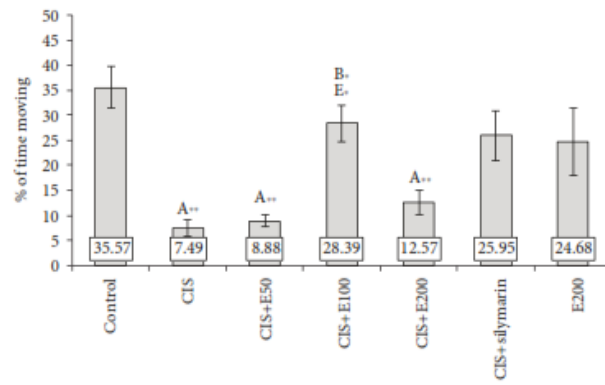


(b)

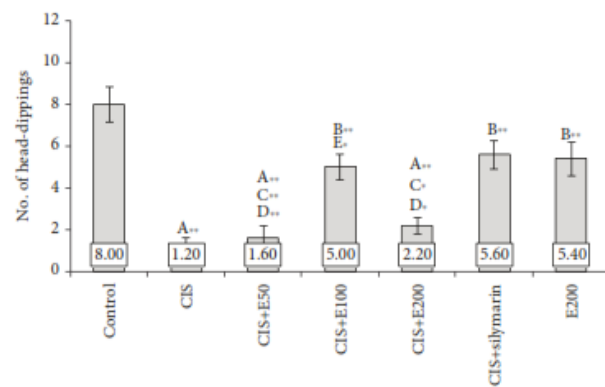


(c)

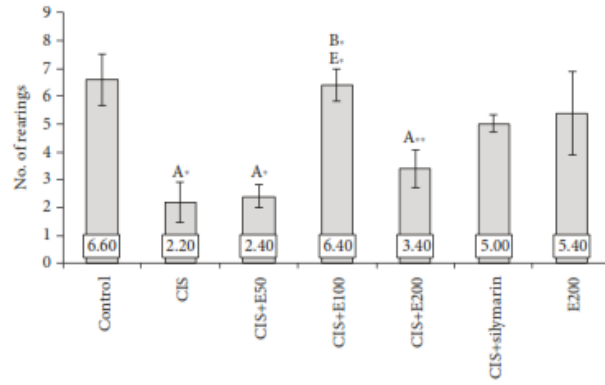
FIGURE 2: Continued.



(d)



(e)



(f)

FIGURE 2: CONTINUED.

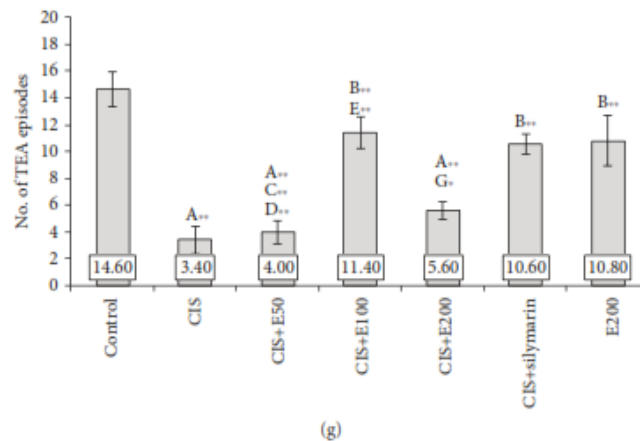


FIGURE 2: Parameters obtained in the elevated plus maze (EPM) test: (a) the cumulative duration in open arms (CDOA), (b) the frequency to open arms (FOA), (c) the total distance moved (TDM), (d) the percentage of time moving (%TM), (e) the number of head-dippings (HD), (f) the number of rearings, and (g) the number of TEA episodes. Values are the mean \pm standard error of the mean (SEM); $n = 5$ per group. * denotes a significant difference of $p < 0.05$; ** denotes a significant difference of $p < 0.01$. A: control vs. other groups; B: CIS vs. other groups; C: CIS+silymarin vs. other groups; D: E200 vs. other groups; E: CIS+E50 vs. CIS+E100; F: CIS+E50 vs. CIS+E200; G: CIS+E100 vs. CIS+E200.

sufficient to attenuate the cisplatin-induced decline in exploratory activity in both OF and EPM tests (Figure 1(e) and Figures 2(e)–2(g)). The lower dose of extract (50 mg/kg/d) failed to ameliorate this manifestation of anxiety-like behavior, which was manifested by significantly lower exploratory activity compared to the control values ($p < 0.01$), and even when compared to the effect of the middle dose of the extract ($p < 0.01$ for OF and TEA in EPM). Although the exploratory activity following the administration of the higher dose (200 mg/kg/d) along with cisplatin was not significantly lower compared to the middle dose (100 mg/kg/d), except for TEA, this anxiogenic feature of simultaneous administration of cisplatin and SH extract in the dose of 200 mg/kg/d remained significantly below the control values ($p < 0.01$), except for the number of rearings in EPM (Figure 2(f)).

When compared to SH, silymarin (a standardized plant extract with proven antioxidant effects *in vivo*) administration in a dose of 100 mg/kg/d showed similar protective effect on behavioral alterations induced by cisplatin in OF and EPM to the equivalent dose of SH (Figures 1 and 2) but still more pronounced than the effects of lower (50 mg/kg/d) and higher (200 mg/kg/d) doses of extract. As shown in Figure 2(a), silymarin did not prevent a decline in CDOA ($p < 0.01$) after cisplatin administration when compared to the control and did not produce a significant increase in any of the principle parameters for anxiety estimation in the applied tests. The protective effect following cisplatin application of silymarin was more pronounced by means of locomotor activity estimation, where it significantly increased cisplatin-induced decline in TDM (Figure 1(c) and Figure 2(c), $p < 0.01$), as well as exploratory activity in both tests (Figure 1(e) and Figures 2(e)–2(g), $p < 0.01$), except for the number of rearings in EPM.

3.2. *Satureja hortensis* L. Extract Prevents Oxidative Damage Induced by Cisplatin. All applied protocols resulted in significant alterations in oxidative stress markers: TBARS ($F = 5.400$, $df = 6$), SOD ($F = 6.103$), and CAT ($F = 4.396$). A single application of cisplatin (7.5 mg/kg b.w.) caused a significant ($p < 0.01$) increase in TBARS and decline in SOD and CAT activity ($p < 0.01$) in the hippocampus, when compared to the control group (Figures 3(a)–3(c), respectively). Except for the lowest estimated dose of *S. hortensis* extract (50 mg/kg b.w.), all tested concentrations of extract and silymarin provided a significant amelioration in the level of TBARS, in comparison with the cisplatin group. The application of SH at a dose of 100 mg/kg b.w. showed the most pronounced ($p < 0.01$) effect on the decrease of the TBARS level in hippocampal tissue in comparison with the cisplatin group. At the same time, the increase of SOD activity in the hippocampus, when compared to the cisplatin group, following administration of SH extracts was significant ($p < 0.05$) only with the dose of 100 mg/kg (Figure 3(b)). The activity of CAT in hippocampal tissue (Figure 3(c)) also significantly increased ($p < 0.05$) only in the extract-treated group at a dose of 100 mg/kg b.w., when compared to the cisplatin group. On the other hand, the GSH level in the hippocampus was decreased, although not significantly, by a single administration of cisplatin. However, the data presented in Figure 3(d) showed improvements in the GSH level in the groups treated with higher doses of SH (100 and 200 mg/kg) as well as with silymarin, but these effects were not significantly pronounced ($F = 3.034$). The level of GSH in the extract per se group was slightly increased ($p > 0.05$), compared to the control, and as such is statistically different from the cisplatin group ($p < 0.05$).

The application of silymarin (100 mg/kg b.w.) in combination with cisplatin showed almost equal effects in the

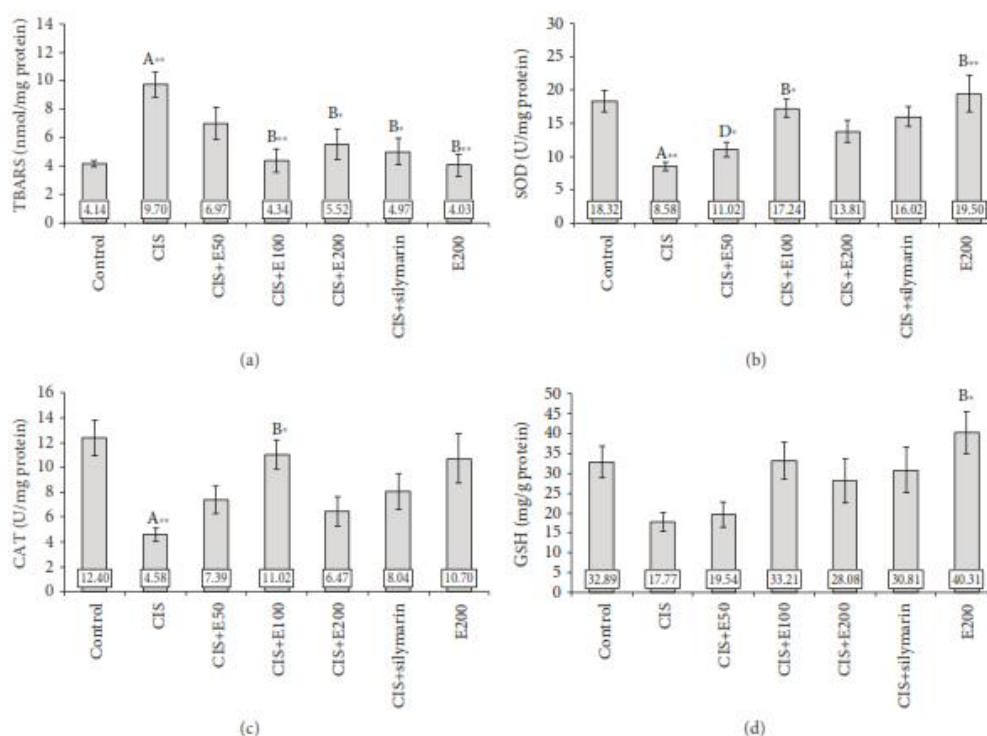


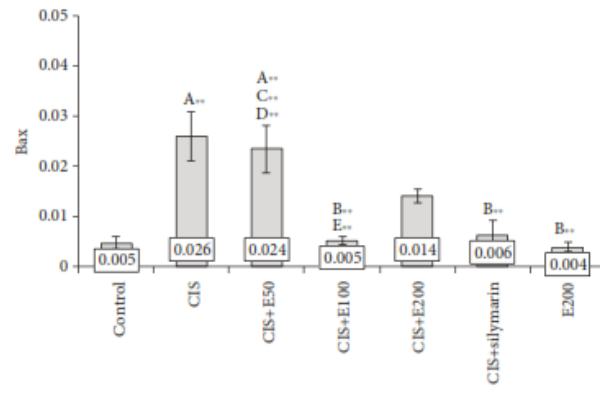
FIGURE 3: Oxidative stress markers in the rat hippocampus: (a) TBARS, (b) SOD, (c) CAT, and (d) GSH. Values are the mean \pm standard error of the mean (SEM); $n = 5$ per group. * denotes a significant difference of $p < 0.05$; ** denotes a significant difference of $p < 0.01$. A: control vs. other groups; B: CIS vs. other groups; C: CIS+silymarin vs. other groups; D: E200 vs. other groups; E: CIS+E50 vs. CIS+E100; F: CIS+E50 vs. CIS+E200; G: CIS+E100 vs. CIS+E200.

regulation of SOD and CAT activities in the hippocampus compared to *S. hortensis* extract at a dose of 100 mg/kg b.w. Application of extract at a dose of 200 mg/kg b.w. in combination with cisplatin was less effective in the regulation of all examined oxidative stress-related parameters compared to the extract dose of 100 mg/kg b.w. No significant changes were observed among the examined antioxidant hippocampal tissue parameters between the control group and the group treated with extract at a dose of 200 mg/kg b.w. without cisplatin application.

