



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Раде Вуковић

**Значај антиоксидантне суплементације
N-ацетилцистеином у третману
манифестација неуротоксичности
изазване цисплатином код пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Rade Vuković

**Značaj antioksidantne suplementacije N-
acetilcisteinom u tretmanu manifestacija
neurotoksičnosti izazvane cisplatinom kod
pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Rade Vuković

**Significance of antioxidant N-
acetylcysteine supplementation in the
treatment of cisplatin-induced
neurotoxicity manifestations in rats**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

Аутор
Име и презиме: Раде Вуковић
Датум и место рођења: 05.07.1977., Прибој, Србија
Садашње запослење: Војномедицинска академија Београд Специјалиста анестезиологије и интензивне терапије
Докторска дисертација
Наслов: Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у третману манифестација неуротоксичности изазване цисплатином код пацова
Број страница: 93
Број слика: 37
Број библиографских података: 177
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): медицина
Ментор: др сци. мед. Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 25.12.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-473/19, 15.07.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Гвозден Росић редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. проф. др Гвозден Росић редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; 2. проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан; 3. проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан.
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Rade Vuković
Datum i mesto rođenja: 05.07.1977., Priboj, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Vojnomedicinska akademija, specijalista anesteziologije i intenzivne terapije
Doktorska disertacija
Naslov: Značaj antioksidantne suplementacije N-acetilcisteinom u tretmanu manifestacija neurotoksičnosti izazvane cisplatinom kod pacova
Broj stranica: 93
Broj slika: 37
Broj bibliografskih podataka: 177
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: dr sci. med. Dragica Selaković, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 25.12.2019.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-473/19, 15.07.2020.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: 1. prof. dr Gvozden Rosić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik; 2. prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član; 3. prof. dr Tihomir Ilić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Neurologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: 1. prof. dr Gvozden Rosić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, predsednik; 2. prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član; 3. prof. dr Tihomir Ilić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Neurologija, član.
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Rade Vuković
Date and place of birth: 05.07.1977., Priboj, Srbija
Current employment: Military Medical Academy, specialist in anesthesiology and intensive therapy
Doctoral Dissertation
Title: Significance of antioxidant N-acetylcysteine supplementation in the treatment of cisplatin-induced neurotoxicity manifestations in rats
No. of pages: 93
No. of images: 37
No. of bibliographic data: 177
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Assistant Professor Dragica Selakovic, M.D., Ph.D. Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 25.12.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-473/19, 15.07.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. Gvozden Rosić, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, chairman; 2. Prof. Vladimir Jakovljević, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, member; 3. Prof. Tihomir Ilić, full professor of Medical Faculty of Military Medical Academy, University of Defense Belgrade, scientific domain: Neurology, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. Gvozden Rosić, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, chairman, 2. Prof. Vladimir Jakovljević, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain: Physiology, member; 3. Prof. Tihomir Ilić, full professor of Medical Faculty of Military Medical Academy, University of Defense Belgrade, scientific domain: Neurology, member.
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Увод: Студија разматра утицај антиоксидативног ефекта N-ацетилцистеина (НАС) неуротоксичне манифестације изазване употребом цисплатине код пацова.

Материјал и методе: Студија је обухватила 32 пацова Wistar albino пацова, старости 2 месеца, телесне масе од 200 до 250 g, подељених у 4 групе: контролна, цисплатинска, цисплатина + НАС група и НАС група. Цисплатина је примењивана у појединачној дози (7.5 mg/kg) петог дана док је антиоксидантна суплементација N-ацетилцистеином примењиван у одговарајућим групама првог и петог дана (500 mg/kg). Промене у понашању су се утврђивале десетог дана помоћу бихевиоралних тестова (тест отвореног поља, тест уздигнутог крстатстог лавиринта и тест качења о реп). Након ових тестирања животиње су биле жртвоване и ткиво хипокампуса и префронталног кортекса је анализирано ради одређивања маркера оксидативног стреса и апоптозе.

Резултати: Резултати бихевиоралног испитивања су показали анксиогени ефекат цисплатине. Бихевиорални тестови су такође указали на антидепресантни ефекат цисплатине што није у складу са очекивањима на основу резултата из досадашњих студија, па се тај закључак не може са сигурношћу извести и потребно су додатне студије и анализе. Такође, смањење неуротоксичности изазване цисплатином, у смислу утицаја на вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе је остварено применом N-ацетилцистеина и у ткиву хипокампуса и у ткиву префронталног кортекса пацова.

Закључак: Анксиогени ефекат, као манифестација неуротоксичности изазване цисплатином, је у бихевиоралним тестовима био успешно умањен оралном применом N-ацетилцистеина.

Кључне речи: цисплатина, N-ацетилцистеин, бихевиорални тестови, анксиозност, депресивност, оксидативни стрес, апоптоза, хипокампус, префронтални кортекс

ABSTRACT

Introduction: A review study affects the antioxidant effect of N-acetylcysteine (NAC) neurotoxic manifestations and the use of cisplatin in rats.

Material and methods: The study included 32 Wistar albino rats, 2 months old, body weight 200 to 250 g, divided into 4 groups: control, cisplatin, target + NAC group and NAC group. Target administration was in a single dose (7.5 mg/ kg) on the fifth day while antioxidant supplementation with N-acetylcysteine was administered in the approval groups on the first and fifth day (500 mg/kg). Behavioral changes were determined on the tenth day using behavioral tests (open field test, elevated cross maze test, and tail climbing test). After these tests, the animals were sacrificed and the tissue of the hippocampus and prefrontal cortex was analyzed to determine the marketing of oxidative stress and apoptosis.

Results: The results of the behavioral study showed an anxiogenic effect of cisplatin. Behavioral tests also indicated an antidepressant effect of cisplatin, which is not in line with expectations based on the results from previous studies and this conclusion cannot be reported with certainty and additional studies and analyzes are needed. Also, the reduction of acid-induced neurotoxicity, in terms of the influence on the values of oxidative stress and apoptosis parameters, is created by appropriate N-acetylcysteine both in the hippocampal tissue and in the tic of the rat prefrontal cortex.

Conclusion: The anxiogenic effect, as a manifestation of neurotoxicity and the use of cisplatin, was successfully reduced in behavioral tests by oral administration of N-acetylcysteine.

Key words: cisplatin, N-acetylcysteine, behavioral tests, anxiety, depression, oxidative stress, apoptosis, hippocampus, prefrontal cortex

Захвалница

Дугујем велику захвалност мојој менторки, доц. др Драгици Селаковић, на великој помоћи и разумевању током изреде и писања докторске дисертације. Њену несебичну помоћ сам имао од настанка идеје па до коначне финализације овог рада.

Такође, морам да искажем захвалност и поштовање проф. др Гвоздену Росићу без чије помоћи би било готово немогуће доћи до краја и написати докторску дисертацију. Од првог сусрета до данас имао сам његову подршку и разумевање како у експерименталном делу рада тако и самом писању дисертације.

Велику захвалност исказујем целокупном колективу Катедре за физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за огромну, несебичну помоћ у целом току докторских студија.

Хвала мојој породици на разумевању, помоћи и жртви коју су поднели због моје одсутности и мојих обавеза.

Хтео бих овим радом да одам почаст и поштовање мојим прецима, а мојим потомцима да укажем на прави пут и праве вредности.

Докторску дисертацију као круну мог школовања посвећујем мојим учитељима од основне школе до данас: Милуну, Жарку, Владу, Предрагу, Зорану, Милићу, Здравку, Драгану...

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Цисплатина	2
1.1.1. Терапијске индикације за примену цисплатине	2
1.1.2. Механизам дејства цисплатине на ћелијском нивоу.....	3
1.1.3. Нежељена дејства цисплатине.....	4
1.1.3.1. Неуротоксичност цитостатика на бази платине	6
1.2. Антиоксиданти	9
1.2.1. Слободни радикали – настанак и улога у организму	9
1.2.2. Механизам дејства антиоксиданата.....	11
1.3. N-ацетилцистеин	13
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	17
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	19
3.1. Експериментални протоколи	20
3.1.1. Складиштење и третман експерименталних животиња	20
3.1.2. Фармаколошки третмани	20
3.1.3. Експериментални дизајн и протокол истраживања	20
3.2. Методологија бихевиоралних испитивања.....	21
3.3. Узорковање ткива префронталног кортекса и хипокампуса за квантитативну анализу индикатора оксидативног стреса и апоптозе	21
3.4. Статистичка анализа	21
4. РЕЗУЛТАТИ.....	22
4.1. Бихевиорални тестови	23
4.1.1. Тест отвореног поља (ОП тест).....	23
4.1.1.1. Утицај N-ацетилцистеина на промене укупног временаведеног у централној зони изазване цисплатином током теста отвореног поља.....	24
4.1.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у централну зону изазване цисплатином током теста отвореног поља.....	25
4.1.1.3. Утицај примене екстракта N-ацетилцистеина на промене укупног пређеног пута изазване цисплатином током теста отвореног поља	26
4.1.1.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста отвореног поља	27

4.1.1.5. Утицај примене екстракта N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста отвореног поља	28
4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест).....	29
4.1.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног времена проведеног у отвореним крацима изазване цисплатином током теста УКЛ теста	30
4.1.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у отворене краке изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта	31
4.1.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног пређеног пута изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта	32
4.1.2.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта	33
4.1.2.5. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја нагињања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта	34
4.1.2.6. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта	35
4.1.2.7. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног броја епизода експлоративне активности изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта.....	36
4.1.3. Тест качења за реп	37
4.1.3.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене времена до прве имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп	38
4.1.3.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја епизода имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп	39
4.1.3.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног трајања имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп	40
4.1.3.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на просечно трајање епизода имобилности (ПТЕИ) изазване цисплатином у тесту качења за реп	41
4.2. Маркери оксидативног стреса.....	42
4.2.1. Маркери оксидативног стреса у ткиву префронталног кортекса	42
4.2.1.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације изазване цисплатином у ткиву префронталном кортексу	43
4.2.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса	44
4.2.1.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса.....	45
4.2.1.4. Утицај примене N-ацетилцистеина и цисплатине на концентрацију укупног глутатиона у ткиву префронталног кортекса	46

4.2.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампусу	47
4.2.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	47
4.2.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	48
4.2.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	49
4.2.2.4. Утицај примене N-ацетилцистеина и цисплатине на концентрацију укупног глутатиона у ткиву хипокампуса	50
4.3. Маркери апоптотске активности	51
4.3.1. Маркери апоптотске активности у ткиву префронталног кортекса	51
4.3.1.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса	52
4.3.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса	53
4.3.1.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса	54
4.3.2. Маркери апоптотске активности у ткиву хипокампуса	55
4.3.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	55
4.3.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	56
4.3.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса	57
4.4. Испитивање међусобне каузалне повезаности параметара добијених у бихевиоралним тестовима и испитивању оксидативног стреса и апоптотске активности у хипокампусу	58
4.4.1. Анализа међусобне повезаности вредности параметара маркера оксидативног стреса и маркера апоптотске активности	58
4.4.1.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS) и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса	59
4.4.1.2. Анализа међусобне повезаности активности супероксид дисмутазе и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса	60

4.4.1.3. Анализа међусобне повезаности активности каталазе и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса	61
4.4.2. Анализа међусобне повезаности односа маркера оксидативног стреса у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта	62
4.4.2.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS) и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта	62
4.4.2.2. Анализа међусобне повезаности активности супероксид дисмутазе и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта	63
4.4.2.3. Анализа међусобне повезаности активности каталазе у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта.	64
4.4.3. Анализа међусобне повезаности маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта	65
5. ДИСКУСИЈА.....	66
6. ЗАКЉУЧЦИ	73
7. ЛИТЕРАТУРА.....	75
СКРАЋЕНИЦЕ.....	89

1. УВОД

1.1. Цисплатина

Цисплатина или диаминодихлоридплатина је синтетско хемијско једињење чија структура подразумева јон платине у центру са два молекула хлора и амонијака директно везаним ковалентним везама за јон платине (1).

Једињење цисплатине је први синтетизовао и описао Микеле Пејроне 1845. године па је због тога синоним за ово једињење „Пејронова со“ (2). 50 година касније хемијску структуру овог једињења објаснио је Алфред Вернер (3). Сама структура молекула цисплатине има квадратно-планарни распоред са јоном платине у центру и са по два лиганда хлора и амонијака на теменима замишљеног квадрата. Изомерија датог једињења одређује боју једињења па ће *cis* варијанта бити жуте боје а *trans* изомер (трансплатин) беле. Ово објашњење саме структуре молекула цисплатине било је значајно и за даље проучавање реактивности самог једињења и свих ефеката које цисплатина прави (3).

Тек 1965. године цисплатина постаје предмет проучавања у смислу новог хемотерапијског концепта. Наиме, после сензационалног открића енглеског биофизичара Розенберга да цисплатина инхибира деобу ћелија (4) кренула су даља проучавања цисплатине као нове могућности у лечењу малигних болести. Сам Розенберг је до овог открића дошао нехотице покушавајући да докаже утицај електричног поља на раст бактерије, при томе користећи електроде направљене од платине (4). Тада је уочио да се бактеријске ћелије под одређеним утицајем повећавају и до 300 пута али да не долази до ћелијске деобе. Прва претпоставка је била да електрично поље инхибира ћелијску деобу. У каснијим истраживањима, Розенберг је доказао да заслуга за инхибицију ћелијске деобе припада цисплатини од које су биле грађене електроде и једињењима која од ње настају (5). Током седамдесетих година прошлог века више студија на животињама (пси, мајмуни, мишеви) доказали су ову особину цисплатине (6). Ова потврда хемотерапијских особина цисплатине и одобрење од стране америчког Националног института FDA 1978. године за коришћење цисплатине у лечењу малигних болести, донело је револуцију у лечењу карцинома. Цисплатина је један од најзаступљенијих лекова у савременим хемотерапијским протоколима и зато се често назива „пеницилином рака“ (7).

1.1.1. Терапијске индикације за примену цисплатине

Цисплатина је једно од најраспрострањенијих и најзаступљенијих хемотерапијских средстава. Користи се за лечење тумора солидних органа и хематолошких малигних болести. Може се употребљавати као монотерапија или у комбинацији са другим хемотерапеутицима за индукциону и неoadјувантну терапију.

Клиничка испитивања антинеопластичних својстава цисплатине су покренута 1971. године. Први тумори за које је цисплатина била одобрена као хемотерапијски лек били су тумори тестиса, јајника и бешике (7). У даљим испитивањима и научним студијама доказано је корисно антинеопластично дејство код више врста тумора.

Карцином плућа – микроцелуларни тип карцинома плућа се сматра неоперабилним и у његово конзервативно лечење се од пре 10 година је уведена цисплатина (8). Немикроцелуларни типови карцинома плућа се примарно лече

операбилно, али се и код њих примењује хемиотерапија на бази цисплатине, и то код стадијума II и III као адјуватна терапија (9). Цисплатина даје снажан антитуморски ефекат који је праћен пропратним нежељеним ефектима као што су нефротоксичност (10), мучнина и повраћање (11). Због нефротоксичности потребан је мониторинг продукције урина као и агресивна хидратација. Ако су нежељени ефекти нарочито изражени цисплатина се замењује у терапији карбоплатином која има мање изражене нежељене ефекте.

Карцином дојке – лечи се и хируршки и конзервативно у зависности од типа и стадијума самог тумора. Цисплатина се примењује најчешће у комбинацији са другим цитостатицима, што због спречавања резистенције тако и због бољег терапијског ефекта (12). Терапију цисплатином прате бројни нежељени ефекти.

Карцином јајника – цисплатина је и даље први лек избора код ове болести (13). Терапија је праћена бројним нежељеним дејствима лека и честом појавом резистенције. Зато се цисплатина примењује у комбинованој терапији пре свега са таксаном и витаферином (14).

Остали малигнитети где је цисплатина заступљена у лечењу су: сквамозни карциноми главе и врата, Нон-Хоџкинов лимфом, тумори мозга, карцином штитне жлезде, саркоми и многи други (15).

1.1.2. Механизам дејства цисплатине на ћелијском нивоу

Цисплатина се у терапијске сврхе примењује у облику раствора а начин апликације лека је искључиво интравенски. У крви је већи део молекула цисплатине везан за протеине крвне плазме (68-98 %), најчешће за хумани серумски албумин. Један молекул хуманог серумског албумина веже за себе 5 молекула цисплатине. Мањи део молекула цисплатине је везан за карбонатни и фосфатни јон. Један део молекула цисплатине се одмах по апликацији веже за одређене протеине који се у значајној мери филтрирају у бубрезима и излучују урином још у току саме инфузије цисплатине.

Први корак ка крајњем циљу, терапијском ефекту лека на малигне ћелије, представља улазак цисплатине у ћелију. Овај процес је сложен и још увек није до краја објашњен. Цисплатина улази у ћелију углавном пасивном дифузијом, где је концентрација цисплатине у ванћелијском и интраћелијском простору од пресудног значаја на транспорт кроз ћелијску мембрану.

Ипак, студије које су разматрале успешност уласка цисплатине у ћелију код инхибираних система активног транспорта су сугерисале да постоје и други начини уласка цисплатине у ћелију сем пасивног (16).

Активним транспортом цисплатина улази у ћелију најчешће преко трансмембранских протеина за транспорт јона бакра CTR1 и CTR2 (17). Такође, активни транспорт је могућ и преко других трансмембранских система за транспорт катјона (OCT, SLC22A2) и анјона (OAT; SLC22A).

Активација самог молекула цисплатине у ћелији се дешава секвенцијалном заменом 2 атома хлора са 2 молекула воде (18).

Новонастали метаболит је веома реактиван и као такав брзо ступа у реакцији са ендогеним нуклеофилима као што су глутатион, метионин и протеини. Цитотоксичност цисплатине се првенствено приписује интеракцији са нуклеофилним N7 местом пуринске базе у ДНК ланцу. Тако настају абнормалне унакрсне везе унутар једног ланца као и између различитих ланаца ДНК. 1,2 унакрсне везе унутар једног ланца (ДНК адукти) чине 85-90 % укупних оштећења које цисплатина прави на ДНК (19) и они се сматрају најодговорнијим за цитотоксичност цисплатине. Даљи догађаји у ћелији, од насталих ДНК адуката па до краја цитотоксичног процеса апоптозе, су тек недавно разјашњени. За ДНК адукт се веже преко 20 различитих протеина преко којих се покрећу различити биолошки путеви који као крајњи резултат имају апоптозу ћелије. Један од ових путева представља и активацију контролних тачака ћелијског циклуса што за последицу има заустављање ћелијског циклуса у фазама S и G1 (20). Оштећење ДНК изазвано цисплатином такође утиче на активацију про-апоптотских фактора као што су Bax, протеаза 9, каспаза 6, и то пре свега преко активације комплекса као што су P53. То доводи до ослобађања апоптогеног фактора цитохром-C из митохондрија. Паралелно са тим долази до смањења настајања анти-апоптотског фактора Bcl-2.

ДНК није једина структура у ћелији која је изложена утицају цисплатине. Митохондрије су ћелијске органеле које су нарочито оштећене утицајем цисплатине. Цисплатина у митохондријама проузрокује оксидативни стрес стварањем слободних кисеоничких радикала и смањењем антиоксидативног капацитета. Тиме долази до оштећења митохондријалне мембране и активног транспорта кроз њу као и оштећења митохондријалних протеина (21).

Ћелија се на почетку дејства цисплатине бори против њеног штетног утицаја на различите начине, пре свега активацијом система за поправку грешака у ланцу ДНК, као и другим механизмима. Када оштећење ДНК пређе критичан праг и надвлада ћелијски капацитет поправке, даља биолошка дешавања у ћелији фаворизују процес апоптозе (18).

1.1.3. Нежељена дејства цисплатине

Упркос успеху у лечењу малигних болести, употреба цисплатине као цитостатика је ипак ограничена пре свега нежељеним пропратним ефектима која су последица системске токсичности цисплатине (22). Главни узроци настајања нежељених ефеката цисплатине су оштећење ДНК и настајање слободних радикала који изазивају оксидативни стрес (23). Ови механизми оштећења ћелије јављају се како у малигним ћелијама тако и у здравим и као последица тога јављају се нежељени ефекти дејства цисплатине.

Разматрано је и тестирано више различитих начина на које је покушано да се смање или избегну нежељени ефекти цисплатине. Цисплатина се некад мора администрирати у мањој дози од прописане протоколом или се мора заменити другим цитостатиком. Због примењене мање дозе од оптималне, неки карциноми као што је карцином јajника може брзо да развије резистенцију (23).

Такође, поред цисплатине синтетизовано је много других комплекса платине са намером да се избегну нежељени ефекти које цисплатина прави. Око 30 једињења су и

клинички испитивана а најчешће коришћени комплекси платине као замене за цисплатину су карбоплатина (24) и оксалиплатина (25).

Смањење нежељених ефеката цисплатине се постиже коришћењем одређених суплемената (витамини, фолати, бифосфонати, пептиди...) који различитим механизмима постижу тај циљ (24). Такође, везивање цисплатине са одређеним честицама-носачима (протеини, полимери, липозоми, наночестице) омогућава да испорука цисплатине буде селективна и самим тим да се смање нежељени ефекти (24, 25)

Такође, тестирани су други лекови код којих је уместо платине у центру структуре лека био постављен неки други метал (26). Многи лекови са оваквом структуром су показали мање или више успеха у хемиотерапији, многи се још увек тестирају а неколицина њих се и клинички примењује код одређених врста тумора. Такав пример је Арсен триоксид који се примењује у лечењу промијелоцитне леукемије (27).

Комбинована хемотерапија, са коришћењем више различитих цитостатика, омогућава да се мањом дозом цисплатине оствари очекивани антинеопластични ефекат. Самим тим ће и нежељени ефекти бити мањи с обзиром на мању примењену дозу. Међутим, сваки лек има своју фармакокинетику која ограничава њихову употребу и захтева одговарајуће време примене лека за оптимални ефекат.

Један од начина на који се смањују нежељени ефекти цисплатине је и примена цисплатине у облику пролека. Пролек је облик лека са смањеном активношћу саме супстанце. Након администрације биоактивацијом долази до активације овог облика, инактивни облик метаболише се *in vivo* у активни облик. Применом стратегије пролека повећава се селективност лека за њену мету - малигну ћелију. Пошто пролек има ниску цитотоксичност пре него што се активира, здраве неканцирогене ћелије су ређе мете цисплатине па се самим тим редукују и нус појаве везане за овај лек (28).

Нефротоксичност је чест нежељени ефекат терапије цисплатином и као такав представља ограничавајући фактор у примени цисплатине у протоколима за лечење малигних болести. Метаболити цисплатине се излучују преко бубрега и то гломерулском филтрацијом и тубулском секрецијом. Зато постоји њихова велика акумулација у проксималним тубулима бубрега, и до пет пута већа у односу на друге делове (29). Зато су проксимални тубули и највише оштећени делови бубрега цисплатином.

Механизам токсичности цисплатине је вишеструк. Цисплатина покреће апоптозу тубулских ћелија и то везивањем *tumor necrosis faktora α* (TNF α) за рецепторе TNF 1 што активира каспазу 8 и каспазу 3 и долази до апоптозе (30, 31). Покреће се и директна индукција апоптозе оштећењем ендоплазматског ретикулума и активацијом каспазе 12 (32). Такође, цисплатина покреће инфламаторну реакцију у бубрезима, повећава продукцију слободних радикала, смањује продукцију анти-апоптотских протеина (Bcl-2, Bcl-K), оштећује ДНК чиме се активира Вах про-апоптотски систем што доводи до апоптозе (33). Такође цисплатина оштећује бубрег и активацијом система Р53 преко којег се антагонизују анти-апоптоски протеини и активирају про-апоптотске факторе што као крајњи резултат даје апоптозу и оштећење бубрега (34, 35).

Због негативног утицаја цисплатине на бубреге потребан је адекватан мониторинг функције бубрега у току терапије цисплатином што подразумева пре свега сатну диурезу. Зато је потребна активна хидратација у току терапије. Проксимални тубули бубрега имају способност регенерације после завршетка хемотерапије што смањује нежељене ефекте које цитостатици неминовно праве (36).

Ототоксичност цисплатине је иреверзибилно оштећење чула слуха у току хемотерапије. Цисплатина оштећује рецепторске ћелије Кортијевог органа и мења електролитни састав ендолимфе у унутрашњем уху чим мења потенцијал који је веома битан за регистровање и пренос звучног надражаја (37).

Гастроинтестинални поремећаји изазвани терапијом цисплатине су најчешће мучнина и повраћање. Цисплатина је једно од најметоногенијих хемотерапијских средстава(38).

Патофизиолошки механизам настанка мучнине и повраћања код терапије цисплатином се дели на централни и периферни тип утицаја цисплатине. Централни тип дејства подразумева утицај цисплатине на хеморецепторе у продуженој моздини. То активира центар за повраћање у ретикуларној формацији продужене моздине. Периферни механизам подразумева оштећење цисплатином гастроинтестиналних ентерохромафинских ћелија са последичним ослобађањем серотонина који преко аферентних вагусних влакана активира центар за повраћање (38). Многи неуротрансмитери као што су допамин, хистамин, ацетилхолин и серотонин активацијом својих рецептора су укључени у настанак мучнине и повраћања. Антиеметски лекови делују на рецепторе ових трансмитера блокирајући их и тако постижу свој ефекат (39).