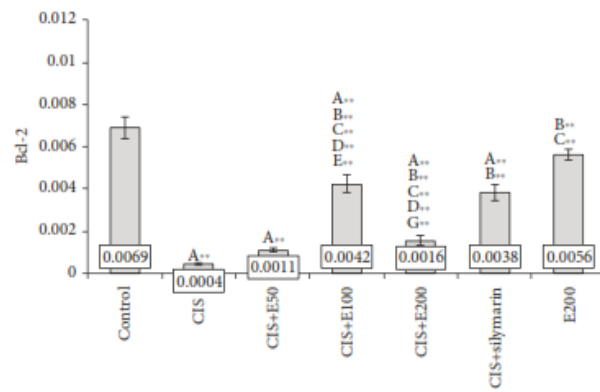
3.3. Diminishing of Cisplatin-Induced Proapoptotic Actions by Antioxidant Supplementation. The protocols applied in this study significantly altered the relative expression of genes involved in the regulation of cellular apoptosis, Bax ($F = 10.165$, $df = 6$), and Bcl-2 ($F = 58.950$) in hippocampal tissue. As shown in Figure 4, the application of cisplatin in the single dose induced a significant increase in Bax and decline in Bcl-2 relative gene expression compared to the control ($p < 0.01$), which resulted in significant augmentation of the Bax/Bcl-2 ratio ($F = 19.754$, $p < 0.01$). Although oral administration of SH did not significantly affect the hippocampal expression of those genes when applied alone, simultaneous oral intake of *S. hortensis* extract in a dose of 100 mg/kg reduced Bax and enhanced Bcl-2 hippocampal

gene expression ($p < 0.01$), reversing the cisplatin-induced effects to control values (Figures 4(a) and 4(b)). On the other hand, administration of both lower and higher doses of *S. hortensis* extract (50 and 200 mg/kg) was not sufficient to significantly alter individual gene expression of Bax and Bcl-2 (Figure 4) but still significantly declined the Bax/Bcl-2 ratio in hippocampal tissue ($p < 0.01$). The effects of SH in a dose of 100 mg/kg/d on cisplatin-induced alterations of Bax and Bcl-2, as well as their ratio ($p < 0.01$), compared to the CIS group were very similar to the effects of simultaneous administration of silymarin in an equal dose. The relative gene expression of caspase-3, an apoptosis coordination enzyme, was also significantly affected by the applied protocols ($F = 53.467$) in the same manner as Bax. Thus, cisplatin administration significantly increased caspase-3 hippocampal expression (Figure 4(d)) compared to the control ($p < 0.01$). This manifestation of cisplatin proapoptotic action was lowered with all orally administered extracts (CIS+E100, CIS+E200, and CIS+silymarin) compared to the CIS group ($p < 0.01$), except for the lowest dose of *S. hortensis* extract (50 mg/kg/d).

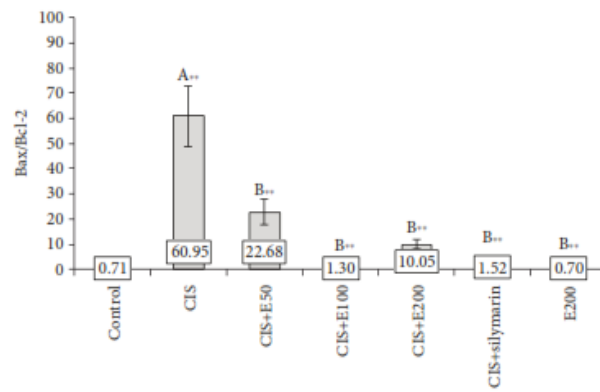
As shown in Figure 5(a), simple regression analysis revealed a strong positive correlation between the index of lipid peroxidation expressed as TBARS and the Bax/Bcl-2 ratio ($R = 0.823$, $p = 1.26E-09$). The analysis also indicated



(a)



(b)



(c)

FIGURE 4: Continued.

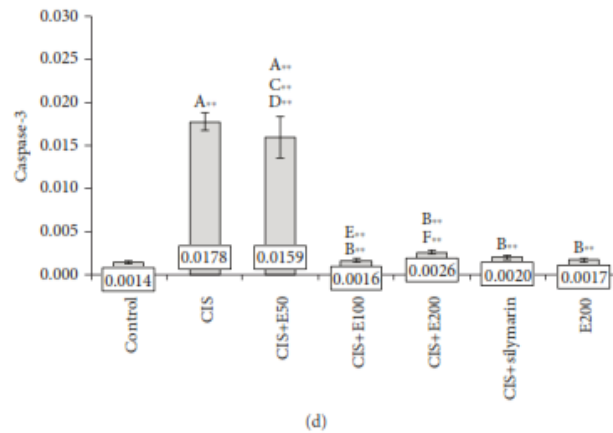


FIGURE 4: The relative expression of genes related to apoptosis in the rat hippocampus: (a) Bax, (b) Bcl-2, (c) Bax/Bcl-2 ratio, and (d) caspase-3. Values are the mean \pm standard error of the mean (SEM); $n = 5$ per group. * denotes a significant difference of $p < 0.05$; ** denotes a significant difference of $p < 0.01$. A: control vs. other groups; B: CIS vs. other groups; C: CIS+silymarin vs. other groups; D: E200 vs. other groups; E: CIS+E50 vs. CIS+E100; F: CIS+E50 vs. CIS+E200; G: CIS+E100 vs. CIS+E200.

strong but negative (Figure 5(b)) correlation between the hippocampal antioxidant capacity estimated by means of SOD activity and Bax/Bcl-2 ratio ($R = 0.688$, $p = 4.70E-06$). Finally, the analysis presented in Figure 5(c) confirms a strong, also negative, correlation between the Bax/Bcl-2 ratio and the principal indicator of the increased anxiety level obtained in the EPM test expressed as CDOA ($R = 0.601$, $p = 0.0001$).

4. Discussion

Although chemotherapy is one of the most employed approaches in the treatment of numerous malignancies, this therapeutic approach usually results in numerous adverse effects. Cisplatin, a widely used chemotherapeutic drug, has also been reported for serious clinical side effects, including severe manifestations of neurotoxicity, despite the fact that it poorly crosses the blood-brain barrier under physiological conditions [27], such as psychological, cognitive, and perceptual impairment [6, 28, 29]. The manifestations of neurotoxicity following cisplatin administration have also been confirmed in animal experimental models. Cisplatin-induced behavioral alterations include cognitive dysfunction [30] and depressive- and anxiety-like behaviors in rats [31, 32]. The results obtained in this study showed a clear anxiogenic effect of cisplatin (Figures 1 and 2). The anxiety-like behavior following cisplatin administration was manifested by means of the decline of the most convincing indicators in OF (CDCZ and FCZ) and EPM (CDOA and FOA) tests and confirmed by a decrease in locomotor and exploratory activities, in both tests, which is typical for anxiogenic features [33]. The anxiogenic effect of cisplatin applied in the single dose (7.5 mg/kg b.w.), as observed in this study, is in accordance with previously reported anxiety-like behavior following chronic

cisplatin administration (5 mg/kg for five weeks and seven weeks) [5, 7].

Behavioral manifestations of cisplatin-induced neurotoxicity occur simultaneously with alterations in the hippocampus that involve inhibition in cell proliferation, differentiation, and neurogenesis with alterations in neurotransmitter content with morphological verification of neuronal damage [34–36]. Cisplatin also causes apoptosis [37], oxidative stress [38], and inflammation [39]. Our results show that the anxiogenic effect of cisplatin was accompanied by significant alterations in hippocampal tissue oxidative status (Figure 3). The increased lipid peroxidation following cisplatin administration observed in this study, as well as the decline in the antioxidant defense system, expressed by means of SOD and CAT activity in the hippocampus, is in line with reported alterations in oxidative status following chronic cisplatin treatment [7]. However, the lack of significant alteration in total hippocampal glutathione after a single dose of cisplatin, which is not in accordance with the reduction in GSH reported in that study, may be explained by different experimental protocols that included prolonged cisplatin treatment (seven weeks), sufficient to induce a significant decline in hippocampal glutathione. The postulated mechanisms of cisplatin neurotoxic effects in the rat hippocampus include the action via alteration in the expression of genes involved in antioxidative defense responses [7]. Changes in gene expression provoked by cisplatin implicate both downregulation of Nrf2, as a key regulator of protection against oxidative stress [40], and HO-1 (controlled by the Nrf2 gene level), as well as upregulation of NF- κ B, which is responsible for cell damage in a various manner, including the increase of proinflammatory cytokines. Those mechanisms may lead to neuroinflammatory cascade in the hippocampus with the consequent behavioral deficits [41]. Inflammatory mediators have been reported to reduce hippocampal BDNF levels [42], which

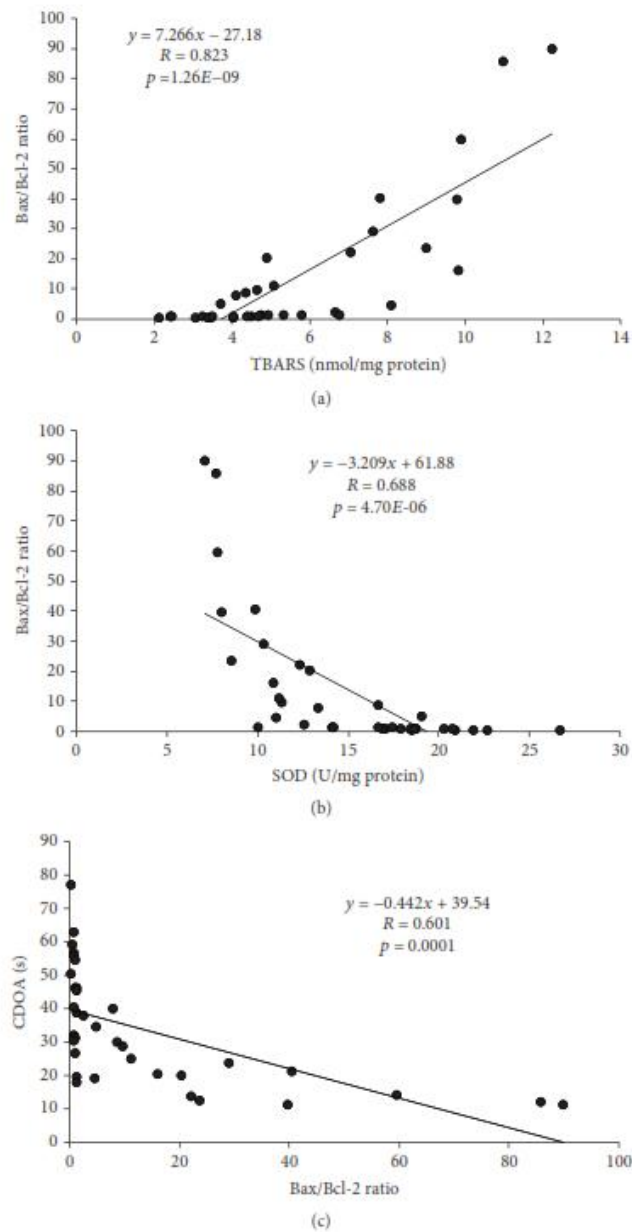


FIGURE 5: The relationship between (a) TBARS and Bax/Bcl-2 ratio, (b) SOD activity and Bax/Bcl-2 ratio, and (c) Bax/Bcl-2 ratio and CDOA in hippocampal tissue ($n = 35$).

may result in a decrease of hippocampal volume that, in turn, may be the principal cause of various mood disorders [43], including anxiety-like behavior.

Not surprisingly for the anticancer drug, cisplatin administration in this study exerted proapoptotic response (Figure 4). This action was manifested by both an increase in Bax and caspase-3 relative gene expression and a decline

in Bcl-2 hippocampal expression. The significant alterations in apoptotic gene relative expression in the hippocampus were confirmed by a typical proapoptotic shift in the gene expression ratio, as the intracellular ratio of Bax and Bcl-2 stems from their antagonistic action in apoptosis control and describes the ability of a cell to respond to an apoptotic signal [44, 45]. A similar response to single cisplatin

application was reported by Manohar and coworkers [8]. That comprehensive study offered excellent insight in the individual proapoptotic gene expression pattern in a rat hippocampus, showing that the whole proapoptotic set of genes (Bid, Bik, and Bok) was elevated following cisplatin, while the antiapoptotic capacity of hippocampal neurons, expressed as Bcl2a1 relative gene expression, was simultaneously significantly deprived along with the marker of cell proliferation (Ki67). The proapoptotic outcome provoked by cisplatin, as observed in our study, accompanied by the previously described oxidative damage in the hippocampus, may be considered as potential biological mechanisms involved in emotional impairment manifested by anxiety-like behavior [5, 6].

Previously, we demonstrated that *S. hortensis* methanol extract used in this study was rich in phenolic compounds, particularly in rosmarinic acid (24.9 mg/g of dry extract) [17]. Several phenolic acids, such as chlorogenic, caffeic, syringic, *p*-coumaric, sinapic, and isoferulic acids, were identified in lower concentrations, as well as a certain amount of flavonoids (quercetin, apigenin, luteolin, and naringenin) and their derivatives [17]. Rosmarinic acid is mostly known for its antioxidant features [46], but it has shown many biological activities including cytotoxicity, antimicrobial, antiviral, antidiabetic, anti-inflammatory, antiallergic, and immunomodulatory activities [47–50]. In previous investigations, rosmarinic acid showed significant alleviation of oxidative stress and anti-inflammatory potential *in vivo* [47]. Especially important were antioxidant properties of rosmarinic acid during *in vivo* cisplatin treatment [48, 51]. Domitrović and coworkers proposed that protective effects of rosmarinic acid against CP-induced nephrotoxicity included reducing the levels of oxidative stress markers where rosmarinic acid decreased lipid peroxidation, 4-HNE, CYP2E1, and HO-1 immunoreactivity [48]. Also, this phenolic acid had an influence on inflammatory response in kidneys by lowering the expression of NF- κ B p65 and TNF- α and reducing the parameters of apoptotic cell death (expression of p53 and p-p53) compared to the cisplatin treatment. A study of Lee and coworkers showed that rosmarinic acid was able to protect human dopaminergic neuronal cells against H₂O₂-induced oxidative stress by regulating the apoptotic process and suggested that this compound may be used in the prevention of neurodegenerative diseases [52]. Also, rosmarinic acid showed neuroprotective properties against H₂O₂-induced oxidative damage in astrocytes [53].

The restoration of equilibrium in the level of intrinsic antioxidant defense armory in tissue in cisplatin-treated rats after oral treatment with summer savory extract has been proposed as a dominant ameliorating mechanism [17]. The extract of *S. hortensis* in this study was able, not surprisingly, to reduce oxidative stress and apoptotic gene relative expression in the hippocampal tissue of experimental animals. Therefore, the neuroprotective effects of summer savory may be related to the presence of a high amount of rosmarinic acid in the extract [17]. Moreover, other phenolic compounds detected in *S. hortensis* showed significant *in vivo* antioxidant potential during the treatment with cisplatin. For example, quercetin [54] and naringenin [55] reduced

cisplatin-induced nephrotoxicity while luteolin inhibited the accumulation of platinum, inflammation, and apoptosis in renal tissues during treatment with cisplatin [56].

Accompanying oxidative stress, mitochondrial damage and induced cell death may be involved in neurological disorders and neural dysfunction [57]. In our study, a single application of cisplatin increased the expression of proapoptotic Bax gene in the hippocampus, in response to the increased level of ROS. Additionally, cisplatin downregulated the antiapoptotic Bcl-2 gene, which is in line with previous studies [8]. Oral administration of *S. hortensis* extract (100 mg/kg/d), as well as silymarin, significantly changed the balance between Bcl-2 and Bax expression, indicating that the apoptosis in the hippocampus was inhibited by the application of the extract. Our results were in accordance with another research, which demonstrated that *S. hortensis* extract controlled apoptosis in H₂O₂-challenged Jurkat cells [18]. Considering the positive correlation observed between the Bax/Bcl-2 ratio and TBARS level, it could be concluded that the main denominator of the apoptotic pathway may be lipid peroxidation, which is the main factor in disturbance of cellular integrity.

The plants from genus *Satureja* (Lamiaceae) are known for their various pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, immunostimulant, hepatoprotective, and anticancer properties [16, 58], but the studies regarding the behavioral effects of *Satureja* species have not been reported so far. In this study, for the first time, it was shown that the *Satureja* species may also have an influence on the reduction of cisplatin-induced neurotoxicity. The effects of *S. hortensis* extract on the regulation of oxidative stress and proapoptotic factors in the hippocampal tissue were comparable to silymarin. When applied in the same doses, both exhibited very similar effects on these parameters. Silymarin, as a standardized herbal preparation known for its antioxidant effects, was able to reduce the toxic effects caused by many xenobiotics, including drug-induced toxicity [59]. The protective effects of silymarin on cisplatin-induced ototoxicity [60], as well as liver, kidney, and testicular toxicities, have been reported so far [17].

In summary, anxiogenic action of cisplatin, accompanied with increased oxidative stress and proapoptotic manifestations in the hippocampus, can be attenuated by antioxidant supplementation with a simultaneous diminishing of oxidative damage and enhanced antiapoptotic capacity in rats, suggesting a potential beneficial role of antioxidant-rich natural products in the treatment of cisplatin-induced neurotoxicity patterns.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Authors' Contributions

Authors Igor Kumburovic and Dragica Selakovic contributed equally to this study.

Acknowledgments

This work was supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (JP 06/18), and the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (project No. III43004).

Supplementary Materials

Supplement 1: RT-PCR primers used in this study. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] W. Hassan, C. Barroso Silva, I. U. Mohammadzai, J. Teixeira da Rocha, and J. Landeira-Fernandez, "Association of oxidative stress to the genesis of anxiety: implications for possible therapeutic interventions," *Current Neuropharmacology*, vol. 12, no. 2, pp. 120–139, 2014.
- [2] M. I. Turan, A. Cayir, N. Cetin, H. Suleyman, I. S. Turan, and H. Tan, "An investigation of the effect of thiamine pyrophosphate on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in rat brain tissue compared with thiamine: thiamine and thiamine pyrophosphate effects on cisplatin neurotoxicity," *Human & Experimental Toxicology*, vol. 33, no. 1, pp. 14–21, 2014.
- [3] D. Aydin, E. G. G. Peker, M. D. Karakurt et al., "Effects of Ginkgo biloba extract on brain oxidative condition after cisplatin exposure," *Clinical and Investigative Medicine*, vol. 39, no. 6, 2016.
- [4] O. Kanat, H. Ertas, and B. Caner, "Platinum-induced neurotoxicity: a review of possible mechanisms," *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 8, no. 4, pp. 329–335, 2017.
- [5] M. Shabani, M. Nazeri, S. Parsania et al., "Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity," *NeuroToxicology*, vol. 33, no. 5, pp. 1314–1321, 2012.
- [6] L. Troy, K. McFarland, S. Littman-Power et al., "Cisplatin-based therapy: a neurological and neuropsychological review," *Psychooncology*, vol. 9, no. 1, pp. 29–39, 2000.
- [7] A. Jangra, M. Kwatra, T. Singh et al., "Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus," *European Journal of Pharmacology*, vol. 791, pp. 51–61, 2016.
- [8] S. Manohar, S. Jamesdaniel, and R. Salvi, "Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes," *Neurotoxicity Research*, vol. 25, no. 4, pp. 369–380, 2014.
- [9] M. K. Parvez, "Natural or plant products for the treatment of neurological disorders: current knowledge," *Current Drug Metabolism*, vol. 19, no. 5, pp. 424–428, 2018.
- [10] R. Hamidpour, S. Hamidpour, M. Hamidpour, M. Shahlari, and M. Sohraby, "Summer savory: from the selection of traditional applications to the novel effect in relief, prevention, and treatment of a number of serious illnesses such as diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer's disease, and cancer," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 140–144, 2014.
- [11] P. N. Ravindran, G. S. Pillai, and M. Divakaran, "Other herbs and spices: mango ginger to wasabi," in *Handbook of Herbs and Spices*, K. V. Peter, Ed., pp. 557–582, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2012.
- [12] V. Hajhashemi, H. Sadraei, A. R. Ghannadi, and M. Mohseni, "Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 71, no. 1-2, pp. 187–192, 2000.
- [13] S. Mohtashami, V. Rowshan, L. Tabrizi, M. Babalar, and A. Ghani, "Summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions," *Industrial Crops and Products*, vol. 111, pp. 226–231, 2018.
- [14] P. Mašković, V. Veličković, M. Mitić et al., "Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity," *Industrial Crops and Products*, vol. 109, pp. 875–881, 2017.
- [15] I. Fierascu, C. E. Dinu-Pirvu, R. C. Fierascu et al., "Phytochemical profile and biological activities of *Satureja hortensis* L.: a review of the last decade," *Molecules*, vol. 23, no. 10, p. 2458, 2018.
- [16] B. Tepe and M. Cilkiz, "A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 3, pp. 375–412, 2015.
- [17] T. Boroja, J. Katanić, G. Rosić et al., "Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 118, pp. 252–263, 2018.
- [18] I. Chkhikvishvili, T. Sanikidze, N. Gogia et al., "Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 456253, 9 pages, 2013.
- [19] H. Takeda, M. Tsuji, M. Inazu, T. Egashira, and T. Matsumiya, "Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice," *European Journal of Pharmacology*, vol. 449, no. 3, pp. 261–267, 2002.
- [20] J. Joksimovic, D. Selakovic, N. Jovicic et al., "Exercise attenuates anabolic steroids-induced anxiety via hippocampal NPY and MC4 receptor in rats," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, p. 172, 2019.
- [21] B. RF Jr. and S. IW, "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 195, no. 1, pp. 133–140, 1952.
- [22] H. P. Misra and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, pp. 3170–3175, 1972.
- [23] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [24] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [25] L. OH, R. NJ, F. AL, and R. RJ, "Protein measurement with Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265–275, 1951.