Кардиотоксичност настаје оштећењем кардиомиоцита цисплатином. При томе се из ових ћелија ослобађају лактат дехидрогеназа и креатинин киназа због оштећења мембране кардиомиоцита механизмом липидне пероксидације (40). Као последица тога настаје некроза срчаног мишића праћена фиброзом, која за последицу може дати различите типове хемодинамске нестабилности.

Хепатоксичност настаје као последица повећаног оксидативног стреса при уношењу великих доза цисплатине (41). Хепатоцити бивају оштећени слободним радикалима и липидном пероксидацијом њихове мембране (42). Као последица оштећења хепатоцита настаје повећање нивоа ензима јетре (трансаминаза) (43). Морфолошки, оштећење јетре се манифестује као некроза и дегенерација хепатоцита са запаљенским процесом око сабирних крвних судова уз дилатацију синусоида (44).

1.1.3.1. Неуротоксичност цитостатика на бази платине

После гастроинтестиналних поремећаја и нефротоксичности, неуротоксичност представља трећи најчешће заступљени облик токсичности цисплатине. Нежељени ефекти терапије цисплатином су заступљени и на централном нервном систему (ЦНС) у облику различитих енцефалопатија, и на периферном нервном систему (ПНС) као периферне неуропатије (45). Неуротоксичност је дозно зависни нежељени ефекат и јавља се када је кумулативна доза којој је организам изложен већа од 300 mg/m^2 тела уз акумулацију лека у ткиву (46).

У литератури су подаци су оскудни у вези оштећења ЦНС-а цисплатином. Хематоенцефална баријера штити ЦНС од оштећења цисплатином при првој администрацији лека. Поновљена и продужена администрација лека ствара оштећење ЦНС-а које се јавља за неколико сати од примене цисплатине. Цисплатина пре свега оштећује церебралну васкуларизацију и тако повећава васкуларну пропустљивост за цисплатину. Карактеристично за ову нуспојаву дејства цисплатине је то да цисплатина више оштећује прогениторне ћелије ЦНС-а и олигодендроците него саме малигне ћелије што за последицу има јаче изражене нежељене ефекте од стране ЦНС-а (47). Нарочито вулнерабилне су ћелије у дентатном гирусу хипокампуса и ћелије у *Corpus callosum* где се највише убрзава и повећава ћелијска смрт администрацијом цисплатине. Што се тиче когнитивних функција, цисплатина има утицај тако што повећава степен депресивности (48) и анксиозности (49).

Код периферног нервног система (ПНС), највеће промене се јављају на сензорним нервним влакнима највећег дијаметра. Бројне морфофункционалне промене праћене су одговарајућим субјективним осећајем (50). Симптоми трају веома дуго и интересантно је да се могу појачати након прекида терапије (51). Такође, степен оштећења нервног система цисплатином зависи и од генетских и клиничких предиспозиција (52). Места где се цисплатина лако и брзо акумулира су ганглиони задњих нервних коренова (53). Наиме, ту нема природне баријере у виду хематоенцефалне баријере и зато су ови ганглиони лако доступни цисплатини. Постоји повезаност између региона тела где се јављају нежељени ефекти изазвани цисплатином и ганглиона у којем се цисплатина акумулирала. Нервна влакна која инервишу дати регион пролазе поред ганглиона у којем је акумулирана цисплатина (54). Промене које цисплатина ствара на нервном систему су иреверзибилне у 30 до 50 % пацијената.

Механизми којим цисплатина оштећује нервни систем нису до краја проучени, али оно што се до сада зна говори у прилог да су механизми слични механизмима оштећења у другим органима. Цисплатина оштећује ћелијску ДНК, митохондријалну ДНК и повећава оксидативни стрес.

Транспорт цисплатине из крви у нервно ткиво тачније неуроне се одиграва углавном активним транспортом преко специфичних транспортера OGT2 и CTR1 (55). Унутар ћелије, цисплатина се веже за ДНК ланац нарушавајући његову структуру. У ДНК се стварају унакрсне везе унутар једног ланца или између различитих ланаца ДНК. Тиме је угрожен интегритет и функција ДНК ланца па самим тим долази до заустављања процеса транскрипције РНК са таквог оштећеног ДНК ланца. Крајњи резултат тога је апоптоза ћелије (56). Овај механизам оштећења је нарочито заступљен у ганглионима задњих нервних коренова. Такође број формираних веза између цисплатине и ДНК је пропорционалан тежини неуротоксичности (57). У неурону постоје два система за поправку грешака у ланцу ДНК и оба се активирају када цисплатина оштети ДНК. Први систем је NER (*nucleotid excision repair*) који поправља грешке у ланцу ДНК и тако смањује неуротоксичност цисплатине. С друге стране ова поправка има и штетан утицај пошто прави резистенцију на лек јер NER систем утиче на везу ДНК- цисплатина и у малигним ћелијама (58, 59). Поред овог система поправке активира се још један систем, BER (*basis excision repair*) који такође поправља ДНК ланац неутралишући настале унакрсне везе (60). Оба система поправки су повезани са P53 сигналним путем преко кога се активирају про-апоптотски фактори.

Други механизам оштећења неурона цисплатином је оштећење митохондријалне ДНК и самих митохондрија. У митохондријама се стварају цисплатински ДНК адукти слични адуктима на ДНК саме ћелије. У митохондријама за

разлику од саме ћелије не постоје NER и BER системи поправке (61). Као последица стварања цисплатинских митохондријалних ДНК адуката долази до инхибиције транскрипције и репликације у митохондријама. Долази до прекида ланца транспорта електрона и смањења стварања аденозин 3 фосфата (АТФ) као и повећања броја слободних радикала и акумулације јона калцијума у митохондријама (62). То све за последицу има оштећење митохондрија. У периферном нервном систему митохондрије су локализоване у аксонима. Аксонски пренос импулса је енергетски зависан тако да ће оштећење митохондрија онемогућити аксонски пренос импулса (63). Оштећењем митохондрија смањује се производња енергије за живот ћелије што повећава токсичност цисплатине, а симптоми токсичности ће се задржати а некад и појачати после завршетка терапије цисплатином (64).

У ганглионима задњих нервних коренова детектован је посебан вид неуротоксичности. То су промене на нивоу пропустљивости јонских канала, које омогућавају неконтролисан улазак јона калцијума у ћелију. То затим активира про-апоптотске факторе (каспаза 3) што за последицу има апоптозу ћелије (65). Такође, уласком цисплатине у ганглије задњих коренова повећава се експресија TRPA1 рецептора преко којих се остварује хипералгетски ефекат на хладноћу и механичке дражи (66).

Због неуротоксичности цисплатине у хемиотерапијским протоколима, прављене су *in vitro* студије где су упоређивани неуротоксични ефекти цисплатине и других платинских комплекса (67). Карбоплатина је имала мање изражену неуротоксичност у односу на цисплатину и оксалиплатину (68). То се објашњава тиме да је терапија карбоплатином праћена знатно мањом продукцијом слободних радикала и мањим оксидативним стресом. Установљено је да је овај ефекат дозно зависан па ће тако и карбоплатина у десет пута већој дози имати сличне ефекте као друга два платинска комплекса (69).

1.2. Антиоксиданти

1.2.1. Слободни радикали – настанак и улога у организму

Слободни радикали се дефинишу као молекули или молекулски фрагменти који садрже један или више неспарених електрона у атомским или молекулским орбиталама (70). У многим метаболичким процесима у организму, настају слободни радикали који имају различите корисне и штетне улоге у организму. Процеси стварања и елиминације слободних радикала су континуирани динамички процеси и од равнотеже између ова два процеса зависи у којој мери ће слободни радикали бити заступљени у организму и каква ће њихова улога бити.

Слободни радикали генерисани из кисеоника представљају најважнију класу реактивних врста генерисаних у живим системима (71). ROS (*reactive oxygen species*) су високо реактивне форме кисеоника и као такве убрајају се у слободне радикале или њихове прекурсоре. Настају као делимично оксидовани међупродукти метаболизма и своју реактивност остварују захваљујући неспареним електронима у орбиталама атома кисеоника. Овај нестабилни облик постиже стабилност тако што узима електроне из различитих биомолекула унутар ћелије и тиме доводи до трансформације и оштећења различитих ћелијских структура (72). Кисеоник је заступљен у свим ћелијама поготово у митохондријама где се обавља ћелијско дисање и добијање енергије за све процесе у ћелији. То значи да се реактивне форме кисеоника налазе у свим ћелијама и да корисне и штетне ефекте реактивних форми кисеоника можемо наћи у свакој ћелији организма.

Молекуларни кисеоник O_2 има јединствену електронску конфигурацију и ако му се дода један електрон настаје супероксидни анјонски радикал (O_2^-) који представља примарну форму ROS (71). Супероксидни анјонски радикал највећим делом настаје у митохондријама (73). Митохондријски транспортни ланац електрона је главни извор АТФ-а у ћелијама сисара при чему је кисеоник неопходан за овај процес. Током трансдукције енергије, мали број електрона прерано бива пребачен на молекул кисеоника и тако се формира супероксидни анјонски радикал који учествује у патофизиологији многих болести, али и има одређене корисне улоге у организму (74).

Сем супероксидног анјона постоје и друге врсте реактивних кисеоничких форми насталих у организму. Водоник пероксид (H_2O_2) настаје у пероксизомима и има улогу у оксидацији различитих молекула (75). У пероксизомима постоје ензими каталазе који разлажу водоник пероксид и тако спречавају акумулацију овог потенцијално штетног једињења. Када постоји одређена дисфункција у пероксизому или у функцији каталитичких ензима, водоник пероксид се ослобађа у цитосол и то повећава оксидативни стрес у ћелији.

Пероксилни радикали ($ROO\cdot$) (76) и хидроксидни јон (OH^-) (77) су такође реактивне кисеоничке форме која настају у живим системима и имају битну улогу у метаболичким процесима у ћелији.

У организму постоји динамичка равнотежа између продукције и елиминације кисеоничких реактивних форми. Тај еквилибријум може бити нарушен у смислу повећаног настанка кисеоничких слободних радикала што ће неминовно довести до оксидативног стреса и оштећења ћелије. У основи овог оштећења је негативан утицај реактивних форми кисеоника на биомолекуле ћелије (78). Примери за то су оштећење

липида у ћелијској мембрани (пероксидација липида) (78), оштећење гликозида што доводи до промене у стварању и активности интерлеукина, простагландина, хормона и неуротансмитера (79), инактивација и денатурација протеина (80), оштећење нуклеинских киселина што доводи до мутагенезе и карциногенезе (79) и многи други.

Поред кисеоничких, у организму су заступљене и азотне реактивне форме – RNS (*reactive nitrogen species*) (81). Прекомерном производњом као и смањеном елиминацијом ових форми може доћи до нитрозативног стреса што се манифестује нитрозијацијом протеина чиме се мења њихова структура и функција (82). Азот моноксид (NO) је најважнији представник ове групе реактивних форми. Азот моноксид се генерише у ткивима из аргинина у реакцијама катализованим специфичним синтетазама (83). Важан је биолошки сигнални молекул који учествује у великом броју различитих биолошких процеса (неуротрансмисија, регулација крвног притиска, релаксација глатких мишића, перисталтика, агрегација тромбоцита, имунолошке реакције) (84).

Поред ендогених фактора постоје и егзогени фактори који утичу на продукцију слободних радикала у организму. Сунчево зрачење, тачније ултраљубучасти зраци су битан егзогени фактор који оштећујући биолошке структуре утиче на формирање слободних радикала. Интоксикације различитим хемијским супстанцама такође поспешују стварање слободних радикала. Токсичност лекова је последица њихове конверзије у слободне радикале или последица утицаја лека на њихово стварање. Патофизиологија настанка цирозе јетре код алкохолизма се заснива на утицају слободних радикала. Контаминирана храна, разни нутритивни адитиви као и пестициди су примери егзогеног утицаја на стварање слободних радикала у организму (85).

Обољења у чијој патофизиологији слободни радикали имају битну улогу су кардиоваскуларна обољења, малигна обољења, инфламаторна обољења, неуролошки поремећаји, дијабетес мелитус тип II. Процес старења је потпомогнут антиоксидативним оштећењима ћелија која се кроз дуже време акумулирају и тако утичу на старење организма.

Многа обољења у својој патогенези имају повећано стварање слободних радикала. Наиме, одговор организма на одређени штетан утицај може да буде у повећаном стварању слободних радикала у организму. Овде су слободни радикали саставни део природног одбрамбеног система. Пример овог одговора организма су ћелије са фагоцитном способношћу које преко NADPH стварају супероксидни анјон који је примарна реактивна форма у борби против патогена. Супероксидни анјон затим покреће низ каскадних реакција које имају за циљ стварање секундарних реактивних форми које такође учествују у борби против и елиминисању штетног патогеног утицаја. Уколико концентрација слободних радикала буде већа од потребне за уништење патогена може доћи до оксидативног оштећења околног ткива (85). Поред овог примера где је улога слободних радикала корисна за организам, постоје и други примери као што су: улога катализатора у ензимским реакцијама, реакција полимеризације аминокиселина у пептидни ланац, реакција полимеризације глукозе у синтези гликогена (86), улога секундарних преносника у ћелијским сигналним путевима као и у индукцији митогеног одговора (87).

Акутни инфаркт је обољење у чијој патофизиологији постоји специфичност да су слободни радикали и узрок обољења (стварају оксидативни стрес и тако оштећују срчане и васкуларне ћелије) али и последица јер компромитовањем перфузије у

одређеном региону може доћи до повећаног стварања слободних радикала и оксидативног оштећења (88). Наиме, у подручју које је захваћено исхемијом долази до парадоксалног повећања реактивних кисеоничких форми које могу додатно оштетити околно ткиво које је већ компромитовано исхемијом. Такође, после поновног успостављања перфузије кроз регион који је био исхемијска зона бележи се поновно повећање количине кисеоничких слободних радикала и последично оштећење ткива (88). Ова појава, названа „реперфузиона повреда“ може оштетити ткиво колико и сама исхемија (89). Реперфузиона повреда се може наћи код акутног инфаркта миокарда, можданог удара и трансплантације органа (90). Сличан патофизиолошки механизам са битном улогом реактивних кисеоничких форми је откривен и код цереброваскуларног инсульта. Такође, доказана је преминација производње слободних радикала у односу на заштитне антиоксидативне механизме и код неких патоморфолошких стања који се свакодневно срећу у клиничкој пракси као што су *diabetes mellitus*, артеријска хипертензија, матеболички синдром и атеросклероза (90).

Постоји значајна улога слободних радикала и оксидативног оштећења у процесу карциногенезе и настанка малигну обольења. Утицајем различитих ендогених и егзогених фактора нарушава се равнотежа између продукције и елиминације слободних радикала, који стварањем оксидативног стреса оштећују ДНК стварајући мутације и промене у генској експресији чиме се активира процес карциногенезе (91).

Централни нервни систем је посебно осетљив на поремећај редокс равнотеже. Разлози за то леже у великој искористљивости кисеоника у мозгу, великог садржаја полинезасићених масних киселина као и у присуству редокс активних метала (бакар, гвожђе). Оксидативни стрес је неминован и временом његове последице се акумулирају у централном нервном систему (92). Клинички, то се манифестује у облику неуродегенеративних обольења својствених старим лицима као што су Алцхајмерова болест (93) и паркинсонизам (94).

1.2.2. Механизам дејства антиоксиданата

Одржавањем еквилибријума између стварања и уклањања слободних радикала, редокс стање унутар ћелије се одржава у уском оптималном опсегу (95).

Биолошки систем одбране од оксидативног стреса се састоји од неколико нивоа. Сем антиоксидантног механизма одбране, други нивои подразумевају превентивне механизме, унутарћелијске механизме поправке оштећених молекула као и физичку одбрану од реактивних форми (87).

Антиоксиданти су супстанце које у малим количинама спрачавају или успоравају оксидацију одређене материје неутралишући слободне радикале. Реакција између слободних радикала и антиоксиданата зависи од концентрације и хемијске структуре оба реактанта, врсте медијума где се реакција одвија као и од реакционих услова (85).

Антиоксидантна одбрана од слободних радикала се може поделити на ензимски и неензимски део (87).

Ензими који имају најзначајнију улогу у антиоксидантној заштити су супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза (96, 97). Супероксид

дисмутаза (SOD) је најважнији антиоксидациони ензим који катализује реакцију дисмутације супероксидног аниона до водоник пероксида који се у наставку реакције разлаже до кисеоника и воде уз помоћ глутатион пероксидазе (GPK) и каталазе (CAT) (98, 99). Каталаза је ензим која се налази у пероксизомима и има примарни задатак да разлаже пероксидне реактивне форме док исти задатак глутатион пероксидаза остварује у цитосолу или у митохондријама (100).

Неензимски антиоксидативни систем одбране има специфичан механизам елиминације слободних радикала. Ова једињења донирају електрон молекулу слободног радикала и тако га неутралишу а они сами постају реактивни с тим што је та реактивност мања од реактивности слободног радикала. Тако новонастала реактивна једињења се лако неутралишу другим антиоксидантима. Неензимски антиоксидативни систем обухвата ендogene антиоксиданте као и егзогене пореклом из хране или синтетске.

Најважније ендogeno неензимско једињење које учествује у антиоксидативној заштити је глутатион (GSH). Глутатион се налази у цитосолу, једру и митохондријама и у свакој од тих целина представља главно антиоксидантно једињење. Оксидацијом глутатиона настаје глутатион дисулфид (GSSG). Ензим глутатион редуктаза редукује GSSG до GSH и тако га враћа у активан облик. Однос GSH/GSSG се може посматрати као „редокс“ пуфер и добар је показатељ оксидативног стреса у организму (101). Што је већа количина GSSG већи је оксидативни стрес у организму. Иначе своју антиоксидативну улогу глутатион врши на неколико различитих начина (102). Пре свега он неутралише хидроксилне радикале, синглет O_2 , H_2O_2 , и липидне пероксиде. Кофактор је неколико антиоксидативних ензима (најважнији глутатион пероксидаза), и уз то регенерише друге антиоксиданте као што су витамини С и Е и тако их опет враћа у активни облик. Поред глутатиона у групу неензимских ендогених једињења спадају и протеини пре свих албумини, који се вежу за слободни радикал и тако га неутралишу, док оксидовани облик протеина подлеже протеолизи.

Најзначајнија неензимска антиоксидантна егзогена једињења пореклом из хране су витамини С и Е, каротеноиди, флавоноиди, манган, цинк, селен и многи други.

Представници синтетских антиоксидантних једињења су N-ацеилцистеин, пенициламин, тетрациклини и други.

1.3. N-ацетилцистеин

N-ацетилцистеин (2-ацетамидо-3-сулфанилпропаноинска киселина, NAC) је лек и нутрициони суплемент који је већ неколико деценија у хуманој употреби (103).

Првенствену намену ово једињење има као муколитички агенс и код тровања ацетаминифеноном (парацетамолом). Због своје способности да повећава ниво глутатиона у ћелији, NAC се може сматрати и унутарћелијским антиоксидантом који може превенирати оксидативни стрес (114). Такође, NAC се користи за превенцију кардиотоксичности изазване доксорубицином (110, 111), превенцију хеморагијског циститиса изазваног алкилирајућим антиканцерогеним лековима (112), превенцију неуропсихијатријских секвела код тровања угљен моноксидом (104) као и код тровања хлороформом (104). NAC као и остала сулфхидрилна једињења има способност хелације јона тешких метала (113).

NAC се користи као муколитичко средство од шездесетих година прошлог века код плућних болести које су праћене стварањем густог мукозног секрета, као што су хронични бронхитис и плућна фиброза. NAC разлаже густ секрет раскидајући дисулфидне везе у њему и тако га чини течнијим и лакшим за изbacивање (104). Постоје различити подаци и неусаглашеност по питању оптималне дозе NAC-а код плућних болести. Код оралне примене лека, због брзог метаболизма NAC-а у организму, мала је акумулација лека (134). Код понављаних доза лека не долази до повишења нивоа цистеина али се значајно подиже концентрација глутатиона у плазми (135).

NAC има веома битну улогу као антидот код пацијената који су интоксигирани великим дозама ацетаминифенона (парацетамола) (105). Парацетамол има реактивне метаболите који праве хепатореналну токсичност. NAC подиже концентрацију глутатиона (GSH) који редукује метаболите ацетаминифенона и тако индиректно остварује своје дејство код интоксикације парацетамолом. NAC је ефикасан ако се примени до 10 сати од интоксикације (106). Може се применити и интравенски и перорално. Интравенско давање NAC се примењује по више различитих протокола. Најчешћи примењивани протокол подразумева давање NAC у укупној дози од 300 mg/kg телесне тежине у току 20 сати од интоксикације (107), мада постоје студије које показују да је администрација NAC-а у периоду од 48 сати (иницијално 140 mg/kg телесне тежине па затим 70 mg/kg тт. на свака 4 сата) ефикаснији начин примене од протокола са 20-часовном администрацијом (108).

Орална примена NAC-а код интоксикације ацетаминифеноном подразумева давање дозе од 70 mg/kg телесне тежине на свака 4 сата у укупном трајању од 68 сати (109). Повраћање је контраиндикација за оралну примену NAC-а, а употреба активног угља отежава апсорпцију NAC-а што онда умањује његов ефекат (118).

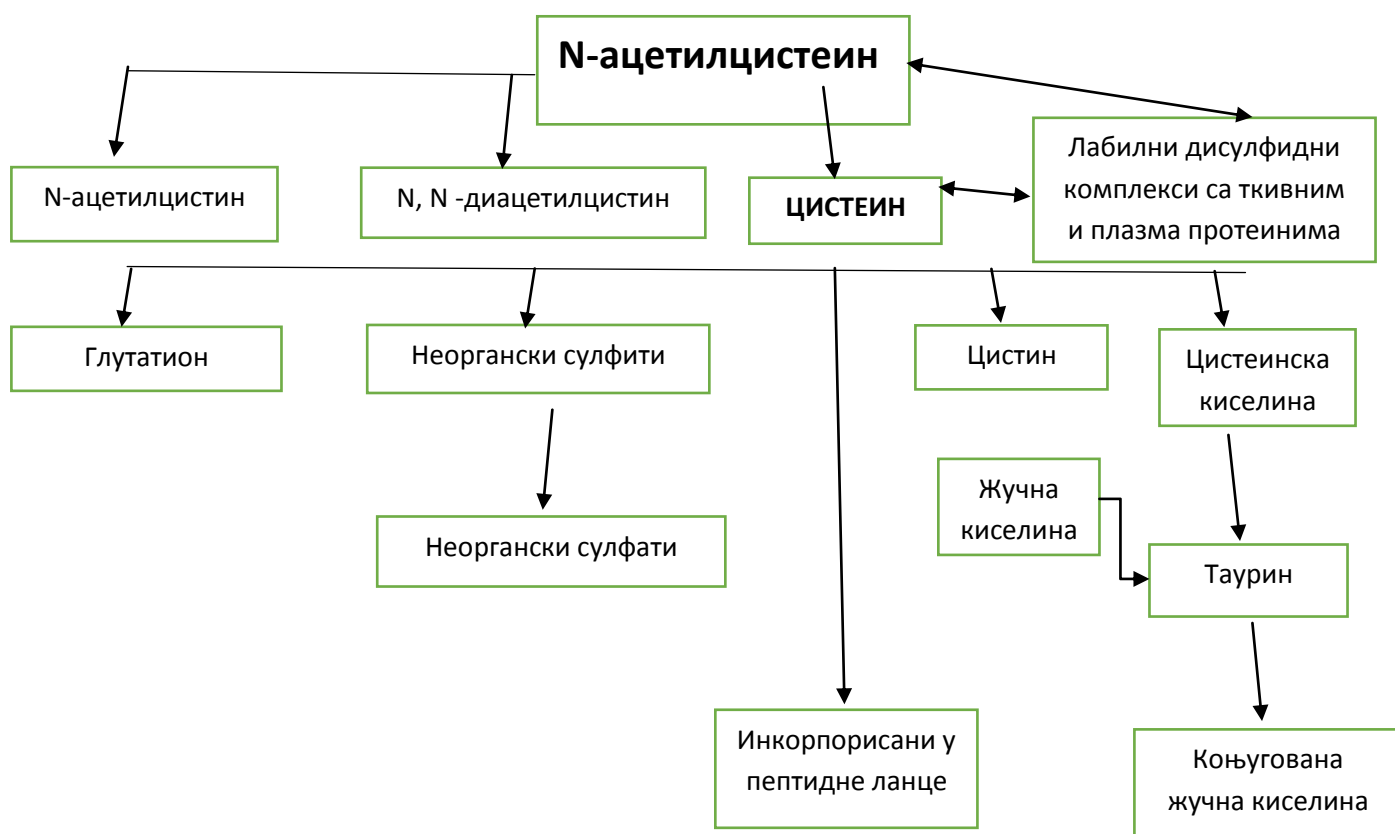
У хемијској структури, NAC је дериват цистеина са ацетилном групом која везана преко атома азота.