- [26] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [27] S. Jacobs, C. L. McCully, R. F. Murphy, J. Bacher, F. M. Balis, and E. Fox, "Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 65, no. 5, pp. 817–824, 2010.
- [28] S. Kaasa, B. T. Olsnes, E. Thorud, and H. Høst, "Reduced short-term neuropsychological performance in patients with nonsmall-cell lung cancer treated with cisplatin and etoposide1," *Antibiotics and Chemotherapy*, vol. 41, pp. 226–231, 1988.
- [29] C. C. P. Verstappen, J. J. Heimans, K. Hoekman, and T. J. Postma, "Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management," *Drugs*, vol. 63, no. 15, pp. 1549–1563, 2003.
- [30] N. Lomeli, K. Di, J. Czerniawski, J. F. Guzowski, and D. A. Bota, "Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 102, pp. 274–286, 2017.
- [31] N. F. Abdelkader, M. A. Saad, and R. M. Abdelsalam, "Neuroprotective effect of nebulivol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats," *Journal of Neurochemistry*, vol. 141, no. 3, pp. 449–460, 2017.
- [32] M. Pantic and M. Minic, "The evaluation of the effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced alterations in exploratory activity in elevated plus maze test in rats," *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, vol. 20, no. 1, pp. 65–72, 2017.
- [33] A. Ennaceur, "Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments," *Physiology & Behavior*, vol. 135, pp. 55–71, 2014.
- [34] Y. Liu, N. Hamaue, T. Endo, M. Hirafuji, and M. Minami, "5-Hydroxytryptamine (5-HT) concentrations in the hippocampus, the hypothalamus and the medulla oblongata related to cisplatin-induced pica of rats," *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, vol. 113–114, pp. 97–113, 2003.
- [35] J. Dietrich, R. Han, Y. Yang, M. Mayer-Proschel, and M. Noble, "CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo*," *Journal of Biology*, vol. 5, no. 7, p. 22, 2006.
- [36] S. E. James, H. Burden, R. Burgess et al., "Anti-cancer drug induced neurotoxicity and identification of Rho pathway signaling modulators as potential neuroprotectants," *Neurotoxicology*, vol. 29, no. 4, pp. 605–612, 2008.
- [37] D. Kong, L. Zhuo, C. Gao et al., "Erythropoietin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis," *Journal of Nephrology*, vol. 26, no. 1, pp. 219–227, 2013.
- [38] Y. I. Chirino and J. Pedraza-Chaverri, "Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 61, no. 3, pp. 223–242, 2009.
- [39] K. P. Kang, D. H. Kim, Y. J. Jung et al., "Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 24, no. 10, pp. 3012–3020, 2009.
- [40] M. R. Vargas, D. A. Johnson, D. W. Sirkis, A. Messing, and J. A. Johnson, "Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 50, pp. 13574–13581, 2008.
- [41] W. F. Wang, S. L. Wu, Y. M. Liou, A. L. Wang, C. R. Pawlak, and Y. J. Ho, "MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats," *Behavioral Neuroscience*, vol. 123, no. 6, pp. 1261–1270, 2009.
- [42] K. Sulakhiya, G. P. Keshavlal, B. B. Bezbaruah et al., "Lipopoly-saccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin," *Neuroscience Letters*, vol. 611, pp. 106–111, 2016.
- [43] A. J. Eisch, "Adult neurogenesis: implications for psychiatry," *Progress in Brain Research*, vol. 138, pp. 315–342, 2002.
- [44] Z. N. Oltval, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer, "Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death," *Cell*, vol. 74, no. 4, pp. 609–619, 1993.
- [45] E. Yang and S. J. Korsmeyer, "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death," *Blood*, vol. 88, no. 2, pp. 386–401, 1996.
- [46] A. G. Adomako-Bonsu, S. L. F. Chan, M. Pratten, and J. R. Fry, "Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: importance of physico-chemical characteristics," *Toxicology in Vitro*, vol. 40, pp. 248–255, 2017.
- [47] M. Alagawany, M. E. Abd el-Hack, M. R. Farag et al., "Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits," *Animal Health Research Reviews*, vol. 18, no. 2, pp. 167–176, 2017.
- [48] R. Domitrović, I. Potočnjak, Ž. Crnčević-Orlić, and M. Škoda, "Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 66, pp. 321–328, 2014.
- [49] R. Iswandana, B. T. Pham, W. T. van Haften et al., "Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid," *Toxicology in Vitro*, vol. 32, pp. 261–268, 2016.
- [50] Y. L. Ngo, C. H. Lau, and L. S. Chua, "Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 121, pp. 687–700, 2018.
- [51] M. Tavañi and H. Ahmadvand, "Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats," *Tissue and Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 392–397, 2011.
- [52] H. J. Lee, H. S. Cho, E. Park et al., "Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis," *Toxicology*, vol. 250, no. 2–3, pp. 109–115, 2008.
- [53] P. Costa, B. Sarmento, S. Gonçalves, and A. Romano, "Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line," *Industrial Crops and Products*, vol. 50, pp. 361–365, 2013.
- [54] P. D. Sanchez-Gonzalez, F. J. Lopez-Hernandez, F. Perez-Barriocanal, A. I. Morales, and J. M. Lopez-Novoa, "Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 11, pp. 3484–3495, 2011.
- [55] O. A. Badary, S. Abdel-Maksoud, W. A. Ahmed, and G. H. Owieda, "Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats," *Life Sciences*, vol. 76, no. 18, pp. 2125–2135, 2005.
- [56] R. Domitrović, O. Cvijanović, E. P. Pugel, G. B. Zagorac, H. Mahmutefendić, and M. Škoda, "Luteolin ameliorates

- cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of platinum accumulation, inflammation and apoptosis in the kidney," *Toxicology*, vol. 310, pp. 115–123, 2013.
- [57] M. P. Mattson, "Apoptosis in neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 2, pp. 120–130, 2000.
- [58] F. Jafari, F. Ghavidel, and M. M. Zarshenas, "A critical overview on the pharmacological and clinical aspects of popular Satureja species," *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, vol. 9, no. 3, pp. 118–127, 2016.
- [59] J.-W. Wu, L.-C. Lin, and T.-H. Tsai, "Drug–drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 121, no. 2, pp. 185–193, 2009.
- [60] S. I. Cho, J. E. Lee, and N. Y. Do, "Protective effect of silymarin against cisplatin-induced ototoxicity," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 78, no. 3, pp. 474–478, 2014.

Article

N-Acetylcysteine Protects against the Anxiogenic Response to Cisplatin in Rats

Rade Vukovic ¹, Igor Kumburovic ², Jovana Joksimovic Jovic ², Nemanja Jovicic ³, Jelena S. Katanic Stankovic ⁴, Vladimir Mihailovic ⁵, Milos Djuric ⁶, Stefan Velickovic ⁷, Aleksandra Arnaut ⁷, Dragica Selakovic ^{2,*} and Gvozden Rosic ^{2,*}

¹ Clinic for Anesthesiology and Critical Care, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia; radvuk@gmail.com

² Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; ikumburovic@gmail.com (I.K.); jovana_joksimovic@yahoo.com (J.J.J.)

³ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; nemanjajovicic.kg@gmail.com

⁴ Department of Science, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijica b.b., 34000 Kragujevac, Serbia; jkatanic@kg.ac.rs

⁵ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia; vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs

⁶ Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotica 8, 11000 Belgrade, Serbia; dr.milosdj@gmail.com

⁷ Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; velickovicstefan91@gmail.com (S.V.); sandra11_92@yahoo.com (A.A.)

* Correspondence: dragica984@gmail.com (D.S.); grosic@medf.kg.ac.rs (G.R.)

Received: 13 November 2019; Accepted: 8 December 2019; Published: 17 December 2019

Abstract: Since cisplatin therapy is usually accompanied with numerous toxicities, including neurotoxicity, that involve tissue oxidative damage, the aim of this study was to evaluate the possible protective effect of *N*-acetylcysteine (NAC) on the anxiogenic response to cisplatin (CIS). Thirty-two male Wistar albino rats divided into four groups (control, cisplatin, NAC, and CIS + NAC). All treatments were delivered intraperitoneally. On day one, the control and cisplatin groups received saline while the NAC and CIS + NAC groups were administered with NAC (500 mg/kg). On the fifth day, the control group received saline while the CIS group was treated with cisplatin (7.5 mg/kg), the NAC group again received NAC (500 mg/kg), and the CIS + NAC group was simultaneously treated with cisplatin and NAC (7.5 and 500 mg/kg, respectively). Behavioral testing, performed on the tenth day in the open field (OF) and elevated plus maze (EPM) tests, revealed the anxiogenic effect of cisplatin that was significantly attenuated by NAC. The hippocampal sections evaluation showed increased oxidative stress (increased lipid peroxidation and decline in antioxidant enzymes activity) and proapoptotic action (predominantly by diminished antiapoptotic gene expression) following a single dose of cisplatin. NAC supplementation along with cisplatin administration reversed the prooxidative and proapoptotic effects of cisplatin. In conclusion, the results obtained in this study confirmed that antioxidant supplementation with NAC may attenuate the cisplatin-induced anxiety. The mechanism of anxiolytic effect achieved by NAC may include the decline in oxidative damage that down regulates increased apoptosis and reverses the anxiogenic action of cisplatin.

Keywords: cisplatin; *N*-acetylcysteine; oxidative stress; apoptosis; hippocampus; rats

1. Introduction

Cisplatin, cisplatinum, or cis-diamminedichloroplatinum (II) is a well-known chemotherapeutic drug used to treat a number of different types of cancers including sarcomas, cancers of the soft tissue, muscles, bones, and blood vessels [1]. Although synthesized in 1844, cisplatin has been increasingly interesting since its anticancer activity was shown. Namely, in the 1960s it was discovered to possess cytotoxic properties [2], and in the seventies it became the core compound for the systemic treatment of germ cell cancers. Cisplatin was the first FDA-approved platinum compound for cancer treatment in 1978 [3], which has significantly affected the further development of related platinum-based drugs as potential anticancer treatments [4]. Although highly effective as a cytostatic, cisplatin treatment leads to dose-dependent adverse effects as a consequence of DNA damage, increased production of proinflammatory cytokines, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and oxidative stress [5]. These adverse effects include neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, ototoxicity, myelosuppression, gastrointestinal toxicity, and cardiotoxicity. Common neurological adverse effects are cognitive deficits, disorientation, visual perception, and hearing disorders [6].

Cisplatin exerts its cytotoxic properties by reacting with DNA, which eventually leads to irreversible apoptosis [7]. It binds to the N7 reactive center on purine residues and as such forms DNA–DNA interstrand and intrastrand crosslinks. It is believed that intrastrand adducts are responsible for the cytotoxic effects of cisplatin and the inhibition of DNA replication and transcription. DNA adduct formation is followed by DNA damage recognition by a number of proteins that further transmit DNA damage signals to downstream signaling cascades involving p53, MAPK, and p73, which ultimately induce apoptosis. Furthermore, cisplatin induces apoptosis and inhibits the proliferation of stem cells and neurogenesis in the subventricular and subgranular hippocampal zone by increased expression of proapoptotic genes (*Bid*, *Bik*, *Bax*, *Bok*, *Tp53bp2*, and *Card6*), while reducing the expression of one of the major anti-apoptotic genes, *Bcl-2* [8]. Cisplatin binds to mitochondrial DNA (mtDNA) causing irreversible damage, leading to inhibitory replication and transcription of mtDNA and subsequent mitochondrial dysfunction and cell death. mtDNA damage and subsequent mitochondrial dysfunction result in the production of free reactive oxygen species (ROS), as well as the induction of oxidative stress [9].

Antioxidants gained significant scientific attention for their prominent beneficial effects that can combat the excessive oxidative stress in organisms. They are compounds that stabilize, scavenge, and suppress the generation of oxidants and free radicals [10]. They can be grouped into enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT), and nonenzymatic antioxidants, such as ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), glutathione (GSH), β -carotene, and vitamin A. Besides several endogenous substances, there are a number of exogenous substances with strong antioxidant properties, such as flavonoids, polyphenols, coenzyme Q10, amino acids, and herbal extracts. They all may exhibit a strong antioxidant and anti-inflammatory potential, however, they differ significantly in their mechanisms of action [5]. *N*-acetylcysteine (NAC) is a sulfur containing amino acid that has recently been proven as a potent antioxidant. It is a more stable form of the L-cysteine amino acid, which is a source of cysteine that is necessary for the synthesis of glutathione, a significant nonenzymatic intracellular antioxidant [11]. As such, NAC may provide possible beneficial results with cisplatin administration in order to prevent cisplatin adverse effects. In addition to its antioxidant properties, NAC may reduce the reactivity of cisplatin within the cell itself. This could be achieved by its direct binding to cisplatin, diminishing its toxicity. Furthermore, it has been recently shown that NAC mitigates cisplatin-induced inhibition of dendritic branching, the formation of oxidative stress, and apoptosis of the cells in the hippocampus, as well as subsequent cognitive dysfunction, without affecting the effectiveness of cytostatic therapy [12].

The objective of this study was to estimate the possible beneficial effects of NAC supplementation along with cisplatin administration in order to prevent the behavioral adverse effects of cisplatin. Furthermore, the study aimed to evaluate the impact of NAC on

cisplatin-induced alterations in oxidative stress markers, as well as on the expression of apoptotic genes in the hippocampi of rats.

2. Material and Methods

2.1. Animals and Treatment

Three months old male Wistar albino rats (250–300 g, $n = 32$) were purchased from the Military Medical Academy, Serbia. All animals were kept in transparent cages (four animals per cage) under standard conditions (temperature 23 ± 1 °C, humidity $50 \pm 5\%$) with a light/dark cycle (12/12h) and had free access to food and water.