Апсорпција и дистрибуција NAC-а. Код пероралне администрације NAC-а, апсорпција лека се одиграва брзо и концентрација лека у плазми достиже максимум 1 до 2 сата од примене (103). Биорасположивост NAC-а код оралног узимања је 6 до 10

% колико је забележено код облика са брзим растварањем (ефервета) (117). Разлог ове ниске биолошке доступности NAC-а у односу на дату дозу се објашњава тиме да се NAC врло брзо оксидује, већ у гастроинтестиналном систему, пре него што стигне у циркулацију.

Код интравенске примене лека, максимална концентрација у циркулацији од 50% дате дозе лека се достиже 4 сата након примене лека, да би 12 сати након администрације та концентрација била 20 % од дате дозе лека (117). Волумен дистрибуције NAC-а је 0.33 до 0.47 L/kg (117). Два сата након примене лека NAC се може наћи у бубрезима, јетри, надбубрежној жлезди, плућима, слезини, крви, мишићима, мозгу (119).

Метаболизам NAC-а у организму се одвија веома брзо без обзира на начин администрације лека. У плазми и ткивима NAC може бити у слободној форми, као метаболит који је дисулфидном везом везан за протеине или уклопљен у пептидне ланце (103). 1 сат након администрације лека, 50% NAC-а се везује за протеине плазме (120). Метаболизам NAC-а се одиграва у више различитих токова што га чини сложеним и због тога још увек недовољно испитаним у метаболичком смислу (104) (Шема1).



Схематски приказ метаболичког пута N-ацетилцистеина у организму. Према DeCaro et al. 1989

Као и већина тиола, NAC може бити оксидиран утицајем слободних радикала. На тај начин се смањује активност реактивних форми као што су супероксидни анјон, хидроксилни јон и водоник пероксид и смањује се штета коју они могу направити у ћелији на липидима, протеинима, ДНК ланцу. NAC свој утицај на слободне радикале остварује реституишући ниво GSH у ћелији. GSH је једно од најбитнијих антиоксидативних средстава и при елиминацији оксидативног стреса ниво GSH неминовно се смањује. NAC је директан прекурсор GSH и његовом администрацијом ниво цистеина у ћелији се повећава, а од цистеина се под утицајем γ -глутамил цистеин лигазе синтетише GSH. Такође на регенерацију оксидованог облика GSH (GSSG) утиче ензим глутатион редуктаза који редукује глутатион до почетног облика (115). На активност GSH утичу и ензими глутатион S-трансфераза и глутатион пероксидаза 2. Све напред поменуте ензиме, њихову експресију и активност, контролише транскрипциони нуклеарни фактор – еритроид 2 повезани фактор (NRF2) који је веома редокс сензитиван (116).

Елиминација NAC-а. NAC се елиминише из организма делом у непромењеном облику (20-30%) и већим делом преко метаболичких продуката (122). Полувреме елиминације NAC-а код интравенске примене је 2 часа, док је за оралну примену 6 часова (121).

Око 70 % телесног клиренса је нереналног порекла (122) а главни екскреторни продукт NAC-а је неоргански сулфат (око 38 % администриране дозе) (119). Око 3% администрираног NAC-а се избацује фецесом (123).

Нежељена дејства NAC-а. Код оралне примене NAC-а, ретко се срећу нежељени ефекти. После поновљених високих доза NAC-а код интоксикације ацетаминофеноном могу се јавити мучнина и повраћање као и дијареја, ретко и главобоља, осип, хипотензија и респираторни дистрес (133). Нежељена дејства NAC-а су чешћа код интравенске примене лека. Јављају се код 10 % пацијената, 15 до 60 минута после интравенске администрације лека и најчешће су по типу анафилактоидне реакције (чести су осип, пруритус, ангиоедем, бронхоспазам, мучнина, повраћање, хипотензија, тахикардија, респираторни дистрес) (133).

Најважнији утицаји NAC-а на органе и системе органа. Оксидативни стрес оштећује хепатоците стварајући инфламацију и некрозу подижући истовремено ниво ензима јетре у крви. NAC остварује протективни ефекат на хепатичне ћелије изложене оксидативном стресу (127). Такође запажен је позитиван ефекат NAC-а код оштећења јетре метаболитима парацетамола.

Захваљујући својим антиоксидантним својствима NAC има позитиван терапијски утицај код инсулинске резистенције и дијабетес мелитуса тип II као и код њихових компликација (128). NAC побољшава осетљивост на инсулин, повећава периферни унос глукозе у ћелију (129), има заштитни ефекат на бета ћелијама панкреаса, смањује пораст нивоа липида и липопротеина у крви код инсулинске резистенције (130).

NAC има протективну улогу код контрастом изазване нефропатије, као и код токсичног ефекта пестицида на бубрег и бубрежну функцију. NAC тежи спречавању оштећења бубрега одржавањем интегритета ћелијске мембране, показујући бубрежну заштитну активност (131).

Оксидативни стрес оштећује имунолошку одбрану организма, повећавајући имуносупресију. Глутатион је битан у регулацији имунолошке функције Т лимфоцита, што значи да NAC индиректно утиче на имуни систем, повећавајући ниво глутатиона у организму (132).

Многобројне студије су показале да NAC показује антиинфламаторну активност и то постиже ограничавајући ослобађање цитокина током почетне фазе имунске пролиферације (124). Код пацијената који су редовно на програму хемодијализе као и код стања септичког шока NAC ограничава настанак и ослобађање TNF α фактора, интерлеукина 1 β и интерлеукина (125). У експерименталним студијама примећено је да NAC инхибира ослобађање проинфламаторних цитокина током церебралне исхемије код глодара (126).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу претходно наведеног као и на основу резултата више студија различитих аутора, одређени су следећи циљеви овог истраживања:

1. Утврђивање бихевиоралних промена изазваних применом цисплатине код пацова.
2. Утврђивање бихевиоралних промена изазваних применом N-ацетилцистеина код пацова.
3. Утврђивање бихевиоралних промена након симултане администрације цисплатине и N-ацетилцистеина код пацова.
4. Утврђивање вредности параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса и префронталног кортекса након примене наведених терапијских протокола код пацова.
5. Утврђивање вредности апоптотских маркера у ткиву хипокампуса и префронталног кортекса након примене наведених терапијских протокола код пацова.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Експериментални протоколи

3.1.1. Складиштење и третман експерименталних животиња

Складиштење и третман експерименталних животиња је спроведено према стандардизованој процедури која се примењује у бихевиоралним студијама (136, 137) уз претходно прибављене сагласности одговарајућих етичких органа, при чему је поштована сва важећа међународна и домаћа регулатива.

3.1.2. Фармаколошки третмани

Примена цисплатине и N-ацетилсистеина у одговарајућим групама је спроведена на начин претходно прецизиран у литератури (138).

3.1.3. Експериментални дизајн и протокол истраживања

Протокол је спроведен на укупно 32 животиње (*Wistar albino* пацови мушког пола, старости 2 месеца), подељене у четири групе са истом величином узорка:

1. контролна група животиња – интраперитонеална примена физиолошког раствора (2 ml), првог и петог дана третмана;
2. цисплатина група (CIS) – интраперитонеална примена физиолошког раствора (2 ml) првог дана и цисплатине (7.5 mg/kg тм), петог дана третмана;
3. цисплатина и NAC група (CIS+NAC) – интраперитонеална примена NAC-а (500 mg/kg тм) првог и петог дана, и цисплатине (7.5 mg/kg тм) петог дана третмана;
4. NAC група (NAC) – интраперитонеална примена NAC-а (500 mg/kg тм) првог и петог дана.

3.2. Методологија бихевиоралних испитивања

Методологија бихевиоралних испитивања је реализована у складу са раније описаним поступцима (136, 137). Процена степена анксиозности и депресивности је извођена у одговарајућим тестовима – *Open field* тест (тест отвореног поља – ОП) и *Elevated plus maze* тест (тест уздигнутог крстастог лавиринта – УКЛ) за квантификацију промена анксиозности, и *Tail suspension* тест (тест качења за реп – ТКР) за процену степена депресивности, према раније описаним стандардним процедурама (136, 137).

Софтверска анализа видео записа регистрованих током наведених тестова је остварена уз примену адекватног софтверског пакета Ethovision software XT 12 (Noldus Information Technology, the Netherlands).

3.3. Узорковање ткива префронталног кортекса и хипокампуса за квантитативну анализу индикатора оксидативног стреса и апоптозе

По завршетку тестова за процену промене емоционалног статуса, експерименталне животиње су анестезиране и декапитоване према описаној процедури (137). Узорковање ткива префронталног кортекса и хипокампуса за квантитативну анализу индикатора оксидативног стреса и апоптозе је реализовано према стандардној методологији (136). У овој студији су као индикатори поремећаја оксидативног баланса и апоптотске активности анализирани стандардни маркери описани у литератури (136).

3.4. Статистичка анализа

Статистичка анализа квантификованих параметара је спроведена коришћењем одговарајуће методологије у складу са статистичком обрадом у ранијим студијама сличног карактера (136, 137).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Бихевиорални тестови

4.1.1. Тест отвореног поља (ОП тест)

Параметри који су праћени у тесту отвореног поља су:

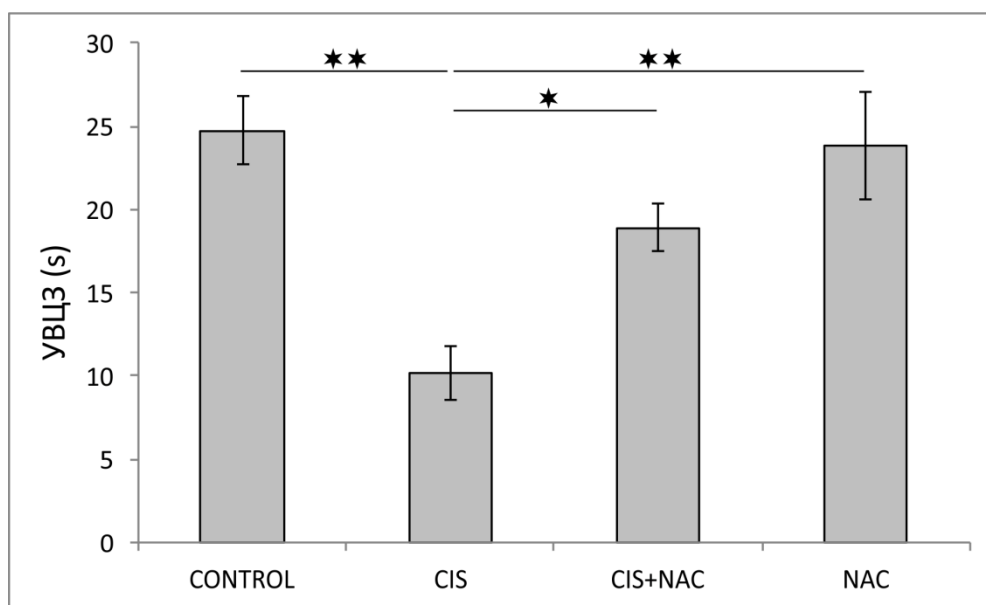
1. укупно време проведено у централној зони (УВЦЗ)
2. број улазака у централну зону (БУЦЗ)
3. укупни пређени пут (УПП)
4. проценат времена кретања током трајања теста (%ВК)
5. број усправљања (БУ)

4.1.1.1. Утицај N-ацетилцистеина на промене укупног времена проведеног у централној зони изазване цисплатином током теста отвореног поља

Протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене укупног времена проведеног у централној зони (УВЦЗ) током теста отвореног поља ($F= 9.423$, $df=3$, $p<0.01$).

Цисплатин је значајно смањио УВЦЗ, у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Ова анксиогена карактеристика цисплатине умањена је истовременом применом NAC ($p<0.05$, у поређењу са CIS групом), што је подигло вредности УВЦЗ готово на вредности које су забележене у контролној групи.

У групи где је по протоколу примењиван само NAC није било битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



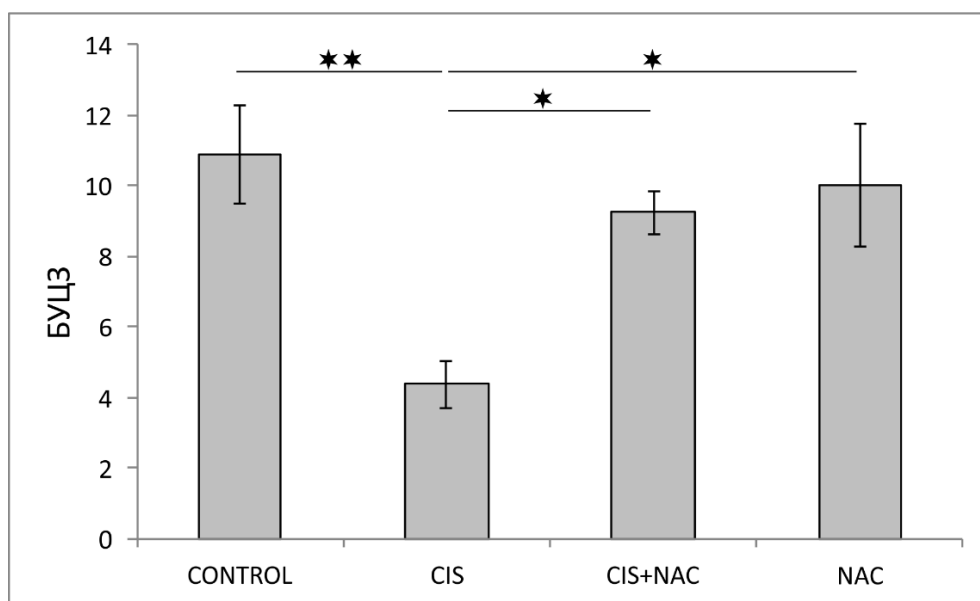
Слика 4.1. Ефекти примене NAC на промене укупног времена проведеног у централној зони (s) изазване цисплатином током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $*p<0.05$, $**p<0.01$

4.1.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у централну зону изазване цисплатином током теста отвореног поља

Спроведени бихевиорални тестови су показали да су терапијски протоколи примењени у овој студији узроковали значајне промене броја улазака у централну зону (БУЦЗ) током теста отвореног поља ($F= 5.850$, $df=3$, $p<0.01$).

Као што је на слици 4.2. приказано, у групи која је била третирана искључиво појединачном дозом цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg забележено је статистички значајно смањење БУЦЗ ($p<0.01$). Применом NAC-а првог и петог дана ова анксиогена карактеристика цисплатине је умањена ($p<0.05$ у односу на CIS групу).

Група која је добијала искључиво NAC није бележила битније промене БУЦЗ у односу на контролну групу.

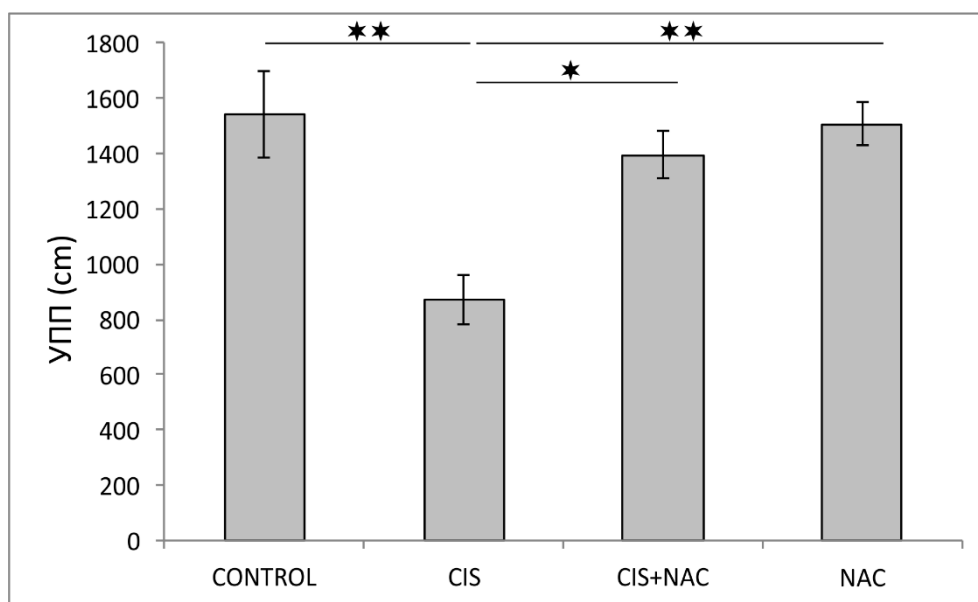


Слика 4.2. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у централну зону изазване цисплатином током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.3. Утицај примене екстракта N-ацетилцистеина на промене укупног пређеног пута изазване цисплатином током теста отвореног поља

На Слици 4.3 су представљени ефекти различитих терапијских протокола спроведених у овој студији, који су значајно утицали на промене укупног пређеног пута (УПП) током теста отвореног поља ($F=8.552$, $df=3$, $p<0.01$)

Једнократна примена цисплатине у дози од 7.5 mg/kg је доводила до значајног смањења УПП ($p<0.01$). Антиоксидантна суплементација NAC-ом примењена првог и петог дана у дози од 500 mg/kg TM , значајно је утицала на вредност овог параметра у поређењу са вредностима оствареним у CIS групи ($p<0.05$). Контролна група и група која је била третирана искључиво NAC-ом су имале једнаке вредности параметра УПП при извођењу теста отвореног поља.



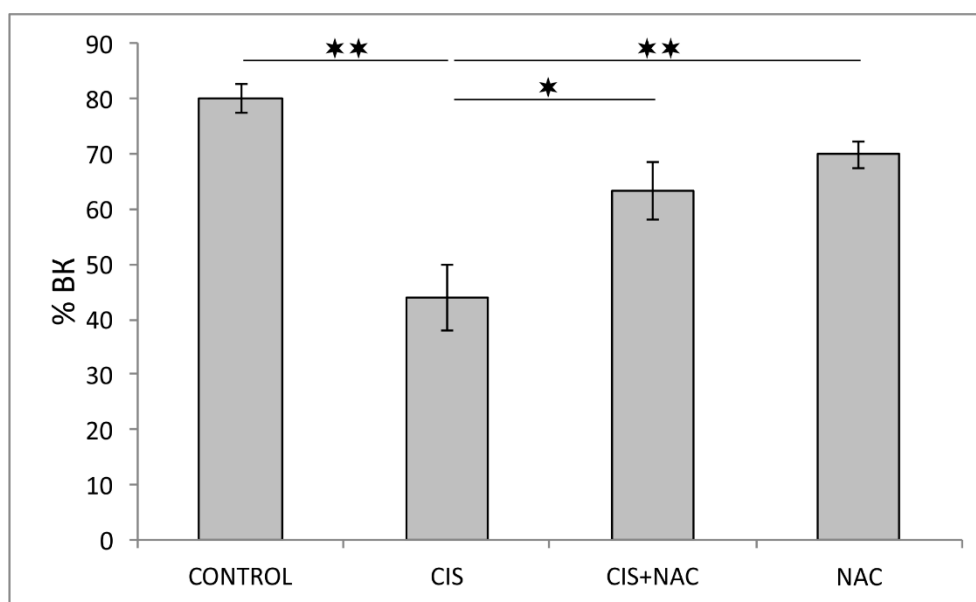
Слика 4.3. Ефекти примене N-ацетилцистеина на цисплатином изазване промене укупног пређеног пута (cm) током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

4.1.1.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста отвореног поља

Уз укупно пређену дистанцу, проценат времена кретања (%ВК) представља други параметар локомоторне активности који се прати у тесту отвореног поља и применом терапијских протокола ове студије дошло је до статички битних промена овог параметра ($F=12,551$ $p<0.01$).

На слици 4.4 су приказане вредности овог параметра по групама, у зависности који је терапијски протокол примењиван. Интраперитонеална апликација цисплатине у појединачној дози од 7.5 mg/kg је узроковала значајно смањење % ВК ($p<0.01$). Као и код другог параметра локомоторне активности, антиоксидантна суплементација NAC-ом у групи CIS + NAC је променила вредности % ВК ($p<0.05$) у односу на CIS групу и вратила их на вредности које су приближно биле исте као код контролне групе.

Група која је добијала искључиво NAC није бележила битније промене % ВК у односу на контролну групу.



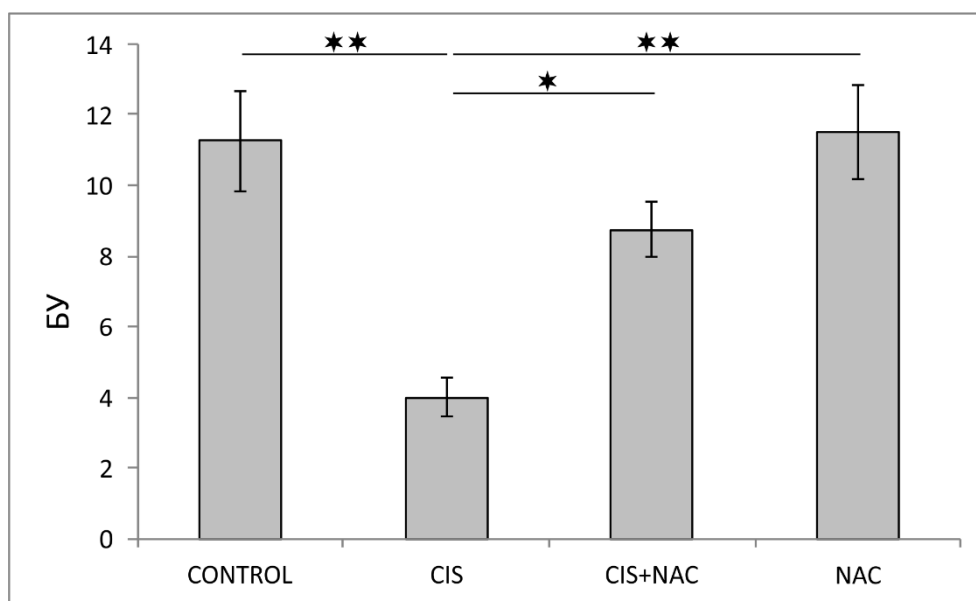
Слика 4.4. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NACом, NAC – група са NAC-ом. $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.5. Утицај примене екстракта N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста отвореног поља

Број усправљања (БУ) се сматра експлоративном врстом активности која се прати у току теста отвореног поља.

Као што се на слици 4.5 може видети терапијски протоколи из ове студије су значајно утицали на вредности параметра БУ у тесту отвореног поља ($F=10,231$ $p<0.01$). Забележено је значајно смањење БУ у групи која је била третирана једнократно цисплатином у дози од 7.5 mg/kg (интраперитонеално) ($p<0.01$). Ипак, група које је уз цисплатину примила и две дозе NAC-а (500 mg/kg перорално, први и пети дан терапије) показала је побољшање у вредностима БУ ($p<0.05$)

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



Слика 4.5. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом. $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест)

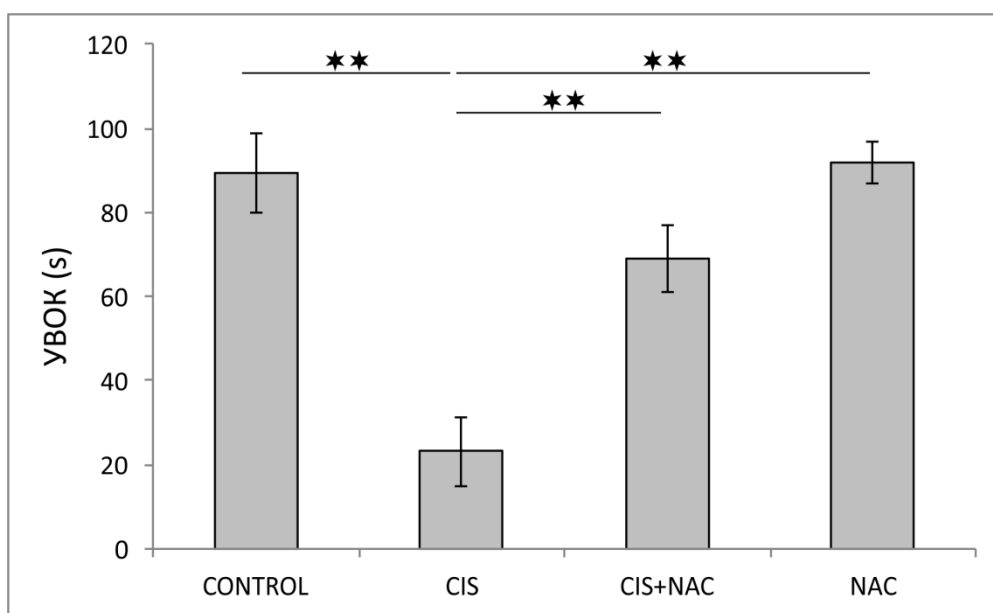
Параметри праћени у тесту уздигнутог крстастог лавиринта су:

1. укупно време проведено у отвореним крацима (УВОК)
2. број улазака у отворене краке (БУОК)
3. укупни пређени пут (УПП)
4. проценат времена кретања током трајања теста (%ВК)
5. број нагињања (БН)
6. број усправљања (БУ)
7. број епизода укупне експлоративне активности (УБЕЕА)

4.1.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног времена проведеног у отвореним крацима изазване цисплатином током теста УКЛ теста

Као што се на слици 4.6 може видети применом терапијских протокола ове студије дошло је до битних промена у вредностима параметара укупног времена проведеног у отвореним крацима (УВОК) који је мерен у току УКЛ теста ($F=16.447$, $df=3$, $p<0.01$). Анксиогени одговор у CIS групи манифестован је значајним падом вредности овог параметра ($p<0.01$), који је уз параметар број улазака у отворене кракове главни параметар анксиозности у УКЛ тесту. Администрација NAC-а значајно повећава вредности овог параметра ($p<0.01$) у комбинованој групи у поређењу са CIS групом.