The rats were randomly assigned into four equal groups: control, cisplatin (CIS), NAC, and CIS + NAC groups ($n = 8$). As shown in Table 1, at the start of the trial (day 1) the control and cisplatin groups received saline (approximately 2 mL i.p.), while the NAC and CIS + NAC groups were administered with NAC (500 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich, Munich, Germany). On the fifth day, the control group received saline (in the same manner), the CIS group was treated with cisplatin (7.5 mg/kg i.p.) (Merck, Paris, France), the NAC group was administered with NAC again (500 mg/kg i.p.), and the CIS + NAC group was simultaneously treated with cisplatin and NAC (7.5 and 500 mg/kg i.p., respectively).

All research procedures were carried out in accordance with the European Directive for the welfare of laboratory animals No 86/609/EEC, the principles of Good Laboratory Practice (GLP), and in accordance with the ARRIVE guidelines. All experiments were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

Table 1. Experimental protocol. CIS: cisplatin; NAC: N-acetylcysteine.

Group	Day 1	Day 5	Day 10
Control	saline (2 mL, i.p.)	saline (2 mL, i.p.)	testing and sacrifice
CIS	saline (2 mL, i.p.)	cisplatin (7.5 mg/kg, i.p.)	testing and sacrifice
NAC	NAC (500 mg/kg, i.p.)	NAC (500 mg/kg, i.p.)	testing and sacrifice
CIS + NAC	NAC (500 mg/kg, i.p.)	cisplatin (7.5 mg/kg, i.p.) + NAC (500 mg/kg, i.p.)	testing and sacrifice

2.2. Behavioral Testing

Behavioral tests were conducted on the tenth day. At approximately 0900 the rats were placed in the testing room and acclimatized for 1 h before testing in the open field (OF) and the elevated plus maze (EPM) test, respectively, with an inter-trial interval of 15 min. In order to remove possible interfering scents, the mazes were cleaned with water and ethanol (70%) after each trial.

2.2.1. Open Field Test

The OF apparatus and methodology have been fully described elsewhere [13]. Briefly, at the beginning of the trial, each rat was placed in the center of the square arena ($60 \times 60 \times 30$ cm) and spontaneous exploration was recorded for 5 min. The following parameters were calculated: the cumulative duration in the center zone (CDCZ) (s), the frequency to the center zone (FCZ), the number of rearings, the total distance moved (TDM) (cm), and the percentage of time moving (%TM).

2.2.2. Elevated Plus Maze Test

The apparatus for the EPM test consisted of two open (50×20 cm) and two enclosed ($50 \times 20 \times 30$ cm) opposite arms elevated 100 cm above the floor. Each rat was placed in the center of the maze

facing the open arm, and was allowed 5 min for free exploration. The parameters obtained in the EPM test were as follows: the cumulative duration in the open arms (CDOA) (s), the frequency to the open arms (FOA), the total distance moved (TDM) (cm), the percentage of time moving (%TM), the number of rearings, the number of head dippings, and the number of total exploratory activity (TEA) episodes.

2.2.3. Video Recording System and Analysis

OF and EPM tests were recorded by using a digital video camera (SONY FDR AX33B) mounted above the mazes at a suitable height (150 and 250 cm, respectively). Interpretation of video files was conducted by Ethovision software XT 12 (Noldus Information Technology, the Netherlands).

After completing behavioral testing, the rats were anaesthetized with a combination of ketamine (10 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.), and sacrificed by decapitation. Brains were carefully removed and hippocampi were dissected. Afterwards, tissue samples were homogenized in phosphate buffered saline (PBS, 50 mM, pH 7.4) and frozen at -80°C for further analysis.

2.3. Oxidative Stress Markers Determination

The homogenized samples of hippocampi were centrifuged (4000 rpm, 4°C) for 15 min. The obtained supernatants were used to evaluate the following parameters of oxidative stress: index of lipid peroxidation, the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the level of total glutathione (GSH).

The lipid peroxidation in the hippocampus was evaluated by following the method of Ohkawa and coworkers [14] and expressed as the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results were calculated using the standard curve of malondialdehyde (MDA) and presented as nanomoles of MDA per milligram of protein (nmol/mg protein). The activity of SOD was monitored by spectrophotometric measurement of inhibition of adrenalin decomposition to adrenochrome at 480 nm [15], while CAT activity was determined based on the rate of hydrogen peroxide decomposition at 240 nm [16]. The enzymatic activities were expressed as enzymatic units per milligram of protein (U/mg protein). The supernatants were also used for the determination of GSH levels in the hippocampus, using spectrophotometric assay based on the reaction with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) [17]. The results of GSH levels in tissue homogenates were expressed as milligrams of GSH per gram of protein (mg/g protein). Total protein concentrations were determined using the method of Lowry and coworkers [18] where bovine serum albumin was used as a standard.

2.4. Quantification of Expression of Apoptotic Genes: RT-PCR Analysis of Genes Involved in the Regulation of Cellular Apoptosis

Total RNA from the hippocampus was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, we used 2 μg of total RNA with random hexamers and a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Real-time PCR was carried out using Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA) and mRNA specific primers (Table 2) for *Bax*, *Bcl-2*, and β -*actin* as a housekeeping gene (Invitrogen, Waltham, MA). Real-time PCR reactions were done in the Mastercycler Ep Realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) and after data analysis, relative gene expression was calculated according to Livak and Schmittgen [19].

Table 2. RT-PCR primers used in this study.

Name	Sequence (5' to 3')
β - <i>actin</i>	F GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT
	R GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT
<i>Bax</i>	F GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT
	R ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC

<i>Bcl-2</i>	F	GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG
	R	GTACTTCATCACGATCTCCCGG

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS version 20.0 statistical package (IBM SPSS Statistics 20, Chicago, IL, USA). The results are expressed as the means \pm standard errors of the mean (SEM). Parameters were initially submitted to the Levene's test for homogeneity of variance and to the Shapiro–Wilk test of normality. One-way ANOVA, followed by Bonferroni test was used for comparisons between the groups. Simple linear regression and Pearson's coefficient of correlation were used to analyze relationships between parameters obtained in behavioral tests, oxidative stress markers, and relative gene expression. The significance was determined at $p < 0.05$ for all tests.

3. Results

As shown in Figure 1, cisplatin significantly lowered CDCZ and FCZ compared to the control group ($F = 9.423$ and 5.850 , respectively, $df = 3$, $p < 0.01$). This anxiogenic feature of cisplatin was attenuated by simultaneous administration of NAC ($p < 0.05$, compared to the CIS group), which reversed CDCZ and FCZ almost to the control values. The exploratory activity in the OF test expressed by means of the number of rearings also confirmed the anxiogenic effect of cisplatin that was manifested by significant diminishing of vertical locomotion ($F = 10.231$, $p < 0.01$). NAC application along with cisplatin was sufficient to significantly increase that type of exploratory activity when compared to the CIS group ($p < 0.05$). Cisplatin administration also resulted in a significant decrease in locomotion parameters in the OF test (Figure 1D,E) of TDM and %TM ($F = 8.552$ and 12.551 , respectively, $p < 0.01$) compared to the control values. Again, simultaneous administration of cisplatin and NAC diminished that anxiogenic impact of cisplatin on locomotor parameters ($p < 0.05$). When applied alone, NAC administration had no significant effect on the parameters from OF test when compared to the control.

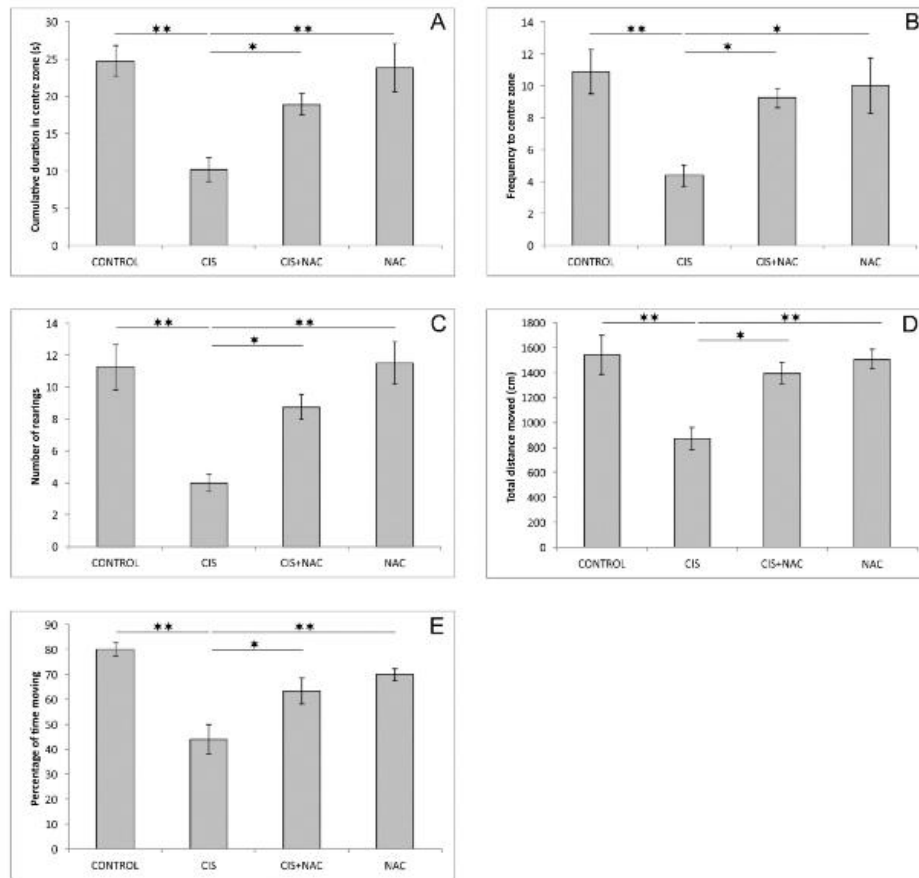


Figure 1. Parameters obtained in the open field test: (A) the cumulative duration in center zone, (B) the frequency to center zone, (C) the number of rearings, (D) the total distance moved, (E) the percentage of time moving. The values are mean \pm standard error of the mean (SEM), * denotes a significant difference $p < 0.05$, ** denotes a significant difference $p < 0.01$.

Like in the OF test, the anxiogenic response to cisplatin was manifested by a significant decline, compared to the control, in two principal indicators of anxiety in the EPM test: CDOA and FOA ($F = 16.447$ and 8.769 , respectively, $dF = 3$, $p < 0.01$). As shown in Figure 2A,B, the beneficial effect of NAC on cisplatin-induced anxiogenic effects was expressed by a significant increase in CDOA ($p < 0.01$) and FOA ($p < 0.05$) in the combined group compared to CIS group. The parameters of locomotor activity in the EPM test (TDM and %TM; Figure 2C,D, respectively), were also significantly altered by the applied protocols ($F = 12.827$ and 6.335). The significant diminishing of locomotion was confirmed by the decline in both parameters in cisplatin treated rats when compared to the control ($p < 0.01$). The cisplatin-induced reduction of locomotion, similar to the results obtained in the OF test, was also abolished by simultaneous administration of NAC ($p < 0.05$), except for %TM. The exploratory activity in the EPM test, expressed as the number of rearings and head-dippings, as well as the number of TEA episodes (Figure 2E–G) was also significantly affected by the applied protocols ($F = 18.475$, 18.337 and 25.996 , respectively). A single dose of cisplatin significantly reduced all three parameters of exploration compared to the control ($p < 0.01$). Although NAC supplementation was sufficient to attenuate the cisplatin-induced decline in those parameters compared to the CIS group ($p < 0.05$ and 0.01 for TEA), it was not able to restore the exploratory activity in EPM since it remained significantly above the control values ($p < 0.05$ and 0.01 for TEA).