Група третирана само NAC-ом није бележила битнију разлику у вредностима УВОК у односу на контролну групу.



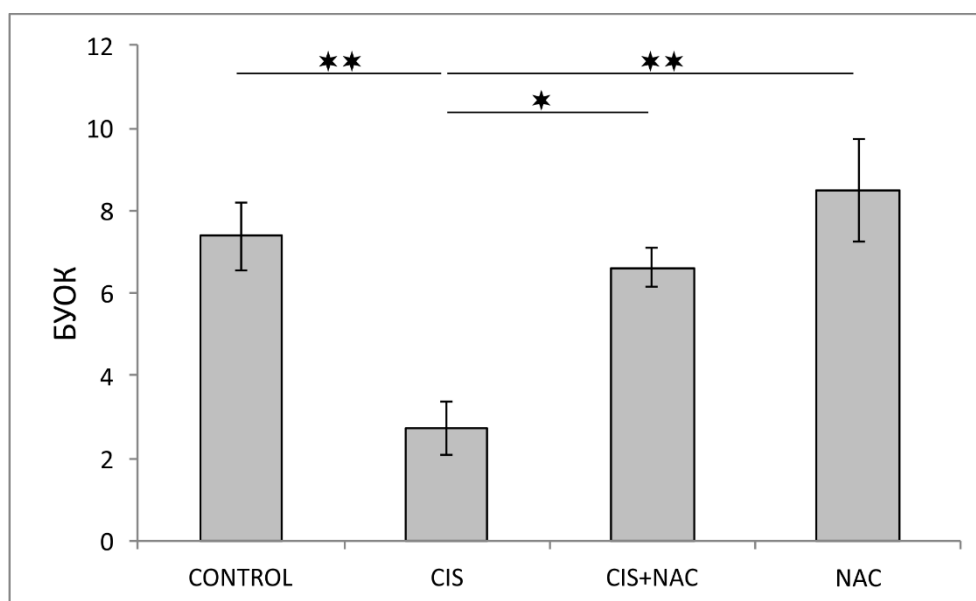
Слика 4.6. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене укупног времена проведеног у отвореним крацима (s) изазване цисплатином током теста отвореног поља. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X}\pm SEM$, $**p<0.01$.

4.1.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у отворене краке изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Број улазака у отворене краке (БУОК) током теста уздигнутог крстастог лавиринта је значајно промењен применом одређених терапијских протокола из ове студије што је и графички приказано на слици 4.7 ($F= 8.769$, $df=3$, $p<0.01$).

У групи у којој је администрирана цисплатина у појединачној дози од 7.5 mg/kg забележено је значајно смањење овог типичног анксиогеног параметра ($p<0.01$). С друге стране, перорална администрација NAC-а уз цисплатину у дози од 500 mg/kg првог и петог дана, при контролним условима је повећала БУОК у односу на CIS групу ($p<0.05$).

Искључива примена NAC-а није дала битније промене БУОК у односу на контролну групу.

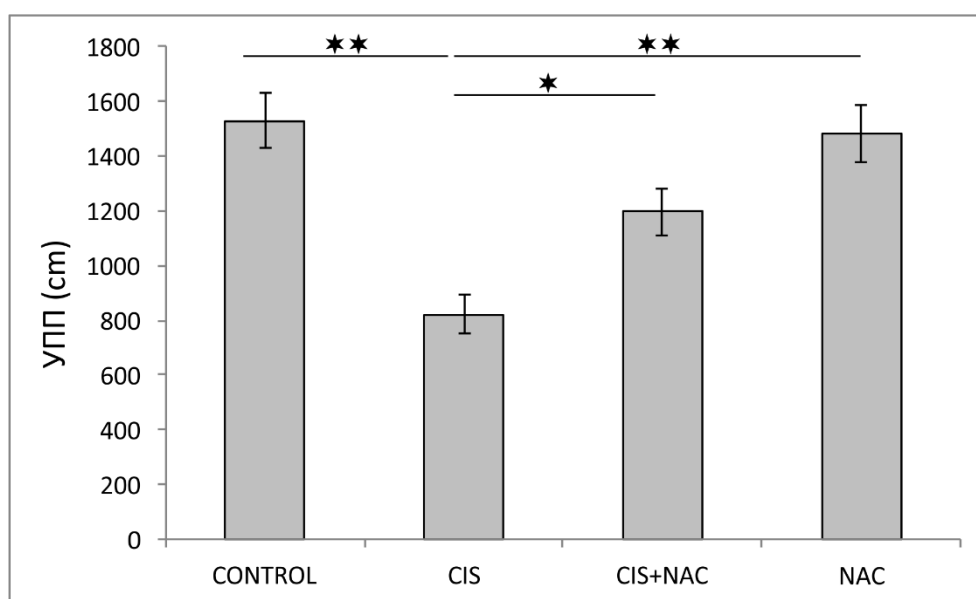


Слика 4.7. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја улазака у отворене краке изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног пређеног пута изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Укупно пређени пут (УПП) представља параметар који одређује локомоторне карактеристике и применом терапијских протокола које ова студија садржи, дошло је до статистички битних промена овог параметра ($F=12.827$, $df=3$, $p<0.01$).

На слици 4.8. је представљен графички приказ УПП у тесту уздигнутог крстастог лавиринта по групама у зависности од примењеног терапијског протокола. Група третирана искључиво цисплатином бележила је статистички значајно смањење УПП у односу на контролну групу ($p<0.01$). Симултана примена NAC-а уз цисплатину, поништила је овај негативан утицај цисплатине на кретање, тако да је УПП имао веће вредности у односу на CIS групу ($p<0.05$). Према очекивању, група која је била третирана искључиво NAC-ом није имала битније промене УПП у односу на контролну групу.



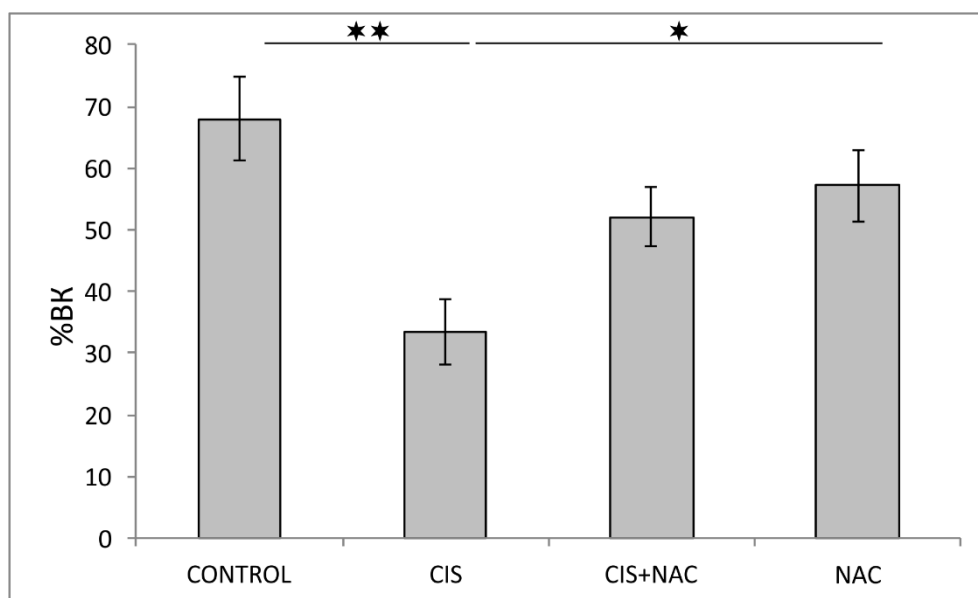
Слика 4.8. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене укупног пређеног пута изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Процент времена кретања (%BK) је други параметар локомоторне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. На Слици 4.9 су представљене промене (%BK) које су статистички значајне а настале су применом терапијских протокола из ове студије ($F=6.335$, $df=3$, $p<0.01$)

Група третирана искључиво цисплатином у појединачној дози од 7.5 mg/kg је бележила значајно смањење %BK у тесту уздигнутог крстастог лавиринта ($p<0.01$). Антиоксидантна суплементација NAC-ом је показала да значајно утиче на ефекте изазване цисплатином, тако да је регистрован значајан пораст %BK у односу на CIS групу ($p<0.01$).

Искључива примена NAC-а није дала битније промене %BK у односу на контролну групу.



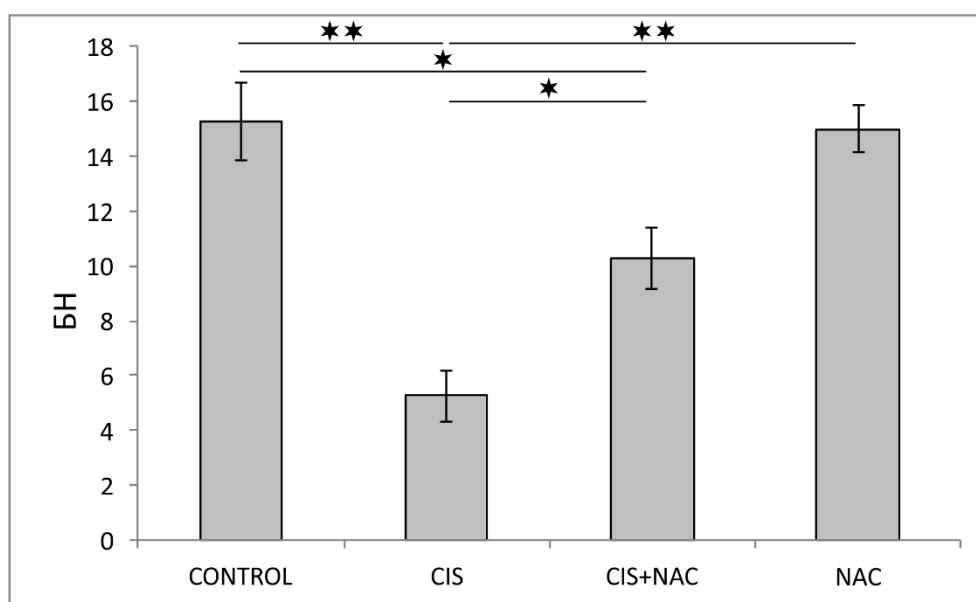
Слика 4.9. Ефекти примене екстракта N-ацетилцистеина на промене процента времена кретања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.5. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја нагињања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Слика 4.10. приказује ефекте терапијских протокола примењених у овој студији на број нагињања (БН) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експеримент је показао значајан утицај терапијских протокола на вредност овог параметра експлоративне активности ($F= 18.337$, $df=3$, $p<0.01$).

Забележено је значајно смањење БН у групи која је била третирана једнократно цисплатином у дози од 7.5 mg/kg (интраперитонеално) ($p<0.01$). Ипак, група које је уз цисплатину примила и две дозе NAC-а (500 mg/kg , први и пети дан терапије) показала је побољшање у вредностима БН ($p<0.05$)

Администрација искључиво NAC-а није показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са контролном групом.



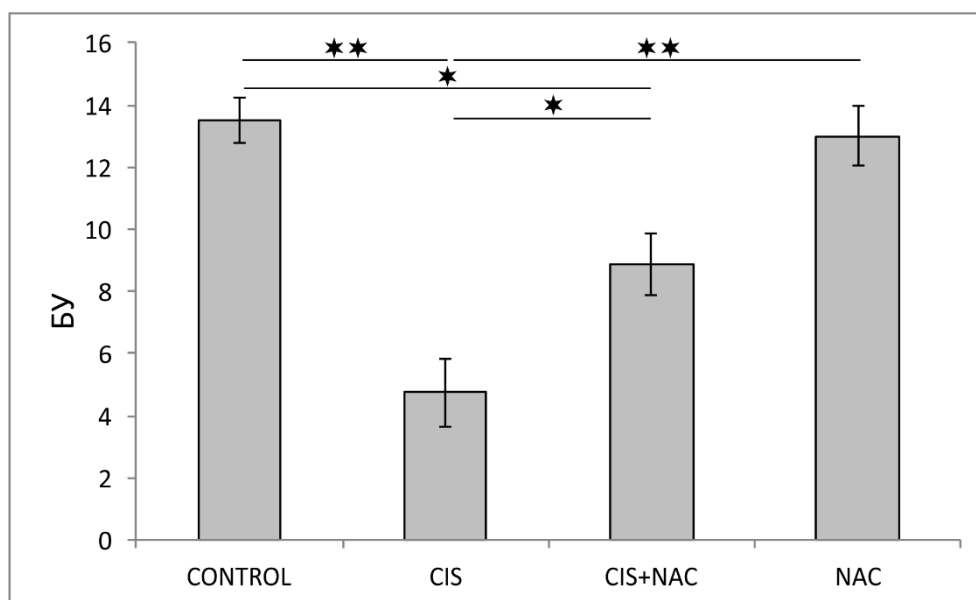
Слика 4.10. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја нагињања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.6. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Протоколи спроведени у овој студији су узроковали значајне промене у броја усправљања (БУ) током теста отвореног поља ($F=18.475$, $df=3$, $p<0.01$).

Цисплатин је значајно смањио БУ, у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Ова анксиогена карактеристика цисплатине умањена је истовременом применом NAC-а ($p<0.05$, у поређењу са CIS групом), што је подигло вредности БУ, приближно на вредности које су бележене у контролној групи.

У групи где је по протоколу примењиван само NAC није било битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



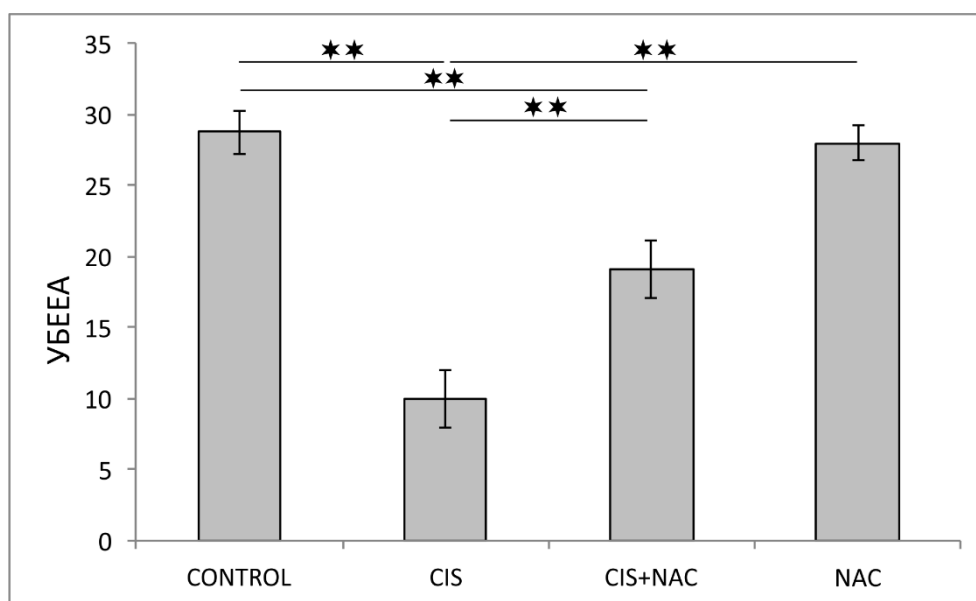
Слика 4.11. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја усправљања изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.7. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног броја епизода експлоративне активности изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Терапијски протоколи спроведени у овој студији имали су значајан утицај на укупни број епизода експлоративне активности (УБЕЕА) током теста уздигнутог крстастог лавиринта ($F= 25.996$, $df=3$, $p<0.01$).

Група која је била третирана цисплатином у дози од 7.5 mg/kg је показивала значајно смањење УБЕЕА ($p<0.01$). Антиоксидантна суплементација NAC-ом која је у контролним условима спровођена симултано уз цисплатину показала значајан утицај на вредност овог параметра у поређењу са CIS групом ($p<0.01$).

Група третирана искључиво NAC-ом није имала битнија одступања у вредностима овог параметра у односу на контролну групу.



Слика 4.12. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене укупног броја епизода експлоративне активности изазване цисплатином током теста уздигнутог крстастог лавиринта. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $**p<0.01$.

4.1.3. Тест качења за реп

Тест качења за реп (ТКР) је најчешће коришћени тест за испитивање степена депресивности.

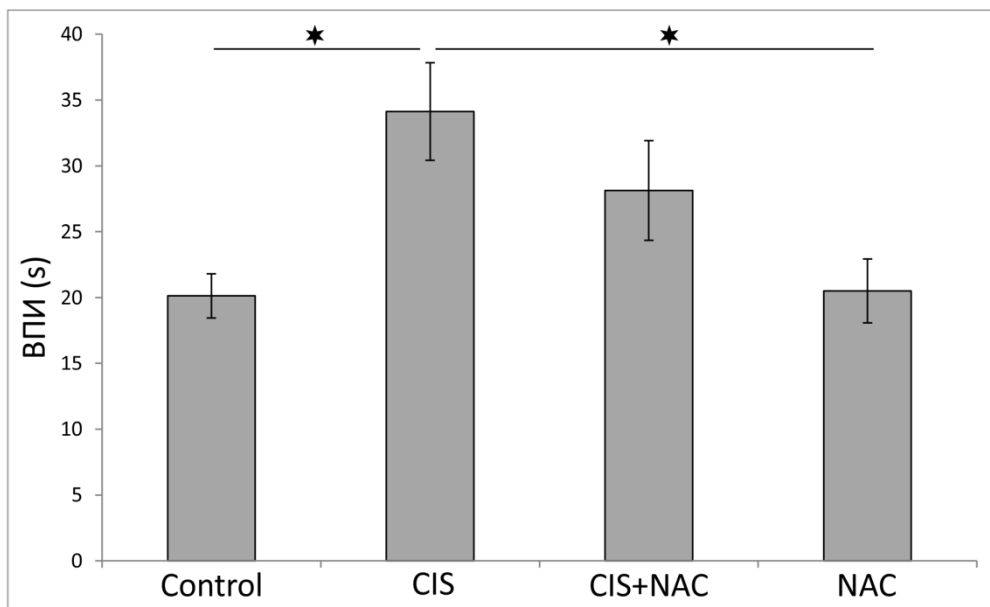
Параметри праћени у тесту качења за реп су:

1. време до прве имобилности (ВПИ)
2. број епизода имобилности (БЕИ)
3. укупно трајање имобилности (УТИ)
4. просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ).

4.1.3.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене времена до прве имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп

Терапијски протоколи спроведени у овој студији су узроковали промене времена до прве имобилности (ВПИ) у тесту качења за реп ($F=4.905$, $df=3$).

Као што се види на слици 4.13. једнократна апликација цисплатине у дози од 7.5 mg/kg је доводила до повећања ВПИ ($p<0.05$) у поређењу са контролном групом. Примена NAC-а самостално није изазвала промену вредности ВПИ, док примена NAC-а симултано са цисплатином је повећање ВПИ које је цисплатина изазвала, учинила статистички безначајним.



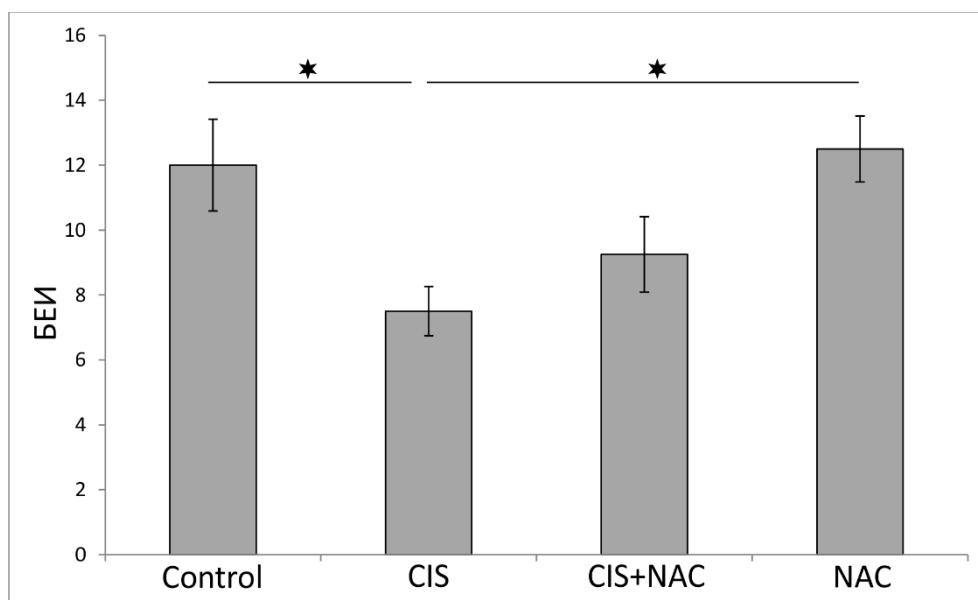
Слика 4.13. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене времена до прве имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $*p<0.05$.

4.1.3.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене броја епизода имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп

Терапијски протоколи из ове студије су узроковале значајне промене у броју епизода имобилности (БЕИ) у тесту качења за реп ($F=4.446$, $df=3$, $p<0.05$).

Примена цисплатина у једнократној дози од 7.5 mg/kg резултирала је смањењем БЕИ у поређењу са контролним вредностима ($p<0.05$). И код овог параметра, истовремена примена NAC-а је смањила утицај цисплатине, тако да су вредности БЕИ у CIS+NAC групи биле приближне вредностима у контролној групи.

У групи која је третирана искључиво NAC-ом није забележена промена БЕИ у односу на контролну групу

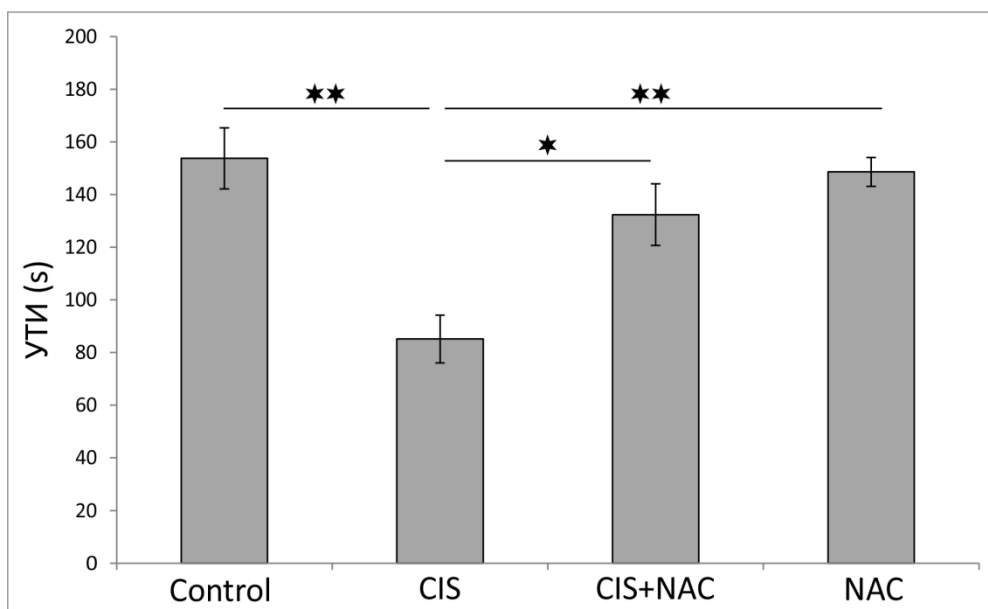


Слика 4.14. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене броја епизода имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $*p<0.05$.

4.1.3.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене укупног трајања имобилности изазване цисплатином у тесту качења за реп

Примењени протоколи, као што је приказано на слици 4.15, изазвали су значајне промене у укупном трајању имобилности (УТИ) у тесту качења за реп ($F=10.198$, $df=3$). Вредности УТИ забележене у ЦИС групи биле су значајно ниже ($p<0.01$) у поређењу са контролном групом. Међутим, истовремена примена NAC са цисплатином резултирала је повећањем УТИ у поређењу са ЦИС групом ($p<0.05$) тако да су вредности УТИ биле на нивоу контролне групе.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

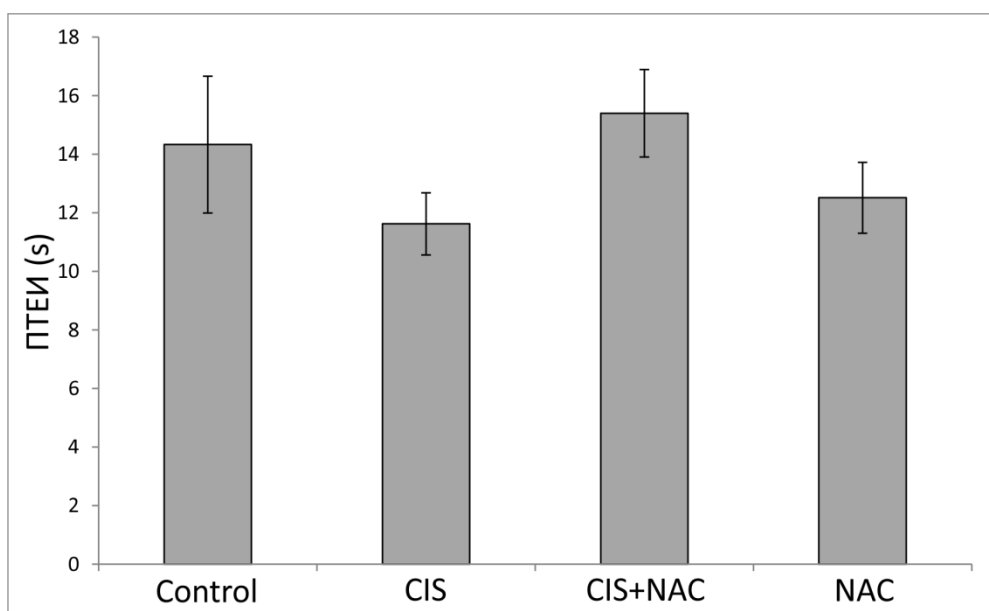


Слика 4.15. Ефекти примене N-ацетилцистеина на цисплатином изазване промене укупног трајања имобилности у тесту качења за реп. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X}\pm SEM$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.4. Утицај примене N-ацетилцистеина на просечно трајање епизода имобилности (ПТЕИ) изазване дисплатином у тесту качења за реп

Није било значајне разлике у просечном трајању епизоде имобилности (ПТЕИ) између група ($F=1.141$, $df=3$) формираним према протоколима примењеним у овој студији.

У групи која је третирана дисплатином, у групи којој је истовремено администрирана дисплатина и NAC као и у групи која је третирана NAC-ом, нису забележене значајне промене вредности ПТЕИ (слика 4.16).



Слика 4.16. Ефекти примене N-ацетилцистеина на просечно трајање епизода имобилности промене укупног трајања имобилности изазване дисплатином у тесту качења за реп. . CONTROL – контролна група, CIS – група са дисплатином, CIS+NAC – група са дисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

4.2. Маркери оксидативног стреса

У овом истраживању испитивани су маркери оксидативног стреса у ткиву префронталног кортекса и хипокампуса пацова који су пре тога били третирани неким од терапијских протокола.

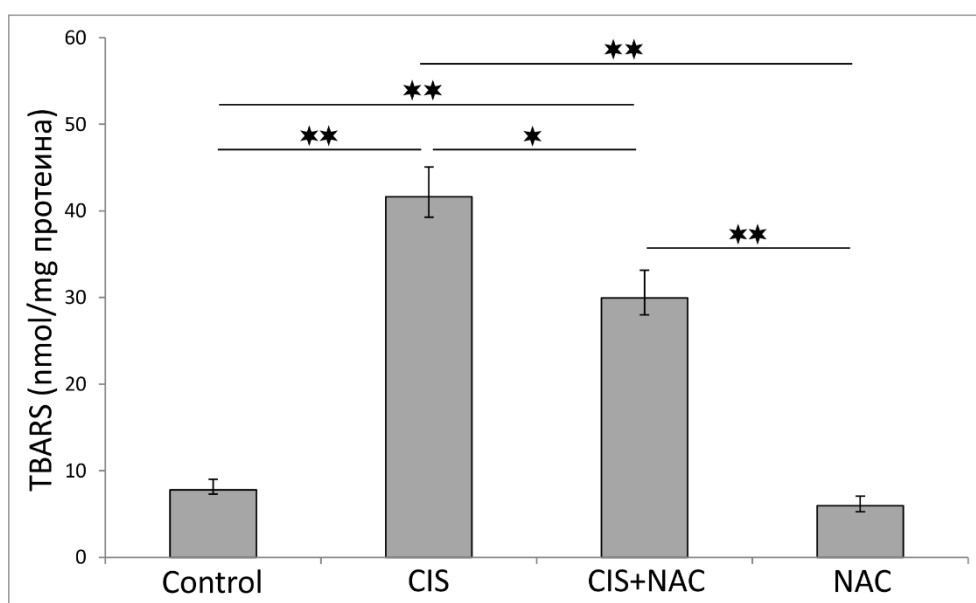
4.2.1. Маркери оксидативног стреса у ткиву префронталног кортекса

Маркери оксидативног стреса из ткива префронталног кортекса који су мерени у овом истраживању су: индекс липидне пероксидације (TBARS), активност ензима супероксид дисмутазе (SOD), активност ензима каталазе (CAT) и концентрација укупног глутатиона (GSH).

4.2.1.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације изазване цисплатином у ткиву префронталном кортексу

Као што је приказано на слици 4.17, примењени протоколи показали су значајан утицај на пероксидацију липида, изражену као TBARS ($F=48.633$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно повећала TBARS у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Истовремена примена NAC резултирала је падом пероксидације липида у поређењу са вредностима у CIS групи ($p<0.05$), али вредности TBARS-а постигнуте у комбинованој групи остале су значајно изнад вредности контролне групе ($p<0.01$).

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

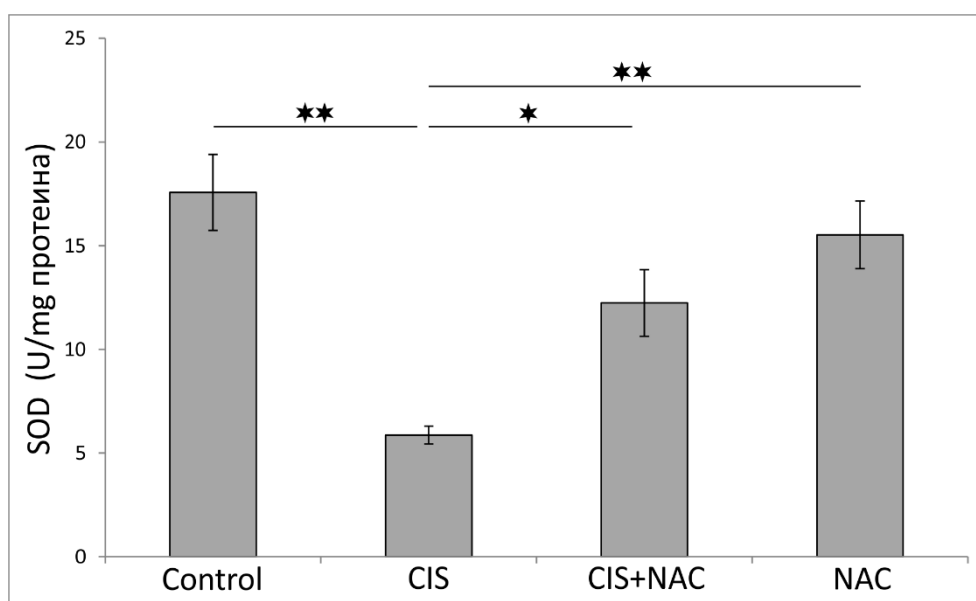


Слика 4.17. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације израженог као TBARS (nmol/mg протеина) изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса

Као што је приказано на слици 4.18, примењени протоколи показали су значајан утицај на активност супероксид дисмутазе (SOD) ($F=11.915$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно смањила активност SOD у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Ово штетно деловање цисплатина на антиоксидативни капацитет у префронталном кортексу успешно је спречено истовременом применом NAC-а који појачава активност антиоксидативних ензима у поређењу са CIS групом ($p<0.05$), спречавајући битније одступање активности SOD-а у поређењу са вредностима из контролне групе.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

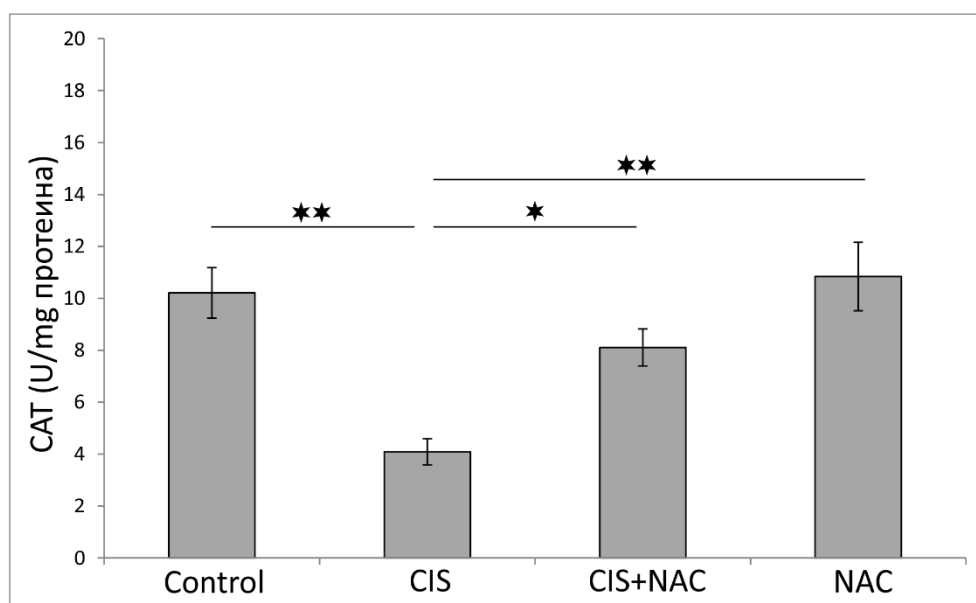


Слика 4.18. Ефекти примене екстракта N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X}\pm\text{SEM}$, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

4.2.1.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса

Као што је приказано на слици 4.19, примењени протоколи показали су значајан утицај на активност ензима каталазе (CAT) ($F=10.759$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно смањила активност (CAT) у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Ово штетно деловање цисплатина на антиоксидативни капацитет у префронталном кортексу успешно је спречено истовременом применом NAC-а који појачава активност антиоксидативних ензима у поређењу са CIS групом ($p<0.05$), спречавајући битније одступање активности CAT-а у поређењу са вредностима из контролне групе.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

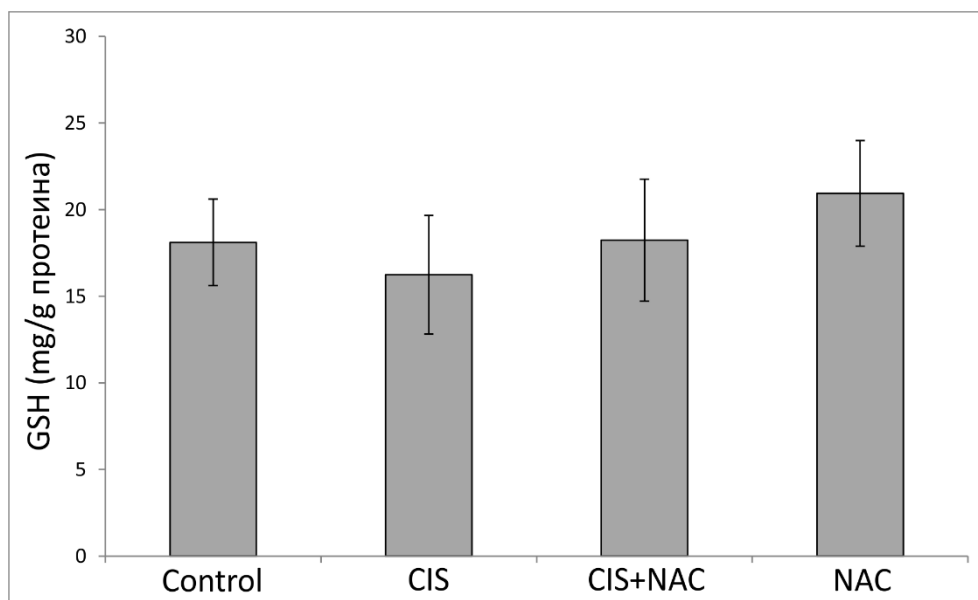


Слика 4.19. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.1.4. Утицај примене N-ацетилцистеина и цисплатине на концентрацију укупног глутатиона у ткиву префронталног кортекса

Није било значајних промена у концентрацији укупног глутатиона (GSH) између група формираних према протоколима примењеним у овој студији. ($F=0.378$, $df=3$).

У групи која је третирана цисплатином, у групи којој је истовремено администрирана цисплатина и NAC као и у групи која је третирана само NAC-ом, нису забележене значајне промене вредности GSH.



Слика 4.20. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене концентрације укупног глутатиона изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

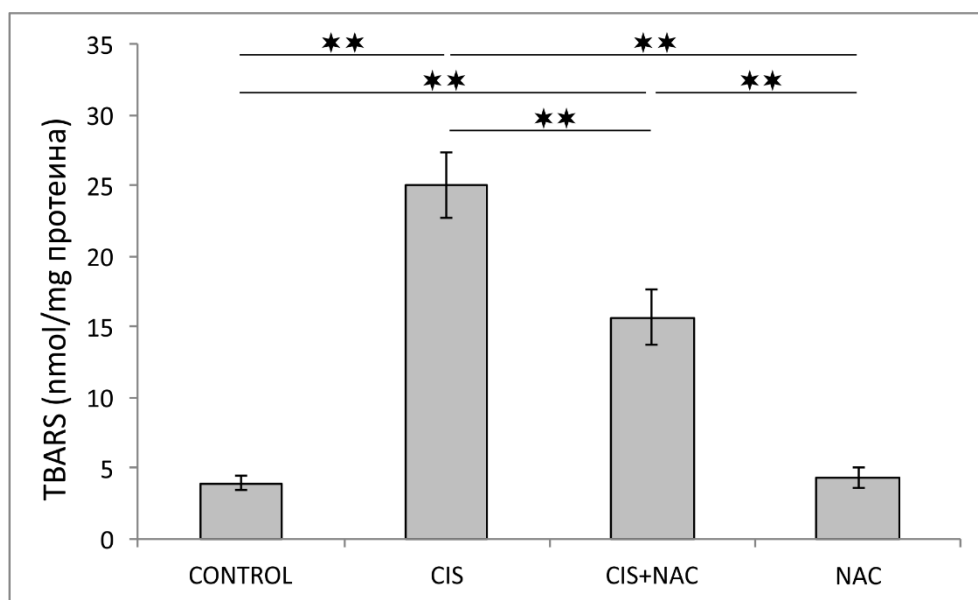
4.2.2. Маркери оксидативног стреса у ткиву хипокампусу

Маркери оксидативног стреса из ткива хипокампуса који су мерени у овом истраживању су: индекс липидне пероксидације (TBARS), активност ензима супероксид дисмутазе (SOD), активност ензима каталазе (CAT) и концентрација укупног глутатиона (GSH).

4.2.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

Као што је приказано на слици 4.21, примењени протоколи показали су значајан утицај на пероксидацију липида, изражену као TBARS ($F=40.872$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно повећала TBARS у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Прооксидативни ефекат цисплатине у хипокампусу је значајно смањен симултаном администрацијом NAC-а и као резултат тога добијена је значајна редукција нивоа TBARS-а ($p<0.01$) у односу на CIS групу.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



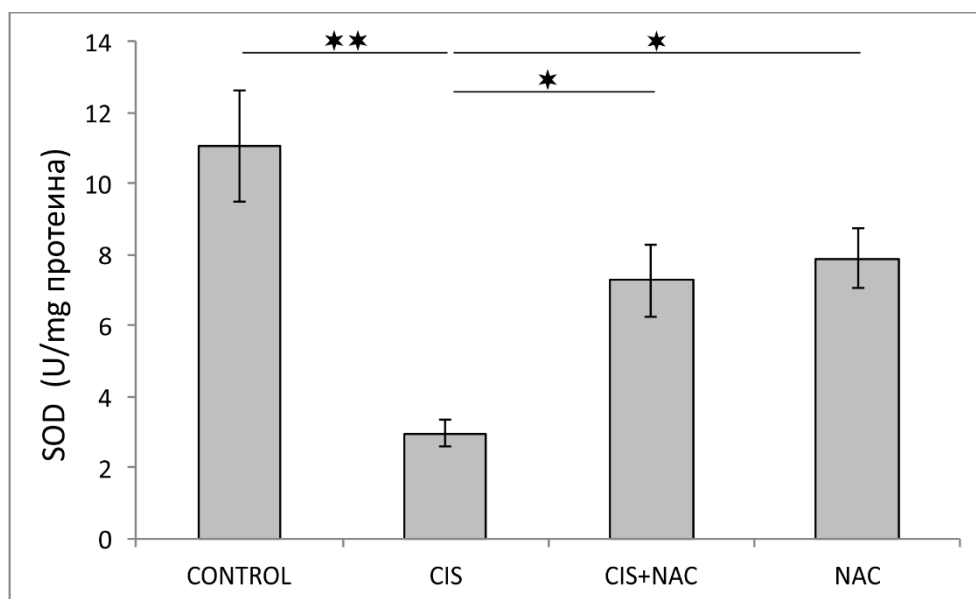
Слика 4.21. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене индекса липидне пероксидације израженог као TBARS изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са

цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; n=8 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, **p<0.01.

4.2.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

Као што је приказано на слици 4.22, примењени протоколи показали су значајан утицај на активност супероксид дисмутазе (SOD) ($F=10.372$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно смањила активност SOD у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Ово штетно деловање цисплатина на антиоксидативни капацитет у хипокампусу успешно је спречен истовременом применом NAC-а који појачава активност антиоксидативних ензима у поређењу са CIS групом ($p<0.05$), спречавајући битније одступање активности SOD-е у поређењу са вредностима из контролне групе.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

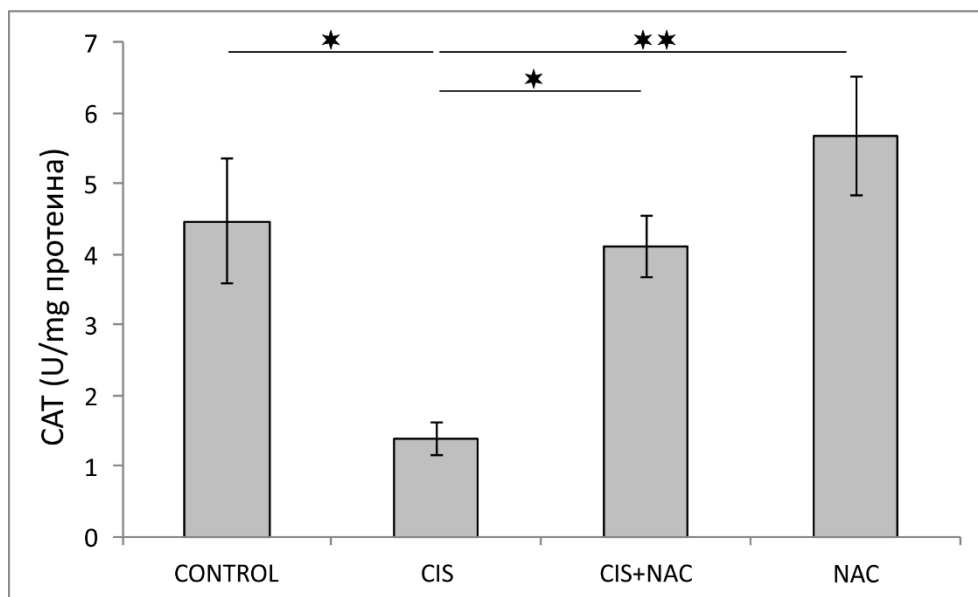


Слика 4.22. Ефекти примене екстракта N-ацетилцистеина на промене активности супероксид дисмутазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; n=8 по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, *p<0.05, **p<0.01.

4.2.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

Као што је приказано на слици 4.23, примењени протоколи показали су значајан утицај на активност ензима каталазе (CAT) ($F=7.635$, $df=3$). Једна доза цисплатина је значајно смањила активност (CAT) у поређењу са вредностима из контролне групе ($p<0.01$). Ово штетно деловање цисплатина на антиоксидативни капацитет у хипокампусу успешно је спречено истовременом применом NAC-а који појачава активност антиоксидативних ензима у поређењу са CIS групом ($p<0.05$), спречавајући битније одступање активности CAT-а у поређењу са вредностима из контролне групе.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

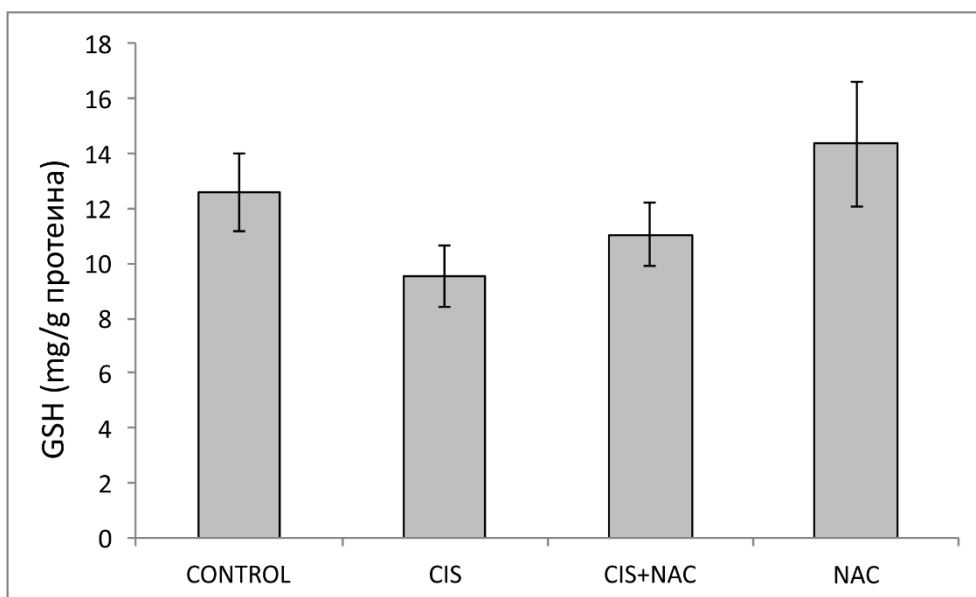


Слика 4.23. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене активности каталазе изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.2.2.4. Утицај примене N-ацетилцистеина и цисплатине на концентрацију укупног глутатиона у ткиву хипокампуса

Није било значајних промена у концентрацији укупног глутатиона (GSH) између група формираних према протоколима примењеним у овој студији ($F=1.757$, $df=3$).

У групи која је третирана цисплатином, у групи којој је истовремено администрирана цисплатина и NAC као и у групи која је третирана само NAC-ом, нису забележене значајне промене вредности GSH.



Слика 4.24. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене концентрације укупног глутатиона изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

4.3. Маркери апоптотске активности

У овом истраживању испитивани су маркери апоптотске активности у ткиву префронталног кортекса и хипокампуса пацова који су пре тога били третирани неким од терапијских протокола из ове студије.

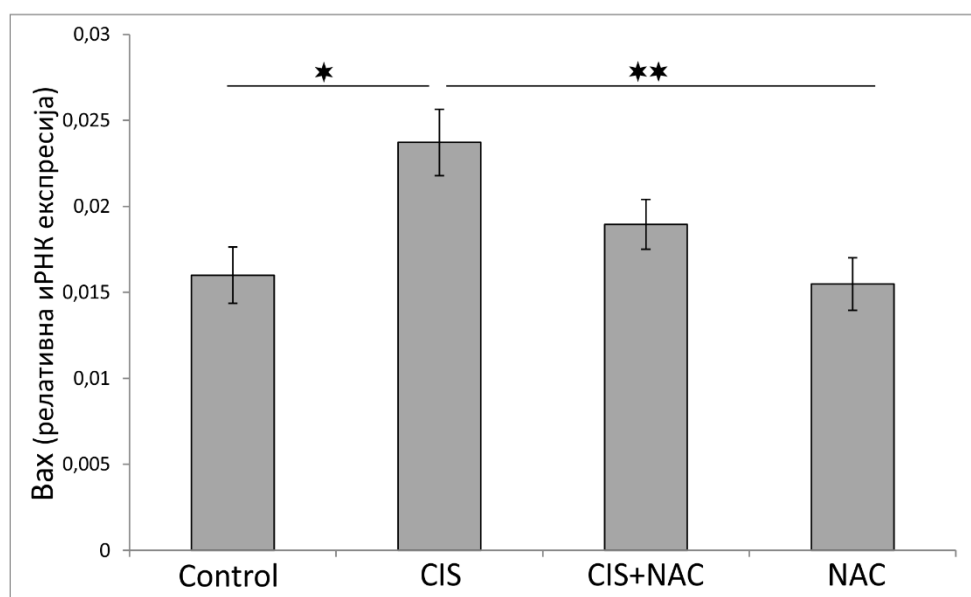
4.3.1. Маркери апоптотске активности у ткиву префронталног кортекса

Маркери апоптотске активности из ткива префронталног кортекса који су мерени у овом истраживању су: релативна експресија информационе РНК за про-апоптотски ген Вах, релативна експресија иРНК за анти-апоптотски ген Bcl-2 и однос релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2.

4.3.1.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса

Као што је приказано на слици 4.25, релативна експресија про-апоптотског гена Вах у префронталном кортексу је значајно измењена примењеним протоколима ($F=5,254$, $df=3$). Примена цисплатине резултирала је повећаном релативном експресијом гена Вах ($p<0.05$), али је ово про-апоптотско деловање цисплатине значајно смањено истовременом применом NAC-а после чега су вредности Вах биле приближно на нивоу вредности у контролној групи ($p<0.01$).