Similar to the OF test, the administration of NAC alone did not significantly affect any of parameters obtained in EPM test.

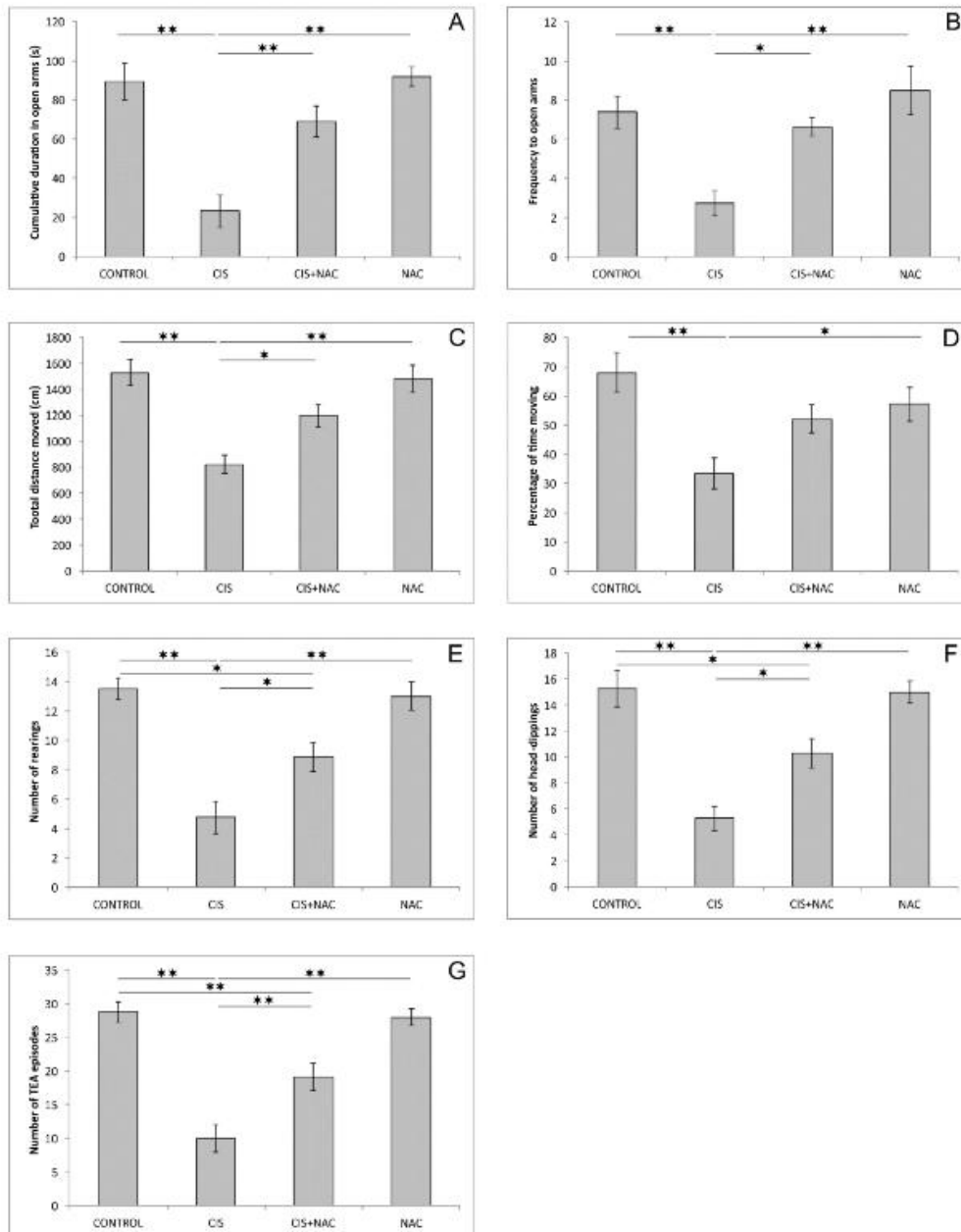


Figure 2. Parameters obtained in the elevated plus maze: (A) the cumulative duration in open arms, (B) the frequency to open arms, (C) the total distance moved, (D) the percentage of time moving, (E) the number of rearings, (F) the number of head-dippings, (G) the number of total exploratory activity (TEA) episodes. The values are mean \pm standard error of the mean (SEM), * denotes a significant difference $p < 0.05$, ** denotes a significant difference $p < 0.01$.

The evaluation of oxidative stress parameters showed significant alteration of the TBARS level, as well as CAT and SOD activities (Figure 3A–C) in the hippocampus caused by the application of cisplatin and its combination with NAC ($F = 40.872$, $F = 7.635$, $F = 10.372$). Cisplatin administration

induced a significant increase of the TBARS level ($p < 0.01$) and a significant decline in the examined antioxidant enzyme (CAT and SOD) activities ($p < 0.01$) in the hippocampus, while the GSH level in this group was almost unchanged ($p > 0.05$) compared to the control group. This prooxidative effect of cisplatin in the hippocampus was significantly attenuated by simultaneous NAC administration, resulting in a significant reduction ($p < 0.01$) of the TBARS level and increase of CAT ($p < 0.05$) and SOD ($p < 0.05$) activities, compared to the cisplatin-treated group. NAC application, when applied alone, had no significant effect on the studied oxidative stress markers in the hippocampus compared to the control group. As shown in Figure 3D, none of the applied protocols significantly altered total GSH levels ($F = 1.757$).

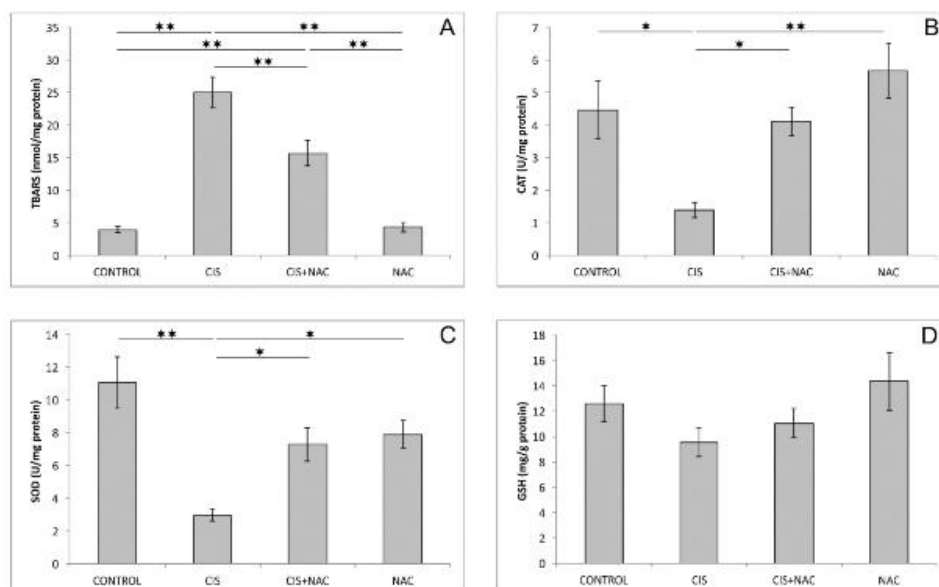


Figure 3. Oxidative stress parameters in rat hippocampus: (A) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), (B) catalase (CAT), (C) superoxide dismutase (SOD), (D) glutathione (GSH). The values are mean \pm standard error of the mean (SEM), * denotes a significant difference $p < 0.05$, ** denotes a significant difference $p < 0.01$.

As shown in Figure 4A, none of the applied protocols had a significant impact on relative gene expression of proapoptotic *Bax* in rat hippocampi ($F = 0.352$, $df = 3$). However, the relative gene expression of hippocampal *Bcl2* (Figure 4B) was significantly altered in this trial ($F = 11.143$). A single application of cisplatin significantly decreased the relative expression of this antiapoptotic gene compared to the control group ($p < 0.01$). This proapoptotic action of cisplatin was significantly attenuated ($p < 0.05$) by simultaneous NAC administration. This effect was also demonstrated by a significantly lower *Bax/Bcl2* ratio ($F = 12.866$, $p < 0.01$) compared to cisplatin alone. Neither pro- nor anti-apoptotic relative gene expression in the rat hippocampus was significantly affected by NAC, compared to the control values, when applied alone.

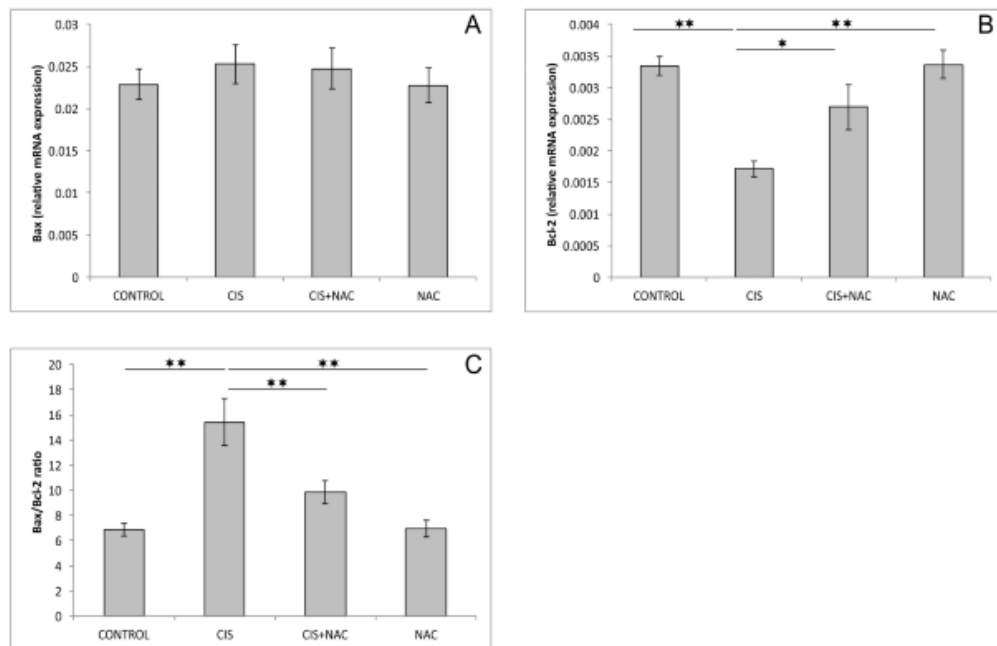


Figure 4. The relative gene expression of the pro- and anti-apoptotic genes in the rat hippocampus. (A) *Bax*, (B) *Bcl-2*, (C) *Bax/Bcl-2* ratio. The values are mean \pm standard error of the mean (SEM), * denotes a significant difference $p < 0.05$, ** denotes a significant difference $p < 0.01$.

Simple regression analysis (Figure 5A–C) revealed that hippocampal lipid peroxidation, expressed as TBARS, significantly positively correlated with the relative expression of *Bax*, as well as the *Bax/Bcl-2* ratio (Pearson's $r = 0.53$ and 0.85 , $p = 0.002$ and 5.9×10^{-10} , respectively) but negatively (also significantly) with the relative expression of *Bcl-2* in the rat hippocampus ($r = 0.88$, $p = 4.4 \times 10^{-11}$). In contrast, this analysis showed that the activity of both antioxidant enzymes, SOD (Figure 5D–F) and CAT (Figure 5G–I), significantly negatively correlated with *Bax* and the *Bax/Bcl-2* ratio ($r = 0.66$ and 0.70 , $p = 3.3 \times 10^{-5}$ and 9.3×10^{-6} for *Bax* and $r = 0.74$ and 0.73 , $p = 1.1 \times 10^{-6}$ and 1.8×10^{-6} for the *Bax/Bcl-2* ratio, respectively). At the same time, the activity of both enzymes strongly (positively) correlated with the relative expression of *Bcl-2* ($r = 0.86$ and 0.68 , $p = 2.3 \times 10^{-10}$ and 2.1×10^{-5} , respectively).