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



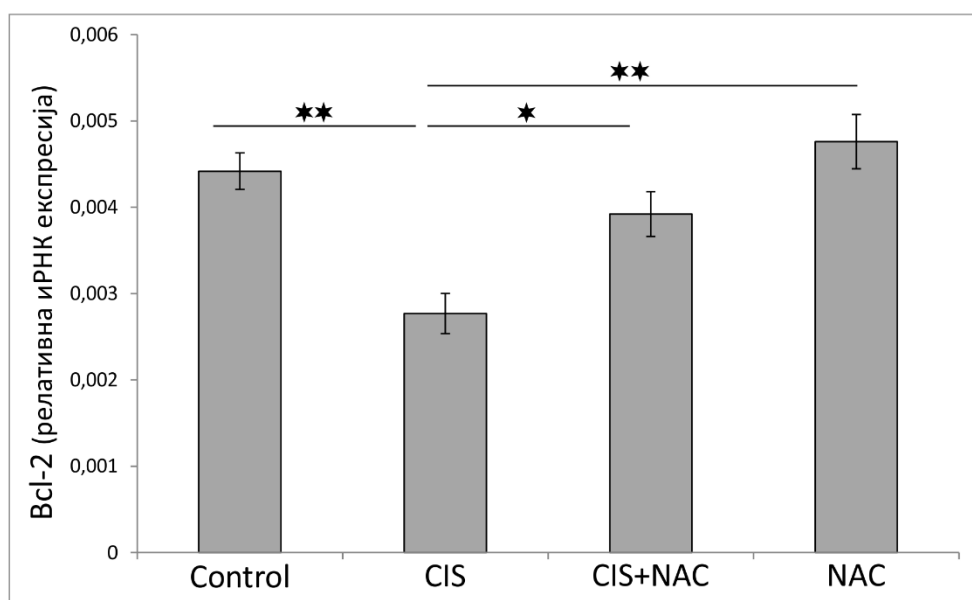
Слика 4.25. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.1.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса

После примене терапијских протокола из ове студије анти-апоптотски капацитет у префронталном кортексу, је квантификован (слика 4.26) и доказане су значајне промене овог параметра ($F=11.435$, $df=3$).

Једнократна доза цисплатине је значајно смањила релативну експресију гена Bcl-2 ($p<0.01$) и тако негативно утицала на анти-апоптотску активност. Применом NAC-а упоредо са цисплатином, релативна експресија гена Bcl-2 је повећана ($p<0.05$) у поређењу са CIS групом, достижући вредности добијене у контролној групи.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

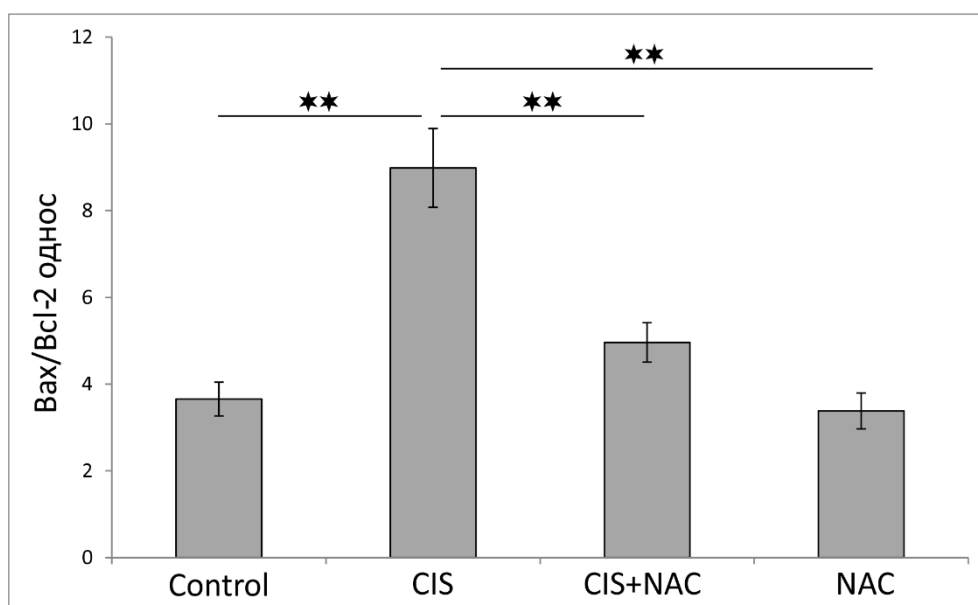


Слика 4.26. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.1.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву префронталног кортекса

Процена односа Вах/Bcl-2 потврдила је значајан утицај примењених протокола на апоптотску равнотежу ($F=19.710$, $df=3$). Дакле, про-апоптотско деловање цисплатине, изражено као однос између Вах и Bcl-2 релативне експресије гена, манифестовало се значајним повећањем овог параметра ($p<0.01$), док је анти-апоптотски ефекат истовременом применом NAC-а био манифестован смањењем односа Вах/Bcl-2 у поређењу са CIS групом ($p<0.01$), достижући вредности забележене у контролној групи.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



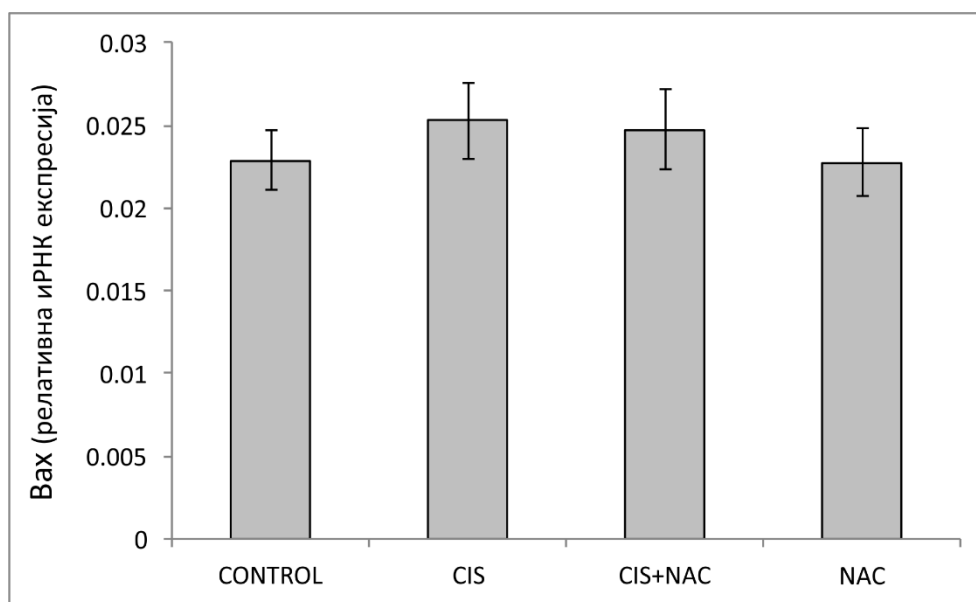
Слика 4.27. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $**p<0.01$.

4.3.2. Маркери апоптотске активности у ткиву хипокампуса

Маркери апоптотске активности из ткива хипокампуса који су мерени у овом истраживању су: релативна експресија иРНК за про-апоптотски ген Вах, релативна експресија иРНК за анти-апоптотски ген Bcl-2 и однос релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2.

4.3.2.1. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

Као што је приказано на слици 4.28, ниједан од примењених протокола није имао значајан утицај на релативну експресију про-апоптотског гена Вах-а у хипокампусу ($F=0.352$, $df=3$).

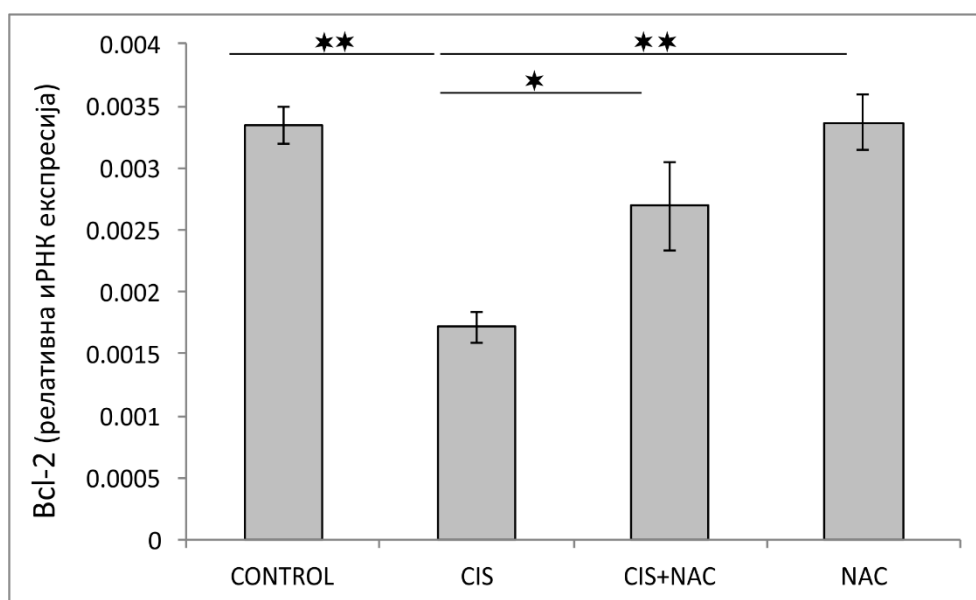


Слика 4.28. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Вах изазване цисплатином у хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm SEM$.

4.3.2.2. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

За разлику од Вах гена, релативна експресија гена Bcl-2 је значајно промењена применом терапијских протокола из ове студије ($F=11.143$, $df=3$). Једнократна примена цисплатина значајно је смањила релативну експресију овог анти-апоптотског гена у поређењу са контролном групом ($p<0.01$). Истовременом применом NAC-а, про-апоптотско деловање цисплатина је значајно умањено ($p<0.05$) и вредности су биле изједначене са вредносима у контролној групи.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.

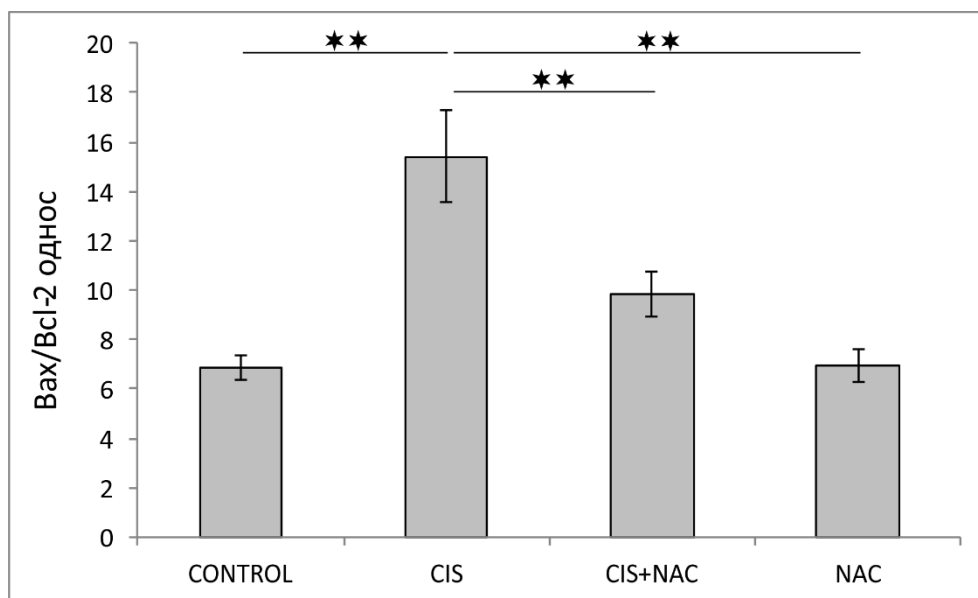


Слика 4.29. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.2.3. Утицај примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса

Процена односа Вах/Bcl-2 потврдила је значајан утицај примењених протокола на апоптотску равнотежу ($F=12.866$, $df=3$). Про-апоптотски утицај цисплатине се огледа у смањењу релативне експресије гена Bcl-2 у односу на контролну групу, што последично повећава и однос Вах / Bcl-2. Истовременом применом цисплатине и NAC-а однос Вах/Bcl-2 је значајно смањен у односу на CIS групу ($p<0.01$) чиме је потврђен анти-апоптотски ефекат NAC-а.

Група која је била третирана искључиво NAC-ом није показала битније промене овог параметра у односу на контролну групу.



Слика 4.30. Ефекти примене N-ацетилцистеина на промене квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 изазване цисплатином у ткиву хипокампуса. CONTROL – контролна група, CIS – група са цисплатином, CIS+NAC – група са цисплатином и NAC-ом, NAC – група са NAC-ом; $n=8$ по групи. Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, $**p<0.01$.

4.4. Испитивање међусобне каузалне повезаности параметара добијених у бихевиоралним тестовима и испитивању оксидативног стреса и апоптотске активности у хипокампусу

4.4.1. Анализа међусобне повезаности вредности параметара маркера оксидативног стреса и маркера апоптотске активности

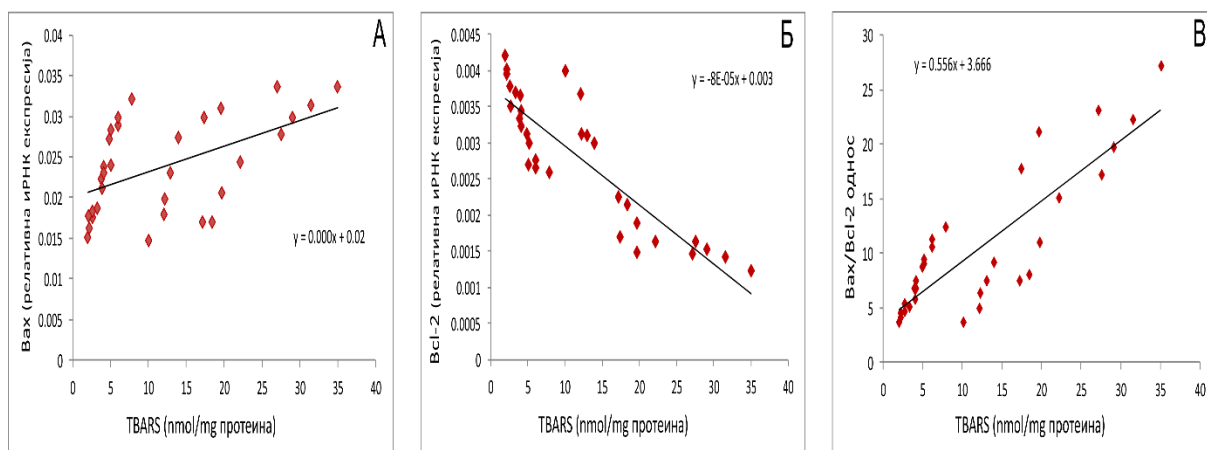
Регресионом методом анализирана је међусобна повезаност маркера оксидативне активности у хипокампусу, TBARS (индекс пероксидације липида), активности супероксид дисмутазе и каталазе са про- и анти-апоптотским факторима, релативном генском експресијом иРНК за Bax и Bcl-2 као и односа Bax/Bcl-2 у ткиву хипокампуса.

4.4.1.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS) и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса

Као што је приказано на слици 4.31 А, индекс липидне пероксидације хипокампуса, изражен као TBARS, у значајној је позитивној корелацији са релативном експресијом иРНК за Вах (Пирсонов $r=0.53$, $p=0.002$).

Значајна негативна корелација је забележена између индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) и релативне експресије иРНК за Bcl-2 ($r=0.88$, $p=4.4 \times 10^{-11}$) у ткиву хипокампуса (слика 4.30 Б).

Квантитативни однос релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 и индекса липидне пероксидације хипокампуса, изражена као TBARS, у значајној је позитивној корелацији (слика 4.30 В) ($r=0.85$, $p=5.9 \times 10^{-10}$),

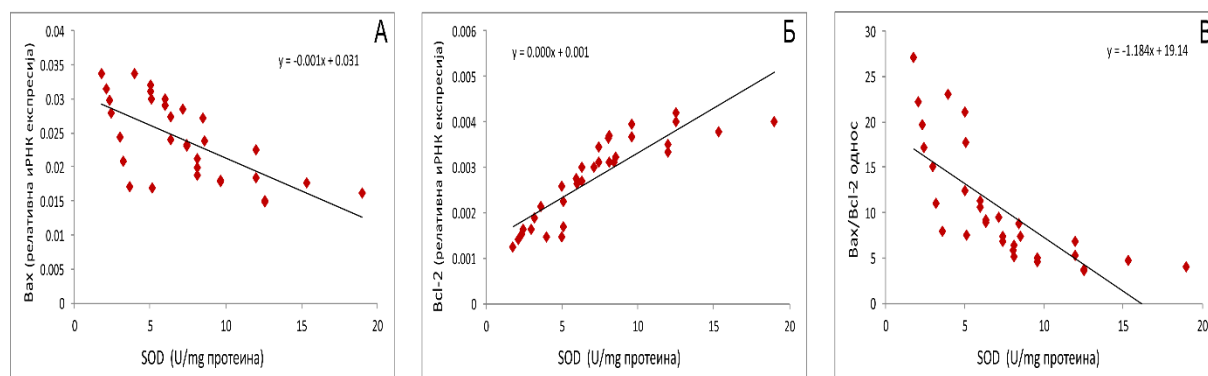


Слика 4.31. Повезаност индекса липидне пероксидације (TBARS) и: (А) релативне генске експресије иРНК за Вах, (Б) релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 и (В) квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса.

4.4.1.2. Анализа међусобне повезаности активности супероксид дисмутазе и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса

Као што се на слици 4.32 А може видети, антиоксидантни капацитет изражен кроз активност супероксид дисмутазе (SOD) је у значајној негативној корелацији са релативном експресијом иРНК за Вах (Пирсонов $r=0.66$ и $p=3.3 \times 10^{-5}$) а иста корелација се јавља и између активности SOD и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 (Пирсонов $r=0.74$ и $p=1.1 \times 10^{-6}$), слика 4.32 В.

Истовремено, активност овог ензима је у значајној позитивној корелацији са релативном експресијом Bcl2 (Пирсонов $r=0.86$ и $p=2.3 \times 10^{-10}$), слика 4.32 Б.

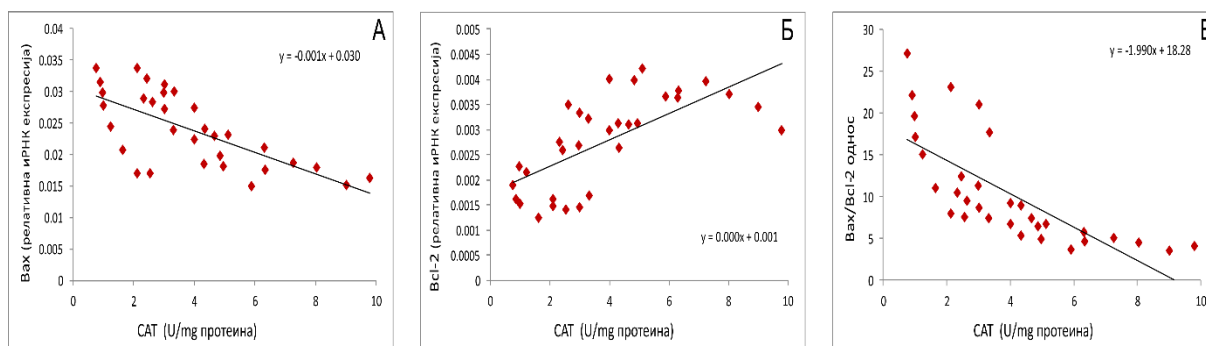


Слика 4.32. Повезаност активности супероксид дисмутазе и : (А) релативне генске експресије иРНК за Вах, (Б) релативне генске експресије иРНК за Bcl-2 и (В) квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Bcl-2 у ткиву хипокампуса.

4.4.1.3. Анализа међусобне повезаности активности каталазе и маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса

Као што се на слици 4.33.А може видети, антиоксидантни капацитет изражен кроз активност каталазе (САТ) је у значајној негативној корелацији са релативном експресијом иРНК за Вах (Пирсонов $r=0.70$ и $p=9.3 \times 10^{-6}$) а иста корелација се јавља и између активности САТ и квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Всл-2 (Пирсонов $r=0.73$ и $p=1.8 \times 10^{-6}$), слика 4.32 В.

Истовремено, активност овог ензима је у значајној позитивној корелацији са релативном експресијом Всл-2 (Пирсонов $r=0.68$, $p=2.1 \times 10^{-5}$), слика 4.32 Б.



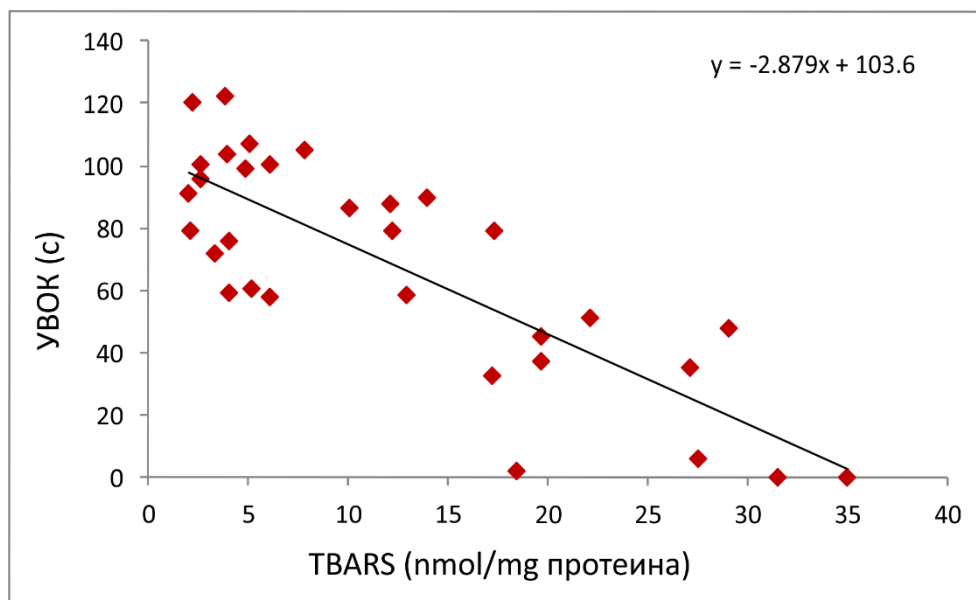
Слика 4.33. Повезаност активности каталазе и: (А) релативне генске експресије иРНК за Вах, (Б) релативне генске експресије иРНК за Всл-2 и (В) квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Всл-2 у ткиву хипокампуса.

4.4.2. Анализа међусобне повезаности односа маркера оксидативног стреса у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Поред утицаја на релативну хипокампаљну експресију про- и анти-апоптотских гена, једноставна регресиона анализа открила је да су маркери оксидативног стреса такође у корелацији са главним параметром нивоа анксиозности добијеним у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ). Главни параметар нивоа анксиозности у УКЛ тесту је укупно време проведено у отвореним крацима (УВОК).

4.4.2.1. Анализа међусобне повезаности индекса липидне пероксидације (TBARS) и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта

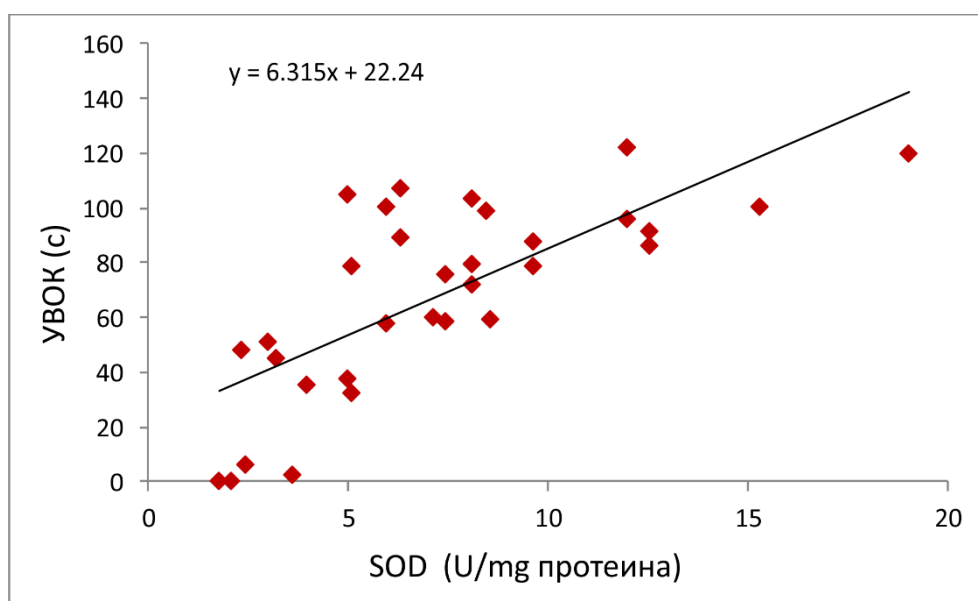
Липидна пероксидација, изражена као TBARS, у негативној је корелацији значајног степена са анксиолитичким исходом тесту (слика 4.34), што је приказано повећањем УВОК параметра у УКЛ тесту (Пирсонов $r=0.82$, $p=1.7 \times 10^{-8}$).



Слика 4.34. Повезаност индекса липидне пероксидације (TBARS) и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта.