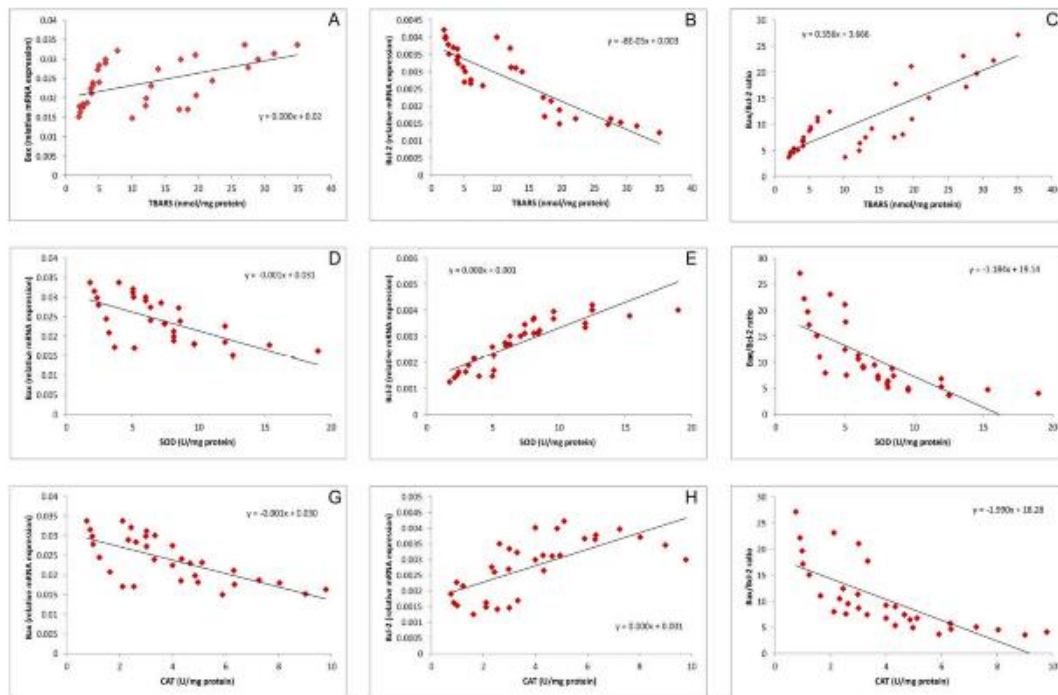


Figure 5. Relationship between the parameters of oxidative status in the rat hippocampus and the relative gene expression of apoptotic genes in the rat hippocampus for all investigated groups (A, B, C – represents the relationship between TBARS and *Bax*, *Bcl-2* and *Bax/Bcl-2* ratio, respectively; D, E, F – represents the relationship between SOD and *Bax*, *Bcl-2* and *Bax/Bcl-2* ratio, respectively; and G, H, I – represents the relationship between CAT and *Bax*, *Bcl-2* and *Bax/Bcl-2* ratio, respectively).

As shown in Figure 6, besides the impact on the relative hippocampal expression of pro- and anti-apoptotic genes, simple regression analysis revealed that the markers of oxidative stress also correlated with CDOA, the principle parameter of anxiety level obtained in the EPM test. The lipid peroxidation, expressed as TBARS, strongly and negatively correlated with the anxiolytic outcome in the EPM test (Figure 6A) as shown by the increase in CDOA ($r = 0.82, p = 1.7 \cdot 10^{-8}$). The opposite results were observed while testing the relationship between the activity of antioxidant enzymes, SOD and CAT, in the hippocampus, with CDOA (Figure 6B,C). SOD and CAT activity strongly and positively correlated with the indicator of decreased anxiety level expressed as CDOA ($r = 0.73$ and $0.70, p = 2.1 \cdot 10^{-6}$ and $6.2 \cdot 10^{-6}$ respectively).

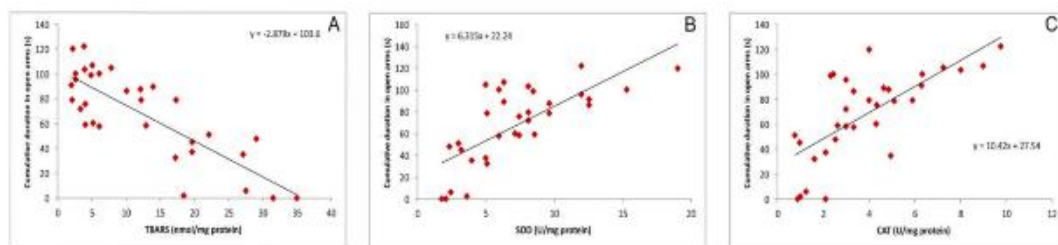


Figure 6. Relationship between the cumulative duration in the open arms and the hippocampal oxidative stress markers (A, B, C – represents the relationship between CDOA and TBARS, SOD, and CAT, respectively).

The connectivity between the parameters that indicates apoptotic mechanisms and the behavioral outcome is also presented in Figure 7. The increase in the relative hippocampal expression of the (pro-apoptotic) *Bax* gene negatively correlated with CDOA (Figure 7A, $r = 0.34, p >$

0.05). Also, negative (but strong) correlation was observed for the *Bax/Bcl-2* ratio and CDOA (Figure 7C, $r = 0.71$, $p = 6.2 \times 10^{-6}$). In contrast, the relative expression of the antiapoptotic gene *Bcl-2* also strongly, but positively, correlated with the increase in CDOA, as an indicator of an anxiolytic-like effect ($r = 0.84$, $p = 1.8 \times 10^{-9}$).

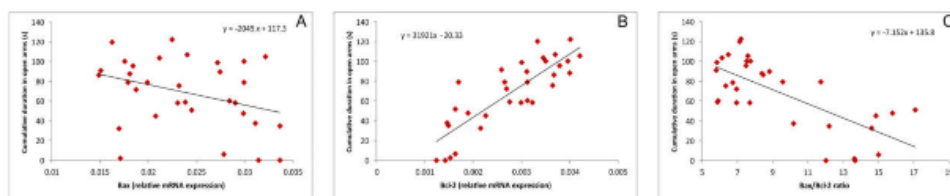


Figure 7. Relationship between the cumulative duration in the open arms and the relative expression of pro- and anti-apoptotic genes in the rat hippocampus (A, B, C – represents the relationship between CDOA and *Bax*, *Bcl-2* and *Bax/Bcl-2* ratio, respectively).

4. Discussion

The potential beneficial effects of antioxidant supplementation are still very intriguing since a compromise must be made between the two principle key points of a platinum-based therapeutic approach: its ability to treat numerous malignancies and, at the same time, its numerous serious side effects that quite often limit therapeutic. A variety of antioxidant-containing sources (including vitamins, natural compounds, etc.) have been employed in investigations of cisplatin-induced toxicity prevention and/or cure, but there still has not been confirmation of the potential beneficial role of the drugs already approved for different clinical implications (that have been confirmed for their safety and wide dosage range), such as NAC, in the treatment of behavioral manifestations of cisplatin-induced neurotoxicity.

Indeed, the results of this study showed that NAC, when applied on its own, did not affect any of the estimated parameters obtained in behavioral testing and hippocampus analysis for oxidative stress and apoptotic markers when compared to the values obtained in the control group. This is in line with a recent study [20], which presented the results of prolonged NAC administration (100 mg/kg for 20 consecutive days) that did not alter oxidative stress markers in the whole brain tissue samples by means of MDA, GSH, and total antioxidant capacity. Similar observations considering the impact on oxidative status in brain regions that were even more specific for the mood regulation (such as hippocampus) in rats were made in the extensive investigation of the other sulfur-containing amino acid, taurine, with no significant changes following continual SCAAs administration [21]. The lack of behavioral alterations after completing a 16 days trial with taurine (200 mg/kg), when compared to the control, was also reported in this study, and it is in accordance with the results of behavioral testing performed in our investigation.

Unlike for the absence of significant alterations when NAC was applied alone, the administration of this SCAA performed in two doses (500 mg/kg, 5 days before and simultaneously with cisplatin application) resulted in an evident modulation of the estimated parameters induced by cisplatin. When applied alone, cisplatin produced clear anxiogenic effect that was manifested by direct parameters of anxiety obtained in the OF, a decrease in CDCZ and FCZ (Figure 1A,B), and in EPM tests, a decrease in CDOA and FOA (Figure 2A,B). The anxiety-like behavior following cisplatin administration was confirmed by diminishing of exploratory activity in both the OF (Figure 1C) and EPM tests (Figure 2E–G). In addition, the anxiogenic response to cisplatin was also represented by means of decreased locomotor activity in both applied behavioral tests (Figures 1 D,E and 2C,D). The anxiety-like outcome of cisplatin administration observed in this study is in line with the results of our recent investigation [22], but the anxiogenic feature of cisplatin was also reported for single administration of cisplatin in a two-fold higher dose [21]. As expected, the cisplatin-induced anxiogenic effect was also described in a study with prolonged cisplatin

administration (5 weeks) with a lower dose (5 mg/kg) compared to the dose applied in this study [23].

Beside the behavioral alterations, the treatment with cisplatin also significantly affected the hippocampal oxidative balance in this investigation. Namely, cisplatin administration resulted in an increase of lipid peroxidation (Figure 3A) and a decline in the antioxidant capacity, expressed by means of decreased activity of antioxidant enzymes, CAT (Figure 3B) and SOD (Figure 3C), with no significant alteration in the second-line defense system (GSH, Figure 3D). The results obtained in this study are in accordance with previously described increased MDA levels in the hippocampus, as well as with an observed diminishing of antioxidant enzymes activity [5,21]. However, the cisplatin protocol performed in this study failed to induce a significant decline of the GSH level as reported in those two studies. This obvious difference can be explained by either a lower dose (7.5 vs. 10 mg/kg) or shorter exposure (single dose vs. 7 weeks) to the chemotherapeutic in our investigation.

The treatment with cisplatin, when applied alone, resulted in proapoptotic action in rat hippocampi in this study. Although the observed increase in *Bax* relative mRNA expression was not significant (Figure 4A), the diminishing of the antiapoptotic mechanism (Figure 4B) was sufficient to shift the pro-/antiapoptotic balance favoring increased apoptosis (Figure 4C). In general, our results are in line with the proapoptotic action of cisplatin previously reported in rodent hippocampi [8] and cell cultures [24], as well as in a human neuroblastoma cell line [25]. However, it should be noted that, unlike in the mentioned studies, the cisplatin-induced increase in proapoptotic markers was not significant. This difference could be attributed to a significantly lower dose of cisplatin applied in this investigation that was not sufficient to produce a more visible increase in proapoptotic markers levels in five days, suggesting that decline in antiapoptotic mechanisms may represent a much faster neuronal response to cisplatin.

Based on the results obtained in this study, it is obvious that NAC supplementation along with cisplatin application (in the applied doses) was sufficient to diminish the action of cisplatin on the parameters of cisplatin-induced neurotoxicity estimated in this investigation. NAC administration attenuated the anxiogenic effect of cisplatin, resulting in the reversion of behavioral indicators obtained in both performed tests (Figures 1 and 2) back to control values. This neuroprotective action of NAC was accompanied with the improvement of the hippocampal oxidative status (Figure 3), as well as with the amelioration of cisplatin-induced proapoptotic effects (Figure 4). The reduction of the anxiogenic response to cisplatin achieved by NAC supplementation, concomitant with enhanced antioxidative and antiapoptotic mechanisms, is in accordance with the previously described beneficial effects of antioxidant supplementation performed by various antioxidant sources, including SCAAs (taurine and d-Methionine) on cisplatin-induced neurotoxicity manifestations [21,26].