4.4.2.2. Анализа међусобне повезаности активности супероксид дисмутазе и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта

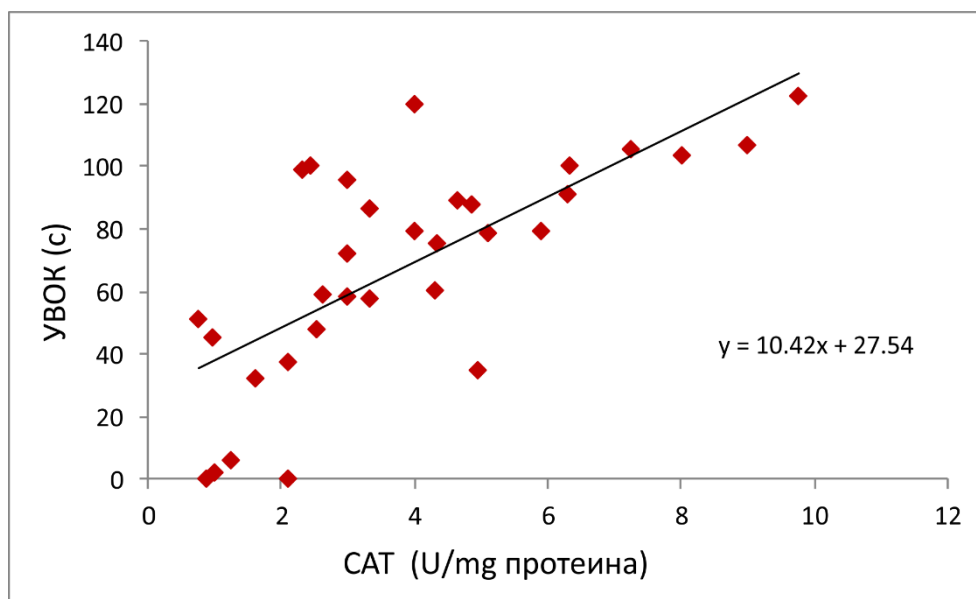
Током испитивања везе између активности антиоксидантног ензима SOD у хипокампусу и УВОК параметра у УКЛ тесту, показана је снажна позитивна корелација активности SOD са показатељем смањеног нивоа анксиозности израженим као УВОК у УКЛ тесту (Пирсонов $r=0.73$, $p=2.1 \times 10^{-6}$).



Слика 4.35. Повезаност активности супероксид дисмутазе и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта.

4.4.2.3. Анализа међусобне повезаности активности каталазе у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Током испитивања везе између активности антиоксидантног ензима САТ у хипокампусу и УВОК параметра у УКЛ тесту, показана је снажна позитивна корелација активности САТ са показатељем смањеног нивоа анксиозности израженим као УВОК у УКЛ тесту (Пирсонов $r=0.70$, $p=6.2 \times 10^{-6}$).

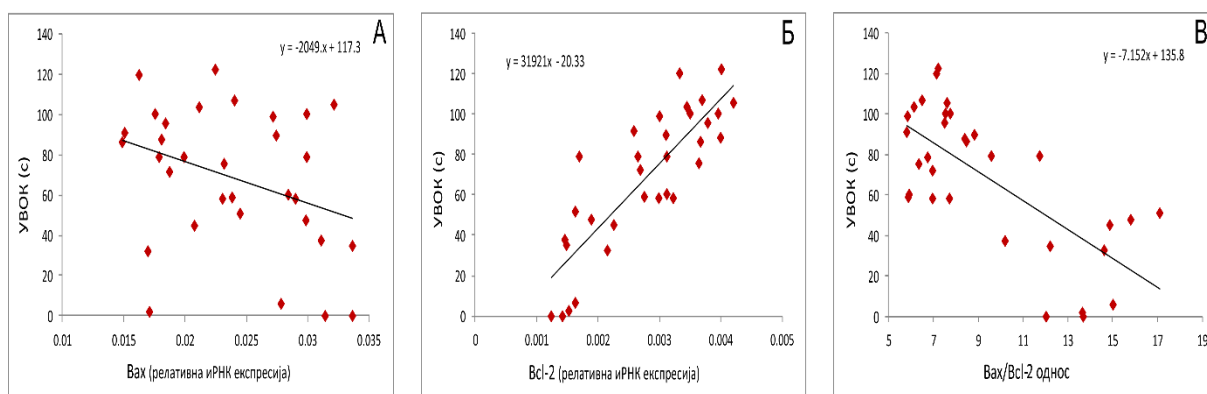


Слика 4.36. Повезаност активности каталазе и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта.

4.4.3. Анализа међусобне повезаности маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса и степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта

Регресионом методом анализирана је повезаност параметара који представљају апоптотске механизме и степен анксиозности испитиваних животиња.

Повећање релативне експресије про-апоптотичног гена Вах негативно је корелирало са УВОК параметром из УКЛ теста (слика 4.37 А, Пирсонов $r=0.34$, $p>0.05$). Такође, показана је значајна негативна корелација за однос релативне генске експресије иРНК Вах / Вс1-2 и степен анксиозности квантификован УВОК параметром у УКЛ тесту (слика 4.37 В, Пирсонов $r=0.71$, $p=6.2 \times 10^{-6}$). Насупрот томе, релативна експресија анти-апоптотског гена Вс1-2 такође је значајно, али позитивно, у корелацији са порастом УВОК параметра, као показатељем анксиолитичког ефекта (слика 4.37 Б, Пирсонов $r=0.84$, $p=1.8 \times 10^{-9}$).



Слика 4.37. Повезаност степена анксиозности израженог преко укупног времена проведеног у отвореним крацима током теста уздигнутог крстастог лавиринта и: (А) релативне генске експресије иРНК за Вах, (Б) релативне генске експресије иРНК за Вс1-2 и (В) квантитативног односа релативне генске експресије иРНК за Вах и Вс1-2 у ткиву хипокампуса.

5. ДИСКУСИЈА

И поред појаве многих нових врста антиканцерских лекова, цисплатина представља још увек важан и незаобилазан лек у савременом концепту лечења многих малигнитета. Несумњиви антитуморски потенцијал који цисплатина поседује је кроз вишедеценијску праксу потврђен и у облику монотерапије (139) и у комбинацији са другим цитостатицима (140, 141). Врло често цисплатина не може да оствари свој антиканцерски утицај у пуном обиму због бројних пропратних нежељених ефеката који ограничавају њену примену. Зато се у примени цисплатине често прави компромис између способности цисплатине да позитивно утиче на бројне малигне болести и бројних озбиљних нежељених ефеката који прилично ограничавају терапијске.

Неуротоксичност не спада у најзаступљеније нежељене манифестације дејства цисплатине, али када се јави резултира озбиљним клиничким поремећајима због којих може доћи прекида цитостатске терапије цисплатином. Иако молекул цисплатине у малој мери успева да прође кроз хематоенцефалну баријеру (142), манифестације неуротоксичног дејства цисплатине су значајне и тешке. Клинички симптоми и знакови који се јављају могу се поделити на психолошке, перцептивне и когнитивне (143-145). Примена цисплатине на анималним моделима у дозама које су еквивалентне терапијским дозама код људи је показала бројне штетне ефекте како на периферном тано и на централном нервном систему. Једна од битних манифестација неуротоксичности цисплатине су и бихевиорални поремећаји. Међу најчешћим бихевиоралним поремећајима који су изазвани применом цисплатине су когнитивне дисфункције (146) повећан степен депресивности (147) и анксиозности (148). Експериментални модел из ове студије је подразумевао администрацију цисплатине здравим јединкама, чиме је избегнута могућност да се неке од неуротоксичних манифестација повежу са основном малигном болешћу. Неопходно је нагласити значај анималних експерименталних модела у испитивању нежељених манифестација хемиотерапеутика, јер се из објективних разлога то не може испитивати у клиничким студијама.

Као и бројни други нежељени ефекти примене цисплатине, тако и неуротоксичност у својој патогенетској основи садржи неконтролисано оксидативно оштећење различитих ткива. Због тога је додатак различитих антиоксиданата терапији цисплатином, као потенцијални начин заштите против неуротоксичности цисплатине, врло често био испитиван на експерименталним анималним моделима.

Још увек нема сигурне потврде о могућој корисној улози антиоксидативних суплемената и лекова који се већ налазе у употреби, као што је N-ацетилцистеин (NAC) код појаве различитих клиничких манифестација неуротоксичног ефекта цисплатине. Самим тим антиоксиданти још увек нису уведени у клиничке протоколе при настајању ових нежељених дејстава цитостатика на бази цисплатине, иако студије као што је и ова показују несумњиво њихов користан ефекат.

Резултати ове студије су показали да самостална примена N-ацетилцистеина (NAC-a), није имала значајни ефекат на параметре који су били праћени у бихевиоралним тестовима као ни на параметре оксидативног стреса и апоптотске маркере у односу на вредности тих параметара у контролној групи. Овај резултат је у складу са студијом (149) која је примењивала NAC у дози од 100 mg/kg током 20 дана и после тога испитивала маркере оксидативног стреса и укупни антиоксидантни капацитет можданог ткива пацова. Такође у другој студији (150) испитиван је ефекат примене таурина (аминокиселине која садржи сумпор, 200 mg/kg ТМ, 16 дана) на мождане регионе специфичне за регулацију понашања, при чему није било промене у

оксидативном капацитету а такође нису забележене ни промене у понашању у поређењу са контролном групом, што је такође у позитивној корелацији са резултатима добијеним у овој студији.

Утицај терапијских протокола на резултате бихевиоралних тестова

Бихевиорални тестови којима су подвргнуте животиње после администрације једног од 4 терапијских протокола која су сачињавала ову студију, имали су за циљ да одреде степен анксиозности и депресивности. Тестом отвореног поља (ОП тест) и тестом уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест) анализиран је степен анксиозности док је депресивност испитивана тестом качења за реп (ТКР тест).

У групи која је била третирана искључиво цисплатином забележен је јасан анксиогени ефекат који је био квантификован смањењем директних параметара анксиозности у ОП тесту и у УКЛ тесту. Наиме, директни индикатори анксиозности у ОП тесту, укупно време проведено у централној зони (УВЦЗ) као и број улазака у централну зону (БУЦЗ) у групи која је третирана цисплатином су били смањени (слике 4.1 и 4.2). Такође директни индикатори анксиозности у УКЛ тесту, укупно време у отвореним краковима (УВОК) и број улазака у отворене краке (БУОК) показивали су код ове групе исти тренд (слике 4.6 и 4.7), из чега се може извести закључак о анксиогеном ефекту цисплатине.

Према подацима из литературе, доказ анксиогеног утицаја неког испитиваног средства чини и смањење локомоторне и експлоративне активности испитиване животиње (152). Такође на повећани степен анксиозности указивали су параметри истраживачке и локомоторне активности у ОП и УКЛ тесту. Вредности локомоторних параметара УПП и %ВК (слике 4.3 и 4.4) као и вредност БУ као експлоративног параметра (слика 4.5) у ОП тесту су били значајно смањени у групи третираној цисплатином. Смањење вредности експлоративних (УБЕЕА; БУ, БН) и локомоторних (УПП, %ВК) параметара забележени су и у УКЛ тесту (слике 4.8 -12).

Добијени резултати су били очекивани с обзиром на резултате добијене у другим студијама где је такође показан анксиогени ефекат цисплатине, додуше уз двоструко већу дозу цисплатине (150) или уз продужену администрацију од 5 недеља, са мањом дозом од 5 mg/kg ТМ (151) у односу на ово истраживање.

Експериментална група која је била третирана цисплатином и НАС-ом је у бихевиоралним тестовима показала значајно мањи анксиогени ефекат у односу на групу третирану само једнократном дозом цисплатине. Параметри одређивани у ОП тесту, директни индикатори анксиозности УВЦЗ И БУЦЗ (слике 4.1 и 4.2), параметри локомоторне активности УПП и %ВК (слике 4.3 и 4.4), као и БУ као параметар експлоративне активности (слика 4.5) били су приближно исти вредностима датих параметара у контролној групи. Исти резултати су добијени и применом УКЛ теста. Наиме, директни индикатори анксиозности УВОК и БУОК (слике 4.6 и 4.7), параметри локомоторне активности УПП и %ВК (слике 4.8 и 4.9), као и параметри експлоративне активности УБЕЕА БУ и БН (слике 4.10-12) су у групи третираној цисплатином и НАС-ом имали вредности без значајне разлике у односу на контролну групу, односно поништен је утицај цисплатине забележен у групи која је третирана искључиво цисплатином.

Ови резултати су били очекивани и у складу са претходно описаним позитивним ефектима суплементације антиоксидантима из различитих антиоксидативних извора као што су таурин (150) и D-метионин (153).

За разлику од бихевиоралних тестова који су анализирали степен анксиозности настале применом терапијских протокола из ове студије, резултати теста качења за реп (ТКР тест), који анализира појаву депресије су били сложенији за тумачење и нису били у складу са оним што се очекивало на основу резултата добијених из студија које су се тиме већ бавиле.

У групи која је третирана искључиво цисплатином, посматрани параметри праћени у ТКР тесту, време до прве имобилности (ВПИ, слика 4.13) , промене броја епизода имобилности (БЕИ, слика 4.14), и укупно трајање имобилности (УТИ, слика 4.15) бележили су значајне промене у односу на контролну групу у смислу повећања антидепресантног ефекта, док параметар просечно трајање епизоде имобилности (ПТЕИ, слика 4.16) није бележио битније промене. Објашњење овако добијених резултата садржи неколико објективних околности и претпоставки. Наиме, вредности посматраних параметара у ТКР тесту за процену депресије могу бити измењени променама нивоа анксиозности. Моторичке манифестације јаког анксиогеног одговора на одговарајуће стресне стимулусе, могу маскирати продепресантни ефекат и његову квантификацију (151). Овакав закључак би био у складу са већ потврђеним продепресантним ефектом цисплатине (144). Такође, различити експериментални дизајни у студијама које су анализирале продепресантни утицај цисплатине могу бити један од разлога за тумачење несклада у добијеним резултатима ове студије са већ постојећим сличним студијама. Дакле, продепресантно дејство цисплатине је квантификовано у студији где је терапијски протокол подразумевао администрацију цисплатине у трајању од 10 недеља (144) док овај нежељени ефекат није примећен после једнократне дозе цисплатине како је предвиђао протокол из овог истраживања. Такође, префронтални кортекс (ПФК) као један од два морфолошка супстрата која су анализирана у овом истраживању укључен је и у контролу депресије (152) али и контролу нивоа анксиозности (153). У претходним истраживањима вентрална зона ПФК-а је мапирана као део задужен за анксиозност (154) и у њој се најпре уочава неуротоксични ефекат у ПФК-у (155). Продужена и понављана администрација цисплатине била би праћена оштећењем и других делова ПФК-а што би за последицу имало и продепресантни ефекат (155). Специфична регионална анализа ПФК-а и одређивање функције и улоге сваког од региона би олакшао анализу утицаја цисплатине како на овај сложени мождани регион тако и на бихевиоралне промене.

Утицај терапијских протокола на промене параметара оксидативног стреса

Поред промена у бихевиоралним карактеристикама, овим истраживањем је несумњиво показан негативан утицај цисплатине на оксидативну равнотежу како у префронталном кортексу (ПФК) тако и у хипокампусу.

Анализом маркера оксидативног стреса на нивоу ПФК-а потврђено је снажно прооксидативно дејство цисплатине. Доказ овог проксидативног дејства цисплатине је било повећање липидне пероксидације (слика 4.17) и смањена активност антиоксидативних ензима супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у групи која је била третирана искључиво цисплатином (слике 4.18 и 4.19). Резултати из претходних студија поткрепљују резултате добијене у овом истраживању (159, 160). Такође сличан

ефекат цисплатине на антиоксидативни капацитет забележен је и на фронталном делу кортекса пацова што је било праћено специфичним манифестацијама (159,160).

С друге стране, ниво глутатиона (GSH) у ПФК после примене цисплатине је остао непромењен (слика 4.20). Поређење овог податка са литературним подацима је било могуће само са подацима о нивоу GSH у различитим регионима мозга и то након већих доза цисплатине и/или дужег давања (161).

Истовремена администрација NAC-а уз цисплатину се показала као довољна да умањи прооксидативно деловање цисплатине у ПФК-у. NAC примењен у две дозе значајно је смањило липидну пероксидацију (слика 4.17) и истовремено повећао антиоксидативни капацитет обнављањем капацитета антиоксидативних ензима (слике 4.18 и 4.19). Ови резултати су у складу са претходно описаном неуропротективном улогом антиоксиданата у лечењу нежељених ефеката изазваних лековима на бази платине (162).

Сличан ефекат цисплатине на антиоксидантни капацитет је забележен и на нивоу хипокампуса. Наиме, примена цисплатине је резултирала повећањем индекса липидне пероксидације TBARS-а (слика 4.21) и израженом смањеном активношћу антиоксидативних ензима SOD (слика 4.22) и CAT (слика 4.23), док у нивоу GSH нису уочене значајније промене (слика 4.24). Резултати добијени у овој студији су у корелацији са већ показаним смањењем активности антиоксидативних ензима у хипокампусу (160, 161). Ипак резултати овог истраживања нису у потпуности нису у потпуности у складу са до сада објављеним резултатима. Наиме, ниво GSH у хипокампусу је остао непромењен без обзира који је терапијски протокол из ове студије био примењен. Ова разлика у резултатима може се правдати нижом дозом цисплатине примењеној у овој студији (7.5 mg/kg у односу на 10 mg/kg) и краћом изложеношћу (појединачна доза у односу на дужину протокола од 7 недеља) у односу на две студије које се испитивале утицај цисплатине на хипокампус.

Истовремена администрација NAC-а уз цисплатину је имала користан ефекат на антиоксидативни капацитет у хипокампусу.

Утицајем NAC-а, вредности индекса липидне пероксидације TBARS су за разлику од групе која је третирана само цисплатином враћене на ниво који је забележен и у контролној групи (слика 4.21). Такође NAC је неутралисао дејство цисплатине на антиоксидативне ензиме и вратио капацитет SOD (слика 4.22) и CAT (слика 4.23) на ниво који је забележен у контролној групи.

Ови резултати су у складу са претходно описаним корисним ефектима суплементације антиоксидантима из различитих извора, на неуротоксичне манифестације индуковане цисплатином (153, 160).

Утицај терапијских протокола на промене параметара апоптотске активности (промена)

Примена цисплатине у једнократној дози од 7.5 mg/kg остварила је значајан про-апоптотски ефекат на нивоу ПФК-а. Наиме, анализом ткива ПФК-а у групи која је третирана искључиво цисплатином, показано је појачање про-апоптотских механизма квантификовано кроз повећање релативне генске експресије за Вах у односу на контролну групу (слика 4.25) и слабљење анти-апоптотске активности квантификоване смањењем релативне генске експресије за Bcl-2 (слика 4.26). Последишно, однос

релативне генске експресије за Вах и Bcl-2 је био повећан (слика 4.27) што је, такође, потврђивало про-апоптотски ефекат цисплатине.

Ово запажено про-апоптотско деловање цисплатине је у корелацији са резултатима из студија које су већ бавиле утицајем цисплатине на апоптотке механизме (163).

Анализом маркера апоптотке активности у ПФК-у групе која је третирана цисплатином и NAC-ом је показано да је NAC успешно умањио про-апоптотско деловање цисплатине. У односу на групу која је третирана само једнократном дозом цисплатине, у овој групи се бележи смањење релативне генске експресије за Вах (слика 4.25), повећање релативне генске експресије за Bcl-2 (слика 4.26) као и смањење односа релативне генске експресије за Вах и Bcl-2 (слика 4.27) чиме је показан већ потврђени користан ефекат NAC-а код неуротоксичних манифестација изазваних лековима на бази платине (162).

Анализа маркера апоптотске активности у ткиву хипокампуса групе која је третирана једнократном дозом цисплатине од 7.5 mg/kg је показала такође про-апоптотски ефекат цисплатине. Иако није забележен значајан раст релативне експресије иРНК за Вах (слика 4.28) смањење анти-апоптотског потенцијала изражено кроз смањење релативне генске експресије за Bcl-2 (слика 4.29), било је довољно за померање про-/анти- апоптотске равнотеже у меру појачања апоптозе (слика 4.30). Ови резултати у начелу корелирају са студијама које су показале про-апоптотско дејство цисплатине на хипокампус глодара (164), ћелијске културе (165) и на ћелије хуманог неуробластома (166). Разлог због чега у овом истраживању није било значајнијег повећања проапоптотских маркера (Вах) у хипокампусу под дејством цисплатине могао би да лежи у томе да примењена доза цисплатине није била довољна да за 5 дана изазове значајнији пораст про-апоптотских маркера у хипокампусу. Такође, могао би да се изведе закључак да пад анти-апоптотских маркера у хипокампусу представља бржи одговор нервног система у односу на пораст про-апоптотских маркера при дејству цисплатине.

Према очекивању, примена NAC-а је смањила про-апоптотски утицај цисплатине на хипокампус. У групи која је третирана цисплатином и NAC-ом забележен је пораст релативне генске експресије за Bcl-2 (слика 4.29) као и смањење односа релативне генске експресије за Вах и Bcl-2 (слика 4.30) у односу на групу која је третирана само цисплатином. Добијени резултати су били у складу са студијама које су се бавиле утицајем антиоксиданата из различитих извора на неуротоксичне манифестације дејства цисплатине (153, 160).

Анализа међусобног односа резултата добијених у бихевиоралним тестовима и испитивању оксидативног баланса и апоптотске активности у хипокампусу

Анализом резултата различитих испитивања из овог истраживања може се уочити неколико правилности које могу помоћи при доношењу коначног закључка о повезаности различитих процеса којим се ово истраживање бави.

Проксидативно дејство цисплатине се ублажава применом NAC-а који своје антиоксидативно дејство остварује различитим механизмима. Један од начина подразумева и утицај NAC-а на експресију гена који су под утицајем цисплатине, као што је Nrf2 (главни заштитни фактор против оксидативног стреса) (167). Оксидативни

стрес додатно промовише штетне ефекте цисплатине тако што фаворизује ослобађање проинфламаторних цитокина (168). Једном покренута неуронфламаторна каскада може довести до опадања нивоа неуротрофичног фактора пореклом из мозга (BDNF) (169) са последичним смањењем волумена хипокампуса што може бити узрок промена понашања какве су забележене у овом истраживању (170). Ова узајамна повезаност се може бројчано поткрепити снажном корелацијом између липидне пероксидације (слика 4.34) и активности антиоксидативних ензима SOD (слика 4.35) и CAT (слика 4.36) у хипокампусу са најважнијим показатељем анксиозности у понашању уоченим у овом истраживању.

Према резултатима добијеним у овом истраживању, чини се да спречавањем оксидативног оштећења употребом NAC-а такође може смањити оштећење ДНК изазвано цисплатином и стога може умањити апоптотско деловање цисплатине. Као што је приказано на слици 4.30, повећана пероксидација липида праћена је смањењем антиапоптотских механизма у хипокампусу, док је смањење антиоксидативног капацитета квантификовано кроз активност SOD (слика 4.32) и CAT (слика 4.33) у снажној корелацији са преваленцијом про-апоптотских механизма.

Анализом међусобног односа између про-/анти- апоптотске равнотеже и промена понашања добијена је значајна повезаност анксиогеног обрасца понашања и повећања проапоптотских параметара (4.37). Та повезаност могла би да буде основа за повезаност апоптозе и манифестација понашања код неуролошких поремећаја (171).

Иако је доказано да су различити региони мозга одговорни за регулацију расположења (172, 173), већина студија на пољу промена понашања фокусирана је на хипокампус (174, 175). Ипак, постоје студије које показују да повећана оксидативна оштећења у свим специфичним деловима мозга одговорним за регулацију расположења корелирају са поремећајима расположења (176, 177). Иако се резултати поменутих истраживања поклапају са резултатима наших истраживања анализирајући дефинитивно постигнуте промена расположења, тешко је упоређивати их са нашим резултатима. Разлог лежи у разликама у методологији и експерименталном моделу који постоји у тим студијама за разлику од нашег истраживања где је коришћен јатрогени узрочник са хемиотерапијским дејством.