It seems that the antioxidative scavenger action of NAC, accompanied with the enhancement of the antioxidant defense capacity, may lead to the attenuation of the prooxidant action of cisplatin, which includes the cisplatin-induced alterations in gene expression, such as down regulation of Nrf2 (the principle protective factor against oxidative stress [27]) and consequent decrease in HO-1, and upregulation of NF- κ B. On this level, the oxidative stress additionally promotes deleterious effects of cisplatin by promoting proinflammatory cytokines release [28]. Once achieved, a neuroinflammatory cascade may lead to the previously described decline of hippocampal BDNF levels [29] with the consequent reduction of hippocampal volume that may contribute in cisplatin-induced behavioral alterations [30], such as the ones observed in this study. The postulated mechanism can be numerically supported by a strong correlation between lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes in hippocampus with the most important behavioral indicator of anxiety observed in this investigation (Figure 6). According to the results obtained in this study, it seems that by preventing the oxidative damage, NAC may also reduce the cisplatin-induced DNA damage and therefore may attenuate the apoptotic action of cisplatin. As shown in Figure 5, the increased lipid peroxidation is accompanied by the decline of the antiapoptotic cell capacity in the hippocampus, while the decrease in antioxidative capacity strongly correlates with the prevalence of proapoptotic mechanisms. Since the estimated relationship between the pro-/antiapoptotic balance

and the behavioral outcome strongly confirmed the anxiogenic response under the proapoptotic conditions (Figure 7), it is possible that this coherency is the basis for the connection between the apoptosis and the behavioral manifestations of neurological disorders [31].

Although there are various investigated brain regions responsible for mood regulation [32,33], the majority of studies in the field of behavioral alterations are focused on the hippocampus [34,35]. It is worth noticing that increased oxidative damage in all specific brain regions responsible for mood regulation correlates with mood disorders [36,37]. However, although the mentioned investigations match with our study on the basis of finally achieved mood alteration, it is hard to compare them with our results since the methodologies were completely different (mostly chronic, unpredictable mild stress) when compared to our iatrogenic model based on a chemotherapeutic agent.

In the study of Zaki and coworkers [38] it is obvious that peripheral neurotoxicity was induced following prolonged cisplatin administration with a cumulative dose that was twice as high as the dose applied in this study (16 mg/kg vs. 7.5 mg/kg). A similar observation could be made for NAC supplementation. Namely, Zaki and coworkers applied NAC in a dose that was 50% higher than ours. According to those findings, it seems that a protocol with prolonged administration required higher doses of both cisplatin and NAC in order to produce significant alterations by means of peripheral neurotoxicity quantification. However, in line with this conclusion, a single administration of cisplatin and a shorter protocol with NAC were sufficient for the estimation of an acute response to cisplatin by means of the behavioral alterations. The complementarity of those two investigations was additionally confirmed on the basis of an increase in oxidative damage and apoptotic markers induced by cisplatin, which was diminished in both studies by applying antioxidant supplementation with NAC.

5. Conclusion

According to the results obtained in this study, it seems that the antioxidant supplementation performed by NAC may attenuate the cisplatin-induced neurotoxicity manifestations. The underlying mechanism of the beneficial effects of NAC on the adverse cisplatin effects may include the decline in oxidative damage that down regulates increased apoptosis and reverses the anxiogenic action of cisplatin. Since the behavioral alterations may be considered as early signs of cisplatin-induced neurotoxicity, the NAC supplementation in this stage of therapy may be useful in the prevention of more profound neurological disorders that accompany the therapeutic protocols based on cisplatin.

Our further investigations will address the estimation of different brain regions involved in the regulation of stress and anxiety (such as amygdala, paraventricular nucleus, etc.) to provide insights into the subtle mechanisms that can explain the neuroprotective role of sulfur-containing compounds, especially on the grounds of cisplatin-induced neurotoxicity. Furthermore, our future investigations in this field will cover the potential regional differences inside the targeted regions involved in mood regulation. Namely, according to our previous investigations, the possible mechanisms that connect behavioral alterations and the pathophysiological base of cisplatin action may be linked to very specific changes in mood controlling receptors, as well as to the amount of neurotrophic factors in a subregion of the hippocampus [39] instead of overall expression of mood regulators in each brain region responsible for mood regulation.

Author Contributions: Conceptualization, R.V., D.S., and G.R.; Methodology and Investigation, R.V., I.K., J.J.J., N.J., J.S.K.S., V.M., M.D., S.V., A.A., D.S., and G.R.; Software, Validation and Formal Analysis, R.V., J.J.J., N.J., D.S., and G.R.; Writing – Original Draft Preparation, R.V., D.S., and G.R.; Writing – Review and Editing, J.S.K.S., D.S., and G.R.; Resources, Funding Acquisition and Project Administration, D.S. and G.R.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We are grateful to Janko Samardzic for providing his competent skills for the preparation of the manuscript and his helpful suggestions. This work was supported by the Faculty of Medical Sciences (JP 01/19), University of Kragujevac, Serbia.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References

1. Dasari, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378.
2. Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
3. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
4. Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q.P. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1813–1825.
5. Jangra, A.; Kwatra, M.; Singh, T.; Pant, R.; Kushwah, P.; Ahmed, S.; Dwivedi, D.; Saroha, B.; Lahkar, M. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *791*, 51–61.
6. Lomeli, N.; Di, K.; Czerniawski, J.; Guzowski, J.F.; Bota, D.A. Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats. *Free Radic. Bio. Med.* **2017**, *102*, 274–286.
7. Tanida, S.; Mizoshita, T.; Ozeki, K.; Tsukamoto, H.; Kamiya, T.; Kataoka, H.; Sakamuro, D.; Joh, T. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int. J. Surg. Oncol.* **2012**, *2012*, 862879.
8. Manohar, S.; Jamesdaniel, S.; Salvi, R. Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes. *Neurotox. Res.* **2014**, *25*, 369–380.
9. Rosic, G.; Joksimovic, J.; Selakovic, D.; Jakovljevic, V.; Zivkovic, V.; Srejovic, I.; Djuric, M.; Djuric, D. The Beneficial Effects of Sulfur-containing Amino Acids on Cisplatin induced Cardiotoxicity and Neurotoxicity in Rodents. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 391–403.
10. Haida, Z.; Hakiman, M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 1555–1563.
11. Rosic, G.; Selakovic, D.; Joksimovic, J.; Srejovic, I.; Zivkovic, V.; Tatalović, N.; Orescanin-Dusic, Z.; Mitrovic, S.; Ilic, M.; Jakovljevic, V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol. Lett.* **2016**, *242*, 34–46.
12. Sancho-Martínez, S.M.; Prieto-García, L.; Prieto, M.; Fuentes-Calvo, I.; López-Novoa, J.M.; Morales, A.I.; Martínez-Salgado, C.; López-Hernández, F.J. N-acetylcysteine transforms necrosis into apoptosis and affords tailored protection from cisplatin cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *349*, 83–93.
13. Prut, L.; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety-like behaviours: A review. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *463*, 3–33.
14. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Clin. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358.
15. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
16. Beers, R.F.; Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133–140.
17. Ellman, G.L. Tissue sulphydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
18. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.L.; Farr, A.L.; Randall, R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
19. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
20. Abdel-Wahab, W.M.; Moussa, F.I. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *13*, 1155–1162.
21. Owoeye, O.; Adedara, I.A.; Farombi, E.O. Pretreatment with taurine prevented brain injury and exploratory behaviour associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *102*, 375–384.
22. Kumburovic, I.; Selakovic, D.; Juric, T.; Jovicic, N.; Mihailovic, V.; Stankovic, J.K.; Sreckovic, N.; Kumburovic, D.; Jakovljevic, V.; Rosic, G. Antioxidant Effects of *Satureja hortensis* L. Attenuate the

- Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats. *Oxid. Med. Cell. Long.* **2019**, *2019*, 8307196.
23. Shabani, M.; Nazeri, M.; Parsania, S.; Razavinasab, M.; Zangiabadi, N.; Esmailpour, K.; Abareghi, F. Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* **2012**, *33*, 1314–1321.
 24. Rathinam, R.; Ghosh, S.; Neumann, W.L.; Jamesdaniel, S. Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. *Cell Death Dis.* **2015**, *1*, 15052.
 25. Donzelli, E.; Carfi, M.; Miloso, M.; Strada, A.; Galbiati, S.; Bayssas, M.; Griffon-Etienne, G.; Cavaletti, G.; Petruccioli, M.G.; Tredici, G. Neurotoxicity of platinum compounds: Comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurooncol.* **2004**, *6*, 65–73.
 26. Gopal, K.V.; Wu, C.; Shrestha, B.; Campbell, K.C.; Moore, E.J.; Gross, G.W. D-Methionine protects against cisplatin-induced neurotoxicity in cortical networks. *Neurotoxicol. Teratol.* **2012**, *34*, 495–504.
 27. Vargas, M.R.; Johnson, D.A.; Sirkis, D.W.; Messing, A.; Johnson, J.A. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 13574–13581.
 28. Wang, W.F.; Wu, S.L.; Liou, Y.M.; Wang, A.L.; Pawlak, C.R.; Ho, Y.J. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav. Neurosci.* **2009**, *123*, 1261–1270.
 29. Sulakhiya, K.; Keshavlal, G.P.; Bezbaruah, B.B.; Dwivedi, S.; Gurjar, S.S.; Munde, N.; Jangra, A.; Lahkar, M.; Gogoi, R. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neurosci. Lett.* **2016**, *611*, 106–111.
 30. Eisch, A.J. Adult neurogenesis: Implications for psychiatry. *Prog. Brain Res.* **2002**, *138*, 315–342.
 31. Mattson, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 120–130.
 32. Lovelock, D.F.; Deak, T. Acute stress imposed during adolescence yields heightened anxiety in Sprague Dawley rats that persists into adulthood: Sex differences and potential involvement of the Medial Amygdala. *Brain Res.* **2019**, *1723*, 146392.
 33. de Bruin JP, Sánchez-Santed F, Heinsbroek RP, Donker, A., Postmes, P. A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: Evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation. *Brain Res.* **1994**, *652*, 323–333.
 34. Scotton, E.; Colombo, R.; Reis, J.C.; Possebon, G.M.P.; Hizo, G.H.; Valiati, F.E.; Géa, L.P.; Bristot, G.; Salvador, M.; Silva, T.M.; Guerra, A.E.; Lopes, T.F.; Rosa, A.R.; Kunz, M. BDNF prevents central oxidative damage in a chronic unpredictable mild stress model: The possible role of PRDX-1 in anhedonic behavior. *Behav. Brain Res.* **2019**, *378*, 112245.
 35. Selakovic, D.; Joksimovic, J.; Jovicic, N.; Mitrovic, S.; Mihailovic, V.; Katanic, J.; Milovanovic, D.; Pantovic, S.; Mijailovic, N.; Rosic, G. The Impact of Hippocampal Sex Hormones Receptors in Modulation of Depressive-Like Behavior Following Chronic Anabolic Androgenic Steroids and Exercise Protocols in Rats. *Front. Behav. Neurosci.* **2019**, *13*, 19.
 36. Hicham, E.M.; Tariq, T.; Abderrahim, L.; Bilal, E.K.; Ali, O. Aboubake, E.; Abdelhalim, M. Argan Oil Supplementation Reverses Anxiety and Depressive-Like Behaviors, Neurodegeneration and Oxidative Stress in Amygdala Induced by Chronic Mild Stress in Rats. *J. Depress. Anxiety* **2018**, *7*, 319.
 37. Park, J.K.; Lee, S.J.; Oh, C.S. Treadmill exercise exerts ameliorating effect on isolation-induced depression via neuronal activation. *J. Exerc. Rehabil.* **2013**, *9*, 234–242.
 38. Zaki, S.M.; Mohamed, E.A.; Motawie, A.G.; Abdel Fattah, S. N-Acetylcysteine versus progesterone on the cisplatin-induced peripheral neurotoxicity. *Folia Morphol. (Warsz)* **2018**, *77*, 234–245.
 39. Stajic, D.; Selakovic, D.; Jovicic, N.; Joksimovic, J.; Arsenijevic, N.; Lukic, M.L.; Rosic, G. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *78*, 177–187.