6. ЗАКЉУЦИ

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 хомогенатима ткива хипокампуса и префронталног кортекса пацова
- Једнократна примена цисплатине у дози од 7.5 mg/kg за последицу има снажно повећање степена анксиозности, док су за дефинитивни закључак о депресантном ефекту потребна додатна испитивања.
- Симултана примена N-ацетилцистеина у дози од 500 mg/kg поновљеној првог и петог дана уз цисплатину примењену у једнократној дози од 7.5 mg/kg, смањује степен оксидативног оштећења и апоптозу изазвану цисплатином у хомогенату ткива хипокампуса и префронталног кортекса пацова.
- Симултана примена N-ацетилцистеина у дози од 500 mg/kg поновљеној првог и петог дана уз цисплатину примењену у једнократној дози од 7.5 mg/kg, смањује степен анксиозности и депресивности изазваних цисплатином код пацова
- Примена N-ацетилцистеина у дози од 500 mg/kg поновљеној првог и петог дана не изазива промене у понашању као ни промене параметара оксидативног стреса и апоптотске активности код пацова.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019; 88:102925. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
2. Peyrone M. “Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür” [On the action of ammonia on platinum chloride], *Ann. Chem. Pharm.* 1844; 51 1–29.
3. Barry N, Sadler P. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure Appl. Chem.* 2014, 86 1897-1910.
4. 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. doi: 10.1038/205698a0.
5. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969; 222(5191):385-386. doi: 10.1038/222385a0.
6. 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. doi: 10.1016/s0041-008x(73)80009-2.
7. Hanif, M., & Hartinger, C. G. Anticancer metallodrugs: where is the next cisplatin? *Future Medicinal Chemistry*, 2018; 10(6), 615–617. doi:10.4155/fmc-2017-0317
8. 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.
9. 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.
10. 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. doi: 10.1378/chest.128.4.2268.
11. 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. doi: 10.1200/JCO.2001.19.1.119.
12. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47):7265-79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933.
13. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(7):502-16. doi: 10.1038/nrc1123.
14. 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):819-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.047.
15. Carter, S. K. Cisplatin — Past, Present and Future. *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, 1984; 4: 359–76. doi:10.1007/978-1-4613-2837-7_28

16. 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.
17. More S.S., Akil O., Ianculescu A.G., et al. Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *J. Neurosci*. 2010; 30: 9500-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1544-10.2010.
18. el Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ and Bolton AM. *J. Inorg. Biochem.* 1999, 77, 13–21. doi: 10.1016/s0162-0134(99)00146-4.
19. Kelland LR, Mistry P, Abel G, Loh SY, O'Neill CF, Murrer BA and Harrap KR. *Cancer Res.*, 1992; 52: 3857–64.
20. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47):7265-7279. doi: 10.1038/sj.onc.1206933.
21. 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.
22. Hanif, M., & Hartinger, C. G. Anticancer metallodrugs: where is the next cisplatin? *Future Medicinal Chemistry*, 2018; 10(6), 615–617. doi:10.4155/fmc-2017-0317
23. Cheff DM, Hall MD. A drug of such damned nature. Challenges and opportunities in translational platinum drug research. *J. Med.Chem.* 2017; 60(11): 4517–4532. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01351.
24. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted pt(II) agents, nanoparticle delivery, and pt(IV) prodrugs. *Chem. Rev.* 2016; 116(5): 3436–3486 doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00597.
25. Basu U, Banik B, Wen R, Pathak RK, Dhar S. The Platin-X series: activation, targeting, and delivery. *Dalton Trans.* 2016; 45(33):12992–13004 doi: 10.1039/c6dt01738j.
26. Hanif M, Babak MV, Hartinger CG. Development of anticancer agents: wizardry with osmium. *Drug Discov. Today* 2014; 19(10): 1640–1648. doi: 10.1016/j.drudis.2014.06.016.
27. Jaouen G, Vessieres A, Top S. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44(24): 8802–8817 doi: 10.1039/c5cs00486a.
28. Keith Parker; Laurence Brunton; Goodman, Louis Sanford; Lazo, John S.; Gilman, Alfred. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York: McGraw-Hill. 2006; 154-188 ISBN 0071422803.
29. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin.Nephrol.* 2003; 23:460–464. doi: 10.1016/s0270-9295(03)00089-5.
30. Juo P., Kuo C.J., Yuan J., Blenis J.. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 1998;8:1001-8. doi: 10.1016/s0960-9822(07)00420-4.
31. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996;93:14486-91. doi: 10.1073/pnas.93.25.14486.

32. Ramesh G., Reeves W.B. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005;289:F166-74. doi: 10.1152/ajprenal.00401.2004.
33. Lee R.H., Song J.M., Park M.Y., et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem. Pharmacol.* 2001;62:1013-23. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00748-1.
34. Jiang M., Wei Q., Wang J., et al. Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene* 2006;25:4056-66. doi: 10.1038/sj.onc.1209440.
35. Seth R., Yang C., Kaushal V., et al. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J. Biol. Chem.* 2005;280:31230-39. doi: 10.1074/jbc.M503305200
36. Santabarbara, G., Maione, P., Rossi, A., & Gridelli, C. Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of Cisplatin chemotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2015; 17(4):561–570. doi:10.1517/14656566.2016.1122757
37. Kim, H.J., Lee, J.H., Kim, S.J. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J. Neurosci.* 2010;30:3933-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6054-09.2010.
38. Santabarbara, G., Maione, P., Rossi, A., & Gridelli, C. Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of Cisplatin chemotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2015;17(4): 561–570. doi:10.1517/14656566.2016.1122757
39. 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. doi: 10.1111/1759-7714.12891.
40. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol.Res.* 2006; 53:278–286. doi: 10.1016/j.phrs.2005.12.005.
41. 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. doi: 10.1016/j.cbi.2007.07.014.
42. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J.Biochem.Mol.Biol.* 2006; 39:656–661. doi: 10.5483/bmbrep.2006.39.6.656.
43. 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. doi: 10.1016/j.tox.2006.11.073.
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. doi: 10.1002/jat.1103.
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. 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; 5:22-29. doi: 10.1186/jbiol50.
48. 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. doi: 10.1111/jnc.13978.
49. 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):15-54 doi: 10.1515/SJECR-2017-0053.
50. Chiorazzi A, Semperboni S, Marmioli P. Current view in platinum drug mechanisms of peripheral neurotoxicity. *Toxics* 2015; 3: 304-321. doi: 10.3390/toxics3030304
51. 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.
52. 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.
53. Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci Lett* 2015; 596: 90-107. doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.014.
54. Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, et al. Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J Neurosci* 2007;27:9451-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0523-07.2007.
55. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica (Cairo)* 2012; 3:456-549. doi: 10.6064/2012/473829.
56. Avan A, Postma TJ, Ceresa C, et al. Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. *Oncologist.* 2015 Apr;20(4):411-32. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0044.
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. doi: 10.1016/j.neuro.2006.04.010.
58. Englander E.W. DNA damage response in peripheral nervous system: coping with cancer therapy-induced DNA lesions. *DNA Rep. (Amst)* 2013;12:685-90. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.020.
59. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells, *Cancer Res.* 2002;62:3899-4902.

60. Jiang Y, Guo C, Vasko MR, Kelley MR. Implications of apurinic/aprimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons, *Cancer Res.* 2008;68:6425-34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1173.
61. Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat. Res.* 1999;434:137-48. doi: 10.1016/s0921-8777(99)00025-7.
62. 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. doi: 10.1016/j.nbd.2010.11.017
63. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPasmitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2. *Nat. Genet.* 2004;36:449-51 doi: 10.1038/ng1341.
64. Grunberg SM, Sonka S, Stevenson LL, Muggia FM. Progressive paresthesias after cessation of therapy with very high-dose cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1989;25:62-64. doi: 10.1007/BF00694340.
65. 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.
66. 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.
67. 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. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0044.
68. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother Res Pract* 2011; 2011: 843019. doi: 10.1155/2011/843019.
69. 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
70. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press. 2015; 2: 68-111
71. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 2005;12: 1161–1208. doi: 10.2174/0929867053764635.
72. 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
73. Cadenas, E., & Sies, H. The lag phase. *Free. Radic. Res.*, 1998; 28: 601–609. doi: 10.3109/10715769809065816.
74. Kovacic, P., Pozos, R. S., Somanathan, R., Shangari, N., & O'Brien, P. J. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 2601–2623. doi: 10.2174/092986705774370646.

75. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*,2004; 266: 37–56. doi: 10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89.
76. De Grey, A. D. N. J. HO₂•: The forgotten radical. *DNA Cell Biol.*,2002; 21: 251–257. doi: 10.1089/104454902753759672.
77. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *J. Mol. Biol.*,2000; 304: 55–68. doi: 10.1006/jmbi.2000.4173.
78. Nakamura H, Nakamura K, Yodai J. Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:351-369. DOI:10.1146/annurev.immunol.15.1.351
79. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 2015;5:27986. DOI: 10.1039/c4ra13315c
80. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*. 1997;4:324-31. doi: 10.1042/bj3240001.
81. Limón-Pacheco J, Gonsébat 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):137-47. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015.
82. Klatt, P., & Lamas, S. Regulation of protein function by Sglutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur.J. Biochem.*, 2000; 267: 4928–4944. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01601.x.
83. Ghafourifar, P., & Cadenas, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005;26: 190–195. doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005.
84. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., & Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*,1999; 65: 1865–1874. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00439-7.
85. Santos-Sánchez N., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C. and Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism 2011; 3: 122-56 DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85270>
86. Fridovich I. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press; 1976 ; Vol. 1. 15-89.
87. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., 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
88. Becker, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.*, 2004;61: 461–470. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.10.025.
89. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000; 18(6):655-673. doi: 10.1097/00004872-200018060-00002.
90. Rice-Evans C. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. In: *Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction*. London: Portland Press. 1995; 1:1-32.

91. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:239-267. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851.
92. Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging*, 2002;23: 655–664. doi: 10.1016/s0197-4580(01)00340-2.
93. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992;256: 184–185. doi: 10.1126/science.1566067.
94. Sayre, L. M., Smith, M. A., & Perry, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8: 721–738. doi: 10.2174/0929867013372922.
95. Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001;30: 1191–121
96. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry.* 1995;64:97-112.DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
97. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research.* 2005;79:157-165. DOI: 10.1002/jnr.20280
98. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical Journal.* 1984;222: 649-655. DOI: 10.1042/bj2220649
99. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2004;61:192-208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5
100. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis.* 2004;8:141-149. DOI: 10.2165/00066982-200408030-00001
101. Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. . Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.*, 2004; 104: 6255–6285. doi: 10.1021/cr0406559.
102. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005;16: 577–586. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
103. Holdiness MR Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine 1991 Feb;20(2):123-34 DOI: 10.2165/00003088-199120020-00004
104. Flanagan RJ, Meredith TJ. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):131S-139S. doi: 10.1016/0002-9343(91)90296-a.
105. Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JAJH, Stewart M J, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J* 1979; 2: 1097-100. doi: 10.1136/bmj.2.6198.1097.
106. Meredith T, Caisley J, Volans G. Emergency drugs: agents used in the treatment of poisoning. *Br Med J* 1984; 289: 742-748. doi: 10.1136/bmj.289.6447.742.

107. Prescott LE Paracetamol overdose: pharmacological considerations and clinical management. *Drugs* 1983; 25: 290-314.
108. Bronstein AC, Linden CH, Hall AH, et al. Intravenous N-acetylcysteine for acute acetaminophen poisoning. *Vet Hum Toxicol* 1985; 27: 316-24.
109. Smilkstein M J, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multi- center study (1976 to 1985). *N Engl J Med* 1988; 319: 1557-62. doi: 10.1056/NEJM198812153192401.
110. Unverferth DV, MehegabJP, NelsonRW, Scott CC, Leier CV, et al. The effeciacy of N-acetylcysteine in preventing doxorubicin induced cardiomyopathy in dogs. *Seminar in Oncology* 1983a;10: 2-6,
111. Unverferth DV, Fertel RH. Balcerzak SP. Magorien RD, O'Dorisio MS. N-acetylcysteine prevents the doxorubicin induced decrease of cyclic GMP. *Seminars in Oncology* 1983b; 10; 49-52,.
112. Morgan LR, Donley PJ. Harison EF. Hunter HL. Protective efect of N-acetylcysteine on the urotoxicity produced by oxazaphosphosine with anticancer activity. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*1982; 18: 113-114 doi: 10.1016/0277-5379(82)90035-9.
113. Flanagan RJ. The role of acetylcysteine in clinical toxicology. *Med Toxicol* 1987; 2: 93-104. doi: 10.1016/0002-9343(91)90296-a.
114. Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 2016;151:359-363. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003.
115. Djukic MM, Jovanovic MD, Ninkovic M, Stevanovic I, Ilic K, Curcic M, Vekic J, Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem.-Biol. Interactions* 2012; 199:74–86. doi: 10.1016/j.cbi.2012.05.008.
116. Correa F., E. Ljunggren, C. Mallard, M. Nilsson, S.G. Weber, M. Sandberg, The Nrf2-inducible antioxidant defense in astrocytes can be both up-and downregulated by activated microglia:involvement of p38 MAPK, *Glia* 59 2011;44: 785–799. doi: 10.1002/glia.21151.
117. Borgstrom L. Kagedal B. Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1986; 31: 217-222. doi: 10.1007/BF00606662.
118. Klein-Schwartz W, Oderda GM Adsorption of oral antidotes for acetaminophen poisoning (methionine and N-acetylcysteine) by activated charcoal. *Clinical Toxicology* 1981; 18: 283-290. doi: 10.3109/15563658108990038.
119. Sheffncr AL. Medler EM. Bailey KR, Gallo DG, Mueller AJ, et al. Metabolic studies with acetylcysteine. *Biochemical Pharmacology* 1966;15: 1523-1535, doi: 10.1016/0006-2952(66)90197-3.
120. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1988;34: 77-82, doi: 10.1007/BF01061422.
121. Prescott LF, Donovan JW, Jarvie DR, Proudfoot AT. The disposition and kinetics of intravenous N-acetylcysteine in patients with paracetamol overdosage. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 37: 501-6. doi: 10.1007/BF00558131.

122. Borgstrom L, Kage. Edal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 31: 217-22. doi: 10.1007/BF00606662.
123. Bonanomi L, Gazzaniga A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine, *European Journal of Respiratory Disease* 1980; 61 (Suppl. 11); 45-51,
124. Omara FO, Blakley BR, Bermier J, Fournier M. Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro. *Toxicology* 1997; 116: 219–226. doi: 10.1016/s0300-483x(96)03520-2.
125. Emet S, Memis D, Pamukçu Z. The influence of N-acetyl-L-cystein infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. *Critical Care* 2004; 8: 172–179. DOI: 10.1186/cc2866
126. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004; 76: 519 –527. doi: 10.1002/jnr.20087.
127. Lasram M M, Jrad Lamine A, Bini Dhouib I, Bouzid K, Annabi A, Belhadjhmida N, Ben Ahmed M, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. *Life Sciences* 2014b; 107 (1–2): 50-58 doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.033. Epub 2014 May 5.
128. Ribeiro G, Roehrs M, Bairros A, Moro A, Charão M. N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats. *Drug Chem Toxicol* 2011; 34: 467-474. doi: 10.3109/01480545.2011.564179.
129. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2009; 80: 265–269.
130. Diniz YS, Rocha K, Souza G, Galhardi C, Ebaid G, Novelli Filho JL, Cicogna AC, Novelli ELB. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 543: 151–157. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.039. Epub 2006 Jun 2.
131. Izadia F, Jafarib M, Asgarib A, Salehib M. Protective role of N-acetyl-cysteine on diazinon induced oxidative stress in rat kidney. 12th Iranian Congress of Biochemistry & 4th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Mashhad, Iran, 2011; 44(13):6-9.
132. El-Bini Dhouib I, Lasram MM, Abdeladhim M, Gharbi N, Ben Ahmed M, El-Fazaa S. Immunosuppression and oxidative stress induced by subchronic exposure to carbosulfan in rat spleen; Immunomodulatory and antioxidant role of N-acetylcysteine. *Toxicol Mech Methods* 2014; 24: 417–427. doi: 10.3109/15376516.2014.928764.
133. Miller LF & Rumack BH. Clinical safety of high oral doses of acetylcysteine. *Seminars in Oncology* 1983;10:76-85.
134. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol containing antioxidant; N-acetylcysteine. *Respiration* 50 1986;(Suppl. 1); 31-42. doi: 10.1159/000195086.

135. Cotgreave IA, Eklund A, Larson K, Moldeus P. No penetration of orally administered N-acetylcysteine into bronchoalveolar lavage fluid. *European Journal of Respiratory Diseases* 1987;70: 73-77.
136. Arsenijevic N, Selakovic D, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, Mitrovic S, Milenkovic J, Milanovic P, Vasovic M, Markovic SD, Zivanovic M, Grujic J, Jovicic N, Rosic G. The Beneficial Role of *Filipendula ulmaria* Extract in Prevention of Prodepressant Effect and Cognitive Impairment Induced by Nanoparticles of Calcium Phosphates in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6670135. doi: 10.1155/2021/6670135.
137. Kumburovic I, Selakovic D, Juric T, Jovicic N, Mihailovic V, Katanic Stankovic J, et al. Antioxidant Effects of *Satureja hortensis* L. Attenuate the Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8307196. doi: 10.1155/2019/8307196.
138. Vukovic R, Kumburovic I, Joksimovic Jovic J, Jovicic N, Katanic Stankovic JS, Mihailovic V, et al. N-Acetylcysteine Protects against the Anxiogenic Response to Cisplatin in Rats. *Biomolecules*. 2019; 9(12): 892. doi: 10.3390/biom9120892.
139. McGuire WP 3rd, Markman M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br J Cancer*. 2003; 89 Suppl 3:S3-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6601494.
140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. 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. doi: 10.1002/(sici)1099-1611(200001/02)9:1<29::aid-pon428>3.0.co;2-z.
144. 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. doi: 10.1159/000416209.
145. 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. doi: 10.2165/00003495-200363150-00003.
146. 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. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.046.
147. 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.

148. 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.
149. 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. doi: 10.2147/DDDT.S191240.
150. 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. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.051.
151. Shabani, M.; Nazeri, M.; Parsania, S.; Razavinasab, M.; Zangiabadi, N.; Esmaeilpour, K.; Abareghi, F. Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2012, 33, 1314–1321. doi: 10.1016/j.neuro.2012.08.004.
152. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol Behav*. 2014; 135:55-71. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.032.
153. 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. doi: 10.1016/j.ntt.2012.06.002.
154. Kumburovic I, Kumburovic D, Vujovic S, Rajković Z, Veličković S. The Effects of *Satureja hortensis* L. Extract on Cisplatin-induced Behavioral Alterations in the Tail Suspension Test. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2019. DOI: 10.2478/sjecr-2019-0029
155. Fee C, Banasr M, Sibille E. Somatostatin-positive gamma-aminobutyric acid interneuron deficits in depression: cortical microcircuit and therapeutic perspectives. *Biological Psychiatry*. 2017; 82: 549–559. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.05.024.
156. Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, et al. Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. *Neuron*. 2016; 89: 857–866. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.011.
157. Adhikari A, Lerner TN, Finkelstein J, Pak S, Jennings JH, Davidson TJ, et al. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature*. 2015; 527: 179–185. doi: 10.1038/nature15698.
158. Moda-Sava RN, Murdock MH, Parekh PK, Fetcho RN, Huang BS, Huynh TN, et al. Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*. 2019; 364: 147. doi: 10.1126/science.aat8078.
159. Almutairi MM, Alanazi WA, Alshammari MA, Alotaibi MR, Alhoshani AR, Al-Rejaie SS, et al. Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17(1): 472. doi: 10.1186/s12906-017-1976-9.
160. Owoeye O, Adedara IA, Farombi EO. Pretreatment with taurine prevented brain injury and exploratory behaviour associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 102: 375-384. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.051.
161. Jangra A, Kwatra M, Singh T, Pant R, Kuswah R, Ahmed S, et al. Edaravone alleviates cisplatin-induced neurobehavioral deficits via modulation of oxidative stress and

- inflammatory mediators in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*. 2016; 791: 51- 61. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.08.003.
162. Stankovic JSK, Selakovic D, Mihailovic V, Rosic G. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Neurotoxicity Induced by Platinum-Based Chemotherapeutics—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20): 7753. doi: 10.3390/ijms21207753.
163. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2016;1863(12): 2977-2992. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
164. Manohar, S.; Jamesdaniel, S.; Salvi, R. Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes. *Neurotox. Res.* 2014, 25, 369–380. doi: 10.1007/s12640-013-9443
165. 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: 150-52. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.52.
166. 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. doi: 10.1023/b:neon.0000021787.70029.ce.
167. 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 Dec 10;28(50):13574-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4099-08.2008
168. 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. doi: 10.1037/a0017401.
169. 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. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.031.
170. Eisch, A.J. Adult neurogenesis: Implications for psychiatry. *Prog. Brain Res.* 2002, 138, 315–342. doi: 10.1016/S0079-6123(02)38085-3.
171. Mattson, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, 1, 120–130. doi: 10.1038/35040009.
172. 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 Nov 15;1723:146392. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146392.
173. De Bruin, J.P.; Sánchez-Santed, F.; Heinsbroek, R.P.; 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 Aug 1;652(2):323-33. doi: 10.1016/0006-8993(94)90243-7.

174. 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.; et al. 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. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112245.
175. 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 Feb 7;13:19. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00019.
176. 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.
177. 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. doi: 10.12965/jer.130005.

СКРАЋЕНИЦЕ

SOD – супероксид-дисмутаза

CAT – каталаза

GSH – глутатион

ОП 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

УКЛ – 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

ТКР – тест качења за реп

ВППИ – време до појаве прве имобилности

БЕИ – број епизода имобилности

УВИ – укупно време имобилности

ТВАРС – тиобарбитурна киселина

TNF α – tumor necrosis faktor α

TNF 1 – tumor necrosis faktor 1

ЦНС – централни нервни систем

ПНС – периферни нервни систем

NER – nucleotid excision repair

BER – basis excision repair

АТР – аденозин трифосфат

ROS – reactive oxygen species

RNS - reactive nitrogen species

ГПК – глутатион пероксидаза

CAT – каталаза

GSSG – глутатион дисулфид

i.p. – интраперитонеално

УВЦЗ – укупно време у централној зони

иРНК – информациона рибонуклеинска киселина

ПФК – префронтални кортекс

БИОГРАФИЈА

Др Раде Вуковић је рођен 05. јула 1977. године у Прибоју, Република Србија. Основну школу и гимназију је завршио у Прибоју. Медицински факултет у Београду уписао је школске 1996/1997 године, а звање доктора медицине стекао је 2004. године. Након завршених студија обавио је обавезан приправнички стаж и положио стручни испит 2005. године у Београду.

Запошљава се у Војномедицинском центру у Београду као лекар опште праксе. Специјализацију из области Анестезиологије је уписао 2009. године на Војномедицинској академији у Београду и успешно завршио у року, 2013 године, са одличном оценом. У чин санитетског пуковника ванредно унапређен у јуну 2021. године због заслуга у формирању и раду Војне КОВИД болнице „Карабурма“. Тренутно запослен на Клиници за анестезиологију и интензивну терапију, ВМА у Београду.

Кандидат је објавио више радова као аутор или коаутор из области анестезиологије и експерименталне медицине у часописима који су на *SCI* листи.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2017/2018. године – изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положио је све испите предвиђене планом и програмом студија. Усмени докторски испит положио је у јулу 2019. године.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **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
2. **Vukovic R**, Selakovic D, Katanic Stankovic J., Kumburovic I, Jovicic N., Rosic G. Alteration of Oxidative stress and apoptotic markers alterations in the rat prefrontal cortex influence behavioral response induced by cisplatin and N-acetylcysteine in the tail suspension test. *J. Integr. Neurosci*. 2021 vol. 20(3), 711-718.
3. **Vukovic R**, Kumburovic I, Jovicic N, Velickovic S, Arnaut A, and Selakovic D. Antioxidant supplementation with N-acetylcysteine protects against cisplatin-induced motor impairment in rats. *Ser J Exp Clin Res*. 2019. In Press. DOI: 10.2478/sjecr-2019-0076
4. Selakovic D, Kumburovic I, **Vukovic R**, Katanic Stankovic J, Mihailovic V, Rosic G. Molecular mechanisms of behavioral manifestations of neurotoxicity induced by platinum-based chemotherapeutics: a beneficial role for antioxidant supplementation. *Biologia Serbica*, 2021, 43(1): 12-15.
5. Romić P, Nozić D, Surbatović M, Veljović M, Stojić M, **Vuković R**. Mechanical ventilation in patients with most severe forms of influenza A H1N1]. *Vojnosanit Pregl*. 2011;68(3):235-40. Doi: 10.2298/vsp1103235r. PMID: 21526552
6. **Vuković R**, Nešković V. Električna impedansna tomografija kao savremeni metod monitoringa regionalne respiratorne funkcije (Princip rada, klinička primena i dosadašnji rezultati), *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy* 2017, vol 39, br.5-6 str. 149-157.
7. **Vuković R.**, Petrović B., Konzervativno zbrinjavanje jatrogene povrede traheje. *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy* 2016, vol. 38, br. 1-2, str. 49-53
8. **Vuković R**. Strano telo u bronhu za donji levi režanj – specifičnosti anesteziološkog pristupa – strano telo u levom bronhu. , *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy* 2015, vol. 37, br. 5-6, str. 261-264,
9. Vasković I, Stamenković D., Stojić M., Nikolić N., **Vuković R.**, Nešković V. Rekrutment manevar u intraoperativnoj mehaničkoj ventilaciji - mogućnost prevencije atelektaze. *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy* 2016 , vol. 38, br. 5-6, str. 137-144,
10. Veljović M., Šurbatović M., Stojić M., **Vuković R**. Infekcija H1N1 virusom i mehanička ventilacija pluća - iskustvo Vojnomedicinske Akademije. *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy* 2014, vol. 36, br. 1-2, str. 139-143.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Раде Вуковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

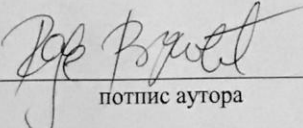
Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у третману манифестација неуротоксичности изазване цисплатином код пацова

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, 17.11.2021. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Раде Вуковић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у
третману манифестација 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

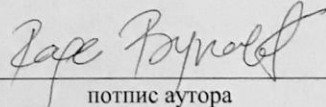
не дозвољавам¹

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 _____, 17.11.2021. 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/>